



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ERKEK GERMLİNE KÖK HÜCRE-BENZERİ
HÜCRELERİN OLGUN SPERME IN VITRO
FARKLILAŞMASI VE IN VIVO SPERMATOGENEZ
RESTORASYONUNA ETKİSİ**

Dünya AYDOS

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ERKEK GERMLİNE KÖK HÜCRE-BENZERİ
HÜCRELERİN OLGUN SPERME IN VITRO
FARKLILAŞMASI VE IN VIVO SPERMATOGENEZ
RESTORASYONUNA ETKİSİ**

Dünya AYDOS

**DİSİPLİNLER ARASI KÖK HÜCRE VE YENİLEYİCİ TIP
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI**

**ANKARA
2023**

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans olarak hazırlayıp sunduğum “Erkek Germline Kök Hücre-Benzeri Hücrelerin Olgun Sperme In Vitro Farklılaşması ve In Vivo Spermatogenez Restorasyonuna Etkisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dünya AYDOS

Tarih: 19/05/2023

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Kök Hücre ve Yenileyici Tıp Anabilim Dalı'nda
Dünya AYDOS tarafından hazırlanan
“Erkek Germline Kök Hücre-Benzeri Hücrelerin Olgun Sperme In Vitro
Farklılaşması ve In Vivo Spermatogenez Restorasyonuna Etkisi” adlı tez çalışması
aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/05/2023

İmza

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza

Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Raportör

İmza

Doç. Dr. Ceylan Verda BİTİRİM
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Unvanı Adı ve Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xi
Çizelgeler	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Erkek İnfertilitesi	3
1.2. Radyoterapi ve Sitotoksik Tedavilerin Testis Fonksiyonu Üzerindeki Etkisi	6
1.3. Erkeklerde Reprodüktif Kök Hücreler	8
1.3.1. Embriyo Hücresi Benzeri Çok Küçük Hücreler	8
1.3.2. Germline Kök Hücreleri	12
1.3.2.1. Germ Hücresi Öncüleri: İlkel Cinsiyet (Primordiyal Germ) Hücreleri	12
1.3.2.2. İndüklenmiş Primordiyal Germ Hücresi-Benzeri Hücreler	15
1.3.2.3. Erkek Yetişkin Germline Kök Hücreleri	17
1.3.2.3.1. Spermatogonyal Kök Hücre Transplantasyon Tekniği	22
1.3.2.3.2. Spermatogonyal Kök Hücre Nişi	24
1.3.2.3.3. Spermatogonyal Kök Hücreleri Düzenleyen Büyüme Faktörleri	25
1.4. Unipotent Erkek Germline Kök Hücrelerinde Pluripotensinin İndüklenmesi: Germline-Kökenli Pluripotent Kök Hücreler	27
1.5. Germline-Kökenli Pluripotent Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları	30
1.5.1. <i>In Vitro</i> Spermatogenez: Bir Fertilite Restorasyonu Stratejisi	32
1.5.1.1. Organotipik kültür	34
1.5.1.2. İki-Boyutlu Kültür	35
1.5.1.3. Üç-Boyutlu Kültür	37
1.5.1.4. Mayozun Başlaması ve İlerlemesinde SB431542 ve Retinoik Asitin Rolü	38
2. GEREÇ ve YÖNTEM	48
2.1. Fare Testislerinden Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması	48
2.2. 10-günlük ve 8-haftalık Fare Testisinde CD49f+ Hücre Yüzdesinin Flow Sitometri ile Karşılaştırılması	50
2.3. MACS ile CD49f+ Hücrelerin Seçilimi	50
2.4. Annexin V/Propidium İyodür Boyaması ile Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Saptanması	51
2.5. Testiküler Somatik Hücrelerin RNA ve Protein Düzeyinde Karakterizasyonu ve Saflık Analizleri	52
2.5.1. Yarı Kantitatif PZR	52
2.5.2. Flow Sitometri	53
2.5.3. İkili İmmünohistokimyasal Boyama	54
2.6. CD49f+ GKH'lerin GATA4+ TSH'ler ile Ko-kültürü	55

