

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

**FAREDE SPERMATOGENEZ BOYUNCA
METİLASYON İMPRİNTLERİNİN
MEYDANA GETİRİLMESİNDE BORİS
GENİNİN ROLÜ**

Güler Leyla SATI

Doktora Tezi

Antalya, 2011

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

FAREDE SPERMATOGENEZ BOYUNCA METİLASYON İMPRİNTLERİNİN MEYDANA GETİRİLMESİNDE BORİS GENİNİN ROLÜ

Güler Leyla SATI

Doktora Tezi

**Tez Danışmanları
Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Dr. James MCGRATH**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2008.03.0122.004)

“ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 26/07/2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mustafa Faruk USTA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Münire ERMAN AKAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / /2011 tarih ve .. ./.. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul 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 (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

- 1- **Sati L.**, Ovari L., Bennett D., Simon S., Demir D., Huszar G. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. Reprod Biomed Online. 2008 Apr;16(4):570-9.
- 2- **Sati L.**, Seval-Celik Y, Unek G, Korgun ET, Demir R. The presence of kinesin superfamily motor proteins KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placenta. Placenta. 2009 Oct;30(10):848-54.
- 3- P Prinosilova, TF Kruger, **L Sati**, S Ozkavukcu, L Vigue, E Kovanci, G Huszar. Selectivity of hyaluronic acid binding by spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. Reprod Biomed Online. 2009 Feb;18(2):177-83.
- 4- Ovári L, **Sati L.**, Stronk J, Borsos A, Ward DC, Huszar G. Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. Fertil Steril. 2010 May 1;93(7):2255-61.

ÖZET

BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites; CTCFL), genetik olarak imprinte genlerin ekspresyonuna katılan bir proteindir. Ekspresyonu, erişkin vücudunda normal koşullar altında sadece testiste, bunun dışında malignant hücrelerde ve kök hücrelerde belirlenebilmiştir. Genlerin doğru bir şekilde ekspres olmasının, fertilizasyon ve sonrasında fetüsün gelişimi için ne kadar önemli olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmamızda, genetik mühendisliği teknikleriyle *Boris* gen ekspresyonunun değiştirildiği transgenik fareler kullanıldı. *Boris*'in normal spermatogenez, erkek fertilitesi (*in vivo* ve *in vitro* olarak) ve fetal büyüme ve yaşayabilirlik üzerindeki etkileri araştırılarak, *Boris*'in *H19/Igf2* bölgesi gibi önemli bir imprinting lokusunda doğru metilasyon imprintlerinin oluşmasındaki olası rolü ortaya konuldu.

Fare *Boris* geni mutant ve normal olmak üzere iki farklı formda, GFP (yeşil floresan protein) ve tetrasiklin (Tet) duyarlı element içeren iki yönlü Tet plasmidine (pTRE-Tight-BI-AcGFP1) klonlandı. Bu sistem *Boris* transgeni ekspresyonunun sadece testiste ve tetrasiklin analogu olan doksisisiklin varlığında görülebilmesine imkan sağladı. Elde edilen plasmid, fare zigotlarına enjekte edildi. Genotipleme ile tespit edilen kurucu (ata) *Boris* transgenik fareler, testise özgü ekspresyon için testis-spesifik promoterlerin bulunduğu *Protamin Cre* veya *Snaptomemal kompleks Cre* transgenik fare soyları ve indüksiyon için tetrasiklin-kontrollü transaktivatör protein (rtTA)'e sahip *rtTA* transgenik fare soyları ile çiftleştirildi. Doksisisiklin (2mg/ml) muamelesine tabi tutulan farelerin testislerinden RNA izolasyonu yapılarak kantitatif gerçek zamanlı PCR metodu uygulandı. Testis örnekleri ışık ve floresan mikroskopla incelendi. Proliferasyon indeksleri (PCNA) ve apoptotik hücre oranları hesaplandı. Bu fareler ile çiftleştirilen dişi farelerin gebelikleri doğuma kadar takip edilerek yavrulardaki embriyonik hasarlar değerlendirildi. Bisülfid sekanslama analizleri yapılarak *H19* DMD metilasyonu araştırıldı.

Çalışmamızın sonuçları, *Boris* transgenik fare soylarının fertil olduğunu ancak *Boris* proteini ve spermatogenez arasında potansiyel bir ilişki olabileceğini işaret etmektedir. Doksisisiklin ile muamele edilmiş mutant ve normal *Boris* transgenik fare yavruları, kontrol gruplarına göre daha düşük vücut ağırlığına sahip iken yüksek postnatal mortalite oranı göstermiştir. Etkilenen yavruların birçok organ yapısında büyüme geriliği tespit edilmiştir. Ayrıca yetişkin ve yavru *Boris* transgenik fare DNA'sında *H19* DMD metilasyonu kontrollere göre farklı bulunmuştur.

Çalışmamız, *Boris* geni ile embriyogenez ve fetal gelişim bozuklukları arasındaki ilişkiyi ortaya koyan literatürdeki ilk çalışmadır. Gelecek çalışmalarımız, embriyogenez boyunca *Boris* geninin anormal ekspresyonunun nasıl olup da normal gelişimi değiştirebildiğine dair olası mekanizmalar üzerinde yoğunlaşacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Boris*, transgenik fare, doksisisiklin, spermatogenez, fertilizasyon, embriyogenez bozuklukları

ABSTRACT

Brother of the Regulator of Imprinted Sites (BORIS; CTCFL) is a gene that has been implicated in the expression of genetically imprinted genes. In adult animals, it is normally expressed in the testes and is reactivated and expressed in many cancer cells and embryonic stem cells. However, it is well known that the appropriate gene expression is crucial for the fertilization and further fetal development. Therefore, we genetically engineered mice in such a way to allow expression of the *Boris* gene to determine its effects on spermatogenesis, male fertility (both *in vivo* and *in vitro*), fetal growth and viability and also the formation of methylation imprints in *H19/Igf2* locus.

The mouse *Boris* gene, two different forms as mutant and normal, was cloned into the Bidirectional Tet plasmid (pTRE-Tight-BI-AcGFP1) that contains GFP and a tetracycline (Tet) responsive element which permits expression of the *Boris* transgene when doxycycline is present in the drinking water. This plasmid was injected into mouse zygotes to create the transgenic strains. Mice born from injected zygotes were screened by PCR to determine founder lines. These mice were then bred to transgenic strains that carry testis specific promoters, *Protamine Cre* or *Synaptonemal complex Cre*, and tetracycline controlled transactivator protein (*rtTA*) for the ectopic gene induction. The triple transgenic mice were then administered of a 2-3 month course of doxycycline (2mg/ml supplemented with %5 sucrose) in drinking water. RNA samples were extracted from testis and quantitative real time PCR method (qRT-PCR) was performed. Testis samples were further evaluated by light and fluorescein microscopy and proliferative index (PCNA) and percentage of apoptotic cells were calculated. Females bred to such males and who were on doxycycline during the pregnancy were allowed to give birth and altered embryonic defects in the offspring were analyzed. Bisulfite sequencing was performed to analyze *H19* DMD methylation status.

Our results showed that both *Boris* transgenic mice were fertile but there was a potential relation between *Boris* and spermatogenesis. The offspring from doxycycline fed mutant and normal *Boris* transgenic mice were smaller with a higher postnatal mortality rate compared to that of control mice. The affected pups, confirmed by genotyping, showed retarded growth in most organs. In addition, *H19* DMD methylation status was found to be significantly different than controls with the adult and offspring DNA samples.

Our study is of importance for being the first to investigate the possible relationship between BORIS and embryogenesis defects and fetal development. Future work will focus on possible mechanisms for how the *Boris* gene, when aberrantly expressed during embryogenesis could alter normal development.

Keywords: *Boris*, transgenic mice, doxycycline, spermatogenesis, fertilization, embryogenesis defects

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleşmesinde;

Danışman hocalarım Prof. Dr. Ramazan DEMİR ve Dr. James MCGRATH’a tezimin gerçekleşmesi için göstermiş oldukları maddi ve manevi destekleri için;

Yale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Karşılaştırmalı Tıp, Hayvan Genomiks Birimi yetkilileri ve değerli çalışanlarına her türlü teknik ve bilimsel katkılarından dolayı;

Yale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Karşılaştırmalı Tıp, Patoloji Laboratuvar çalışanları ve özellikle birim başkanı Dr. Caroline J. Zeiss’a patolojik dokuların incelenmesindeki değerli katkılarından dolayı;

Tez projemin bir bölümünü Yale Üniversitesi, Tıp Fakóltesi laboratuvarlarında tamamlamama destek olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı’na (BİDEB);

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’ndaki tüm Hocalarıma ve arkadaşlarıma tezimi Yale Üniversitesi’nde tamamlamam için göstermiş oldukları toleransları ve destekleri için;

Sevgili ailemin tüm fertlerine, bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tüm imkânlar için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
EKLER	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tarihsel Yaklaşım	4
2.2. Gametogenez	5
2.2.1. Memeli Spermatogenezi	5
2.3. Testisin Genel Yapısı	6
2.3.1. Seminifer Tübüller	7
2.3.2. Sertoli Hücreleri	8
2.3.3. Leydig Hücreleri	9
2.3.4. Peritübüler Miyoid Hücreler	9
2.4. Germ Hücreleri ve Oluşum Süreci	9
2.4.1. Spermatogoniya	10
2.4.2. Spermatositler	10
2.4.3. Spermatidler	12
2.5. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü	14
2.6. Epigenetik Mekanizmalar	16
2.6.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi	18
2.6.1.1. Primordiyal Germ Hücrelerinde (PGH) Metilasyon	19
2.6.1.2. Spermatogenezde DNA Metilasyon Değişiklikleri	20
2.6.1.3. Erişkin Testisinde Metilasyon	20
2.6.1.4. Fertilizasyonda Metilasyon	21
2.6.2. Histon Modifikasyonları	21
2.7. Genetik İmprinting	22
2.7.1. İmprinte Genlerin Genel Özellikleri	23
2.8. DNA Metilasyon Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Teknikler	24
2.8.1. Özgül Olmayan Metilasyon Analizi	24
2.8.2. Dizi-özümlü Metilasyon Analizi	24
2.9. CCCTC Bağlanma Faktörü (CTCF)	25

2.10.	BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites)	26
2.10.1.	BORİS ve Kanseri İlişkisi	28
2.10.2.	BORİS ve Epigenetik	29
2.11.	Genetik Bozukluklar ve Yeni Nesil	30
GEREÇ VE YÖNTEM		32
3.1.	Transgenik <i>Boris</i> Genine Sahip Fare Soyları	32
3.1.1.	Mutant <i>Boris</i> Transgeni	32
3.1.2.	Normal <i>Boris</i> Transgeni	32
3.2.	Transgenik <i>Boris</i> Genine Sahip Fare Soylarının Oluşturulması	33
3.2.1.	Etkili Transgenik Ekspresyon Konstraktının Dizayn Edilmesi	33
3.2.1.1.	Liyofilize Halde Alınan Konstraktların Yeniden Oluşturulması (rekonstitüsü)	34
3.2.1.2.	pUC19 Vektörünün <i>E.coli</i> DH5α Bakterisine Transformasyonu	34
3.2.1.3.	Vektör İçeren Bakteri Kolonisinin Belirlenmesi	35
3.2.1.4.	Plasmid DNA'sının İzolasyonu	35
3.2.1.5.	Mutant ve Normal <i>Boris</i> DNA'sının Mini Prep Örneklerinde Dizi Özgüllüğünün Doğrulanması	37
3.2.1.6.	Mutant ve Normal <i>Boris</i> Transgeninin pTRE-Tight-BI-AcGFP1 Vektörüne Klonlanması	37
3.2.1.7.	Agaroz Jelin Hazırlanışı	39
3.2.1.8.	Agaroz Jelden DNA Fragmentlerinin Ekstraksiyonu	40
3.2.2.	Pronükleer Mikroenjeksiyon İçin Yüksek Saflıkta DNA Eldesi	41
3.2.3.	Pronükleer Mikroenjeksiyon ve Embriyo Transferi	41
3.2.4.	Potansiyel Kurucu (founder) Farelerin Tespiti İçin Yavrulardan Kuyruk DNA'sı İzolasyonu ve Genotipleme	42
3.2.4.1.	DNA Örneklerinin İzolasyonu	43
3.2.4.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metodu ile Genotipleme	44
3.2.5.	Kurucu Fare Soylarının Çoğaltılması	45
3.3.	<i>Boris</i> -Tetrasiklin-GFP Transgenlerinin Testise Özgü Ekspresyonunun Sağlanması	45
3.4.	Üçlü <i>Boris</i> Transgenik Farelerin Genotiplemesi	47
3.5.	Ektopik Gen Ekspresyonunun İndüksiyonu	48
3.6.	Dokuların Toplanması	49
3.7.	Işık Mikroskopik Değerlendirmeler	49
3.8.	Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)	49
3.8.1.	RNA İzolasyonu	49
3.8.2.	qRT-PCR	51
3.9.	İmmünofluoresan Değerlendirme	52
3.10.	İmmünohistokimyasal Değerlendirme	52
3.11.	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-aracılı dUTP Nick End Labeling (TUNEL)	53
3.12.	<i>Boris</i> Transgenik Farelerin Fertilité/İnfertilité Durumu	55
3.12.1.	<i>In vivo</i> Fertilizasyon	55
3.12.2.	<i>In vitro</i> Fertilizasyon	55
3.12.2.1.	Süperovulasyon ve Ovosit Toplanması	55
3.12.2.2.	Fare Spermilerinin Hazırlanması	55

3.12.2.3.	Fare İn Vitro Fertilizasyonu (IVF)	56
3.13.	Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	56
3.13. 1.	Spermden Genomik DNA'nın İzolasyonu	57
3.13.2.	DNA'nın Bisülfıt ile Muamelesi	58
3.13.3.	Bisülfıt ile Muamele Edilmiş DNA'nın Temizlenmesi	59
3.13.4.	Bisülfıt ile Muamele Edilmiş DNA'nın PCR ile Amplifikasyonu	60
3.13.5.	<i>H19</i> DMD PCR Ürünlerinin pCR [™] 4-TOPO [®] TA Vektörüne Klonlanması	61
3.13.5.1.	<i>H19</i> DMD PCR Ürünlerinin Elektrokompotent One Shot [®] TOP10 <i>E. coli</i> Hücrelerine Transformasyonu	61
3.13.5.2.	Plasmid DNA'sının Bakteriden Uzaklaştırılması ve Sekans Analizi	62
3.14.	İstatistiksel Analizler	63
BULGULAR		64
4.1.	Kurucu <i>Boris</i> Transgenik Fare Soyları ve PCR Değerlendirmeleri	64
4.2.	Transgen Ekspresyonunun Doku Özgüllüğü	65
4.3.	Testiste Ektopik <i>Boris</i> Transgen Ekspresyonu ve qRT-PCR	67
4.4.	<i>Boris</i> Transgenik Fare Testislerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi	68
4.5.	<i>Boris</i> Transgenik Fare Yavrularının <i>in vivo</i> Hayatta Kalım Oranları	69
4.6.	<i>Boris</i> Transgenik Fare Yavrularının <i>in vivo</i> Hayatta Kalım Oranları	70
4.7.	Patolojik Görünümlü <i>Boris</i> Transgenik Fare Yavruları	71
4.7.1.	Patolojik Görünümlü <i>Boris</i> Transgenik Fare Yavrularının Doğum Ağırlıkları	72
4.7.2.	Patolojik Görünümlü <i>Boris</i> Transgenik Fare Yavrularının Histopatolojik Analizi	72
4.8.	<i>Boris</i> Transgeni ve Testis Hücre Proliferasyonu İlişkisi	75
4.9.	<i>Boris</i> Transgeni ve Apoptoz İlişkisi	76
4.10.	<i>Boris</i> Transgeninin Erkek Fertilitesi Üzerindeki Etkisi	77
4.10.1.	<i>Boris</i> Transgeninin Erkek Fertilitesi Üzerindeki <i>in vivo</i> Etkisi	77
4.10.2.	<i>Boris</i> Transgenik Fare Spermleri ile İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	77
4.10.3.	<i>Boris</i> Transgenik Farelerin Embriyo Transfer Sonuçları	78
4.11.	Yetişkin <i>Boris</i> Transgenik Farelerde <i>H19</i> DMD Metilasyonu	79
4.12.	<i>Boris</i> Transgenik Fare Yavrularında <i>H19</i> DMD Metilasyonu	81
TARTIŞMA		82
SONUÇLAR		88
KAYNAKLAR		89
ÖZGEÇMİŞ		102

Ek 1. Sati L., Ovari L., Bennett D., Simon S., Demir D., Huszar G. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online*. 2008 Apr;16(4):570-9.

Ek 2. Sati L., Seval-Celik Y, Unek G, Korgun ET, Demir R. The presence of kinesin superfamily motor proteins KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placenta. *Placenta*. 2009 Oct;30(10):848-54.

Ek 3. P Prinosilova, TF Kruger, L Sati, S Ozkavukcu, L Vigue, E Kovanci, G Huszar. Selectivity of hyaluronic acid binding by spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online*. 2009 Feb;18(2):177-83.

Ek 4. Ovári L, Sati L., Stronk J, Borsos A, Ward DC, Huszar G. Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies. *Fertil Steril*. 2010 May 1;93(7):2255-61.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BORIS	:Brother of the Regulator of Imprinted Sites
BWS	:Beckwith-Weidemann sendromu
ChIP	:Kromatin immünopresipitasyonu
CRE	:Cre rekombinaz
CREB	:cAMP cevap elementi bağlayıcı protein
CTCF	:CCCTC bağlanma faktörü
DAB	:3,3' Diaminobenzidine
DER	:Düz endoplazmik retikulum
DMD	:Differentially methylated domain
DNA	:Deoksiribonükleik asit
DNMT	:DNA metiltransferaz
dNTP	:Deoksinükleotid trifosfat solüsyonu
dpc	:Çiftleşmeden sonraki gün
FSH	:Folikül uyarıcı hormon
GAPDH	:Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GnRH	:Gonadotropin-salgılatıcı hormon
HCG	:human koryonik gonadotropin
HDAC	:Histon deasetilaz
HE	:Hematoksilen-Eozin
ICR	:İmprinting kontrol bölgesi
IGF2	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
LB	:Luria-Bertani broth
LH	:Lüteinize edici hormon
LMP	:Düşük erime noktası
MCS	:Çoklu klonlama alanı
MeDIP	:Metile DNA immünopresipitasyonu
mHTF	:Modifiye insan tubal sıvısı
mRNP	:Haberçi (messenger) ribonükleoprotein parçacıkları

PCNA	:Çoğalan hücre çekirdek antijeni
PCR	:Polimeraz zincir reaksiyonu
PGH	:Primordiyal germ hücreleri
PMSG	:Pregnant mare serum gonadotropin
PWS	:Prader Willi sendromu
qRT-PCR	:Kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyonu
SAM	:S -adenozilmetionin
SCO	:Sertoli Cell Only “Sadece Sertoli hücresi bulunan”
SDS	:Sodyum dodesil sülfat
TAE	:Tris asetat EDTA tamponu
TBS	:Tris tamponu
Tet	:Tetrasiklin
TP	:Transizyon (geçiş) proteinleri
TRE	:Tetrasiklin duyarlı element
TUNEL	:Terminal d-UTP Nick-End Labeling
ÜYTE	:Üremeye yardımcı teknikler
ZF	:Çinko parmak (Zinc finger)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa	
2.1.	Fare embriyolarında erkek germ hücre gelişiminin zamanlaması.	5
2.2.	Mayozun aşamalarını gösteren erkek gametogenezi.	6
2.3.	Seminifer tübüle ait kompartmanlaşma.	8
2.4.	Farklılaşan iki adet intermediyet spermatogoniya.	10
2.5.	Kromatinin yeniden paketlenmesi ve somatik hücrelerle karşılaştırması.	14
2.6.	Spermatogenezin endokrin düzenlenimi.	16
2.7.	Epigenetik modifikasyonların mekanizması.	17
2.8.	DNA metiltransferazlar (Dnmt) ve metilasyon.	18
2.9.	Üreme hücrelerinde ve preimplantasyon embriyolarında metilasyon.	20
2.10.	Şematize bir şekilde genetik imprinting tanımı.	23
2.11.	CTCF proteininin genel yapısı.	26
2.12.	İnsan BORIS ve CTCF aminoasit dizilerinin karşılaştırılması.	27
2.13.	İnsan BORIS ve CTCF proteinlerinin karşılaştırılması.	28
2.14.	CTCF ve BORİS fonksiyonlarına ait önerilen bir model.	29
2.15.	CTCF'in sessizleşmesi ve BORİS'in aktivasyonu.	30
3.1.	Mutant ve normal <i>Boris</i> DNA dizileri.	33
3.2.	pUC19 plasmidine ait dizi haritası.	34
3.3.	pTRE-Tight-BI-AcGFP1 vektörüne ait harita.	38
3.4.	Tetrasikline duyarlı ve iki yönlü çalışabilen promoterin şematik gösterimi.	38
3.5.	Enjekte edilmiş zigotların embriyo transferi.	42
3.6.	Kulak işaretlemesinde kullanılan kodlama sistemi.	43
3.7.	Transgenik soyların çiftleştirilme stratejisi.	46
3.8.	Bisülfid sekanlamasında analiz edilen <i>H19</i> DMD bölgesi.	60
3.9.	pCR®4-TOPO® vektörüne ait harita.	61
4.1.	Mutant ve normal <i>Boris</i> transgenine sahip kurucu soyların PCR analizi.	64
4.2.	Steril mutant <i>Boris</i> transgenik kurucu soyun testisinin H&E boyaması.	65
4.3.	Genotipleme ve transgenik farelerin belirlenmesi.	65

4.4.	Dokuya özgü gen ekspresyonunun doğrulanması.	66
4.5.	Transgenik fare yavrularına ait GFP ekspresyonu.	66
4.6.	Mutant <i>Boris</i> transgeni için qRT-PCR sonuçları.	67
4.7.	Normal <i>Boris</i> transgeni için qRT-PCR sonuçları.	68
4.8.	Parafine gömülmüş mutant <i>Boris</i> transgenik fare testisine ait kesit.	69
4.9.	Parafine gömülmüş normal <i>Boris</i> transgenik fare testisine ait kesit.	69
4.10.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik hayvanlara ait yavru vücut ağırlıkları.	70
4.11.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik yavrularının viabilite ve mortalite oranları.	70
4.12.	Normal ve anormal görünümlü yavrular.	71
4.13.	Normal <i>Boris</i> transgenik farelere ait anormal yavru fenotipi.	71
4.14.	Kontrol ve gözü açık doğan transgenik yavruların vücut ağırlıkları.	72
4.15.	Kontrol ve normal <i>Boris</i> transgenik fare yavrularında oküler fenotip.	73
4.16.	Normal <i>Boris</i> transgenik fare yavrusunda anteriyor lens-kornea defekti.	73
4.17.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare yavrularında organ patolojileri.	74
4.18.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare testis kesitlerinde PCNA boyanmaları.	75
4.19.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare testislerine ait ortalama % PCNA indeksi.	76
4.20.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik testis kesitlerine ait TUNEL boyanmaları.	76
4.21.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare testislerine ait apoptotik hücre yüzdesi.	77
4.22.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare spermelerine ait % fertilizasyon oranları.	78
4.23.	Normal ve patolojik fetüs görünümü.	79
4.24.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare spermelerine ait metilasyon dağılımı.	79
4.25.	Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare spermelerine ait kolonilerde metilasyon.	80
4.26.	Kontrol ve anormal <i>Boris</i> transgenik yavrularına ait metilasyon dağılımı.	81
4.27.	Kontrol ve anormal transgenik yavrulara ait kolonilerde metilasyon.	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
3.1. Mutant ve normal <i>Boris</i> transgenleri için PCR reaksiyonları.	45
3.2. Çalışmada kullanılan <i>Cre</i> ve <i>Rosa rtTA</i> transgenik fareler.	47
3.3. PCR reaksiyonları için dizayn edilen primer dizileri.	47
3.4. <i>Rosa rtTA</i> ve <i>Cre</i> transgenleri için PCR reaksiyonları.	47
3.5. KSOM medyumunun hazırlanışı.	56
3.6. Bisülfid reaksiyonu bileşenleri.	58
3.7. DNA'nın bisülfid ile muamelesinde kullanılan PCR programı.	59
3.8. <i>H19</i> DMD için PCR reaksiyon karışımı.	60
4.1. Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare testislerine ait apoptotik hücre yüzdesi.	77
4.2. Kontrol ve <i>Boris</i> transgenik fare spermeleri ile IVF sonuçları.	78

GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanlarda biri anneden diğeri babadan gelmek üzere, her kromozomdan iki örnek bulunur. Bununla birlikte, bazı genler anneden gelen kromozomlarda aktif iken bazı genler sadece babadan gelen kromozomlarda aktiftir. Diğer bir deyişle, sorumlu oldukları özelliğın ortaya çıkabilmesi için sadece anne ya da babadan gelmiş olması, diğeri allelinin ise baskılanmış olması gerekir. "Genetik imprinting" olarak adlandırılan bu durum, genetik materyalin anneden veya babadan kalıtılmış olmasına bağılı olarak farklı ekspresyonudur [1, 2].

Genetik imprinting, non-mendelian kalıtım gösterir [3] ve DNA'nın epigenetik modifikasyonunu gerektirir. DNA dizisinde bir farklılık yaratmadan gen ekspresyonunu değıştiren ve bir sonraki oğul döle aktarılabilen değışiklikler epigenetik değışiklikler olarak tanımlanmaktadır [4, 5]. Bu modifikasyonlar, gelecek nesilde tersine çevrilebilir nitelikte olan gen ekspresyonunda değışiklikler oluşturabilir. Günümüzde kabul edilen görüş, hücre genomunun işlevini görebilmesi için temel epigenetik düzenleyicinin DNA'nın metilasyonu olduğı yönündeki görüştür [6]. Gerçekten de, bazı genlerin görevlerini yerine getirebilmesi ile DNA'sının metilasyon durumu arasında sıkı bir ilişki vardır. DNA metilasyonu, DNA dizisindeki guaninin (G) önünde yerleşmiş sitozinlerin (C) 5. konumundaki karbonuna "metil grubu" bağlanması ile gerçekleşir ve bölgesel hipermetilasyon promotor bölgede bulunan CpG adacıklarını etkileyerek genin aktivitesini durdurur. DNA hipermetilasyonunun dışında hipometilasyon da, kromozom instabilitesine, retrotranspozon elementlerin ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak karsinogenezin oluşumunda önemli rol oynar [7]. Dolayısıyla genin aktivasyonu ile metilasyonu arasında genellikle ters bir ilişki vardır. Metilasyonun aksi ise "demetilasyon", yani sitozine bağlanmış olan metil grubunun kalkarak, o genin tekrar fonksiyonuna başlayabilmesidir. Bu metilasyon-demetilasyon durumu primordiyal germ hücreleri (PGH) evresindeyken işlemeye başlar; spermatogenez sürecinde devam ederek, fertilizasyonu takiben embriyo gelişimini ve sonuçta erişkin organogenezini ayarlar [8, 9]. Eğer bu sırada imprinting mekanizmasında problemler olursa fetüsün gelişimi de anormal olur, hatta malign hastalıklar ortaya çıkabilir [10].

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, genetik imprinting defektlerinin neden olduğı sendromlar ile üremeye yardımcı teknikler (ÜYTE) arasında bir ilişki olup olmadığı konusu üzerinde yoğunlaşmıştır. Birçok vaka raporu ve kontrollü çalışma, ÜYTE ile dünyaya gelen çocuklarda anormal genetik imprinting olduğunu vurgulamaktadır. ÜYTE çocuklarının, Beckwith-Weidemann (BWS), Prader Willi (PWS) ve Angelman sendromları gibi genetik imprinting defektlerinin neden olduğı bilinen, belli bazı sendromlar bakımından yüksek insidansa sahip olduğı ifade edilmektedir [9, 11-18].

İnfertil çiftlerin yaklaşık %50-70'inde erkeğe ait bir sorun bulunduğu belirtilmektedir [19, 20]. Genetiğin bu fenomen içerisindeki rolü de detaylı bir şekilde araştırılmaktadır [21-23]. Bu infertil erkekler genellikle sağlıklı olduğundan, infertilitede rol oynayan genlerin sadece spermatogenez sürecinde ekspre olduğu ya da fonksiyonel olarak sadece spermatogenez ve/veya üreme için gerekli olduğu düşünülebilir. Dolayısıyla spermin ovositi fertilize ederek embriyoyu oluşturabilmesi için, bir yandan genlerinin sağlıklı biçimde ekspre olması gerekirken, diğer yandan da bazı genlerinin baskılanması gerekir. Genin baskılanması önemlidir; çünkü o gen eğer çalışırsa ürettiği faktör belki de spermatogenezde bazı basamakları baskılayabilecektir (imprinting).

DNA metilasyonu erkekte üreme organlarının gelişiminde, spermatogenezde, seksüel davranışlar ve fertilizasyonu takiben embriyo gelişiminde önemli bir role sahiptir [24-27]. Dolayısıyla, metilasyondaki bozukluklar beraberinde anormal seksüel gelişim ve üreme bozukluklarını da getirecektir. Yapılan çalışmalarda, bazı infertilite olgularından metilasyon bozukluklarının sorumlu olabileceği ifade edilmektedir [28]. Ayrıca genetik imprinting bozukluklarının hipospermatogenez yol açtığı ve oligozoospermik erkeklerin bu imprinting defektlerini çocuklarına da geçirdikleri ileri sürülmüştür [29]. Doğacak çocuğa genetik materyalin sağlıklı biçimde geçebilmesinde sperm DNA'sının bütünlüğü esastır. Sonuç olarak, erkek üreme sisteminin gelişmesinde ve spermatogenezini etkileyebilen genlerin ekspresyonunda DNA metilasyonunun rolü dikkat çekici bir konudur.

2002 yılında Loukinov ve arkadaşları tarafından yeni bir protein tanımlanmış ve BORİS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites ya da CTCFL; CCCTC-binding factor-like protein ya da CTCF-T) olarak adlandırılmıştır [30]. İlginç olarak, BORİS geninin ekspresyonu, erişkin vücudunda normal koşullar altında “testiste” ve bunun dışında “malignant hücrelerde” ve “kök hücrelerde” belirlenebilmiştir [31, 32]. Bu nedenle, bu gen testise özgüdür ve ayrıca tümörlü dokularda yeniden aktive olduğu için “kanseri-üreme hücre hattı (germline) genlerinden” biri olarak kabul edilir. BORİS’in epigenetik bir düzenleyici ve testise özgü olması nedeniyle, erkek genomunun genetik imprintinginin yeniden programlanması konusunda rolü olabileceği ifade edilmektedir [33].

BORİS’i diğer kanser - üreme hücre hattı ailesi üyelerinden ayrıcalıklı tutan nokta ise somatik dokularda normal şartlarda yaygın olarak ekspre olan bir paraloğunun olmasıdır. Bu paralog, üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan CCCTC bağlanma faktörü (CTCF) proteinidir. BORİS ve CTCF proteinleri, amino (N) ve karboksi (C) uçları dışında, ortak 11-çinko parmak (zinc finger) yapısına sahip olup, aynı DNA bölgelerine bağlanabilmektedir. Dolayısıyla BORİS ekspre eden bir hücre CTCF, CTCF ekspre eden bir hücre ise BORİS ekspresyonu göstermemektedir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde, CTCF ile BORİS ekspresyonları arasındaki regülasyonun bozularak, bunun kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir [31, 34].

CTCF, imprinting'in epigenetik regülasyonu, X kromozomu inaktivasyonu, represyon, kanser-testis genlerinin aktivasyonu, kromatin organizasyonu gibi pekçok önemli olayda rol oynamaktadır [35-37]. Dolayısıyla benzer DNA bağlanma bölgelerine sahip olması nedeni ile BORİS'in, CTCF'in rol oynadığı bu önemli olaylarda, özellikle de genetik imprinting ve embriyonik gelişimde, rol oynayabileceği ileri sürülebilir. Bu nedenle, tümöröenezin yanı sıra, BORİS geninin bu potansiyel olası rolleri oldukça dikkat çekici ve araştırmaya değer bir konudur.

Genlerin doğru bir şekilde imprinte olmasının, fertilizasyondan sonra ve fetüsün gelişimi için çok önemli olduğu artık kabul edilen bir görüştür. BORİS mRNA'sı yetişkin testisinde germ hücrelerinde, özellikle primer spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde ekspre olmaktadır. Bununla birlikte, BORİS'in embriyonik ve fetal gelişim boyunca ekspresyonu ve rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda, genetik mühendisliği teknikleriyle *Boris* gen ekspresyonunun değiştirildiği, genetik yapısı değiştirilmiş transgenik fareler kullanılmıştır. Çalışmamızda amacımız, ektopik *Boris* ekspresyonunun, normal spermatogenez ve erkek fertilitesi (hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak), fetal büyüme ve yaşayabilirlik (viabilite) üzerindeki etkileri ile *H19/Igf2* imprinting lokusunda doğru metilasyon imprintlerinin oluşmasındaki olası rolünü araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihsel Yaklaşım

Tüm ileri gelişmiş organizmalarda olduğu gibi, insanlarda da soy sürdürme eşey hücreleri aracılığıyla olmaktadır. Soy devamlılığı, erkek ve dişi gametlerin birlikteliğinin -birleşmenin- sonrasında yeni oluşan hücre birimine dayandırılmış bir gizemin başlangıcını ifade eder. Bu bağlamda eşey hücrelerinin varlığı yeni birey oluşumunda temel faktördür. Bu faktörlerden “atak” davranan erkek hücrenin kaynağı, erkek gonad (testis) ile ifadesini bulur. Erkek gonadların görevlerini anlamak için insanoğlu uzun uğraşlar vermiştir. Merak edileni anlamak ve pratikte ne işe yaradığını belirlemek ve ‘bilim-bilgi’ üretme amacına göre bilinmeyi öğrenme isteği, her alanda gelişen bugünkü bilgi düzeyinin hazırlayıcısı olmuştur. İşte insanoğlunun soy devamlılığını sağlayan eşey hücrelerinin gizemliliği ve oluşturdıkları yeni oluşumlar, bu bağlamda anlaşılabilmiştir.

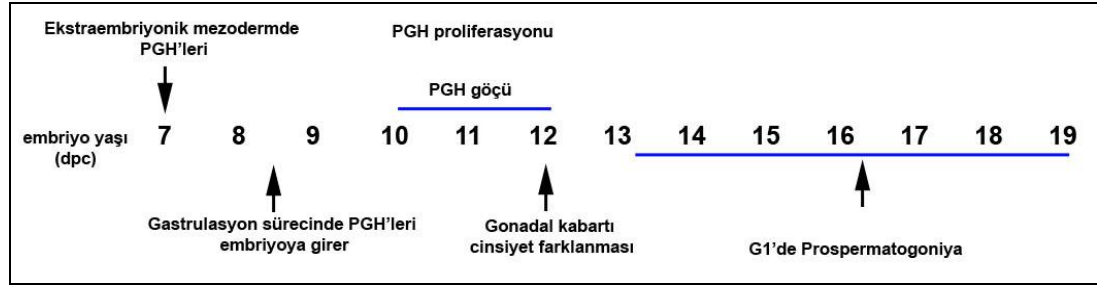
Kısırlaştırmanın (kastrasyon) etkisi antik çağlarda dahi bilinmesine rağmen, testis ve fertilité arasındaki ilişki 17. yüzyıla kadar açık değildi. Aristo, İÖ 400 yıllarında testis anatomisini gösteren oldukça doğru çizimler yapmıştır, fakat testislerin fertilité için gerekliliği bilinmiyordu. De Graaf tarafından yapılan incelemeler sonucunda, testislerin genel yapısı ve fonksiyonu doğru bir şekilde gösterildi [38]. Graaf’ın gözlemlerini takiben 1667 yılında, van Leeuwenhoek spermatozoayı seminal sıvı içerisinde gözlemledi [38]. Von Kölliker’in çalışmalarına değin, spermatozoayı üreten birimler (seminifer tübüller) ve spermatozoanın oluşumu arasındaki ilişki net olarak bilinmiyordu. Bu araştırmacı, spermatozanın seminifer tübüllerde geçirdiği bir seri gelişim süreci sonunda üretildiğini ortaya koydu; spermatozoanın üretimi ile noktalanın bu hücrel değişiklikler “spermatogenez” olarak adlandırıldı [39].

Kastrasyonun hormonal etkisinin olduğu yine Aristo zamanında bilinmesine rağmen, bu konuya Berthold’un deneysel çalışmaları ışık tuttu [40]. Berthold, horozlarda yaptığı çalışmalarda, kastrasyondan sonra ibik yapısında azalma ve ötme eyleminin kaybolmasının, testis transplantasyonu ile geri döndüğünü ve düzeldiğini gösterdi. Bouin ve Ancel adlı araştırmacılar, erkeklik (maskülen) faktörün Leydig hücrelerinden salındığını 1903 yılında ortaya koymasına rağmen [41], testosteronun izole edilmesi ancak 1935 yılında David ve arkadaşları tarafından gerçekleştirildi.

Ondokuzuncu yüzyılın sonlarında mikroskop alanında gerçekleşen ilerlemeler, spermatogenezin özellikleri hakkındaki bilgi dağarcığımızı genişletmiştir. Ayrıca, kromozomların keşfedilmesi, mitoz ve mayoz olaylarının ortaya konulması erkekte gamet üretimi olayını anlamamızı büyük ölçüde kolaylaştırmıştır.

2.2. Gametogenez

Gametogenezde germ hücrelerinde önce proliferasyon, arkasından hücre siklusunda bir müddet duraklama ve devamında hücre farklılaşması olayları peşisıra birbirini izler. Erkek fare embriyonunda ilk primordiyal germ hücreleri (PGH) çiftleşmeden sonraki 7.5. günde görülür. Bunlar bir yandan gonadlara göç ederlerken aynı zamanda hızla çoğalmalarını sürdürürler. Fötal Sertoli hücreleri ile çevrenmesini takiben PGH'lerine gonosit ya da prospermatogoniya adı verilir. Çiftleşmeden sonra 13.5-15. günden doğuma kadar gonositlerin çoğalması durur (Şekil 2.1). Doğumdan sonra yeniden çoğalma başlayarak, spermatogoniyal kök hücreleri oluşturur ve bunlar arasından bazıları 10. günden itibaren aktifleşerek farklılaşır ve mayozla girer [42]. İnsanda da temelde benzer bir süreç işlemektedir.

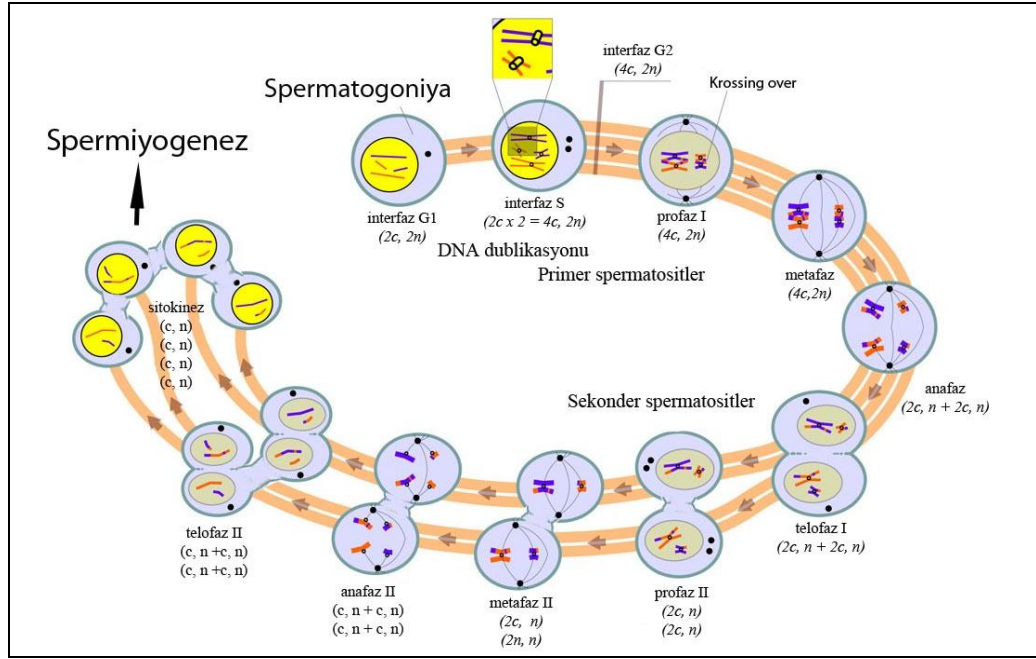


Şekil 2.1. Fare embriyolarında erkek germ hücre gelişiminin zamanlaması. Embriyogenez boyunca PGH'leri çiftleşmeden sonraki (dpc) yaklaşık 7.5. günde belirlenebilmektedir. Germ hücreleri genital kabartı alanına çiftleşmeden sonraki 10.5-11.5. günler arasında ulaşır. Cinsiyetler arasındaki farklılıklar ilk olarak genital kabartının morfolojik olarak farklılaştığı çiftleşmeden sonraki 12.5. günde ortaya çıkar. Çiftleşmeden sonraki 13.5. günde erkek üreme hücreleri mitotik areste uğrar. Farede ilk spermatogonik siklus, doğumdan en az 1 hafta sonrasına kadar mayozla başlamaz [43].

2.2.1. Memeli Spermatogenezi

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen ve sperm üretimi için gerekli olan oldukça karmaşık bir hücresel farklılaşma sürecidir (Şekil 2.2). Üç aşamada incelenebilir. Mitotik proliferasyon fazında; germ hücreleri mitoz bölünme ile çoğalarak kendilerinin aynısı olan hücreler oluştururlar. Redüksiyon-bölünme fazında; mayoz bölünme ile germ hücreleri kromozom sayılarını 23'e indirirler. Farklılaşma fazında ise; sperm öncüsü hücreler (spermatogoniya, spermatosit, spermatid) sperme dönüşürler. Seminifer tübül içinde, spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül lümenine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı alanlarında, gelişimin değişik evrelerinde olan sperm hücrelerinin üretimi devam eder.

Literatürde spermatogenez başlığı üzerine yazılmış çok sayıda derleme ve çalışma bulunmaktadır. Tezin giriş bölümünde, spermatogenez kavramı üzerinde durularak temel tanımlayıcı bilgiler sunulacaktır.



Şekil 2.2. Mayozun aşamalarını gösteren erkek gametogenezi. n, kromozom sayısını, c ise kopya miktarını (DNA içeriği) ifade etmektedir [44].

2.3. Testisin Genel Yapısı

İnsanlarda, her bir testis genellikle 15-20 ml hacminde, 4 cm uzunluğunda, 2.5 cm eninde ve 10-15 g ağırlığındadır. Skrotum içinde, abdomen dışında bulunan çift testisler, “tunica albuginea” denilen sıkı bir bağ dokusu kapsülü ile çevrilidir. Tunika albuginea, ön ve yan yüzlerinde “prosessus vaginalisin” kalıntısı olan tunika vaginalisin, visseral ve pariyetal yaprakları ile kaplanmıştır. Tunika albugineanın iç yüzeyinden bir bağ dokusu bölmesi (septası) testisin arkasında yer alan “mediastinum” bölgesine doğru uzanır. Bağ dokusundan oluşan bu bölgenin içerisinde anastomozlaşmış (ağızlaşmış) bir kanal ağı görünümündeki “rete testis” vardır.

Düz kas fibrillerini de içeren sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunika albuginea kapsülü, fizyolojik ve farmakolojik uyarılara cevap olarak kasılmayı sağlar. Tunika albugineanın iç yüzeyi ise, gevşek bağ dokusu karakterinde ve damardan zengin bir bölge olan “tunica vasküloza” ile komşuluk yapar. Testislerin loblanma derecesi türler arasında farklılıklar gösterir; lobçuklar içerisinde spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller (tubulus seminiferus kontortus) vardır. Seminifer tübüller mediastinum testisten sarmallar şeklinde uzanır ve “tubuli rekti” denilen düz tübüllerle bağlantılıdır. Böylece, her bir sarmalı oluşturan tübül oldukça katlantılı bir yapı göstererek yüzey alanını genişletir. Tübül sarmallarının oluşması “olgun olmayan” Sertoli hücrelerinin gelişim sırasındaki mitotik aktivitesinin sonucudur [45]. Tübüller arası dokunun düzeni türler arasında oldukça dramatik değişiklikler gösterir; kan damarları, lenfatikler ve sinir liflerini içerir. Tübüller arası dokudaki Leydig hücreleri, damarlarla ve seminifer tübüllerin “lamina propriyası” ile ilişkili olup gruplar halinde dağılmıştır. Seminifer tübüllerin çevresinde ise, “miyoid hücreler” denilen modifiye düz kas hücreleri vardır.

Testisler, insanlarda ve diğer bazı memeli türlerinde fetal ya da erken post-natal hayatta “skrotuma” inerler. Birçok omurgalının testisi abdominal bölgede (karın boşluğu) yer aldığından, insanlardaki bu durum oldukça ilgi çekicidir. İnsanlarda testisin skrotumda yer alması, vücut ısısına göre, yaklaşık 2°C’lik bir ısı farkına neden olur. Bir ya da her iki testisin birden abdominal kavitede asılı kalmasına “kriptorşidizm” denir. Bilateral olarak kriptorşidik olan erkekler infertildirler, ancak unilateral kriptorşidik olan bazı erkekler sperm üretebilirler.

“Spermatik kord” testiste gelen ve giden kan damarlarını, “vaza deferens” ise lenfatikleri ve sinirleri içerir. “Pampiniform pleksus” zengin ven ağından oluşur; testis üzerinde testiküler arteri çevreler ve bu arterle kaynaşarak spermatik korda uzanır. İnsanlarda ve birçok hayvanda pampiniform pleksus kompleks bir damar ağ sisteminden oluşur ve “termo-regülasyonda” rol oynar. Bu etkin sistem, kanı testise girmeden önce soğutur ve testisten vücuda dönen kanı ise ısıtır. Bu sistem aynı zamanda testise giden arteriyal kan basıncını kontrol etmede rol alır. Testiküler venlerin kapakçıkları vardır ve genellikle “varikoz” haline gelerek, “varikosel” denilen patolojik duruma neden olabilirler. Varikosel sonucunda skrotum içi ısının arttığı ve fertilitiyi etkilediği öne sürülmektedir [46]. Ayrıca varikoselin, testiküler hacimde bir azalmaya ve Leydig hücre salgısında düşüşe neden olduğu bildirilmiştir.

2.3.1. Seminifer Tübüller

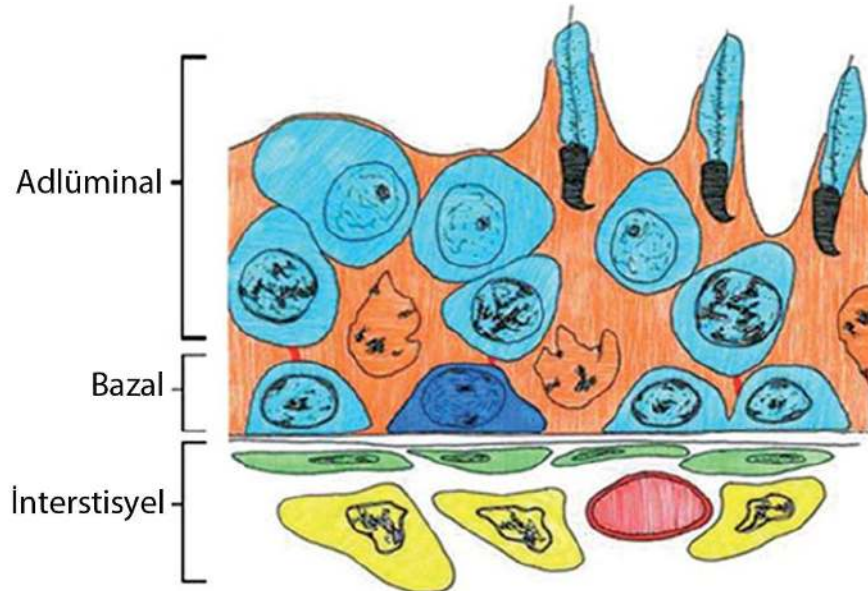
Her evredeki germ hücreleriyle bunları destekleyen Sertoli hücrelerini içerirler. Testis hacminin %85-90’nını oluştururlar. Sertoli hücreleri sayıları değişmeyen, bölünmeyen hücrelerdir. Tübülün bazal membranına otururlar. Birbirlerine sıkı bağlantıları vardır ve böylece kan-testis bariyerini oluştururlar. Spermatozoanın pubertede, immün sistemin kendiliğinden tanıma “self recognition” döneminden çok daha sonra ortaya çıkması nedeniyle bu bariyer önemlidir. Sertoli hücreleri, gelişen germ hücrelerini beslemenin yanında özüllü olanları fagosite etmekle de görevlidir. Tübül lümenine yaklaştıkça spermatosit ve spermatidler gözlenir. Olgun spermiyumlar Sertoli hücreleri ile simbiyotik bir evre yaşarlar. Tübülün bazal membranı tarafında ve bazal lamina üzerinde spermatogoniyumlar bulunur.

Germinal ya da spermatogenik hücreler bazal membrandan lümeneye doğru aşama aşama erişkinleşerek sıralanır. Spermatogoniyumlar bazal membran üzerine direkt otururlar. Yetişkin farelerde 12 değişik tübül aşamasında gözlenen germ hücreleri lümeneye doğru, tübül duvarında segmental olarak gözlenirler. Primitif hücreler (spermatogoniya) bölünerek yenilendiği gibi sonradan spermatosit olacak olan hücrelere de dönüşür. Spermatositler, bölünerek gelişim aşamasına katılır ve spermatidler oluşturur. Bu aşamaya kadar olan olayların tümüne “spermatogenez” adı verilir. Spermatidler de değişime uğrayıp spermatozoayı oluştururlar ki bu aşamaya da “spermiyogenez, spermiyohistogenez (ya da spermiyositogenez)” denilir. Bu değişim, çekirdeğin yoğunlaşması, Golgi yıkımı sonucu akrozomun belirmesi, sentriyol göçü, sitoplazmanın büyük oranda kaybı, kuyruğun gelişip spermin ortasındaki mitokondriya ile ilişkili hale gelmesi olaylarını kapsar.

2.3.2. Sertoli Hücreleri

Bu hücreler, seminifer tübülün periferinden lümenine doğru uzanan diploid hücrelerdir. Spermatogenez esnasında çok önemli rol oynarlar. En önemli görevleri germ hücrelerinin farklılaşması için gerekli çevreyi sağlamaktır. Bütün germ hücre serisi ile kontakt halindedirler. Sertoli hücrelerinin bazal kısımları, seminifer tübülün bazal laminası ile ilişkidir dolayısıyla sistemik sirkülasyonla gelen maddelere direkt olarak erişebilirler. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri gibi bazal lamina üzerinde yer alırken, spermatogenik hücre serisinin diğer hücreleri Sertoli hücreleri tarafından oluşturulmuş kompartmanlar içinde yerleşiktirler.

Sertoli hücrelerinin mikroskobik yapısı oldukça karmaşıktır. Çok miktarda düz endoplazmik retikulum (DER) ve mikroflamanlar kümesi şeklinde belirgin bir hücre iskeletine sahiptirler. En önemli özellikleri ise özelleşmiş bağlantı kompleksleridir. Çeşitli tiplerde bağlantılar kurarlar ve hücre-hücre kontaktlarını sürdürürlerken ayrıca germ hücre serileri ile de iletişim halindedirler. Şüphesiz ki, en önemli bağlantı Sertoli-Sertoli hücresi arasında kurulan sıkı bağlantıdır. Bu bağlantılar hücreleri sıkıca bir araya getirerek, bazı maddelerin geçişine engel olur ve kan-testis bariyeri için önemlidir. Dolayısıyla seminifer tübüllerde iki kompartman tanımlanabilir: Seminifer tübülün periferinden hücreler arası bağlantı kompleksine kadar olan “bazal” kompartman ve bağlantı kompleksinden tübülün lümenine doğru uzanan “adlüminal” kompartman (Şekil 2.3). Spermatogoniya bazal kompartmanda yer alırken ardından gelen spermatogenik hücre serisi ise adlüminal kompartmanda yer alırlar. Sertoli hücrelerinin destek görevi görmesi ve ilettikleri çeşitli sinyaller, yetişkinlerde germ hücre farklılaşması, mayoz ve spermiyogenez ve spermatogoniyal kök hücre havuzunun devamlılığı için kritik öneme sahiptir [47].



Şekil.2.3. Seminifer tübüle ait kompartmanlaşma. Spermatogonyum (koyu mavi), Sertoli hücreleri (turuncu) ve farklılaşan germ hücreleri (açık mavi) gösterilmektedir. Tübül dışındaki nişi ise myoid hücreleri (yeşil), kan damarları (kırmızı) ve Leydig hücreleri (sarı) oluşturmaktadır [48].

2.3.3. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüller arasındaki bağ dokusunda bulunurlar ve kan damarları etrafında kümelenirler. Steroid biyo-sentezinde gerekli olan iyi gelişmiş DER, Leydig hücrelerinin tipik bir özelliğidir. Ayrıca, insanlarda büyüklükleri ve şekilleri değişen ve “Reinke kristalleri” olarak adlandırılan sitoplazmik inklüzyonlara sahiptirler. Bu inklüzyonları içermeyen Leydig hücreleri de bulunabilir ve bu durumda bu tür hücreler “olgun olmayan” formdaki Leydig hücreleri olarak kabul edilmektedir [49]. Leydig hücreleri arasında da sıkı bağlantı kompleksleri vardır.

Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması LH ve reseptörleri aracılığıyla kontrol edilir; LH ve reseptörleri, steroid ilişkili yolların çalışabilmesi için gerekli enzimlere ait genlerin transkripsiyonunu uyarır [50]. Androjen reseptörleri, Sertoli hücrelerinde ve peritübüler miyoid hücrelerinde yerleşim gösterir [51].

2.3.4. Peritübüler Miyoid Hücreler

Peritübüler miyoid hücreleri yassı, düz-kas-benzeri hücreler olup testiküler kordonları sarar. Farede, bu hücreler sadece tek kat şeklinde bulunur [52]. Miyoid hücreler birbirlerine bağlantı kompleksleri ile bağlanır ve çok miktarda aktin filamanı içerir. Bu aktin filamanları, seminifer tübüllerin düzensiz kasılmalarına olanak sağlar ve böylece Sertoli hücrelerince üretilen salgının ve spermatositlerin lümene atılmasını kolaylaştırır. Bu hücreler, Sertoli hücre fonksiyonunu etkileyen, hücre dışı matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri gibi diğer bazı maddeler de salgırlar [52]. Miyoid hücrelerin, testis gelişimi için gerekli olan androjen reseptörü içerdiği ve retinol işlevinde görev aldığı da bilinmektedir [52]. Kısacası, miyoid hücreler testisin yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal spermatogenik fonksiyonun işleminde görev üstlenmektedir.

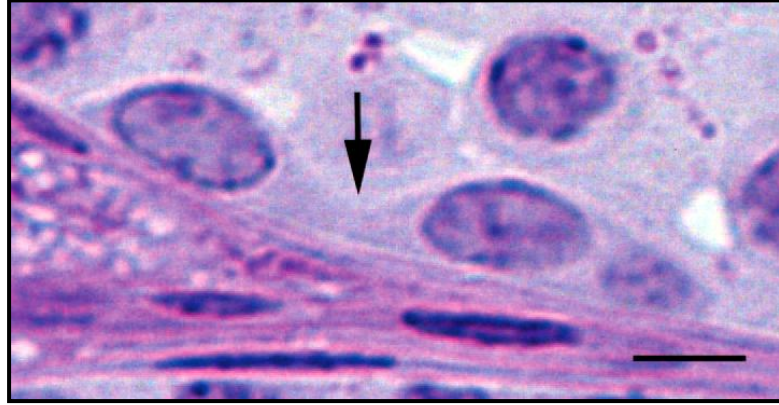
2.4. Germ Hücreleri ve Oluşum Süreci

Birçok hayvan türünde, belli başlı spermatogenik hücreler sadece belli başlı hücreler ile ilişki halindedir. Örneğin; farelerde her bir spermatogoniyum bir diğeri ile aynı anda gelişir, dolayısıyla herhangi bir zaman aralığında seminifer tübül kesiti incelenirse, spermatogoniyumdan spermiyuma kadar tüm bir hücre serisi bir arada görülebilir. Bu hücre ilişkisine “spermatogenik siklus” denir. Bu anlamda farede seminifer tübüllerde 12 farklı evre tanımlanmıştır [53]. Her evre spermatogenik süreçte bulunan spermatid, spermatosit ve spermatogoniya tiplerinin kombinasyonu ile karakterizedir.

Seminifer epitel modeli birçok hayvan türünde mevcut iken, insanda bu model bu kadar açık değildir. İnsan seminifer tübül kesitlerinde, farklı spermatogenik siklus evresinde hücrelerin varlığı ya da bazı germ hücrelerinin birbirleriyle olan ilişkisinin varlığı ya da yokluğu gibi birçok düzensizlik göze çarpar. Bu kompleks düzenlenmeyi kontrol eden mekanizmalar tam olarak bilinmese de, parakrin ve otokrin mekanizmaların rolü olduğu tahmin edilmektedir.

2.4.1. Spermatogoniya

Diploid sayıda kromozoma sahip olan spermatogoniyumlar, seminifer tübülün bazal laminası üzerine oturmuş şekilde yerleşim gösterirler; sürekli mitoz bölünmeler geçirirler, ya kendi benzeri spermatogoniyumları ya da farklılaşma sürecine gidecek primer spermatositleri üretirler [48]. Spermatogoniyal kök hücreler, oldukça nadir olup kemirgen testisinde üreme hücrelerinin sadece %0.03'lük bir kısmını oluşturur [54]. Üç kategoride sınıflandırılır; Tip A, intermediyet ve Tip B [55]. Tip A farklılaşmamış spermatogoniya, kendi kendini yenileyebilen spermatogoniyal kök hücre tipi olup, tek bir hücre ya da A single (A_s) olarak adlandırılır [55]. Tip A spermatogoniyumlar bölünerek kendilerini çoğaltıkları gibi diğer taraftan A paired (A_{pr}) ve A aligned (A_{al}) gibi diğer tip spermatogoniyumları oluşturur [56]. A_{pr} ve A_{al} gibi spermatogoniya tipleri sitoplazmik köprüler aracılığı ile birbirleriyle bağlantı halindedir (Şekil 2.4) [57] [58]. Hücreler arasındaki bu sitoplazmik köprüler, spermatogenez boyunca varlığını sürdürür ve kardeş germ hücreleri arasında mRNA'ların ve proteinlerin hareketini sağlar [59]. A_{al} spermatogoniya, mitotik çoğalmanın interfaz basamağında bir farklılaşma geçirerek A_1 spermatogoniyaya farklanır [55]. A_1 spermatogoniya, 5 kez ard-arda mitoz geçirdikten sonra preleptoten primer spermatositleri oluşturur ve daha sonra sırasıyla A_2 , A_3 , A_4 , intermediyet (In) ve Tip B spermatogoniyaya farklanır. Tip B spermatogoniya ise spermatosite farklılaşan tipteki spermatogoniyadır. Preleptoten primer spermatositler daha sonra mayoza girer [60]. A_s spermatogoniyadan A_{al} spermatogoniya'ya doğru gelişen hücreler, bazal lamina ile yüksek derecede temas yaparken Tip B spermatogoniyadan preleptoten spermatogoniyaya gelişen hücrelerin bazal membran ile teması tamamen kopar [59]. Spermatogoniyumların bu bölünmelerinin mitotik kinetiği oldukça karmaşıktır ve günümüzde hâlâ tartışmalı bir konudur [48].



Şekil 2.4. Sitoplazmik köprülerle (ok) birbirine bağlanmış farklılaşan iki adet intermediyet spermatogoniya. Skala bar 10µm'yi ifade etmektedir.

2.4.2. Spermatositler

Spermatogoniyumların bölünmesi sonucu meydana gelen spermatositler mayoz bölünme geçirerek, haploid sayıda kromozom taşıyan dört adet spermatid meydana getirirler. İlk önce, homolog kromozomların rastgele ayrılması olur, daha sonra ise homolog kromozomlar arasında genetik materyalin değiş tokuşu (krossing over) gözlenir. Bu iki olay türlerin yaşaması için gerekli olan çeşitliliği sağlar.

Mayoz bölünmenin profaz aşaması oldukça uzun bir süreçte gerçekleşir; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez olmak üzere bazı safhalar gösterir. Spermatositler birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasına girdiklerinde, seminifer tübülün bazal membranından lümenine doğru hareket ederler. Mayotik profazın ilk fazı olan leptoten, iplik-benzeri kromozomların oluşumuyla başlar [58]. Zigoten fazında homolog kromozomların eşleşmesi görülmeye başlar ve snaptonemal kompleks oluşur (sinaps). Ayrıca hücrelerde kromatin kalınlaşması da zigoten fazıyla karakterizedir [59]. Burada görev alan üç önemli snaptonemal kompleks proteini; SYCP1, SYCP2 ve SYCP3'dür. Tüm bu proteinler "fermuar" yapısında yer almakta ve rekombinasyonun gerçekleşmesi için iki homolog kromozomu birbirine yakın olarak tutmaktadır. Bu proteinler, kromozom yoğunlaşması (kondenzasyon) ve sinapsis olaylarında da görev alırlar [61]. Zigoten aşamasında, spermatositler bazal membrandan ayrılırlar. Pakiten aşaması, mayozun ve profaz evresinin en uzun aşamasıdır ve bu nedenle geçen bu süreç zarfında spermatositlerin çeşitli hasarlara maruz kalma şansları en çoktur. Pakiten hücrelerinde, kromozomlar tamamen sinaps yapmış ve snaptonemal kompleks oluşumu tamamlanmıştır [62]. Rekombinasyonun gerçekleştiği ve hücrelerin hızlı bir şekilde büyüme gösterdiği faz olan pakiten, memelilerde yaklaşık bir haftanın sonunda tamamlanır [60]. Diploten, rekombinasyonun olduğu, kiazmata bölgelerinin görüntülenemediği, snaptonemal kompleksin birbirinden ayrılmaya başlayarak sadece rekombinasyonun olduğu bölgelerde temasın kaldığı fazdır [61]. Profaz I, diakinezle sona erer. Diakinez, kromatinlerin ileri derecede yoğunlaşmış olduğu ve kromozom ayrılmasına hazırlık olarak kiazmatanın serbestlendiği fazdır [59].

Profazı takip eden metafaz aşamasında homolog kromozomlar, iğ iplikçiklerine tutunurlar ve anafaz aşamasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler. Telofaz sırasında, her biri iki kromatid içeren haploid kromozomlu iki kardeş hücre meydana gelir ve bu hücreler, hücrelerarası köprülerle halen birbirlerine bağlıdır [59].

Birinci mayozun profazı tamamlandıktan sonra sekonder spermatositler oluşur. Spermatosit-I'ler diploid kromozom ($2n$) ve diploid DNA miktarı ($4DNA$) taşırlar. Birinci mayoz bölünme sonucunda bu miktarlar yarıya iner. Birinci mayoz bölünme sırasında genetik materyalin değişimi "kiazma" noktalarından gerçekleşir ve her bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatosit oluşturur. Testiste, mayoz II çok hızlı bir şekilde gerçekleştiğinden bu hücreler kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositler adeta mitozu taklit ederler; kardeş kromatidler iğ iplikçikleri ile birbirlerine tutunurlar ve metafaz - anafaz II sırasında hücrenin karşıt kutuplarına yerleşirler [58]. Mayoz II sonunda oluşan en son ürün, spermatid olarak adlandırılan 4 adet haploid gamettir.