2.7. P5 CD49f+ GKH'lerin RNA ve Protein Düzeyinde Karakterizasyonu ve Saflık Analizleri	56
2.7.1. Alkalan Fosfataz Aktivitesi Ölçümü	56
2.7.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR	57
2.7.3. Flow Sitometri	57
2.7.4. İmmünohistokimyasal Boyama	58
2.8. <i>In Vitro</i> Ortamda Germ Hücrelerine Farklılaştırılması	59
2.8.1. Western Blotlama	60
2.8.1.1. Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonunun BCA Testi ile Ölçülmesi	60
2.8.1.2. SDS-PAGE	60
2.8.1.3. Yarı-Kuru Transfer	61
2.8.1.4. Bloklama, Antikor İnkübsasyonu ve Jel Görüntülemesi	61
2.8.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR	62
2.8.3. İmmünohistokimyasal Boyaması	62
2.9. Busulfan-Kaynaklı Fare İnfertilite Modelinin Oluşturulması	63
2.9.1. Parafin Kesitlerde Hematoksilen-Eozin Boyaması	64
2.9.2. Parafin Kesitlerde İmmüno Floresan Boyaması	64
2.9.3. Testis Dokusundan RNA İzolasyonu ve Kantitatif Eş Zamanlı PZR	65
2.9.4. 40 mg/kg Busulfanın 15. ve 35. günlerde Testiküler Kök Hücrelerin Oranına Etkisinin Flow Sitometrik İncelemesi	65
2.10. Transplantasyon Deneyleri	66
2.11. Alıcı Testislerinde <i>In Vivo</i> Floresan Görüntüleme, Histolojik Analizler ve Kantitatif Eş Zamanlı PZR	67
2.11.1. <i>In Vivo</i> Floresan Görüntüleme	67
2.11.2. Histolojik Analizler	67
2.11.3. Kantitatif Eş Zamanlı PZR	68
2.12. Intracitoplazmik Sperm Enjeksiyonu	68
2.12.1. Süperovülasyon ve Oosit Toplanması	68
2.12.2. Spermilerin Hazırlanması	69
2.12.3. Piezo-ICSI Prosedürü	69
2.13. İstatistiksel Analizler	70
3. BULGULAR	71
3.1. Testiküler Somatik Hücrelerin Karakterizasyonu ve Saflığı	71
3.2. GKH'lerden MACS ile CD49f+ Hücrelerin Ayırıştırılması	74
3.3. CD49f+ GKH'lerin GKHBH'lere <i>In Vitro</i> İndüksiyonu ve Karakterizasyonu	76
3.4. GKHBH'lerde Nodal Yolağı Elemanlarının Tanımlanması	81
3.5. GKHBH'lerin <i>In Vitro</i> Ortamda Mayotik Germ Hücrelerine ve Sperm-Benzeri Hücrelere Farklılaştırılması	83
3.6. Busulfan-Kaynaklı İnfertil Fare Testislerine Transplante Edilen GKHBH'lerin TSH'lere Kıyasla Spermatogenez Restorasyonundaki Etkisi	89
3.7. GKHBH'lerden <i>In Vito</i> -Türetilen Spermilerin İşlevselliğinin Piezo-ICSI ile Değerlendirilmesi	106
4. TARTIŞMA	107
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	129
ÖZET	133
SUMMARY	134

KAYNAKLAR	135
EKLER	183
ÖZGEÇMİŞ	191



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında tüm fare testiküler kök hücreleri arasından fonksiyonel germline kök hücreleri (GKH) zenginleştirildikten sonra tanımlanmış kültür koşulları altında GKH'leri canlılığını ve fonksiyonunu koruyarak uzun süreli çoğaltmayı amaçladık. Onkoterapi sonrası sağ kalan erkeklerin yanı sıra üreme çağındaki erkeklerin yaklaşık %3'ünü etkileyen azoospermi olgularının tedavisinde GKH'lerin yararlı olabileceği ile ilgili görüşler olmasına karşın bu hücrelerden *in vitro* olgun gamet hücresi elde edilmesi konusunda birçok sorun bulunmaktadır. Bu nedenle, literatürde daha önce yapılmamış SB431542 ve retinoik asitten oluşan iki aşamalı ardışık *in vitro* diferansiyasyon kültür sisteminin GKH'lerde baskılanmış mayozu indüklemesindeki etkisini araştırdık. Aynı zamanda eksojen olarak sağlıklı somatik niş/Sertoli hücresi desteği sağlandığında *in vitro* kültüre edilmiş GKH'lerin kemoablate edilmiş fare testislerinde hasarlı nişi onararak spermatogenezi yeniden başlatabilme kapasitesini inceledik. Bu çalışma, TÜBİTAK ARDEB 1002 - Hızlı Destek Programı (Proje No. 121S259) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP)-B+ (Proje No. 21B0230002) tarafından desteklenmiştir.

Yüksek lisans çalışmam süresince gerek engin tecrübe ve bilgileriyle beni yönlendiren, gerekse her aşamada bana güvenip sonuna kadar destek olan danışman hocam Prof. Dr. K. Can Akçalı'ya teşekkürlerimi borç bilirim. Tüm yüksek lisans sürecimde her önüme çıkan engelde hiç çekinmeden rahatlıkla danışabildiğim, beni her zaman motive eden, kariyerimde örnek alacağım canım hocam Doç. Dr. Verda Bitirim'e tüm 'kalbim'le teşekkür ederim. Her zaman yanımda olup bana yardımcı olmak için her şeyi yapan ve yıllardır bana örnek olan aileme yardımları için teşekkür ederim. Ayrıca fikir, destek ve yardımlarını benden esirgemeyen tüm ekip arkadaşlarıma teşekkür ederim. Her zaman desteğini ve sevgisini hissettiren, bana cesaret veren Ali Batuhan Karahan'a teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Acr	Akrozin
Acta2	Aktin Alfa 2
Acvr	Aktivin A Reseptör
Aldh	Aldehit Dehidrojenaz
AP	Alkalen Fosfotaz
BLIMP1 (Prdm1)	B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1
BMP	Kemik Morfogenetik Proteini
Bmpr	Kemik Morfogenetik Protein Reseptör
Bp	Baz çifti
BSA	Sığır Serum Albümini
cm	Santimetre
CSF1	Koloni Uyarıcı Faktör 1
CXCR4	C-X-C Motif Kemokin Reseptör 4
CYP26	Sitokrom P450 Ailesi 26
D	Gün
Dazl	Deleted In Azoospermia Like
Ddx4	DEAD-Box Helikaz 4
dk	Dakika
Dmc1	DNA Mayotik Rekombinaz 1
DMSO	Dimetil Sülfoksit
Dnmt	DNA Metiltransferaz
Dnmt3l	DNA Metiltransferaz 3 Benzeri
dpc	days post coitum
Dppa5	Developmental Pluripotency Associated 5
E	Embriyonik Gün
ECM	Ekstraselüler Matriks
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGH	Embriyonik Germ Hücresi
EKH	Embriyonik Kök Hücre
EpiKH	Epiblast Kök Hücresi
ETV5	ETS Varyant Transkripsiyon Faktörü 5
FBS	Fetal Sığır Serum
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
FOXO1	Forkhead Box O1
FP	İleri primer
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GDF	Büyüme Farklılaşma Faktörü
GDNF	Gliya-Kökenli Nörotrofik Faktör
Gfra1	GDNF Ailesi Reseptör Alfa-1
GKH	Germline Kök Hücresi
GKHBH	GKH-Benzeri Hücre
GPR125	G-Protein Coupled Receptor 125
GSK3β	Glikojen Sentaz Kinaz 3 Beta
H&E	Hematoksilen-Eozin