Mayoz bölünme esnasında, seks kromozomlarının DNA replikasyonu, kondensasyon ve transkripsiyon zamanlamaları, somatik kromozomlardan farklılıklar gösterir. Spermatosit-II hücreleri, somatik mitoz bölünmeye benzeyen 2. mayoz bölünmeyi geçirirken, kromozomların kromatidlerine eş oluşturmak için

2DNA'nın yarısını bir kromatin, diğerini de ikinci kromatine eş oluşturmak için kullanır.

Mayoz sırasında meydana gelebilecek herhangi bir mutasyon germ hücre soyu boyunca kalıtıldığından mayoz hücre bölünmesi sıkı bir şekilde kontrol edilir. Synaptonemal kompleks, mayozun kontrolünde büyük önem taşır; çift zincirli DNA'nın rekombinasyonunu ve tamirini kontrol eden hücre siklusu düzenleyicileri için yerleşim bölgesidir [61].

2.4.3. Spermatidler

Mayoz bölünmeler sonucunda meydana gelen spermatidlerin gelişmesi, değişmesi ve seminifer tübül lümenine spermiyum olarak atılması sürecindeki olaylara "spermiyogenez" denir. Spermiyogenez oldukça önemli ve eşsiz bir süreçtir. Çünkü; basit bir hücre özelliğinde olan bir spermatid, yapısal, fonksiyonel ve biyokimyasal değişikliklere uğrayarak özelleşmiş bir hücre tipi olan spermatozoayı meydana getirir. Bu değişim mekanizması günümüzde hâlâ açıklanamamıştır. Bu süreçte meydana gelen değişiklikler, bu hücrelere özgü olaylardır ve diğer hiçbir hücre tipinde gözlenmez. Spermiyogenez süreci oldukça senkronize ve entegredir, dolayısıyla bu süreç sırasında meydana gelen küçük sapmalar bile infertiliteye neden olabilir; ne yazık ki bu sapmaların ya da hataların nedeni henüz açıklanamamıştır.

Spermatid, spermiyogenezin başında basit bir hücre tipi iken, daha sonra spermiyumun temel hücre iskeletini oluşturmak üzere bir seri değişim geçirir. Spermiyogenez sırasında temelde 5 farklı işlem gerçekleşir; 1) akrozom oluşumu, 2) çekirdek yoğunlaşması ve uzama, 3) kuyruk (flagellum) gelişimi, 4) sitoplazmanın yeniden organizasyonu, 5) spermiyasyon [59]. Spermatidlerin farklılaşma sürecinde, yapısı diğer hücrelerden daha karmaşık olan Golgi kompleksinin sisternaları yıkılarak akrozomal vezikülü oluştururlar; çekirdeğin apikaline göç ederek, çekirdeği üstten saran bir kılıf (takke) gibi gelişen bir akrozom sistemini meydana getirirler. Akrozom, salgı görevinde olan ve hücre çekirdeği ile yakın ilişkide bulunan dev bir "lizozom" gibi düşünülebilir.

Hücre çekirdeği kromatini daha sıkı yoğunlaşma (kondenzasyon) gösterir. Bu yapının iç membranı, çekirdek membranı ile sıkı ilişkidir. Özellikle mayoz bölünme sırasında, RNA ve protein sentezi maksimum düzeydedir ve erken spermatogenez sırasında oldukça azalarak, neredeyse sıfır seviyesine iner. Spermatogenezin kromatinin yeniden organizasyonu sürecinde, hücre çekirdeği somatik hücreye benzeyen "nükleozom" yapısını, memeli spermiyumunun "nükleoprotamin" yapısındaki çekirdek yapısına dönüştürür. DNA sarmalı arasında bulunan histonlar önce geçiş proteinleri (transizyon proteinleri-TP1 ve TP2) ile yer değiştirirler ve daha sonra bu geçiş proteinleri de yerlerini "arjininden zengin", küçük bazik proteinlere, yani protaminlere bırakırlar (Şekil 2.5) [63]. Protaminlerin temel görevleri, fonksiyonel bir spermiyum için gerekli olan, hücre çekirdeğinin sıkıca paketlenmesi gibi görünmektedir. Spermiyumun DNA'sı, protaminlerle ilişkiye girerek çizgisel, yan yana olan kromatin ışınlarını oluştururken, somatik

hücre DNA'sı histonlar etrafında dolandır. Memeli spermiyum kromatini, spermatogenezin en son post-mayotik aşamalarında, histonlar tamamen protaminler (protamin 1 ve 2) ile yer değiştirdiğinde yaklaşık 10 kattan daha fazla bir yoğunlaşma gösterir [64]. Kromatinin yeniden modellenmesi sayesinde spermatid DNA'sı çok küçük hacimde paketlenir. Protamin genlerinden herhangi birisine sahip olmayan erkek farelerde, spermin çekirdek yoğunlaşması tahrip olur [65]. Bununla birlikte protaminler normal fertilite için de önemlidir. Örneğin fareler PRM1 ya da PRM2'den herhangi birinin haplo-yetersizliğini tolere edememektedir ve bu farelerde ciddi oranda subfertilite ya da infertilite gözlenmektedir [65, 66]. Ayrıca protamin bakımından problemlili sperm ile fertilize olan sağlıklı ovositlerden elde edilen embriyolarda görülen implantasyon başarısızlığının, tamir edilemeyen DNA hasarı olduğu ileri sürülmektedir [67, 68].

Spermatidlerde, kromatinin yeniden düzenlenmesinin ardından transkripsiyon durur. Transkripsiyonun durmasından önce mRNA'lar spermatidlerde depo edilir ve daha sonra bu depo mRNA'ların kullanılmasıyla birlikte protein translasyonu gerçekleşir. Bu olay translasyonel gecikme olarak adlandırılır. Mayozdan sonra ve spermatid kondenzasyonundan önce, büyük miktarda mRNA transkribe edilir ve haberci (messenger) ribonükleoprotein parçacıkları (mRNP) olarak depo edilir. mRNP'ler daha sonra uzamış spermatidlerde translasyona uğratılır [69]. Ayrıca, spermatositlerde ve yuvarlak spermatidlerde, mRNA depolanmasını kolaylaştırmak amacıyla çok miktarda RNA-bağlayıcı protein üretilir.

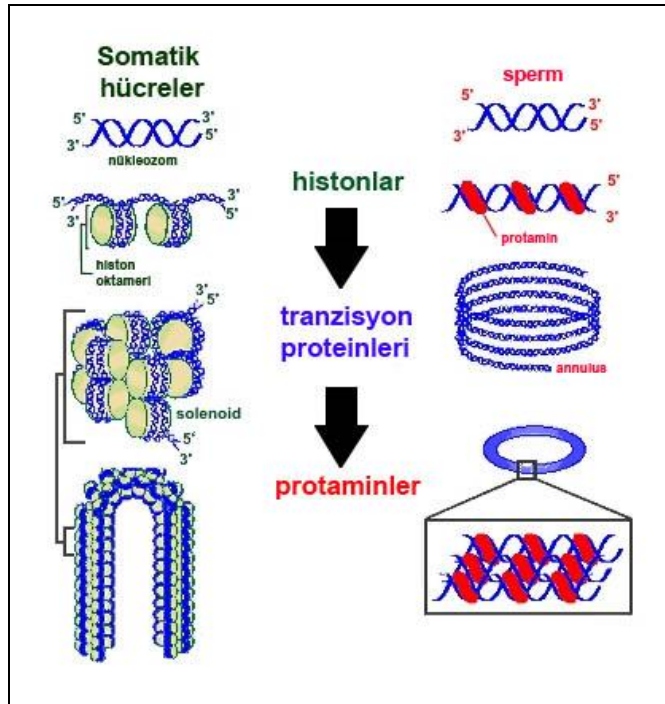
Sperm kuyruğunun (flagellum) gelişimi, haploid erkek germ hücrelerinde başlar. Spermatidde bulunan iki sentriyol ise, gelişmekte olan akrozoma zıt yönde göç eder ve bunlardan bir tanesi ışınal bir düzenleme göstererek gelecekte oluşacak spermiyum kuyruğunun "aksonem" yapısını meydana getirirken, bu sentriyole 90°'lik açıyla konumlanan diğer sentriyol ise, kuyruğu çekirdeğe bağlayan bağlantı parçasını oluşturur. Kuyruğun aksonem parçası uzayarak tabanındaki halka (annulus) yapısına tutunur.

Spermatidlerdeki yeniden-şekillenmede, kuyruk oluşumu dışında, sitoplazma içeriğinin büyük kısmının atılması da söz konusudur. Bu olay sonrasında, daha küçük ve kendi genetik bilgisini etkili bir şekilde ovosite aktaracak olan hücre soyu ortaya çıkar. Sitoplazmanın yeniden organizasyonu sırasında spermatidler kendi orijinal hacimlerinin %25'ine kadar küçülür [70]. Bu olayda, çekirdek ve sitoplazmadaki suyun çıkarılması (eliminasyonu), bazı sitoplazmik kısımların uzayan spermatidlerden atılması [71] ve sperm salınımı sırasında rezidual (kalıntı) cisim olarak adlandırılan paketlenmiş sitoplazmanın atılması söz konusudur [72].

Spermiyasyon, matür spermatozoanın tübül lümenine atılmasını tarif eder. Memelilerde, geç spermatidler, tübül lümenine salınımlarından önce kademeli olarak Sertoli hücreleri ile olan bağlantılarını kaybeder [59]. Ancak bu olayı kontrol eden mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, spermatidde yer alan mitokondriyonlar bölünürler; dış yoğun fibrillerle ilişkiye geçerek tipik çiftli sarmal (heliks) yapısını meydana getirirler.

Spermiyogenez tamamlandığında, spermatogenik hücre serisindeki hücrelerin Sertoli hücreleri ile olan sitoplazmik uzantıları kırılır ve spermiyumlar seminifer tübül lümenine salınırlar. Spermiyogenez süreci Sertoli hücrelerinin desteği ile gerçekleşir; bunun için spermatid ile Sertoli hücresi arasında “simbiyotik” bir yaşam vardır. Olgun bir spermatozoanın sitoplazmasının yaklaşık %70’i geride kalır ve muhtemelen Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir.



Şekil 2.5. Kromatinin yeniden paketlenmesi ve somatik hücrelerle karşılaştırması [64].

2.5. Spermatogenezin Endokrin ve Parakrin Kontrolü

Kemirgenlerde hormonlar spermatogenezin bütün aşamalarını etkilemektedir. Germ hücre proliferasyonu ve hayatta kalımı, büyük oranda gonadotropin-bağımlı mekanizmalara bağlıdır. Hipofiz gonadotropinlerinden olan, folikül stimulan hormon (FSH) ve Luteinleştirici hormon (LH), spermatogenezin önemli düzenleyicileridirler (Şekil 2.6). Erkek bireylerde FSH, Sertoli hücre sayısının belirlenmesi, sperm üretiminin uyarılması ve devamlılığı için gereklidir. FSH etkisini, Sertoli hücrelerinin plasma membranı üzerinde bulunan G-protein ile birleşik FSH reseptörleri aracılığıyla yapar [73]. FSH’ın kemirgenlerde spermatogoniyumların hayatta kalımını kontrol eden mekanizmalarla, onların gelişimi üzerinde rol oynadığı üzerine bilgiler bulunmaktadır. Sertoli hücreleri üzerindeki FSH sinyali, en azından beş farklı sinyal yolağını aktive eder. Bunlar, cAMP ve protein kinazı, MAP kinazı, kalsiyum, fosfatidilinositol 3-kinaz ve fosfolipaz A2 yolaklarıdır [74]. Bu yolaklar, en sonunda cAMP cevap elementi

(CRE)-bağlanma proteinini (CREB) aktive eder ve spermatogenezin aşağı (downstream) hedef genlerini transkribe ettirir.

Testosteron, LH stimülasyonuna bağlı olarak Leydig hücrelerinden sentezlenir [75] ve Sertoli hücreleri üzerinde yerleşimli androjen reseptörleri üzerinden biyolojik etkisini gösterir [76]. Androjenlerin cAMP ve sinyal yolağı gibi ikincil mesajcılar üzerinden non-genomik davranışı üzerine de kanıtlar bulunmaktadır [77]. Özellikle, spermiyogenezin sonraki aşamalarını düzenlediği ileri sürülmektedir.

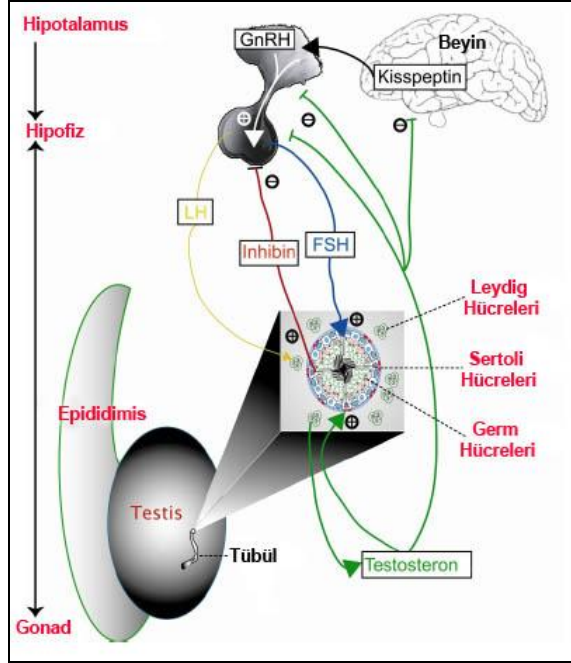
Testisin çeşitli hücre tiplerinin fonksiyonları birbirleri ile bağlantılıdır. Örneğin; Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron, peritübüler hücrelere ve Sertoli hücreleri üzerine etki yapar; böylece hem germ hücrelerinin gelişimine önayak olur, hem de damar yapısında bir etki meydana getirir. Dolayısıyla, testosteron testis dokusunda endokrin bir etkiden çok parakrin bir ürün olarak görev yapar [78]. Bununla birlikte, FSH ile birlikte spermatosit gelişimini destekledikleri üzerine tartışmalar yapılmaktadır. Dolayısıyla, kaliteli ve tamamlanmış bir spermatogenez için her iki hormonun kontrolü gereklidir.

Seminifer epitelin, eksojen FSH ve LH uyarısına cevabı lokal faktörler tarafından düzenlenir. Endokrin ve parakrin mekanizmalar arasındaki ilişki testisin fonksiyonlarını belirler. Ancak, bu ilişkinin doğası ve mekanizmaları bu konuda bir çok çalışma yapılmasına rağmen hala tartışmalıdır. Çok sayıda potansiyel parakrin faktörler keşfedilmesine rağmen, bu faktörlerin *in vivo* fizyolojik etkilerine dair direkt deliller oldukça azdır [79, 80].

Testiküler fonksiyonun düzenlenmesinde gonodotropin üretimini negatif yönde etkileyen aktivin, inhibin ve follistatin gibi hormonlar da rol oynar. Türler arasındaki belirgin farklılıklardan dolayı, kontrol mekanizmasını genelleyebilmek oldukça zordur. Ayrıca, birçok araştırma deney hayvanlarında yapılmasına karşın insanda yapılabilecek araştırma imkanları sınırlıdır. Ayrıca testis biyokimyası ve fizyolojisi homojen bir yapı olarak düşünülemez. Belki de, spermatogenezin endokrin/parakrin kontrolünü anlamının daha gerçekçi bir yolu, tübülün her bir bölümünü bir “mikrokosmos” olarak düşünmek olmalıdır [80].

Germ hücresi ile Sertoli hücresi arasındaki ilişkiyi düzenleyen mekanizmalar henüz tam anlamıyla açıklanamamış olsa da, pakiten evresindeki spermatositler, Sertoli hücrelerini stimüle ederek “androjen bağlayıcı protein” üretimini ve “adenilat siklaz” aktivitesini stimüle ederler. Yuvarlak spermatidlerin hiçbir uyarıcı etkileri olmadığından dolayı bu etkiler hücreye özeldir [81]. Sertoli hücreleri ayrıca, testis içi düzenleyiciler olan “transferin” ve “insülin benzeri büyüme faktörünü” de üretirler. Sertoli hücreleri tarafından üretilen parakrin düzenleyicilerin üretimi ve etkileri, seminifer epitel siklusu tarafından kontrol altındadır. Buna örnek olarak, Sertoli hücrelerinin transferin üretimi verilebilir [78, 79].

Sonuç olarak, testiküler germ hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması, somatik ve germinal elemanlar arasındaki bir seri kompleks ilişkiyi içerir. Bu ilişkiler endokrin, parakrin ve otokrindir. Bu mekanizmalar, testisin normal fonksiyonu için ince bir denge sağlarlar.

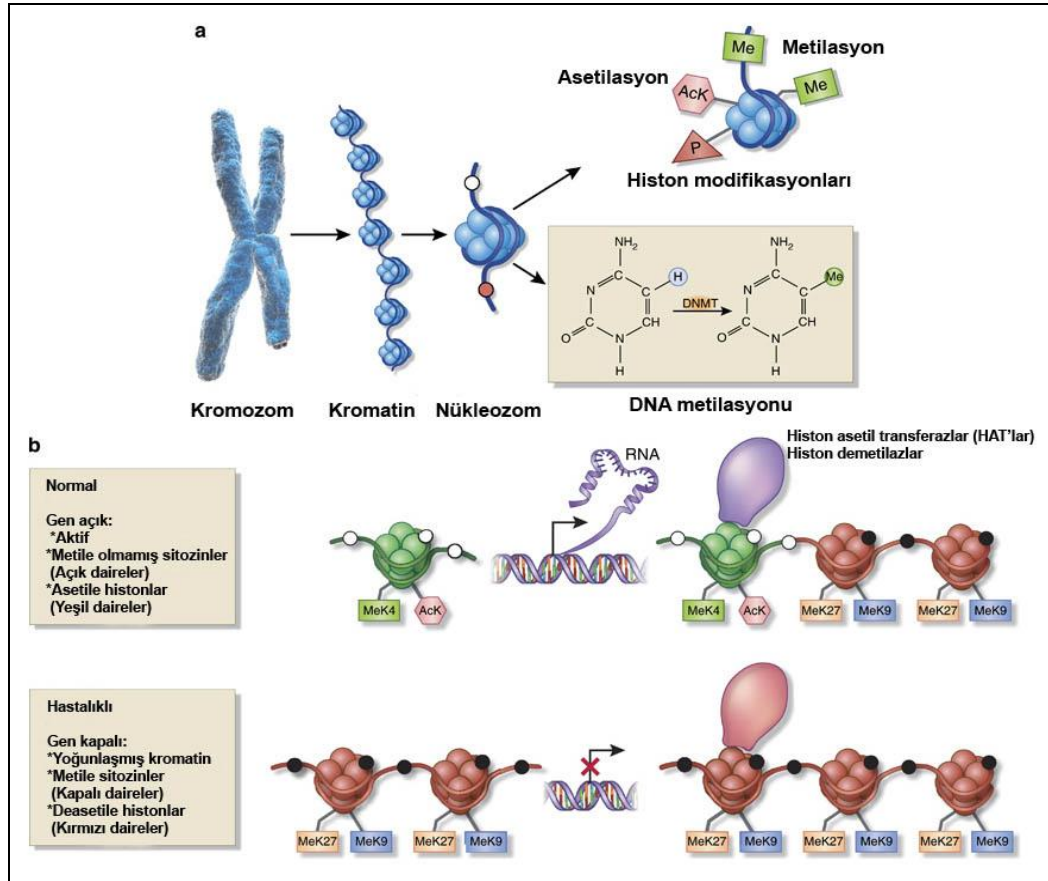


Şekil 2.6. Hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini boyuncası erkeklik fonksiyonunun endokrin kontrolü. Kisspeptin beyinden salgılanır ve Gonadotropin-salğılatıcı hormon (GnRH) salınımını stimüle eder. Hipotalamustan salgılanan GnRH ise hipofizden gonadotropinlerin (FSH ve LH) salınımını indükler. Serum testosteron ve inhibin, kisspeptin, GnRH ve her iki gonadotropinin üretimini negatif geri bildirim ile downregüle eder [82].

2.6. Epigenetik Mekanizmalar

İlk olarak, 1950’lerde Conrad Waddington tarafından önerilen “*epigenetik*” terimi, DNA dizisinde bir farklılık yaratmadan gen ekspresyonunu değıştiren ve bir sonraki oğul dölle aktarılabilen değışiklikler olarak tanımlanmaktadır [83]. Epigenetik, normal memeli gelişimini anlamak için, son yılların en çok üzerinde çalışılan konularından biridir. Bunun nedenlerinden birincisi, epigenetik düzenlenim olmadan normal embriyogenezin devam edememesidir. DNA metiltransferaz ve histon düzenleyicilerinin nakavt edildiğı fareler letaldır [84, 85]. Ayrıca farede yapılan çalışmalar, normal gelişim için maternal ve paternal genomun eşit oranda katılımının gerekliliğini vurgulamaktadır [2, 86]. İkincisi, insan genomunun büyük bir kısmında, epigenetik modifikasyonlar için hedef olan sitozin-guanin (CpG) dizilerinden zengin, türler arasında korunmuş eksonik olmayan elementlerin varlığıdır [87]. Üçüncü bir neden ise nükleer klonlama deneylerinden elde edilen bilgilere göre, farklı dokulardaki hücrelerde mevcut olan bilgi, uygun koşullar altında yeniden programlanabilir ve bu nedenle epigenetiktir. Yeni oluşan pluripotent embriyonun genomu, köken aldığı farklı somatik hücrenin genomu ile aynıdır. Dolayısıyla bilgi içeriğı (epigenetik), yumurtanın yeni hücrel çevresi içerisinde değışime uğramıştır.

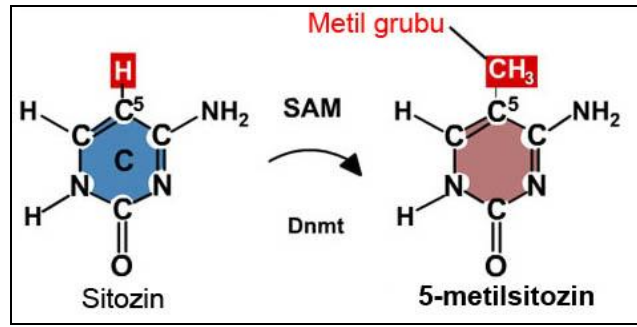
Epigenetik değişiklikler, gen ekspresyonunu düzenler, transposable elementlerin aktivitesini susturur, genetik imprinting ve X kromozom inaktivasyonunda olduğu gibi gen dozajlamasını belirler [88]. Epigenetik mekanizmalar arasında DNA metilasyonu, histon asetilasyonu, metilasyonu, übikütinasyonu ve fosforilasyonu gibi kromatin modifikasyonları bulunmaktadır [89]. Genel olarak sitozin metilasyonu ve histon asetilasyonu, yoğunlaşmış kromatin durumu ve sessiz gen ekspresyonu ile ilişkilidir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Epigenetik modifikasyonların mekanizması. a) Kromatin yapısındaki epigenetik modifikasyonlar. DNA'nın histon oktetmerleri üzerine sarılması sonucu, nükleozomlar oluşur ve bu yapı kromatine organize olur. Histon modifikasyonları, metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyon nedeniyle pekçok alanda gerçekleşir. DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar yardımıyla, sitozin dizilerinin (CpG alanları) 5. karbon pozisyonunda olur. Bu modifikasyonlar, kromatin organizasyonu ve gen ekspresyonunu düzenleyen eşsiz "epigenetik imzanın" atılmasını sağlar. b) Epigenetik değişiklikler, hastalık durumu ile ilişkilidir. Normal sağlıklı dokularda, aktif olarak transkribe olan genlerin promotor bölgeleri, CpG dinükleotidlerinde DNA metilasyonu içermez. Histonlar, lizin 4 metilasyonu, MeK4 ve lizin 9'un asetilasyonu gibi aktif işaretler ile modifiyedir. Transkripsiyon başlama alanı açık ve nükleozomlardan yoksundur. Bu durum, histon kuyruklarını modifiye eden enzimlerce (histon asetil transferazlar ve histon demetilazlar) devam ettirilir. İntra-ve intergenik bölgeler yoğun olarak metile olmuş CpG adacıkları ve inaktif histon modifikasyonlarına (lizin 9 ve lizin 27 metilasyonu) sahiptir. Hastalık durumunda, CpG alanlarındaki metilasyon, represif kromatin işaretleri ile histon deasetilaz (HDAC'lar) ve histon metil transferazların (HMTazlar) varlığında oluşan değişimler ile ilişkilidir. Represif kromatin işaretleri, transkripsiyon başlama alanında nükleozom ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olarak, gen transkripsiyonu önler [89].

2.6.1. DNA Metilasyonu ve Gen İfadesi

Günümüzde kabul edilen görüş hücre genomunun işlevini görebilmesi için major epigenetik düzenleyicinin DNA'nın metilasyonu olduğudur. DNA metilasyonu, omurgalılarda CpG adacıkları adı verilen, 200-2000 bp uzunluğunda ve CG dinükleotidi açısından zengin genomik bölgelerdeki sitozin bazlarında meydana gelmektedir. Sitozin bazları sadece CG dinükleotidi varlığında metillenebilir. Metilasyon, S-adenozilmetionini (SAM) metil grubu vericisi olarak kullanan DNA metiltransferaz (DNMT) adı verilen enzimler tarafından gerçekleştirilir [90, 91] (Şekil 2.8). Üç temel DNMT tanımlanmıştır. DNMT1 (koruma metilazı), replikasyon sırasında daha önce metillenmiş halde bulunan sitozin bazlarını tanıma ve replikasyon sırasında metilasyonu yavru hücrelere aktarma yani metilasyonun korunmasını sağlama özelliğine sahiptir. DNMT3a ve DNMT3b ise “*de novo*” metilasyondan sorumludurlar [92]. Ek olarak, 2 DNMT homologu daha tanımlanmıştır. Bunlardan DNMT2'nin substratı ve DNA metilasyon aktivitesi henüz tam olarak bilinmemektedir fakat tRNA'yı metile ettiği gösterilmiştir [93, 94]. DNMT3L, maternal genomik imprintlerin kurulması için gereklidir [95]



Şekil 2.8. DNA metiltransferazlar (Dnmt) tarafından metil gruplarının bağlanması ve metilasyon [96].

Yapılan çalışmalarda, kromatin üzerindeki aktif ve inaktif bölgelerin DNA metilasyonunun dağılımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. İnaktif bölgelerde DNA metile haldeyken, aktif bölgelerde metilasyon gözlenmez. Metile dizilerde DNA replikasyonu sırasında baz eşleşmesinde bir değişiklik olmaz ve replikasyon sonrasında atasal zincirin komplementeri olan yeni sentezlenen zincirde yer alan sitozine, metil grubu DNMT1 tarafından takılır ve böylelikle metilasyon oğul döllere aktarılır [92]. Normal dokularda CpG dinükleotidlerinin büyük bir kısmı aktif ya da inaktif olmalarına bakılmaksızın metillenmemiş haldedirler. Kanser hücrelerinde ise bu genlerin büyük bir kısmı metile haldedir [97].

Metillenmenin nasıl sonuçlandığı ile ilgili iki görüş öne sürülmüştür. İlk görüşe göre metilasyon, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma özelliğini inhibe eder. Pek çok transkripsiyon faktörünün metilasyon tanıma bölgelerinin bulunduğu ve metilasyona duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Ancak daha sonra metilasyon tanıma bölgeleri bulunmayan ve metilasyona duyarsız transkripsiyon faktörleri de keşfedilmiştir. Bunun sonucunda, daha genele yayılabilir bir görüş ortaya atılmıştır.

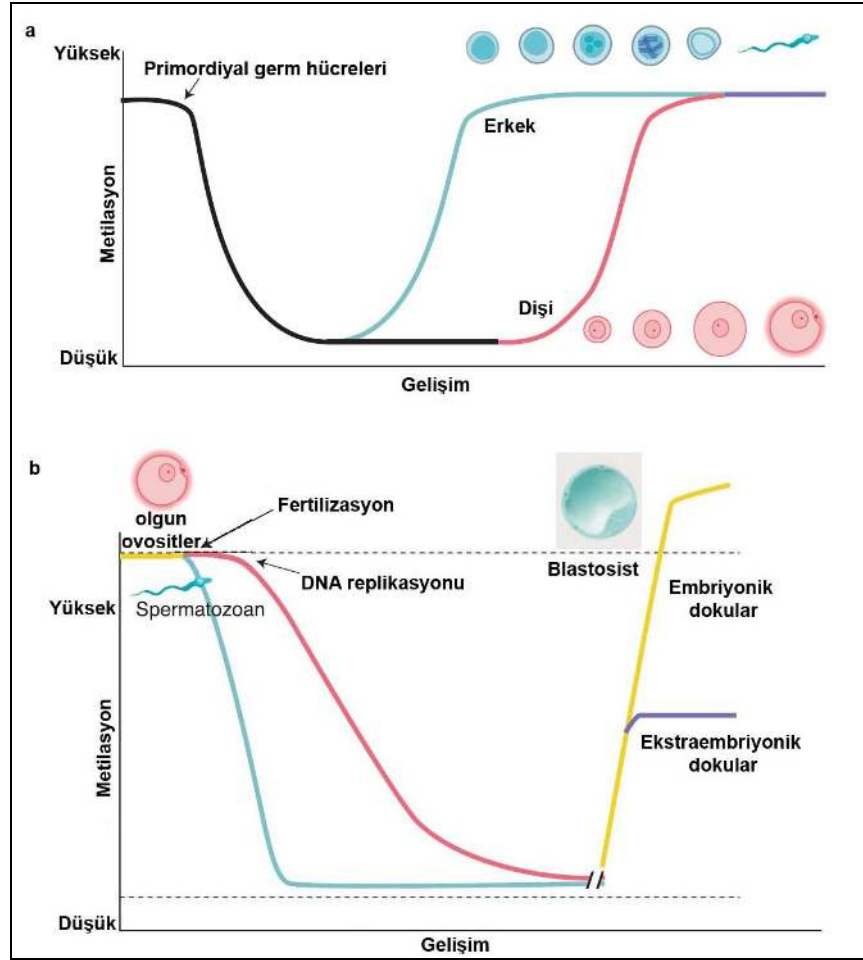
Günümüzde de kabul gören bu görüşe göre, DNA metilasyonu metil içeren DNA'ya bağlanabilen proteinlerin bağlanmasına öncülük eder. Bu proteinlerin en iyi tanımlanmış örnekleri MeCP2, MBD2 ve MBD3'tür. Bu proteinler histon deasetilazlarla (HDAC1 ve HDAC2) ve kromatin yeniden modellenme aktiviteleri ile birlikte çalışırlar. Tüm bu kompleksler kompakt bir kromatin yapısı meydana getirerek, transkripsiyonu baskırlar. DNA hipermetilasyonunun dışında hipometilasyon da, kromozom instabilitesine, retrotranspozon elementlerin ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak karsinogenezisin gelişiminde önemli rol oynayan epigenetik mekanizmadır [7].

DNA metilasyonu erkekte üreme organlarının gelişiminde, spermatogenezde ve seksüel davranışlar üzerinde kanıtlanmış etkiye sahiptir. Sperm genomunda DNA metilasyonu spermatozoanın olgunlaşmasında son derece önemli bir reaksiyondur. Spermatogenez sırasında görülen DNA metilasyonuna ait olaylar deneysel çalışmalarda açıkça gösterilmiştir [26]. Bu konuda en çok 5-azasitidin adlı ilaçla yapılan çalışmalar yardımcı olmuştur. 5-azasitidin germ hücreleri çoğalırken, replikasyon sırasında DNA'nın yapısına girerek metilasyonunu önler [98]. İşte bunun sonucunda, yoğunlaşmış spermatid ve spermatozoa sayılarında azalma, preimplantasyon dönem embriyolarında da gelişim bozuklukları geliştiği ortaya konmuştur [27].

2.6.1.1. Primordiyal Germ Hücrelerinde (PGH) Metilasyon

PGH DNA'sında metilasyon çok azdır. PGH'leri gonadal kabartıya göç ederlerken geniş çapta bir demetilasyona uğrar. Bu dönemde aileden gelen imprinte olmuş, yani baskılanmış özellikler silinerek ortadan kalkmaktadır. Böylece hücre farklılaşmasına olanak sağlanır. Detaylı çalışmalar, PGH'lerin gonadal kabartılara göç ettikleri çiftleşmeden sonraki 10.5 ve 12.5. günler arasında DNA'larında metilasyonların ortadan kalktığını (demetilasyon) göstermiştir [43] (Şekil 2.9).

Çiftleşmeden sonraki 12.5-13.5. günler arasında artık erkek ve dişi germ hücrelerinin genomları aileden gelen imprinte olmuş lokusları kapsayacak şekilde, kuvvetli bir hipometilasyon durumundadırlar [99]. Embriyonun erkek ya da dişi yönünde gelişimine bağlı olarak gametler gelişirken bir süre sonra ya da fertilizasyonu takiben imprinting olayı yeniden başlar. Eğer bu sırada imprinting mekanizmasında sorunlar olursa, fetüsün gelişimi de anormal olur, hatta malign hastalıklar ortaya çıkabilir [10].



Şekil 2.9. (a) Üreme hücrelerinde metilasyonun yeniden programlanması. Farede primordiyal germ hücreleri (PGH) gelişimin erken dönemlerinde demetile hale gelir. Embriyonik 16. günde erkek germ hücrelerinde prospermatogoniya aşamasında remetilasyon başlar. Gelişen ovositlerde ise doğumdan sonra remetilasyon görülür. (b) Preimplantasyon embriyolarında metilasyonun yeniden programlanması. Paternal genom mavi, maternal genom kırmızı ile gösterilmiştir. Her ikisi de implantasyon döneminde, embriyonik ve ekstraembriyonik dokularda farklı miktarda remetile olur [100].

2.6.1.2. Spermatogenezde DNA Metilasyon Değişiklikleri

Erkek farelerde PGH'leri gelişirken DNA'larında demetilasyonunun hemen arkasından, germ hücreleri çoğalmalarına ara verirler ve bu sırada nükleuslarında kuvvetli bir DNA metilasyonu başlar [101]. Bu hipermetilasyon durumu germ hücrelerinin yeniden çoğalmaya başladıkları doğuma kadar sürer. Metilasyona uğrayan sekanslar artık transkripsiyon yapamaz duruma geçmişlerdir. Her ne olursa olsun, doğumdan sonra DNA'daki hipermetilasyon durumu hücre bölündükçe azalmaya başlar [102].

2.6.1.3. Erişkin Testisinde Metilasyon

Testise özgü genlerin büyük kısmı testiste demetile olup ekspre edilirlerken, ekspresyon yapmayan somatik dokularda metilasyona uğramış durumdadırlar. Bu da göstermektedir ki, DNA'nın metilasyon durumu genlerin ekspresyonlarında rol

oynar [103]. Erişkin erkekte spermatogoniyumlar gelişirken, DNA replikasyonunu tamamlayıp mayozla girdiğinde genleri ya metile olur ya da metilasyonu ortadan kalker. Ancak anne ve babadan gelen allellerin metilasyona uğrama zamanları farklıdır. Babadan gelen allelin metilasyonu mayoz başlamadan önce olurken, anneden gelen allel mayoz sırasında metile olur [104]. Spermatogenez sırasında DNA'nın global metilasyon derecesi değişir. Örneğin erişkin testisinin spesifik antikörlerle incelenmesiyle bütün hücrelerde metile olmuş sitozinler gösterilirken, bu metilasyon spermatositlerde görülmemektedir [30].

Farelerde primitif A tip spermatogoniyumlarda DNA az metilasyona uğrarken, pakiten spermatositlerde, yuvarlak spermatidlerde ve epididimal spermelerde DNA'nın metilasyonu fazla olur. Germ hücreleri gelişirken geç dönemlerde yeni metilasyonlar görülebilir. Örneğin bazı genler sadece epididimden geçerken metilasyona uğrarlar [105]. Dolayısıyla spermatozoanın olgunlaşmasının tamamlanması için bazı genlerde DNA'nın metilasyonu gerekir.

2.6.1.4. Fertilizasyonda Metilasyon

İnsanda erkek ve kadından gelen iki farklı kromatin seti birleşerek tek hücreli bir embriyo oluşturur. Erkekte gelen spermdeki kromatin, içerdiği protaminler nedeniyle oldukça yoğunlaşmış durumdayken, ovositin kromozomları ise ikinci mayozun metafazında duraklamış halde olup, nükleozomu normal bir yapı gösterir. İşte iki taraftan gelen böyle farklı yapıdaki kromatin setleri dört-hücreli embriyo oluşana kadar farklılığını sürdürür ve ancak bundan sonra aralarındaki fark kaybolmaya başlar [106].

Sperm ve ovosit fertilizasyon sırasında metilasyona uğramaları nedeniyle transkripsiyon yapamazlar. Oysa diploid olduktan sonra embriyonun somatik gelişimini sürdürebilmesi için kromatin DNA'sı metilasyon durumunda değişiklik yaparak yeniden şekillenir. Bunun için erken embriyo evresinde babadan gelen genom fertilizasyonun ilk birkaç saati içerisinde demetilasyon geçirirken, anneden gelen genom iki-hücreli embriyo dönemini takiben sadece pasif bir demetilasyon süreci izler. Morula ve blastosist geliştikten sonra ise artık her iki genom da eşit oranda metilasyon kaybına uğramışlardır ve daha sonra yeni metilasyonlar oluşur [100].

2.6.2. Histon Modifikasyonları

DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Bu modifikasyonlar arasında; HAT (histon asetil transferaz)'lar tarafından asetillenme ve HMT (histon metil transferaz)'lar tarafından metillenme yer almaktadır. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde düzenleyici olarak rol oynar. Örneğin, asetil grupları histonlardaki (+) yükü nötralize ederek histonlar ve DNA arasındaki elektrostatik etkileşimleri zayıflatır.

Belirli bazı histon modifikasyonları ökromatinin ve heterokromatinin aktif ya da inaktif belirteçleri olarak kullanılabilirler. H3 ve H4 histonlarının lizin dizilerinin asetillenmesinin aktif kromatinle korelasyon gösterdiği, deasetilasyonun ise kromatinin daha sıkı bir şekilde paketlenerek genlerin inaktif duruma geçmesiyle sonuçlandığı bilinmektedir. Histon lizin metilasyonu ise, asetilasyonun tersine, hangi dizide olduğuna göre aktivasyon ya da inaktivasyonla sonuçlanabilir. Bu yolla, histonlardaki spesifik modifikasyonlar, transkripsiyonel olarak aktif ve inaktif kromatinin belirlenmesinde bir çeşit “belirteç” olarak kullanılabilir.

Genel olarak, histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir.

2.7. Genetik İmprinting

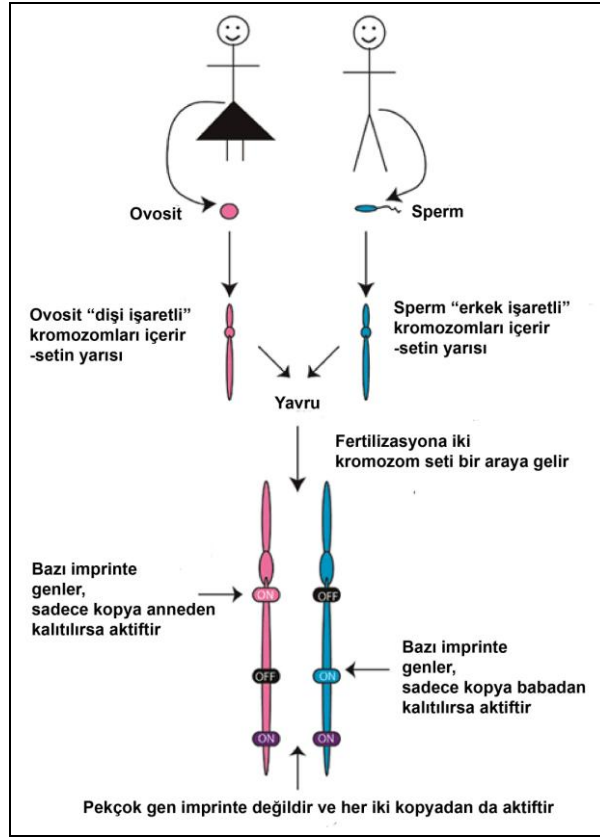
Embriyonal ve postnatal dönemde bazı genlerin parental orijinine bağlı olarak ekspresyon göstermesi "genomik imprinting" olarak tanımlanmaktadır [107, 108] (Şekil 2.10). Genomik imprinting, memelilerde epigenetik kalıtımın güzel bir örneğini teşkil eder. Mendel kalıtımında hangi ebeveyninden gelirse gelsin kalıtım eşdeğerdir. Ancak genomik imprintingte bu durum farklıdır. Genomik imprinting, non-mendelian kalıtım göstermektedir.

İmprint genlerin ekspresyonu DNA metilasyonu, yeniden nükleozom modellenmesi ve histon değişimleri gibi olaylarla sürdürülmektedir. Bu durum normal fetal veya davranışsal gelişim için kritik olan genlerin ekspresyonunu sınırlamak için gerçekleşmektedir. Normal insan hücrelerinde şimdiye kadar tanımlanmış 20-25 bin genden yaklaşık 83'ünün imprinte olduğu bilinmektedir.

Genomik imprinting kanser, zihinsel yavaşlık gibi doğuştan kusurlara yol açar [97]. Prader-Willi, Angelman sendromları, Beckwith-Wiedemann Sendromu gibi bazı genetik hastalıklar spesifik genlerin ve kromozom bölgelerinin imprintinginde oluşan hatalarla ilişkilidir [109, 110]. Örneğin Wilms tümörü kromozom 11'de imprinte *IGF2/H19* lokusu ile ilişkili embriyonik böbrek kanserlerinden biridir. *H19* büyümeyi baskılamak, *IGF2* pek çok kanserde yüksek oranda ekspre olan insülin benzeri büyüme faktörü 2'yi (*IGF2*) kodlar ve hücre büyümesini stimüle eder [111, 112]. *IGF2/H19* lokusundaki imprinting kaybı, kontrolsüz hücre büyümesi ile sonuçlanır, tümör oluşumunu başlatır.

Son yıllarda yardımcı üreme teknikleri ile dünyaya gelen çocuklarda çeşitli imprinting bozukluklarının insidansında artış rapor edilmektedir. Genomik imprinting bozukluklarının hipospermatogeneze yol açtığı ve oligozoospermik erkeklerin bu imprinting defektlerini çocuklarına geçirdikleri gözlenmiştir [29].

Hastalıklara neden olmanın yanında genomik imprinting evrime çok büyük bir katkısı vardır. Evrim sürecinde dişi ve erkekler arasındaki dengenin oluşmasında etkilidir.



Şekil 2.10. Şematize bir şekilde genetik imprinting tanımı ifade edilmektedir.

2.7.1. İmprinte Genlerin Genel Özellikleri

İmprinte genlerin ortak özelliklerinin ortaya konulması oldukça zor olsa da şu ana kadar yapılan çalışmalarda, geniş alanlarda (DNA'da onlarca kilobaz mesafede) kümelenme göstermeleri dikkat çekici bir özelliktir. Genomda yapılan haritalama çalışmaları bu gözlemi destekler niteliktedir. Ayrıca pekçok kümede maternal ve paternal imprinte genler birarada bulunmaktadır. Kümelenmenin nedeni bilinmemektedir ancak imprinte genlerin dağılımının tesadüfi olmadığı ve gelişim boyunca bu genler arasında bir etkileşimin olduğu ileri sürülebilir.

Pekçok vakada görülen DNA replikasyonunun asenkronizasyonu, imprinte genlerin bir başka ortak özelliğidir [113]. İmprinte genlerin büyük bir kısmı protein kodlar ancak *H19* gibi bazıları transle olmayan RNA kodlamaktadır [114]. Fare ve insanda, imprinte genlerin yarısından fazlası korunmuştur, geri kalanı ise farklı davranış gösterir. Örneğin *Igf2r* farede imprinte iken insanda değildir [115]. Bu durum memeli evrimi boyunca farklı genlerin imprintinginin oluşmasında bağımsız gelişimi ifade edebilir.

En azından germ hücrelerinde tersine çevrilebilirlik (reversibilite), imprinte genlerin yaygın bir özelliğidir. Memelilerde görülen X kromozomu inaktivasyonu da imprinting ile benzer özellik gösterir. Her ikisinin ortak bir orijinden olup olmadığı

konusunda kesin bir bilgi olmasa da, X inaktivasyonundaki *Xist* geni, inaktivasyon için genetik imprinting ile benzer moleküler mekanizmayı kullanır.

2.8. DNA Metilasyon Çalışmalarında Kullanılan Moleküler Teknikler

Genel olarak 2 ana grup altında incelenebilirler: i) özgül olmayan metilasyon analizi için teknikler ve ii) dizi özgül metilasyon analizi için teknikler.

2.8.1. Özgül Olmayan Metilasyon Analizi

Sitozin metilasyon düzeylerindeki büyük değişiklikler ters faz HPLC (yüksek performans sıvı kromatografisi) metodu ile ölçülebilir. Bu yöntem metilasyon analizi için en eski metodlardan biridir [116]. Dnaz I ve nükleaz P1 [116] ya da alkaline fosfatase muamelesi sonrasında fosfodiesterazı [117] kullanarak DNA'nın kantitatif hidrolizi esasına dayanır. Bu teknik için oldukça fazla miktarda DNA gerekmektedir, optimizasyon ve örnek saflığının korunması kritiktir.

İnce tabaka kromatografisi, genomdaki metilasyon düzeyinin çalışılması için alternatif olabilir. Bu yöntemde, DNA öncelikle MspI restriksiyon endonükleazı ile kesilir ve internal sitozin [γ -³²P]ATP ve polinükleotid kinaz ile işaretlenir.

Metil alıcı metodlar ve korasetaldehit reaksiyonları nadir de olsa kullanılan metodlardır. Metil alıcı metotta, Sssl prokaryotik metil transferazı, metil grubu vericisinden (SAM-S-adenozil metionin) 3H işaretli metil gruplarını izole DNA'ya transfer eder [118]. Korasetaldehit reaksiyonu ise bisülfid modifikasyonu gerektirir, daha sonra dönüştürülemeyen sitozinlerin klorasetaldehit ile kimyasal reaksiyonu olur ve ortaya yoğun bir floresan ürün çıkar [119].

Ayrıca immünolojik olarak anti-metilsitozin antikorları kullanılarak metilasyonun tespit edilmesi mümkündür. Böylece genel metilasyon durumu hakkında bilgi edinilebilir.

2.8.2. Dizi-özgül Metilasyon Analizi

Dizi özgül genomik metilasyonu tespit edebilmek için kullanılan orijinal metodlar, DNA'nın metilasyon duyarlı restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve devamında Southern Blot hibridizasyon metoduna dayanmaktadır [120]. Fazla miktarda DNA gereksinimi (> 5 µg) ve kesim alanındaki CpG adacıklarının sınırlı sayıda olmasına rağmen bu metod hâlâ kullanılmaktadır. Duyarlılığı artırmak için, yöntem, daha sonraları PCR amplifikasyonu [121] ve PCR ürünlerinin kantitasyonu [122] ile birleştirilmiştir. Bu metotta tamamlanmamış kromozomal DNA kesimi ve örnek hazırlama süreçleri sıkıntılıdır. Ayrıca sadece ortalama metilasyon düzeyi hakkında bilgi verir, mosayik ve tam metilasyon paternleri ya da yarım-metilasyon ayrımını yapamaz.

Restriksiyon enzim kesimi ile mikroarrayleri birlikte kullanan diğer bir yöntem ise HELP (HpaII tiny fragment enrichment by ligation-mediated PCR)

olarak bilinir. Bu yöntemde, metile olmayan DNA ve genomik DNA'nın farklı hibridize olmasından yararlanılır ve HpaII kesim fragmentleriyle, metilasyona duyarlı olmayan MspI fragmentlerinin birlikte hibridizasyonu ile gerçekleştirilir.

Genomik sekans analizleri ise bir diğer değerlendirme metodudur. Bu metodlar içerisinde en özgül ve kantitatif metod "bisülfite genomik sekans" değerlendirmesidir [123]. Bisülfite reaksiyonu sitozinlerin urasil dizilerine dönüşümünü sağlar ve sonrasında yapılan PCR amplifikasyonu ve sekanslama ile timin olarak tanınırlar. Bu metotta sekanslamada metile sitozinler bisülfite ile reaksiyona girmedikleri için, sitozin olarak belirlenirler. Genomik DNA'daki metilasyon alanlarının doğrudan ve pozitif olarak belirlenmesini sağlar. PCR ile amplifiye edilen bisülfite ile muamele edilmiş DNA, doğrudan sekanslama için kullanılabileceği gibi, sonrasında nükleotid ekstansiyon metodları [124], primer spesifik PCR [125] veya pyrosekanslama [126] yapılabilir.

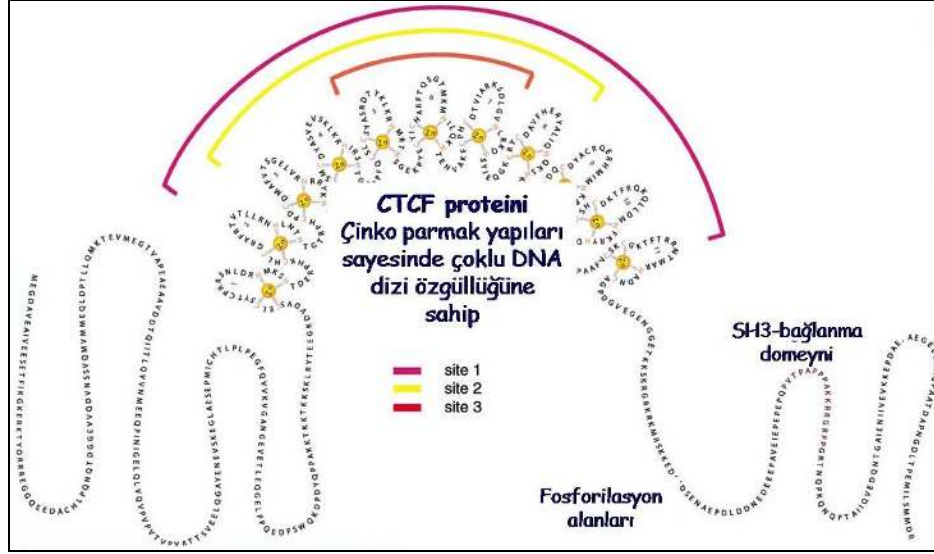
ChIP (kromatin immünopresipitasyonu) yöntemi bir diğer yaklaşımdır. Bu yöntem, hücrenin kromatin durumunun saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA ve ilişkili olduğu proteinlerin kimyasal muamele ile çapraz bağlanmaları sağlanarak, DNA-protein kompleksleri, çalışılan histon modifikasyonuna uygun bir antikor ile immünopresipite edilir. Ayrıca anti-metilsitozin antikorları kullanılarak metilenmiş DNA'nın genomdan izole edilmesi sağlanır. Dolayısıyla bu yöntemi MeDIP (metile DNA immünopresipitasyonu) olarak adlandıranlar da vardır. Bu yöntem mikroarray çipleriyle uygulandığında hızlı ve sağlıklı analizler yapılabilmektedir ve "ChIP on chip" olarak adlandırılmaktadır. ChIP, uygulayıcısına esneklik sağlamakla birlikte, spesifik ya da daha genel antikorlar kullanılarak istenilen bölgelerdeki histon modifikasyonlarını inceleyebilme imkanı sağlar.

2.9. CCCTC Bağlanma Faktörü (CTCF)

Memeli CTCF proteini, 11-çinko parmak (zinc finger) yapısına sahip bir proteindir [127] (Şekil 2.11). CTCF proteini, imprinte genlerin doğrudan transkripsiyonel aktivasyonu [128] ve represyonu [129], istenmeyen yükselticilerden promotorlerin izolasyonu [130], lokal epigenetik yapının kontrolü ve epigenetik bariyerlerin devamlılığı [131], Tsix'e bağlanmak suretiyle X inaktivasyonunun başlatılması, kromatin organizasyonu, imprinte olmayan genlerin dahi transkripsiyonel upregülasyonu ve downregülasyonu, büyüme, proliferasyon, farklanma, apoptoz gibi pekçok önemli hücresel olayda rol oynar [31, 36, 37, 127, 132, 133].

CTCF, *H19* ve diğer imprinte gen lokuslarında imprinte gen ekspresyonu için izolatör bir element olarak görev alır [134, 135]. Koşullu (kondisyonel) CTCF nakavt fare modellerinde, CTCF'in $\alpha\beta$ T hücrelerinde hücre siklusunun ilerlemesi [136] ve yardımcı T2 hücrelerinde sitokin ekspresyonu [137] için gerekli olduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise ZP3 promotorinin kontrolü altındaki transgenik antisens CTCF modelinde, preimplantasyon embriyo letalitesi görüldüğü bildirilmiştir [138].

In vitro, CTCF, DNA bağlanma domeyni içerisinde bulunan 11 adet çinko parmak yapılarının kombinasyonel kullanımı ile farklı DNA dizilerine bağlanabilme yeteneğindedir [139]. Çinko parmak DNA bağlanma domeynine ek olarak, CTCF proteini fonksiyonel amino (N) ve karboksi (C) domeynlerine de sahiptir. P³² ile işaretleme deneylerinde, CTCF'in C terminalinin dört adet serin dizisi içerdiği gösterilmiştir. Bu diziler *in vivo* fosforile olur ve *in vitro* kazein kinaz II (CKII) için substrat olarak görev yapar [140]. CTCF proteini memeliler arasında oldukça korunmuştur (insan ve tavuk arasında %93 korunma).



Şekil 2.11. Çoklu DNA-bağlanma dizi özgüllüğüne sahip bir transkripsiyon faktörü olan CTCF proteininin genel yapısı [31].

2.10. BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites)

Loukinov ve arkadaşları tarafından 2002 yılında tanımlanmış bir protein olan BORIS, literatürde CTCFL, CCCTC-bağlanma faktörü-benzeri protein ya da CTCF-T olarak da ifade edilir [30]. İlginç olarak, BORIS ekspresyonu, erişkin vücudunda normal koşullar altında özellikle “testiste” ve bunun dışında sadece “malignant hücrelerde” belirlenebilmiştir [31]. Bu nedenle, “kanser-üreme hücre hattı (germline) antijen ailesinden” biri olarak kabul edilir. Ayrıca Monk ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada (2008), preimplantasyon gelişiminin erken aşamalarında, insan ovosit ve 4 hücreli embriyolarında ve embriyonik kök hücrelerde ekspre edildiği gösterilmiştir [32].

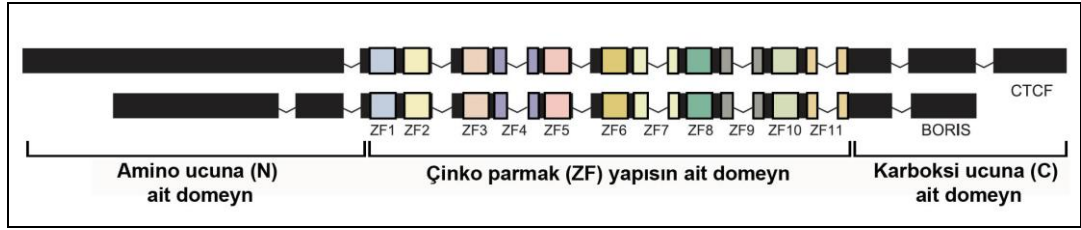
Kanser-üreme hücre hattı antijen gen ürünleri, genel olarak doku-sınırlı bir ekspresyon gösterir ve kanser hastalarında immünojeniktirler [141]. Bununla birlikte her ne kadar çoğu kanser-üreme hücre hattı antijeninin fonksiyonu bilinmese de, bazılarının gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde ve gametogenezin kontrolünde rol oynayabileceği belirtilmektedir [142, 143]. BORIS’i diğer kanser-üreme hücre hattı antijenlerinden ayrıcalıklı tutan nokta ise somatik dokularda übikuitöz olarak ekspre olan bir paraloğunun olmasıdır. Bu paralog, yukarıda detayları verilen ve son 20 yılda üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan CTCF proteindir. BORIS ve CTCF

proteinleri, tamamen birbirinin aynı merkezi 11-çinko parmak yapısına sahiptir ancak amino (N) ve karboksi (C) uçlarında farklılık gösterir [30, 144] (Şekil 2.12 ve Şekil 2.13). Dolayısıyla her iki proteinin aynı DNA bölgelerine bağlanabileceği fakat amino ve karboksi uçlarındaki farklılıklar nedeniyle farklı ve muhtemelen antagonistik fonksiyonlar gerçekleştirdikleri varsayılmaktadır [30, 31, 145]. Öyle ki BORİS ekspre eden bir hücre CTCF, CTCF ekspre eden bir hücre ise BORİS ekspresyonu göstermemektedir. Ayrıca CTCF'in aksine, BORİS metilasyon-bağımsız DNA bağlanma proteini gibi davranır [146] ve gen ekspresyonunu inhibe etmektense aktive eder.

Bu iki protein arasındaki rekabet karşılıklı özel ekspresyon tarzları ile büyük ölçüde engellenmiş bulunmaktadır. BORİS, kanser hücreleri, germ hücreleri ve kök hücrelerde ekspre olurken, CTCF farklı dokularda yaygın olarak bulunur [30, 32]. Çok yakın bir süre önce yayımlanan bir çalışmaya göre, BORİS'in nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre artmış hücre ölümü ile daha küçük testis yapısına sahip fareler gözlenmiştir [147]. Bu çalışmada, mayozda son derece önemli rol oynadığı bilinen Gal3stl (serebrosid sulfotransferaz-CST) transkript düzeylerinin testiste dramatik olarak düştüğü ve spermatogenezde CST'nin transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinde BORİS'in önemli olduğu gösterilmiştir [147].

MAATEIS-VLSEQFTKIKELELMPEKGLKEEKDGVCREKDHRSPELEAERTSG	54
MEGDVAEAVVESETFIRGKERKTYQRRREGGQEDACHLPQ-----NQTDG	47
-----AQQSVLEE-----EV-ELVLAPSEESE---KYILTLQTVHFT	127
GEVVQDVNSVQVMMEQLDPTLLQMKTEVMEGTVAPEAAVDDTQIITLQVVMME	104
SEAV---ELQDMSLLSIQQQEGVQVVVQPGPGLLWLEEGPRQSLQQCVAISIQQELYSPQ	145
EQPINIGELQ-----LVQVPVPTVP-VATTSVEE-----LQGAENEVSKEGLAES	150
EMEVLFQHALEE--NVMVASEDSKLAVSLAETAGLIKLEEEQKN-----QLLAERTKEQLFFVE	163
--EPMICHTLPLPEGFQVVKVGANGEVETLEQGEELPPQEDPSWQKDPDYPQPAKTKTKTKSKL	212
TMSGDERSDIEVLTVSNSNVEEQEDQPTAGQADAeka-----KSTKNQRKTGKAGT	256
RYTEEGKD-----VDVSVYDFEEQQEGLLSEVNAEKVVGNMKPPKPTKIKKGVKKT	265
FHCDVCMFTSSRMSSFNRMKTHTSEKPHLCHLCLKTFRTVTLRNHVNTHTGTRP	312
FQCELCSYTCPRSNLDRIMKSHTDERPHKCHLCGRAFTVTLRNHINTHTGTRP	321
ZF1	ZF2
YKNCDCNMAFVTSSELVRRHRYKHTHEKPFKCSMKCYASVEASKLRHVRSHTGERP	369
HKCPDCDMAFVTSSELVRRHRYKHTHEKPFKCSMCDYASVEVSKLRHVRSHTGERP	378
ZF3	ZF4
FQCCQCSYASRDYTKLKRIMRTHSGEKPYECHICTRFTQSGTMKIHLQKHGENVPK	427
FQCSLCSYASRDYTKLKRIMRTHSGEKPYECYICHAREFTQSGTMKIHLQKHGENVPK	436
ZF5	ZF6
YQCPHCATIIARKSDLRVHMNLHAYSAELKCRYCSAVFHERYALIQHKTHRNEKR	485
FHCPHCDTVIARKSDLRVHMNLHAYSAELKCRYCSAVFHERYALIQHKTHRNEKR	494
ZF7	ZF8
FKCKHCSYACKQERHMTAHIHTHTGEKPFCLSCNKCPRQKQLLNHFRKYHDANFIPTV	545
FKCDQCDYACKQERHMTAHIHTHTGEKPFCLSCNKCPRQKQLLNHFRKYHDANFIPTV	554
ZF9	ZF10
YKCSKCGKGFSRWINLHRHSEKCGS-----GEAKSAASGKGRTRKRRKOTILKEATKGQKE	601
FVCSKCGKGFTRNTARHADNCAGPDGVEGENGGETKSKRGKRRKMSKEDSSDSEN	614
ZF11	CTCF-Ser-phosphorylation
AAKGWKEAANGDEAAAAEASTTKGEQFPGEMFPVACRETTAR-----	643
AEPDL--DDNEDEEPAVEIEPEPEPQVTPAPPAPKRRRPPGRTNQPKQNP	667
-----VKEEVDGVTCEMLINTMDK*	663
TAIQVEDQNTGAIENIIVEVKKEPDAEPAEGEEEAQPAATDAPNGDLTPEMILSMMD*	727
-----CTCF's AT-hook	

Şekil 2.12. İnsan BORİS (üst sıra) ve CTCF (alt sıra) aminoasit dizilerinin karşılaştırılması. Aynı ve benzer aminoasitler kırmızı harflerle gösterilirken, çinko-parmak (ZF) yapılarındaki benzer diziler gri arka boyama ile gösterilmiştir. Kesikli çizgili diziler, boşluk şeklinde, çinko parmak yapılarının dışında çok az benzerlik olduğunu göstermek üzere kullanılmıştır. Başlıca Ser-fosforilasyon alanları ve varsayılan ilave DNA bağlanma-“AT-kanca” motifi, omurgalı CTCF proteinlerinde korunmuştur fakat bu yapı BORİS proteinlerinde yoktur [30].

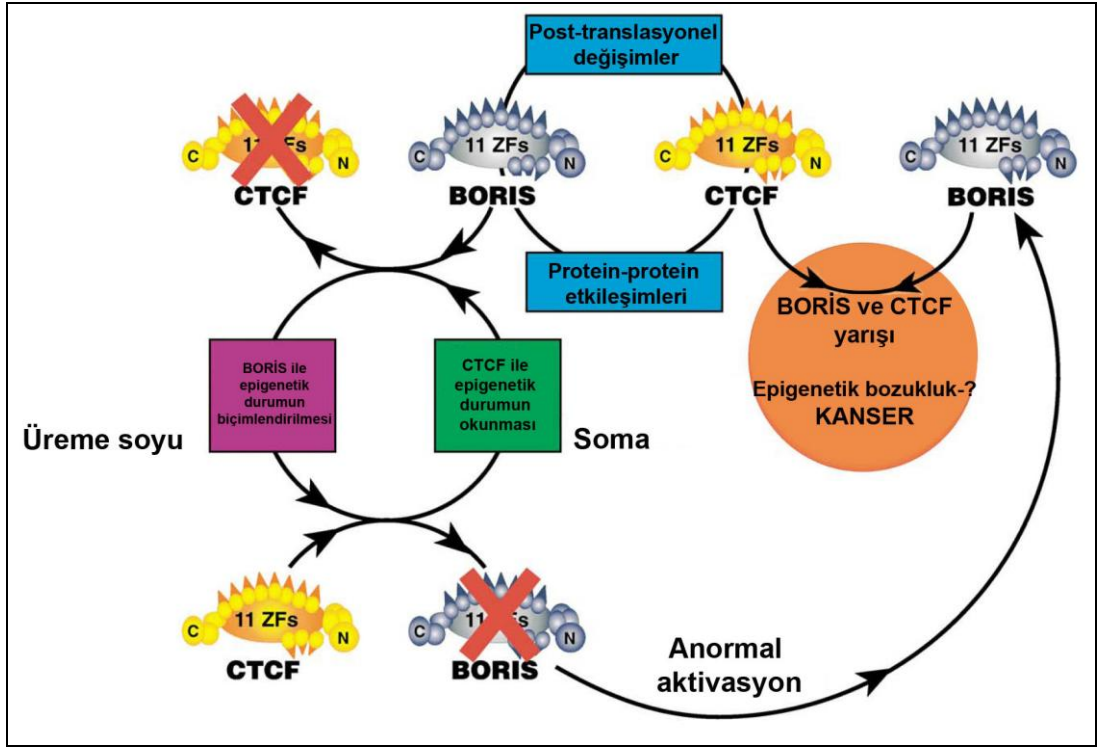


Şekil 2.13. İnsan BORİS ve CTCF proteinlerinin karşılaştırılması. Her iki protein aynı yapıda 11 adet çinko-parmak (ZF) yapısına sahip olup, amino ve karboksi uçlarında farklılık gösterirler [148].

2.10.1. BORİS ve Kanser İlişkisi

Kanser hücrelerinde, CTCF ile BORİS ekspresyonları arasındaki regülasyonun bozularak, bu dengenin kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir [31, 34] (Şekil 2.14). Bu hipotez, BORİS geninin insan kanserlerinin yoğun olarak amplifiye edildiği kromozom 20q13.2 üzerinde lokalizasyon göstermesi ile de uyumludur ve bu genin bir onkojen olarak hareket ettiğini de göstermektedir [31]. Vatolin ve arkadaşları (2005) BORİS'in pek çok tümör hücre hattında ve primer tümörde ekspre olduğunu doğrulamıştır [149]. Bu çalışmada BORİS'in 9/10 oranında melanoma, 7/8 oranında meme, 4/5 oranında nöroblastoma, 3/5 oranında prostat ve 3/4 oranında kolon kanser hücre hattında varlığı rapor edilirken, 11/12 oranında meme, 9/10 oranında prostat ve 8/10 oranında primer kanserlerde de ekspresyonu gösterilmiştir. Bu bulgular farklı gruplarca gösterilen, testiküler [150], ovaryan [151], uterus [152], meme [153] ve akciğer karsinomalarında [154, 155] gözlemlenen BORİS ekspresyonu ile uyumlu sonuçlar sergilemektedir. Dolayısıyla, BORİS, normalde olmaması gerekirken, pek çok kanser hücre hattı ve primer tümörde istisnai olarak ekspre olmaktadır. Vatolin ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada (2005), indüklenabilir tetrasiklin promoterü kullanılarak hücre kültüründe normal insan dermal fibroblastları ile çalışmalar yapılmıştır. BORİS'in geçici ekspresyonu çalışılan 25 kanser-testis geninin çoğunda ekspresyon artışına neden olmuştur. Ancak bu çalışmada hücre fenotipin karakterizasyonu ya da geçici olmayan-kararlı BORİS gen ekspresyonu hakkında herhangi bir değerlendirme yapılamamıştır. Literatürde, organizma düzeyinde *in vivo* BORİS ektopik ekspresyonunun sonuçları üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

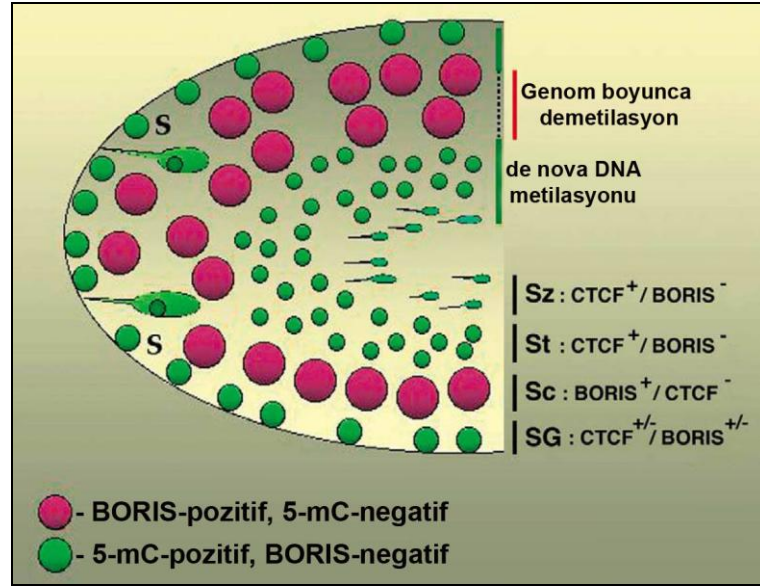
BORİS spesifik siRNA'ların kullanıldığı bir çalışmada, meme kanser hücrelerinde konsantrasyon bağımlı bir şekilde BORİS ekspresyonunun ve kanser hücrelerinin apoptotik olarak ölümünde bir azalma olduğu ve tümör hücre canlılığının devamlılığı için BORİS'in rolü olduğu rapor edilmiştir [156]. BORİS'in, MAGE-A1 ve NY-ESO-1 gibi oldukça önemli rolleri olan, çok sayıda kanser-testis antijeninin ekspresyonunu ve demetilasyonunu indüklediği ve malignansinin erken dönemlerinde ekspre edildiği gösterilmiştir [149, 153-155]. Bu nedenle bir kanser-üreme hücre hattı antijeni olan BORİS, kanser immünoterapi çalışmalarında oldukça önemli bir aday olarak düşünülmektedir [152, 157-160]. BORİS'in bir kanser aşısı olarak klinikte kullanımı üzerine, oldukça iyi dergilerde yayınlanmış orijinal çalışmalar mevcuttur [158-160].



Şekil 2.14. CTCF ve BORİS'in normal hücreler ve kanserde fonksiyonlarına ait önerilen bir model. Tümörögenizde BORİS'in anormal aktivasyonu, CTCF tarafından hücre büyümesinin sınırlandırılması ile çatışır. BORİS ve CTCF arasındaki rekabet ve kanserde BORİS'in anormal ekspresyonu şematize edilmiştir [31].

2.10.2. BORİS ve Epigenetik

CTCF ve BORİS'in birbirinin tamamen aynı olan DNA bağlanma bölgelerine sahip olmaları nedeni ile BORİS'in CTCF'in rol oynadığı önemli olaylarda, özellikle genetik imprinting ve epigenetik regülasyonda rol oynayabileceği ileri sürülmektedir [30, 31]. BORİS proteinini kodlayan BORİS geni, primer spermatositlerde upregüle olurken, ekspresyonu post mayotik germ hücrelerinde CTCF'in aktive olmasıyla sessizleşir [30]. Dikkat çekici bir şekilde, BORİS (CTCF-negatif hücrelerde) ve CTCF'in (BORİS-negatif hücrelerde) birbirini izleyen up-regülasyonu, sırasıyla metilasyon işaretlerinin silinmesi ve yeniden kurulumu ile ilişkili olarak gerçekleşmektedir (Şekil 2.15). Bu nedenle BORİS'in, erkek genomunun epigenetik olarak yeniden programlanmasında en önemli aday protein olabileceği ifade edilmektedir [33].



Şekil 2.15. CTCF'in sessizleşmesi ve BORİS'in aktivasyonu ile ilişkili olarak, erkek üreme hücre gelişimi boyunca testiste genom DNA metilasyonunun yeniden düzenlenimi [31]. Loukinov ve arkadaşlarının [30] BORİS, CTCF ve 5-metilsitozin (5-mC) antikolları ile boyama sonuçlarına göre şematize edilmiştir. BORİS pozitif spermatositler, CTCF negatiftir ve 5-mC antikolları ile görüldüğü üzere genom boyunca DNA demetilasyonu gösterir. Spermatogenezin ilerleyen aşamalarında CTCF yeniden aktive olurken, BORİS sessizleşir. BORİS ve CTCF ekspresyonları çok az ya da hemen hemen hiç çakışmaz. Sz: Spermatozoa, St: Spermatid, Sc: Spermatosit, SG: Spermatogoniya, 5-mC: 5-metilsitozin boyaması.

2.11. Genetik Bozukluklar ve Yeni Nesil

İnsan infertilitesi, dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. Batı ülkelerinde yaygınlığı yaklaşık %20 olarak tahmin edilmektedir [161]. Anatomik bozukluklar, endokrinopatiler, immünolojik problemler, ejakülatuar bozukluklar ve çevresel faktörler infertilitenin önemli nedenleri arasındadır. Sıklıkla, idiyopatik infertilite grubu altında nedeni anlaşılamayan infertilite hastaları da mevcuttur. Bu durum aslında erkek fertilitasını kontrol eden moleküler genetik ağın temel mekanizmalarının tam olarak anlaşılamamasından kaynaklanmaktadır.

Üreme, genetik olarak riskli bir süreç olup döllenmede en sık rastlanan sonuç embriyonik ya da fetal ölümün meydana gelmesidir. Bu ölümlerin en büyük nedeni fetal veya embriyonik düşük dokularında gözlenen yüksek orandaki kromozomal anomalilere bağlanmaktadır. Erkek infertilitesinin yaklaşık %30'unun, erkek üreme hattında rol oynayan genlerdeki mutasyonlar ya da kromozom bozuklukları nedeniyle olduğu ifade edilmektedir. Fare ve Drosophila nakavt deneylerinden elde edilen bulgulara göre, genetik olarak erkek infertilitesini düzenleyen 3000'den fazla gen bulunmaktadır [162]. Bu nedenle, erkek infertilitesinin sadece üreme hücrelerinin genetik ağı ile ilgili değil erkek gonadı ve somatik hücre gelişimine özgü ağları da içerdiği çok nettir [163]. Dolayısıyla bu ağları birbirine bağlayan ve/veya kontrol eden genetik sinyallerin bulunduğu önerilmektedir [164].

Erkek infertilitesi bozulmuş spermatogenez nedeniyle de olabilir [167]. DNA hasarına sahip spermin ovositi etkin olarak dölleyebildiği bilinmektedir [165]. İnsan ovositi ya da embriyosunun, sperm kaynaklı DNA hasarını tamir yeteneği tam olarak anlaşılamamıştır [168, 169]. Ayrıca döllemeden sonra ovosit tarafından tamir edilemeyen DNA ya da nükleotid hasarına sahip paternal genomun, normal embriyo ve fetal gelişim üzerindeki olası etkileri de bilinmemektedir [166]. Canlı doğumların %2-3'ünde majör konjenital malformasyonlar mevcuttur. Ayrıca çok sayıda hastada, görünürde herhangi bir erkek ya da dişi infertilite faktörü olmamasına rağmen gebelik kaybı ile karşılaşmaktadır. Bu durumdaki hastaların, sperm DNA hasarı, mayotik bozukluklar ya da sperm anöploidisi gibi genomik erkek infertilite faktörüne sahip olması olasılığı oldukça yüksektir. Gerçekten infertil erkeklerde, genel popülasyona göre 6-7 kat daha fazla kromozomal bozukluk riski belirtilmektedir [167]. Oligospermik ya da azospermik erkeklerin tedavisinde ICSI yönteminin kullanılması, yavrulara genetik mutasyonların ya da kromozomal anomalilerin aktarımı veya yeni varyasyonların ortaya çıkması ile sonuçlanabilir.

Yakın tarihli çalışmalar bazı infertilite olgularından metilasyon bozukluklarının sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Aslında spermin ovositi fertilize ederek embriyoyu oluşturabilmesi için, bir yandan genlerinin sağlıklı biçimde ekspre olabilmesi gerekirken, diğer yandan da bazı genlerinin inhibisyonu gerekir. Anormal DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları transkripsiyonu etkileyerek normal embriyogenezi etkileyebilir ve azospermiye neden olabilir [170]. Erkek üreme sisteminin gelişiminde ve spermatogenezi etkileyebilen genlerin ekspresyonunda DNA metilasyonunun rolü, metilasyon bozukluklarının infertilitedeki önemine dikkat çekmektedir.

Genomun epigenetik durumundaki değişikliklerin ters çevrilebilir olması kanser tedavisinde yeni bir umut ışığı yarmaktadır. DNA metiltransferazlar ile histon deasetilazlar gibi enzimleri inhibe ederek, tümör - baskılayıcı genlerin epigenetik olarak susturulmasını engelleyebilecek ya da bu genlerin yeniden aktivasyonunu sağlayabilecek yeni kanser ilaçlarının geliştirilmesi üzerine yoğun çalışmalar başlamıştır. Günümüzde, epigenetik inhibisyon için geliştirilmekte olan ilaçların ana hedefleri DNA metil transferazlar ve histon deasetilazlardır. Epigenetik gen susturulmasında rol alan karmaşık etkileşimler ağı, klinik olarak etkin bir tedavi için çeşitli ilaçların beraber kullanılmasının daha doğru olacağını göstermektedir. Gerçekten de, DNA metiltransferazlar ile histon deasetilazların inhibitörlerinin birlikte kullanımının epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktivasyonunda başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür [91]. Bu yaklaşımın klinik olarak test edilmeye değer olduğu da bir gerçektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Tezde kullanılan *Boris* transgenik hayvan soylarının oluşturulması, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Karşılaştırmalı Tıp, Hayvan Genomiks Birimi desteği ile gerçekleştirildi. Kullanılan diğer transgenik fare soyları, Jackson Laboratuvarı'ndan (Bar Harbor, Maine, USA) temin edildi. Tüm hayvanlar, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde üretilerek gerekli gen indüksiyonları yapıldı. Fareler 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık siklusu ile barındırıldı. Bu hayvanların deneylerde kullanımı ve muamelesi için gerekli izin, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan alınmıştır (protokol no: 2008-07271). Doku örnekleri elde edilmeden önce hayvanlar, CO2 inhalasyonu sonrasında, servikal dislokasyonla ile öldürüldü.

3.1. Transgenik *Boris* Genine Sahip Fare Soyları

Fare *Boris* geni “mutant” ve “normal” olmak üzere iki farklı formda klonlandı ve doksisisiklin ile indüksiyon sonucu, testiste mutant ya da normal *Boris*'in overekspresyonu sağlandı.

3.1.1. Mutant *Boris* Transgeni

Normal *Boris* geni merkezi bir 11 çinko parmak domeynine sahiptir ve tezin giriş bölümünde belirtildiği üzere, bu yapı *Boris*'in paraloğu olan CTCF'te de aynıdır. BORIS ve CTCF farklı amino ve karboksi uçlarına sahiptir ki bu da iki proteinin farklı fonksiyonlar gösterebilmelerini açıklar. Çalışmamızın ilk transgenik soyunda, *Boris* geni, merkezi 11 çinko parmak domeynini koruyup, amino terminal domeyninin büyük bir kısmını kaybedecek şekilde klonlandı (Şekil 3.1).

3.1.2. Normal *Boris* Transgeni

Çalışmamızın ikinci transgenik soyunda, *Boris* geni bütün olarak (full length) cDNA primerleri kullanarak klonlandı (Şekil 3.1).

AGAGCAATTTAGCACGAGGTGGCAAGGTGGCGGCCACGCGGTCAACAGTCCAGGCCCTGCCTCTGTGGGGTCGT
 CACCATGGCTGCCGCTGAGGTCCCTGTCCCTTCTGGGTACTTCACCCAGATCAAAGAGCAGAAGTTGAAGCCTGG
 AGACCTAGAGGAGGAGAAAGAGGAGGACGGGTACAAAGAGTGGAAGCCCAGGAGGGAGTTGTCAAGGAGGTG
 GAGGCCGAGAACAGTTGCCTGCTTCTGGAGGCCAGGGCCCCGGTGGAGAGCGACAGGCGGATCCTGACCCTGCA
 AACGGTGCACCTGGAGTCCCAGGATGTGCACCTACAGGGGCTGGGATGGCTGAGCGTGCCACACTCTGAGGAGC
 TTTCAGGGACGGTACCAGAGGCGGAAGGCATACTGCAGTTGCCATCCGTGCTGTGGCTCGACCCAGAGCCCCAG
 CTCAGCCTTCAGCATTGCGTGACGGTCAGCATCCCGGAAGAGCTGTACCCACCAGAGGAGCTGCAGCGGATACA
 TTTTCACCTGCTGAGAGAGAATGTGCTAATGGCCGAGGAGAACCAGAGTTAACACCAGACTTGGACGAAAGCA
 CAGCCCTGAAAAAGCCCCGAAGAAGATGAAAAGGAGCCAGCTCCCGCCCCAGGGAGAGACAGACAAGAGAGAAG
 AGAGGTTGCTCCTTCTGGAATGAAACCAAAAGAGGGAAGACGACGAAATTGTCTGACCATTTCCTATCTA
 AGCCTCGAAGAACAGCAAGATCCACCAGCGGCCAATCAGACAAGTGTGCCGGGAGCCAAAGCCGCAAAACCAA
 AACGGCGGAGGCAGACCAAGGGAAAGCCTCAGAGCTTTCAGTGTGACACCTGCCCGTTCACTTCCTCCAAGCTC
 TCAACTTTCAATCGTCACATCAAAATTCACAGCAATGAGAGGCCACACCTGTGTACCTGTGCCCTGAAGGCCTTC
 CGGACTGTCACTCTTCTTAGGAACCATGTGAACACCCACACAGGAACCAGGCCCCACAAGTGCAGGGACTGCGA
 CATGGCGTTGTACACAGTGGAGAACTCGTCCGGCACAGGCGTTACAAACACACTTATGAGAAGCCCTTCAAGT
 GCTCCCTGTGCAAGTACGCCAGCGTCGAGGCAAGCAAGATGAAGCGTCACATCCGCTCACACACGGGTGAGCGT
 CCCTTCAGCGTTTGGCAGTGTGCTTACGCCAGCAGGACTCCTACAAGCTGAAGCGCCACATGAGGACAGCACTC
 AGGTGAGAAGCCGTATGAATGTCCACCTGTACGTCCGGTTCACCCAGAGCGGGACCATGAAAATCCATATAG
 CACAGAAGCACGGAGAGAATGTGCCCAAATACGAGTGTCCCACTGTGCCACCATCATCGCGAGGAAGAGCGA
 CCTGCGTGTCCATCTGCGTAACCTGCACAGCCAGAGCCCGGAGGAGATGAAGTGCCGATACTGTCCCGCTGGCTT
 CCATGAGCGTATGCCCTATTCAGCACAGAGAGGCCACAAGAAGAGAGAAAGTTCAAGTGCAAGCAGTGCG
 ATTACGCGTGCAAGCAGGAGCGATGCTTGAAGGCGCACATGCGCATGCACACAGGAGAGAAGCCCTTCTCCTGC
 CTGGCCTGCAACAAGCACTTCCGACAGAAGCAGCTACTGACCGTGCACCTGAGGAAGTACCATACCCGAACCT
 CGTCCCCAATCTGCACCTGTGCCTCAAGTGTGATAAACGTTTCTCCCGCTGGAGTAACCTGCAGAGACACAGAAA
 GAAGTGTGACCCGAGCATGAGACGTTAGCCCCAACAAAGGACAGGAGACCAAGTACAAGGACACAGGCCCTCG
 GAGGGAGAAGCAGGACACAAGGAAGGGGAGCCTCAGTGCCCTGGGGAGCAGGCTCTGGGCCACCAAGGAGAA
 GCAGCGGGGAGCCAGAGCCAGACCACGGCCTTACCTGCGAGATAATCTTTAACATGATGGATAAGTGATGGAT
 AAGTGAGCAGTCGTGCCTCT

Şekil 3.1. Mutant (truncated) ve normal (full length) *Boris* DNA dizisi. Mutant *Boris* dizisinde, amino terminal domeyninin çıkartıldığı kısım kırmızı ile gösterilmiştir.

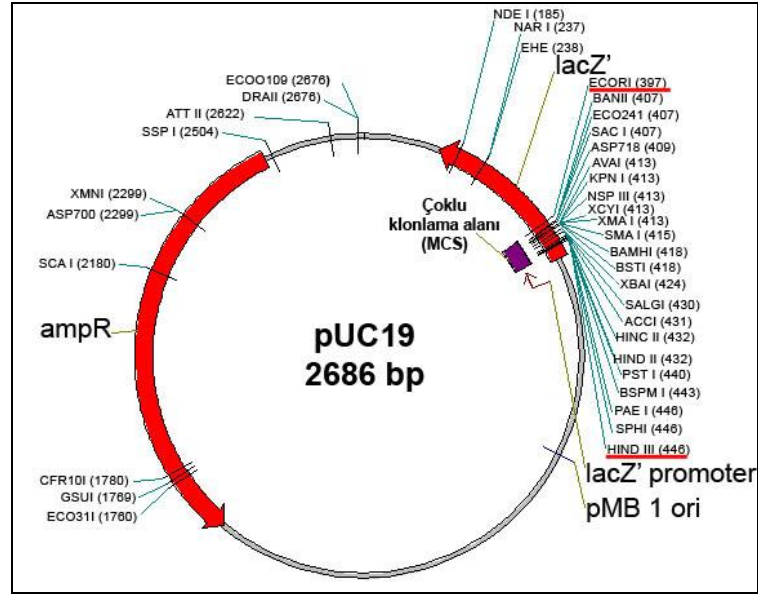
3.2. Transgenik *Boris* Genine Sahip Fare Soylarının Oluşturulması

Boris transgenik farelerin oluşturulması sürecindeki aşamalar aşağıda belirtilmiştir:

- 1- Etkili bir transgenik ekspresyon konstraktının dizayn edilmesi.
- 2- Pronükleer mikroenjeksiyon için yüksek saflıkta DNA eldesi.
- 3- Başarılı pronükleer mikroenjeksiyon ve embriyo transferi.
- 4- Potansiyel kurucu (founder) farelerin tespiti için yavrulardan kuyruk DNA'sı izolasyonu ve genotiplemenin yapılması.
- 5- Kurucu fare soylarının çoğaltılması.

3.2.1. Etkili Transgenik Ekspresyon Konstraktının Dizayn Edilmesi

Gerek mutant gerekse normal *Boris* transgenlerinin eldesi için gerekli konstraktlar (her biri yaklaşık 2.5µg DNA) Codon Devices firmasına (Cambridge, MA, USA) hazırlanmıştır. Firma tarafından her iki konstrakta ait amplifiye edilen DNA dizileri, pUC19 vektörünün çoklu klonlama alanı (MCS) içerisine klonlanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. pUC19 plasmidine ait dizi haritası. Amplifiye edilen mutant ve normal *Boris* dizileri EcoRI ve HindIII kesim (restriksiyon) bölgeleri arasına yerleştirilmiştir.

3.2.1.1. Liyofilize Halde Alınan Konstraktların Yeniden Oluşturulması (rekonstitüsüonu)

En son konsantrasyon 1µg/100µl (10ng/µl) olacak şekilde aşağıda belirtildiği şekilde yapıldı.

~2.5µg DNA

200µl nükleaz (DNaz-RNaz) içermeyen su (American Bioanalytical, katalog no: AB02128)

Codon Devices firmasından alınan konstraktların, tezde iki yönlü çalışan plasmid vektöre klonlanması gerektiği için öncelikle *E. coli* DH5α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirildi.

3.2.1.2. pUC19 Vektörünün *E.coli* DH5α Bakterisine Transformasyonu

1. 1µl vektör, 50µl DH5α hücrelerinin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve hücreler 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Bu işlem, plasmidin bakteri hücre duvarına yapışmasını sağlar.
2. Hücreler, 30 saniye 42°C'de olan ısıtıcı blokta ısı şokuna maruz bırakıldı. Bu işlem, bakteri hücre membranında porların açılmasını ve plasmidin hücre içine girmesini sağlar. Bu süre içinde herhangi bir karıştırma yapılmamasına dikkat edildi.
3. Hücreler tekrar 2 dakika süreyle buz üzerine alındı. 37°C'de önceden ısıtılmış 900µl LB/Ampisilin medyumuna eklendi ve 37°C'de 60 dakika

boyunca çalkalanarak (225rpm) inkübe edildi. Isı şokundan sonra hücrelerin tekrar buz üzerine alınması hücre membranında oluşan porları kapatır ve plasmidin dışarı çıkmasını engeller.

4. 50µl transformasyon karışımı, LB Agar + 100µg/ml Ampisilin kültür kaplarına (Recombinant Technologies, LLC) yayıldı. Bu işlemler sırasında steril koşullarda çalışıldı. Kültür kapları 37°C’de gece boyu inkübe edildi. Kullanılmayan transformasyon karışımı, tekrar kullanabilme gereksinimi düşünülerek +4°C’de 1 gün boyunca saklandı.

Stok Ampisilin (50mg/ml):

10ml distile su

0.5g Ampisilin

Hazırlanan solüsyon +4°C’de saklandı.

Luria-Bertani Broth (LB) Karışımı:

10g Bacto-Trypton (BD, katalog no: 211705)

5 g Maya (yeast) ekstraktı (BD, katalog no: 288620)

10g NaCl (J.T Baker, katalog no: 3624-05)

1 litre olana kadar distile su.

Bu karışım otoklavlandı ve oda ısısında saklandı.

3.2.1.3. Vektör İçeren Bakteri Kolonisinin Belirlenmesi

Transformasyondan bir gün sonra, LB-Ampisilinli kültür kaplarında kolonilerin gelişimi gözlemlendi. Bakteri kolonilerinden hangisinin vektörü içerdiğini belirlemek için 8-10 koloni seçilerek 3 ml’lik LB-Ampisilinli solüsyonda 37°C’de gece boyu çalkalamalı kültürasyon (12-16 saat) yapıldı.

3.2.1.4. Plasmid DNA’sının İzolasyonu

Gece boyu kültürasyon sonrasında miniprep kiti (Qiagen, QIAprep® Miniprep, katalog no: 27106) ile plasmid DNA’sı izole edildi.

1. 1.5ml’lik kültür karışımı alınarak ~7000rpm’de 15dk santrifüj yapıldı. Pellet halindeki bakteri hücreleri 250µl resüspansiyon tamponu (Buffer P1) ile resüspanse edildi ve mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Bu aşamada resüspansiyon tamponu P1’e RNase A eklendiğinden emin olunmalıdır.

Resüspansiyon tamponu P1 kullanılmadan önce içine 1:1000 oranında “LyseBlue” olarak adlandırılan mavi bir renk belirteci eklendi. Bu renk belirteci, karıştırma işlemlerinin görsel tespiti için kullanılmıştır. Eklendikten sonra şeffaf bir renk görülür. Opsiyonel bir basamaktır.

10 µl LyseBlue

10 ml resüspansiyon tamponu P1

2. Tüpe 250µl resüspansiyon tamponu P2 (Buffer P2) eklendi ve 4-6 kez ters çevirmek suretiyle hafifçe karıştırıldı. Genomik DNA'nın yapısını bozabileceğinden bu aşamada vorteksleme yapılmamalıdır.

LyseBlue ajanı resüspansiyon tamponu P1 ile karıştırıldığında çöker ancak karışıma resüspansiyon tamponu P2'nin eklenmesi ile tamamen çözünür ve mavi bir renk ortaya çıkar. Homojen mavi bir renk oluncaya kadar karıştırmaya devam edildi. Lizis reaksiyonunun 5dk'yı geçmemesine özen gösterildi.

3. 350 µl nötralizasyon tamponu N3 (Buffer N3) eklendi ve tüp hemen 4-6 kez ters çevirmek suretiyle karıştırıldı. Nötralizasyon tamponu N3 eklenmesi ile renk şeffaflaşır. Bu durum lizis tamponu içerisindeki SDS'nin etkin olarak çöktüğünün bir göstergesidir.
4. 10 dakika 13,000rpm'de (~17,900 x g) santrifüj yapıldı. Beyaz bir pellet oluşumu gözlemlendi.
5. Bir önceki aşamada oluşan supernatantlar pipetleme yapılarak QIAprep çevirme kolonlarına aktarıldı. 13,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve tüpün altındaki sıvı kısım atıldı.
6. Üretici firmanın tavsiyesi göz önünde tutularak QIAprep çevirme kolonları, 0.5ml PB tampon eklenerek 13,000rpm'de 1 dakika daha santrifüj yapılarak yıkandı. Tüpün altındaki sıvı kısım atıldı.
7. QIAprep çevirme kolonlarına 0.75ml PE tamponu eklenerek, 13,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün altındaki sıvı kısım atıldı.
8. QIAprep çevirme kolonları, son olarak hiçbir solüsyon eklenmeden 13,000rpm'de 1dakika daha santrifüj edildi. Böylece kalıntı (residual) olabilecek yıkama tamponu uzaklaştırılmış oldu.
9. QIAprep çevirme kolonları, 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Kolonların ortasına 50µl elüsyon tamponu (EB) eklenerek (10 mM Tris·Cl, pH 8.5) 1 dakika oda ısısında beklendi ve sonrasında 13,000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
10. QIAprep çevirme kolonları atılarak, mikrosantrifüj tüpündeki izole edilmiş plasmid DNA'sının spektrofotometrik olarak saflığı ve konsantrasyonu ölçüldü. İzole edilmiş plasmid DNA'sı +4°C'de saklandı.

3.2.1.5. Mutant ve Normal *Boris* DNA'sının Mini Prep Örneklerinde Dizi Özgüllüğünün Doğrulanması

DNA örnekleri EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri kullanılarak kesildi. Toplam 20µl reaksiyon karışımı hazırlandı ve 37°C'de gece boyu inkübasyon yapıldı.

5µl DNA

2µl 10X NEBuffer EcoRI

1µl EcoRI (New England BioLabs, katalog no: R0101S, 20,000U/ml)

1µl HindIII (New England BioLabs, katalog no: R0104S, 20,000U/ml)

11µl distile su (American Bioanalytical, katalog no: AB02128)

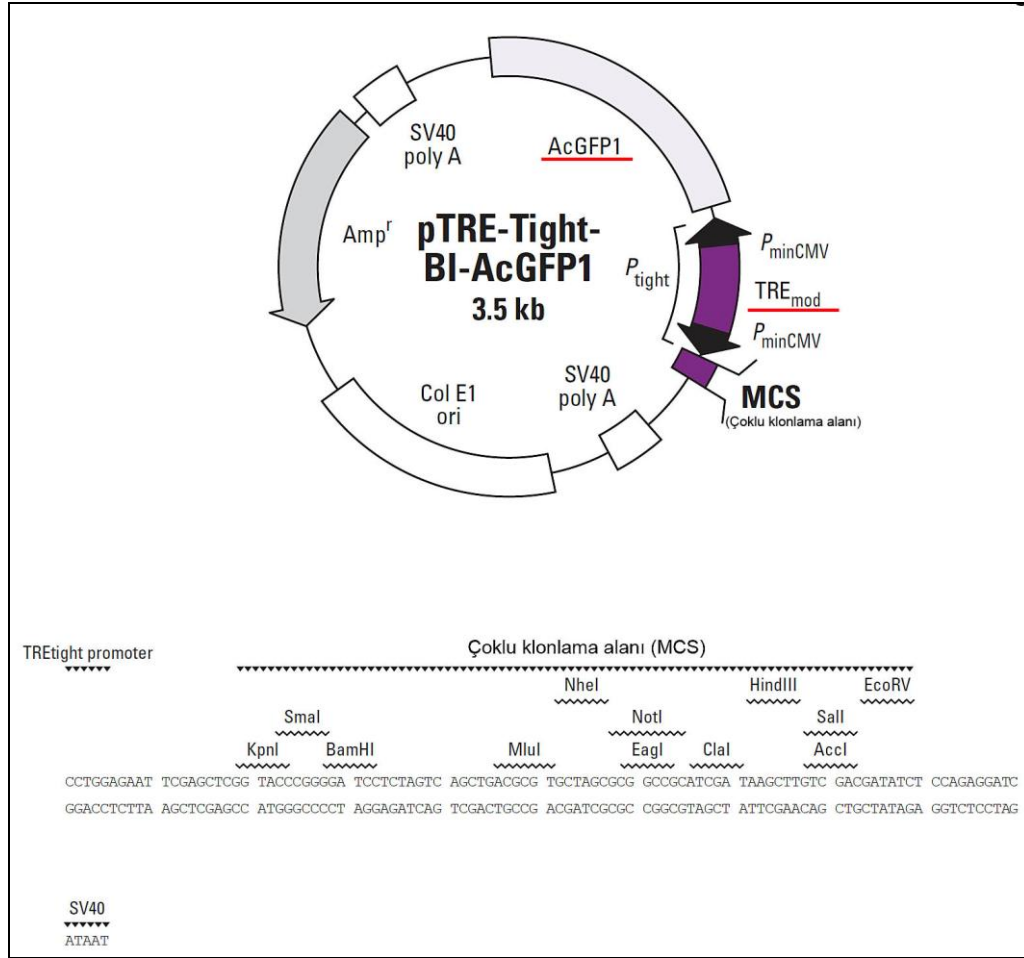
Kesim sonrası, Codon Devices firmasından alınan konstraktların doğrulanması için, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Keck Biyoteknoloji Laboratuvarları'nda sekanslama yapıldı.

3.2.1.6. Mutant ve Normal *Boris* Transgeninin pTRE-Tight-BI-AcGFP1 Vektörüne Klonlanması

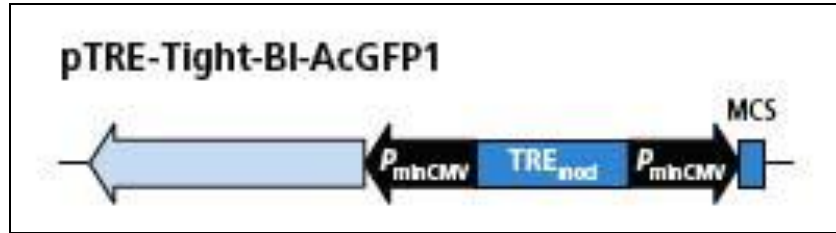
Sekanslama ile doğrulama sonrası pUC19 vektörü içinden ilgili gen dizileri kesilerek, tezde kullanılacak olan iki yönlü çalışan (bidirectional) ve tetrasiklin ile indüklenebilir plazmid vektöre (pTRE-Tight-BI-AcGFP1, 20ug, katalog # 631066, Clontech, Mountain View, CA USA) klonlandı (Şekil 3.3).

Vektör yapısında tetrasikline (Tet) duyarlı bir element (tetracycline responsive element; TRE) içermektedir. Böylece transgenik *Boris* ekspresyonunun, içme suyunda tetrasiklin ya da onun analogu olan doksisisiklin varlığında ve sadece testiste görülebilmesi hedeflendi.

Transgen ekspresyonunu kolayca görebilmek için, raportör bir gen olan yeşil floresan protein (GFP) transgenik konstraktın bir parçasını oluşturdu. Plazmid vektörün yapısı itibariyle hem *Boris* transgeni hem de GFP raportörü, transkripsiyonu her iki yönde de başlatarak, iki yönlü çalışabilen tek bir promotörün kontrolü altında idi (Şekil 3.4). Diğer bir deyişle, bir yönden *Boris* transgeni ekspre olurken, diğer yönden de GFP ekspresyonu gözlenebildi.



Şekil 3.3. pTRE-Tight-BI-AcGFP1 vektörüne ait harita.



Şekil 3.4. Tetrasikline duyarlı ve iki yönlü çalışabilen promoterinin şematik gösterimi. Plazmid vektör, aynı özellikte ancak ters yerleşimli iki minimal CMV promoterü (P_{minCMV}) arasında modifiye edilmiş tetrasiklin-duyarlı element (TREmod) içermektedir.

Transgenik soyları oluşturmak üzere, pTRE-Tight-BI-AcGFP1 vektörüne klonlanan mutant ve normal *Boris* DNA'sı, plazmid vektörün istenilmeyen diğer kısımları kesilip çıkartıldıktan sonra, mikroenjeksiyon ile döllenmiş fare zigotlarına ait pronükleuslara enjekte edildi.

Klonlama aşamalarında elde edilen her iki transgene ait saf kültürün bir kısmı, daha sonra kullanılmak üzere gliserol stoklarında saklandı.

Gliserol Stoklarının Hazırlanışı:

0.15ml gliserol, kriyotüplere kondu, kapakları gevşek bir şekilde 20 dakika otoklavlandı. Soğuduktan sonra üzerine 0.85ml bakteri kültürü eklendi, vorteksenerek iyice karıştırıldı Etanol/kuru buz ya da sıvı nitrojende donduruldu. Örnekler -80°C’de saklandı.

Plasmid vektörde ilgilenilmeyen kısımların restriksiyonu için aşağıdaki DNA restriksiyon reaksiyonları yapılmıştır.

Mutant *Boris* DNA’sı için;

Toplam 100µl reaksiyon karışımı: (37°C’de)

80µl linearize DNA (160ng/ µl)
10µl NE Buffer 1 (NEB1)
5µl Zra I (New England BioLabs, katalog no: R0659S, 10,000U/ml)
5µl Pci I (New England BioLabs, katalog no: R0655S, 10,000U/ml)

Normal *Boris* DNA’sı için;

Toplam 70µl reaksiyon karışımı: (37°C’de)

45µl linearize DNA (394ng/ µl)
7µl NE Buffer 3 (NEB3)
5µl Pci I (New England BioLabs, katalog no:R0655S, 10,000U/ml)
7µl Ssp I (New England BioLabs, katalog no:R0132S, 5,000U/ml)
6µl distile su (American Bioanalytical, katalog no: AB02128)

DNA restriksiyon işleminden sonra agaroz jel elektroforezi yapıldı. Agaroz jel elektroforezinde %1’lik agaroz jel kullanıldı.

3.2.1.7. Agaroz Jelin Hazırlanışı

Agaroz (American Bioanalytical, katalog no: AB000972-00100, GPG/LE) ve 1xTAE Tamponu (Tris-asetat-EDTA) jel elektroforezinin yapılacağı tankın büyüklüğüne göre karıştırıldı (0.7g agaroz + 70ml 1xTAE tamponu). Mikrodalga fırında kaynatılarak agaroz eriyip, şeffaf bir görüntü elde edildikten sonra, hava kabarcıklarının gitmesi için oda ısısında kısa bir süre bekletildi. Daha sonra 0.1 µg/ml etidiyum bromid (Invitrogen, katalog no: 15585-011, 10mg/ml) eklenip karıştırıldıktan sonra, elektroforez tankına döküldü. Tank içerisine taraklar yerleştirildikten sonra, jel polimerizasyona bırakıldı. DNA örnekleri 6x yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra jel kuyucuklarına yüklendi. 80-100V’da DNA fragmanları ayrılana dek yürütüldü.

50X TAE Tamponu:

- 242g Tris baz (American Bioanalytical, katalog no: AB02000-01000),
- 600 ml distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.
- 100ml 0.5M EDTA (American Bioanalytical, katalog no: AB00502-01000) eklenip 5 dakika karıştırıldı.
- 90ml glasiyel asetik asit (J.T Baker, katalog no: 9508-33) eklendi.
- Hacim 1 litre oluncaya kadar distile su eklendi.

DNA örneklerinin rutin olarak değerlendirmesinde yukarıda belirtilen normal agaroz jel kullanılırken jelden DNA izolasyonunun yapılacağı deneylerde, düşük erime noktasına sahip jeller hazırlandı. Restriksiyonun doğru ve tam olduğu teyit edildikten, örnekler düşük erime noktasına sahip (LMP; American Bioanalytical Agarose GPG/LMP, Low melt, katalog no:AB00981-00050) jelle yüklendi.

LMP Jeli: 0.75g LMP agaroz + 85ml 1xTAE tamponu

LMP agaroz jelde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra, UV ışığı altında jel görüntülemesi yapıldı (Alpha Innotech Corporation, Fluor Chem SP). İlgili bant UV ışığı altında kesilerek jelden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Agaroz jelden DNA ekstraksiyonu için QIAEX II Jel Ekstraksiyon Kiti (Qiagen, katalog no: 20021) kullanıldı.

6X Agaroz Jel Yükleme Boyası:

Gliserol	3mL
Bromofenol mavisi (bromophenol blue)	25mg
Ksilen siyanol (Xylene Cyanol)	25mg
Distile su	7ml

3.2.1.8. Agaroz Jelden DNA Fragmentlerinin Ekstraksiyonu

1. Jelden keskin bir jilet yardımıyla DNA bantları kesildi. 250mg'lık agaroz parçalarına kadar 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpleri kullanıldı. Jel parçalarının ağırlıkları tartıldı. Kesilecek DNA boyutları 100bp-4kb arasında olduğu için 1 hacim jel için 3 hacim QX1 tamponu eklendi. (Örneğin 100mg jel için 300µl QX1 tamponu)
2. QIAEX II 30 saniye vortekslenerek resüspanse edildi. Örneklerin üzerine 10-12µl QIAEX II eklendi.
3. Agarozun sıvı hale gelmesi ve DNA'ya bağlanma için 50°C'de 10 dakika inkübasyon yapıldı. QIAEX II 'nin süspansiyonda kalması için her 2 dakikada bir vortekslene yapıldı. Karışımın rengi sarı olmalıdır.

4. Örnekler 30 saniye santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Bütün santrifügasyonlar 13,000 rpm’de oda ısısında (15–25°C) masaüstü mikrosantrifüjde gerçekleştirildi.
5. Pellet 500µl QX1 tamponu ile yıkandı. Pellet vortekslenerek resüspanse edildi. Örnekler 30 saniye santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Böylece kalıntı olabilecek agaroz kontaminantlarının uzaklaştırılması sağlandı.
6. Pellet 500µl PE tamponu ile iki kez yıkandı. Pellet vortekslenerek resüspanse edildi. Örnekler 30 saniye santrifüj edildi. Pipet yardımıyla süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Böylece kalıntı olabilecek tuz kontaminantlarının uzaklaştırılması sağlandı.
7. Pellet beyaz renk oluncaya kadar, 10-15 dakika hava ile kuruması sağlandı. Aşırı derecede kurutma yapılmamasına dikkat edildi. Aşırı kurutma elüsyonun etkinliğini azaltabilir.
8. DNA 20µl 10mM Tris-HCl, pH 8.5 ile elute edildi. Pellet vortekslenerek resüspanse edildi. Oda ısısında 5 dakika inkübasyon yapıldı. 30 saniye santrifüj yapıldı. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Bu adım birkez daha tekrar edilerek DNA örnekleri birleştirildi. İkinci elüsyon aşaması verimliliği yaklaşık %10-15 oranında artırmaktadır.

3.2.2. Pronükleer Mikroenjeksiyon İçin Yüksek Safılıkta DNA Eldesi

DNA konsantrasyonu ve izolasyon saflığı spektrofotometrede (BioRad, Smart SpecTM Plus Spectrophotometer) okunarak kaydedildi. Elde edilen DNA örneklerinin spektrofotometrik OD260/280 oranının 1.7-1.9 arasında olmasına dikkat edildi.

3.2.3. Pronükleer Mikroenjeksiyon ve Embriyo Transferi

Hazırlanan transgenik konstrakt, saflaştırma işlemi sonrasında 5ng/µl konsantrasyonda, injeksiyon tamponunda (300µl) resüspanse edildi. DNA’nın parçalanmaması için taze olarak aşağıdaki mikroenjeksiyon solüsyonu kullanıldı.

Mikroenjeksiyon Solüsyonu (50 ml)

0.5ml 1M Tris-HCl, pH 7.5 (otoklavlanmış)
 10µl 0.5 M EDTA, pH 8.0 (otoklavlanmış)
 1ml 5 M NaCl (otoklavlanmış)
 50µl 1000x Poliamin karışımı
 50ml’ye kadar otoklavlanmış distile su

En son konsantrasyon

10mM Tris-HCl, pH 7.5
 0.1mM EDTA
 100mM NaCl
 1x poliamin karışımı

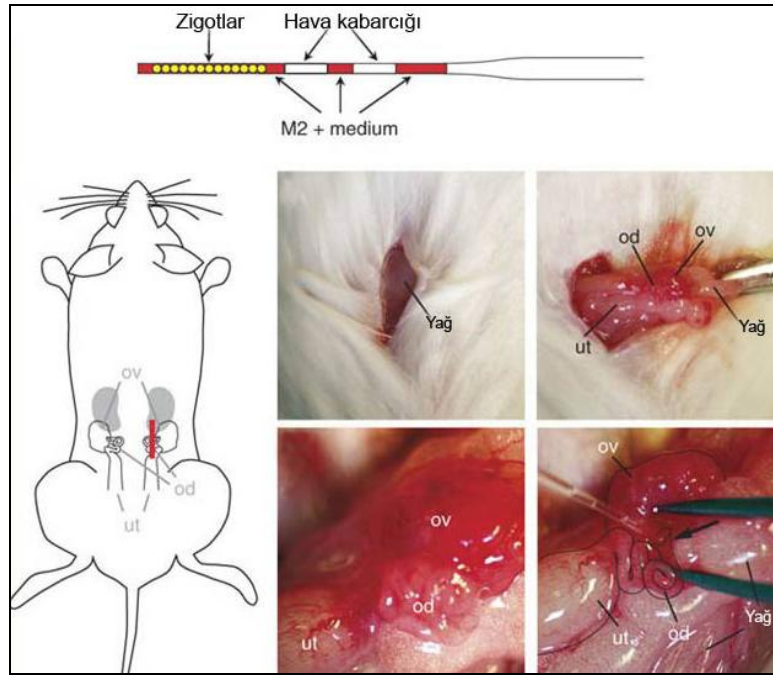
1000x Poliamin Stok Karışımı:

30mM Spermin (Sigma, tetrahidroklorid, katalog no: S-1141)

70mM Spermidin (Sigma, trihidroklorid, katalog no: S-2501)

Spermin ve spermidin birlikte otoklavlanmış distile su içinde çözüldü. 0.2 mikronluk filtreler ile filtre edildi. -20°C’de saklandı.

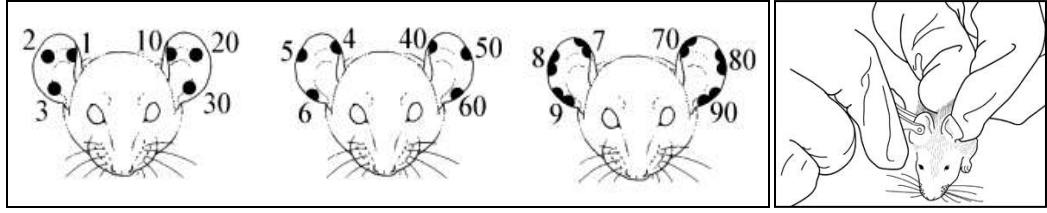
Pronükleer injeksiyon için yaklaşık 250 adet C57BL/6 embriyoları kullanıldı. Pronükleuslarda belirgin bir şişme görülünceye kadar enjeksiyona devam edildi. 200-250 embriyo, üç gün boyunca 6 adet yalancı gebe dişi farenin uteruslarına transfer edildi (Şekil 3.5). Embriyo transferi yapıldıktan sonra taşıyıcı anneler gebelikleri boyunca izlendi. Doğan yavrulardan kuyruk DNA’sı elde edilerek genotipleme yapıldı.



Şekil 3.5. Enjekte edilmiş zigotların embriyo transferi. Kullanılan transfer pipeti. Pipet içindeki hava kabarcıkları, transferi kolaylaştırır. Dorsal orta hatta paralel olarak deride 1cm uzunluğunda bir kesim yapılır. Ovaryuma yapışık yağ dokusu pens yardımıyla tutulur ve ovaryum dikkatlice ovidukt ve uterus ile birlikte dışarı çekilir. Uterus üzerinde enjeksiyon iğnesi ile açılan delikten zigot transferi yapılır. Ok infundibulumu göstermektedir. ut, uterus; od, ovidukt; ov, ovaryum [171].

3.2.4. Potansiyel Kurucu (founder) Farelerin Tespiti İçin Yavrulardan Kuyruk DNA’sı İzolasyonu ve Genotipleme

Doğan yavrular 21 günlük olunca, erkek ve dişi ayrımı yapılarak, her kafeste 5 yavru olacak şekilde yavrular annelerinden ayrıldı. Kulak kepçesi bir klips yardımıyla dikkatli bir şekilde işaretlenerek her yavruya bir numara verildi (Şekil 3.6). Numara verilen her yavrunun kuyruğunun uç kısmı kesilerek DNA izolasyonu için ayrı bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Mikrosantrifüj tüplerinin aynı numara ile kodlanmasına dikkat edildi.



Şekil 3.6. Kulak işaretlemesinde kullanılan kodlama sistemi şematize edilmiştir. Sol kulak onlu rakamları ifade ederken, sağ kulak tekli rakamları göstermektedir. Bu şekilde 100'e kadar fare numaralandırması yapılabilir. 100. farede herhangi bir işaretleme yapılmaz.

3.2.4.1. DNA Örneklerinin İzolasyonu

DNA izolasyonu için DNeasy Kan ve Doku Kiti (Qiagen, katalog no: 69506) kullanılmıştır. Bütün santrifügasyonlar oda ısısında (15-25°C) masaüstü mikrosantrifüjde gerçekleştirildi. Vortekslemeler 5-10 saniyelik uygulamalar şeklinde yapıldı.

1. Yaklaşık 1-1.2 cm'lik kuyruk parçaları (erişkinde sadece 0.4–0.6 cm yeterli) 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine koyuldu. Dokudan örnek kullanılacaksa 25mg'a kadar olan doku parçaları yeterlidir. Örneğin üzerine 180 µl ATL tamponu eklendi.
2. ATL tamponundan sonra aynı tüpe 20µl proteinaz K eklendi. Örnekler iyice vortekslenerek karıştırıldı. 56°C'de doku tamamen lizise oluncaya kadar gece boyu inkübasyon yapıldı. Inkübasyon boyunca arada bir vorteksleme yapılarak örneğin tüp içinde homojen olarak dağılması sağlandı. Inkübasyon sonrasında lizat vizköz bir görüntü alabilir.
3. Ertesi gün örnekler 15 saniye vorteksleme yapıldı. Örnek başına 200µl AL tamponu ve 200µl etanol (%96-100) (American Bioanalytical, katalog no: AB00515-00500) olacak şekilde, AL tamponu ve etanol, taze olarak homojen bir şekilde karıştırıldı. Her tüpe 400µl bu karışımdan eklendi. Vortekslenerek tüpler tekrar iyice karıştırıldı. AL tamponu ve etanol karıştırıldığında beyaz bir çökme meydana gelebilir ancak bu çökme DNeasy prosedürünü etkilemez.
4. Bu karışım herhangi bir çökme varsa o da dahil olmak üzere pipetlenerek, daha önceden üzeri kodlanmış ve 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş DNeasy Mini çevirme (spin) kolonlarına aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı.
5. Kolonlar, 2ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 500µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı.

6. Kolonlar tekrar 2ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 500µl AW2 tamponu eklendi. DNeasy membranının kuruması için 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı. DNeasy Mini çevirme kolonu membranının kuruması önemlidir çünkü kalıntı etanol sonraki aşamaları olumsuz olarak etkileyebilir. Eğer kolonda etanol kalıntısı görülürse 14,000 rpm'de tekrar 1 dakikalık santrifüj yapılmalıdır.
7. DNeasy Mini çevirme kolonları, üzeri önceden kodlanmış temiz 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. 100µl AE tamponu doğrudan DNeasy membranı üzerine konuldu. 1 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı ve sonrasında elüsyon için 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu aşama bir kez daha tekrarlanarak toplam 200µl DNA eldesi yapıldı. DNA örnekleri, +4°C'de kullanılma zamanına kadar saklandı.

3.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metodu ile Genotipleme

PCR amplifikasyonları, dizayn edilen primerler (Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Keck Biyoteknoloji Laboratuvarları) kullanılarak, 12µl'lik reaksiyonlar şeklinde yapıldı. Amplifikasyonlar, Ependorf marka PCR cihazı (Mastercycler® pro mit vapo.protect™) kullanılarak gerçekleştirildi.

Mutant *Boris* primerleri (Transgen = ~200 bp)
F 5'-GTG AAC GGG CAG GTG TCA CAC-3'
R 5'- CGG TGG GAG GCC TAT ATA AGC AG-3'

Normal *Boris* Primerleri (Transgen = ~440 bp)
F 5'-GGA ACT GAC AGC CAA CCC AGT CC-3'
R 5'-CGG TGG GAG GCC TAT ATA AGC AG-3'

40nM olarak alınan primerler, 400µl distile su (American Bioanalytical, DNase/RNase free) içerisinde resüspanse edilerek stok solüsyonlar elde edildi. Konsantrasyonlar spektrofotometrede ölçülerek, PCR reaksiyonu için, stok solüsyon 10mM olacak şekilde distile su ile dilue edildi.

DNA'nın çoğaltılması amacıyla, PCR reaksiyonları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı (Çizelge 3.1). Her iki transgene ait orijinal plasmid DNA'sı pozitif kontrol olarak kullanıldı. DNA örneğinin eklenmediği, sadece distile su konulan reaksiyonlar negatif kontrol olarak değerlendirildi.

Çizelge 3.1. Mutant ve normal *Boris* transgeni için PCR reaksiyonları.

Bileşen	Mutant <i>Boris</i> PCR	Normal <i>Boris</i> PCR
10x Coraload PCR Tamponu (Qiagen, kit, katalog no:201203)	1.2µl	1.2µl
10mM dNTPs (invitrogen, katalog no: 18427-013)	0.25µl	0.25µl
10µM İleri primer	0.5µl	0.25µl
10µM Geri primer	0.5µl	0.25µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz enzimi (Qiagen, kit, katalog no:201203, 5 units/µl)	0.12µl	0.125µl
Distile su	6.925µl	8.425µl
Genomik DNA Kalıbı	2,5µl	1.5µl

Mutant *Boris* transgeni için PCR kurulumu:

1. basamak 94 °C.....2 dakika
2. basamak (29 siklus) 94 °C.....30 saniye
62 °C.....3 dakika
3. basamak 68 °C.....10 dakika
4. basamak +4 °C.....sonsuz

Normal *Boris* transgeni için PCR kurulumu:

1. basamak 94 °C2 dakika
2. basamak (32 siklus) 94 °C30 saniye
56 °C30 saniye
65 °C3 dakika
3. basamak 68 °C10 dakika
4. basamak +4 °Csonsuz

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi ve bantlar UV ışığı altında görüntülendi. Agaroz jelin hazırlanışı yukarıda belirtilmiştir. Transgene sahip pozitif olduğu belirlenen hayvanlar PCR sonucuna göre tespit edildi ve çalışmalarda kullanıldı.

3.2.5. Kurucu Fare Soylarının Çoğaltılması

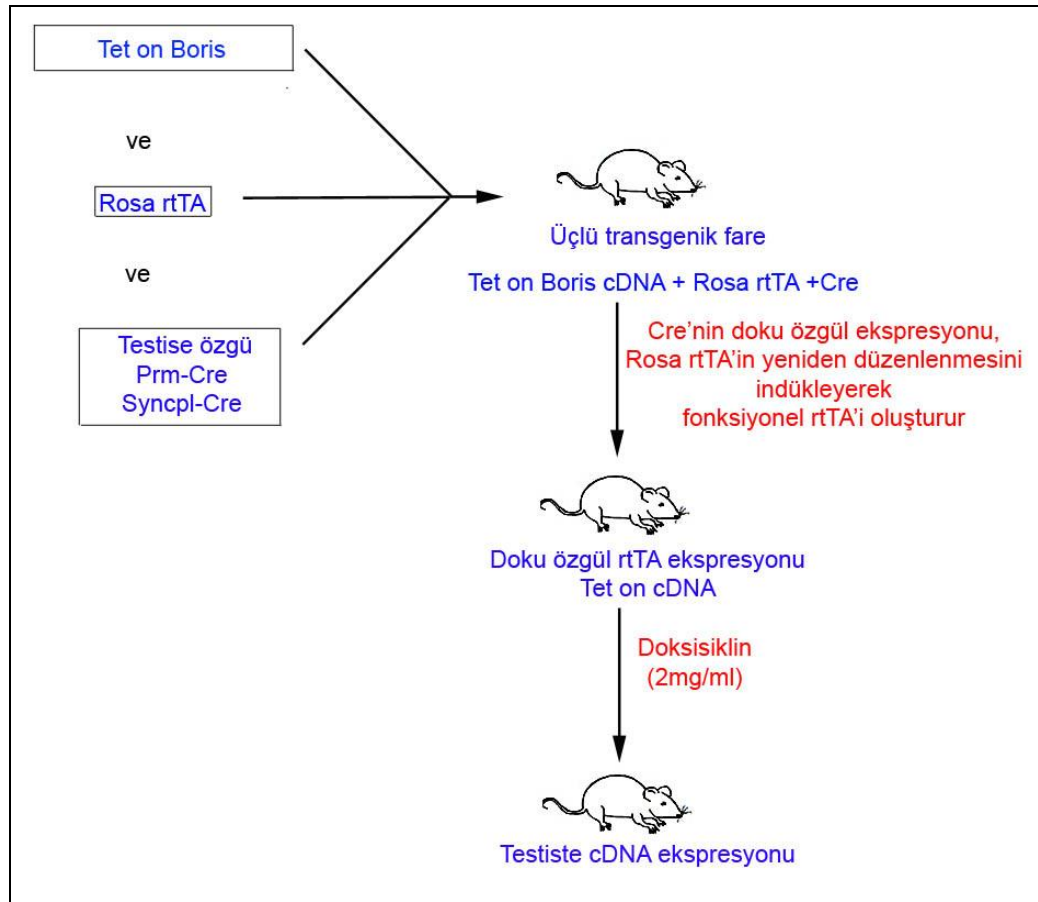
Transgenin genoma integrasyonu tesadüfi olduğu için her bir transgenik hayvan essiz bir şekilde hemizigottur. Potansiyel kurucu farenin genomunun, transgenik olmayan farelerle çiftleştirilerek yeni soylara aktarılması sağlandı.

3.3. *Boris*-Tetrasiklin-GFP Transgenlerinin Testise Özgü Ekspresyonunun Sağlanması

İki yönlü çalışan Tet promoterü, ters (reverse) Tetrasiklin transkripsiyonal aktivatör (*rtTA*) transgeni ile kombine olmadığı sürece inaktiftir. Bu nedenle, yukarıda belirtilen *Boris* transgenleri, transgenik soylarda sessiz olarak bulunmaktadır. Bu transgenler, *Boris* transgenik soyların, testis spesifik promoter

elementin kontrolü altında, Rosa 26 lokusu yerleşimli *rtTA* elementi taşıyan bir fare soyu (Jackson Laboratuvarı, Bar Harbor, Maine, USA) ile çiftleştirilmesi ile aktif hale getirildi. Bu şekilde, gerek *Boris* gerekse *rtTA* transgenlerini kalıt alan soy, içme suyunda doksisisiklin ile beslendiği zaman, mutant veya normal *Boris* genini ekspre edebilir. Testis spesifik promoter kullanıldığı için, bu ekspresyon sadece testiste olacaktır (Şekil 3.7).

Testise özgü promotere sahip transgenik fare soyu olarak, *Snaptomemal kompleks* ve *Protamin Cre* taşıyan fareler kullanılmıştır (Jackson Laboratuvarı, Bar Harbor, Maine, USA). *Boris* transgenine ek olarak deneysel düzenekte kullanılan transgenik fare soyları Çizelge 3.2’de özetlenmiştir.



Şekil 3.7. Transgenik soyların çiftleştirilme stratejisi. Testise özgü Cre rekombinaz, loxP alanları arasındaki DNA parçasını çıkartarak sadece testiste fonksiyonel *rtTA* oluşmasını sağlar. Üçlü transgenik farelere içme suyunda doksisisiklin verilerek gen indüksiyonu sağlanır. Bu deneysel dizayn, dokuya özgü *Cre* transgenik soyn varlığına bağlı olarak, istenilen dokuda *Boris* transgeninin spesifik ekspresyonuna olanak sağlar.

Çizelge 3.2. Tetrasiklin ile indüklenabilir sistemde testise özgü ekspresyonun sağlanabilmesi için kullanılan *Snaptomemal kompleks* ve *Protamin Cre* hayvanlar ile *Rosa rtTA* transgenine sahip fareler listelenmiştir.

Transgenik soy	Stok numarası
Syncp-1-cre (B6;D2-Tg(Sycp1-cre)4Min/J)	003466
Prm-1 (B6Ei.129S4-Tg(Prm-cre)58Og/EiJ)	007252
B6.Cg-Gt(ROSA)26Sor ^{tm1(rtTA,EGFP)Nagy/J}	005670

3.4. Üçlü *Boris* Transgenik Farelerin Genotiplemesi

Rosa rtTA elementi, *Snaptomemal kompleks* ve *Protamin Cre* PCR amplifikasyonları için dizayn edilen primerler (Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Keck Biyoteknoloji Laboratuvarları) aşağıda listelenmiştir (Çizelge 3.3). PCR protokolünün detayları yukarıda sunulmuştur. Yapılan çiftleştirmelerde her üç geni (*Boris*, *rtTA* ve *Cre*) içeren erkek fareler (triple transgenik fareler) değerlendirmelerde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonları için dizayn edilen primer dizileri.

	Primerler
internal kontrol =324 bp	F 5'-CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT -3' R 5'- GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C -3'
<i>Rosa rtTA</i> Transgen = 560 bp	F-5'- GAA TCG AAG GTT TAA CAA CCC GTA A-3' R-5'- GGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG TTG T -3'
<i>Cre</i> Transgen = 520 bp	F-5'-AAG TTC ATC TGC ACC ACC G -3' R-5'- TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG -3'

DNA'nın çoğaltılması amacıyla, PCR reaksiyonları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. *Rosa rtTA* ve *Cre* transgenleri için PCR reaksiyonları.

Bileşen	<i>Rosa rtTA</i> PCR	<i>Cre</i> PCR
10x Coraload PCR Tamponu (Qiagen, kit, katalog no:201203)	1.2 µl	1.2 µl
25mM dNTPs (invitrogen, katalog no: 18427-013)	0.125 µl	0.10 µl
İleri primer (<i>Rosa rtTA</i> için 20µM; <i>Cre</i> için 25µM)	0.6 µl	0.5 µl
Geri primer (<i>Rosa rtTA</i> için 20µM; <i>Cre</i> için 25µM)	0.6 µl	0.5 µl
<i>Taq</i> DNA Polimeraz enzimi (Qiagen, kit, katalog no:201203, 5 units/µl)	0.125 µl	0.10 µl
Distile su	6.35 µl	7.6 µl
Genomik DNA Kalıbı	3 µl	2 µl

Snaptomemal kompleks ve Protamin Cre transgeni için PCR kurulumu:

1. basamak	94 °C	1.5 dakika
2. basamak (35 siklus)	94 °C	30 saniye
	54 °C	1 dakika
	72 °C	1 dakika
3. basamak	72 °C	5 dakika
4. basamak	+4 °C	sonsuz

Rosa rtTA transgeni için PCR kurulumu:

1. basamak	94 °C	1.5 dakika
2. basamak (35 siklus)	94 °C	30 saniye
	60 °C	40 saniye
	72 °C	45 saniye
3. basamak	72 °C	10 dakika
4. basamak	+4 °C	sonsuz

PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde değerlendirildi ve PCR ürünlerine ait bantlar UV ışığı altında görüntülendi. Agaroz jelin hazırlanışı yukarıda belirtilmiştir.

3.5. Ektopik Gen Ekspresyonunun İndüksiyonu

Mutant ve normal *Boris* transgen ekspresyonlarının sağlanması için, üçlü transgenik fareler 2-3 ay süreyle içme suyunda %5'lik süktroz varlığında doksisiklin (2mg/ml, Sigma katalog no: D9891-25G) ile indüklendi. Doksisiklin uygulamasının başlama noktasından itibaren, en az 2 spermatogenik siklus tamamlanıncaya kadar (spermatogenik siklus süresi farelerde ortalama 34-35 gün) bu indüksiyona devam edildi.

Doksisiklin hyclate	2g
Süktroz	50g
İçme suyu	1 litre

GFP raportör geni aracılığıyla, spermatogenik hücrelerde fluoresanının kuvveti ile ekspresyon düzeyi değerlendirilebildi. Doksisiklin ile beslenen hayvanlara ait testis dokuları, değişmiş spermatogenez ve değişmiş imprinte gen metilasyonu açısından analiz edildi.

Çalışmamızda, mutant ve normal ektopik *Boris* protein ekspresyonunun yapıldığı 2 ayrı transgenik deney grubunun yanısıra transgen içermeyen ancak doksisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve transgen içermeyen gibi doksisiklin uygulamasının yapılmadığı iki ayrı kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir.