H2AX	H2A.X Varyant Histon
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
Hsd17b3	Hidroksisteroid 17-Beta Dehidrogenaz 3
ICSI	İntasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IGF	İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü
Igf1r	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
Igf2r	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 Reseptörü
INSL3	İnsülin Benzeri 3
Insr	İnsülin Reseptörü
Irs	İnsülin Reseptör Substratı
ITGA6	Integrin Subunit Alfa 6
IVF	<i>In vitro</i> fertilizasyon
IVIS	<i>In Vivo</i> Görüntüleme Sistemi
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilo dalton
Kİ	Kemik İliği
KSR	Knockout Serum Replasmanı
Lefty	Left-Right Determination Factor
LIF	Lösemi Engelleyici Faktör
LIF-R	LIF Reseptör Subunit Alfa
m	Murin
MACS	Magnetic-Activated Cell Sorting
MAP2K1	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz 1
MAPC	Multipotent Yetişkin Progenitor Hücre
MASC	Multipotent Yetişkin Spermatogonyal-Kökenli Kök Hücre
MEF	Fare Embriyo Fibroblastı
mGKH	Multipotent GKH
MII	Mayoz II
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
ml	Mililitre
MMC	Mitomisin C
nM	Nanomolar
NOA	Nonobstrüktif Azospermi
P	Pasaj
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
PDGF	Kan Plateletlerinden Köken Alan Büyüme Faktörü
PGH	Primordiyal Germ Hücresi
PGHBH	PGH-Benzeri Hücre
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKH	Pluripotent Kök Hücre
PLZF	Promiyelositik Lösemi Çinko Parmak
Prdm	PR/SET Domain
Prm2	Protamin 2
qPZR	Kantitatif PZR
RA	Retinoik Asit
RAR	Retinoik Asit Reseptör

RP	Geri primer
RT-PZR	Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RXR	Retinoid X Reseptör
SALL4	Spalt Benzeri Transkripsiyon Faktörü 4
Sca-1	Kök Hücre Antijeni-1
SCF (KITL)	Kök Hücre Faktörü
SDF-1 (CXCL12)	Stroma Kökenli Faktör 1
SF	Scatter Faktör
SFK	Src Ailesi Kinaz
SKH	Spermatogonyal Kök Hücre
sn	Saniye
Sox	SRY-Box Transkripsiyon Faktörü
SPEF1	Sperm Flagellar Protein 1
Ssea	Evreye Özgü Embriyo Antijeni
Stra	Stimulated By Retinoic Acid
Syp3	Synaptonemal Kompleks Protein 3
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü β
Tgfbr	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta Reseptör
TNAP	Doku Non-Spesifik AP
TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü α
TS-GKHBHT	TSH ve GKHBH Ko-Transplantasyon
TSH	Testiküler Somatik Hücre
TSHT	TSH Transplantasyon
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGFA	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
Vim	Vimentin
VPA	Valproik asit
VSEL	Embriyo Hücresi-Benzeri Çok Küçük Hücre
Wt1	Wilms Tümör 1
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikromolar

ŞEKİLLER

- Şekil 1.1:** Erkek ve dişi germ hücrelerinin oluşumu için *in vivo* gelişim sürecinin özeti ve germ hücresi gelişimi esnasında germ hücre-ilişkili genlerin ekspresyonu. 15
- Şekil 1.2:** Kemirgenlerin spermatogenik soylarında klonal gelişim. 19
- Şekil 1.3:** Evreye özgü germ hücre belirteçleri. 20
- Şekil 1.4:** Spermatogonyal transplantasyon yönteminin ana hatları ve SKH için kantitatif analiz. 23
- Şekil 1.5:** SKH nişinin şematik diyagramı ve SKH'lerin köklülüğünü ve kendini yenilemesini sürdürmede yer alan düzenleyici faktörler. 25
- Şekil 1.6:** Her iki cinsiyetin fare fetal gonadlarında germ hücre gelişiminin şeması. 39
- Şekil 1.7:** Testiküler Sertoli ve/veya mayotik germ hücrelerde RA biyosentezi ve sinyalleşmesi. 43
- Şekil 1.8:** TGF β sinyalleşme yolağı bileşenleri. 44
- Şekil 2.1:** Çalışmada izlenen yöntem basamaklarının genel gösterimi. 48
- Şekil 3.1:** TSH'lerin karakterizasyonu. (a): P4 TSH'lerin aydınlık-alan mikroskopunda çekilmiş görüntüsü (10X; Ölçek çubuğu = 100 μ m). (b): P4 TSH'lerde ve total testiste Sertoli, germ, peritübüler miyoid ve Leydig belirteçlerine özgü primerler kullanılarak yapılan RT-PZR ürünlerinin jel görüntüsü. Test edilen belirteçlerin ifade seviyeleri bant yoğunluklarına göre pozitif kontrol olarak kullanılan total testisinkilerle kıyaslanmıştır. (c): TSH'lerin P1'deki (sol panel) ve besleyici hücre tabakası olarak veya transplantasyon deneylerinde kullanıldığı P4'teki (sağ panel) GATA4 pozitifliğinin flow sitometri ile ölçülmesi. (d): P4 TSH'ler, GATA4 (yeşil) ve INSL3 (kırmızı) ifadesiyle immünohistokimyasal olarak boyanarak protein düzeyinde karakterize edilmiştir. Parafin testis kesitlerinde INSL3 immünofloresan boyamasının, Leydig hücrelerine spesifik olduğu teyit edilmiştir. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 20 μ m). 73
- Şekil 3.2:** GKH'lerin eldesi. (a): GKH'lerin izolasyon aşamalarının şematik gösterimi. (b): CD49f⁺ GKH yüzdesinin 8-haftalık ve 10-günlük fare testislerinde flow sitometri ile karşılaştırması. (c): MACS sonrası elde edilen *pre-sort*, CD49f⁻ ve CD49f⁺ fraksiyonda CD49f ifade eden hücrelerin yüzdesinin flow sitometri ile ölçülmesi. Flow okumaları bir *sorting* deneyini

temsil etmektedir. (d): MACS sonrası CD49f+ GKH'lerin canlılık analizi için yapılan FITC Annexin V-PI ikili boyamasının flow sitometrik incelenmesi. Annexin V-/PI- normal hücreleri, Annexin V+/PI- erken apoptotik hücreleri, Annexin V+/PI+ geç apoptotik hücreleri ve Annexin V-/PI+ nekrotik hücreleri işaret eder.

74

Şekil 3.3: (sol panel): GKHBH'lerin oluşturduğu iki farklı tipte koloninin P5'teki parlak alan mikroskopunda çekilmiş fotoğrafı (20X; Ölçek çubuğu = 50 µm). Farklılaşmamış GKH'ler, birbirlerine daha gevşek bağlı farklılaşmaya gitmiş GKH'lere kıyasla, daha kompakt ve sınırları belli olmayan koloniler oluşturur. Kompakt şekilli kolonilerde alkalen fosfataz aktivitesi (beyaz kenarlıklı eklentide yeşil boyalı, AP) görülmüştür (10X; Ölçek çubuğu = 100 µm). (sağ panel): Farklılaşmamış kolonilerin TSH besleyici tabakası üzerinden stereomikroskop altında bir mikromanipülatör yardımıyla seçimi.

77

Şekil 3.4: AP+CD49f+ GKHBH kolonilerde (pembe sütun) (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): proliferasyon (*Ki67*), (c): mayotik/post-mayotik (*Stra8* ve *Sycp3/Prm2* ve *Acr*), (d): GKH/VSEL/pluripotensi (*Gfra1* ve *Oct4/Ly6a/Oct4a*, *Sox2* ve *Nanog*) belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin zenginleştirilmiş kültür ortamına koyulmamış CD49f+ GKH'lerdekilere (siyah sütun) göre kat değişimi olarak verilmiştir. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

79

Şekil 3.5: (a): MACS sonrası 0. günkü CD49f+ GKH'lerde ve (b): AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinde SCA-1, CD45, LIN, GPR125 ve SSEA-1 ifadelerinin flow sitometrik incelenmesi.

80

Şekil 3.6: AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinin immünositokimyasal boyaması ile protein düzeyinde karakterizasyonu. P5 GKHBH'ler SCA-1 (yeşil), GPR125 (turuncu), SSEA-1 (magenta) ve DDX4 (kırmızı)/OCT4A (yeşil) ifadesiyle karakterize edilmiştir. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 50 µm).

81

Şekil 3.7: AP+CD49f+ GKHBH'lerde Nodal sinyalleşme yolağı elemanlarının gen ekspresyonu ve immünoboyaması. (a): *Nodal*, *Cripto*, *Acvr2b*, *Acvr1b*, *Tgfbr1* ve *Lefty2* gen ekspresyonu qPZR ile 0. gün CD49f+ GKH'lerinde (siyah sütun) ve 45. gün GKHBH'lerde (pembe sütun) ölçüldü. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder. (b): ACVR2B (kırmızı), TGFBR1 (yeşil) ve NODAL (yeşil) P5 GKHBH'lerinde saptandı. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 50 µm).