3.6. Dokuların Toplanması

Cinsel olgunluğa ulaşan (7-9 hafta) üçlü transgenik ve kontrol gruplarına ait farelerden testisler alındı. Testislerden biri, moleküler uygulamalar için (RNA deneyleri ve kantitatif gerçek zamanlı PCR) RNAlater solüsyonu (Qiagen, katalog no:76104) içerisine konuldu. Gece boyu +4°C’de inkübe edildikten sonra, RNAlater solüsyonu dokudan uzaklaştırılarak sıvı nitrojen tankında saklandı. RNA later solüsyonu RNA stabilizasyonunu sağlayarak oluşabilecek RNA degradasyonu riskini minimize etmektedir. Diğer testis dokusuna ise aşağıda belirtilen yöntemler uygulanmıştır.

Boris’in spermatogenez üzerindeki etkisini değerlendirebilmek amacı ile gerek kontrol gerekse transgenik hayvanlardan elde edilen ikinci testis, Bouin fiksatifinde (Ricca Chemical Company, Arlington, TX, USA, katalog no: R1120000-1A 1120/32) oda ısısında 24 saat fikse edildi. Doku işleme makinasında (Thermo, Electron Corporation, Shandon Excelsior) takip uygulanarak parafin bloklar elde edildi ve mikrotom yardımıyla 5µm kalınlığında kesitler alındı.

Ayrıca epididimal sperm örnekleri in vitro fertilizasyon deneyleri için toplandı ve metilasyon deneylerinde kullanılmak üzere DNA ekstraksiyonu için sıvı nitrojende depolandı.

3.7. Işık Mikroskopik Değerlendirmeler

Hematoksilen-Eozin (HE) ve Periyodik asit Schiff (PAS) boyamaları yapılarak, testis dokularındaki histopatolojik değişiklikler ışık mikroskobu ile değerlendirildi. HE boyası, seminifer tübüllerin genel görünümünü belirlemek için uygulandı. PAS boyası ise Leydig hücrelerini ve spermatidler daha net bir şekilde ortaya koyduğu için kullanıldı.

3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

Doksisisiklin ile ektopik gen ekspresyonunun sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek için, erişkin kontrol ve transgenik farelere ait testis ve karaciğer dokularında kantitatif gerçek zamanlı PCR metodu uygulanmıştır. Bu amaçla kontrol ve *Boris* transgenik fare testislerinden ve karaciğerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Karaciğer dokuları testise özgü ektopik ekspresyonu doğrulamak amacıyla kullanıldı.

3.8.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için RNeasy kiti (Qiagen, katalog no: 74106) kullanılmıştır. Bütün santrifüjasyonlar oda ısısında (15-25°C) 13,200 rpm’de masaüstü mikrosantrifüjde gerçekleştirildi.

1. İzolasyona başlamadan önce doku miktarı belirlendi. Her örnek için yaklaşık 30mg testis dokusu kullanıldı. Optimal RNA eldesi için başlangıç dokusunun miktarı önemlidir. RNAlater solüsyonunun dokudan tamamen uzaklaştırıldığından emin olundu.

2. Dokuların QIAshredder (Qiagen, katalog no: 79654) ile homojenizasyonu gerçekleştirildi. 2ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne konulan dokunun üzerine, ağırlığına göre 600µl RLT tampon eklendi. Karışım pipet ile QIAshredder çevirme kolonuna aktarıldı. 2 dakika en yüksek devirde santrifüj yapıldı. Pipet yardımıyla supernatant alındı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. İlerleyen aşamalarda sadece bu supernatant kullanıldı. Kullanmadan önce RLT tamponuna betamerkaptoetanol eklendiğinden emin olundu.
3. Lizat 3 dakika tekrar en yüksek devirde santrifüj edildi. Supernatant dikkatlice pipet yardımıyla alındı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
4. 350µl lizat alınarak üzerine 350µl %70'lik etanol eklendi. Pipetlenerek hızla karıştırıldı. QIAshredder homojenizasyonundan artan örnek -80°C' ye kaldırıldı.
5. 700µl örnek, çökmeler ile birlikte 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy çevirme kolonuna transfer edildi. Kapağı kapatılıp 30 saniye 13,500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama tüpü tekrar kullanıldı.
6. RNeasy çevirme kolonuna 700µl RW1 tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp, çevirme kolonunun membranının yıkanması için 30 saniye 13,500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama tüpü tekrar kullanıldı.
7. RNeasy çevirme kolonuna 500µl RPE tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp, çevirme kolonu membranının yıkanması için 30 saniye 13,500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama tüpü tekrar kullanıldı. Kullanmadan önce RPE tamponuna etanolün eklendiğinden emin olundu.
8. RNeasy çevirme kolonuna 500µl RPE tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp, çevirme kolonunun membranının yıkanması için 2 dakika 13,500 rpm'de santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama tüpü tekrar kullanıldı. Uzun santrifügasyon, çevirme kolonu membranının kurumasını sağlar. RNA'nın elute edilmesinden önce herhangi bir etanol kalıntısının olmaması gerekir. Kalıntı etanol izleyen aşamalarda zararlı olabilir.
9. Santrifüjden sonra RNeasy çevirme kolonu toplama tüpünden dikkatlice çıkartıldı. RNeasy çevirme kolonu 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek en yüksek devirde 1 dakika daha santrifüj edildi. Herhangi bir sıvı kontaminasyonu olmamasına özen gösterildi.
10. RNeasy çevirme kolonu, 1.5ml'lik bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Membranın tam ortasına 30µl RNaz içermeyen su eklenerek 1 dakika oda

ısısında beklendi. RNA'nın elüsyonu için 13,500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. RNA örnekleri kısa sürede çalışılacaksa -20°C'de, uzun vadede çalışılacaksa -80°C'de saklandı.

3.8.2. qRT-PCR

Reaksiyonun hazırlanacağı yüzey DNAoff (Takara, Clontech, katalog no:TAK9036) ile temizlendi. Syber green tek aşamalı PCR kiti (Stratagene, Brilliant II SYBR® Green qRT-PCR Master Mix Kit, 1-Step, katalog no:600825) kullanıldı. Her bir reaksiyon üç defa tekrarlandı. Hazırlanan reaksiyonlar, M.J. Reasearch Opticon2 real-time sistem makinasında değerlendirildi.

Toplam 25µl reaksiyon karışımı:

2xBrilliant II QRT-PCR Master Mix	12.5µl
Distile su (DNaz/RNaz içermeyen)	9.1µl
10µM İleri primer	0.2µl
10µM Geri primer	0.2µl
RT/RNaz Blok Enzim Karışımı	1µl
RNA örneği	2µl

1. basamak	50 °C30 dakika
2. basamak	95 °C10 dakika
3. basamak	95 °C1 dakika
4. basamak	52 °C1 dakika
5. basamak	65 °C2 saniye
6. basamak	Okuma
7. basamak	72 °C75 saniye
8. basamak	3.basamağa 40 kez tekrar
9. basamak	72 °C5 dakika
10. basamak	60 °C5 saniye
11. basamak	65°C-95°C'ye erime eğrisi, her 0.2 siklusta bir okuma
12. basamak	+4 °Csonsuz

Negatif kontrol olarak kalıp RNA yerine distile su konularak amplifikasyonun doğruluğu tespit edildi. Pozitif kontrol olarak konstrakta ait plasmid DNA'sı kullanıldı. Hedef genlere ait mRNA'ların normalizasyonu için gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) primerleri (ürün boyutu 150-160bp) kullanıldı.

GAPDH primerleri F-‘5-CAA TGC ATC CTG CAC CAC CAA CT-3’
R-‘5-TCA CGC CAC AGC TTT CCA GAG-3’

3.9. İmmünofluoresan Değerlendirme

Kontrol ve gen indüksiyonunun yapıldığı transgenik hayvanlara ait dokular, GFP için immünofluoresan analizler yapılarak, ekspresyon açısından karşılaştırıldı. Erişkinde sadece testiste, yavru soylarda ise bütün dokularda GFP ekspresyonunun olması beklendi.

3.10. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

Boris-testiküler yapı ilişkisine paralel olarak, immünohistokimya yöntemi ile hücre proliferasyon ilişkisi araştırıldı. İmmünohistokimyasal incelemeler için kullanılacak olan hayvanlara ait doku bloklarından 4-5µm kalınlığında alınan kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alındı ve oda ısısında kurutuldu.

1. Kesitler immünohistokimya boyaması öncesinde parafinin erimesi için 56°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Deparafinizasyon için kesitler üç kez 5'er dakika ksilollerden geçirilerek ve her birinde ikişer kez 5'er dakika olmak üzere %100 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra iki değişim distile suda 5'er dakika bekletildi.
2. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, sebze buhar makinasında (vegetable steamer) sitrik asit çözeltisinde (pH:6.0) 20 dakika kaynatılıp 20 dakika soğutulan kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksit ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
3. Distile suda iki kez 5 dakika yıkandı. Kesitler distile suya aktarıldıktan sonra, etrafları hidrofobik kalem (Dako, katalog no: S2002) ile çizildi. 5 dakika 1X TBS-T tamponunda (pH:7.6) yıkanan kesitler, nemli ortamda özgül olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla 6 dakika oda ısısında bloklandı (Lab Vision Corporation, Ultra V Block, katalog no: TA-060-UB).
4. Bloklama aşamasından sonra yıkama yapılmadan kesitler, 1:1000 dilusyonda primer antikor (PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen; Dako, katalog no: M0879) ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine izotip kontroller uygulandı. Primer antikor, antikor dilüsyon solüsyonu (Dako, katalog no: S0809) içerisinde hazırlandı.
5. Kesitler tekrar TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkanıp, 1:400 dilusyonda biyotinli anti-fare sekonder antikor (Vector Laboratories, katalog no: BA-9200) ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikor TBS-T içerisinde hazırlandı.
6. Kesitler tekrar TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Üretici firmanın tavsiye ettiği şekilde, kesitler Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) ile 30 dakika oda ısısında, nemli ortamda muamele edildi.

7. Kesitler tekrar TBS-T ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Yıkama aşamasından sonra, sinyalleri geliştirmek için kesitler diaminobenzidin (DAB) kromojeni ile (Biocare, Betazoid DAB, katalog no: BDB2004H) (1ml DAB substrat tamponu + 1damla DAB kromojeni) muamele edildi ve distile suda yıkandı.
8. Mayer'in hematoksileninde 5-10 saniye zıt boyamanın ardından kesitler çeşme suyunda 5 dakika yıkandı. Daha sonra ikişer kez sırasıyla 20 saniye %95'lik ve %100'lük alkol serilerinden geçirildi. Kesitler daha sonra 2 defa 5'er dakika ksilolden geçirildi.
9. Kesitler lamel kullanılarak, cyto seal kapatma medyumunu ile kapatıldı. Boyanmalara ait fotomikrograflar Axioplan mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile çekildi ve dokunun proliferasyon durumu değerlendirildi. Tüm testiküler doku örnekleri aynı zamanda aynı protokole tabi tutuldu.

PCNA indeksi, 200X büyütmede elde edildi. Her slaytta tesadüfi alanlar sayıldı. Seminifer tübülün bazalindeki hücreler sayıldı. PCNA oranı, her seminifer tübüldeki pozitif boyanan PCNA hücresinin toplam bazal hücre oranı şeklinde değerlendirildi. Ortalama PCNA indeksi ise, bütün PCNA indekslerinin toplamının sayılan seminifer tübül sayısına oranı şeklinde hesaplandı [172].

İmmünohistokimya da Kullanılan Solüsyonlar

10X Tris Tamponu (TBS) pH 7.6

Trizma baz ($C_4H_{11}NO_3$)	242g
NaCl	80g
Distile su	1 lt'ye kadar
Konsantre HCl ile pH 7.6'ya ayarlanır.	

1X TBS/0.1 % Tween-20 (1X TBS-T)

100ml 10X TBS + 900µl distile su+ 1ml Tween-20 eklenir, karıştırılır.

10X Sodyum Sitrat tamponu (pH 6.0)

29.4g sodyum sitrat trisodyum tuz dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) + 1 litre distile su. Konsantre HCl ile pH 6.0'ya ayarlanır.

%3'lük H_2O_2

10ml %30'luk H_2O_2 (J.T Baker katalog no: 2186-01) + 90ml metanol

3.11. Terminal Deoksinükleotidil Transferaz-aracılı dUTP Nick End Labeling (TUNEL)

Boris'in kanser-üreme hücre hattı antijen aile üyesi olması nedeniyle, testiküler hücre proliferasyonuna ek olarak apoptoz mekanizması değerlendirildi.

Kontrol ile transgenik hayvanlarda, testiküler dokulardaki hücre ölümü ile proliferasyon durumu değerlendirildi. Testis dokusundaki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi ile enzimatik olarak isaretlenmesiyle belirlendi. TUNEL metodu ile isaretleme, Hücre Ölümü Belirleme Kiti (Roche, katalog no:1 684 809) ile üreticinin önerileri doğrultusunda yapıldı.

1. Poli-lizin kaplı lamlara alınan 5µm kalınlığındaki parafin kesitler, parafinin erimesi için 56°C'de etüvde 30 dakika bırakıldı. Deparafinizasyon için kesitler iki kez 5'er dakika ksilolden geçirilerek, her birinde 5'er dakika olmak üzere %100, %90, %80 ve %70'lik alçalan alkol serilerinden geçirildi ve dehidrate edildi. Daha sonra iki değişim distile suda 5'er dakika bekletildi.
2. Fosfat tamponunda (PBS) 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. +4°C'de (buzdolabında ya da oda ısısında buz üzerinde) 8 dakika inkübasyon yapıldı.
3. Taze olarak permeabilizasyon solüsyonu (%0.1'lik sodyum sitrat solüsyonu içinde %0.1'lik Triton-X 100) hazırlandı. 100ml distile su + 100µl Triton-X hazırlandıktan sonra içinde, 0.1g Sodyum sitrat çözüldü.
4. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Ardından TUNEL solüsyonu aşağıda belirtildiği miktarlarda hazırlandı. 37°C'de, 1 saat, nemli ortamda ve karanlıkta inkübasyon yapıldı.

Enzim solüsyonu (vial 1)	50µl (10X)
İşaretleme (Label) solüsyonu (vial 2)	450µl (1X)
Tunel dilusyon tamponu	500µl

Tüpte artan 100µl işaretleme solüsyonu negatif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrole sadece 100µl işaretleme solüsyonu ve 100µl tunel dilusyon tamponu karışımı eklendi.

5. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Daha sonra 30µl dönüştürücü ajan (Converter-AP; vial 3) kesitler üzerine damlatıldı ve 37°C'de, 30 dakika, nemli ortamda, karanlıkta inkübasyon yapıldı.
6. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra isaretleli DNA iplikçigi kırıklarını içeren hücrelerin lokalizasyonu için renk geliştirme işlemi Fast Red substrat solüsyonu kullanılarak yapıldı. Kesitler Fast red substrat solüsyonu ile oda ısısında, 1-2 dakika, nemli ortamda ve karanlıkta bekletildi.

0.1 M Tris HCl (pH=8.2) solüsyonunun 2ml'sinde 1 tablet Fast Red (Roche Applied Science, katalog no: 11 496 549 001) çözülür.

7. PBS solüsyonunda 2 kez 5'er dakika yıkama yapıldı. Ardından hematoksilen ile hafif bir zıt boyama yapıldı.
8. Kaiser'in gliserol jelatin solüsyonu (Merck Kaisers Glycerin Gelatine, katalog no: 1.09242.0100) ile kapatma işlemi yapıldı.

Testis dokusunda TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücre sayısının belirlenmesi için her bir seminifer tübülde, TUNEL pozitif apoptotik hücreler sayıldı. TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücrelerin toplam alandaki sayısı belirlenerek dokudaki apoptotik hücre oranı (%) belirlendi. Değerlendirme yapılırken kesit düzeyi yuvarlak olan ve lümeni net olarak görünen seminifer tübüller dikkate alınmıştır.

3.12. Boris Transgenik Farelerin Fertilite/İnfertilite Durumu

Boris'in infertilite ile ilişkisi olup olmadığı sorusu *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki açıdan değerlendirdi.

3.12.1. In vivo Fertilizasyon

Kontrol ve transgenik erkek fareler, yabanıl tip dişi fareler ile çiftleştirildi (1 erkek: 4 dişi), ertesi sabah vajinal plak tespit edilen dişiler gebeliğin 0.5. gününde kabul edildi. Vajinal plak kontrolü için hayvanlar 1-2 hafta boyunca hergün kontrol edildi. Farelerin fertilizasyon durumları ve yavru ağırlıkları değerlendirildi.

3.12.2. In vitro Fertilizasyon

Protokole ait aşamalar aşağıda başlıklar altında sunulmuştur.

3.12.2.1. Süperovulasyon ve Ovosit Toplanması

Kumulus hücreleri ile çevrelenmiş fare ovositleri yabanıl tip dişilerden elde edildi. Bu dişiler, 5 IU pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) ve bunun 46-48 saat ardından 5 IU human koryonik gonadotropin (HCG) ile intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ovosit/kumulus hücre kompleksleri, HCG enjeksiyonundan 12-13 saat sonra bir pens çifti yardımıyla dişi farelerin ampulla bölgesinin yırtılması ile elde edildi. Daha sonra ovositler IVF kültür medyumuna (modified human tubal fluid; mHTF) içeren 4 adet damlacıktan geçirilerek yıkandı.

3.12.2.2. Fare Spermlerinin Hazırlanması

En azından 5 gün süre ile çiftleştirilmemiş yetişkin kontrol ve transgenik hayvanlara ait sperm örnekleri kauda (kuyruk) epididimis ve vasa deferens bölgelerinden elde edildi. Her fareden alınan kauda epididimis ve vasa deferens doku parçaları, kültür yağı altında, 1ml mHTF medyumuna içerisine konuldu, 20 dakika süreyle 5'lik CO₂ içeren, 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde bekletildi. Kauda epididimis ve vasa deferens kanalı, spermatozoanın dağılması için hafifçe parçalandı [173]. Yüzeye yüzen spermier toplanarak (swim up) IVF'de kullanıldı.

3.12.2.3. Fare İn Vitro Fertilizasyonu (IVF)

Fertilizasyon için 10µl sperm süspansiyonu 250µl mHTF içerisine eklendi. 0.25ml mHTF medyumunu damlacıklarında, ovosit ve kumulus hücreleri sperm ile inkübe edildi. %5'lik CO₂ içeren, 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde mineral kültür yağı altında 4-6 saat inkübasyon yapıldı.

İnkübasyon süresinin sonunda, ovositler damlacıktan uzaklaştırıldı. Bu ovositler 3 kez yıkama işlemi sonrasında, K simpleks optimizasyon medyumunu (KSOM) ile hazırlanan başka bir IVF petrisine aktararak yeniden inkübe edildi (Çizelge 3.5). Embriyolar takip edilerek, fertilizasyon oranı, 24 saatlik post inseminasyon süresi sonrasında, 2 hücreli aşamaya geçen zigot oranı şeklinde belirlendi. Yıkamalar dahil olmak üzere tüm inkübasyonlar mineral yağ altında gerçekleştirildi.

Çizelge 3.5. KSOM medyumunun hazırlanışı.

KSOM medyumunu	g/100ml	mM
NaCl	0.555	95
KCl	0.019	2.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.025	1.71
KH ₂ PO ₄	0.005	0.35
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.005	0.2
NaHCO ₃	0.210	25
Dekstroz	0.004	0.2
Na Laktat	0.206	10
EDTA	0.004	0.01
Na Pruvat	0.004	0.34
Penicillin G		100IU/ml
Streptomycin	0.005	0.05IU/ml
L-Glutamine		1
Fraction V BSA		4mg/ml
Essential Amino Asitler (aa)	1ml	10µl/ml
Non Ess aa.	0.5 ml	5µl/ml
Fenol kırmızısı (11 mg/ml)	0.1 ml	

Karışım filtre edilir ve +4°C'de 4 haftaya kadar kullanılabilir.

3.13. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Metilasyon, CpG adaları içinde bulunan sitozin bazlarında meydana gelmektedir. Sodyum bisülfid uygulaması sayesinde metile olan sitozin bazları değişime uğramaz ancak metile olmayan sitozin bazları urasil bazına dönüştür. Transgenik erişkin erkek hayvanların epididimal spermatozoasında ve yavrularda metilasyon imprintleri araştırıldı. Toplanan erişkin fare spermi aşağıda belirtilen işlemlere tabii tutuldu. Yavrular ile ilgili deneylerde kuyruk DNA'sı elde edilerek, deneylere devam edildi.

3.13.1. Spermden Genomik DNA'nın İzolasyonu

Epididimisler toplanarak, PBS içerisinde parçalandı. Doku debrisinin çökmesini takiben, supernatant içerisindeki spermelerden genomik DNA izole edildi [174].

1. 100µl sperm 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Üzerine 100µl X2 tamponu eklendi. Örnek çözününceye kadar 55°C'de 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon boyunca, örneğin tüp içinde dağılması için tüp ters çevrildi.
2. Örneğe 200µl AL tamponu ve 200µl etanol eklendi. Vortekslenerek karıştırıldı. Bu karışım herhangi bir çökme varsa o da dahil olmak üzere pipetlenerek, daha önceden üzeri kodlanmış ve 2ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş DNeasy Mini çevirme kolonlarına aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı.
3. DNeasy çevirme kolonları, 2ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 500µl AW1 tamponu eklendi. 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı.
4. DNeasy çevirme kolonları tekrar 2ml'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. Üzerine 500µl AW2 tamponu eklendi. DNeasy membranının kuruması için 14,000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı ile birlikte toplama tüpü uzaklaştırıldı. Eğer kolonda etanol kalıntısı görülürse 14,000 rpm'de tekrar 1 dakikalık santrifüj yapılmalıdır.
5. DNeasy çevirme kolonları, üzeri önceden kodlanmış temiz 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. 50µl AE tamponu doğrudan DNeasy membranı üzerine eklendi. 1 dakika oda ısısında inkübasyon yapıldı ve sonrasında elüsyon için 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Bu basamak bir kez daha tekrarlandı ve toplam 100µl DNA elde edildi. DNA örnekleri, +4°C'de kullanılma zamanına kadar saklandı.

X2 Tamponu:

1M Tris, pH 8.0	2ml
0.5m EDTA	4ml
%20'lik SDS	20ml
NaCl	1.1688g
Distile su	74ml

Kullanmadan hemen önce, uygun miktarda Proteinaz K stok solüsyonu (20 mg/ml) eklendi (100µl X2 tamponu için 12.5 µl Proteinaz K).

DTT, sıvı solüsyonlarda çok çabuk oksidize olur. Bu nedenle kullanımdan hemen önce solüsyona eklendi (100µl X2 tamponu için 8µl 1M DDT). 1M stok DTT alikvatları hazırlanarak (0.77g DDT + 5ml distile su) -20°C'de saklandı.

3.13.2. DNA'nın Bisülfıt ile Muamelesi

Metile olmayan sitozinlerin urasile dönüşümü için Epitech Bisülfıt Kiti (Qiagen, katalog no: 59104) kullanıldı. Bu kit kullanılarak 20µl'de 2 µg-1 ng DNA'ya kadar DNA ile çalışılabilir.

1. Çalışılacak örnek sayısına bağlı olarak, kitle bulunan bisülfıt karışımı alikvatlarının herbirine 800µl RNaz içermeyen su eklendi ve karışımın çözünmesi için vorteksleme yapıldı. Tam olarak çözünme yaklaşık 5 dakika kadar sürebilir. Ayrıca bisülfıt karışımı-RNaz içermeyen su solüsyonu 60°C'de ısıtılarak çözünme sağlanabilir. Bisülfıt karışımı kesinlikle buz üzerinde çözünmemelidir.
2. 200µl'lik PCR tüpleri kullanılarak bisülfıt reaksiyonları aşağıdaki çizelgede belirtilen sıraya göre hazırlandı (Çizelge 3.6). PCR tüpleri kapatıldı ve bisülfıt reaksiyonları karıştırıldı. Tüpler oda ısısında tutuldu. DNA koruma tamponunun rengi, DNA-Bisülfıt karışımının eklenmesinden sonra yeşilden maviye dönmelidir. Bu yeterli ve etkili bir karışma olduğunun ve bisülfıt dönüşüm reaksiyonu için doğru pH değerinin bir belirtecidir.

Çizelge 3.6. Bisülfıt reaksiyonu bileşenleri. *DNA solüsyonu ve RNaz içermeyen suyun toplam hacmi 20 µl olmalıdır.

Bileşen	Reaksiyon başına hacim (µl)
DNA solüsyonu (1ng-2 µg)	Değişken (maksimum 20)*
RNaz içermeyen su	Değişken*
Bisulfıt Karışımı (çözünmüş)	85
DNA Koruma Tamponu	35
Toplam hacim	140

PCR makinası kullanılarak, DNA bisülfıt dönüşümü yapıldı. Kullanılan program aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.7). Dönüştürülen DNA, gece boyunca herhangi bir sorun olmadan makinada tutulabilir. Toplam süre yaklaşık 5 saattir. PCR tüplerinin iyice kapatıldığından emin olunmalıdır.

Çizelge 3.7. DNA'nın bisülfıt ile muamelesinde kullanılan PCR programı.

Aşama	Süre	Sıcaklık
Denatürasyon	5 dakika	99°C
İnkübasyon	25 dakika	60°C
Denatürasyon	5 dakika	99°C
İnkübasyon	85 dakika	60°C
Denatürasyon	5 dakika	99°C
İnkübasyon	175 dakika	60°C
Bekleme	sonsuz	20°C

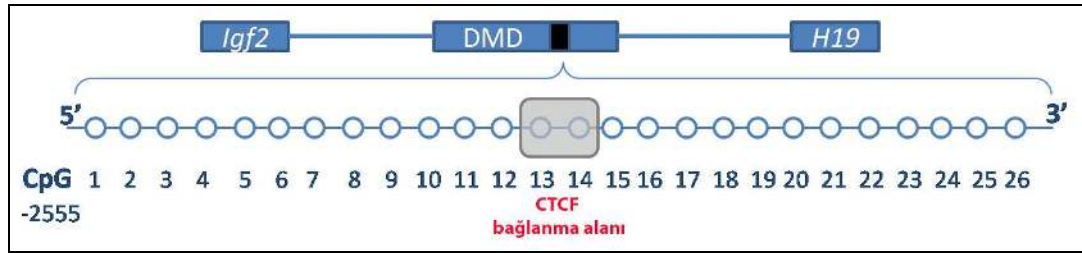
3.13.3. Bisülfıt ile Muamele Edilmiş DNA'nın Temizlenmesi

1. Bisülfıt reaksiyonu tamamlanınca, bisülfıt reaksiyonlarını içeren PCR tüpleri kısa bir süre santrifüj edildi. Daha sonra reaksiyonlar temiz 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Solüsyondaki herhangi bir çökme, reaksiyonu ya da performansı etkilememektedir. Tüplere, 10µg/ml taşıyıcı RNA içeren 560µl taze olarak hazırlanmış BL tamponu eklendi. Karışım vortekslenerek karıştırıldı ve kısa bir süre santrifüj edildi. 100ng DNA'dan fazla DNA kullanılıyorsa, taşıyıcı RNA'ya gerek yoktur.
2. Bir önceki aşamada elde edilen tüm karışım, toplama tüpü içindeki EpiTect çevirme kolonuna transfer edildi. Kolona 15,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
3. Kolona 500µl BW tamponu (yıkama tamponu) eklendi. 15,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
4. Kolona 500µl BD tamponu (desülfonasyon tamponu) eklendi. Oda ısısında 15 dakika beklendi. Eğer herhangi bir çökme varsa, bunun çevirme kolonuna aktarılmamasına dikkat edildi. İnkübasyon boyunca kolonun kapağı kapatıldı.
5. 15,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
6. Kolona 500µl BW tamponu (yıkama tamponu) eklendi. 15,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve kolon tekrar toplama tüpüne yerleştirildi. Bu aşama bir kez daha tekrarlandı.
7. Çevirme kolonu 2ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. 15,000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılarak kalıntı olabilecek sıvının uzaklaştırılması sağlandı.

8. Çevirme kolonu 1.5ml'lik yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Membranın ortasına 20µl elüsyon tamponu (EB) eklenerek yaklaşık 15,000 x g (12,000 rpm)'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve DNA elute edildi. Elüsyon aşaması bir kez daha tekrarlanarak toplam 40µl bisülfite ile muamele edilmiş DNA hazırlandı..

3.13.4. Bisülfite ile Muamele Edilmiş DNA'nın PCR ile Amplifikasyonu

H19 DMD (differentially methylated domain)'de bir bölge, paternal allelde yoğun bir şekilde metile iken, maternal allelde hipometile durumdadır [175]. Bu bölge transkripsiyon başlama alanına göre -1968 ve -2555 arasında lokalizedir (Erişim numarası AF049091) ve 26 tane CpG alanı ve bir adet CTCF-bağlanma alanı içermektedir [135, 176] (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Bisülfite sekanlamasında analiz edilen 588bp uzunluğunda *H19* DMD bölgesinin şematik gösterimi. Bölge 26 adet CpG adacığı ve bir CTCF bağlanma alanı (gri) içermektedir.

Seçilen bölge PCR ile amplifiye edilmiş ve değerlendirilmiştir. Reaksiyon için HotStar *Taq*DNA polimeraz (Qiagen, katalog no:203203) kullanıldı. Hazırlanan primerler sadece bisülfite ile muamele edilmiş genomik DNA'ya özgü olarak aşağıda belirtildiği şekilde dizayn edilmiştir. PCR ürünü 588-bp'dır. PCR reaksiyon karışımı aşağıda sunulmuştur (Çizelge 3.8).

H19DMR F 5'-CAA CCT CTA CTT TTA TAA CTA TAA AAT-3'
H19DMR R 5': AAT GGT TTT TTT ATA TAT TGA ATT AGA-3'

Çizelge 3.8. *H19* DMD için PCR reaksiyon karışımı.

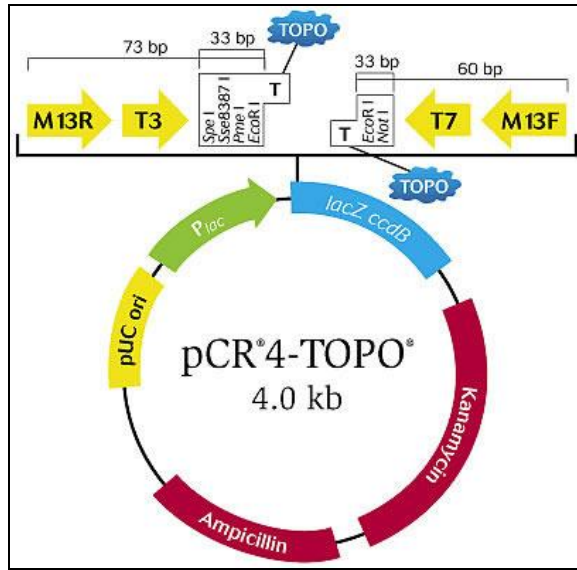
Bileşen	H19DMR PCR (µl)
Distile su	28.1
10x PCR Tamponu (Qiagen, kit, katalog no:201203)	5
25mM dNTPs (invitrogen, katalog no: 18427-013)	0.65
20µM İleri primer	2.55
20µM Geri primer	2.55
HotStar <i>Taq</i> DNA polimeraz (Qiagen, katalog no:203203)	0.65
Bisülfite ile muamele edilmiş genomik DNA Kalıbı	10.5

PCR koşulları aşağıdaki şekilde programlanmıştır. PCR amplifikasyon ürünleri poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edildi. Örneklerin yürütülme işlemi tamamlandıktan sonra jel, UV ışık altında kontrol edildi. Amplifikasyon doğrulandıktan sonra subklonlama aşamalarına geçildi.

1. basamak	95 °C	15 dakika
2. basamak (35 siklus)	94 °C.....	1 dakika
	50 °C.....	1 dakika
	72 °C	1 dakika
3. basamak	72 °C	10 dakika
4. basamak	+4 °C	sonsuz

3.13.5. *H19* DMD PCR Ürünlerinin pCR™4-TOPO® TA Vektörüne Klonlanması

Taq polimeraz ile amplifiye edilen *H19* DMD PCR ürünleri pCR™ 4-TOPO TA vektörüne (İnvitrogen katalog no:45-0030) klonlandı. PCR ürünü vektörde çoklu klonlama alanı içerisine entegre edildi (Şekil 3.9)



Şekil 3.9. pCR®4-TOPO® vektörüne ait harita.

3.13.5.1. *H19* DMD PCR Ürünlerinin Elektrokompotent One Shot® TOP10 *E. coli* Hücrelerine Transformasyonu

Çalışmamızda hem kimyasal (İnvitrogen, katalog no: C4040-03) hem de elektrokompotent (İnvitrogen, katalog no: C4040-52) One Shot® TOP10 *E. coli* hücreleri kullanılmıştır. Elektroporasyon ile transformasyon etkinliğinin kimyasal yolla transformasyona göre daha yüksek sonuç vermesi nedeniyle elektrokompotent hücreler ile çalışmalara devam edilmiştir.

1. Her bir transformasyon için, yetenekli hücrelerin bulunduğu tek bir vial kullanıldı. Her örnek için LB-Ampisilinli (50 µg/ml Ampisilin) 2 adet kültür kabı kullanıldı. Transformasyona başlamadan önce bir vial S.O.C. medyumuna oda ısısına getirildi. Aynı şekilde kullanılacak olan seçici LB-Ampisilin kültür kapları 30 dakika 37°C’de ısıtıldı. Bir vial elektrokompotent *E. coli* hücreleri (One Shot® TOP10), transformasyon için buz üzerinde çözüldü. Bu hücreler kullanılarak TOPO® Klonlama reaksiyonu hazırlandı. 30 dakika oda ısısında beklenildi. Bütün bileşenler hazırlandıktan sonra -20°C’de saklanabilir.

TOPO® Klonlama Reaksiyonu

Taze PCR ürünü	4µl
Dilüye edilmiş tuz solüsyonu (1:4)	1µl
TOPO® vektör	1µl
Toplam Hacim	6 µl

2. 2µl TOPO® Klonlama reaksiyonu, 1 vial (50µl) One Shot® Elektrokompotent *E. coli* hücresine eklendi ve hafifçe karıştırıldı. Bu aşamada pipetleyerek karıştırma yapılmamalıdır. Solüsyon hava kabarcığı yapılmadan 0.1cm küvete (E.coli pulser cuvette, BioRad katalog no: 1652089) aktarıldı.
3. Örnekler elektropore edildi (1.8V) (BioRad, E. Coli pulser, model: 1652102). Hemen ardından üzerinde 250µl oda ısısına getirilmiş S.O.C medyumuna eklendi.
4. Solüsyon, 14ml’lik kapaklı bir tüpe aktararak (Becton Dickinson, Falcon 352057), antibiyotik direnç genlerinin ekspresyonu için en azından 1 saat 37°C’de çalkalandı (225rpm).
5. Her transformasyondan alınan 10-50µl örnek, daha önceden ısıtılmış seçici LB-Ampisilin kültür kaplarına yayıldı. Gece boyunca 37°C’de inkübasyon gerçekleştirildi. Küçük hacimlerin daha kolay yayılması için 20µl S.O.C. medyumuna eklenebilir. İki farklı hacim ile çalışılarak en uygun dağılımın görüldüğü kültür kabından koloniler kullanıldı. Etkili bir TOPO® Klonlama reaksiyonu, yüzlerce koloninin oluşmasını sağlar.

3.13.5.2. Plasmid DNA’sının Bakteriden Uzaklaştırılması ve Sekans Analizi

1. Elektroporasyondan bir gün sonra, LB-Ampisilinli kültür kaplarında kolonilerin gelişimi gözlemlendi. Kültür kaplarında bulunan bakteri kolonilerinden hangisinin vektörü içerdiğini belirlemek için 10-12 koloni seçilerek 3ml’lik LB-Ampisilinli solüsyonda 37°C’de gece boyu çalkalamalı kültürasyon (12-16 saat) yapıldı.

2. K lt rasyon sonrasında 1.5ml’lik kültür karışımı alınarak miniprep (Qiagen, QIAprep® Miniprep, katalog no: 27106) kiti kullanılmak suretiyle, plasmid DNA’sı izole edildi. Protokolün detayları önceki bölümlerde sunulmuştur.
3. Vektöre sokulan *H19* DMD gen amplikonunun varlığını doğrulamak için plasmid DNA’sı  rnekleri “EcoRI” restriksiyon enzimi kullanılarak kontrol edildi. Toplam 20 l reaksiyon karışımı hazırlanarak, 37 C’de, gece boyu inkübasyon gerçekleştirildi.

3 l DNA

2 l 10X NEBuffer EcoRI

1 l EcoRI (New England BioLabs, katalog no: R0101S, 20,000U/ml)

14 l distile su (American Bioanalytical, katalog no: AB02128)

4. Kesim sonrası, örnekler 6x yükleme boyası ile karıştırılarak %1’lik agaroz jele yüklendi ve vektöre sokulan genin varlığı kontrol edildi. Doğrulama sonrasında, örnekler sekanslama için hazırlanarak Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Keck Biyoteknoloji Laboratuvarları’na gönderildi.

Sekans için kullanılan primer (TE tamponunda 0.1  g/ l, pH 8)

M13 ileri primer (-20) -5’-GTAAAACGACGGCCAG-3’

5. Sekanslama için örnekler 96 kuyucuklu kültür kabında (Eppendorf twin.tec® 96 Red PCR Plates, katalog no: 951020389) hazırlandı. Kapatma filmi kullanılarak, kültür kabı yüzeyi kapatıldı. Herbir kuyucuğa aşağıdaki karışım eklendi. DNA miktarı spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

550 ng plasmid DNA’sı

16  l

4  M M13 ileri primer

2  l

Toplam hacim

18  l

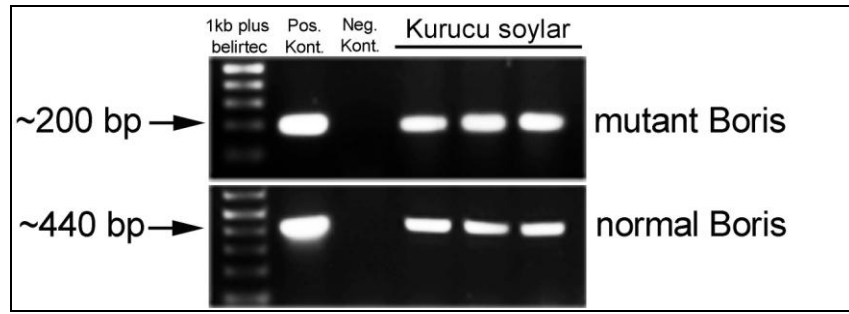
3.14. İstatistiksel Analizler

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler SigmaStat (Version 3.5) programı kullanılarak karşılaştırmalı testler yapılarak (ANOVA, t-test) değerlendirildi ve gruplar arasında anlamlı farklılıkların olup olmadığı belirlendi. Sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak sunulmuştur. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

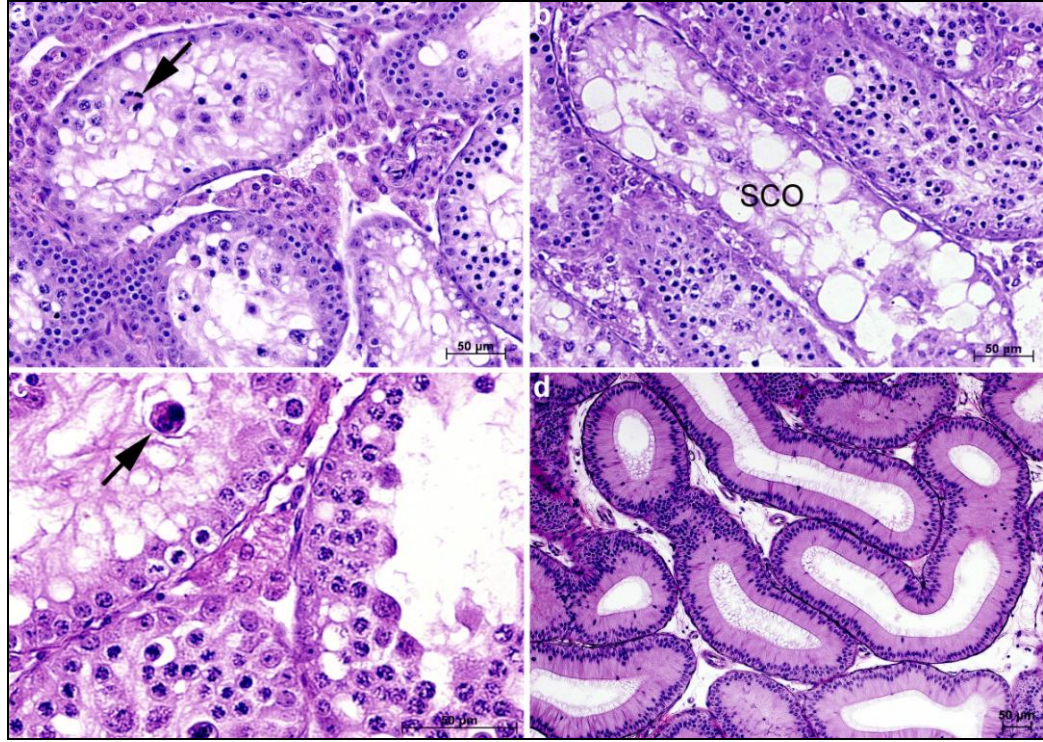
4.1. Kurucu *Boris* Transgenik Fare Soyları ve PCR Değerlendirmeleri

C57BL/6 zigotlarına normal ve mutant *Boris* cDNA'ların injeksiyonu sonucunda sırasıyla 38 ve 58 adet fare doğumu gözlemlendi. Kuyruk DNA'sı kullanılarak yapılan PCR değerlendirmelerinde (Şekil 4.1), 38 adet potansiyel normal *Boris* transgenik yavru içerisinde 4 tanesinin (2 adet erkek ve 2 adet dişi) transgeni içerdiği ve fertil olduğu tespit edildi. 58 adet potansiyel mutant *Boris* transgenine sahip fare içerisinde ise sadece 3 tanesi mutant *Boris* transgenini içerdi. Bu 3 farenin 1 tanesinin erkek ve fertil iken, 1 tanesinin dişi ve fertil, 1 tanesinin ise ilginç olarak erkek ve steril olduğu gözlemlendi. Steril fareye ait testisin histolojik analizi, tübüllerde spermatogenetik duraksamanın (arrest) varlığını ortaya koyarken, epididimis kesitleri incelendiğinde herhangi bir sperm hücresine rastlanılmadı (Şekil 4.2).

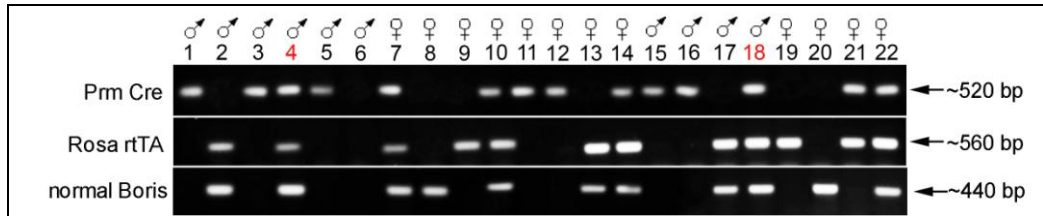


Şekil 4.1. Mutant ve normal *Boris* transgenine sahip kurucu soyların PCR analizi.

Boris transgenine sahip transgenik fareler, testise özgü *Snaptoneal Kompleks* ve *Protamin Cre* transgenik fareler ile çiftleştirildi. Genotipleme yapılmak suretiyle *Boris* ve *Cre* transgenini taşıdığı tespit edilen ikili (double) transgenik fareler, *Rosa rtTA* transgenini taşıyan üçüncü bir transgenik fare ile çiftleştirildi. *rtTA* transgeninin fonksiyonel hale gelmesiyle, *Boris* ekspresyonunun indüklenabilir bir sistemde sadece testiste olması sağlanmış oldu. Elde edilen her üç transgeni taşıyan (üçlü) transgenik farelerin (Şekil 4.3) fertilite durumları test edildikten sonra, %5 oranında sükröz içeren içme suyunda 2mg/ml doksisiklin muamelesi ile *Boris* gen indüksiyonu yapıldı.



Şekil 4.2. Steril mutant *Boris* transgenik kurucu soyun testis kesitinin H&E boyaması (a-c). Seminifer tübüller, pakiten spermatosit aşamasında spermatogenezde duraksama (arrest) göstermektedir. Germinal hücre aplazisine sahip, sadece Sertoli hücrelerine sahip tübüller (SCO) gözlemlendi. Oklar, seminifer tübüllerdeki anormal hücreleri işaret etmektedir. d) Epididimiste sperm hücrelerinin yokluğu dikkat çekmektedir.



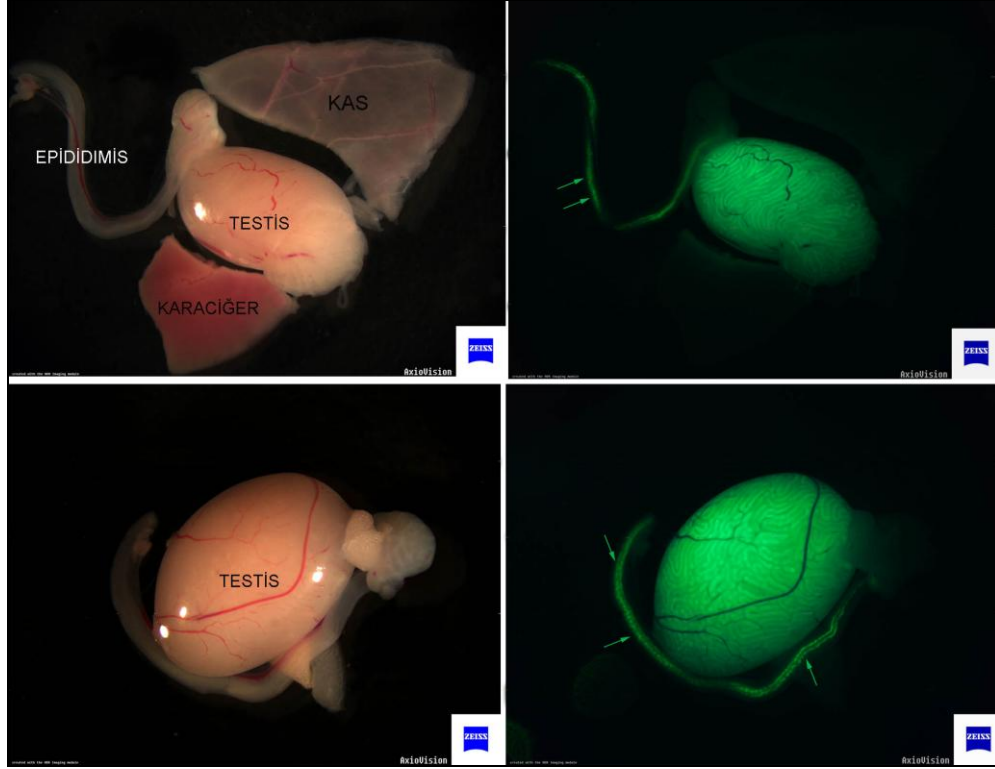
Şekil 4.3. Genotipleme ve transgenik farelerin belirlenmesi. 22 potansiyel üçlü transgenik fare içerisinde, 4, 7, 10, 14, 18 ve 22 numaralı fareler her üç transgeni de içermektedir. Bunlardan sadece 4 ve 18 numaralı (kırmızı) hayvanlar erkektir. Bu şekilde belirlenen erkek üçlü transgenik farelere (örneğin Tet-On *Boris/Rosa rtTA/Protamin-Cre*) doksisisiklin ile gen indüksiyonu uygulandı.

4.2. Transgen Ekspresyonunun Doku Özgüllüğü

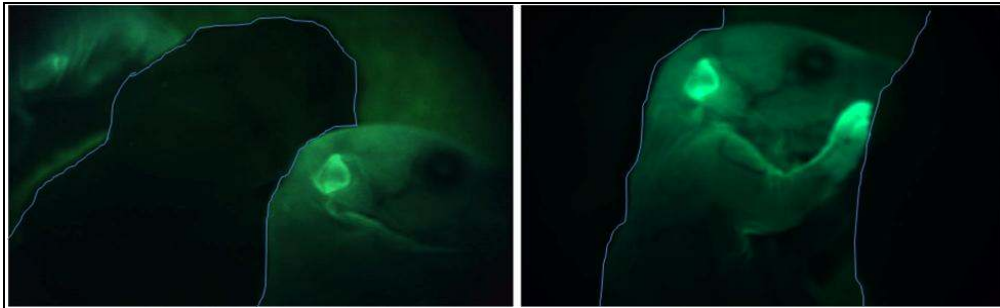
Boris ekspresyonunu doku özgün yapabilmek amacıyla, *Rosa 26* lokusu yerleşimli tetrasiklin-kontrollü transaktivatör proteinin (*rtTA*) bulunduğu ayrı bir transgenik soy ile çiftleştirmeler yapıldı. *rtTA*'ın fonksiyonel hale gelebilmesi için Cre rekombinazın bu lokusta yeniden bir düzenlenme yapması gerekmektedir. Dolayısıyla Cre rekombinazın testis özgü promoterlerin kontrolü altında yerleştirildiği *Synaptonemal Kompleks Cre* ve *Protamin Cre* transgenik hayvanlar kullanıldığı için, gendeki yeniden düzenlenme sadece testiste olmuştur. Testise özgü ekspresyon, floresan bir mikroskop kullanılarak üçlü transgenik farelerin farklı

dokularının GFP ekspresyonu açısından değerlendirilmesi ile çok net bir şekilde gösterildi (Şekil 4.4).

Cre rekombinaz erişkin testisinde gendeki yeniden düzenlenimi yaptığı için bütün sperm hücrelerinde fonksiyonel *rtTA* oluşumu gerçekleşmiştir. Bu nedenle, erişkinde sadece testiste görülen GFP ekspresyonu, yavru soylarda bütün dokularda görülebilecektir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. *Boris*, *Rosa rtTA* ve *Cre* genlerini taşıyan üçlü transgenik farelere ait karaciğer, testis, kas ve epididimis organlarının makroskopik görüntüsü. Sol panel ışık mikroskopik, sağ panel floresans filtrelerle elde edildi. Yeşil floresanın sadece testis, epididimis ve vasa deferenste (oklar) varlığına dikkat ediniz. Kullanılan promoterler testise özgü olduğu için karaciğer ve kas gibi diğer dokularda herhangi bir GFP ekspresyonu görülmemektedir.



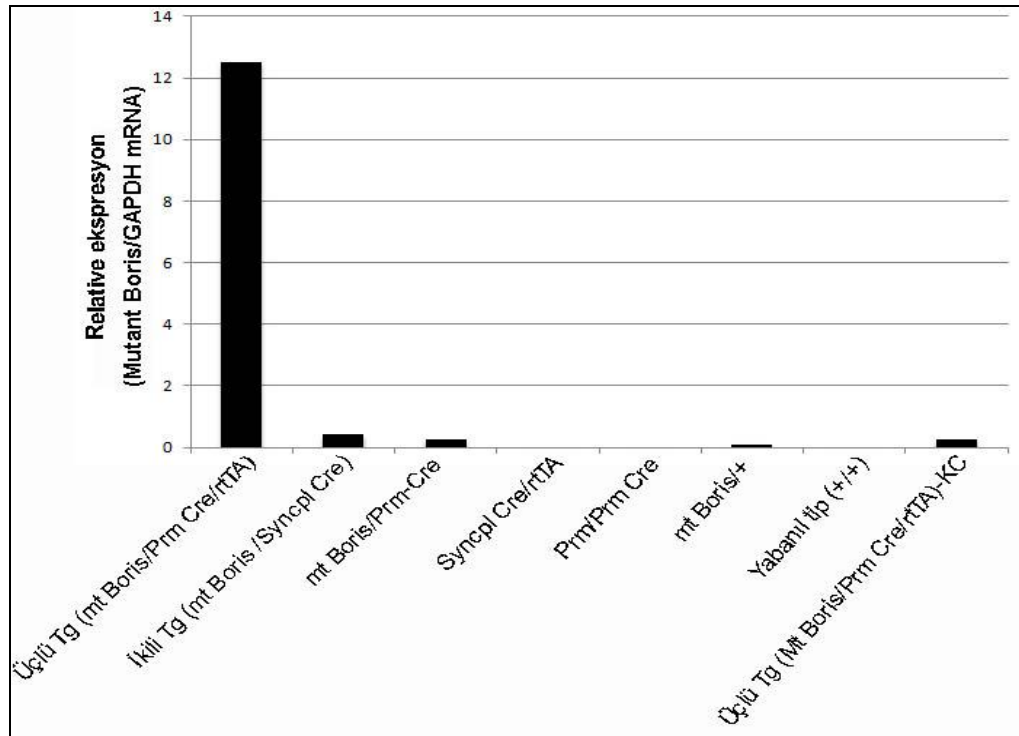
Şekil 4.5. Makroskopik olarak üçlü *Boris* transgenik fare yavrularına ait GFP ekspresyonu. Bu makroskopik şekillerde, GFP ekspresyonu görülen transgeni içeren bir yavru ve yanında ekspresyonun görülmediği iki ayrı fare yavrusu örneklenmiştir.

4.3. Testiste Ektopik *Boris* Transgen Ekspresyonu ve qRT-PCR

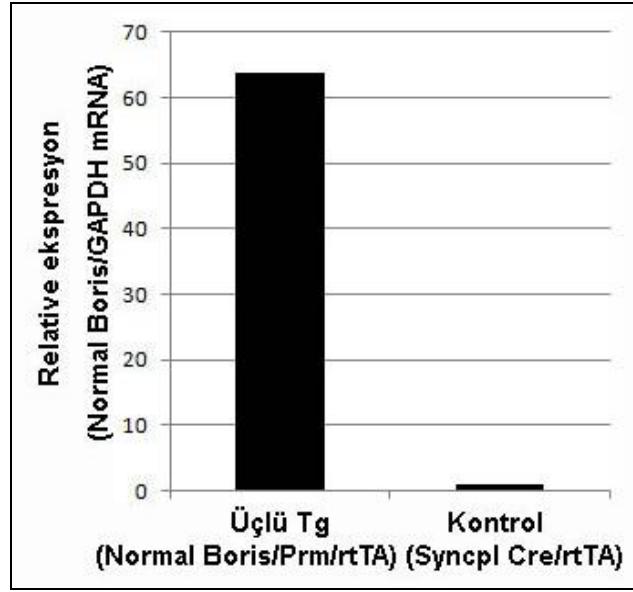
Üçlü transgenik farelerde doksisisiklin muamelesi ile ektopik gen indüksiyonu olduğunu doğrulayabilmek amacıyla, doksisisiklin ile muamele edilmiş üçlü transgenik farelerin testis örnekleri ile qRT-PCR uygulaması yapıldı. Bu amaçla izole edilen RNA örnekleri, öncelikle ters (revers) transkribe edildi. Daha sonra *Boris*'e özgü primerler kullanılarak amplifiye edilen cDNA'lar kantitatif olarak değerlendirildi. Kontrol grupları olarak qRT-PCR çalışmalarına, farklı genotiplere sahip ve gen indüksiyonunun yapılmadığı fareler de dahil edildi.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre, doksisisiklin muamelesi ile mutant *Boris* transgen RNA'sında farklı genotipteki kontrol hayvanlarına göre yaklaşık 10-12 kat artış görüldü (Şekil 4.6). Benzer şekilde normal *Boris* transgeni açısından ekspresyon artışı rapor edildi. Normal *Boris* transgen ekspresyonunda yaklaşık 60-65 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.7).

Testise ek olarak doksisisiklin ile muamele edilmiş üçlü transgenik farelerin karaciğer örnekleri ile qRT-PCR sonuçları karşılaştırıldığında, ektopik *Boris* overekspresyonunun sadece testise özgü olduğu ortaya konuldu (Şekil 4.6). Karaciğer örneklerindeki mutant veya normal *Boris* ekspresyonu diğer kontrol gruplarına göre herhangi bir farklılık göstermedi.



Şekil 4.6. Farklı fare genotiplerine ait testis örneklerinde, mutant *Boris* transgeni için qRT-PCR sonuçları. İçme suyunda doksisisiklin muamelesi ile mutant transgen ekspresyonunda yaklaşık 10-12 kat artış görüldü. Testiste görülen bu artışa kıyasla aynı hayvana ait karaciğer örneği (KC) kullanıldığında herhangi bir artışın olmaması, testise özgü gen overekspresyonu yapıldığını doğrulamaktadır. Tg:Transgenik. Not: Grafikteki son örnek karaciğerden diğerleri testis örneklerinden hazırlanmıştır.



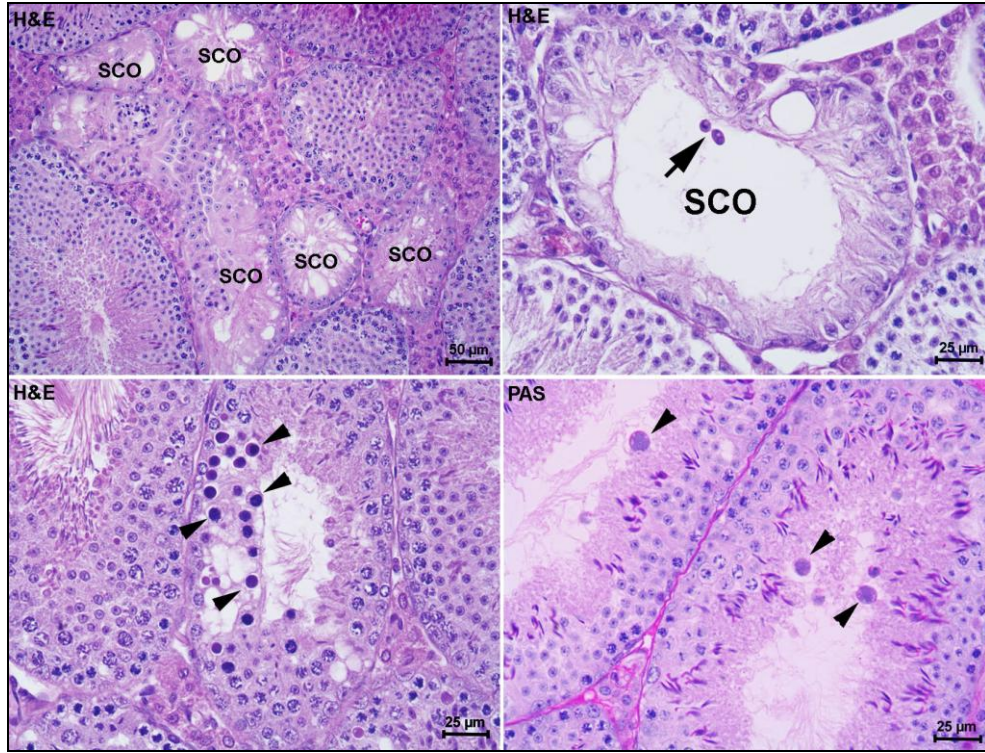
Şekil 4.7. Testiste normal *Boris* transgeni için qRT-PCR sonuçları. İçme suyunda doksisisiklin muamelesi ile kontrole göre yaklaşık 60-65 kat artmış mutant *Boris* transgen ekspresyonu gösterilmektedir. Tg:Transgenik.

4.4. *Boris* Transgenik Fare Testislerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

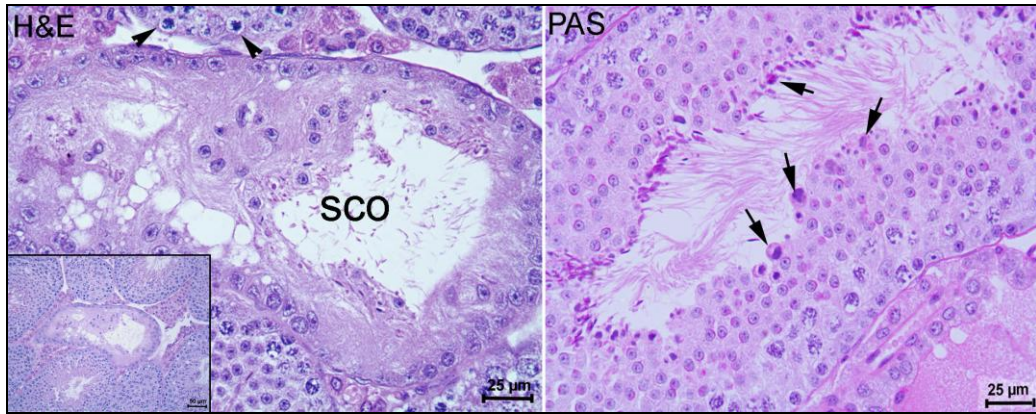
Ektopik *Boris* ekspresyonunun testisteki olası patolojik etkilerini ortaya koyabilmek için, parafin bloklardan elde edilen kesitlere Hematoksilen eozin ve Periyodik asit Schiff boyamaları yapıldı. Özellikle mutant transgenik fare soyunda bazı seminifer tübüllerde germinal hücre aplazisi olarak adlandırılan sadece Sertoli hücrelerinin bulunduğu tübüllerin görülmesi dikkat çekici oldu (Şekil 4.8). Normal *Boris* transgenik farelere ait testis kesitlerinde patolojik tübül yapıları izlendi (Şekil 4.9).

Her iki gruba ait testis kesitlerinde, lümene atılmış anormal görünümlü hücresel yapılar gözlemlendi. Özellikle normal *Boris* transgenik fare testisinde olmak üzere, gerek mutant gerekse normal *Boris* transgenik fare testis kesitlerinde yoğunlaşmış kromatin materyaline sahip spermatositler dikkat çekti. Bununla birlikte kesitlerde normal görünüme sahip tübüller de bulunmaktaydı.

Seminifer tübüllere ait intersitisyel alanlarda herhangi bir patoloji ile karşılaşmadı. Leydig hücreleri ve damar yapıları normal olarak gözlemlendi.



Şekil 4.8. Parafine gömülmüş mutant *Boris* transgenik fare testisine ait kesit. Sadece Sertoli hücreleri içeren (SCO) bozuk tübüllere dikkat ediniz. Ok ve ok başları lümene atılmış anormal hücreleri işaret etmektedir. H&E: Hemotoksilen-eozin boyaması; PAS: Periyodik asit Schiff boyaması

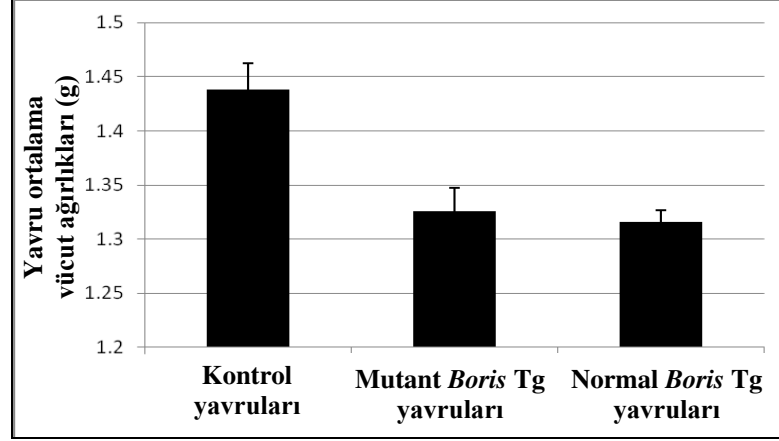


Şekil 4.9. Parafine gömülmüş normal *Boris* transgenik fare testisine ait kesit. Mutant olan farelerde olduğu gibi sadece Sertoli hücreleri (SCO) ve lümene atılmış anormal hücreleri (oklar) içeren tübüller görüldü. Ok başları yoğunlaşmış kromatine sahip spermatositleri göstermektedir. H&E: Hemotoksilen-eozin boyaması; PAS: Periyodik asit Schiff boyaması.

4.5. *Boris* Transgenik Fare Yavrularının Doğum Ağırlıkları

Doksisisiklin ile gen indüksiyonu yapılan *Boris* transgenik hayvanlar, yabancıl tip dişi fareler ile çiftleştirildi. Gebelik boyunca dişiler takip edildi ve doğumun ilk günü doğan yavruların vücut ağırlıkları tartılarak kaydedildi ve kontrol grupları ile karşılaştırıldı. Sonuçlarımıza göre doksisisiklin ile muamele edilmiş mutant ($1.326 \pm$

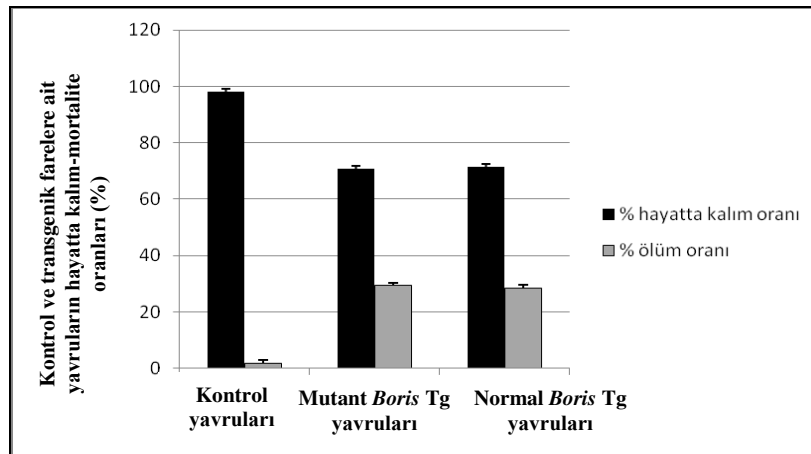
0.02g) ve normal ($1.316 \pm 0.01g$) transgenik fare yavrularının vücut ağırlıkları, kontrol gruplarına ($1.438 \pm 0.02g$) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü ($P = <0.001$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Kontrol (n=87) ve transgenik (Tg) hayvanlara ait yavru vücut ağırlıkları. Mutant (n=82) ve normal (n=317) *Boris* transgenik fare yavrularının, kontrol yavrularına kıyasla daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğu görülüyor ($P = <0.001$).

4.6. *Boris* Transgenik Fare Yavrularının *in vivo* Hayatta Kalım Oranları

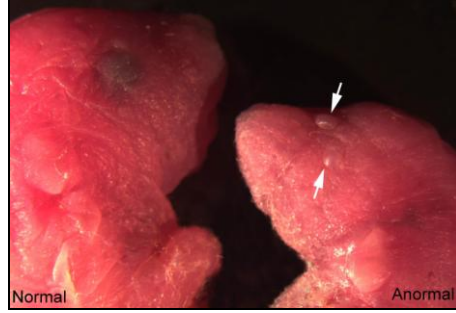
Doğan yavruların vücut ağırlıklarına ek olarak, yaşamlarının ilk haftası boyunca hayatta kalım oranları (viabilite) hesaplandı. Kontrol (n=88), mutant (n=103) ve normal (n=328) *Boris* transgenik fare yavruları için postnatal hayatın ilk haftasındaki ortalama viabilite yüzdeleri, sırasıyla 98.09 ± 1.28 ; 70.65 ± 9.70 ve 71.43 ± 3.75 olarak bulundu. Bulgularımıza göre kontrol grubu ile *Boris* transgenik fare yavruları karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmış postnatal hayatta kalım oranı gözlemlendi ($P = <0.001$). Dolayısıyla ektopik *Boris* ekspresyonu artmış mortalite oranı ile ilişkili bulundu (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Kontrol ve *Boris* transgenik yavruların postnatal hayatın ilk haftasına ait ortalama hayatta kalım (viabilite) ve ölüm (mortalite) oranları. Transgenik (Tg) fare yavrularında ortalama hayatta kalım yüzdesi kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş göstermektedir. Ortalama ölüm oranı ise paralel bir şekilde artmış görülüyor ($P = <0.001$).

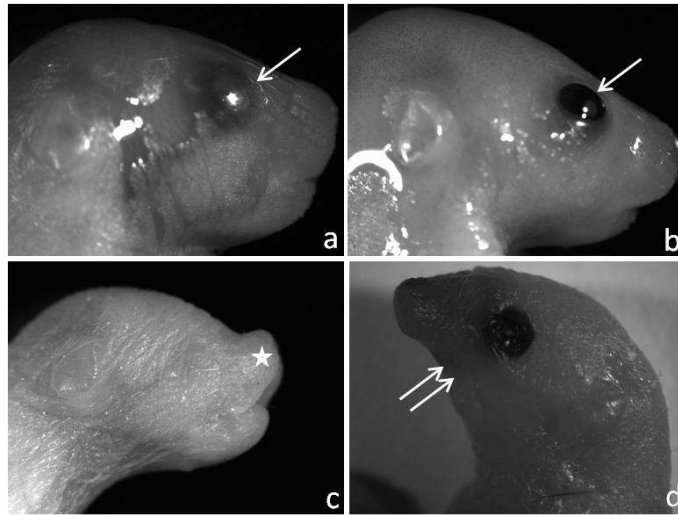
4.7. Patolojik Görünümlü *Boris* Transgenik Fare Yavruları

Doksisiklin ile muamele edilmiş, mutant *Boris* transgenik fare yavrularının detaylı değerlendirmesinde, postnatal hayatın ilk 24 saati içerisinde, transgene sahip yavruların öldüğü gözlemlendi. Bu yavruların makroskopik olarak analizinde, özellikle beyin ve yüz gelişiminde gelişim geriliği gözlemlendi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Doksisiklin muamelesi sırasında mutant *Boris* transgenik fareler ile çiftleştirmelerden oluşan normal ve anormal görünümlü yavrular. Kraniyumun neredeyse olmadığı küçük bir baş yapısı ile rudimenter gözlere (oklar) sahip anormal bir yavru (sağ tarafta) ile normal fenotip ve genotipe olan kardeşi (sol tarafta) görülmektedir.

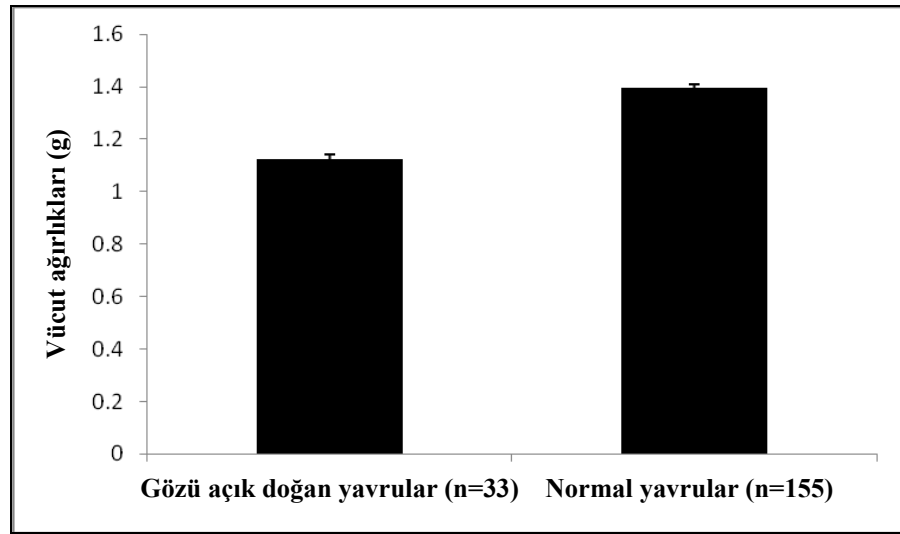
Doksisiklin uygulamasındaki normal *Boris* üçlü transgenik farelerin çiftleştirmelerinde de anormal yavrular oluştu. Genotipleme yapılarak transgeni kesinlikle taşıdığı tespit edilen normal *Boris* transgenik fare yavrularının, tipik olarak göz kapağı füzyonu olmadan, gözleri açık olarak dünyaya geldikleri ve postnatal hayatın ilk 12 saati içerisinde öldükleri görüldü (Şekil 4.13). Mutant gruptan daha belirgin olarak hemen hemen çoğu organda gelişim geriliği gözlemlendi.



Şekil 4.13. Doksisiklin ile muamele sırasında normal *Boris* transgenik farelerin yabani (vahşi) tip dişi fareler ile çiftleştirilmesi ve dişinin gebelik boyunca doksisiklin ile muamelesine devam edilmesi durumunda anormal yavru fenotipi gözlemlendi. a) Kapalı göz kapağı (ok) ile normal yavru, b) Açık göz kapağı (ok) ile anormal yavru, c) Gözün olmadığı, ucu kalkık, basık burun (yıldız), d) Çenenin olmadığı (ikili ok) anormal yüz özellikleri ve açık göz yapısına sahip yavru.

4.7.1. Patolojik Görünümlü *Boris* Transgenik Fare Yavrularının Doğum Ağırlıkları

Patolojik olarak gözü açık şekilde doğan yavrular, normal görünümlü kardeşleri ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde, daha düşük vücut ağırlıklarına sahipti ($P = <0.001$). Gözü açık olarak dünyaya gelen yavrular ($n=33$), ortalama 1.124 ± 0.018 g vücut ağırlığına sahip iken, bu yavruların normal görünümlü ve transgeni içermeyen kardeşleri ($n=155$), ortalama 1.394 ± 0.013 g vücut ağırlığına sahipti (Şekil 4.14). Genotipleme ile doğrulanmış fenotipi taşıyan yavrular ile kontrol yavrular arasında yaklaşık %20 civarında bir fark olduğu ortaya konuldu.

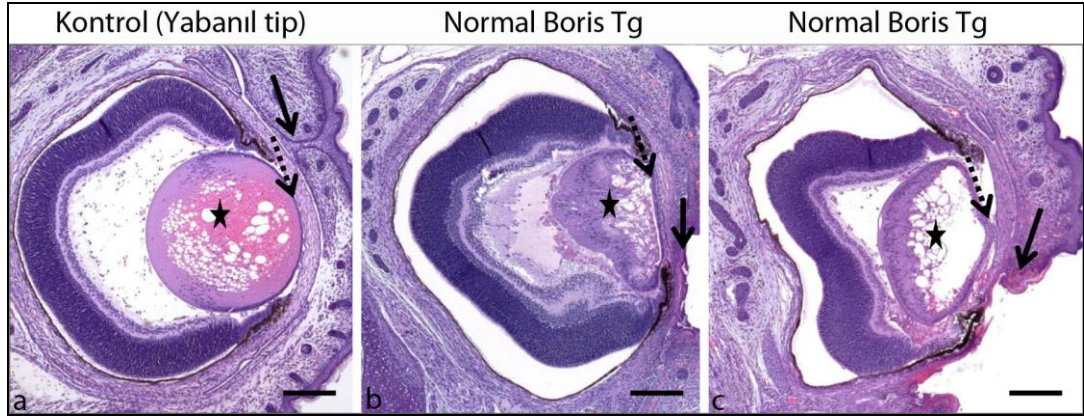


Şekil 4.14. Kontrol ve gözü açık doğan transgenik yavruların vücut ağırlıkları. Gözü açık olarak doğan ve postnatal hayatın ilk gününde kaybedilen yavrular, normal genotip ve fenotipe sahip kardeşlerine göre daha düşük vücut ağırlıklarına sahiptir ($P = <0.001$).

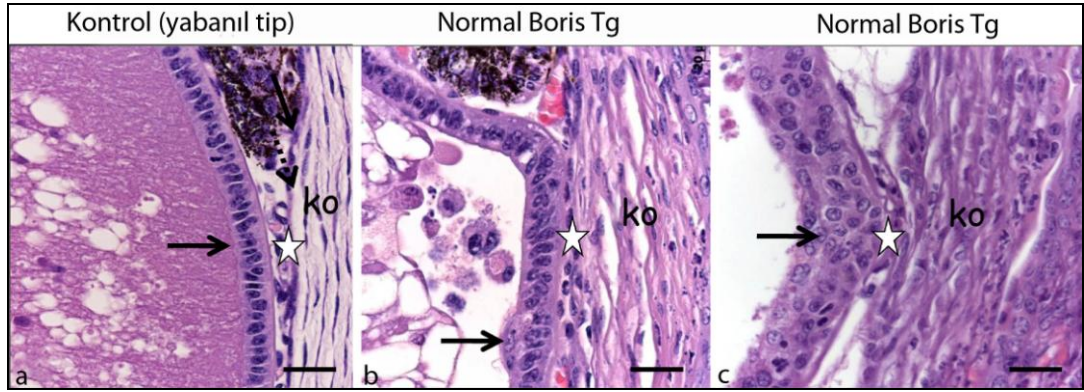
4.7.2. Patolojik Görünümlü *Boris* Transgenik Fare Yavrularının Histopatolojik Analizi

Doksisiklin uygulamasındaki normal *Boris* üçlü transgenik farelerin çiftleştirmelerinden oluşan fenotipi taşıyan yavrular makroskopik değerlendirmenin yanı sıra histolojik olarak değerlendirildi.

Yavruların tipik olarak gözlerinin açık olarak dünyaya gelmesiyle paralel bir şekilde, gözde lens vezikül oluşumu ve gelişiminin bozuk olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15). Anterior lens kapsülünün posteriyor korneaya adhezyonu (yapışması) nedeniyle ciddi nükleer ve posteriyor polar katarakt olduğu tespit edildi (Şekil 4.16). Anterior lens epiteli düzensizdi ve primer fibrillerde dejenerasyon görüldü. İlave olarak, Desement membranının yokluğu gözlemlendi.

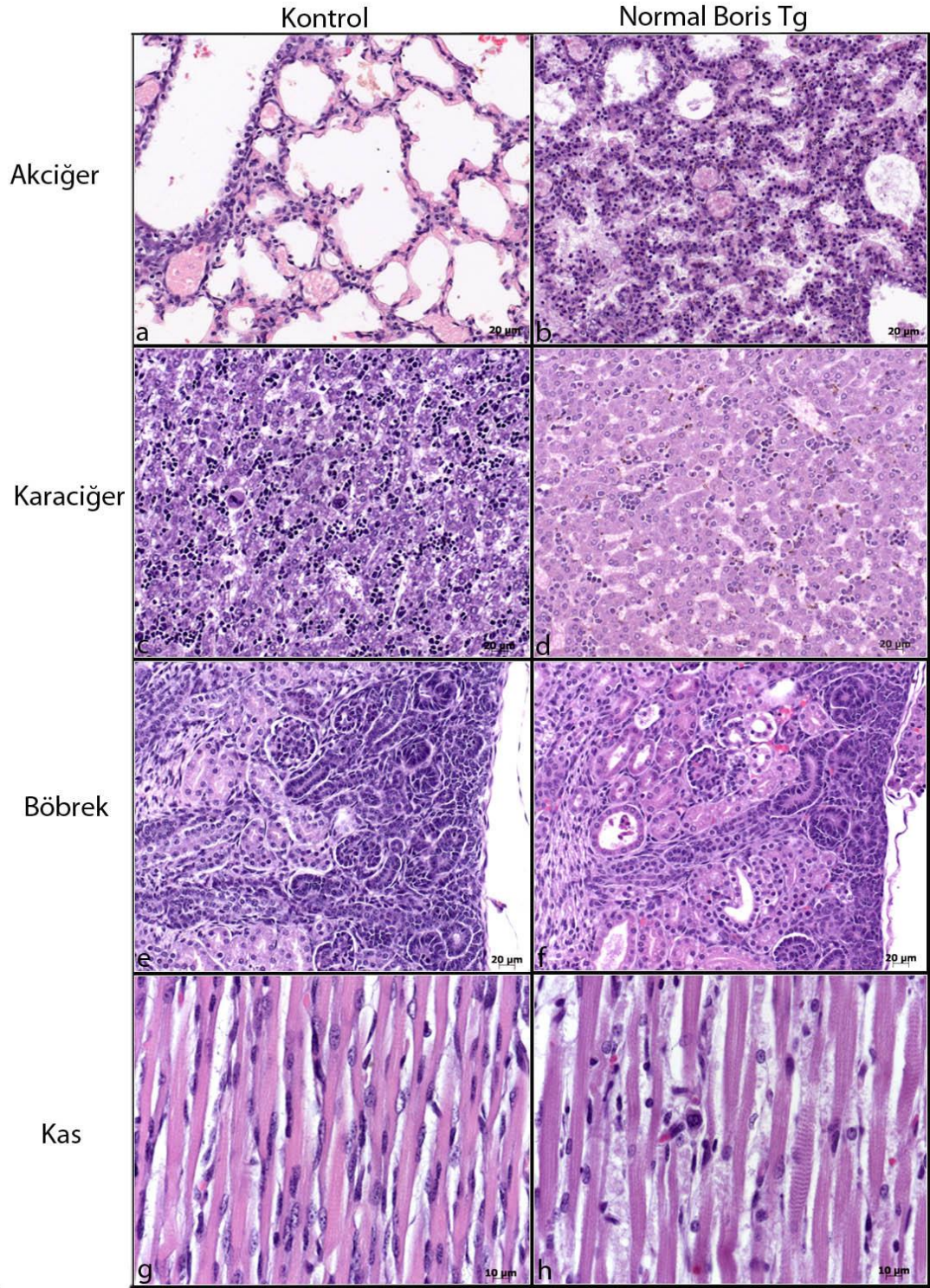


Şekil 4.15. Kontrol (a) ve normal *Boris* transgenik fare yavrularında (b,c) oküler fenotip. *Boris* transgenik fare yavrularında, primer lens fibrilleri, lens vezikülünü (asteriks) dolduramamaktaydı. Anterior lens kapsülü ile kornea (noktalı ok) arasında adhezyonlar (yapışmalar) görüldü. Göz kapakları açıktı (ok).



Şekil 4.16. Normal *Boris* transgenik fare yavrusunda anterior lens-kornea defekti (b,c). Korneal stroma ve endotelyum normal olarak gelişmemişti ve sonuçta anterior lens ve kornea (ko) arasında adhezyonlar (asteriks) görüldü. Kontrole kıyasla (a), anterior lens epiteli, *Boris* yavrularında anormal olarak proliferatif özellikte görüldü (ok). Tg: Transgenik.

Gözdeki patolojiye ek olarak, akciğer, karaciğer, böbrek ve kas gibi birçok organda gelişim geriliği gözlemlendi (Şekil 4.17).

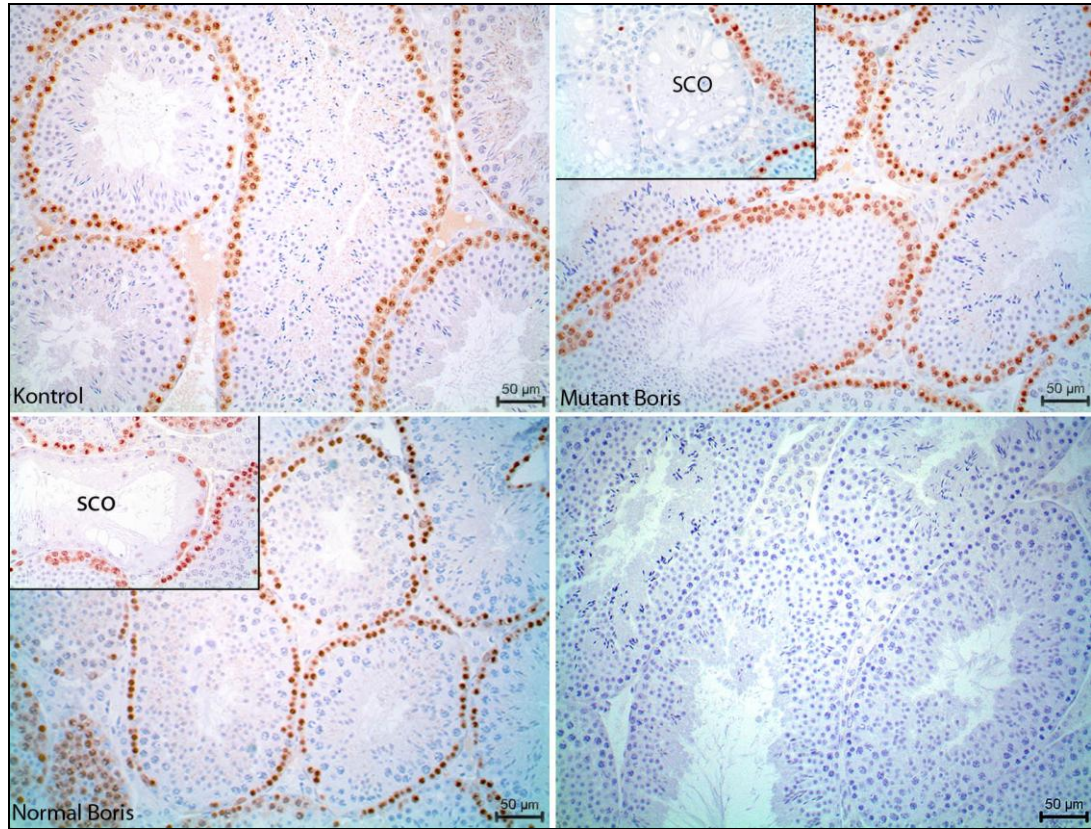


Şekil 4.17. Kontrol (a,c,e,g) ve fenotipe sahip normal *Boris* transgenik fare yavrularında (b,d,f,h) görülen organ patolojileri. b) *Boris* fare yavrularında, akciğerler az gelişmişti. d) Karaciğer, soluk renkte ve daha az hematopoetik prekürsör (öncül) hücre içerdi. f) Böbrekler, az gelişmiş bir korteks yapısına sahipti ve bazılarında debris içeren çok sayıda dilate tübül görüldü. Böbrek gelişiminde kantitatif bir anormallik mevcuttu. h) Kas yapısı miyofibril dejenerasyonu ve az sayıda nükleus ile hipoplastik özellikteydi. Tg: Transgenik.

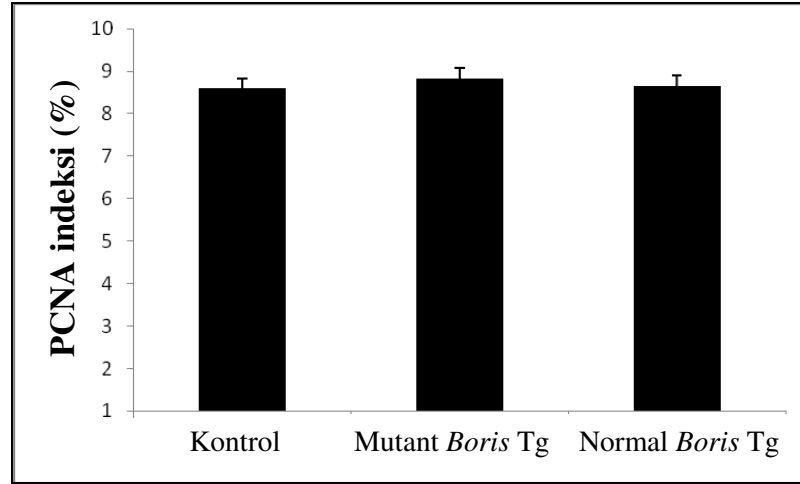
4.8. *Boris* Transjeni ve Testis Hücre Proliferasyonu İlişkisi

Boris'in kanser-üreme hücre hattı antijen ailesi üyesi olması nedeniyle, erişkin transgenik fare testisinde PCNA antikorları kullanılarak ektopik *Boris* ekspresyonunun proliferasyon ile ilişkisi olup olmadığı araştırıldı (Şekil 4.18).

Her slaytta tesadüfi alanlar sayılarak PCNA indeksi çıkartıldı. PCNA antikorları ile seminifer tübüllerin bazalindeki spermatogoniya ve spermatositlerin boyandığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerin bazalindeki hücreler, DNA sentezinin gerçekleştiği aktif hücreler olduğu için, sadece bu hücreler değerlendirildi. Elde edilen PCNA indeksleri toplanarak değerlendirilen toplam seminifer tübül sayısına bölündü. Ortalama PCNA indeksleri kullanılarak, kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik testis örnekleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.19) ($p>0.05$).



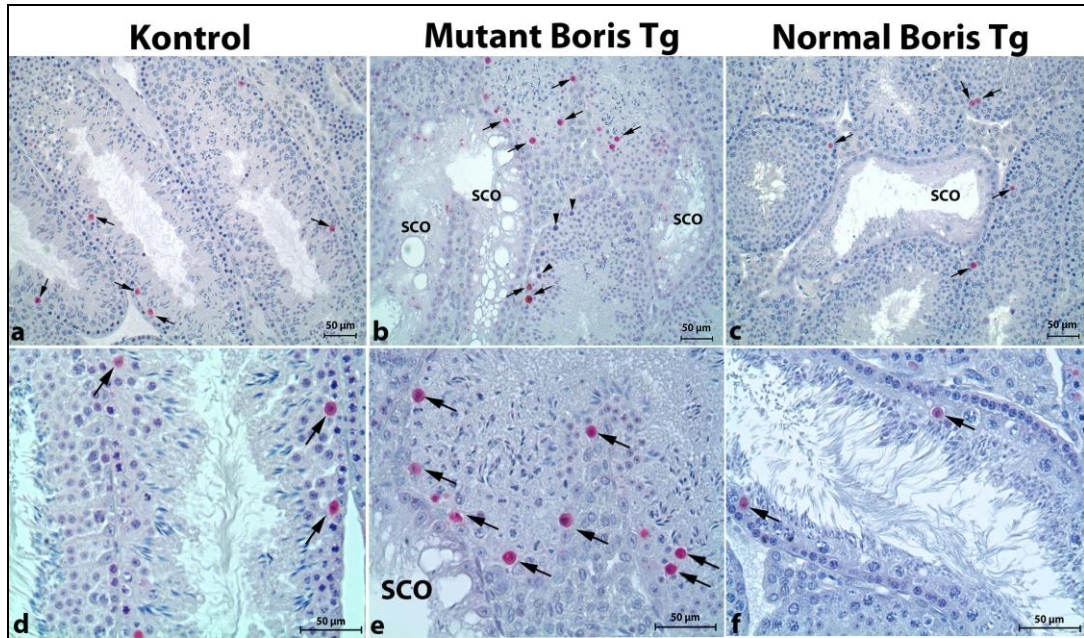
Şekil 4.18. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik fare testis kesitlerine ait immunohistokimyasal PCNA boyanmaları. Sağ alt panel negatif kontrolü göstermektedir. Seminifer tübüllerin bazalındaki spermatogoniya ve spermatositlerdeki PCNA boyanmaları (kahverengi) dikkat çekmektedir. İnsetler, patolojik tübül alanlarındaki PCNA ekspresyonlarını göstermektedir.



Şekil 4.19. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik (Tg) fare testislerine ait ortalama % PCNA indeksi. Kontrol ve *Boris* transgenik testis kesitlerinde PCNA indeksleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

4.9. *Boris* Transjeni ve Apoptoz İlişkisi

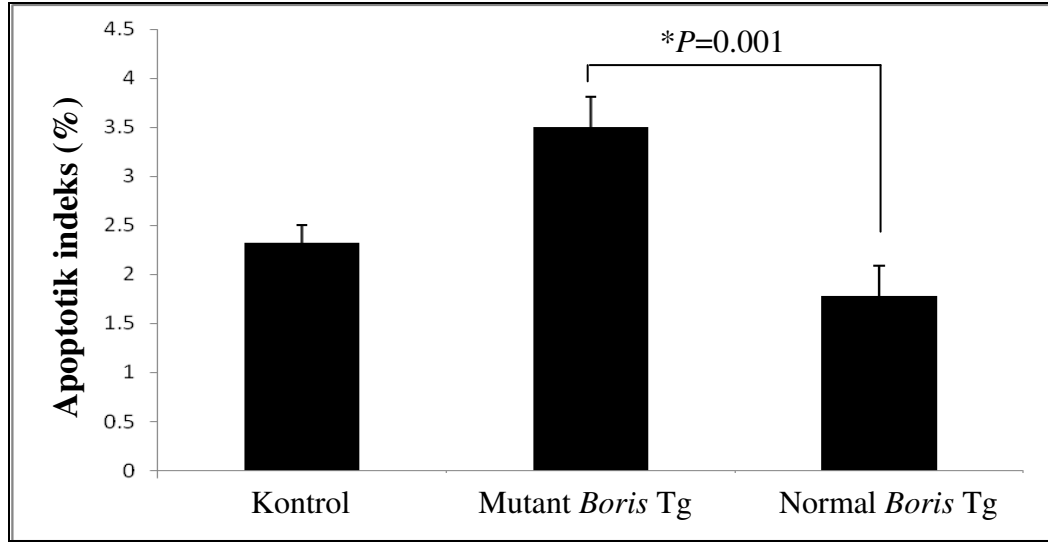
Boris transgenine sahip farelerin testis kesitleri üzerinde TUNEL boyanması gerçekleştirildi (Şekil 4.20) ve TUNEL pozitif hücre oranları hesaplandı (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.21). Mutant ve normal *Boris* transgenik fare testislerindeki apoptotik hücre yüzdeleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunurken ($P = 0.001$), kontrole kıyasla her iki grup arasında herhangi bir fark tespit edilemedi (Şekil 4.21).



Şekil 4.20. Kontrol (a,d), mutant (b,e) ve normal (c,f) *Boris* transgenik (Tg) fare testis kesitlerine ait TUNEL boyanmaları. TUNEL pozitif apoptotik hücreler (oklar) kırmızı renkte izlenmektedir. SCO:Sadece Sertoli hücrelerinin olduğu tübüller. Ok başları anormal görünümlü hücreleri işaret etmektedir.

Çizelge 4.1. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik (Tg) fare testislerine ait ortalama apoptotik hücre yüzdeleri belirtilmiştir.

	Ortalama %
Kontrol	2.317 ± 0.184
Mutant <i>Boris</i> Tg	3.503±0.310
Normal <i>Boris</i> Tg	1.783±0.305



Şekil 4.21. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik (Tg) fare testislerine ait ortalama apoptotik hücre yüzdeleri şematize edilmiştir.

4.10. *Boris* Transgeninin Erkek Fertilitesi Üzerindeki Etkisi

Ektopik *Boris* ekspresyonu ve fertilite ilişkisi hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak değerlendirildi.

4.10.1. *Boris* Transgeninin Erkek Fertilitesi Üzerindeki *in vivo* Etkisi

In vivo eşleştirmeler yapıldığından önceki bulgulardan da anlaşılacağı üzere, gerek mutant gerekse normal *Boris* transgen ekspresyonunun fertilite üzerinde görünürde herhangi bir etkisinin olmadığı ve bu farelerin fertil olduğu tespit edildi.

4.10.2. *Boris* Transgenik Fare Spermeleri ile *In Vitro* Fertilizasyon (IVF)

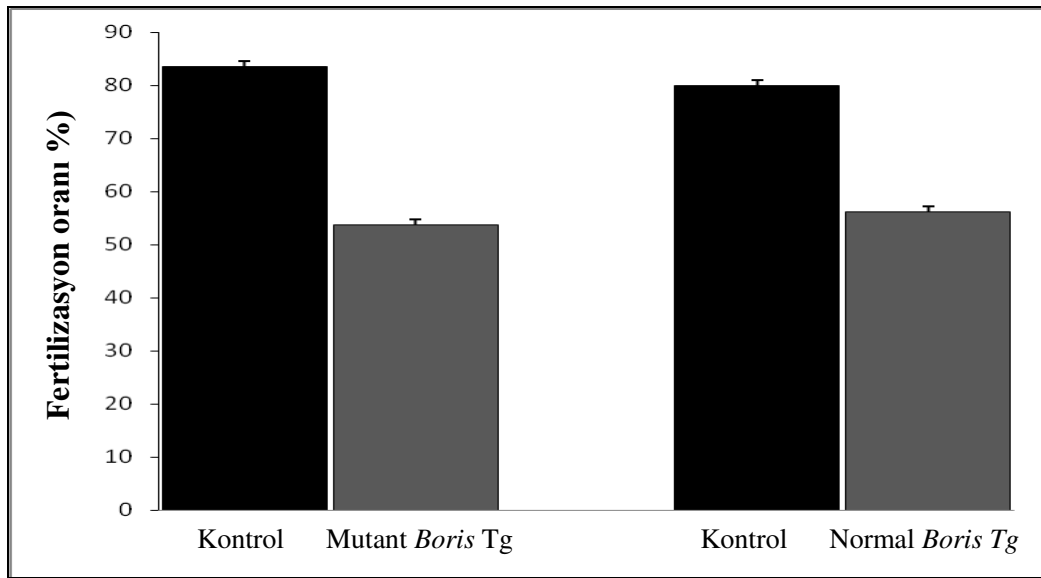
Fertilizasyon kapasitesi *in vitro* yapılan deneylerle de test edildi (n=5264 ovosit). Doksisisiklin ile muamele edilmiş *Boris* üçlü transgenik fareler sakrifiye edildikten sonra, epididimis ve vasa deferens kanallarından spermatozoa elde edildi. Benzer şekilde kontrol erkeklerinden de sperm örnekleri toplandı ve eş zamanlı olarak her gruba ait sperm örnekleri ile IVF deneyleri gerçekleştirildi. Fertilizasyon oranı, *in vitro* kültürde 24 saat sonra 2 hücreli aşamaya geçen hücre oranı olarak değerlendirildi.

Aynı anda prosedür uygulanan kontrol ve *Boris* transgenik fare spermeleri kullanılarak yapılan IVF çalışmalarında kontrollere kıyasla azalmış fertilizasyon

oranı dikkat çekici oldu (Çizelge 4.2. ve Şekil 4.22). Bununla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Çizelge 4.2. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik (Tg) fare spermleri ile yapılan IVF deneylerine ait sonuçlar görülmektedir.

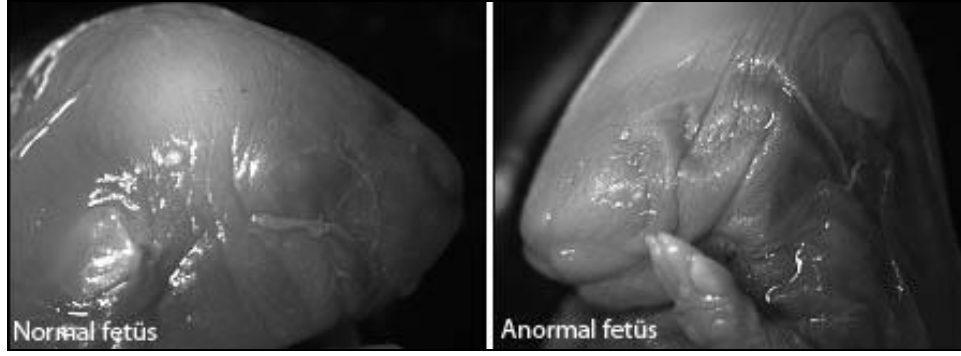
	Grup 1		Grup 2	
	Kontrol (n= 1146)	Mutant <i>Boris</i> Tg (n= 1070)	Kontrol (n= 1352)	Normal <i>Boris</i> Tg (n= 1696)
Fertilizasyon oranı (%)	83.6±3.63	53.7±12.47	79.875±5.91	56.125±12.93



Şekil 4.22. Kontrol gruplarına kıyasla mutant ve normal *Boris* transgenik (Tg) fare spermlerine ait ortalama % fertilizasyon oranları.

4.10.3. *Boris* Transgenik Farelerin Embriyo Transfer Sonuçları

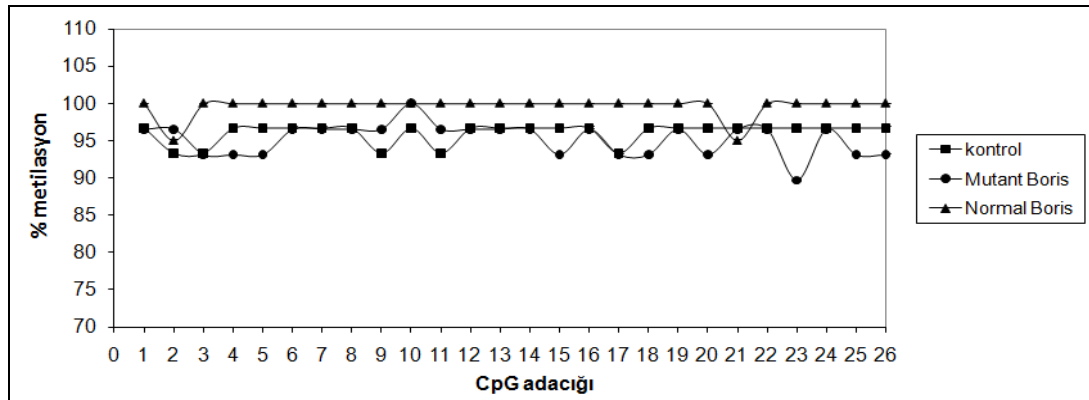
Her gruptan IVF sonucu elde edilen 2 hücreli embriyolar, vazektomize erkek farelerle çiftleştirilmiş embriyonik 0.5.günde olan yalancı gebe dişi oviduktlarına transfer edildi (n=157 embriyo). Transfer edilen potansiyel transgenik fare embriyolarının genel olarak implantasyon ve ilerleyen gebelik aşamalarını başarılı bir şekilde geçtiği gözlemlendi. Bununla birlikte, *Boris* transgenik fare embriyolarının ovidukta transferi sonrasında, normal görünümlü yavruların yanı sıra, anormal görünümlü yavru gelişimi de rapor edildi (Şekil 4.23). Kontrol farelere ait spermlerin kullanıldığı ve dişilerin gebelik boyunca doksisisiklin ile muamele edilmediği kontrol grubundan dünyaya gelen yavru oranı, yaklaşık %80 olarak hesaplandı. Bununla birlikte doksisisiklin ile muamele edilmiş mutant ve normal *Boris* transgenik fare spermlerinin kullanıldığı ve dişinin gebelik boyunca doksisisiklin ile muamele edildiği deney gruplarından doğan yavru oranları açısından bir düşüş kaydedildi. Ortalama doğan yavru yüzdeleri mutant ve normal *Boris* transgenik fareleri için sırasıyla % 31.25 ve % 34.54 idi.



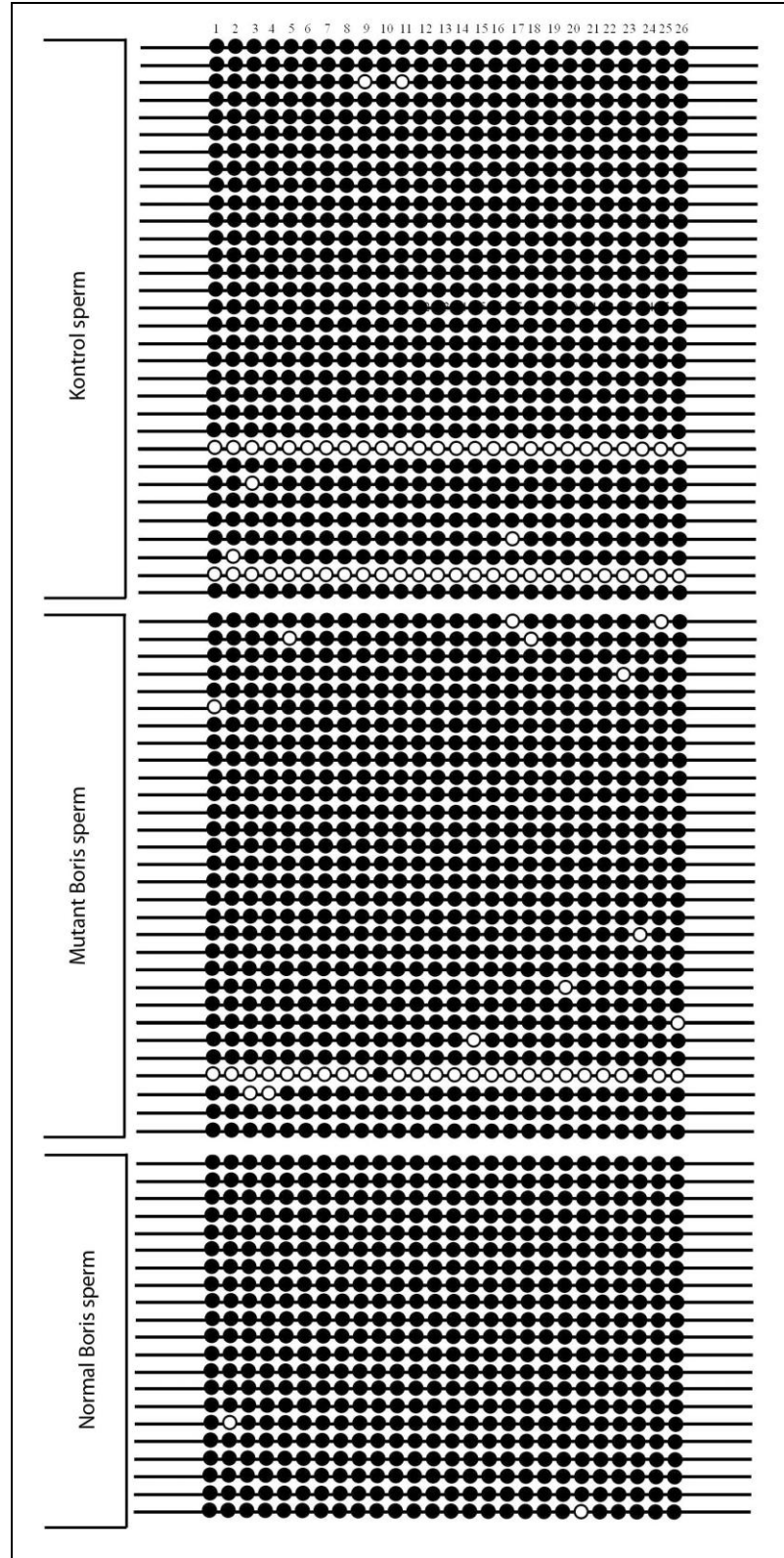
Şekil 4.23. Taşıyıcı dişi, normalde doğum yapması gereken tarihte gebeliğini tamamlayamadı. Ötanazi ve diseksiyon sonrasında, kontrol hayvanlara (sol taraf) kıyasla bazı patolojik fetüslerin küçük bir baş yapısına ve kısa ön uzuvlara sahip olduğu (sağ taraf) görüldü.

4.11. Yetişkin *Boris* Transgenik Farelerde *H19* DMD Metilasyonu

26 adet CpG adacığı içeren *H19* DMD bölgesinin metilasyon analizleri, bisülfıt sekanslama yöntemi ile gerçekleştirildi. Bu yöntem, DNA'nın bisülfıt ile inkübe edilerek, metile olmamış bütün sitozinlerin urasile dönüşümü, subklonlama ve sonrasında sekans analizlerini içermektedir. Bisülfıt ile muamele edilmiş DNA'da *H19* DMD bölgesinin sekans analizleri, 26 CpG alanlarının her birindeki sitozin dizilerinin metile olup olmadığını gösterdi. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik farelerden elde edilen sperm örnekleri ile yapılan çalışmalarda, *H19* DMD CpG alanlarının total metilasyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($p = <0.001$) (Şekil 4.24). Sekans analizlerine göre her bir koloniye ait metilasyon durumu Şekil 4.25'de sunulmuştur. Kontrol örneklerinde 2418 CpG adacığı değerlendirilmiştir. Mutant ve normal *Boris* transgenik sperm örneklerinde ise sırasıyla 2262 ve 1040 adet CpG adacığı incelenmiştir.



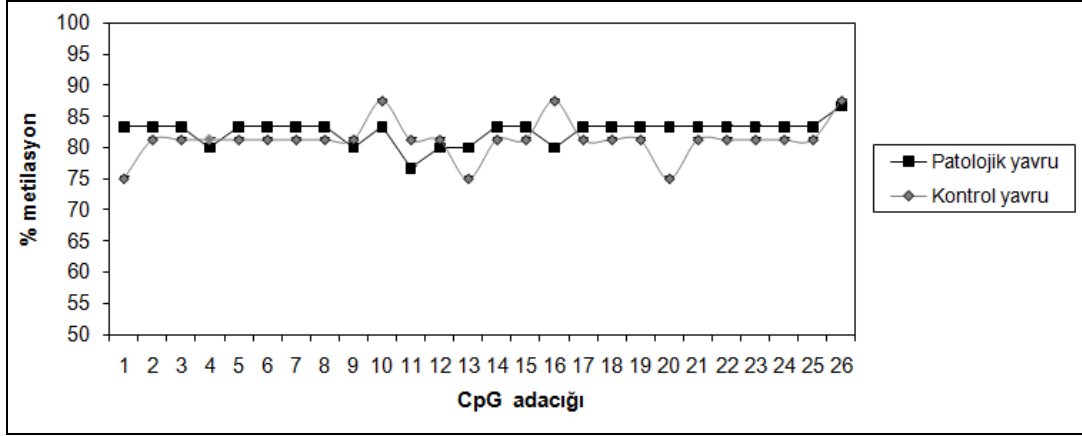
Şekil 4.24. Kontrol, mutant ve normal *Boris* üçlü transgenik fare spermelerine ait 26 adet CpG adacığının ortalama metilasyon dağılımı. Kontrolle kıyasla normal ve mutant *Boris* transgenik fare spermeleri arasında fark bulunmaktadır ($p = <0.001$).



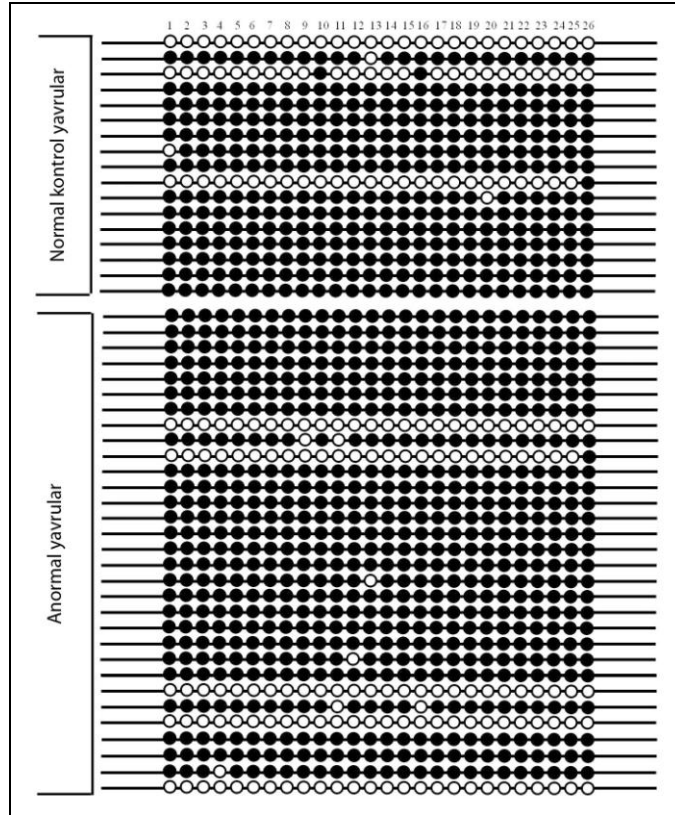
Şekil 4.25. Kontrol, mutant ve normal *Boris* transgenik fare spermlerine ait her bir kolonide değerlendirilen 26 adet CpG adacığının metilasyon durumu. Her satır bir koloniyi göstermektedir. Siyah daireler metile, beyaz daireler metile olmamış anlamında kullanılmıştır.

4.12. *Boris* Transgenik Fare Yavrularında *H19* DMD Metilasyonu

Normal ve anormal olarak doğan yavrulardan elde edilen kuyruk DNA'sı kullanılarak yapılan deneylerde, *H19* DMD CpG alanlarında total metilasyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak fark bulunmuştur ($P = 0.011$) (Şekil 4.26 ve Şekil 4.27).



Şekil 4.26. Kontrol ve anormal *Boris* üçlü transgenik fare yavrularına (normal *Boris* transgenik) ait kuyruk DNA'sı örneklerinde 26 adet CpG alanının ortalama metilasyon yüzdesi görülüyor.



Şekil 4.27. Kontrol ve anormal *Boris* üçlü transgenik fare yavrularına (normal *Boris* transgenik) ait kuyruk DNA'sı örneklerinde her bir koloninin değerlendirilen 26 adet CpG adacıklarının metilasyon durumu. Her satır bir koloniyi göstermektedir.

TARTIŞMA

Gen ekspresyonlarının epigenetik olarak düzenlenmesi, DNA metilasyonu, çeşitli histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden modellenmesi gibi yapı ve fonksiyon arasında karşılıklı etkileşimleri gerektirmektedir. Etkileşim içindeki bu sistemlerden biri ya da birkaçının bozukluğu, genlerin ekspresyonlarında uygun olmayan durumlara neden olmakta ve kromozomal kararsızlık, zihinsel gerilik ve kanser gibi farklı patolojilerin gelişmesine neden olabilmektedir. Dolayısıyla genomdaki özgün bir lokusta devam eden süreçlerin doğru bir şekilde idame ettirilmesi, insan gelişimi ve yaşamı için kritik önem taşımaktadır.

Tez çalışmamızda, genetik mühendisliği teknikleriyle *Boris* gen ekspresyonunun değiştirildiği fareler üzerinde çalışmalar gerçekleştirdik. Gen indüksiyonunun yapılabildiği özel transgenik hayvan modelleri oluşturarak; a) *Boris*'in normal spermatogenez; b) erkek fertilitesine ilişkin rolünü (*in vivo* ve *in vitro*); c) fetal büyüme ve yaşayabilirlik üzerindeki etkilerini; d) spermatozoa ve bir sonraki jenerasyonda, *H19/Igf2* gibi önemli imprinting genlerinde doğru metilasyon imprintlerinin oluşmasındaki olası rolünü araştırdık.

BORİS, çok fonksiyonlu bir DNA bağlanma proteini olan CTCF proteinin paraloğudur [30]. CTCF, promotor represyonu ya da aktivasyonu, izolator elementlerin oluşturulması ve fonksiyonel olarak allel spesifik metilasyon işaretlerinin okunması gibi birçok önemli olayda görev almaktadır [37, 177, 178]. CTCF'in, DNA metilasyonu, üst düzey kromatin yapısı ve soya özgü gen ekspresyonları arasındaki etkileşimleri düzenleyerek, epigenetik sistemin kalıtılabilir bir bileşeni olabileceğini ileri süren çalışmalar bulunmaktadır [178].

BORİS ve CTCF benzer yapıda olan 11 adet çinko-parmak DNA bağlanma domeynine sahiptir [30]. Genomik olarak sırasıyla 20q13.2 ve 16q22.1 kromozomlarında yerleşiktirler. Çinko-parmak yapılarını kodlayan ekzonların, her iki protein arasında benzer bir şekilde düzenlenimi, memeli evrimi boyunca CTCF'in bu ekzonlarının, çevresindeki bölgeler ile birlikte dublike olduğunu ve farklı bir kromozoma transpose olduğunu akla getirmektedir [30]. Bununla birlikte her iki protein, amino ve karboksi uçlarının farklı olması ile birbirinden ayrılır. Bu farklılık, BORİS ve CTCF'in aynı DNA alanlarına bağlanabileceğini fakat farklı fonksiyonlar gösterebileceğini ifade etmektedir.

CTCF'in hemen hemen bütün dokularda ubikütöz olarak ekspresyonuna karşılık, BORİS normal koşullar altında, memeli testisindeki spesifik hücrelerde ekspre olmaktadır. İlginç olarak CTCF ekspresyonunun vücutta sadece bu hücrelerde olmaması dikkat çekicidir. Dolayısıyla her iki protein arasındaki rekabet, BORİS'in sınırlı ekspresyon tarzı ile kısmen de olsa engellenmiştir. Gerçekten de

DNA metilazdan yoksun bir hücre modelinde, Sun ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları bir çalışmada, her iki proteinin eşit oranda mevcudiyeti durumunda rekabetin olabileceği işaret edilmektedir [145]. Bu durum, bazı kanser hücrelerinde gerçekleşiyor olabilir; çünkü germ hücreleri ve kök hücrelere [32] ek olarak BORİS ekspresyonu, özgün olarak kanser hücrelerinde tanımlanmaktadır [149, 153-155].

İşte BORİS ve CTCF'in, benzer DNA bağlanma yapılarına sahip olmaları bilgisinden yola çıkarak, BORİS'in CTCF'in rol oynadığı olaylarda, özellikle testiste erkek üreme hattının metilasyon paterninin yeniden düzenleniminde rol oynayabileceği ileri sürülebilir [30]. Bu anlamda *Boris*'i daha iyi karakterize edebilmek amacıyla tez çalışmamızda, tetrasiklin ile indüklenebilir tarzda iki farklı transgenik hayvan modeli oluşturduk. Transgenik hayvan modellerimizin ilkinde, mutant *Boris* transgeni için uygun konstrakt dizaynı yapıldı. *Boris* proteininin, merkezi 11 çinko parmak domeynini koruyup, amino terminal domeyninin büyük bir kısmını kaybedecek şekilde klonlanması gerçekleştirildi. Bu şekilde elde edilen değişmiş proteinin, hedef dizilere bağlanabileceği fakat normal fonksiyonlarını göstermede yeteneksiz olacağı fikrini ileri attık. Mutant *Boris* transgenik modelimiz için diğer önemli bir yaklaşımımız ise, değişime uğramış *Boris*'in, endojen *Boris* ile rekabete girebileceği ve bu durumun *Boris* gen ürünlerinde fonksiyonel kayıp ile sonuçlanabileceği hipotezi oldu. İndüksiyon sonrasında erişkin testis kesitlerinin histolojik analizinde, özellikle mutant grupta, germ-hücre aplazisi (sadece Sertoli hücrelerinin varlığı) gibi bazı testiküler bozukluklar dikkat çekici oldu. Dolayısıyla kısmen de olsa bazı tübüllerde spermatogenez sürecinde bozukluklar gözlemlendi.

Çalışmamızın ikinci transgenik soyunda ise *Boris* geni tam boy cDNA primerleri (full length; normal *Boris* transgeni) kullanılarak klonlandı. Böylelikle mutant ve normal *Boris* transgen ekspresyonlarına ait fenotipler karşılaştırıldı. Literatürde *Boris* geni hakkında *in vivo* yapılmış sadece bir çalışma olmakla birlikte [147], bu genin fonksiyonları hakkında yeterli ve detaylı bilgi mevcut değildir. Özellikle indüklenebilir bir transgenik hayvan modelinde *in vivo* olarak *Boris*'in etkilerini değerlendiren herhangi bir çalışma yoktur. Bu nedenle oluşturduğumuz deney modeli, *Boris*'in olası *in vivo* etkilerini ortaya koyabilmemizi mümkün kılmış orijinal bir modeldir.

Çalışmamızda indüklenebilir ve testis spesifik bir sistem oluşturulduğu için sadece *Boris* transgenik hayvanları değil, ilave olarak farklı transgenik hayvan soyları da sisteme dahil edilmiştir. Testise özgü ekspresyon için testis-spesifik promoterlerin bulunduğu *Protamin Cre* veya *Snaptoneal kompleks Cre* transgenik fare soyları kullanılırken, indüksiyon için tetrasiklin-kontrollü transaktivatör protein (rtTA)'e sahip *rtTA* transgenik fare soyları kullanılmıştır. Çalışmamızda iki farklı testis-spesifik *Cre* transgenik fare soyu kullanılmasının nedeni fenotipin doğrulanması amacıyla tercih edilmiştir. Dolayısıyla üç transgeni (normal ya da mutant *Boris* transgeni, testis-spesifik *Cre* ve *rtTA*) içeren üçlü (triple) transgenik erkek fareler çalışmaya dahil edilmiştir. Testiste görülen patolojik tübüller dahil olmak üzere, yavrularda *Cre* transgeninin orijinine (*Protamin Cre* veya *Snaptoneal kompleks Cre*) bağlı olmaksızın benzer fenotipler gözlenmiştir.

Teknik olarak çalışmada kullanılan tetrasiklin ile indüklenabilir sistem ve vektörü (Tet-On sistemi), zaman-bağımlı ve doku-spesifik bir tarzda pekçok biyolojik sorunun cevaplanabilmesi avantajını sağlayabilen, teknik olarak oldukça yüksek potansiyelli bir sistemdir. Bu sistemde doksisisiklin ile indüksiyon sonrasında, hedef genin transkripsiyonu ve sonrasında da translasyonuna gerçekleşir [179]. Bu anlamda çalışmalarımızın başlangıcında kantitatif gerçek zamanlı PCR yapmak suretiyle, *Boris* transgenik hayvanlarının testislerinden RNA izolasyonu yapılmıştır. Doksisisiklin verilen ve transgene sahip farelerde gen indüksiyonunun gerçekleştirilebildiği doğrulanmıştır. Bir tetrasiklin analogu olan doksisisiklinin, sitotoksik düzeyin altında rtTA'ı etkili bir şekilde aktive ettiği ve herhangi bir patolojiye neden olmadığı bilinmektedir [179, 180]. Gerçekten de çalışmamızda doksisisiklin verilen, ancak transgen içermeyen kontrol grubu hayvanlarında ve yavrularında bir patolojik gelişim izlenmemiştir.

Tez projemizin temelini oluşturan Tet sistemi, Cre, FRT ve ER (östrojen reseptör) gibi diğer koşullu (kondisyonel) gen ekspresyon sistemlerine göre daha avantajlı bir sistemdir. Ayrıca daha hızlı cevap sağladığı için tercih edilmiştir. Dolayısıyla çalışmamız teknik dizayn ve kurulum bakımından, *in vivo* bir sistemde *Boris* proteini ve üreme biyolojisi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan önemli bir çalışmadır.

Çalışmamızda kullandığımız vektörde yer alan yeşil fluoresan protein (GFP), dolaylı olarak gen ekspresyonu izleyebilme imkanı sağlamıştır. Erişkin *Boris* transgenik farelere ait karaciğer, kas, testis ve epididimis gibi farklı dokular, GFP için uygun filtrelerle sahip bir fluoresan mikroskop altında değerlendirildiğinde sadece testiste ve dolayısıyla epididimis kanalındaki spermelerde GFP ekspresyonunun gözlenmesi, testise özgü gen ekspresyonunun gerçekleştirildiğini çok net bir şekilde ortaya koymuştur.

Daha önceki çalışmalarda BORİS'in erkek üreme hücrelerinde ekspres edildiği gösterilmiş olsa bile, literatürde sadece bir çalışmada spermatogenez üzerindeki fonksiyonuna değinilmiştir [147]. Bu çalışmada BORİS'in fonksiyonel aktivitelerini ortaya koyabilmek için *Boris* nakavt fareler üretilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, homozigot *Boris* nakavt fare testislerinde, artmış hücre ölümü ile ilişkili bir şekilde küçük testis yapısı gözlenmiştir. Dikkat çekici diğer bir nokta ise spermatogenezde görülen bozukluklar olmuştur. Bu bozukluklar, haploid hücrelerin üretiminde bir gecikme ile postnatal hayatın 21. günü gibi oldukça erken bir dönemde açık bir şekilde gözlenebilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre gerek normal gerekse mutant *Boris* transgenik fare testislerinde, histolojik olarak bazı seminifer tübül defektleri dikkat çekici olmuştur. Özellikle germ hücrelerinden yoksun sadece Sertoli hücrelerini içeren tübüller, mutant *Boris* transgenine sahip hayvanların testis kesitlerinde daha belirgin olarak görülmüştür. Suzuki ve arkadaşlarının (2010) yapmış olduğu gen ekspresyon profillemesi çalışmalarında, mayozda hayati önem oynadığı bilinen GAL3st1 (serebrosid sülfotransferaz-CST olarak da bilinen) transkript düzeylerinin *Boris* nakavt fare testislerinde dramatik bir şekilde düştüğü gösterilmiştir [147]. Çalışmada

promoterde BORİS bağlanma alanındaki mutasyonun, BORİS'in promoteri aktive etme yeteneğinde bir azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür. Bu bulgular, BORİS'in CST ekspresyonunu transkripsiyonel düzeyde düzenlemek suretiyle spermatogenezde önemli bir rol oynadığını doğrular niteliktedir [147].

Boris'in kanser ile ilişkisi üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır [181-184]. Özellikle MAGE-A1 ve NY-ESO-1 gibi kanser-testis genlerinin ekspresyonunu indüklemesi ve malignansinin erken dönemlerinde ekspre olması nedeniyle immünoterapi için oldukça çekici bir aday olarak görülmektedir. Bununla birlikte çalışmamızda normal ya da mutant *Boris* transgeninin ektopik ekspresyonu sonrasında makroskopik ya da mikroskopik olarak herhangi bir tümör oluşumu gözlenmedi. Ayrıca yapmış olduğumuz PCNA immünohistokimyası ve TUNEL değerlendirmelerinde, kontrol testislerine kıyasla proliferasyon ya da apoptotik indekslerde herhangi bir fark kaydedilememiştir. Daha uzun süreli doksisisiklin muameleleri sonrasında durumun değerlendirilmesi farklı bir sonuç oluşturabilir.

Deney modellerimizde Cre enzimi denek ebeveynin testisinde gerekli rekombinasyonu yaptığı için, denek ebeveynin spermi aracılığıyla yavru nesillerde *Boris* proteininin bütün dokularda ekspresyonu sağlanmış oldu. Dolayısıyla doksisisiklin ile muamele edilen erişkinde, sadece testiste görülen GFP ekspresyonu, *Boris* transgeni ve rtTA'e sahip yavruların bütün dokularında gözlenmiştir.

Ebeveyn gonadlarındaki bozuklukların yavru nesillerde anormal gelişime yol açabileceği bilinmektedir [185, 186]. Biz de çalışmamızda, bozuk *Boris* ekspresyonunun yavru nesillerde ne gibi patolojilere neden olabileceğini ortaya koyabilmek amacıyla, doksisisiklin muamelesi yaptığımız *Boris* transgenine sahip erkek fareleri, yabanıl tip dişi fareler ile çiftleştirdik. Çalışmamızda *Boris* transgenik fare yavrularının doğum ağırlıklarının, kontrol gruplarına göre, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu gözlenmiştir ($P = <0.001$). Bu yavruların, postnatal hayatın ilk haftasındaki *in vivo* hayatta kalım oranları karşılaştırıldığında ise yine anlamlı bir şekilde azalmış postnatal viabilite oranı gözlenmiştir ($P=<0.001$). Bulgularımız ektopik *Boris* ekspresyonunun artmış mortalite oranı ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda gebelik süreci boyunca devam ettirilen doksisisiklin muamelesi ile *Boris*'in normalde olmaması gerekirken ektopik olarak gerçekleştirilen ekspresyonunun, yavru nesillerde organ gelişimlerinde ciddi patolojilere yol açtığını gözlemledik. Bu fenotip normal *Boris* transgenine sahip farelerin yavrularında görüldüğü gibi mutant *Boris* transgenine sahip farelerin bazı yavrularında da gözlemlendi. Bununla birlikte, mutant grupta genotiplemeye paralel bir şekilde gözlenen fenotip her zaman doğrulanamadığı için, özellikle normal *Boris* transgenine sahip farelerin yavrularında değerlendirmeler yapıldı. Normal *Boris* transgenik fare yavrularının fenotipi taşıyan bireylerinin postnatal hayatın ilk gününde ölmesi dikkat çekicidir. Mutant *Boris* transgenine sahip farelerin yavrularındaki anormal yavru gelişiminin altında yatan mekanizmalar için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Normal *Boris* transgenine sahip yavru farelerde ilk göze çarpan fenotip, bu yavruların tipik olarak gözlerinin açık olarak dünyaya gelmesi ve göz kapağı füzyonunun gerçekleşmemiş olmasıydı. Gözde lens vezikül oluşumu ve gelişiminde bozukluklar olduğu gözlemlendi. Anterior lens kapsülünün posterior korneaya yapışması (adhezyonu) nedeniyle ciddi düzeyde katarakt olduğu tespit edildi. Ayrıca Desement membranının olmadığı görüldü. Anterior lens epiteli düzensizdi ve primer fibrillerde dejenerasyon gözlemlendi. Gözlenen bu patoloji, insanlarda görülen ve anterior segment disgenezinin (gelişmemesi) bir formu olan Peters anomalisine büyük benzerlik göstermektedir [187]. Bu anomali, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer bir şekilde, katarakt ve korneal opasite ile karakterizedir. Peters anomalisinin kalıtılabilir bir patern göstermekle birlikte, özellikle PAX6, FOXE3, CYP1B1, PITX2, FOXC1 gibi genlerdeki mutasyonlar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir [188-192]. Ayrıca diğer oküler ya da sistematik bozukluklar ile ilişkili de olabileceği ileri sürülmektedir [193]. Elde ettiğimiz bulguların ışığı altında, *Boris* geni ve sözü edilen genler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı sorusunun cevabını ileriki çalışmalarımızla cevaplamaya çalışacağız.