83

Şekil 3.8: (a): AP+CD49f+ GKHBH'lerin mayotik/sperm hücrelerine uygulanan iki-aşamalı *in vitro* farklılaşma protokolünün şematik gösterimi. (b): AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinin sperme *in vitro* farklılaşmalarının

indüklenmesi sırasında parlak alan mikroskopunda çekilmiş fotoğraflar. Fotoğrafların çekildiği günler üstlerinde verilmiştir (10X; Ölçek çubukları = 100 µm). Koloniler TSH besleyici hücreleri üzerinde 7 gün SB431542 ile kültüre edilmelerini takiben RA ile 14 gün kültüre edildi. Kültürün 9., ve 11. günlerinde sırasıyla A_{pr} spermatogonya (2-hücreli; kırmızı ok) ve A_{al-4} ve A_{al-8}/A_{al-16} spermatogonya (4-hücreli ve 8-hücreli/16-hücreli; açık mavi ve pembe ok) oluşturdu. Spermatositler (beyaz ok) ve spermatidler (siyah ok) kültürün 13-24. günlerinde görüldü. Uzun kuyruklarıyla amorf sperm-benzeri hücreler (yeşil ok) ise çoğunlukla kültürün 24. gününde gözlemlendi. Kültürün 28. gününde ise geniş çaplı hücre ölümüyle birlikte az sayıda primer spermatosit ile sperm-benzeri hücre (siyah çerçeve) de görüldü (40X; Ölçek çubuğu = 20 µm).

85

Şekil 3.9: AP+CD49f+ GKHBH'lerin *in vitro* ortamda sperme farklılaştırıldıkları (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): proliferasyon (*Ki67*), (c): GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), (d): mayotik (*Stra8* ve *Sycp3*) ve (e): post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin ifadelerinin indüklenmemiş kontrol hücrelerine (siyah sütun) kıyaslanmasıyla qPZR ile gösterildi. SB, SB431542 eklenerek (pembe sütun) ve RA, retinoik asit eklenerek (yeşil sütun) oluşturulmuş kültür ortamındaki örnekleri temsil eder. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

87

Şekil 3.10: AP+CD49f+ GKHBH'lerden *in vitro* olarak farklılaştırılan spermatosit ve spermilerin immünositokimyasal olarak boyanması ile protein düzeyinde karakterizasyonu (40X; Ölçek çubuğu = 20 µm). (a): GKH kültür besiyeri II ile kültüre edilmiş indüklenmemiş GKHBH'ler (kontrol grubu) ve (b): SB431542 içeren besiyeri ile 7 gün kültüre edilen GKHBH'lerin her ikisinde de PCNA (kırmızı) ekspresyonu saptanırken, H2AX (kırmızı) ve SYCP3 (kırmızı) ekspresyonunun sadece SB431542 verilmiş grupta leptoten aşamasındaki spermatositlerin (beyaz ok) nükleusuna lokalize olduğu bulundu. (c): SB431542'i takiben RA içeren besiyeri ile 14 gün ileri farklılaşması indüklenen spermatogenik hücrelerde spermatositlerin varlığı (beyaz ok), H2AX (kırmızı) ve SYCP3 (kırmızı) ekspresyonunun nükleusta spesifik olarak görülmesiyle gösterilirken aynı zamanda az sayıda CLAMP (yeşil) pozitif kuyruklu sperm hücrelerine (beyaz ok) rastlandı. Orta panelde pakiten (beyaz çerçeve) ve diploten (sarı çerçeve) aşamasındaki spermatositler büyütülmüş olarak verildi. En sağ panelde zigoten aşamasındaki bir spermatosit (beyaz çerçeve) büyütülerek gösterildi. Nükleus DAPI ile boyandı.

88

Şekil 3.11: AP+CD49f+ GKHBH'ler DMSO veya 10 µM SB431542 içeren bazal farklılaşma besiyeriyle 2 günde bir besiyeri değişimi yapılarak toplamda 1 hafta kültüre edildi ve SMAD2 ve fosforile SMAD2'ye (pSMAD2) özgü antikorlarla immünoblotlama kullanılarak kullanılan doz ve sürenin ALK4/5/7 sinyalleşmesi üzerindeki inhibe edici etkisine bakıldı. Blotlamanın prob edildiği antikorlar panellerin yanında verilmiştir. Temsili sonuçlar, n=4.

89

Şekil 3.12: 30 mg/kg, 40 mg/kg veya 45 mg/kg busulfan ve her bir doz için karşılık gelen miktarda DMSO uygulanan 8-haftalık BALB/c erkek farelerin 35 gün sonra 5-µm kalınlığındaki testis kesitlerine ait H&E boyanmış fotoğraflar (40X; Ölçek çubuğu= 20 µm). Her bir doz ve her dozun çözücüsü için n=6 fare.

90

Şekil 3.13: (a): 40 mg/kg busulfan veya eşit miktarda DMSO verildikten 35 gün sonra testislerden alınan parafin kesitlerde DDX4 (germ hücresi belirteci) ve OCT4A (pluripotensi belirteci) boyaması (n=3; 40X, Ölçek çubuğu = 20 µm). Belirtilen dozda ve sürede busulfan ile atrofik ve germ hücrelerince deplete olmuş ve DMSO'ya kıyasla boyut olarak küçülmüş testislerde DDX4 ifadesine rastlanmamışken DMSO grubunda DDX4 sinyalleri bazal bölgede zayıftı ve farklılaşan hücrelerde daha güçlüydü. OCT4A ifadesinin ise sadece busulfan grubunda bazal laminanın hemen üstündeki bölgedeki az sayıdaki hücrede görece zayıf olduğu gözlenmiştir. Testis resimlerinin yanında H&E boyamaları da konulmuştur (n=3; 40X, Ölçek çubuğu = 100 µm). (b): 40 mg/kg busulfan (pembe sütun) ve eşit miktarda DMSO (siyah sütun) enjekte edildikten 35 gün sonra testislerde germ hücre (*Ddx4*), GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), mayotik (*Sycp3*) ve post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin transkript miktarları qPZR ile ölçüldü. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

93

Şekil 3.14: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra tüm testiküler hücreler içerisinde GPR125 ve SSEA-1 ifade edenler flow sitometri ile kantifiye edildi.