Normal *Boris* transgenine sahip yavru farelerde, göz yapısında görülen patolojiye ek olarak, akciğer, karaciğer, böbrek ve iskelet kası gibi birçok organda gelişim geriliği gözlenmiştir. Akciğerlerin az gelişmiş olması, bu yavrularda görülen ölümün primer nedeni olabilir. Özellikle fenotipi taşıyan etkilenmiş yavrular, normal görümlü ve transgen içermeyen kardeşlerine göre daha düşük vücut ağırlıklarına sahipti ($P = <0.001$). Bu durum embriyogenez sürecinde *Boris* ekspresyonunda görülen anormal ekspresyonun, global anlamda tüm yavru vücudunu etkilediğini ifade etmektedir. Dolayısıyla çalışmamız *Boris* ile doğum defektleri ve konjenital malformasyonlar hakkında temel bilgileri sunan literatürdeki ilk çalışmadır. Bulgularımız *Boris* geninin embriyogenez sürecinde kritik rol oynadığını ortaya koymaktadır.

İnfertilite önemli bir sağlık sorunu olup, özellikle infertilite nedenleri arasında genetik faktörlerin önemine dikkat çekilmektedir. Çalışmamızda oluşturduğumuz kurucu mutant *Boris* transgenik farelerden birinin steril olması dikkat çekici olmuştur. Testisin histolojik analizinde spermatosit aşamasında spermatogenetik tutulum (arrest) gözlenmiştir. Bu erkek farede, transgenin bozuk ekspresyonunun steriliteye neden olup olmadığı bilinmemektedir. Bununla birlikte diğer mutant ya da normal *Boris* transgenine sahip farelerin *in vivo* analizinde bu farelerin fertil oldukları gözlenmiştir. Kontrol ve *Boris* transgenik fare spermleri kullanılarak yapılan IVF çalışmalarında ise kontrollere kıyasla azalmış fertilizasyon oranı gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Dolayısıyla bu çalışmanın sonuçları ektopik *Boris* ekspresyonunun infertiliteye sebep olmadığını göstermiştir.

Yapılan birçok çalışma, ÜYTE ile dünyaya gelen çocuklarda anormal genetik imprinting olduğunu vurgulamaktadır. Beckwith-Weidemann, Prader-Willi ve Angelman sendromları gibi genetik imprintinginde hatalarla ilişkili hastalıkların insidansında artış rapor edilmiştir [9, 11-18, 194]. Bu sendromlara ek olarak imprinting bazı kanserler ile de ilişkilendirilmektedir [133]. Çalışmamızda

epigenetik bir düzenleyici olduğu ileri sürülen *Boris*'in embriyonik gelişim boyunca ekspresyonu ve rolü henüz tam olarak bilinmemektedir. Epigenetik bilgilerin, memeli üreme hattı boyunca nesiller arasında aktarılabilirdiği temel bilgisinden yola çıkarak, özellikle yavrularda görülen patolojiler, ektopik *Boris* ekspresyonu nedeniyle oluşabilecek bozulmuş bir imprinting sistemi ile ilişkili olabilir. Diğer bir deyişle, eğer *Boris* geni paternal-spesifik metilasyon paterninin oluşmasını yönlendiriyorsa, aşırı *Boris* ekspresyonu, normal süreçlerde bozulmalara neden olabilir ve *IGF2/H19* ya da diğer imprinte gen bölgelerinde anormal metilasyon ile sonuçlanabilir. Bu varsayımdan hareketle çalışmamızda, *Boris*'in aşırı ekspresyonu sonrasında, erişkin sperminde ve yavru soylarda *IGF2/H19* lokusu gibi oldukça yaygın olarak çalışılan, önemli bir imprinting gen bölgesinde anormal imprinting olup olmadığını araştırdık. Bu amaçla erişkin transgenik hayvanlara ait epididimal sperm örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirildi. DNA örnekleri bisülfid ile muamele edildikten sonra, *H19* DMD bölgesi klonlanarak, metilasyon analizlerine tabi tutuldu. Benzer bir şekilde, bu farelerin normal ve anormal olarak doğan yavrularına ait DNA örnekleri ile analizler gerçekleştirildi.

Yetişkin *Boris* transgenik farelerde 26 adet CpG adacığı içeren *H19* DMD bölgesinin metilasyon analizleri, bisülfid sekanslama yöntemi ile gerçekleştirildiğinde, kontrol spermlerine göre, mutant ve normal *Boris* transgenik farelerden elde edilen sperm örneklerinde metilasyon oranının bozulduğu ortaya konmuştur ($p = <0.001$). Normal ve anormal olarak doğan yavrulardan elde edilen kuyruk DNA'sı kullanılarak yapılan deneylerde, bu lokusta total metilasyon yüzdeleri açısından fark bulunmuştur ($p = 0.011$) Gözlenen değişmiş metilasyon paterninin anormal fetal gelişim ile doğrudan ilişkili olup olmadığı sorusunun cevaplandırılabilmesi için daha ileri düzeyde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Shaw ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, erkek üreme hattında *H19* ICR'nin metilasyonu için BORİS tarafından spesifik bir kromatin imzasının tanınmasının gerektiği rapor edilmiştir [33]. Bilindiği üzere CTCF, maternal *H19* imprinting kontrol bölgesine (ICR) bağlanmak suretiyle, DNA metilasyonunu engeller ve böylelikle *H19/Igf2* lokusunun imprintinginde kritik rol oynar [195]. DNA metilasyonuna duyarlı *H19* ICR ise izolatör olarak görev yapar, *Igf2*'yi susturur ve maternal allelde *H19*'u aktive eder. Embriyonik 15.5. günde testis örnekleri kullanılarak yapılan kromatin immünopresipitasyon çalışmalarında, BORİS'in erkek üreme hücrelerinde paternal olarak metile *H19* ICR'a bağlandığı gösterilmiştir [33]. Eğer BORİS, *H19* ICR'nin DNA metilasyonuna katılıyorsa, BORİS'in azaltılması, metilasyonu bozabilir ve imprinting kaybına neden olabilir [196]. Bu nedenle, çalışmamız ile *in vivo* bir sistemde *Boris*'in *IGF2/H19* lokusu ile ilişkisinin ortaya konulmasının, genetik imprinting defektlerinin neden olduğu sendromların anlaşılması ve klinik olarak çözüm aranması açısından önemli bilimsel katkı sağlayabileceğini düşünüyoruz. Dolayısıyla çalışmamız; imprintingın nasıl işlediğinin anlaşılması ve normal imprinting bozacak koşulların belirlenmesi açısından önem ve yeni bilgi-bulgu taşımaktadır. Bu anlamda sadece *IGF2/H19* lokusu değil, diğer imprinte genlerin metilasyon paterninin araştırılmasında da yarar vardır.

SONUÇLAR

Bu tezde, transgenik hayvan modellerinde ektopik *Boris* ekspresyonu gerçekleştirilerek, spermatogenez ve yavru soylar üzerindeki muhtemel rolleri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir

1. Bu proje kapsamında literatürde ilk kez Tet/ON sistemini kullanmak suretiyle indüklenebilir bir tarzda normal ve mutant *Boris* transgenik fare modelleri oluşturulmuştur.
2. Transgenik fare testislerinde normal tübül yapılarının yanısıra, bozuk tübül yapıları ve lümene atılmış anormal görünümlü hücresel yapılar görülmüştür. Çalışmamız, *in vivo* bir sistemde *Boris* proteini ve spermatogenez arasında potansiyel bir ilişki olduğunu vurgulamaktadır.
3. Normal ya da mutant *Boris* transgeninin ektopik ekspresyonu sonrasında makroskopik ya da mikroskopik olarak herhangi bir tümör oluşumu gözlenmemiştir.
4. PCNA immünohistokimyası ve TUNEL değerlendirmelerinde, kontrol testislerine kıyasla proliferasyon ya da apoptotik indekslerde herhangi bir fark kaydedilememiştir. Bu durum gen indüksiyon süresi ile ilişkili olabilir, araştırmaya değer bir konudur.
5. Doksisisiklin ile muamele edilmiş mutant ve normal *Boris* transgenik fare yavruları, kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük vücut ağırlığına sahip iken yüksek postnatal mortalite oranı göstermektedir.
6. Doksisisiklin uygulamasındaki normal *Boris* transgenik farelerin çiftleştirmelerinde patolojik yavrular oluşmuştur. Başta göz olmak üzere, iskelet kası, karaciğer, akciğer ve böbrekleri içeren pek çok organ sisteminde büyüme geriliği tespit edilmiştir. Araştırmamız, *Boris* geni ile embriyogenez ve fetal gelişim bozukluklarını ilişkilendiren literatürdeki ilk çalışmadır.
7. *Boris* transgenik fare soyları fertildir. IVF çalışmalarında kontrollere kıyasla azalmış fertilizasyon oranı dikkat çekici olsa da gruplar arasında bir fark bulunamamıştır.
8. Yetişkin ve yavru *Boris* transgenik fare DNA'sında *H19* DMD metilasyonu kontrollere göre farklılık göstermektedir. Dolayısıyla ektopik *Boris* ekspresyonu metilasyon paternlerini etkilemiştir.

KAYNAKLAR

1. Latham, K.E., McGrath, J. and Solter, D. Mechanistic and developmental aspects of genetic imprinting in mammals. *Int Rev Cytol*, 1995. 160: p. 53-98.
2. McGrath, J. and Solter, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 1984. 37(1): p. 179-83.
3. Kaneko-Ishino, T., Kohda, T. and Ishino, F. The regulation and biological significance of genomic imprinting in mammals. *J Biochem (Tokyo)*, 2003. 133(6): p. 699-711.
4. Paoloni-Giacobino, A. Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr Res*, 2007. 61(5 Pt 2): p. 51R-57R.
5. Feinberg, A.P. and Tycko, B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(2): p. 143-53.
6. Reik, W. and Dean, W. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis*, 2001. 22(14): p. 2838-43.
7. Strathdee, G. and Brown, R. Aberrant DNA methylation in cancer: potential clinical interventions. *Expert Rev Mol Med*, 2002. 4(4): p. 1-17.
8. Arnaud, P. and Feil, R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2005. 75(2): p. 81-97.
9. Lucifero, D., Chaillet, J.R. and Trasler, J.M. Potential significance of genomic imprinting defects for reproduction and assisted reproductive technology. *Hum Reprod Update*, 2004. 10(1): p. 3-18.
10. Gosden, R., et al., Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet*, 2003. 361(9373): p. 1975-7.
11. DeBaun, M.R., Niemitz, E.L. and Feinberg, A.P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet*, 2003. 72(1): p. 156-60.
12. Jacob, S. and Moley, K.H. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. *Pediatr Res*, 2005. 58(3): p. 437-46.
13. Maher, E.R. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet*, 2005. 14 Spec No 1: p. R133-8.
14. Paoloni-Giacobino, A. Implications of reproductive technologies for birth and developmental outcomes: imprinting defects and beyond. *Expert Rev Mol Med*, 2006. 8(12): p. 1-14.

15. Rossignol, S., et al., The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet*, 2006. 43(12): p. 902-7.
16. Sutcliffe, A.G., et al., Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey. *Hum Reprod*, 2006. 21(4): p. 1009-11.
17. Thompson, J.R. and Williams, C.J. Genomic imprinting and assisted reproductive technology: connections and potential risks. *Semin Reprod Med*, 2005. 23(3): p. 285-95.
18. Valenzuela, C.Y. The risk of congenital malformations and genomic imprinting defects in assisted reproductive technologies and nuclear transfer cloning]. *Rev Med Chil*, 2005. 133(9): p. 1075-80.
19. Cisneros, F.J. DNA methylation and male infertility. *Front Biosci*, 2004. 9: p. 1189-200.
20. Meacham R.B., Lipshultz L.I. and Howards, S.S. Male infertility. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JW editor(s). *Adult and Pediatric Urology*. St Louis: Mosby-Year Book Inc, 1747-802. 1996.
21. Krausz, C. and Giachini, C. Genetic risk factors in male infertility. *Arch Androl*, 2007. 53(3): p. 125-33.
22. Ferlin, A., et al., Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online*, 2007. 14(6): p. 734-45.
23. Coward, K., Kubota, H. and Parrington, J. In vivo gene transfer into testis and sperm: developments and future application. *Arch Androl*, 2007. 53(4): p. 187-97.
24. Sakai, Y., et al., Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Gene Expr Patterns*, 2004. 5(2): p. 231-7.
25. Kelly, T.L., Li, E. and Trasler, J.M. 5-aza-2'-deoxycytidine induces alterations in murine spermatogenesis and pregnancy outcome. *J Androl*, 2003. 24(6): p. 822-30.
26. Kafri, T., et al., Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 1992. 6(5): p. 705-14.
27. Doerksen, T. and Trasler, J.M. Developmental exposure of male germ cells to 5-azacytidine results in abnormal preimplantation development in rats. *Biol Reprod*, 1996. 55(5): p. 1155-62.
28. Hartmann, S., et al., Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod*, 2006. 12(6): p. 407-11.
29. Marques, C.J., et al., Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet*, 2004. 363(9422): p. 1700-2.
30. Loukinov, D.I., et al., BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-

finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(10): p. 6806-11.

31. Klenova, E.M., et al., The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol*, 2002. 12(5): p. 399-414.
32. Monk, M., Hitchins, M. and Hawes, S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development. *Mol Hum Reprod*, 2008. 14(6): p. 347-55.
33. Jelinic, P., Stehle, J.C. and Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol*, 2006. 4(11): p. e355.
34. Robertson, K.D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*, 2005. 6(8): p. 597-610.
35. Lewis, A. and Murrell, A. Genomic imprinting: CTCF protects the boundaries. *Curr Biol*, 2004. 14(7): p. R284-6.
36. Recillas-Targa, F., et al., Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis. *J Cell Mol Med*, 2006. 10(3): p. 554-68.
37. Filippova, G.N. Genetics and epigenetics of the multifunctional protein CTCF. *Curr Top Dev Biol*, 2008. 80: p. 337-60.
38. Graaf, R.D. On the human reproductive organs, translated by ND Jocelyn and BP Setchell. *J Reprod Fertil*, 1972((Suppl 17)).
39. Kölliker, R.V. *Bertrage zur Kenntniss der Geschlecht-versaltsmisse und der Samen-flussigkeit wirbelloser Thiere und die Bedeutung de sogenannten Samenthiere*. 1841, Berlin.
40. Berthold, A. Transplantation der Hoden. *Arch Anat Physiol Wiss Med*, 1849. 16: p. 42-46.
41. Bouin, P. *Recherches sur les cellules interstitielles der testicule des mammiferes*. *Arch Zool (Stockh.)*, 1903. 1: p. 437-523.
42. Kluin, P.M., Kramer, M.F. and de Rooij, D.G. Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *Int J Androl*, 1982. 5(3): p. 282-94.
43. Hajkova, P., et al., Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 2002. 117(1-2): p. 15-23.
44. http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Cell_Division_-Meiosis.
45. Barrat, C. Spermatogenesis. In: Grudzinskas JG and Yovich JL (eds): *Gametes- the spermatozoon*. 1995, Cambridge University Press. p. 250-267.

46. WHO, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 1992, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-107.
47. Hess, R.A., et al., Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle*, 2006. 5(11): p. 1164-70.
48. Phillips, B.T., Gassei, K. and Orwig, K.E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2010. 365(1546): p. 1663-78.
49. Glower, T.D., Barratt, C.L.R. and Tyler, J.J.P. Human male fertility and semen analysis. 1990, London Academic Press. p. 247.
50. Waterman, M.R. and Simpson, E.R. Regulation of steroid hydroxylase gene expression is multifactorial in nature. *Recent Prog Horm Res*, 1989. 45: p. 533-63; discussion 563-6.
51. Shan, L.X., et al., Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology*, 1995. 136(9): p. 3856-62.
52. Maekawa, M., Kamimura, K. and Nagano, T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. *Arch Histol Cytol*, 1996. 59(1): p. 1-13.
53. Oakberg, E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am J Anat*, 1956. 99(3): p. 507-16.
54. Tegelenbosch, R.A. and de Rooij, D.G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*, 1993. 290(2): p. 193-200.
55. De Rooij, D.G. and Russell, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*, 2000. 21(6): p. 776-98.
56. De Rooij, D.G. and Grootegoed, J.A. Spermatogonial stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 1998. 10(6): p. 694-701.
57. Zhou, Q. and Griswold, M.D. Regulation of spermatogonia, in *StemBook*, T.S.C.R. Community, Editor. 2008.
58. De Kretser, D. and Catt, K. J. *Physiology of Reproduction*. 1994, New York: Raven Press Ltd.
59. Kerr, JB, et al., *Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms*, Ernst Knobil and J.D. Neill, Editors. 2006, Elsevier Academic Press.
60. Russell, L, et al., *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1990, Clearwater, FL: Cache River Press.
61. Morelli, M.A. and Cohen, P.E. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. *Reproduction*, 2005. 130(6): p. 761-81.
62. Heyting, C. Synaptonemal complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*, 1996. 8(3): p. 389-96.

63. Ward, W.S. and Coffey, D.S. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod*, 1991. 44(4): p. 569-74.
64. Braun, R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet*, 2001. 28(1): p. 10-2.
65. Cho, C., et al., Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet*, 2001. 28(1): p. 82-6.
66. Oliva, R. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(4): p. 417-35.
67. Aoki, V.W., et al., DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl*, 2005. 26(6): p. 741-8.
68. Ramos, L., et al., Incomplete nuclear transformation of human spermatozoa in oligo-astheno-teratospermia: characterization by indirect immunofluorescence of chromatin and thiol status. *Hum Reprod*, 2008. 23(2): p. 259-70.
69. Kleene, K.C. Patterns of translational regulation in the mammalian testis. *Mol Reprod Dev*, 1996. 43(2): p. 268-81.
70. Sprando, R.L. and Russell, L.D. Comparative study of cytoplasmic elimination in spermatids of selected mammalian species. *Am J Anat*, 1987. 178(1): p. 72-80.
71. Russell, L.D. and Malone, J.P. A study of Sertoli-spermatid tubulobulbar complexes in selected mammals. *Tissue Cell*, 1980. 12(2): p. 263-85.
72. De Kretser, D.M. Ultrastructural features of human spermiogenesis. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 1969. 98(4): p. 477-505.
73. Heckert, L.L. and Griswold, M.D. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res*, 2002. 57: p. 129-48.
74. Walker, W.H. and Cheng, J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*, 2005. 130(1): p. 15-28.
75. De Kretser, D.M., Catt, K.J. and Paulsen, C.A. Studies on the in vitro testicular binding of iodinated luteinizing hormone in rats. *Endocrinology*, 1971. 88(2): p. 332-7.
76. Silva, F.R., Leite, L.D. and Wassermann, G.F. Rapid signal transduction in Sertoli cells. *Eur J Endocrinol*, 2002. 147(3): p. 425-33.
77. Walker, W.H. Nongenomic actions of androgen in Sertoli cells. *Curr Top Dev Biol*, 2003. 56: p. 25-53.
78. Sharpe, R.M. Intratesticular control of steroidogenesis. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1990. 33(6): p. 787-807.
79. Bellve, A.R. and Zheng, W. Growth factors as autocrine and paracrine modulators of male gonadal functions. *J Reprod Fertil*, 1989. 85(2): p. 771-93.

80. De Kretser D.M., Sun, Y.T., Drummond A.E., Gonzales G.F., Robertson D.M., Riosberbriger G.P. In: Asch RH, Balmaceda JP, Johnson I (eds), in Sero Symposium. 1990: USA. p. 19-30.
81. Djakiew, D. and Dym, M. Pachytene spermatocyte proteins influence Sertoli cell function. *Biol Reprod*, 1988. 39(5): p. 1193-205.
82. Wistuba, J., Stukenborg, J.B. and Luetjens, C.M. Mammalian Spermatogenesis, in *Functional Development and Embryology*. 2007, Global Science.
83. Bird, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, 2007. 447(7143): p. 396-8.
84. Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992. 69(6): p. 915-26.
85. Lagger, G., et al., Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J*, 2002. 21(11): p. 2672-81.
86. Surani, M.A., Barton, S.C. and Norris, M.L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 1984. 308(5959): p. 548-50.
87. Hardison, R.C., Oeltjen, J. and Miller, W. Long human-mouse sequence alignments reveal novel regulatory elements: a reason to sequence the mouse genome. *Genome Res*, 1997. 7(10): p. 959-66.
88. Callinan, P.A. and Feinberg, A.P. The emerging science of epigenomics. *Hum Mol Genet*, 2006. 15 Spec No 1: p. R95-101.
89. Dwivedi, R.S., et al., Beyond genetics: epigenetic code in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 2011. 79(1): p. 23-32.
90. Cheng, X. and Blumenthal, R.M. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, 2008. 16(3): p. 341-50.
91. Szyf, M. DNA methylation and demethylation probed by small molecules. *Biochim Biophys Acta*, 2010. 1799(10-12): p. 750-9.
92. Jones, P.A. and Laird, P.W. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*, 1999. 21(2): p. 163-7.
93. Rai, K., et al., Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev*, 2007. 21(3): p. 261-6.
94. Goll, M.G., et al., Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006. 311(5759): p. 395-8.
95. Bourc'his, D., et al., Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 2001. 294(5551): p. 2536-9.
96. <http://www.medindia.net/patients/patientinfo/epigenetics-molecular-basis.htm>.
97. Kristensen, L.S., Nielsen, H.M. and Hansen, L.L. Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol*, 2009. 625(1-3): p. 131-42.

98. Michalowsky, L.A. and Jones, P.A. Differential nuclear protein binding to 5-azacytosine-containing DNA as a potential mechanism for 5-aza-2'-deoxycytidine resistance. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(9): p. 3076-83.
99. Lee, J., et al., Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*, 2002. 129(8): p. 1807-17.
100. Reik, W., Dean, W. and Walter, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 2001. 293(5532): p. 1089-93.
101. Coffigny, H., et al., Alterations of DNA methylation patterns in germ cells and Sertoli cells from developing mouse testis. *Cytogenet Cell Genet*, 1999. 87(3-4): p. 175-81.
102. Bernardino-Sgherri, J., et al., Unusual chromosome cleavage dynamic in rodent neonatal germ cells. *Chromosoma*, 2002. 111(5): p. 341-7.
103. Hisano, M., et al., Methylation of CpG dinucleotides in the open reading frame of a testicular germ cell-specific intronless gene, *Tact1/Actl7b*, represses its expression in somatic cells. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(16): p. 4797-804.
104. Davis, T.L., et al., Acquisition of the H19 methylation imprint occurs differentially on the parental alleles during spermatogenesis. *Genomics*, 1999. 58(1): p. 18-28.
105. Xie, W., et al., Regulation of ALF gene expression in somatic and male germ line tissues involves partial and site-specific patterns of methylation. *J Biol Chem*, 2002. 277(20): p. 17765-74.
106. Mayer, W., et al., Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. *J Cell Biol*, 2000. 148(4): p. 629-34.
107. Paulsen, M. and Ferguson-Smith, A.C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*, 2001. 195(1): p. 97-110.
108. John, R.M. and Lefebvre, L. Developmental regulation of somatic imprints. *Differentiation*, 2011.
109. Sparago, A., et al., Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet*, 2004. 36(9): p. 958-60.
110. Sparago, A., et al., Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet*, 2007. 16(3): p. 254-64.
111. Sakatani, T., et al., Loss of imprinting of *Igf2* alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science*, 2005. 307(5717): p. 1976-8.
112. Kaneda, A. and Feinberg, A.P. Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer Res*, 2005. 65(24): p. 11236-40.

113. Bartolomei, M.S. and Tilghman, S.M. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet*, 1997. 31: p. 493-525.
114. Brannan, C.I., et al., The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*, 1990. 10(1): p. 28-36.
115. Kalscheuer, V.M., et al., The insulin-like growth factor type-2 receptor gene is imprinted in the mouse but not in humans. *Nat Genet*, 1993. 5(1): p. 74-8.
116. Kuo, K.C., et al., Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980. 8(20): p. 4763-76.
117. Gomes, J.D. and Chang, C.J. Reverse-phase high-performance liquid chromatography of chemically modified DNA. *Anal Biochem*, 1983. 129(2): p. 387-91.
118. Schmitt, F., Oakeley, E.J. and Jost, J.P. Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *J Biol Chem*, 1997. 272(3): p. 1534-40.
119. Oakeley, E.J., Schmitt, F. and Jost, J.P. Quantification of 5-methylcytosine in DNA by the chloroacetaldehyde reaction. *Biotechniques*, 1999. 27(4): p. 744-6, 748-50, 752.
120. Southern, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975. 98(3): p. 503-17.
121. Singer-Sam, J., et al., A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 1990. 18(3): p. 687.
122. Brandeis, M., et al., The ontogeny of allele-specific methylation associated with imprinted genes in the mouse. *EMBO J*, 1993. 12(9): p. 3669-77.
123. Clark, S.J., et al., High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 1994. 22(15): p. 2990-7.
124. Gonzalgo, M.L. and Jones, P.A. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(12): p. 2529-31.
125. Herman, J.G., et al., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(18): p. 9821-6.
126. Uhlmann, K., et al., Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 2002. 23(24): p. 4072-9.
127. Ohlsson, R., Bartkuhn, M. and Renkawitz, R. CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma*, 2010. 119(4): p. 351-60.

128. Vostrov, A.A., Taheny, M.J. and Quitschke, W.W. A region to the N-terminal side of the CTCF zinc finger domain is essential for activating transcription from the amyloid precursor protein promoter. *J Biol Chem*, 2002. 277(2): p. 1619-27.
129. Lobanenko, V.V., et al., A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. *Oncogene*, 1990. 5(12): p. 1743-53.
130. Bell, A.C., West, A.G. and Felsenfeld, G. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. *Cell*, 1999. 98(3): p. 387-96.
131. Felsenfeld, G., et al., Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2004. 69: p. 245-50.
132. Chao, W., et al., CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. *Science*, 2002. 295(5553): p. 345-7.
133. Uribe-Lewis, S., et al., Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev Mol Med*, 2011. 13: p. e2.
134. Kanduri, C., et al., Functional association of CTCF with the insulator upstream of the H19 gene is parent of origin-specific and methylation-sensitive. *Curr Biol*, 2000. 10(14): p. 853-6.
135. Bell, A.C. and Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature*, 2000. 405(6785): p. 482-5.
136. Heath, H., et al., CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. *EMBO J*, 2008. 27(21): p. 2839-50.
137. Ribeiro de Almeida, C., et al., Critical role for the transcription regulator CCCTC-binding factor in the control of Th2 cytokine expression. *J Immunol*, 2009. 182(2): p. 999-1010.
138. Wan, L.B., et al., Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. *Development*, 2008. 135(16): p. 2729-38.
139. Filippova, G.N., et al., An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(6): p. 2802-13.
140. Klenova, E.M., et al., Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(6): p. 2221-34.
141. Scanlan, M.J., Simpson, A.J. and Old, L.J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*, 2004. 4: p. 1.
142. Old, L.J. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun*, 2001. 1: p. 1.

143. Kalejs, M. and Erenpreisa, J. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int*, 2005. 5(1): p. 4.
144. Campbell, A.E., Martinez, S.R. and Miranda, J.J. Molecular architecture of CTCFL. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. 396(3): p. 648-50.
145. Sun, L., et al., DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res*, 2008. 68(8): p. 2726-35.
146. Nguyen, P., et al., CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res*, 2008. 68(14): p. 5546-51.
147. Suzuki, T., et al., Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol Cell Biol*, 2010. 30(10): p. 2473-84.
148. Hore, T.A., Deakin, J.E. and Marshall Graves, J.A. The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCFL in amniotes. *PLoS Genet*, 2008. 4(8): p. e1000169.
149. Vatolin, S., et al., Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res*, 2005. 65(17): p. 7751-62.
150. Looijenga, L.H., et al., Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer Res*, 2006. 66(1): p. 290-302.
151. Woloszynska-Read, A., et al., DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCFL expression in ovarian cancer. *Cancer Immun*, 2007. 7: p. 21.
152. Risinger, J.I., et al., Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(6): p. 1713-9.
153. D'Arcy, V., et al., The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(20 Pt 1): p. 5978-86.
154. Hong, J.A., et al., Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res*, 2005. 65(17): p. 7763-74.
155. Kang, Y., et al., Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene*, 2007. 26(30): p. 4394-403.
156. Dougherty, C.J., et al., Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. 370(1): p. 109-12.

157. Kholmanskikh, O., et al., Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer*, 2008. 122(4): p. 777-84.
158. Loukinov, D., et al., Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem*, 2006. 98(5): p. 1037-43.
159. Ghochikyan, A., et al., Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J Immunol*, 2007. 178(1): p. 566-73.
160. Mkrtichyan, M., et al., DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice. *Gene Ther*, 2008. 15(1): p. 61-4.
161. WHO, Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *Int J Andrology*, 1987. 7: p. 1-35.
162. Matzuk, M.M. and Lamb, D.J. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*, 2002. 4 Suppl: p. s41-9.
163. Vogt, P.H. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(5): p. 471-500.
164. Vogt, P.H. Molecular basis of male (in)fertility. *Int J Androl*, 1997. 20 Suppl 3: p. 2-10.
165. Gandini, L., et al., Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod*, 2004. 19(6): p. 1409-17.
166. Fatehi, A.N., et al., DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl*, 2006. 27(2): p. 176-88.
167. Perrin, A., et al., Aneuploidy and DNA Fragmentation in Sperm of Carriers of a Constitutional Chromosomal Abnormality. *Cytogenet Genome Res*, 2011.
168. Wells, D., et al., Expression of genes regulating chromosome segregation, the cell cycle and apoptosis during human preimplantation development. *Hum Reprod*, 2005. 20(5): p. 1339-48.
169. Gasca, S., et al., Identifying new human oocyte marker genes: a microarray approach. *Reprod Biomed Online*, 2007. 14(2): p. 175-83.
170. Lee, J.Y., et al., Role of genetics in azoospermia. *Urology*, 2011. 77(3): p. 598-601.
171. Ittner, L.M. and Gotz, J. Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat Protoc*, 2007. 2(5): p. 1206-15.
172. Tousson, E., et al., Proliferating Cell Nuclear Antigen as a Molecular Biomarker for Spermatogenesis in PTU-Induced Hypothyroidism of Rats. *Reprod Sci*, 2011.

173. McGrath, J. and Hillman, N. The in vitro transmission frequency of the t6 allele. *Nature*, 1980. 283(5746): p. 479-81.
174. Ariel, M., McCarrey, J. and Cedar, H. Methylation patterns of testis-specific genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(6): p. 2317-21.
175. Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L. and Bartolomei, M.S. Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev*, 1998. 12(23): p. 3693-702.
176. Hark, A.T., et al., CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, 2000. 405(6785): p. 486-9.
177. Ohlsson, R., Renkawitz, R. and Lobanenko, V. CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. *Trends Genet*, 2001. 17(9): p. 520-7.
178. Phillips, J.E. and Corces, V.G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*, 2009. 137(7): p. 1194-211.
179. Gossen, M., et al., Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995. 268(5218): p. 1766-9.
180. Baron, U. and Bujard, H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol*, 2000. 327: p. 401-21.
181. Pugacheva, E.M., et al., The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e13872.
182. Yoon, S.L., et al., Susceptibility for breast cancer in young patients with short rare minisatellite alleles of BORIS. *BMB Rep*, 2010. 43(10): p. 698-703.
183. Renaud, S., et al., BORIS/CTCF-mediated transcriptional regulation of the hTERT telomerase gene in testicular and ovarian tumor cells. *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(3): p. 862-73.
184. Hines, W.C., et al., BORIS (CTCF) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. *PLoS One*, 2010. 5(3): p. e9738.
185. Nordstrand, L.M., et al., Mice lacking Alkbh1 display sex-ratio distortion and unilateral eye defects. *PLoS One*, 2010. 5(11): p. e13827.
186. Vervenne, H.B., et al., Targeted disruption of the mouse Lipoma Preferred Partner gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 379(2): p. 368-73.
187. Bhandari, R., et al., Peters Anomaly: Review of the Literature. *Cornea*, 2011.
188. Doucette, L., et al., A novel, non-stop mutation in FOXE3 causes an autosomal dominant form of variable anterior segment dysgenesis including Peters anomaly. *Eur J Hum Genet*, 2011. 19(3): p. 293-9.
189. Azuma, N., et al., Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am J Hum Genet*, 1999. 65(3): p. 656-63.

- 190.** Nanjo, Y., et al., A novel mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in a patient with Peters' anomaly. *Br J Ophthalmol*, 2004. 88(5): p. 720-1.
- 191.** Vincent, A., et al., Further support of the role of CYP1B1 in patients with Peters anomaly. *Mol Vis*, 2006. 12: p. 506-10.
- 192.** Honkanen, R.A., et al., A family with Axenfeld-Rieger syndrome and Peters Anomaly caused by a point mutation (Phe112Ser) in the FOXC1 gene. *Am J Ophthalmol*, 2003. 135(3): p. 368-75.
- 193.** Hanna, N.N., et al., Atypical Peters plus syndrome with new associations. *J AAPOS*, 2010. 14(2): p. 181-3.
- 194.** Maher, E.R., et al., Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet*, 2003. 40(1): p. 62-4.
- 195.** Fedoriw, A.M., et al., Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science*, 2004. 303(5655): p. 238-40.
- 196.** Weaver, J.R., Susiarjo, M. and Bartolomei, M.S. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome*, 2009. 20(9-10): p. 532-43.

ÖZGEÇMİŞ

Güler Leyla SATI 1979 yılında Kars'ta doğdu. Lise öğrenimini 1998 yılında Antalya İngilizce ağırlıklı Karatay Lisesi'nde tamamladı. Lisans eğitimini, 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, Fakülte ve Biyoloji Bölümü birincisi olarak tamamladı. 2002 yılında Hacettepe Üniversitesi tarafından İhsan Doğramacı Üstün Başarı Ödülü ve Öğrenci Başarı Ödülü'nü kazandı. 2002-2003 Eğitim-Öğretim yılı güz döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na bağlı Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans Programı'na giriş sınavlarını kazanarak, burada Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yüksek lisans tezinin bir kısmını Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Reprodüktif Endokrinoloji Bölümü Sperm Fizyolojisi Laboratuvarı'nda Dr. Gabor Huszar'ın danışmanlığında yaptı. Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans eğitimini 2005 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı. Doktora tez çalışmalarının bir kısmını yurt dışında gerçekleştirmek amacıyla, TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) tarafından verilen yurt dışı araştırma bursunu kazandı. 2009-2010 yılları arasında doktora tez projesinin deney aşamalarını Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Karşılaştırmalı Tıp Anabilim Dalı Hayvan Genomiks Birimi'nde gerçekleştirdi. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ramazan Demir ve Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Karşılaştırmalı Tıp ve Genetik Anabilim Dalları'ndan Dr. James McGrath'ın ortak danışmanlığında doktora tez çalışmalarını tamamladı. Güler Leyla SATI'nın Science Citation Index'te kayıtlı dergilerde yayınlanmış 25 makale ve yurt içi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 40'ı aşkın kongre bildirisi bulunmaktadır. Güler Leyla SATI, American Society of Reproductive Medicine (ASRM, USA), Uluslararası Dermatoloji ve Androloji konferansı (Mısır), International Federation of Placenta Associations (IFPA)/2nd Placenta Association of the Americas (PAA) Konferansı (Kanada) gibi uluslararası düzeyde bilimsel ödüllere aday gösterilmiş ve ödüller almıştır.

EKLER

Article

Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation



Leyla Sati MSc is currently a PhD student in the Department of Histology and Embryology, Akdeniz University, Turkey, having previously worked as a pre-doctoral Fellow in the Sperm Physiology Laboratory, Yale University School of Medicine with Dr Gabor Huszar. Her research interests include the various biochemical markers of human sperm maturity and function, and the relationship between tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and sperm binding to the zona pellucida and hyaluronic acid. She has been nominated for and awarded prizes at international meetings, including the American Society of Reproductive Medicine and the 2007 International Dermatology and Andrology Conference in Egypt.

Dr Leyla Sati

Leyla Sati^{1,4}, Laszlo Ovari², David Bennett¹, Stephen D Simon³, Ramazan Demir⁴, Gabor Huszar^{1,6}

¹The Sperm Physiology Laboratory, Department of Obstetrics and Gynecology, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06510 USA; ²Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Debrecen, Hungary; ³Children's Mercy Hospitals and Clinics, Kansas City, MO 64108, USA; ⁴Department of Histology and Embryology, Akdeniz University, School of Medicine Antalya, Turkey

⁶Correspondence: Tel: +1 203 7854010; Fax: +1 203 7371200; e-mail: gabor.huszar@yale.edu

Abstract

Individual spermatozoa were assessed with pairs of probes for persistent histones and cytoplasmic retention, persistent histones and DNA fragmentation, and persistent histones and apoptotic markers. The individual spermatozoa were treated sequentially with combinations of probes for these cytoplasmic and nuclear biochemical markers. Sperm fields were recorded with computer-assisted imaging, and staining patterns with the two probes in the same spermatozoa were examined and scored as light, intermediate or dark (mature to arrested-maturity spermatozoa). The effects of arrested sperm maturation were similar with respect to the cytoplasmic and nuclear characteristics of spermatozoa in 84% of cells, indicating that cytoplasmic and nuclear attributes of arrested sperm maturation are related. However, there were moderate (intermediate–dark or intermediate–light patterns, 14.5% of cells) or major (light–dark patterns, 1.6% of cells) discrepancies in the intensity of the double staining patterns. Thus, testing with single maturity markers may not be fully reliable. These findings are important with respect to: (i) arrested sperm maturation; (ii) potential efficacy of antioxidant and similar therapeutic strategies in subfertile men, as spermatozoa with infrastructure defects due to mismaturation or maturation arrest are unlikely to respond to interventions; and (iii) detection of adverse male environmental exposures.

Keywords: anti-oxidant therapy, apoptosis, DNA fragmentation, multiple biochemical probes, persistent histones, sperm maturity

Introduction

DNA integrity is an attribute of paramount importance in spermatozoa, because fragmented DNA in spermatozoa adversely affects the paternal contribution to fertilization and conception, and to zygote development (Aitken *et al.*, 2003, 2004; Seli *et al.*, 2005; Borini *et al.*, 2006; Tarozzi *et al.*, 2007). DNA chain fragmentation is thought to be related to the various nuclear attributes of arrested/diminished sperm maturity, as shown by excessive persistent histones, which indicate a lower efficiency of histone–protamine replacement (Dadoune *et al.*, 1988; Foresta *et al.*, 1992; Hammad *et al.*, 1996; Morel *et al.*, 1998). Lower concentrations of the protamine–DNA complex

render the DNA chains more vulnerable to damage due to inappropriate DNA folding and packaging (Spano *et al.*, 2000; Steger *et al.*, 2003; Ozmen *et al.*, 2007).

Further, studies on sperm maturity and expression levels of the heat shock protein (HspA2) chaperone protein indicated that the low expression of HspA2 in diminished maturity spermatozoa contribute to a reduced DNA repair capacity (Eddy, 1999; Huszar *et al.*, 2000). Indeed, the destruction of the gene for the homologous chaperone protein, HSP70–2, in mice caused diminished sperm production, apoptosis

and male infertility (Dix *et al.*, 1996). Conversely, in human spermatozoa with arrested maturity and low HspA2 concentrations, increased levels of the apoptotic process have been found (Cayli *et al.*, 2004).

Another relevant aspect of DNA damage is the relationship between production of sperm reactive oxygen species (ROS) and arrested sperm maturation. This relationship was established based on proportionally increased ROS production and cytoplasmic retention in spermatozoa, as detected by higher concentrations of sperm creatine kinase (CK) and other cytoplasmic proteins (Aitken *et al.*, 1994; Huszar and Vigue, 1994). A further relationship was demonstrated between sperm cytoplasmic content and the rate of lipid peroxidation measured by malonyl dialdehyde production (a direct end product of lipid peroxidation). Regarding spermatozoa with arrested maturation, in combined fractions of mature spermatozoa and spermatozoa with arrested maturity subjected to repeated co-centrifugation and co-coincubation at 37°C that provided extensive sperm-to-sperm contact, there was no increase in ROS production in the mature sperm fraction. The conclusion was drawn that increased sperm ROS production is primarily an 'inborn' error of arrested spermatogenetic maturation, rather than a process that may be 'acquired' by mature spermatozoa (Huszar and Vigue, 1994). The CK probe of cytoplasmic retention also indicated that in semen samples, there is a polymorphism, as well as a day-to-day and a subject-to-subject variation regarding the proportion of mature and arrested maturity spermatozoa, whether in normozoospermic and oligozoospermic men (Huszar *et al.*, 1988, 2007).

With the various sperm biochemical markers aimed at the cytoplasmic and nuclear attributes of spermatozoa, one can detect features of diminished sperm maturity, including cytoplasmic retention with CK (Huszar and Vigue, 1993), persistent histones by aniline blue staining (Dadoune *et al.*, 1988; Foresta *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 1998), and the presence of active apoptotic process with caspase-3 staining (Cayli *et al.*, 2004). The assessment of DNA degradation is also possible by in-situ DNA nick translation (Irvine *et al.*, 2000).

Most recently, methods were developed the authors' laboratory that allow the application of multiple biochemical probes to the same spermatozoa, in order to explore the hypothesis that there is a relationship between the various nuclear and cytoplasmic attributes in arrested sperm maturation. In the present experiments, this relationship was studied with probe combinations for persistent histones and cytoplasmic retention, persistent histones and DNA degradation, and persistent histones and apoptotic markers.

Materials and methods

Overview of experimental design and methods

The double probing studies in the same spermatozoa were carried out as outlined in **Figure 1**. The steps were as follows. The spermatozoa, smeared onto glass slides, were fixed with

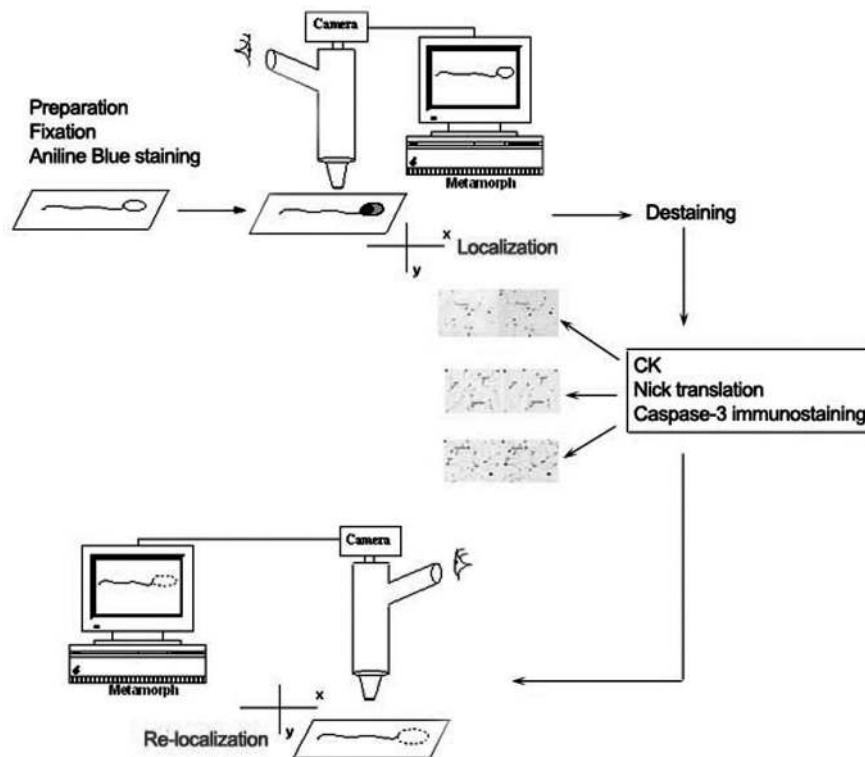


Figure 1. Flow chart of the experimental design. CK = creatine kinase.

methanol–acetic acid, and the sperm cells were stained with aniline blue, a stain that detects persistent histones. Images of sperm fields and individual spermatozoa were then captured using the Metamorph™ imaging program (Universal Imaging Co. Downingtown, PA, USA) (Celik-Ozenci *et al.*, 2003). Subsequently, with the slides still on the microscope platform, the X–Y co-ordinates of the fields were determined, in order to facilitate the re-localization of the same sperm fields. Following this step, the sperm slides were de-stained from aniline blue by overnight incubation in the fixative solutions that were appropriate for the second biochemical markers (methanol for DNA nick translation, and paraformaldehyde for the immunocytochemistry studies). In further steps, the de-stained spermatozoa were treated with one of the second biochemical probes: (i) CK immunocytochemistry to demonstrate cytoplasmic retention in diminished-maturity spermatozoa (Huszar *et al.*, 1993); (ii) DNA nick translation for detection of DNA chain breaks (Irvine *et al.*, 2000); and (iii) caspase-3 immuno-staining to detect the apoptotic process in spermatozoa (Cayli *et al.*, 2004).

Following the staining steps with the second probes, the previously noted X–Y co-ordinates were used to re-locate the same fields that were captured by the Metamorph program following the aniline blue staining. Next, the images of the same spermatozoa treated with the second probe were captured, in order to compare side-by-side the same spermatozoa stained with aniline blue and the second probe applied (**Figures 2, 3 and 4**). The sperm cells, based on the staining intensity, were classified as light (mature), intermediate or dark (arrested-maturity spermatozoa), as described by Huszar *et al.* (2003). In this latter study and in a subsequent study (Huszar *et al.*, 2007), the spermatozoa were probed with the various single biochemical markers, and the sperm staining patterns of parts (a) or (b) of **Figures 2, 3 and 4** in this work were in all aspects comparable with the earlier images.

The men studied presented for semen analysis in the Sperm Physiology Laboratory, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine. All studies were approved by the Yale Human Investigation Committee.

Sperm preparation

Aliquots of liquefied semen were assayed for sperm concentration and motility, and the semen samples were diluted with physiological saline containing 0.3% bovine serum albumin and 30 mmol/l imidazole pH 7.2 (SAIM) up to a final volume of 10 ml. The semen samples were then centrifuged at 500 g for 18 min at room temperature. After the supernatant was discarded, each sperm pellet was re-suspended in the SAIM solution to a concentration of $10\text{--}25 \times 10^6$ sperm/ml. Sperm slides were prepared by smearing 5–10 μ l of sperm suspension onto clean glass slides and allowing them to air-dry. The sperm cells were treated with the various biochemical markers as described below. For the aniline blue/DNA nick translation studies only, the semen samples were first purified by centrifugation through 1.5 ml of a 40% single-phase isolate gradient (Irvin Scientific, Santa Ana, CA) at 500 g for 10 min at room temperature, and the re-suspended sperm pellet fraction was used for the studies.

Aniline blue staining of sperm chromatin

Sperm smears were dried on glass slides and stained with a 5% aniline blue solution (Sigma Co., St Louis, MO, USA) acidified to approximately pH 3.5 with acetic acid. The slides were washed, air-dried and a cover slip was applied before evaluation. Mature spermatozoa, having completed histone–protamine replacement, stained very lightly with aniline blue (light = mature spermatozoa), the slightly immature spermatozoa were stained more extensively (intermediate = diminished maturity), and immature spermatozoa with substantial degrees of persistent histones were darkly stained (dark = immature spermatozoa Huszar *et al.*, 2003). It is of note that the first fixation–aniline blue staining treatment prior to application of the second probe was identical in each of the three double staining studies (**Figure 1**).

For the second probe treatments, the methods used were varied, as the conditions required for the immunological and the DNA nick translation studies were different.

Immunostaining of spermatozoa for CK

After recording the sperm fields, the aniline blue-stained sperm cells were de-stained with 0.5% paraformaldehyde incubation in phosphate buffer/sucrose (PB–suc) overnight at room temperature. All de-staining procedures were carried out on a shaking platform. The formaldehyde was removed by three washing steps with PB–suc, the slides were allowed to air dry, and the spermatozoa were exposed to a 3% bovine serum albumin (BSA) blocking solution in PB–suc at room temperature. After further washing, the spermatozoa were overlaid with a 1:1000 dilution of polyclonal anti–CK–B antiserum (Chemicon Co, Temecula, CA, USA). Following further PB–suc washes, the slides were treated with a biotinylated second antibody (Sigma–Aldrich, Milwaukee, WI) at a 1:1000 dilution and were exposed to a Vector horseradish peroxidase/ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The avidin–biotin complex (ABC)-treated slides were further processed with diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Sigma, St Louis, MO, USA). The developed brown colour highlighted spermatozoa with various degrees of cytoplasmic retention (**Figure 2**). The specificity of the CK staining was established by using pre-immune serum (Sigma–Aldrich, Milwaukee, WI, USA) in place of the first antibody, or by applying the second antibody only. In these experiments, 1284 spermatozoa were studied (four men, concentration: $10.9 \pm 2.2 \times 10^6$ /ml, motility: $32.5 \pm 4.8\%$, 321 sperm/man, range: 209–610).

Immunostaining of spermatozoa for caspase-3

The de-staining and other procedures for caspase-3 immunocytochemistry were carried out similarly to those described for CK immunostaining (Cayli *et al.*, 2004). However, after the spermatozoa were exposed to the 3% BSA blocking solution, they were treated with a 1:300 dilution of active caspase-3 (PharMingen, San Diego, CA, USA) antibody overnight at 4°C. Further, the slides were processed with 1:1000 dilution of a biotinylated anti-rabbit second antibody (Vector

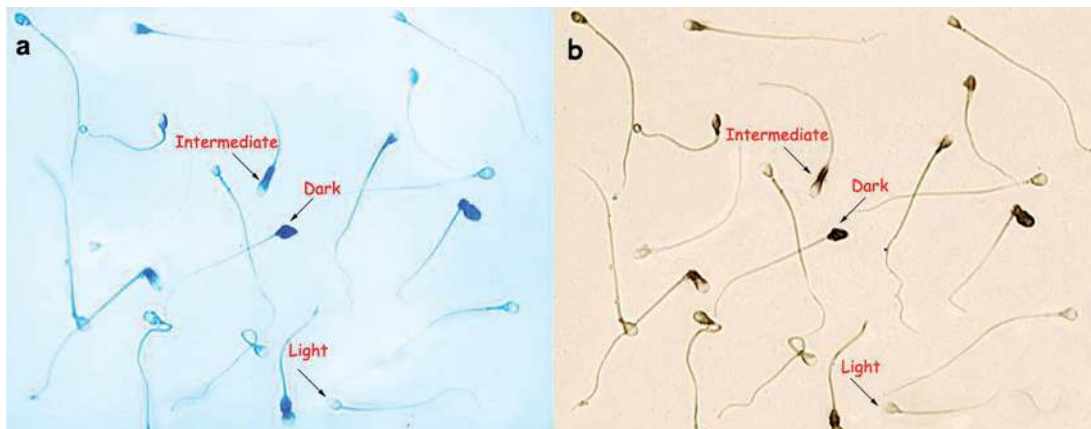


Figure 2. (a) Aniline blue staining and (b) creatine kinase (CK)-immunostaining of the same spermatozoa. Note the substantial degree of similarity in the light-, intermediate- and dark-staining patterns with aniline blue and CK.

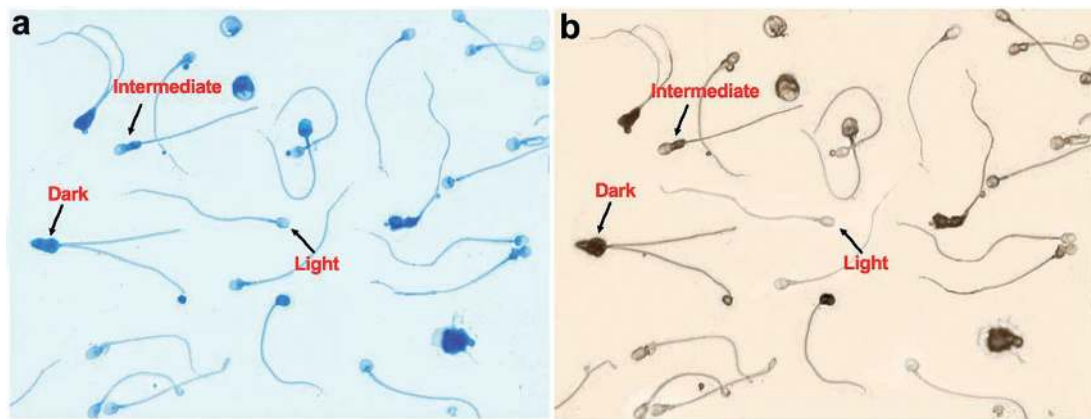


Figure 3. (a) Aniline blue staining and (b) caspase-3 immunostaining of the same spermatozoa. Note the similarity in the light-, intermediate- and dark-staining patterns of the aniline blue and caspase-3 panels. Also, caspase-3 immunostaining is present in the mid-piece of intermediate-type spermatozoa, whereas in dark spermatozoa with more extensive maturity arrest both the head and the mid-piece are stained (a and b).

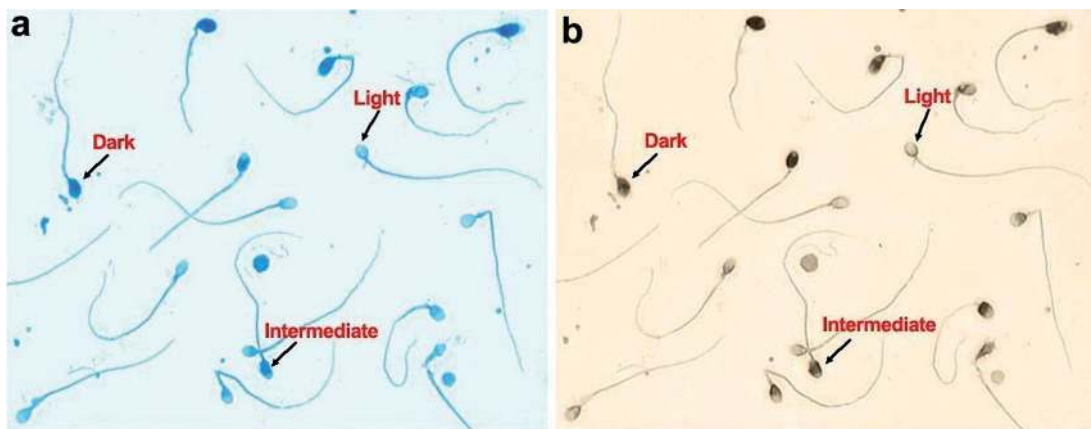


Figure 4. (a) and (b) DNA nick translation of the same spermatozoa. Note the substantial degree of similarity in the light-, intermediate- and dark-staining patterns with the two methods.

Laboratories). The brown colour representing the caspase-3 content of spermatozoa was developed by the ABC method (Vector and Sigma; **Figure 3**). The specificity of staining was established by applying the secondary antibody only. These studies were carried out in 2101 spermatozoa (4 men, sperm concentration: $11.9 \pm 1.4 \times 10^6$ ml, motility: $34.0 \pm 6.6\%$).

Assessment of DNA integrity by nick translation

The basic concept of the assay is as follows. The enzyme DNA polymerase repairs DNA strand breaks by incorporation of nucleotides. However, one of the repair elements is biotin-labelled dUTP, which serves as the anchor for avidin-conjugated horseradish peroxidase. Thus, after the assay, the horseradish peroxidase-generated colour in a spermatozoon is proportional to the extent of DNA breaks and repair (Irvine *et al.*, 2000).

All steps were carried out at room temperature. After recording of the fields, the aniline blue-stained sperm cells were destained in 30% methanol overnight. Further, the slides were covered with 20 mmol/l of imidazole buffer pH: 7.0 for 1 h, and 30% methanol applied for 15 min, followed by air drying. The slides were further treated with methanol-glacial acetic acid (3:1) for 15 min. After exposure to a dehydrating ethanol series (70, 85, 100%), the slides were air dried and treated with 10 mmol/l dithiothreitol (DTT) (in 100 mmol/l Tris, pH: 7.2) for 30 min to initiate DNA decondensation. After a washing step with 100 mmol/l Tris, pH 7.2, the slides were exposed to 10 mmol/l lithium diiodosalicylic acid in 100 mmol/l Tris, pH 7.2 for 3 h. Following further washing with PBS, the slides were blocked with biotin (1:10 dilution of a 0.01% stock) for 20 min, washed again, and then blocked with avidin (1:10 dilution of a 1 mg/ml solution) for 20 min. Further, the slides were exposed to a solution containing 1 mmol/l DTT, 10 mmol/l MgSO_4 , 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7.2, 0.01 mmol/l biotin-16-dUTP, and a 0.01 mmol/l mix of dGTP, dCTP, dATP, and DNA polymerase I (0.025 IU/ml) for 30 min. The repair with biotin-labelled nucleotides was detected by avidin-biotin horseradish peroxidase using the Vector ABC method (Vector Laboratories; all other chemicals were from Sigma). After further washing, the slides were developed in 3,3-diaminobenzidine solution for 10–15 min. The slides were counterstained with Coomassie Blue (0.04% in 25% isopropanol, 10% glacial acetic acid) for 30 s, in order to optimise visualization of the sperm contours. The slides were then washed, and mounted with Permount (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI) (**Figure 4**). In these experiments, 2446 spermatozoa were studied (5 men, sperm concentrations: $17.6 \pm 1.1 \times 10^6$ sperm/ml, motility: $38.4 \pm 5.9\%$, 489 sperm/man; range: 276–602).

Evaluation of sperm morphology

Sperm smears were dried on glass slides and stained with Diff-Quik (Dade-Behring, Newark, USA) according to the manufacturer's instructions. The slides were scored by two investigators in a blinded manner according to the Tygerberg criteria (Kruger *et al.*, 1986, 1988; Menkveld *et al.*, 1990; WHO, 1999). The results were averaged for each slide.

Statistical analysis

Data analysis was carried out using Sigma-Stat 2.0 (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Differences among groups, and the various morphometric parameters, were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) on normally distributed data, and one-way ANOVA on ranks test on data that were not normally distributed. Following ANOVA, Dunn's *post hoc* test was performed. Data analysis was carried out using R statistical software (R Core Development Team, Vienna, Austria) and Sigma-Stat 2.0 (Jandel Corporation). All data are presented as mean $\pm$ SEM.

In order to compare the level of agreement between probe pairs in the same spermatozoa, weighted kappa analysis with quadratic weights was used. A rating scale for kappa, suggested by Altman (1991), indicates that a kappa value >0.8 represents an excellent level of agreement.

Results

Experimental design

In this series of studies, two biochemical probes were applied on the same sperm cell following the experimental scheme of **Figure 1**. For these experiments, oligozoospermic or low normal sperm concentration samples were selected in order to achieve an adequate representation of arrested/diminished maturity spermatozoa. Approximately 5600 double stained spermatozoa were studied, originating from semen samples from 13 men (mean sperm concentration: $25.0 \pm 6.2 \times 10^6$ ml, motility: $36.2 \pm 6.5\%$). It is of note that the double-stained sperm cells in **Figures 2, 3, and 4** are from individual semen samples.

Double probing of spermatozoa with CK-immunocytochemistry and aniline blue staining

In the first study, the spermatozoa were double stained with nuclear and cytoplasmic markers of arrested sperm maturation. Initially, aniline blue was applied to highlight the presence of persistent histones, and this step was followed by CK immunocytochemistry. As **Figure 2a,b** indicates, the spermatozoa stained light, intermediate or dark, represent spermatozoa that are mature, intermediate maturity or diminished maturity respectively. There was good agreement between the two staining patterns with the aniline blue and CK probes. The dark spermatozoa showed high degrees of persistent histones as well as retained cytoplasm. A quantitative analysis of the 1284 cells evaluated is presented in **Table 1**. The actual number of spermatozoa with light-light, intermediate-intermediate and dark-dark staining, and the proportion of spermatozoa expressed as a percentage of the total, is presented.

The majority of the spermatozoa follow a light-light (approximately 40%), intermediate-intermediate (approximately 25%) and dark-dark (approximately 18%) pattern. The representation of intermediate-light or intermediate-dark is approximately 18%, whereas spermatozoa with the discordant

staining pattern of light–dark and dark–light occur only in <1% of the cells. Thus, 82% of the spermatozoa showed conforming staining patterns with the biochemical markers of nuclear (persistent histones) and cytoplasmic (cytoplasmic retention) probes of sperm maturity/arrested maturity.

Double probing of the same spermatozoa with aniline blue and for DNA chain fragmentation with DNA nick translation

In this study, similar to the previous experiment, the sperm fields were stained first with aniline blue, and in-situ DNA nick translation was subsequently performed on the same cells. **Figure 4a,b** demonstrates a substantial agreement between the staining patterns with the two nuclear markers. In **Table 2**, the distribution of the 2446 spermatozoa studied with both probes is presented. The overwhelming majority of spermatozoa showed staining patterns that were conforming, as light–light ($n = 1261$), intermediate–intermediate ($n = 498$), and dark–dark ($n = 291$). The data are also expressed as a proportion of all spermatozoa, as light–light (approximately 52%), intermediate–intermediate (approximately 20%) and dark–dark (approximately 12%), 84% in all. Sperm cells with heterogeneous staining of light–intermediate, dark–intermediate, intermediate–light or intermediate–dark, were approximately 15% of the population, whereas the discordant light–dark or dark–light spermatozoa represented approximately

1.2%. As with the aniline blue–CK experiment, 84% of the spermatozoa showed an identical staining pattern between aniline blue and DNA fragmentation. Thus, spermatozoa with arrested maturity and persistent histones also exhibited a high level of DNA degradation (about 12% of the population), and about 52% of the sperm population tested normally developed mature cells, devoid of both persistent histones and DNA fragmentation.

Double probing of spermatozoa with aniline blue and caspase-3

In **Figure 3a,b**, fields of spermatozoa double stained with aniline blue and caspase-3 immunostaining can be seen. As **Table 3** indicates, 2101 spermatozoa were evaluated for the staining patterns. There was light–light staining in 1047 spermatozoa, intermediate–intermediate pattern in 483 spermatozoa and dark–dark staining in 261 cells. Light–light pattern occurred in approximately 50% of the spermatozoa, intermediate–intermediate pattern in 23% and dark–dark diminished maturity pattern in about 12% of spermatozoa. Thus, as with the other cytoplasmic and nuclear markers (**Tables 1 and 2**), approximately 85% of the double stained spermatozoa showed conforming staining patterns with aniline blue and the apoptotic marker. Similarly to the other markers, intermediate–light or intermediate–dark sperm staining occurred in about 14% of the cells, and the discordant pattern of dark–light and light–dark staining was <1.0%.

Sperm shape and sperm maturity

Sperm morphology evaluated according to the Tygerberg strict criteria seems to be related to the sperm biochemical maturity because the abnormal head and mid-piece shapes, and abaxial insertion of the tail occur as a consequence of cytoplasmic retention in spermatozoa with arrested spermatogenic maturation. The shorter sperm tail, characteristic for spermatozoa with arrested maturity, is also a component of the Kruger strict morphology evaluation.

Table 1. Double probing of spermatozoa with aniline blue and creatine kinase (CK) immunocytochemistry.

Aniline blue staining	CK staining		
	Light	Intermediate	Dark
Light	511 (39.8)	117 (9.1)	3 (0.2)
Intermediate	34 (2.6)	313 (24.4)	47 (3.7)
Dark	1 (0.1)	34 (2.6)	224 (17.4)

Total of 1284 spermatozoa studied from four men (sperm concentration: $10.9 \pm 2.2 \times 10^6/\text{ml}$, motility: $32.5 \pm 4.8\%$).
Values are actual numbers of spermatozoa (% of total).