95

Şekil 3.15: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra total testiküler hücre popülasyonunda (b): c-KIT ve (c): CD90 ifadesi flow sitometri ile ölçüldü.

96

Şekil 3.16: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra total testiküler hücre popülasyonunda CD49f ifadesi flow sitometri ile ölçüldü.

97

Şekil 3.17: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra testiküler hücrelerde SCA-1+/CD45-/LIN- hücreler flow sitometri ile kantifiye edildi.

98

Şekil 3.18: GKHBH'lerin ve TSH'lerin sırasıyla SP-DiOC (yeşil) ve CM-Dil (kırmızı) ile işaretlendiklerinin transplantasyondan hemen önce konfokal mikroskobunda çekilen resimlerle doğrulanması. Negatif kontrol olarak PBS, SP-DiOC veya CM-Dil ile boyandı (40X; Ölçek çubuğu = 20 µm).

100

Şekil 3.19: (a): Skrotum üzerinde orta hattın yapıları kesilerek her iki testis dışarı çıkarılıp steril karton plak üzerine alındı (i). 32G mikro iğne takılı enjektöre 10 µl hacimde 30 µg DNaz I/%10 Tripan mavisi içerisinde 1-2 x 10⁶

işaretleli hücre süspansiyonu çekildi (ii). Optik büyütme altında, sırayla her iki testise mediastinum hizasından rete testis içerisinde iğne 30°C açıyla ilerletilerek interstisiyuma kaçmayacak şekilde 10 µl hücre süspansiyonu enjekte edildi (iii). Seminifer tübüllerin dolduğu, Tripkan mavisinin tunica albuginea üzerinden homojen bir şekilde dağıldığının gözlenmesiyle teyit edildi (iv). Testisler skrotal boşluğa yerleştirildi ve cilt 5/0 abzorbabıl suture ile dikilerek kapatıldı. (b): CM-Dil-TSH'ler ve CM-Dil-TSH + SP-DiOC-GKHBH'lerin transplantasyonun ertesi gününde IVIS ile *in vivo* floresan görüntüleme yapıldı. Doku otofloresanından arındırılmış floresan ışına *Spectral Unmixing* sonucu elde edilmiş olup her iki grupta da testise lokalize sinyal alınmış ve serum fizyolojik verilmiş kontrol grubunda herhangi bir sinyal saptanmamıştır. Her gruptan birer fare temsili olarak sunulmuştur. Her grubun altında CM-Dil (kırmızı) ve SP-DiOC (yeşil) ışımalarının doku otofloresansı (gri) birleştirilmiş resimleri konulmuştur. (c): Transplantasyondan 2 ay sonra servikal dislokasyonla ötenazi uygulanan üç grubun testis boyutlarının görsel olarak karşılaştırılabilmesi için her gruptan bir hayvanın cetvel yanına konmuş temsili fotoğrafları.

101

Şekil 3.20: CM-Dil-TSH'lerin ve CM-Dil-TSH + SP-DiOC-GKHBH'lerin transplantasyonu sonrası sırasıyla TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının testislerinde spermatogenezin ne ölçüde restore edildiği, (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), (d): mayotik (*Stra8* ve *Sycp3*) ve (e): post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin transkripsiyonel düzeydeki ifadelerinin qPCR ile kontrolünkülerle karşılaştırılmasıyla değerlendirildi. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

103

Şekil 3.21: (a): TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının ve kontrol grubu (n=3) parafin kesitlerinin H&E boyaması (40X; Ölçek çubuğu = 50 µm) her hayvanın testisleri ayrı ayrı incelenerek yapılmış ve her gruptan temsili olarak iki testisin Johnsen skorları H&E boyalı preparat fotoğrafları üzerinde ve grafik halinde tüm biyolojik tekrarlar için ortalama ± standart sapma halinde verilmiştir. TS-GKHBHT ve TSHT gruplarında *de novo* tübüller görülmüştür (bkz. üst panel). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. (b): TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının ve kontrol grubu (n=3) parafin kesitlerinin İHK ile SYCP3 ve DDX4 boyaması (63X; Ölçek çubuğu = 20 µm).

105

Şekil 3.22: AP+CD49f+ GKHBH'lerden *in vitro* olarak farklılaştırılan spermin işlevselliği Piezo-ICSI ile değerlendirildi. (a): Ampullaların yırtılmasıyla toplanan BALB/c dişilerin MII oositleriyle yapılan Piezo-ICSI sonrası *in vitro* kültürde gelişen (b): zigot, (c): iki-hücreli embriyo, (d): dört/sekiz-hücreli embriyo, (e): morula ve (f): blastokist fotoğrafları.

106

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1: PZR ve qPZR primerleri, optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ve beklenen ürün boyutları.

52



1. GİRİŞ

Kök hücreler, çoğu yetişkin hücresinden farklı olarak, kendini yenileme, farklılaşma ve klon oluşturma özelliklerine sahip farklılaşmamış hücrelerdir. Bu hem kök hücre havuzunun yenilenmesini hem de birçok özel hücre tipini oluşturmalarını sağlar (Donovan ve Gearhart, 2001; Fuchs ve Segre, 2000; Wagers ve Weissman, 2004). Kök hücreler gelişimsel potansiyellerine göre; erken embriyonun üç germ tabakasının hücrelerine ve plasenta gibi ekstra-embriyonik dokulara dönüşme kapasitesine sahip totipotent kök hücreler, ekstra-embriyonik dokular haricinde bir organizmanın tüm hücrelerine dönüşebilen pluripotent kök hücreler (PKH), belirli bir doku veya organda bulunan birden çok özelleşmiş hücre tipine farklılaşabilen multipotent kök hücreler ve sadece tek bir hücre tipine farklılaşabilen unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılır (Wagers ve Weissman, 2004).

Pluripotent embriyonik kök hücreler (EKH) ilk olarak blastokistlerin iç hücre kitlesinden türetilen hücrelerin *in vitro* kültüre edilmesiyle izole edilmiştir. Ancak iç hücre kitlesi hücrelerinin homojen olarak pluripotent olup olmadığı ve EKH'lerin tanımlanabilir ve fonksiyonel olarak özdeş bir pluripotent iç hücre kitlesi hücresinden mi yoksa EKH izolasyonu ve kültüründen önce blastokistin içinde bulunan hücre popülasyonundan mı türediği hala belirsizdir. Epiblast kök hücreleri (EpiKH) olarak adlandırılan post-implantasyon sonrası epiblastlardan türetilen “*primed*” pluripotent hücreler, “*naïve*” pluripotent EKH'lerden daha farklılaşmış bir durumu temsil eder (Joo ve ark., 2014). Yetişkin somada, kök hücrelerin genellikle dokuya özgü olduğu ve yalnızca köken aldığı dokuların soy hücrelerini oluşturabileceği düşünülmüştür. Bu tür dokuya özgü kök hücreler, yetişkin bağırsak, cilt, kas, kan ve sinir sistemi için değişen derecelerde tanımlanmıştır. Klinik kullanımla ilgili olarak, insan EKH'leriyle ilişkili iki endişe vardır: insan embriyolarının kullanımına ilişkin etik sorunlar ve transplantasyon sonrası immün rejeksiyon. Bu sorunların üstesinden gelmek için, birden fazla grup, hastanın kendi somatik hücrelerinden nükleer transfer yoluyla insan EKH'leri üretmeye çalışmakta olup, Tachibana ve ark. (2013)'nın çalışması gibi birkaç grubun yaptığı çalışmalar insan nükleer transfer EKH'lerini üretmede başarılı

sonuçlar vermiştir. Koyunlarda somatik klonlamanın başarısının yanı sıra somatik hücreler ve fare EKH'leri arasındaki hücre füzyonu yoluyla yeniden programlanma eldesinden (Tada ve ark., 2001) yola çıkan Shinya Yamanaka ve ark., 2006 yılında fare fetal ve yetişkin fibroblastlarının *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* ve *cMyc* ile yeniden programlanmasıyla oluşturdukları bu yeni tip PKH'leri uyarılmış PKH'ler (uPKH) olarak isimlendirmişlerdir. İnsan uPKH'leri 2007'de üretilmiş olup (Takahashi ve ark., 2007; Yu ve ark., 2007) o zamandan beri birçok grup uPKH'leri kliniğe uyarlamak için çalışmaktadır ve bunlardan bazıları şimdiden klinik deneylerde uPKH'leri test etmektedir (Yamanaka, 2020).

PKH'ler sonsuz bir şekilde çoğalır ve her üç germ tabakasının hücrelerine farklılaşır. Bu iki özellik, her ne kadar PKH'leri çeşitli hastalık ve yaralanmalarda hücresel tedavi için çekici kaynaklar haline getirirse de transplantasyonlarından sonra gelişebilecek tümörijenite önemli bir sorundur. Nitekim, farklılaşmamış ve/veya olgunlaşmamış hücreler, insan PKH'lerinden farklılaştırılmış nihai hücre ürünlerinde kalırsa, teratomlar ortaya çıkabilir; yeniden programlama faktörleri uPKH'lerde aktif kalırsa, tümörigenezi teşvik edebilir; PKH'lerin *in vitro* kültürü sırasında meydana gelen genetik mutasyonlardan tümörijenite gelişebilir. İmmün rejeksiyon, hücre tedavisinde başka bir kritik konudur. Her ne kadar hastaların kendi hücrelerinden oluşturulan uPKH'ler, PKH'lerle otolog transplantasyon gerçekleştirmek için benzeri görülmemiş bir fırsat sunsa da otolog uPKH'lerin immünojenitesi tartışmalıdır (Araki ve ark., 2013; Deuse ve ark., 2019; Guha ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2011). Otolog uPKH'ler ve onlardan türetilmiş greftlerin, immün yanıtı önlemek açısından transplantasyon için ideal bir seçenek sağlayabileceği önerilmiştir (Mandai ve ark., 2017; Sharma ve ark., 2019). Bununla birlikte günümüzde hem zaman açısından hem de üretim maliyeti nedeniyle allogreft yaklaşımlar otolog yöntemlere tercih edilmektedir. Allogreftlerdeki rejeksiyon, immünosüpresanlar kullanılarak aşılmış olsa da organ transplantasyonunda hastaların ömür boyu immünsüpresyona ihtiyacı vardır. Farmakoterapi çalışmalarındaki gelişmelere rağmen hastalar hala enfeksiyon ve benzeri yan etkiler ile karşılaşabilmektedir. PKH'ler aynı iki özelliği paylaşır: pluripotensi ve sonsuz proliferasyon. Ancak, her EKH veya uPKH hattı morfoloji, büyüme eğrisi, gen ekspresyonu ve çeşitli hücre soylarına farklılaşma eğilimi