Table 2. Double probing of spermatozoa with aniline blue and DNA nick translation.

Aniline blue staining	DNA nick translation		
	Light	Intermediate	Dark
Light	1261 (51.6)	162 (6.6)	20 (0.8)
Intermediate	80 (3.3)	498 (20.4)	71 (2.9)
Dark	8 (0.3)	55 (2.2)	291 (11.9)

Total of 2446 spermatozoa studied from five men (sperm concentration: $17.6 \pm 1.1 \times 10^6/\text{ml}$, motility: $38.4 \pm 5.9\%$).
Values are actual numbers of spermatozoa (% of total).

Table 3. Double probing of spermatozoa with aniline blue and caspase-3.

Aniline blue staining	Caspase-3 staining		
	Light	Intermediate	Dark
Light	1047 (49.8)	123 (5.9)	3 (0.1)
Intermediate	77 (3.7)	483 (23.0)	46 (2.2)
Dark	0 (0.0)	61 (2.9)	261 (12.4)

Total of 2101 spermatozoa studied from four men (sperm concentration: $11.9 \pm 1.4 \times 10^6/\text{ml}$, motility = $34.0 \pm 6.6\%$).
Values are actual numbers of spermatozoa (% of total).

The relationship between Tygerberg normal morphology and aniline blue staining intensity was studied in five samples by counting approximately 400 spermatozoa for each patient ($n = 3882$ in all, evaluated by two investigators independently). Within the groups of spermatozoa that stained light (normal spermatozoa), intermediate (intermediate maturity) and dark (diminished maturity), the proportion of Tygerberg normal spermatozoa were 9.5 ± 1.3 , 2.3 ± 0.9 and $0.5 \pm 0.3\%$ respectively. There were significant differences in the light versus intermediate ($P < 0.05$), and intermediate versus dark groups ($P < 0.01$). Thus, there is a relationship between the proportion of spermatozoa with various degrees of arrested maturity and abnormal Tygerberg morphology.

Inter-subject variation in staining patterns with the various probes

In order to better evaluate the validity of the two probe staining pattern data, variations among the men studied with each probe combination are presented.

Within the group of four men whose spermatozoa were studied with the aniline blue–CK immuno-probe combination, the proportion of light–light spermatozoa was $36.0 \pm 4.4\%$ (mean $\pm$ SEM), and in the individual men 34.4, 30.3, 30.4 and 48.9%, respectively, the mean incidence of intermediate–intermediate staining was $24.9 \pm 4.1\%$ (25.8, 15.8, 35.4 and 22.8%), whereas spermatozoa with dark–dark pattern were present in $21.1 \pm 5.9\%$ (28.7, 33.3, 12.7 and 9.5%).

In the group of five men whose spermatozoa were studied with aniline blue–DNA nick translation, the mean light–light pattern was $52.0 \pm 6.7\%$ (54.8, 66.4, 32.9, 55.2 and 50.8%), the mean intermediate–intermediate pattern was $19.7 \pm 1.9\%$ (20.6, 16.6, 25.9, 20.5 and 15.0%). The dark–dark pattern was $12.2 \pm 1.7\%$ (12.5, 7.2, 16.1, 9.8 and 15.4%).

Finally, within the group of four men whose spermatozoa were double stained with aniline blue–caspase 3, the proportion of light–light spermatozoa was $49.4 \pm 6.7\%$ (44.5, 56.7, 33.2 and 63.3%) and the intermediate–intermediate stained spermatozoa were 23.3 ± 3.5 (30.3, 26.4, 20.9 and 14.4%). Further, the dark–dark spermatozoa were $12.7 \pm 5.5\%$ (11.3, 3.5, 28.3 and 7.6%).

Interpretation of the staining patterns: a close relationship among probes

The consistently high agreement (83–85% overlap) of probe signal within the mature, intermediate and arrested/diminished maturity spermatozoa, indicates that cytoplasmic retention, DNA chain fragmentation and the presence of the apoptotic process are all related to persistent histones.

This relationship among the various nuclear and cytoplasmic probes was quantified with regression analysis based on the weighted kappa method. There was a very close correlation ($\kappa = 0.8$) among the attributes of arrested maturation within the same sperm cell. Thus, double probing of the same spermatozoa is an extremely sensitive demonstration of the proportion of mature and immature spermatozoa in semen.

Discussion

In these experiments, individual spermatozoa have been studied with probes for persistent histones combined with other probes for cytoplasmic retention, for apoptotic processes, and for DNA fragmentation with in-situ nick translation. All these probes provide light, intermediate and dark staining patterns representing mature, intermediate maturity and arrested/diminished maturity spermatozoa respectively (Huszar *et al.*, 2003). In line with the present hypothesis, approximately 84% of the spermatozoa studied showed maturity levels with aniline blue that were consistent with the staining patterns for cytoplasmic retention, DNA chain fragmentation, and the presence of the apoptotic process. These attributes are also related to persistent histones, and presumably also to lower expression of transition proteins and protamines (Steger *et al.*, 2003; Aoki *et al.*, 2006).

Thus, there is substantial agreement between the cytoplasmic and nuclear probes of maturity in individual spermatozoa.

Confirming that the cytoplasmic and nuclear attributes of arrested sperm maturity are related, there was >80% agreement in the presence or absence of the cytoplasmic and nuclear biochemical marker combinations within individual spermatozoa. Thus, the majority of sperm cells with DNA fragmentation also showed diminished sperm maturity, as detected by cytoplasmic retention, aniline blue staining and apoptotic processes. In **Figure 3a,b**, one can observe fields of spermatozoa double stained with aniline blue and caspase-3 immunostaining. Caspase-3 is an important marker because it is a probe of active apoptotic processes in conjunction with cytoplasmic retention, and in some spermatozoa with the expression of the anti-apoptotic protein, Bclx2 (Carrell *et al.*, 2003; Cayli *et al.*, 2004; Seli *et al.*, 2005).

In addition to the relationship between arrested sperm maturity and DNA integrity, the data also contribute to the compensatory concepts of sperm DNA fragmentation, and to the limitations of antioxidant therapy and similar strategies. It is likely that a substantial proportion of spermatozoa with arrested maturation and related defects of spermatogenesis, as well as the consequential infrastructure deficiencies, would not and could not respond to such therapeutic interventions (Gil-Guzman *et al.*, 2001; Aitken *et al.*, 2003; Steger *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Agarwal and Said, 2005; Comhaire *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2005; Lewis and Aitken, 2005; Aitken and Baker, 2006; Ménéz *et al.*, 2007).

Considering the nuclear probes, the aniline blue–DNA fragmentation and the aniline blue–caspase combinations indicated that approximately 12% of spermatozoa showed arrested maturity, whereas with the aniline blue–cytoplasmic retention probes there was a slightly higher, approximately 17%, incidence of spermatozoa with dark and intermediate staining. It is unclear whether this difference arises from the probe specific attributes alone, or because spermatozoa that show nuclear impact of immaturity survive at a lower rate.

Approximately 15% of spermatozoa tested with any probe combination showed an intermediate–light or intermediate–dark maturity pattern. In these spermatozoa one can see signs of

arrested maturity with one probe that is not detected to the same extent with another probe. This is an important finding for two reasons. First, this heterogeneity in staining intensity or in the regional distribution of markers in the head and mid-piece is in line with the polymorphic attributes of spermatozoa. Thus, even in arrested maturity the sperm cell may follow a variety of pathways (Huszar *et al.*, 2003, 2007). Second, due to this polymorphism, it has become apparent that one cannot determine sperm maturity reliably with a single probe. However, the quick aniline blue test is very useful in detecting the proportion of spermatozoa that are suspected to be of arrested maturation in semen (Dadoune *et al.*, 1988; Foresta *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1992; Morel *et al.*, 1998).

The association between aniline blue staining and caspase-3 in the same spermatozoa suggests that DNA degradation is also related to arrested maturity. An earlier study investigated why these spermatozoa with increased levels of cytoplasmic retention, caspase-3 content and DNA fragmentation survive to be ejaculated rather than, as one would expect, being eliminated by apoptosis within the adluminal area or in the epididymis (Cayli *et al.*, 2004). The probe studies demonstrated the simultaneous presence of caspase-3 and the anti-apoptotic Bclx2 protein in these surviving arrested maturity cells. Further, caspase-3 and Bclx2 were located almost exclusively together in the mid-piece. These data suggest that these spermatozoa overcome apoptotic decay due to the protective Bclx2.

Additional factors that may lead to DNA strand breaks in arrested maturity spermatozoa include an impaired capacity for DNA repair due to the low levels of HspA2 chaperone, which would normally deliver the enzymes and other DNA repair components. Low HspA2 chaperone levels cause meiotic errors and chromosomal aneuploidies, diminished zona pellucida binding, low fertilization and oocyte activation rates, and increased miscarriage rates due to defects of paternal contribution of spermatozoa (Aitken and Baker, 2006; Huszar *et al.*, 2007). Whatever cause may prevail, in the present study it has been established that DNA chain breaks are related to arrested sperm maturity, whether shown by one or more of the nuclear and cytoplasmic probes. Additional adverse effects related to persistent histones may reflect the upstream events of spermatogenesis, as indicated by aberrant protamine-1/protamine-2 ratios at both the mRNA and protein levels in spermatozoa with arrested maturity (Steger *et al.*, 2003; Aitken *et al.*, 2004; Agarwal *et al.*, 2005; Seli and Sakkas 2005).

Another relevant aspect is that spermatozoa with intermediate or dark staining with probes of arrested maturity may also exhibit shape properties that reflect the spermatogenetic defects with respect to cytoplasmic retention and tail sprouting, such as lower proportion of spermatozoa with normal head shape, abaxial insertion of the tail, shorter tail length, or lower tail length/head long axis ratio (Gergely *et al.*, 1999; Celik-Ozenci *et al.*, 2003; Chemes and Rawe, 2003). The shorter sperm tail, characteristic for spermatozoa with arrested maturity, is also a component of the Tygerberg strict morphology evaluation. (Menkveld *et al.*, 1990; Gergely *et al.*, 1999; WHO, 1999; Carrell *et al.*, 2003; Celik-Ozenci *et al.*, 2004). Mature spermatozoa present in sperm-hemizona complexes are clear headed. This supports the idea that sperm shape may also be considered as a biochemical parameter (Huszar *et al.*, 2007).

The study of individual spermatozoa with the various probes provides enhanced levels of statistical power in the analysis of mature and immature spermatozoa, and with this approach, a close correlation was demonstrated between the maturity attributes ($\kappa = 0.8$). It is suggested that this type of analysis, and the use of biomarkers, will be useful in men exposed to environmental reproductive toxicity. It is further suggested that this may be particularly true in the early stages of exposure, when the toxic agents interfere only with sperm maturation, but have not yet placed stress on daily sperm production to cause a decline in sperm concentrations.

The presence of spermatozoa with various degrees of maturity in semen samples further supports the day-to-day and man-to-man variations in sperm maturity, independent of sperm concentrations (Huszar *et al.*, 1992, 2003, 2007). The pregnancy success in couples treated with intrauterine insemination or IVF was inversely related to the proportion of spermatozoa with arrested maturation, as indicated by sperm cytoplasmic retention and HspA2 concentrations (Huszar *et al.*, 2007). Further, IVF fertilization rates are inversely related to DNA damage (Sakkas *et al.*, 1999; Greco *et al.*, 2005), although intracytoplasmic sperm injection fertilization rates seem to be normal with spermatozoa with damaged DNA. This discrepancy may be due to the fact the paternal genome is only expressed at around the 4- to 8-cell stage of human embryos; thus, the DNA breaks may not have an effect in fertilization or in very early development, but the negative effect becomes apparent in the later embryonic stages. Indeed, the proportion of spermatozoa with DNA fragmentation was related to the time needed to achieve pregnancy, and DNA fragmentation was more extensive in men whose wives suffered recurrent pregnancy loss compared with sperm donors in the general population. Also, the incidence of miscarriage is higher with the less mature testicular spermatozoa, compared with ejaculated spermatozoa (Evenson *et al.*, 1999; Spano *et al.*, 2000; Virro *et al.*, 2004).

The present data are also relevant to therapies directed to improve male subfertility, including several lines of research exploring new strategies or therapeutic interventions, i.e. antioxidant therapy, for the prevention or repair of sperm DNA fragmentation, which causes a decline in fertility and the paternal contribution of spermatozoa to the zygote (Aitken *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2003; Agarwal and Said, 2005; Comhaire *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2005; Lewis and Aitken, 2005; Tesarik *et al.*, 2006). However, intermediate and diminished maturity spermatozoa, approximately 40% of spermatozoa in this study, in addition to DNA chain fragmentation, show cytoplasmic retention, persistent histones, apoptotic processes, and structural defects of spermatogenetic and spermatogenetic origin. Those cells with a defective infrastructure are not likely to be amenable to repair. Thus, the study of sperm maturity is relevant to assessment of the potential sperm pool that would be available for improvement by therapeutic interventions. Otherwise, the proportion of spermatozoa that are subject to rescue might be overestimated (Ménézo *et al.*, 2007).

Acknowledgements

This work was supported by NIH grants to GH (HD-19505, OH-04061) and was partially supported by the Research Fund of Akdeniz University, Antalya, Turkey. This study was a part of the Master of Science thesis of Leyla Sati.

References

- Agarwal A, Said TM 2005 Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *British Journal of Urology International* **95**, 503–507.
- Aitken RJ, Baker MA 2006 Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Molecular and Cellular Endocrinology* **250**, 66–69.
- Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE 2004 Seeds of concern. *Nature* **432**, 48–52.
- Aitken RJ, Baker MA, Sawyer D 2003 Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive BioMedicine Online* **7**, 65–70.
- Aitken RJ, Krausz C, Buckingham D 1994 Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Molecular Reproduction and Development* **39**, 268–279.
- Altman DG 1991 *Practical Statistics for Medical Research*. Chapman and Hall, London.
- Aoki VW, Liu L, Jones KP et al. 2006 Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertility and Sterility* **86**, 1408–1415.
- Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D et al. 2006 Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Human Reproduction* **21**, 2876–2881.
- Carrell DT, Wilcox AL, Lowy L et al. 2003 Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss. *Obstetrics and Gynecology* **101**, 1229–1235.
- Cayli S, Sakkas D, Vigue L et al. 2004 Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Molecular Human Reproduction* **10**, 365–372.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T et al. 2004 Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction* **19**, 2052–2059.
- Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A et al. 2003 Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biology of Reproduction* **69**, 1347–1355.
- Chemes EH, Rawe YV 2003 Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update* **9**, 405–428.
- Comhaire FH, El Garem Y, Mahmoud A et al. 2005 Combined conventional/antioxidant 'astaxanthin' treatment for male infertility: a double blind, randomized trial. *Asian Journal of Andrology* **7**, 257–262.
- Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML 1988 Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* **20**, 211–217.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW et al. 1996 Targeted gene disruption of Hsp70–2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**, 3264–3268.
- Eddy EM 1999 Role of heat shock protein HSP70–2 in spermatogenesis. *Reviews of Reproduction* **4**, 23–30.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D et al. 1999 Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* **14**, 1039–1049.
- Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A 1992 Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *International Journal of Andrology* **15**, 330–337.
- Gergely A, Kovanci E, Senturk L et al. 1999 Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Human Reproduction* **14**, 2007–2014.
- Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC et al. 2001 Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* **16**, 1922–1930.
- Greco E, Iacobelli M, Rienzi L et al. 2005 Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology* **26**, 349–353.
- Hammadeh ME, al-Hasani S, Stieber M et al. 1996 The effect of chromatin condensation (aniline blue staining) and morphology (strict criteria) of human spermatozoa on fertilization, cleavage and pregnancy rates in an intracytoplasmic sperm injection programme. *Human Reproduction* **11**, 2468–2471.
- Huszar G, Vigue L 1994 Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *Journal of Andrology* **15**, 71–77.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D et al. 2007 Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive BioMedicine Online* **14**, 650–663.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S et al. 2003 Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility* **79** (Suppl. 3), 1616–1624.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L 2000 Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biology of Reproduction* **63**, 925–932.
- Huszar G, Vigue L, Morshedi M 1992 Sperm creatine phosphokinase M-isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **57**, 882–888.
- Huszar G, Vigue L, Corrales M 1988 Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variable spermic, and oligospermic men. *Biology of Reproduction* **38**, 1061–1066.
- Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL et al. 2000 DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *Journal of Andrology* **21**, 33–44.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF et al. 1988 Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **49**, 112–117.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS et al. 1986 Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **46**, 1118–1123.
- Lewis SE, Aitken RJ 2005 DNA damage to spermatozoa has impacts on fertilization and pregnancy. *Cell and Tissue Research* **322**, 33–41.
- Liu DY, Baker HW 1992 Sperm nuclear chromatin normality: relationship with sperm morphology, sperm–zona pellucida binding, and fertilization rates in vitro. *Fertility and Sterility* **58**, 1178–1184.
- Ménézo YJ, Hazout A, Panteix G et al. 2007 Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reproductive BioMedicine Online* **14**, 418–421.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ et al. 1990 The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* **5**, 586–592.
- Morel F, Mercier S, Roux C et al. 1998 Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertility and Sterility* **69**, 1122–1127.
- Ozmen B, Koutlaki N, Youssry M et al. 2007 DNA damage of human spermatozoa in assisted reproduction: origins, diagnosis, impacts and safety. *Reproductive BioMedicine Online* **14**, 384–395.
- Sakkas D, Mariethoz E, St John JC 1999 Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Experimental Cell Research* **251**, 350–355.
- Seli E, Sakkas D 2005 Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Human Reproduction Update* **11**, 337–349.
- Spano M, Bonde JP, Hjøllund HI et al. 2000 Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study

- Team. *Fertility and Sterility* **73**, 43–50.
- Steger K, Fink L, Failing K *et al.* 2003 Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men. *Molecular Human Reproduction* **9**, 331–336.
- Suzuki M, Kurabayashi T, Yamamoto Y *et al.* 2003 Effects of antioxidant treatment in oligozoospermic and asthenozoospermic men. *Journal of Reproductive Medicine* **48**, 707–712.
- Tarozzi N, Bizzaro D, Flamigni C, Borini A 2007 Clinical relevance of sperm DNA damage in assisted reproduction. *Reproductive Biomedicine Online* **14**, 746–757.
- Tesarik J, Mendoza-Tesarik R, Mendoza C 2006 Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reproductive Biomedicine Online* **12**, 715–721.
- Virro MR, Larson-Cook KL, Evenson DP 2004 Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility* **81**, 1289–1295.
- WHO 1999 *WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm–Cervical Mucus Interaction*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Declaration: The authors report no financial or commercial conflicts of interest.*
- Part of this research was presented at the 60th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine, October 16–20, 2004, Philadelphia, Pennsylvania, USA.*
- Received 30 July 2007; refereed 12 September 2007; accepted 23 November 2007.*



The Presence of Kinesin Superfamily Motor Proteins KIFC1 and KIF17 in Normal and Pathological Human Placenta

L. Sati, Y. Seval-Celik, G. Unek, E.T. Korgun, R. Demir*

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 16 July 2009

Keywords:

Human placenta
KIFC1
KIF17
Preeclampsia
Diabetes
Placental transport

ABSTRACT

Kinesin superfamily proteins (KIFs) are motor proteins that participate in chromosomal and spindle movements during mitosis and meiosis, and transport membranous organelles and macromolecules fundamental for cellular functions. Although the roles of KIFs in axonal and dendritic transports have been studied extensively, their role in intracellular transport in general is less well known. The diversity of kinesins suggests that each kinesin may have a specific function. Therefore, in this study we aimed to investigate the presence and cellular localization of KIFC1 and KIF17 in normal and pathological human placentas. First-trimester (22–56 days) and normal, preeclamptic (PE), and diabetic-term placental tissues were obtained and further studied by immunohistochemistry (IHC) and Western blot methods.

KIFC1 was mainly localized to the syncytiotrophoblast both in early and term placental samples. However, a stronger immunoreactivity was observed both in PE and diabetic placentas compared to normal-term placentas. KIF17 was most intensively localized in developing vascular endothelium in early pregnancy. Even though KIF17 was moderately stained in the endothelium of villi from normal human-term placentas, stronger immunoreactivity was observed in all types of villi of both PE and diabetic placentas. Western blotting of tissue extracts confirmed the IHC results.

Here, we demonstrate the presence of KIFC1 and KIF17 in human placenta for the first time. The intense expression of KIFC1 in syncytiotrophoblast and KIF17 in vascular endothelium suggests that both the proteins might be important in a cargo-transport system. An increased expression pattern of both KIFC1 and KIF17 in PE and diabetes might suggest that these proteins may be involved in complex trophoblast functions and placental pathologies. Further studies will clarify the physiological role of KIFs in human placental transport and development.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The placenta is unique among all other organs in that it conducts the functional activities of most fetal organs (except the locomotor apparatus and the central nervous system) throughout its development. Fetal gas transfer, excretion, catabolism, resorption, and numerous metabolic, secretory, and immunological functions are partially or completely performed by the placenta during pregnancy as a substitute for still immature embryonic and fetal organs [1]. Abnormalities in any one of these functions can be associated with poor pregnancy outcome, ranging from the mild (intrauterine growth restriction, IUGR) to the severe (implantation failure and embryonic, fetal, or perinatal death).

Maternofetal and fetomaternal diffusional transfer depends on the thickness of the separating layers, whereas facilitated transport,

active transport, and vesicular transfer are influenced by the number and kind of layers of the barrier. Increasing knowledge of placental physiology lets us know that synthetic, secretory, and transport functions of the placenta are important aspects of this organ [2]. Also, it has been found that transporters play an important role in this nutrient and waste exchange in the placenta [3, 4]. The trafficking of proteins is tightly regulated, and various different types of proteins are known to be involved.

Kinesin superfamily proteins (KIFs) and cytoplasmic dyneins serve as motors that move along microtubules carrying cargoes such as organelles including mitochondria, lysosomes, synaptic vesicles, protein complexes, and mRNAs [5–8]. Axonal and dendritic transports serve as ideal systems for studying motors involved in intracellular transport. However, studies have also shown that transport mechanisms found in neurons are operational in other cell types as well.

The 45 KIFs have been classified into three major types on the basis of the position of the motor domain: NH2-terminal motor domain type, middle motor domain type, and COOH-terminal

* Corresponding author. Tel.: +90 242 2496881; fax: +90 242 2274486.
E-mail address: rdemir@akdeniz.edu.tr (R. Demir).

motor domain type (called N-kinesin, M-kinesin, and C-kinesin, respectively) [7,9]. Motor domain includes a p-loop motif, switch 1 and 2 motifs, and microtubule-binding regions [6] and utilizes ATP to fuel their movement along microtubules. Microtubules serve as rails for these transportation proteins and have a polarity in a manner in which there is a fast-growing plus end and a relatively stationary minus end. Outside the motor domain, kinesins also contain different stalk and tail domains that mediate oligomerization, regulation of motor activity, and interactions with their specific cargos [10]. The organization is tightly regulated in cells. Although the motor domain is highly conserved among different KIFs, regions other than the motor domain are quite divergent and these regions serve as cargo-binding domains. The sequence diversity of the cargo-binding domains explains why KIFs transport a wide variety of cargoes, including membranous organelles and macromolecular complexes.

It is becoming increasingly clear that the cell uses a number of KIFs and tightly controls the direction, destination, and velocity of transport of various important functional molecules. How motors regulate the binding and release of their cargo is critical; however, only a few studies have attempted to address this important question [11–14].

It is known that the placenta is an organ that develops in a short period of time, and that its functions change with the progress of gestation. It has been shown that the expression levels of amino acid transporters, glucose transporters, placental efflux transporters such as P-glycoprotein (P-gp), and other transporters that contribute to the transfer of nutrients and waste between mother and the fetus change during pregnancy [15–17]. The properties of these transporters are still largely obscure. Therefore, the aim of this study was to determine by immunohistochemistry and Western blot analysis, first, the presence and cellular localization of two different kinesins, KIFC1, a C-kinesin, and KIF17, an N-kinesin, in the very early human placenta at various days of gestation and second, their expression in normal and pathological (diabetes and preeclampsia) human-term placentas.

2. Materials and methods

2.1. Tissue collection

A total of 26 samples of human early placental tissue [six samples at 22–28 days (fourth week p.c.); eight samples at 29–35 days (fifth week p.c.); seven samples at 36–42 days (sixth week p.c.); and five samples at 43–49 days (seventh week p.c.)] in the first trimester of pregnancy were obtained after legal termination of pregnancy by curettage for medical or psychosocial reasons, which were unlikely to affect placental structure and function. Besides, placentas from uncomplicated pregnancies ($n = 5$) and those affected by either pregestational insulin-dependent diabetes mellitus or by preeclampsia were obtained after vaginal delivery or cesarean section at term ($n = 4$ each). Preeclampsia was defined as occurrence of hypertension (sustained blood pressure greater than 140 mmHg systolic and 90 mmHg diastolic), edema, and proteinuria ($\geq 1^+$ protein on dip stick) after 20 wk gestation in a previously normotensive woman. Preeclampsia was associated with intrauterine growth restriction based on both birth weight and placental size in the samples studied. None of the normal pregnancies were receiving hormone treatment. Tissues were obtained from the Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, and Clinic of Obstetrics and Gynecology, Government Hospital, Antalya. Informed consent forms and protocols to use the tissue were approved by the Ethical Committee of the Faculty of Medicine in Akdeniz University.

Placentas were transported to the laboratory immediately and (1) were embedded in paraffin for further immunohistochemical analysis and (2) were snap-frozen in liquid nitrogen for Western blot analysis. For light microscopic analysis, tissue samples were fixed with 10% neutral formaldehyde for 12 h and were dehydrated in ethanol, cleared in xylene, and embedded in paraffin.

2.2. Immunohistochemistry

Serial sections at 5 μ m thickness were collected on poly-L-lysine-coated slides (Sigma, St. Louis, MO), dewaxed, rehydrated, and placed in citrate buffer. To unmask antigens, an antigen-retrieval procedure was performed by treating the samples in a microwave oven at 750 W for 5 min twice. After cooling for 20 min at room

temperature, the sections were washed in PBS and then kept in 3% H₂O₂ for 15 min to remove endogenous peroxidase activity, followed by three washes with PBS. After blocking with Ultra V blocking reagent (Lab Vision, Fremont, CA) for 10 min at room temperature to reduce non-specific binding, the sections were incubated with a 1:150 dilution of mouse monoclonal KIFC1 (H0003833-M01; Abnova), a 1:300 dilution of rabbit polyclonal KIF17 (ab11261-50; Abcam) antibodies, and a mouse monoclonal anti-human CD31 (MS-1873-R7; Clone 1A10; prediluted, NeoMarkers, Fremont, CA, USA) antibody for the detection of angiogenic cell cords and endothelial cells for 2 h at room temperature in a humidified chamber. The sections were washed three times in PBS and incubated with the biotinylated anti-mouse (BA-9200; 1: 400 Dilution; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and biotinylated anti-rabbit (BA-1000; 1: 400 Dilution; Vector Laboratories) secondary antibodies for 45 min at room temperature. After three washes with PBS, the antigen-antibody complexes were detected by using a streptavidin-peroxidase complex (TP-060-HL; LabVision, Fremont, CA, USA) for 15 min followed by three rinses in PBS. The resulting signal was developed with diaminobenzidine (DAB) tablets (D-4293; Sigma), and the sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin (S3309, Dako) and mounted with Permount (Fisher Chemicals, Springfield, NJ, USA) on glass slides. For controls, the sections were treated with either appropriate mouse IgG or normal rabbit serum depending on the primary antibody used and diluted to the same final protein concentration as the primary antibody.

Photomicrographs were taken with an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). All the samples for each individual antibody were exposed to the same protocol at the same time and were stained using the same incubation periods.

2.3. Semi-quantitative analysis of staining intensities

The intensities of KIFC1 and KIF17 immunoreactivity were evaluated semi-quantitatively as follows. Positively stained cells were grouped according to the following categories: 0 (no staining), + (weak but detectable), ++ (moderate or distinct), and +++ (intense). In addition, for each slide, an HSCORE value was calculated by summing the percentages of cells grouped in one intensity category and multiplying this number with the weighted intensity of the staining, using the formula [$HSCORE = \sum Pi(i + 1)$], where i represents the intensity scores and Pi is the corresponding percentage of the cells. For each placental sample, five parallel tissue sections were randomly selected and five randomly selected areas were evaluated for each tissue section under a microscope using 400 $\times$ original magnification. The percentage of cells for each intensity within these areas was determined by two investigators in "blind" (coded) studies, and the average score was used. The HSCORE values were graphed.

2.4. SDS-PAGE and Western blotting

Total protein from early, normal, and pathological human-term placentas was extracted with cell extraction buffer [BioSource International; Camarillo, CA] containing 3 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). The protein concentration was determined by a detergent-compatible protein assay (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA). Samples (50 μ g) were loaded on 5% (for KIF17) and 10% (for KIFC1) Tris-HCl gels, electrophoretically separated and electroblotted onto PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). The membrane was blocked with 5% non-fat dry milk in TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h to reduce non-specific binding. Subsequently, the membrane was incubated overnight at +4°C with primary antibodies against KIFC1 (Abnova; 1:250 dilution) and KIF17 (Abcam; 1:250 dilution) in TBS-T. The membrane was washed with TBS-T for 1 h and incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (Vector Laboratories) diluted at 1:6000 in 2.5% non-fat dry milk in TBS-T for 1.5 h at room temperature. The protein was visualized by light emission on film (Amersham Biosciences; Buckinghamshire, England), and the signal was detected using SuperSignal Chemiluminescent Kit (Pierce Biotechnology) and quantified. As the internal control to confirm equal loading of the samples, a β -actin antibody (sc-47778, C4; Santa Cruz Biotechnology Inc., 1:5000 in 5% non-fat dry milk) was used for 2 h at room temperature to probe each immunoblot simultaneous to the probe for KIFC1 and KIF17 antibody probes. The relative densities of bands were assessed using an Alpha Digi Doc 1000 gel documentation unit (Alpha Innotech Corporation, CA, USA). The intensity of β -actin bands was quantified and their values were used to establish a ratio of KIFC1/ β -actin and KIF17/ β -actin.

2.5. Statistical analysis

For the data obtained from HSCORE analysis, all the pairwise multiple comparison procedures (Holm-Sidak method) were performed for KIFC1. However, since the data from the HSCORE were not normally distributed for KIF17, all the pairwise multiple comparisons were analyzed with ANOVA on ranks (Dunn's method). Statistical calculations were performed using SigmaStat for Windows, version 3.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

3. Results

To characterize and clarify the presence of KIF isoforms and the cell types that express KIFC1 and KIF17 proteins, initial immunohistochemical studies were performed with human placental tissues.

3.1. Characterization and subcellular localization of KIFC1 in the early human placenta

The cytotrophoblast cells revealed a very weak-staining pattern with KIFC1 (Fig. 1a–e) in both the mesenchymal villous (MV) and immature intermediate villi (IMIV). KIFC1 was mainly localized to syncytiotrophoblast with a strong immunoreactivity in all types of placental villi (Fig. 1a–e). It labelled numerous punctate structures in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells (Fig. 1c). However, it was interesting that some of the placental villi showed a strong nuclear staining in cytotrophoblast cells and trophoblastic cell columns with relatively less immunoreaction in syncytiotrophoblast cells (Fig. 1b). Moreover, syncytiotrophoblast microvilli were barely immunopositive with KIFC1 (Fig. 1d). Weak immunoreactivity was observed in the endothelial cells, stromal cells, Hofbauer cells, which are placental macrophages, and angiogenic cell cords (ACCs) (Fig. 1, inset c) (Fig. 1a–e). Even though most of the fetal hematopoietic cells were immunonegative for KIFC1, there were few immunopositive hematopoietic cells in the vessels (Fig. 1d).

According to the HSCORE analysis, KIFC1 showed a significant increase from the 4th week to the 5th week ($p < 0.05$), and a significant difference towards the 7th week compared to the 4th and 5th weeks ($p < 0.05$). The HSCORE values were statistically

significant between the 4th and the 8th weeks as pregnancy progressed ($p < 0.05$) (Fig. 1f).

No immunostaining was observed in the sections where mouse IgG was used instead of the KIFC1 antibody (Fig. 1e, inset).

3.2. Characterization and subcellular localization of KIF17 in the early human placenta

Immunohistochemical analysis showed that the trophoblastic layers of chorionic villous tree, Hofbauer cells, angiogenic cell cords, and trophoblastic cell columns were moderately immunopositive with KIF17 in both MV and IMIV when compared to the reaction observed in the vascular endothelium (Fig. 2a–c). KIF17 was intensively localized in the developing vascular endothelium (Fig. 2a–c). There was also a moderate to strong immunoreactivity with KIF17 in the apical microvilli of syncytiotrophoblast forming a brush border (Fig. 2b). KIF17 revealed a cytoplasmic staining in all the specimens examined. However, there was a membranous reaction, particularly in the apical membrane of cytotrophoblast cells (Fig. 2b). In addition, a weak to moderate immunoreactivity was observed with KIF17 in stromal cells (Fig. 2a–c). Moreover, some of the fetal hematopoietic cells were strongly immunopositive for KIF17 even though there were still some negatively stained hematopoietic cells (Fig. 2c).

KIF17 HSCORE values showed a significant decrease from the 4th week through the 6th week ($p < 0.05$), and were significantly decreased at the 8th week when compared to the 4th week ($p < 0.05$). In addition, statistical analysis showed that the HSCORE values obtained from the 5th and the 7th weeks of early pregnancy were significantly higher than that of the 8th week ($p < 0.05$) (Fig. 2d).

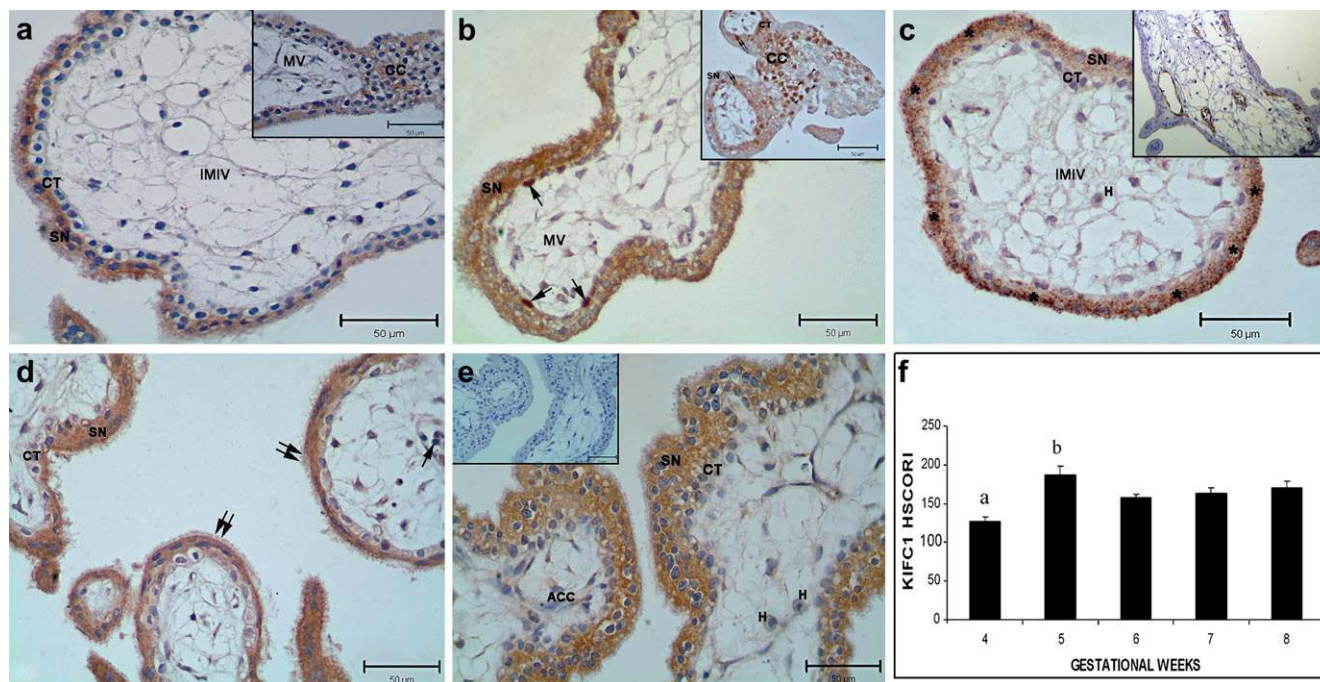


Fig. 1. The distribution of KIFC1 in the early human placental villi with the progression of pregnancy. Tissue sections are taken from the 4th, 5th, 6th, 7th, and the 8th weeks of first-trimester human placenta: (a) KIFC1 is mainly expressed in the syncytiotrophoblast (SN). Weak or no immunoreactivity is observed in the cytotrophoblasts (CTs). Inset: a weak cytoplasmic immunostaining is present in trophoblastic cell columns (CCs). (b) A nuclear KIFC1 expression is observed in some of the cytotrophoblast cells (arrows) and CCs (arrow heads) (inset). (c) The dot-like expression pattern of KIFC1 (asterisk) within the trophoblastic layers of villous tree. Moreover, Hofbauer cells (H) are weakly stained with KIFC1. Angiogenic cell cords and endothelial cells of vessels are immunopositive for CD31 (inset). (d) Some of the hematopoietic cells (arrows) are found to be immunopositive. Please observe a weak-staining pattern in syncytiotrophoblast microvilli (double arrows). (e) Angiogenic cell cords (ACCs) also reveal a weak-staining pattern. No staining is seen in the negative controls (inset). MV: mesenchymal villous; IMIV: immature intermediate villi. Scale bars represent 50 μ m (a–e and insets). (f) The HSCORE of KIFC1 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as means $\pm$ SEM. (a) $p < 0.05$, 5th, 6th, 7th, and 8th week vs. 4th week; (b) $p < 0.05$, 5th week vs. 6th and 7th weeks.

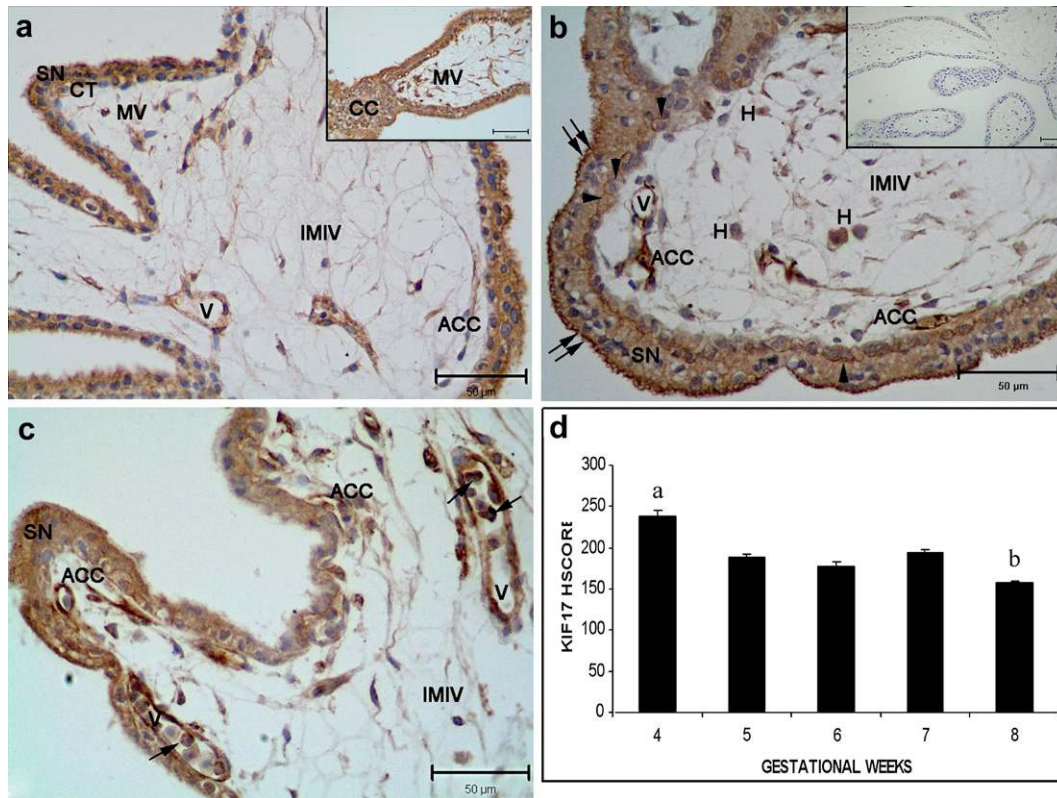


Fig. 2. The distribution of KIF17 in the early human placental villi: (a) KIF17 is expressed in both, the syncytiotrophoblast (SN), cytotrophoblasts (CTs), and angiogenic cell cords (ACCs) and trophoblastic cell columns (CCs) (inset). KIF17 exhibits stronger immunoreactivity in vessel (V; arrows) endothelial cells in overall sections when compared to other cell types in the villi. (b) A membranous reaction, particularly apical membrane, in cytotrophoblast cells is observed for KIF17 (arrow heads). Hofbauer cells (H) are also moderately stained. Please observe a strong staining pattern in syncytiotrophoblast microvilli (double arrows). (c) Some but not all the hematopoietic cells (arrows) are strongly stained with KIF17. Please observe the strongest immunoreaction in the endothelial cells of the vessels (V) as well. No staining is seen in the negative controls (b; inset). MV: mesenchymal villous; IMIV: immature intermediate villi. Scale bars represent 50 μ m (a–c and insets). (d) The HSCORE of KIF17 immunostaining intensities in the early human placental villi. The data are represented as means $\pm$ SEM. (a) $p < 0.05$, 4th week vs. the 5th, 6th, and the 8th week; (b) $p < 0.05$, 5th and 7th weeks vs. the 8th week.

There were no immunoreactions in negative control slides which were treated with normal rabbit serum substituting the KIF17 antibody at the same final protein concentration (Fig. 2b, inset).

3.3. Changes in the protein expression levels of KIFC1 and KIF17 proteins in early human placenta with the progress of gestation

We also performed Western blot analysis on tissue extracts from early human placentas. The blots revealed clear bands for KIFC1 (Fig. 3a) and KIF17 (Fig. 3b) corresponding to 37 and 170 kDa, respectively. The intensity of β -actin on the bands was quantified and their values were used to establish a ratio of the KIFC1/ β -actin and KIF17/ β -actin (Fig. 3a and b). As a positive control, normal rat testicular tissue for KIFC1 and brain tissue for KIF17 without any pathological problems were used in order to confirm the bands observed for placental lysates. Altogether, the Western blot results confirm the presence of the KIFC1 and KIF17 in the early placenta with changes in the protein expression levels over the course of the first trimester and support the data obtained from immunohistochemistry.

3.4. Characterization and subcellular localization of KIFC1 in the normal and pathological human-term placentas

Syncytiotrophoblast cells displayed a strong KIFC1 immunoreactivity in all term-placental samples (Fig. 4). Similar to that observed in early placental villi, KIFC1 labelled numerous punctate

structures in the cytoplasm of syncytiotrophoblast cells. KIFC1 revealed a moderate staining in syncytiotrophoblast cells of villi from normal-term placentas (Fig. 4a), whereas a strong immunoreactivity was observed both in preeclamptic (Fig. 4b) and diabetic (Fig. 4c) placentas. No alterations were observed among different types of placental villi. Moreover, a weak KIFC1 immunoreactivity was observed in the endothelium of vessels of stem villi in preeclamptic (Fig. 4b) and diabetic (Fig. 4c) placentas. Stromal cells, Hofbauer cells, and myofibroblasts within the villous core were negative for KIFC1 in all term placentas investigated.

No immunostaining was observed in the sections where mouse IgG was used instead of the KIFC1 antibody (Fig. 4, insets).

3.5. Characterization and subcellular localization of KIF17 in the normal and pathological human-term placentas

KIF17 was predominantly expressed in the endothelium of vessels in all the term placental samples investigated (Fig. 5). KIF17 was moderately stained in the endothelium of villi from normal human-term placentas (Fig. 5a), while strong immunoreactivity was observed in all types of villi of both preeclamptic (Fig. 5b) and diabetic (Fig. 5c) placentas. Endothelium of small vessels that are located in mesenchymal, mature intermediate, and terminal villi revealed a stronger immunostaining when compared to endothelium of larger vessels located in stem villi. Syncytiotrophoblast cells, stromal cells, Hofbauer cells, and myofibroblasts within the villous core were negative for KIF17 in all the placentas investigated.

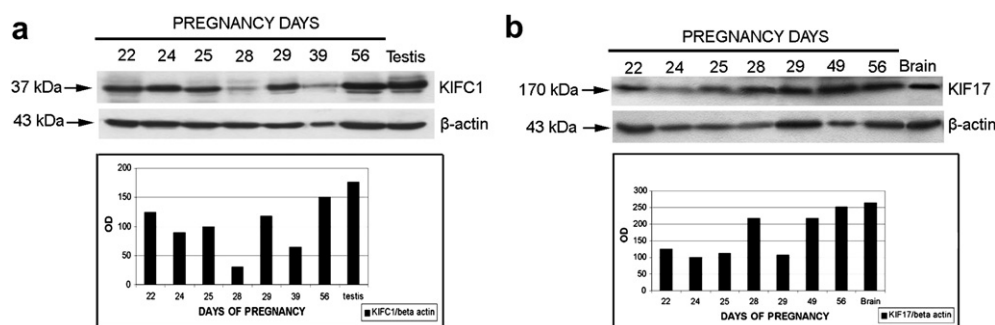


Fig. 3. Western blot analysis of KIFC1 (a) and KIF17 (b) proteins in the early days of human pregnancy. The bands for KIFC1 (37 kDa) and KIF17 (170 kDa) are detected by Western blot. The immunoexpression of β -actin (43 kDa) is used to confirm equivalent amounts of total proteins loaded per lane. The OD (optical density) values of KIFC1 and KIF17 bands are normalized to the OD values of β -actin bands.

No immunostaining was observed in the sections where normal rabbit serum was used instead of the KIF17 antibody (Fig. 5, insets) as a negative control.

3.6. KIFC1 and KIF17 protein expression in normal and pathological human-term placentas

Western blot analysis was performed on tissue extracts from human-term placentas. The Western blot results confirmed the presence of the KIFC1 and KIF17 in term placentas. In accordance with the immunohistochemistry data, both KIFC1 (Fig. 6a) and KIF17 (Fig. 6b) protein expressions were relatively higher in preeclamptic and diabetic placentas, when compared to normal-term placentas according to Alpha Digi Doc 1000 gel documentation unit.

4. Discussion

Here, we report the presence of KIFC1 and KIF17 with different expression patterns in the first trimester, normal, and pathological human-term placenta for the first time with immunohistochemistry and Western blot methods. However, the exact nature of the interaction between the two proteins was not determined in the context of this study.

KIFC1 is a member of a highly related group of C-terminal motor proteins that are very similar to one another, diverging only in their tail domains [18]. Of the tissues examined, KIFC1 was found at its highest level in the testis but was also abundant in ovary, spleen, and liver [18–22]. It has been shown to be associated with membranous organelles [23, 24], Golgi vesicles, and the acrosome in developing spermatids [21]. Since the formation of the acrosome is a major biosynthetic activity of the spermatid, the abundance of

KIFC1 in the testis is consistent with a role for this motor in formation of this organelle. In our study, we have observed that KIFC1 was mainly localized to syncytiotrophoblast cells in all types of placental villi during early, normal, and pathological human-term placentas. The syncytiotrophoblast is the primary barrier for transplacental transfer of nutrients and there is relatively unrestricted transfer of molecules such as glucose and amino acids across the human placental capillary wall [25]. The presence of KIFC1 in these cells might suggest a role for this protein in cellular transport to perform all these important functions. Whether this motor is also involved in trophoblast migration or invasion in human placenta needs to be investigated with further functional experiments.

According to our study, in the early human placental samples the expression of KIFC1 had a strong nuclear-staining pattern in cytotrophoblast cells and trophoblastic cell columns in some of the villi. Staining in syncytiotrophoblast cells, however, was cytoplasmic. It is likely that syncytiotrophoblast cells arise from cytotrophoblast, and during this differentiation KIFC1 becomes more cytoplasmic. As a precedent, it has been previously shown that KIFC1 motor was found in the nucleus of very immature round spermatids just prior to its appearance on the acrosome [21]. However, KIFC1 is not detectable in the nuclei of spermatogonia, spermatocytes, or later-stage spermatids. The authors suggested that perhaps the KIFC1 motor is sequestered in the nucleus in an inactive state until the proper stage of spermatid development [21]. Upon activation, it was proposed that KIFC1 exits the nucleus through nuclear pores. On the other hand, Zhang et al. have shown that disruption of vesicle trafficking by either Brefeldin A or Nocodazole resulted in accumulation of KIFC1 in the nucleus and at the nuclear membrane [24]. Therefore, it would be interesting to investigate whether or not there is a disruption of vesicle trafficking

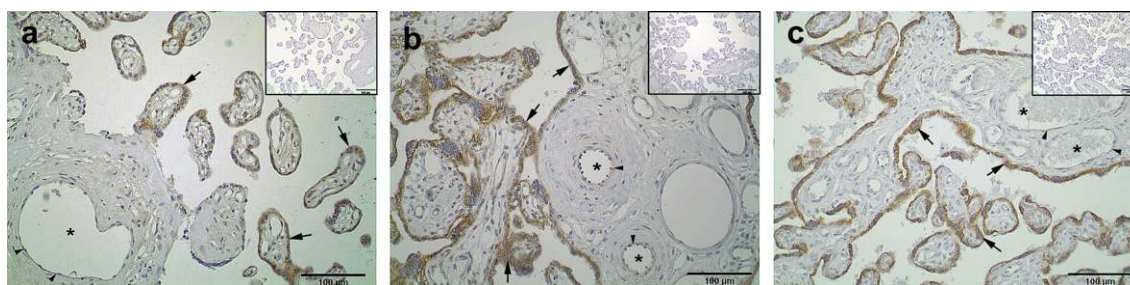


Fig. 4. The distribution of KIFC1 in normal (a), preeclamptic (b), and diabetic (c) placental villi. KIFC1 is mainly expressed in the syncytiotrophoblast cells (arrows) in all the samples investigated. While a very weak KIFC1 immunoreactivity is observed in the endothelium (arrow heads) of larger vessels (asterisk) in stem villi of normal-term placentas, a slight increase is observed in the endothelium (arrow heads) of preeclamptic and diabetic placentas. No staining is seen in the negative controls (insets a–c). Scale bars represent 100 μ m (a–c) and 200 μ m (insets).

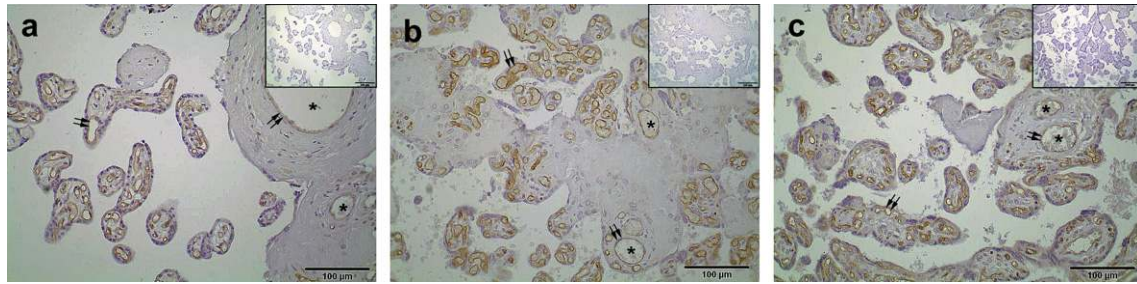


Fig. 5. The distribution of KIF17 in the normal (a), preeclamptic (b), and diabetic (c) placental villi. KIF17 is predominantly expressed in the endothelium (double arrows) of vessels in all types of villi from term placental samples investigated. The endothelium of small vessels shows stronger KIF17 immunostaining when compared to that of larger vessels (asterisks) in stem villi. No staining is observed in the negative controls (insets a–c). Scale bars represent 100 μ m (a–c) and 200 μ m (insets).

or if those cells with nuclear-staining pattern are in an inactive state in the placental villi.

KIF17, a motor protein, belongs to N-kinesin family [26] and is composed of a head domain with ATPase activity used for microtubule binding, whereas the carboxy (C)-terminal tail contains the cargo-binding domains. According to our study, KIF17 was mainly localized to developing vascular endothelium in the early, normal, and pathological term placental villi where intensive placental vasculogenesis and angiogenesis take place.

In addition, Hofbauer cells, the macrophages of the placenta, were also been found to be KIF17-immunopositive in the early human placental samples. Seval et al. have previously shown the relationship between vasculogenesis and angiogenesis with Hofbauer cells [27, 28], and stated that these cells may act in a paracrine manner and influence these processes by expressing angiogenic factors such as Ang-2, Tie-1, and Tie-2. Therefore, we may speculate that Hofbauer cells might play active roles in regulating the placental vascular formation through a motor protein, such as KIF17, since these cells are in close proximity to angiogenic cell cords and vessels. The moderate immunoreactivity in ACCs further supports this idea. In contrast, both normal and pathological term placental samples showed no KIF17 immunoreactivity in Hofbauer cells.

Moreover, we have observed KIFC1 and particularly KIF17 expression in some of the hematopoietic cells in the vessels in the first-trimester placenta even though there was no immunoreaction in the hematopoietic cells of the vessels in the term placenta when the pregnancy progressed. Further studies are needed to elucidate the roles of KIFs in the development of hematopoietic cells and also the maturation and stabilization of vessels in the placenta, and their possible relationship to angiopoietins and their receptors in the early periods of human pregnancy.

Using a yeast two-hybrid screen of a testis cDNA library, Kimmins et al. showed that there was a strong interaction between ACT

(activator of CREM in testis) and a kinesin protein highly similar to a KIF17 isoform found in the brain, which was named KIF17b [29]. The authors also suggested that KIF17b operates in a unique manner that differs from somatic kinesins that are motor-transport molecules normally associated with microtubules and involved in the movement of organelles, vesicles, and proteins [30–33]. Lack of ACT could lead to abnormalities in sperm tail development because of the malfunctioning of KIF17b [34]. As there are several studies on CREM transcripts from decidua and placenta, additional experiments are needed to address this issue in human placenta as well [35–37]. Thus, our study would potentially provide the first evidence of KIF17 in human placenta.

It is known that GLUT1 is the primary transporter responsible for transplacental glucose transport, but it is also present in plasma membranes of placental barriers facing the maternal and fetal sides and on the cells of the placental vasculature [38, 39]. It has been shown that GLUT1 C-terminal-binding protein (GLUT1CBP) was able to bind to native GLUT1 extracted from cell membranes, self-associate, or interact with kinesin superfamily protein KIF-1B [40]. According to our study, KIFC1 revealed a stronger immunoreactivity in syncytiotrophoblast cells of villi both in preeclamptic and diabetic placentas compared to that of normal-term placentas. Whether the KIFC1 subfamily evolves distinct roles in glucose transport in human placenta or can execute a similar function as KIF-1B remains an open question. On the other hand, the pathophysiology of preeclampsia remains poorly understood and there are still many unanswered questions in the development of this disease.

Both preeclampsia and diabetes mellitus are associated with increased fetal morbidity and mortality and may display abnormal placental blood flow velocity waveforms, indicating increased vascular resistance. According to our study, KIF17 showed stronger immunoreactivity in the endothelium of all types of villi from both preeclamptic and diabetic placentas compared to normal placentas,

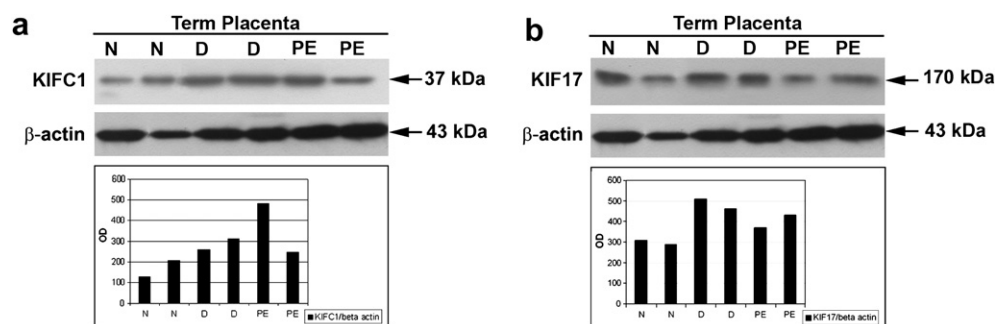


Fig. 6. Western blot analysis of KIFC1 (a) and KIF17 (b) proteins in human-term placentas. The bands for KIFC1 (37 kDa) and KIF17 (140 kDa) are detected by Western blot. The immunoexpression of β -actin (43 kDa) is used to confirm equivalent amounts of total proteins loaded per lane. An increase in both KIFC1 and KIF17 protein expression is observed in diabetic (D) and preeclamptic (PE) placentas when compared to normal (N)-term placentas.

suggesting a possible association with those pathologies. However, further investigations are necessary to determine whether KIF17 is a participant in the pathogenesis of these and other abnormalities observed in diabetic or preeclamptic placentas or changes seen in maternal tissues affected by these conditions.

We have also examined the total protein levels of KIFC1 and KIF17 in placental samples, as early as the 22nd day of pregnancy during first trimester. The slight difference between the total protein levels in Western blot and immunohistochemical scores might be due to the gestational age range of tissues examined.

In conclusion, many recent molecular cell biology and molecular genetics studies reveal that KIFs are fundamental not only for various cellular functions but also for developmental events, and that their functions may underlie some diseases. However, the presence, distribution, and potential function of KIFC1 and KIF17 in placental tissues have not been previously reported. It is hoped that this and the future investigations will elucidate the role of these proteins in human placenta.

Acknowledgements

We would like to thank Sibel Ozer for her excellent technical assistance. This study was partly supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) – Project# SBAG-3267 (105-S460) and The Scientific Research Projects Coordination Unit, Akdeniz University (Project No.: 2007.03.0122.004).

References

- Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. New York, Berlin: Springer-Verlag; 2000.
- King BF. Comparative anatomy of the placental barrier. *Bibl Anat* 1982;22:13–28.
- Baumann MU, Deborde S, Illsley NP. Placental glucose transfer and fetal growth. *Endocrine* 2002;19:13–22.
- Young AM, Allen CE, Audus KL. Efflux transporters of the human placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 2003;55:125–32.
- Vallee RB, Williams JC, Varma D, Barnhart LE. Dynein: an ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 2004;58:189–200.
- Hirokawa N. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 1998;279:519–26.
- Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins. In: Schliwa M, editor. *Molecular motors*. Weinheim: Wiley-VCH; 2003. p. 79–109.
- Sharp DJ, Rogers GC, Scholey JM. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 2000;407:41–7.
- Miki H, Setou M, Kaneshiro K, Hirokawa N. All kinesin superfamily protein, KIF, genes in mouse and human. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:7004–11.
- Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 2003;112:467–80.
- Kayadjanian N, Lee HS, Pina-Crespo J, Heinemann SF. Localization of glutamate receptors to distal dendrites depends on subunit composition and the kinesin motor protein KIF17. *Mol Cell Neurosci* 2007;34:219–30.
- Kamal A, Goldstein LS. Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:63–8.
- Nakagawa T, Setou M, Seog D, Ogasawara K, Dohmae N, Takio K, et al. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell* 2000;103:569–81.
- Setou M, Nakagawa T, Seog DH, Hirokawa N. Kinesin superfamily motor protein KIF17 and mLin-10 in NMDA receptor-containing vesicle transport. *Science* 2000;288:1796–802.
- Novak D, Lehman M, Bernstein H, Beveridge M, Cramer S. SNAT expression in rat placenta. *Placenta* 2006;27:510–6.
- Yamaguchi M, Sakata M, Ogura K, Miyake A. Gestational changes of glucose transporter gene expression in the mouse placenta and decidua. *J Endocrinol Invest* 1996;19:567–9.
- Mathias AA, Hitti J, Unadkat JD. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression in human placenta of various gestational ages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;289:R963–9.
- Navolanic PM, Sperry AO. Identification of isoforms of a mitotic motor in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* 2000;62:1360–9.
- Noda Y, Sato-Yoshitake R, Kondo S, Nangaku M, Hirokawa N. KIF2 is a new microtubule-based anterograde motor that transports membranous organelles distinct from those carried by kinesin heavy chain or KIF3A/B. *J Cell Biol* 1995;129:157–67.
- Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, et al. A standardized kinesin nomenclature. *J Cell Biol* 2004;167:19–22.
- Yang WX, Sperry AO. C-terminal kinesin motor KIFC1 participates in acrosome biogenesis and vesicle transport. *Biol Reprod* 2003;69:1719–29.
- Nath S, Bananis E, Sarkar S, Stockert RJ, Sperry AO, Murray JW, et al. Kif5B and Kif1 interact and are required for motility and fission of early endocytic vesicles in mouse liver. *Mol Biol Cell* 2007;18:1839–49.
- Yang WX, Jefferson H, Sperry AO. The molecular motor KIFC1 associates with a complex containing nucleoporin NUP62 that is regulated during development and by the small GTPase RAN. *Biol Reprod* 2006;74:684–90.
- Zhang Y, Sperry AO. Comparative analysis of two C-terminal kinesin motor proteins: KIFC1 and KIFC5A. *Cell Motil Cytoskeleton* 2004;58:213–30.
- Leach L, Firth JA. Fine structure of the paracellular junctions of terminal villous capillaries in the perfused human placenta. *Cell Tissue Res* 1992;268:447–52.
- Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol* 2005;15:467–76.
- Seval Y, Korgun ET, Demir R. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 2007;28:841–5.
- Demir R, Seval Y, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta. *Acta Histochem* 2007;109:257–65.
- Macho B, Brancorsini S, Fimia GM, Setou M, Hirokawa N, Sassone-Corsi P. CREM-dependent transcription in male germ cells controlled by a kinesin. *Science* 2002;298:2388–90.
- Hogeveen KN, Sassone-Corsi P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. *Hum Fertil* 2006;9:73–9.
- Kotaja N, Lin H, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Interplay of PIWI/argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J Cell Sci* 2006;119:2819–25.
- Kimmins S, Kotaja N, Fienga G, Kolthur US, Brancorsini S, Hogeveen K, et al. A specific programme of gene transcription in male germ cells. *Reprod Biomed Online* 2004;8:496–500.
- Saade M, Irla M, Govin J, Victorero G, Samson M, Nguyen C. Dynamic distribution of spatial during mouse spermatogenesis and its interaction with the kinesin KIF17b. *Exp Cell Res* 2007;313:614–26.
- Kotaja N, De Cesare D, Macho B, Monaco L, Brancorsini S, Goossens E, et al. Abnormal sperm in mice with targeted deletion of the act (activator of cAMP-responsive element modulator in testis) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10620–5.
- Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y, Jameson JL, Habener JF. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 1988;242:1430–3.
- Foulkes NS, Borrelli E, Sassone-Corsi P. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 1991;64:739–49.
- Heckert LL, Schultz K, Nilson JH. The cAMP response elements of the alpha subunit gene bind similar proteins in trophoblasts and gonadotropes but have distinct functional sequence requirements. *J Biol Chem* 1996;271:31650–6.
- Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990;13:198–208.
- Hahn T, Desoye G. Ontogeny of glucose transport systems in the placenta and its progenitor tissues. *Early Pregnancy* 1996;2:168–82.
- Bunn RC, Jensen MA, Reed BC. Protein interactions with the glucose transporter binding protein GLUT1CBP that provides a link between GLUT1 and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 1999;10:819–32.

Article

Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology



Petra Prinosilova

Petra Prinosilova DVM, PhD, graduated from the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Czech Republic in 2001. She then continued her post-graduate studies in the field of veterinary obstetrics, gynecology and andrology in Brno. In 2006 she had further training in andrology and sperm physiology with Dr Gabor Huszar at the Sperm Physiology Laboratory, Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Yale School of Medicine. She is now the Head of the Laboratory for Spermatology and Andrology in Brno.

Petra Prinosilova^{1,2}, Thinus Kruger³, Leyla Sati^{1,4}, Sinan Ozkavukcu¹, Lynne Vigue¹, Ertug Kovanci⁵, Gabor Huszar^{1,6}
¹Sperm Physiology Laboratory, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA; ²Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic; ³University of Stellenbosch, Tygerberg Hospital, Tygerberg, South Africa; ⁴Department of Histology and Embryology, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey; ⁵Department of Obstetrics and Gynecology, Baylor School of Medicine, Houston, TX, USA

⁶Correspondence: Tel: +1 203 7854010; Fax: +1 203 7371200; e-mail: gabor.huszar@yale.edu

Abstract

During spermiogenesis, a plasma membrane remodelling step facilitates formation of sperm zona pellucida and hyaluronic acid (HA) binding sites. Enrichment of Tygerberg normal spermatozoa in HA-bound versus semen sperm fractions was postulated. Semen was placed on the uncoated A side and HA-coated B side of a semen chamber. After 15 min, the HA binding score (proportion of HA-bound motile spermatozoa) was assessed on the B side, and unbound spermatozoa were removed by gentle rinsing. Following Diff-Quick staining, sperm morphology of A and B sides was evaluated by three blinded investigators at Yale and Tygerberg. The proportion of Tygerberg normal spermatozoa was higher in HA-bound versus semen spermatozoa ($n = 63$ subjects) with a 3.04-fold improvement (95% confidence limits: 1.9–4.7) in 37 teratozoospermic men, comparable with a 4.2-fold enrichment in zona pellucida-bound spermatozoa reported earlier by the Tygerberg group. The morphology scores of three investigators were different but related, indicating that the variations reflect individual-to-individual differences in the perception of shape normality. The selection power of HA and zona pellucida for normal spermatozoa are similar. The sperm biomarkers of creatine phosphokinase (reflecting retained cytoplasm in arrested maturity spermatozoa) and chaperone protein HspA2 (heat shock protein) were proportional with sperm HA binding. As HA binding reflects sperm maturity and function, the combination of Tygerberg morphology and HA binding is likely to improve male infertility management.

Keywords: hyaluronic acid binding, sperm biochemical maturity markers, sperm maturity, sperm selection, zona pellucida binding

Introduction

During late human spermiogenesis, simultaneously with the maturation step of cytoplasmic extrusion, a plasma membrane remodelling process occurs that facilitates the formation of the zona pellucida and hyaluronic acid (HA) binding sites in mature spermatozoa (Huszar *et al.*, 1997, 2007). Previous studies have indicated a very close inverse correlation ($r > -0.8$) between the degree of cytoplasmic retention and the expression of the membrane maturity marker galactosyl transferase in human spermatozoa (Huszar *et al.*, 1997).

Spermatozoa of arrested maturation, which also contain surplus cytoplasm, and show consequential abnormal morphology, have diminished ability to bind to the zona pellucida or to HA (Huszar *et al.*, 1994; Cayli *et al.*, 2003). Conversely, spermatozoa that are able to bind to solid state HA are mature and devoid of cytoplasmic retention, excess persistent histones, apoptotic processes, DNA chain fragmentation, and show a normal frequency of chromosomal aneuploidies (Clermont, 1963; Huszar *et al.*, 1998a, 2003; Cayli *et al.*, 2004; Jakab *et al.*, 2005; Sati *et al.*, 2008).

Arrested maturity spermatozoa, due to the retained cytoplasm, may be characterized by larger and irregular heads, enlarged post-acrosomal and mid-piece region, and abaxial insertion of the tail. As a consequence of spermiogenetic arrest, these cells also have shorter tails, and a lower tail length/head long axis ratio (Huszar and Vigue, 1993; Gergely *et al.*, 1999; Chemes and Rawe, 2003). Conversely, the shape attributes of mature spermatozoa conform with normal Tygerberg strict morphology, as these criteria were developed based on zona pellucida-bound spermatozoa (Kruger *et al.*, 1986; Menkveld *et al.*, 1990).

The relationship between sperm maturity and sperm shape has also been studied with computer-based objective morphometry assessment. In line with the attributes of mature spermatozoa, semen samples with low, intermediate and normal levels of sperm maturation, detected by the biochemical markers, were significantly different in head long axis, head area, sperm shape symmetry, tail length and the tail length/head long axis ratio (Gergely *et al.*, 1999; Celik-Ozenci *et al.*, 2003, 2004).

In earlier studies focusing upon sperm morphology in semen and in the respective zona pellucida-bound sperm fractions of the same ejaculate, the Tygerberg group has reported a $\times 4.2$ increase in spermatozoa with normal strict morphology in the zona pellucida-bound fraction (Menkveld *et al.*, 1991). At that time, the investigators believed that selection of the normal spermatozoa was a consequence of rejection of the abnormal or amorphous sperm by the zona pellucida. It is now understood that due to sperm plasma membrane remodelling, the selection of mature spermatozoa with normal morphology is a sperm-initiated active process (Huszar *et al.*, 1994, 1997, 2007). Because mature spermatozoa were shown selectively to bind either to the zona pellucida or HA, the present work has tested the hypothesis that, similarly to the sperm–zona pellucida studies, there will be an improvement in the proportion of spermatozoa with normal Tygerberg morphology in the HA-bound versus the respective semen sperm fractions.

Materials and methods

Experimental design

Sperm morphology was studied according to the Tygerberg criteria in 63 men. The proportion of Tygerberg normal spermatozoa in semen and in their respective HA-bound sperm fractions were evaluated by three independent investigators in a blinded manner. Two readers were from the USA (US1 and US2) and the third, TSA (TFK) was from Tygerberg, South Africa. All studies were approved by the Human Investigation Committee of the Yale School of Medicine.

Preparation of spermatozoa for the studies

For the sperm studies and sperm–HA binding assay, a modified Cell-View semen chamber was used (MidAtlantic Diagnostics Inc., USA). One side (A side) was composed of plain uncoated glass, whereas the second side (B side) was coated with hyaluronic acid. A 7 μ l aliquot of semen (neat semen, without washing, centrifugation or any other intervention) were placed on the B side, and the spermatozoa were allowed to bind to

the HA-coated surface in a wet chamber at room temperature. After 15 min, repeated gentle rinsing to the B side was applied in order to remove the unbound spermatozoa. Following that, a 7 μ l aliquot of semen was smeared on the uncoated glass on the A side. Subsequently, spermatozoa on both sides of the chamber were fixed and stained with Diff-Quik (VWR, Bridgeport, NJ, USA). Following the staining step, cover slips were placed on both the A and B sides and were sealed with Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). For the assessment, 200 spermatozoa, from at least three or four areas of the fields, were evaluated for strict morphology on the A and the B sides by each investigator. After evaluation by the two Yale investigators, the slides were sent to South Africa by overnight mail.

Sperm morphology evaluation

This assessment was carried out using the Tygerberg strict criteria (Kruger *et al.*, 1986; Menkveld *et al.*, 1990). A normal spermatozoon was classified as such if the head was oval shaped and had a well-defined acrosome covering 40–70% of the apical part of the head. The midpiece was smooth, and to the base of the head there was one tail symmetrically attached. The tail was not coiled or abnormally bent. All borderline forms were classified as abnormal. In addition, spermatozoa that were overlapping or not positioned fully flat on the glass surface were not considered.

Determination of sperm HA binding score

For the determination of the HA binding score in the semen samples, 6–8 μ l aliquots of semen were applied to the HA-coated hyaluron binding assay glass chambers (sperm-HB test; MidAtlantic Diagnostics Inc.) according to the manufacturer's recommendation. After application of the semen drop, sperm binding to HA was observed at room temperature under phase contrast microscopy. After 15 min, the proportions of spermatozoa that were HA-bound and exhibited vigorous tail beating versus the unbound spermatozoa that were freely swimming were assessed.

Assessment of the biochemical markers of sperm maturity

The determination of sperm creatine phosphokinase (CK) activity (reflects surplus cytoplasm in arrested maturity spermatozoa) and the expression levels of the chaperone protein HspA2 (heat shock protein) (measure of sperm maturity) are standard procedures in the laboratory. For these studies, aliquots of semen were washed with 10–15 volumes of ice-cold 0.15 mol/l NaCl and 30 mmol/l imidazole (pH 7.0) and centrifuged at 5000 g, in order to remove seminal fluid. The sperm pellets were disrupted by vortexing in 0.1% Triton X-100, 30 mmol/l imidazole (pH 7.0), 10% glycerol, and 5 mmol/l dithiothreitol. The sperm extract was clarified by centrifugation at 5000 g, and aliquots of the clear supernatant were subjected to CK activity determinations by a spectrophotometric CK kit (Sigma Co., St Louis, MO, USA). For HspA2 assessment, CK-B and HspA2 were separated by electrophoresis on precast agarose gels (Helena Laboratories, USA). The separated bands were developed by overlaying the gel with a fluorescent ATP substrate, and the ATP-containing CK-B and HspA2 bands were quantified under long-wave ultraviolet light with a scanning

fluorometer. The HspA2 levels were quantified as a ratio of per cent [HspA2/(HspA2/CK-B)], as described previously (Huszar *et al.*, 1990, 1992, 2000; Ergur *et al.*, 2002).

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using one-way and two-way analyses of variance (ANOVA) with Tukey post-hoc analyses, chi-squared and Spearman tests as well as Pearson correlations with the SigmaStat version 2.0 program (Systat Software, San Jose, CA, USA). Likelihood ratio analysis was calculated by the Microsoft Excel spreadsheet program. The B side versus A side Tygerberg morphology improvement was calculated by taking the actual improvement value for each pair of data on each slide, and then calculating the mean improvement values for each investigator. All values are reported as mean $\pm$ SEM.

Results

Relationship between semen parameters, sperm morphology, biochemical markers, and HA binding scores

Semen samples from 63 men were studied. The sperm concentrations were $34.6 \pm 3.4 \times 10^6$ sperm/ml semen (4.0–115) and sperm motility was $42.1 \pm 2.2\%$ (10–70, **Table 1**). Among the 63 men, 16 were oligozoospermic (group 1), 27 were in the $20\text{--}30 \times 10^6$ per ml low normal sperm concentration range (group 2), and 20 men were in the $\geq 30 \times 10^6$ sperm/ml semen high normal sperm concentration range (group 3). The division of the $>20 \times 10^6$ sperm/ml World Health Organization normal concentration samples into two groups was based on the consistent finding that within the $20\text{--}30 \times 10^6$ sperm/ml samples the biochemical markers showed a substantial proportion of samples with arrested maturity. Further, some of these men in subsequent semen analysis showed sperm concentrations in the $<20 \times 10^6$ /ml range (Huszar *et al.*, 1988). Indeed, in the present study six of the 27 samples in group 2 (22%) showed arrested maturity. In comparison, the proportion of such men was 7 out of 16 in the oligozoospermic group 1 (44%).

There was a balanced representation of semen samples with various sperm concentrations, including oligozoospermic men (group 1, $<20 \times 10^6$ /ml $n = 16$, 25.4% of the study population), men with low normal sperm concentration (group 2, $20\text{--}30 \times 10^6$ /ml, $n = 27$, 42.9% of the study population), and men with high normal concentration samples (group 3 with $>30 \times 10^6$ sperm/ml, $n = 20$, 31.7% of the study population, **Table 1**). Regarding Tygerberg strict morphology, 37 men were classified teratozoospermic ($\leq 14\%$ normal forms) by all three investigators. The other 26 men who were classified as 'normal' morphology, similarly to the Tygerberg design, were scored in the $>14\%$ normal range by at least one of the investigators (Menkveld *et al.*, 1991).

Regarding groups 1, 2 and 3 (**Table 1**), in addition to the sperm concentration differences, there were also variations in the HA binding scores, and the sperm maturity markers of CK activity and HspA2 chaperone protein expression levels. The sperm CK activity (reflecting surplus cytoplasm in arrested maturity spermatozoa) was higher in the oligozoospermic compared with the $\geq 30 \times 10^6$ sperm/ml normal sperm concentration population). The HspA2 chaperone levels and sperm–HA binding scores were higher in the $>30 \times 10^6$ sperm/ml normal sperm concentration group (**Table 1**).

Tygerberg morphology results and B side versus A side score improvements

In **Table 2**, column pairs 1 and 2 (A side and B side, all 63 samples), the proportions of spermatozoa with strict normal morphology are presented in semen and in HA-selected spermatozoa on the HA-coated B side respectively. All comparisons, whether in the whole study group ($n = 63$), or in groups 1, 2 or 3, were significantly different ($P < 0.001$).

The column pairs of 3–4, 5–6 and 7–8 represent the respective A and B side scores by the three individual investigators US1, US2, and TSA in the 63 study samples, in groups 1, 2 and 3, as well as in the teratozoospermic and $>14\%$ normal morphology men. All 15 comparisons were different at the level of $P < 0.001$. The Tygerberg normal morphology scores reported by the three readers on the A sides (**Table 2**, columns 3, 5 and 7) were in a

Table 1. Semen and biochemical attributes of the study population.

	n	Sperm concentration (10^6 /ml)	Motility (%)	CK activity (IU/ 10^8 spermatozoa)	HspA2 ratio (%)	HA binding score (%)
All samples	63	34.6 ± 3.4	42.1 ± 2.2	0.23 ± 0.04	31.3 ± 2.2	75.4 ± 2.0
Group 1 (oligozoospermic men)	16	12.1 ± 1.1	30.1 ± 4.4	0.37 ± 0.1^a	21.7 ± 3.4^c	68.8 ± 4.4^f
Group 2 ($20\text{--}30 \times 10^6$ sperm/ml)	27	25.0 ± 0.50	41.3 ± 3.1	0.21 ± 0.04	30.4 ± 2.9^d	72.9 ± 2.6^e
Group 3 (men with $\geq 30 \times 10^6$ sperm/ml)	20	65.6 ± 6.4	52.6 ± 2.9	0.12 ± 0.04^b	40.6 ± 4.2^c	84.0 ± 3.0^h
Teratozoospermic (by all three investigators)	37	28.2 ± 3.6	39.2 ± 3.0	0.22 ± 0.1	32.1 ± 2.6	73.0 ± 2.5
Normal $> 14\%$ Tygerberg normal (by one or all readers)	26	43.7 ± 6.1	46.1 ± 3.0	0.24 ± 0.5	30.2 ± 3.9	78.8 ± 3.1

Values are mean $\pm$ SEM.

HA = hyaluronic acid; Hsp = heat shock protein.

^{a,b} $P < 0.001$; ^{c,e} $P < 0.01$; ^{d,f} $P < 0.01$; ^h $P < 0.01$; ^g $P < 0.01$.

comparable range: US1 (1–27%), US2 (1–26%) and TSA (1–24%). The respective scores on the B sides (columns 4 and 6) were also comparable in case of US1 (4–37.2%) and US2 (3.5–36.7%), but the wider ranges of column 8 (8–64%) indicated that US1 and US2 applied stricter criteria than TSA.

Further data in **Table 3** show the improvements in the proportion of spermatozoa with normal strict morphology in the B versus A sides ('times' improvement, B versus A), whether considering the total 63 men in the study population or in the other five subgroups. The B versus A improvements found by the three investigators were within the ranges of $\times 1.6$ to $\times 4.7$ (all comparisons are $P < 0.001$).

Reader-to-reader variations and consistency within the strict morphology scores

It is of particular interest in light of the well documented investigator-to-investigator differences in strict morphology evaluations, that despite the individual variations in the personal level of 'strictness' scores, and the fact that each investigator

has likely selected different sperm fields for assessment, the scores were internally consistent, and weakly but significantly, correlated among the three investigators. Considering the A and B scores respectively: US1 versus US2: $r = 0.67$ and $r = 0.57$; US1 versus TSA: $r = 0.53$ and $r = 0.51$; US2 versus TSA: $r = 0.61$ and 0.60 (all six correlations were significant, $P < 0.001$, $n = 63$ men). Within the 37 teratozoospermic men, the respective correlations among the three investigators were also present: A sides: $r = 0.65$, $r = 0.58$; $r = 0.57$; and B sides: $r = 0.44$, $r = 0.40$ and $r = 0.40$ ($P < 0.001$ in all).

There were also variations ($\times 1.6$ to $\times 4.7$) in reader-to-reader strictness within the A-side to B-side improvements within all 63 samples and in the five concentration groups, although all comparisons were highly significant ($P < 0.001$, **Table 3**).

The relationship between the three investigators is further illustrated in **Figure 1**, in which the mean strict morphology scores on the A sides by the three investigators (turquoise line) is presented along with the B side improvements: (i) there was a negative correlation between the initial strict morphology score and the degree of improvement (r values: US1: -0.59 ,

Table 2. Tygerberg strict morphology score and improvement in the hyaluronic acid-bound sperm fractions.

	n	Column number							
		1	2	3	4	5	6	7	8
		All investigators		US1		US2		TSA	
		A side	B side	A side	B side	A side	B side	A side	B side
All samples	63	9.8 $\pm$ 0.6	18.8 $\pm$ 0.9	8.6 $\pm$ 0.7	14.4 $\pm$ 0.9	10.5 $\pm$ 0.8	16.9 $\pm$ 1.0	10.3 $\pm$ 0.7	25.4 $\pm$ 1.4
Group 1 (oligozoospermic men)	16	7.9 $\pm$ 1.2	16.6 $\pm$ 1.7	7.9 $\pm$ 1.4	14.4 $\pm$ 2.2	8.4 $\pm$ 1.5	13.8 $\pm$ 2.2	7.4 $\pm$ 1.3	21.6 $\pm$ 1.8
Group 2 (20–30 $\times 10^6$ sperm/ml)	27	8.9 $\pm$ 0.8	17.7 $\pm$ 1.4	8.1 $\pm$ 1.0	13.5 $\pm$ 1.2	8.9 $\pm$ 1.1	15.0 $\pm$ 1.4	9.7 $\pm$ 0.8	24.5 $\pm$ 2.5
Group 3 (men with $>30 \times 10^6$ sperm/ml)	20	12.5 $\pm$ 1.0	22.3 $\pm$ 1.3	9.9 $\pm$ 1.3	15.7 $\pm$ 1.5	14.2 $\pm$ 1.3	21.8 $\pm$ 1.5	13.5 $\pm$ 1.5	29.5 $\pm$ 2.3
Teratozoospermic by all three readers	37	6.5 $\pm$ 0.4	14.5 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 0.5	11.9 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 0.6	11.9 $\pm$ 0.9	7.2 $\pm$ 0.6	19.8 $\pm$ 0.9
$>14\%$ normal morphology by one or all readers	26	14.4 $\pm$ 0.7	25.7 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 1.2	18.1 $\pm$ 1.4	16.0 $\pm$ 1.0	23.9 $\pm$ 1.3	14.7 $\pm$ 1.0	33.3 $\pm$ 2.5

Values are mean $\pm$ SEM.

A side = plain uncoated glass; B side = coated with hyaluronic acid. US1, US2 and TSA were the three investigators.

All A vs B side comparisons (col 1 vs 2; 3 vs 4; 5 vs 6; 7 vs 8) are different at the level of $P < 0.001$.

Table 3. Morphology score improvements in the hyaluronic acid-bound versus semen sperm fractions.

	n	Improvement (B side versus A side)		
		US1	US2	TSA
All samples	63	2.0 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.3
Group 1 (oligozoospermic men)	16	2.3 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.9
Group 2 (20–30 $\times 10^6$ sperm/ml)	27	2.0 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.5
Group 3 (men with $>30 \times 10^6$ sperm/ml)	20	1.8 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.2
Teratozoospermic by all three readers	37	2.3 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.5
$>14\%$ normal morphology by one or all readers	26	1.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.2

Values are mean $\pm$ SEM.

A side = plain uncoated glass; B side = coated with hyaluronic acid. US1, US2 and TSA were the three investigators.

All B side versus A side improvements (by all three investigators) were statistically significant ($P < 0.001$).

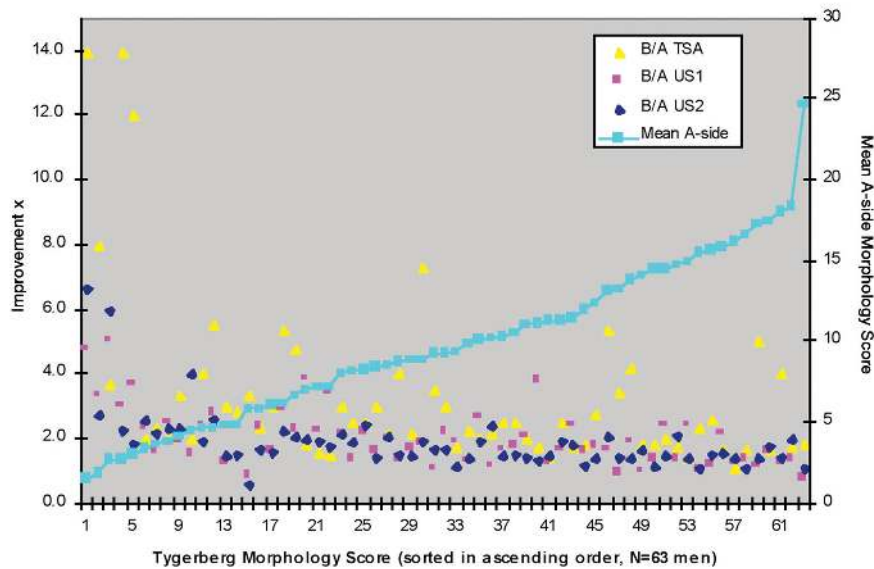


Figure 1. B/A improvement in Tygerberg sperm morphology scores recorded by three individual investigators (US1, US2 and TSA) where A side = plain uncoated glass; B side = coated with hyaluronic acid.

US2: -0.56 , and TSA: -0.69 , all three $P < 0.001$). Thus, the lower the initial morphology score on the A side, the higher the degree of improvement in the B side score; (ii) considering the B side, the correlations between the mean improvement and the improvement reported by the three investigators were also close (US1: $r = 0.72$, US2: $r = 0.65$, TSA: $r = 0.92$, all $P < 0.001$).

The hypothesis underlying this work, that due to plasma membrane remodelling, the HA binding and zona pellucida binding sites are related, was best supported by the percentage increase of spermatozoa with normal morphology in the semen versus HA-selected sperm fractions of the 37 teratozoospermic men. Investigators US1 and US2 reported a 229 and 215% increase. However, TSA found a 388% improvement. This increase is nearly identical to the 420% improvement reported in semen versus zona pellucida-bound sperm fraction by the same Tygerberg investigators in 1991 (Menkveld *et al.*, 1991).

Likelihood analysis of the B/A improvement in the HA-bound sperm fractions

To assess the overall improvement in the proportion of Tygerberg normal spermatozoa from the A (semen spermatozoa) compared with the B (spermatozoa selected by HA binding) sides, the combined data of the three investigators were examined. The frequency of men with $>14\%$ strict morphology on the A side was 24%, whereas the respective Tygerberg normal score frequency on the B side was 74% ($P < 0.001$). The analysis of improvement indicated that in the HA-bound versus semen sperm fraction, the likelihood of mean improvement was $\times 3.04$ (95% confidence limits: $\times 1.9$ to $\times 4.7$).

Discussion

The present study explored the hypothesis that the binding sites for the zona pellucida and HA, which are under common spermiogenetic regulation, would provide a similar degree of power for selecting mature spermatozoa with normal morphology either by HA or by the zona pellucida (Menkveld *et al.*, 1991). This hypothesis was developed based on an earlier demonstration of sperm plasma membrane remodelling in spermiogenesis, which facilitates the formation of both the zona pellucida and HA binding sites (Huszar *et al.*, 1997; Oehninger, 2003).

In addition to strict morphology, various aspects of the research on sperm biochemical markers revealed that the HA-bound mature spermatozoa exhibit nuclear and cytoplasmic maturity attributes that are comparable to that of sperm bound to the zona pellucida of hemizona, including lack of surplus cytoplasm, persistent histones, low levels of DNA chain degradation, chromosomal aneuploidies, and apoptotic processes (Huszar and Vigue, 1993; Huszar *et al.*, 1994, 1998b, 2003; Cayli *et al.*, 2004; Jakab *et al.*, 2005).

The characteristics of spermatozoa with arrested maturation, particularly the incomplete extrusion of the surplus cytoplasm and diminished propagation of tail sprouting, decisively influence sperm shape with respect to the symmetry and size of the head, the shape and size of the midpiece area, including abaxial insertion of the tail, and tail length (Gergely *et al.*, 1999; Celik-Ozenci *et al.*, 2003, 2004). These factors also play a prominent role in the evaluation of sperm shape according to the Tygerberg criteria. An associated line of studies with objective morphometry measurements of sperm fractions further indicated that sperm shape closely reflects the degree of sperm maturity (Gergely *et al.*, 1999; Celik-Ozenci *et al.*, 2003, 2004; Zavaczki *et al.*, 2006).

The present results confirmed the hypotheses posed. The increase of the Tygerberg normal spermatozoa in the HA-bound fractions from the A to the B sides of HA-bound spermatozoa in the population of 63 samples, and in the five subgroups covering oligozoospermic to high normozoospermic ranges, have all shown significant overall improvements. The increase in spermatozoa with normal morphology attributes were also associated with concomitant improvements in the sperm maturity biochemical markers, further indicating the relationship between sperm maturation and sperm shape.

The likelihood analysis based on data of the three investigators showed a $\times 3.04$ (95% confidence limit: $\times 1.9$ to $\times 4.7$) in HA-bound spermatozoa, which is in the range of the $\times 4.2$ improvement reported within the zona pellucida-bound sperm fraction (Menkveld *et al.*, 1991). It is of interest that TSA, who has participated in both studies found a comparable improvement in the HA-bound and hemizona-bound sperm fractions.

With respect to the Tygerberg normal morphology scores of the three investigators, the observations are of interest from the point of view of this study, as well as to the strict morphology method itself. First, there was a substantial and significant increase in the proportion of normal spermatozoa from the A to the B sides with very few exceptions. Although both the A and B side scores varied among the three investigators, the scores were related in all sperm concentration groups. Thus, the variations in scores reflected a consistent individual-to-individual difference in the perception of normality.

Another related question is the reliability of Tygerberg morphology determination by single technicians. It is well established and reported that the 'strict' morphology evaluation, in spite of its utility, is an inexact science. Sample sets tested in various laboratories often resulted in inconsistent results. In further approaches investigators attempted to re-evaluate the clinical utility of sperm morphology, as shape properties or any other semen attribute alone, did not provide a sufficient measure of fertility or a solid 'cut-off' value, and there is a search for second lines of fertility testing (Ombelet *et al.*, 1997, 1998; Guzick *et al.*, 2001; Menkveld *et al.*, 2001; Nallella *et al.*, 2006; Henkel *et al.*, 2008).

Considering sperm function, sperm concentrations often fail to reflect sperm maturity and fertilizing potential. However, objective biochemical markers provide an objective assessment of sperm maturity and fertility. This has been demonstrated not only in laboratory experiments, but also in clinical studies of fertile oligozoospermic men, and of men with normal sperm concentrations with unexplained male infertility (sperm concentrations in the normal range coupled with diminished sperm maturity and fertility) (Huszar *et al.*, 1992; Ergur *et al.*, 2002).

Regarding the oligozoospermic group, in a study of couples treated with intrauterine insemination, in 160 oligozoospermic samples the occurrence of pregnancies was significantly related to sperm CK activity but was unrelated to sperm concentrations (Huszar *et al.*, 1988). With respect to unexplained male infertility, in two blinded studies of IVF couples (82 and 119 couples), sperm CK activity and sperm HspA2 (a chaperone protein reflecting sperm maturity) were followed respectively. In these two studies, nine of 22 (41%) and 13 of 25 (52%)

men with semen in the normal sperm concentration range and adequate sperm motility nevertheless had diminished sperm maturity and failed to achieve pregnancy in the IVF cycles (Huszar *et al.*, 1992; Ergur *et al.*, 2002).

It seems that the sperm-HA binding assay (an objective assessment performed with standardized HA platforms), which is based on basic principles of sperm biochemical measurements, may offer an advantageous test in addition to sperm morphology. HA binding reflects the zona pellucida binding ability of spermatozoa, and the presence of HA receptors that reflects normal spermiogenesis and various upstream maturational events that affect DNA chain integrity, surplus cytoplasm and aneuploidy frequency (Huszar *et al.*, 2007). The HA sperm binding assay is likely to be useful in evaluation of male infertility, particularly if the couple is treated with assisted reproduction.

In summary, the validity of the hypothesis tested in this study was confirmed: due to the common regulation of the HA-binding and zona pellucida-binding sites in human spermatozoa, one may anticipate a similar improvement in the morphology of the HA-bound and zona pellucida-bound spermatozoa versus the semen spermatozoa fraction. In line with the variety of studies that demonstrated that normal sperm shape and sperm function are related, this study enhanced the scientific basis of the 20-year-old 'strict morphology' method. The findings also support the clinical utility of the sperm HA binding assay, as the HA-selected spermatozoa, in all attributes studied so far, seem to be comparable with those selected by the zona pellucida, including sperm shape, maturity properties, and genetic integrity. Thus, the sperm HA binding assay would improve the diagnosis and treatment of male factor infertility.

Acknowledgements

This research was supported by the NIH (HD-19505). PP was supported in part by grant MZE0002716201 and by the Czech Academy of Sciences (CR-project No. 1QS500390506). LS has received support from Akdeniz University.

References

- Cayli S, Sakkas D, Vigue L *et al.* 2004 Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Molecular Human Reproduction* **10**, 365–372.
- Cayli S, Jakab A, Ovari L *et al.* 2003 Biochemical markers of sperm function: male fertility and sperm selection for ICSI. *Reproductive BioMedicine Online* **7**, 462–468.
- Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T *et al.* 2004 Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Human Reproduction* **19**, 2052–2059.
- Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A *et al.* 2003 Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Biology of Reproduction* **69**, 1347–1355.
- Chemes EH, Rawe YV *et al.* 2003 Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update* **9**, 405–428.
- Clermont Y 1963 The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy* **112**, 35–51.
- Ergur AR, Dokras A, Giraldo JL *et al.* 2002 Sperm maturity and

- treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertility and Sterility* **77**, 910–918.
- Gergely A, Kovanci E, Senturk L *et al.* 1999 Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Human Reproduction* **14**, 2007–2014.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P *et al.* 2001 Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *New England Journal of Medicine* **345**, 1388–1393.
- Henkel R, Schreiber G, Sturmhoefel A *et al.* 2008 Comparison of three staining methods for the morphological evaluation of human spermatozoa. *Fertility and Sterility* **89**, 449–455.
- Huszar G, Vigue L 1993 Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Molecular Reproduction and Development* **34**, 292–298.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D *et al.* 2007 Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reproductive BioMedicine Online* **14**, 650–663.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S *et al.* 2003 Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertility and Sterility* **79**, Suppl. 3, 1616–1624.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L 2000 Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biology of Reproduction* **63**, 925–932.
- Huszar G, Patrizio P, Vigue L *et al.* 1998a Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. *Journal of Andrology* **19**, 11–20.
- Huszar G, Gordon E, Irvine D *et al.* 1998b Absence of DNA cleavage in mature human sperm selected by their surface membrane receptors. *Annual Meeting of the American Society for Reproduction Medicine*, San Francisco, CA.
- Huszar G, Sbracia M, Vigue *et al.* 1997 Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biology of Reproduction* **56**, 1020–1024.
- Huszar G, Vigue L, Oehninger S 1994 Creatine kinase immunocytochemistry of human sperm-hemizona complexes: selective binding of sperm with mature creatine kinase-staining pattern. *Fertility and Sterility* **61**, 136–142.
- Huszar G, Vigue L, Morshedi M 1992 Sperm creatine phosphokinase M isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **57**, 882–888.
- Huszar G, Vigue L, Corrales M 1990 Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. *Journal of Andrology* **11**, 40–46.
- Huszar G, Vigue L, Corrales M 1988 Sperm creatine phosphokinase activity as a measure of sperm quality in normospermic, variable spermic and oligospermic men. *Biology of Reproduction* **38**, 1061–1066.
- Jakab A, Sakkas D, Delpiano E *et al.* 2005 Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertility and Sterility* **84**, 1665–1673.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS *et al.* 1986 Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* **46**, 1118–1123.
- Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ *et al.* 2001 Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction* **16**, 1165–1171.
- Menkveld R, Franken DR, Kruger TF *et al.* 1991 Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development* **30**, 346–352.
- Menkveld R, Stander FS, Kotze TJ *et al.* 1990 The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction* **5**, 586–592.
- Nallella KP, Sharma RK, Aziz NA *et al.* 2006 Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertility and Sterility* **85**, 629–634.
- Oehninger S 2003 Biochemical and functional characterization of the human zona pellucida. *Reproductive Biomedicine Online* **7**, 641–648.
- Ombelet W, Bosmans E, Janssen M *et al.* 1998 Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Archive of Andrology* **41**, 103–114.
- Ombelet W, Pollet H, Bosmans E *et al.* 1997 Results of a questionnaire on sperm morphology assessment. *Human Reproduction* **12**, 1015–1020.
- Sati L, Ovari L, Bennett D *et al.* 2008 Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reproductive BioMedicine Online* **16**, 570–579.
- Zavaczki Z, Celik-Ozenci C, Ovari L *et al.* 2006 Dimensional assessment of X-bearing and Y-bearing haploid and disomic human sperm with the use of fluorescence in situ hybridization and objective morphometry. *Fertility and Sterility* **85**, 121–127.

Presented in part at the 2006 Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, October 16–20, 2006, New Orleans, Louisiana, USA.

Declaration: The HA-related diagnostic and sperm selection devices were invented by GH. The patent is owned by Yale University. Yale licensed the technology to Biocoat Inc. GH is acting as scientific advisor.

Received 10 April 2008; revised and resubmitted 27 May 2008; refereed 12 June 2008; accepted 17 October 2008.

Double probing individual human spermatozoa: aniline blue staining for persistent histones and fluorescence in situ hybridization for aneuploidies

Laszlo Óvári, M.D.,^{a,c} Leyla Sati, M.S.,^{a,d} Jill Stronk, M.S.,^a Antal Borsos, M.D.,^c David C. Ward, Ph.D.,^b and Gabor Huszar, M.D.^a

^a Yale Sperm Physiology Laboratory, Yale University, School of Medicine, New Haven, Connecticut; ^b Nevada Cancer Institute, Las Vegas, Nevada; ^c Department of Obstetrics/Gynecology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary; and ^d Department of Histology and Embryology, Akdeniz University, School of Medicine, Antalya, Turkey

Objective: To study the potential relationship between two sperm nuclear attributes: persistence of histones and occurrence of chromosomal aneuploidies.

Design: The two variables were examined by double probing of the same spermatozoa.

Setting: Academic Andrology Laboratory.

Patient(s): Semen samples subjected for analyses were examined.

Intervention(s): We studied >58,000 spermatozoa, in seven men, first with aniline blue histone staining, graded as light (mature sperm), intermediate (moderately immature), and dark (severely arrested maturation). After recording the staining patterns and destaining, the same spermatozoa were subjected to fluorescence in situ hybridization (FISH), using centromeric X, Y, and 17 chromosome probes.

Main Outcome Measure(s): Proportions of sperm with light, intermediate, and dark staining were assessed, and ploidy of these sperm was evaluated.

Result(s): The aneuploidy frequencies in intermediate versus light (mature) spermatozoa were increased four- to sixfold. In addition, aneuploidy frequencies and proportions of intermediate sperm were related. There was no FISH signal detectable in the darkly stained, severely arrested mature sperm.

Conclusion(s): The data suggest that in sperm with arrested maturity and DNA fragmentation, the binding of FISH probes is diminished. DNA damage is further aggravated by the decondensation and denaturation steps of FISH. Thus, there is a strong likelihood that in oligozoospermic men, with a higher proportion of sperm with arrested maturation, the sperm disomy frequencies are historically underestimated. (Fertil Steril® 2010;93:2255–61. ©2010 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Arrested sperm maturation, persistent histones, aneuploidy frequencies

During spermiogenesis the developing round spermatids undergo complex events in both the nuclear and cytoplasmic compartments, including meiosis, histone transition protein–protamine replacement, acrosome development, sprouting of the sperm tail, and cytoplasmic extrusion (1, 2). In addition, in late spermiogenesis, there is a remodeling of the sperm plasma membrane, a step that facilitates formation of the zona pellucida (ZP) and hyaluronic acid-binding sites (3–5).

There are various nuclear and cytoplasmic markers that reflect arrested sperm maturation. However, the major hallmark is the low expression of the chaperon protein HspA2, which

in normal sperm development is expressed in two waves (6). First, in primary spermatocytes, HspA2 is part of the synaptonemal complex and supports meiosis (1, 7). A second HspA2 expression occurs in elongating spermatids, which coincides with delivery of DNA repair and other enzymes, and the major protein movements of cytoplasmic extrusion, nucleoprotein transport, and plasma membrane remodeling. Regarding the nucleoprotein replacement cycle, a close relationship was found between HspA2 chaperon function and transition protein transport (4, 8, 9).

Low HspA2 expression is also associated with other attributes of arrested sperm cellular maturation, such as surplus cytoplasm, persistent histones, the apoptotic enzyme caspase 3, and DNA chain fragmentation (5, 10–13). Because HspA2 is a component of the synaptonemal complex, low expression of HspA2 is also associated with increased frequency of chromosomal aneuploidies (12, 14–19). In line with this concept, sperm with surplus cytoplasm showed a 2–3 times higher frequency of chromosomal aneuploidies compared with normally developed sperm. The frequency of sperm with surplus cytoplasm and aneuploidies were related in semen ($r = 0.72$, $P < .001$) (14). In addition, in sperm studies with morphology and morphometry, there was a relationship

Received March 9, 2009; revised and accepted May 12, 2009; published online July 9, 2009.

L.O. has nothing to disclose. L.S. has nothing to disclose. J.S. has nothing to disclose. A.B. has nothing to disclose. D.C.W. has nothing to disclose. G.H. has nothing to disclose.

Supported by National Institutes of Health (NIH) grants to GH (HD-19505, OH-04061). L.O. has also received support from the University of Debrecen School of Medicine.

Presented in part at the 2004 American Society for Reproductive Medicine meeting, Philadelphia, PA, October 16–20, 2004.

Reprint requests: Gabor Huszar, M.D., Sperm Physiology Laboratory, Dept. Ob/Gyn and Reproductive Sciences, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven CT, 06510 (FAX: 203-737-1200; E-mail: gabor.huszar@yale.edu).

TABLE 1**Sperm attributes of the seven semen samples studied.**

Men	Sperm Conc. 10 ⁶ /mL	Motility (%)	Cells scored (n)	AB Light (%)	AB Intermediate (%)	AB Dark (%)
1	21.0	38.0	8,174	84.6	11.5	3.9
2	18.0	38.0	9,155	75.5	20.9	3.6
3	10.0	49.0	8,193	73.9	21.8	4.2
4	10.0	25.0	8,322	69.5	23.9	6.7
5	16.0	47.0	8,372	69.6	26.2	4.2
6	16.0	49.0	8,721	75.0	19.0	6.0
7	13.0	29.0	7,856	63.8	29.0	6.5
Mean ± SEM	14.8 ± 1.5	39.2 ± 3.6	8,399 ± 159.6	73.1 ± 2.3	21.8 ± 2.1	5.0 ± 0.5

Note: AB = aniline blue staining.

Óvári. Sperm aneuploidy and persistent histones. Fertil Steril 2010.

between increased sperm head size (related to surplus cytoplasm), higher frequencies of chromosomal aneuploidies, as well as a deficiency in plasma membrane remodeling during terminal spermiogenesis causing diminished sperm–hyaluronic acid binding (12, 20, 21).

Regarding the nuclear compartment of sperm with arrested cellular maturity, earlier studies reported an association with diminished histone transition protein–protamine exchange detected by aniline blue staining of excess persistent histones (22–27). Morel et al. (23) found that in semen with increased proportion of aniline blue-stained sperm, there was also an increased frequency of chromosomal aberrations, based on a limited number of spermatozoa tested with fluorescence in situ hybridization (FISH).

In the present study we conducted a more detailed examination of the nuclear events related to persistent histones and aneuploidies. [1] The relationship between aniline blue staining and chromosomal aneuploidies were studied within the same double probed spermatozoa. [2] Approximately 8,000 sperm per man were examined using probes for the X, Y, and 17 chromosomes. [3] Finally, aniline blue staining intensity was quantified as light, intermediate, and dark, thus classifying the degree of arrest in histone transition protein–protamine replacement sequence, along with FISH within approximately 58,000 sperm.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design

Spermatozoa in semen of seven moderately oligozoospermic men were studied. The sperm were subjected to double probe treatment with aniline blue staining and FISH. After the aniline blue staining, the sperm fields were recorded by the computer-assisted Metamorph program (MDS Inc., Toronto, Canada), and the sperm were evaluated for staining intensity (Table 1). To facilitate the relocation of sperm fields, we introduced diamond-scratched lines on the slide, and recorded the X/Y microscope coordinates. The spermatozoa

were classified according to their staining intensity, which reflects sperm cellular maturity and persistence of histones.

Subsequently, the aniline blue was destained, and the sperm were subjected to FISH with three chromosome probes. The chromosome complements were evaluated under fluorescence microscopy (14, 28, 29). The order of the aniline blue staining and FISH procedures was important because after the decondensation and denaturation steps of FISH, the aniline blue staining pattern was not reliable. All studies were approved by the Yale School of Medicine HIC.

Sperm Preparation

After determination of sperm concentration and motility, aliquots of the sperm was washed in 10 volumes of physiological saline containing 0.3% bovine serum albumin (BSA) and 30 mM of imidazole at pH 7.2 (SAIM solution) by centrifugation at $500 \times g$ for 18 minutes at room temperature. Each sperm pellet then was resuspended in the SAIM solution to $30\text{--}40 \times 10^6$ sperm/mL. The sperm slides were prepared by smearing 5–10 μL of sperm onto clean precleaned, poly-L-lysine-coated glass slides and were allowed to air dry.

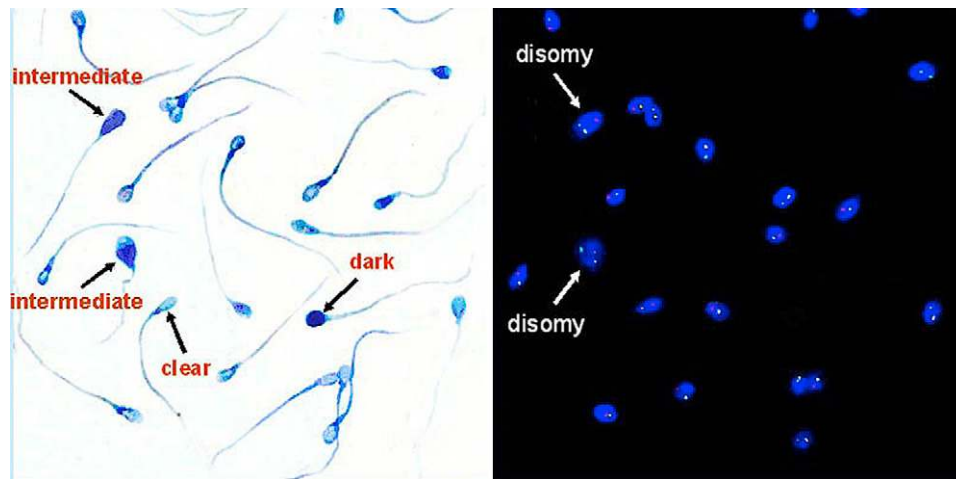
Aniline Blue Staining of Sperm Chromatin

The slides were stained by 5% aniline blue solution (Sigma Co., St. Louis, MO) acidified to approximately pH 3.5 with acetic acid for 5 minutes, then washed with tap water and allowed to completely air dry (22). The sperm were evaluated at $\times 600$ magnification, and images of random microscopic fields were recorded. At least 8,000–10,000 spermatozoa were captured per man (30–40 sperm in 250–300 fields). Destaining of the aniline blue, before FISH occurred in 5% aqueous acetic acid. In addition, the slides were dehydrated in an ethanol series, and were stored at room temperature.

Mature sperm, having completed histone transition protein–protamine replacement, stained very lightly (clear, mature sperm, Fig. 1), the slightly immature sperm were

FIGURE 1

Panels of double treated spermatozoa with aniline blue staining (*left*) and FISH (*right*). Arrows on left side indicate staining intensity patterns.



Óvári. Sperm aneuploidy and persistent histones. *Fertil Steril* 2010.

stained more extensively (intermediate, with slightly or partially stained head, moderately immature), and severely arrested mature sperm with substantial degrees of persistent histones stained darkly (dark, darkly filled head and in some midpiece, severely immature sperm) (5).

FISH Procedures

The DNA decondensation treatment of destained spermatozoa was performed as described (12, 14, 28–30). The cells were treated with 10-mmol/L 1,4-dithiothreitol (Cleland's reagent; DTT, Sigma) in 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0 for 30 minutes on ice. After, the sperm slide was covered with 4 mmol/L lithium 3,5-diiodosalicylic acid (Sigma) in 0.1 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.0 for an additional 90 minutes at room temperature. Slides were rinsed in 0.1 mol Tris-HCl, pH 8.0 buffer, allowed to air dry, then fixed in methanol/acetic acid (3:1).

For FISH, directly labeled alpha satellite centromere-specific probes were used, for chromosome X (Vysis, Downers Grove, IL; Spectrum Green CEP X) and chromosome Y (Vysis; Spectrum Orange CEP Y). Chromosome 17 was hybridized by an indirectly, biotin-labeled centromere-specific probe (SPOT-Light chromosome 17 centromeric probe; Zymed, San Francisco, CA). The sperm DNA was denatured in 70% formamide and two times standard saline citrate (2X SSC) at 75°C for 6 minutes. The slides were snap cooled and dehydrated in an ethanol series at -20°C, air dried, then placed onto a slide warmer at 37°C. The hybridization solution, prepared according to manufacturer's instructions was added and the slide was covered with a cover slip and sealed with acid-free rubber cement (Ross, Columbus, OH).

Hybridization was conducted in dark humidity chamber for overnight at 37°C. After hybridization washing was

accomplished with 50% formamide in 2X SSC at 42°C for 15 minutes followed by treatment in 2X SSC for 15 minutes at 42°C. After a blocking step of 3% BSA for 30 minutes, to visualize the indirect biotin-labeled probe 17, the slides were incubated with avidine–rhodamine (fluorescent red; Roche Biochemicals, Indianapolis, IN), avidine–fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) (fluorescent green; Roche Biochemical). Slides were washed with a solution of 4X SSC, 0.1% Tween 20 at 42°C for 15 minutes, and counterstained with 6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Roche Biochemicals), mounted with an antifade solution (Vectashield; Vector Scientific, Torrance, CA), and a coverslip was applied.

Scoring Criteria and Data Collection

For FISH pattern evaluation, an Olympus AX 70 epifluorescence microscope (Olympus, Center Valley, PA) was used with a triple pass filter for DAPI, FITC, and tetramethyl-rhodamine isothiocyanate (rhodamine). To improve signal resolution, separate single pass filters were also used for DAPI, FITC, and rhodamine.

Sperm nuclei were scored according to published criteria (14). Nuclei were not scored if they overlapped or if they lacked signals, indicating hybridization failure. A spermatozoon was considered disomic when it showed two fluorescent domains of the same color, comparable in size and brightness in approximately the same focal plane, clearly positioned inside the edge of the sperm head, and at least one domain apart. Diploidy was recognized by the presence of two double-fluorescence domains with the same criteria. Nullisomies were not directly scored, and were considered as frequency equivalent to disomies (12, 14, 17, 28–30).

We have detected nuclear maturity by aniline blue, and the presence of disomy 17, XX, YY, XY and diploidy, and scored at least 8,000 spermatozoa per man. [Figure 1](#), the double panel, demonstrates the same sperm fields treated with aniline blue and FISH.

Statistical Analysis

For analysis of significance the Mann-Whitney *U* test and Pearson correlation test were done (Sigmastat 2.0; Jandel Corporation, San Raphael, CA).

RESULTS

Aniline Blue Staining Results

In the seven moderately oligozoospermic men, we have evaluated a total of 58,793 spermatozoa ([Table 1](#)). Regarding nuclear maturity, the proportion of the light, intermediate, and dark aniline blue-stained sperm (representing mature, moderately immature, and severely arrested maturity spermatozoa) were $73.1\% \pm 2.3\%$, $21.8\% \pm 2.1\%$, and $5.0\% \pm 0.5\%$. It is of interest that the sperm concentrations showed a larger variation compared with the proportions of sperm with light, intermediate, or dark staining. This idea of independence between sperm concentration and sperm maturity was described previously with various other biochemical markers ([5](#), [14](#), [31](#)). The three groups of spermatozoa with various levels of cellular maturation served as a model for exploring the potential relationship between a defect of the histone transition protein–protamine replacement cycle and chromosomal aneuploidies, as both may be related to defects of HspA2 action during meiosis or nucleoprotein transport.

FISH Results

Assessment of the sperm population with FISH indicated that the mean frequencies of aneuploidies were as follows: disomy X: $0.07\% \pm 0.01\%$, disomy Y: $0.09\% \pm 0.02\%$; disomy XY: $0.18\% \pm 0.03\%$, and disomy 17: $0.16\% \pm 0.03\%$. The frequencies of diploidy were $0.17\% \pm 0.04\%$.

In the sperm groups of various aniline blue staining intensity or nuclear maturity, the frequency of each of the four disomies and total disomy was higher in the intermediate compared with the light staining (mature) sperm ([Table 2](#)). The increase of frequencies were 3.9 times in X disomy, 5.2 times in Y disomy, 6.1 times in XY disomy, 4.5 times in 17 disomy, and 5.3 times higher in the aggregate or total disomy rates (all comparisons, except X disomy, are $P < .001$). There was also a higher incidence of diploidy in the intermediate compared with the light cells, but this comparison did not reach significance.

Regarding the correlation between the variations of disomy frequencies versus the aniline staining attributes, the findings were confirmatory. [1] There was a relationship between the frequencies of various disomies and sperm with light and intermediate aniline blue staining, particularly between the proportions of intermediate sperm and frequencies

of disomy XY ($r = 0.82$, $P < .05$), disomy 17 ($r = 0.70$, $P < .05$), and total disomy frequencies ($r = 0.76$, $P < .05$). [Figure 2](#) is a graphic presentation of the relationship between aniline blue staining intensity and aneuploidy frequency. However, there was no correlation between aniline blue staining and diploidies or sperm concentrations.

There was an unexpected finding with respect to the FISH patterns in the case of aniline blue dark, the severely arrested mature spermatozoa. There were no chromosome signals with the centromere-specific FISH probes ([Fig. 1](#), left and right panels). Furthermore, some of the dark staining sperm also lacked DAPI nuclear staining, indicating a diminished presence of DNA.

DISCUSSION

Attributes of sperm with arrested maturity may be detected by various nuclear and cytoplasmic probes ([5](#), [6](#), [22](#), [28](#)). Regarding the double probing technique, it was developed for a previous study, in which approximately 10,000 individual spermatozoa were treated with double markers for aniline blue staining and cytoplasmic retention, aniline blue and caspase 3 content, as well as for aniline blue and DNA fragmentation. There was a substantial 70% agreement between these cytoplasmic and nuclear markers with respect to the degree of maturity within the same spermatozoa. This indicated that arrested sperm maturation is not restricted to a single sperm compartment ([22](#)). Thus, the nuclear and cytoplasmic aspects of arrested maturity (e.g., persistent histones, cytoplasmic retention, DNA fragmentation, chromosomal aneuploidies, caspase 3 activity, Tygerberg abnormal morphology) may occur concurrently and are related ([4](#), [6](#), [8](#), [9](#), [11](#), [12](#), [21](#), [22](#), [28](#)). Substantial evidence supports that the relationship between cytoplasmic and nuclear features is based on a common contributory factor—the diminished level of HspA2 chaperon protein. HspA2 is expressed in two waves, in spermatocytes and elongated spermatids, and HspA2 chaperone action supports multiple cellular mechanisms ([1](#), [6–8](#), [32](#)).

The recognition that the aniline blue stain may be removed from sperm by destaining with acetic acid was very fortuitous, as acetic acid is also used as a solvent for aniline blue staining and is a component of fixatives for several sperm biochemical markers, such as FISH, immunocytochemistry, and DNA nick translation. Regarding the study design, the sequence of aniline blue staining and FISH was important, as the FISH procedures of decondensation and denaturation disrupt the nucleoprotein structure.

In earlier studies an association was reported between sperm developmental arrest, as demonstrated by aniline blue staining of persistent histones, and the number of chromosomal aberrations in semen samples ([23](#), [24](#), [33](#)). These data lead us to a more detailed study of the relationship between sperm nuclear maturity and chromosomal aneuploidies as we pursued aniline blue staining and FISH within the same spermatozoon.

TABLE 2**FISH results.**

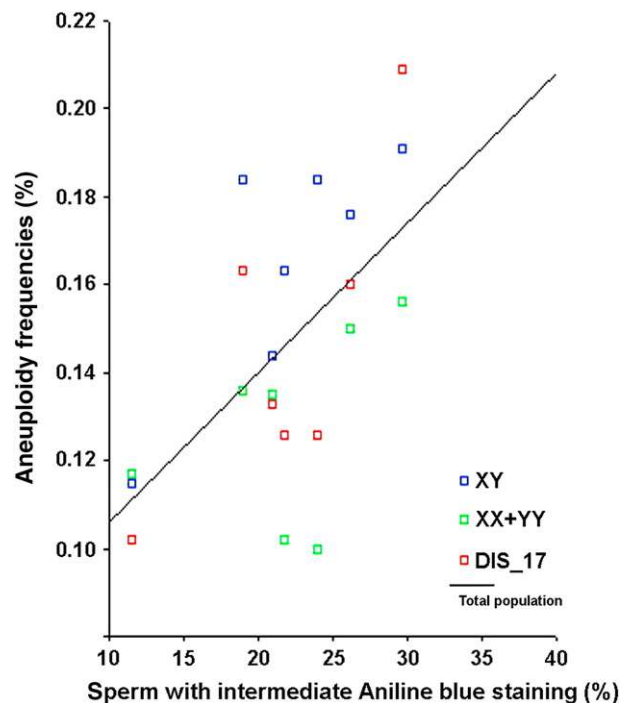
Aniline blue staining pattern		Disomy X		Disomy Y		Disomy XY		Disomy x,y,xy		Disomy 17		Total disomy X,Y,XY,17	
		L	IN	L	IN	L	IN	L	IN	L	IN	L	IN
Sample no.	1	0.029	0.11	0.043	0.430	0.058	0.75	0.130	1.290	0.058	0.543	0.19	1.82
	2	0.029	0.16	0.043	0.210	0.072	0.42	0.144	0.79	0.072	0.418	0.22	1.20
	3	0.033	0.11	0.033	0.170	0.066	0.56	0.132	0.84	0.104	0.335	0.21	1.17
	4	0.035	0.10	0.017	0.15	0.104	0.45	0.156	0.700	0.155	0.403	0.26	1.11
	5	0.034	0.14	0.052	0.18	0.086	0.36	0.172	0.54	0.120	0.501	0.33	1.18
	6	0.046	0.24	0.046	0.18	0.092	0.54	0.184	0.960	0.120	0.423	0.31	1.39
	7	0.040	0.13	0.060	0.21	0.100	0.43	0.200	0.770	0.100	0.515	0.30	1.29
Mean		0.035	0.14	0.035	0.22	0.082	0.50	0.152	0.860	0.099	0.447	0.26	1.31
Increases (fold-x)			3.9x		5.2x		6.1x		5.6x		4.5x		5.3x
Significance		$P = .028$		$P < .001$		$P < .001$		$P < .001$		$P < .001$		$P < .001$	

Note: The aneuploidy frequencies in the light (L) and intermediate" (IN) spermatozoa fractions. All disomy frequencies are expressed in percentage. The increases of aneuploidy frequencies in the L versus IN groups, and the degrees of statistical differences are noted in the two bottom lines.

Óvári. Sperm aneuploidy and persistent histones. Fertil Steril 2010.

FIGURE 2

Relationship between proportion of sperm with intermediate aniline blue staining and disomy frequencies ($r = 0.6$, $P = .002$).



Óvári. Sperm aneuploidy and persistent histones. *Fertil Steril* 2010.

The relationship between diminished maturation of the nucleoprotein replacement pathway and occurrence of aneuploidies may be expected based on two aspects. [1] In spermatozoa with arrested maturity, the low expression of HspA2 would adversely affect histone transition protein–protamine replacement as well as the meiotic process (1, 6, 7, 9, 32–38). A central role for HspA2 in the nucleoprotein replacement has been recently demonstrated based on a global proteomic approach (8). [2] In mature sperm that underwent plasma membrane remodeling and are able to selectively bind to solid state hyaluronic acid, there are no persistent histones or increased frequency of chromosomal aneuploidies (5, 28).

In the present study, the aniline blue staining and FISH results of >58,000 individual spermatozoa have confirmed the relationship between nuclear maturity and aneuploidies. In sperm with light versus intermediate staining patterns (or mature or moderately arrested mature sperm, respectively), there was a four- to sixfold increased frequency of chromosomal aneuploidies (Table 2), affecting the sex and 17 autosomal chromosomes. There was also a correlation between disomy frequencies and aniline blue staining of disomy 17, disomy XY, and total disomy (Fig. 2). These findings agree with previous work in which an increased frequency of chromosomal aneuploidies was found in sperm with surplus cytoplasm (14).

There was also a slight increase in the frequency of diploidies in sperm with arrested maturity, but it did not follow the relationship of disomies and arrested sperm maturity because diploidies arise from a mechanism unrelated to sperm maturation (14, 16).

A further interesting finding was related to sperm with severe arrest of nuclear maturity and dark aniline blue staining, thus high level of persistent histones. These cells exhibited no FISH signal, and sometimes the DAPI staining of sperm DNA was also missing (Fig. 1). We propose two potential mechanisms for the lack of FISH probe binding. [1] The combined effects of arrested sperm maturation—cytoplasmic retention and increased production of reactive oxygen species production may cause higher levels of DNA chain degradation (34, 35). The fragmented DNA is held in place by the secondary helical structure in intact sperm. However, after the decondensation and denaturation steps necessary for FISH, the DNA fragments are released from sperm. [2] The second mechanism is related to low levels of HspA2 expression, which causes a combination of retarded histone transition protein–protamine replacement and delayed delivery of DNA repair enzymes, thus sperm DNA chain integrity is diminished (1, 6, 7, 22). This second point is well supported by Govin et al., a report that actually defines HspA2 as a transition protein chaperone (8).

Our experimental findings suggest that in sperm with severe maturation arrest, both of these proposed mechanisms may lead to the loss of FISH signal. Thus, one may surmise that disomy frequencies in oligozoospermic men, with a higher proportion of arrested maturity sperm, have been historically underestimated.

Acknowledgment: The authors thank Lynne Vigue, M.S., for her technical contributions.

REFERENCES

- Eddy EM. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999;4:23–30.
- Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;14:1197–213.
- Huszar G, Patrizio P, Vigue L, Willets M, Wilker C, Adhooit D, et al. Cytoplasmic extrusion and the switch from creatine kinase B to M isoform are completed by the commencement of epididymal transport in human and stallion spermatozoa. *J Androl* 1998;19:11–20.
- Huszar G, Jakab A, Sakkas D, Ozenci CC, Cayli S, Delpiano E, et al. Fertility testing and ICSI sperm selection by hyaluronic acid binding: clinical and genetic aspects. *Reprod Biomed Online* 2007;14:650–63.
- Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, Zavadzki Z, Hansch E, Vigue L. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril* 2003;79(Suppl. 3):1616–24.
- Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Bio Reprod* 2000;63:925–32.
- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Poorman-Allen P, Mori C, Blizard DR, et al. HSP70-2 is required for desynapsis of synaptonemal complexes during meiotic prophase in juvenile and adult mouse spermatocytes. *Development* 1997;124:4595–603.
- Govin J, Caron C, Escoffier E, Ferro M, Kuhn L, Rousseaux S, et al. Post-meiotic shifts in HSPA2/HSP70.2 chaperone activity during mouse spermatogenesis. *J Biol Chem* 2006;281:37888–92.

9. Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007;13:313–27.
10. Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000;21:33–44.
11. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, Demir R, Huszar G. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm. *Mol Hum Reprod* 2004;10:365–72.
12. Celik-Ozenci C, Catalanotti J, Jakab A, Aksu C, Ward D, Bray-Ward P, et al. Human sperm maintain their shape following decondensation and denaturation for fluorescent in situ hybridization: shape analysis and objective morphometry. *Bio Reprod* 2003;69:1347–55.
13. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update* 2005;11:337–49.
14. Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001;16:1209–17.
15. Bernardini L, Martini E, Geraedts JP, Hopman AH, Lanteri S, Conte N, et al. Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa of normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* 1997;3:431–8.
16. Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, Garcia F, Veiga A, Aran B, et al. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 2000;6:93–105.
17. Blanco J, Egozcue J, Vidal F. Incidence of chromosome 21 disomy in human spermatozoa as determined by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1996;11:722–6.
18. Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, Pinkel D, Weier HU. Detection of sex chromosomal aneuploidies X-X, Y-Y, and X-Y in human sperm using two-chromosome fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* 1994;53:1–7.
19. Guttenbach M, Schmid M. Determination of Y chromosome aneuploidy in human sperm nuclei by nonradioactive in situ hybridization. *Am J Hum Genet* 1990;46:553–8.
20. Gergely A, Kovanci E, Senturk L, Cosmi E, Vigue L, Huszar G. Morphometric assessment of mature and diminished-maturity human spermatozoa: sperm regions that reflect differences in maturity. *Hum Reprod* 1999;14:2007–14.
21. Prinosilova P, Kruger T, Sati L, Ozkavukcu S, Vigue L, Kovanci E, et al. Selectivity of hyaluronic acid binding for spermatozoa with normal Tygerberg strict morphology. *Reprod Biomed Online* 2009;18:177–83.
22. Sati L, Ovari L, Bennett D, Simon SD, Demir R, Huszar G. Double probing of human spermatozoa for persistent histones, surplus cytoplasm, apoptosis and DNA fragmentation. *Reprod Biomed Online* 2008;16:570–9.
23. Morel F, Mercier S, Roux C, Elmrini T, Clavequin MC, Bresson JL. Interindividual variations in the disomy frequencies of human spermatozoa and their correlation with nuclear maturity as evaluated by aniline blue staining. *Fertil Steril* 1998;69:1122–7.
24. Morel F, Roux C, Bresson JL. Disomy frequency estimated by multicolour fluorescence in situ hybridization, degree of nuclear maturity and teratozoospermia in human spermatozoa. *Reproduction* 2001;121:783–9.
25. Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard-Moscato ML. Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 1988;20:211–7.
26. Auger J, Mesbah M, Huber C, Dadoune JP. Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int J Androl* 1990;13:452–62.
27. Foresta C, Zorzi M, Rossato M, Varotto A. Sperm nuclear instability and staining with aniline blue: abnormal persistence of histones in spermatozoa in infertile men. *Int J Androl* 1992;15:330–7.
28. Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, et al. Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 2005;84:1665–73.
29. Robbins WA, Segraves R, Pinkel D, Wyrobek AJ. Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. *Am J Hum Genet* 1993;52:799–807.
30. Celik-Ozenci C, Jakab A, Kovacs T, Catalanotti J, Demir R, Bray-Ward P, et al. Sperm selection for ICSI: shape properties do not predict the absence or presence of numerical chromosomal aberrations. *Hum Reprod* 2004;19:2052–9.
31. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 1993;34:292–8.
32. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:3264–8.
33. Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron* 1995;26:323–45.
34. Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev* 1994;39:268–79.
35. Huszar G, Vigue L. Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *J Androl* 1994;15:71–7.
36. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250:66–9.
37. Aoki VW, Liu L, Jones KP, Hatasaka HH, Gibson M, Peterson CM, et al. Sperm protamine 1/protamine 2 ratios are related to in vitro fertilization pregnancy rates and predictive of fertilization ability. *Fertil Steril* 2006;86:1408–15.
38. Aitken RJ, De Iuliis GN, McLachlan RI. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int J Androl* 2009;32:46–56.