açısından bir diğerinden farklılık gösterir. Böyle bir heterojenitenin varlığı hücrel tedavi gibi daha ileri aşamalarda sorun teşkil edebilir (Yamanaka, 2020).

Sonuç olarak, uPKH'lerin klinik kullanım için onaylanmasından önce, yeniden programlamanın etkilerinin ve uPKH kendini yenileme ve farklılaşmasına katkıda bulunan mekanizmaların daha iyi anlaşılması ve daha güvenli uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi gerekir (Fagoonee ve ark., 2011; Okita ve Yamanaka, 2011).

1.1. Erkek İnfertilitesi

İnfertilite, en az 12 ay boyunca korunmasız, düzenli (haftada en az iki kez) cinsel ilişkiye rağmen çiftlerin çocuk sahibi olamaması olarak tanımlanır (Zegers-Hochschild ve ark., 2017). Dünya popülasyonu genelinde infertilite, üreme çağındaki çiftlerin ortalama %10 (%8-12)'unu etkileyerek ciddi bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (Vander Borcht ve Wyns, 2018). Küresel hastalık yükü araştırmasına (2017) göre, yaşa göre standardize edilmiş infertilite prevalansının 1990 ile 2017 yılları arasında her yıl kadınlarda %0.370 ve erkeklerde %0.291 arttığı gösterilmiştir (Sun ve ark., 2019). Oran bölgelere göre değişmekle birlikte, vakaların yaklaşık yarısının (%20-70 aralığında) erkek faktöründen kaynaklandığı düşünülmektedir (Agarwal ve ark., 2015). Sperm sayısı önceki yıllara göre gittikçe düşme eğiliminde olup, 1992'de gerçekleştirilen bir meta-analizde 60 yıl içinde yarı yarıya azaldığı bildirilmiştir. Bu saptama 1973 ile 2011 arasında sperm sayısının %50-60 oranında azaldığını bildiren başka bir geniş çaplı sistematik inceleme tarafından da doğrulanmıştır (Carlsen ve ark., 1992; Levine ve ark., 2017; Mishra ve ark., 2018; Swan ve ark., 2000).

Erkek infertilitesi doğuştan, kazanılmış ve idiyopatik şeklinde sınıflandırılabilir. Erkek infertilitesi sıklığının artışında çok sayıda etken ve risk faktörü tanımlanmıştır (Krausz, 2011; Salonia ve ark., 2020). Genetik nedenler olarak

sıklıkla Kallmann sendromu, Y-kromozom mikrodelesyonları, testis fonksiyonunda bozulmaya yol açan kromozomal anormallikler ya da bilateral vaz ageneziyle seyreden kistik fibrozis gen mutasyonları sayılabilir. Varikosel erkeklerde en sık rastlanılan (%40) ve tedavi edilebilir bir infertilite nedenidir (Baazeem ve ark., 2011; Damsgaard ve ark., 2016; Salonia ve ark., 2019; Salonia ve ark., 2020; SMRU 2014). Erkek infertilitesi vakalarının yaklaşık %30-50'si idiyopatikdir ve saptanabilen bir nedeni veya eşlik eden kadına ait herhangi bir faktör bulunamaz (Chehab ve ark., 2015). Diğer yandan, infertil erkeklerin %30-80'inde seminal plazmada ROS seviyesinin yükselmesiyle ortaya çıkan oksidatif stresin etyolojide başlı başına rolü olduğu gösterilmiştir (Agarwal ve ark., 2019). Toksik kimyasallara çevresel veya mesleki maruziyet, çevresel olarak indüklenen oksidatif hasara ve hücrel işlev bozukluğuna karşı hücrel antioksidan savunma mekanizması ile ilgili genetik yatkınlıklar (Aydos 2021) ve çeşitli yaşam tarzı faktörleri, örneğin sigara (Sharma ve ark., 2016; Taha ve ark., 2012), alkol tüketimi (Ricci ve ark., 2017), uyuşturucu madde kullanımı (Bracken ve ark., 1990; Fronczak ve ark., 2012; Gundersen ve ark., 2015), obezite (Eisenberg ve ark., 2014; Gaskins ve ark., 2014) ve psikolojik stres (Nargund, 2015) erkek infertilitesi için potansiyel risk faktörleridir (Durairajanayagam, 2018).

Erkek infertilitesi, ejakülattaki spermatozanın kalitatif ve kantitatif değişiklikleriyle ilişkilidir. İnfertil erkeklerin %10-15'inde görülen ejakülatta ölü veya canlı matur sperm hücresinin bulunmadığı duruma azoospermi denir (Durairajanayagam, 2018). Azoosperminin nedenleri pre-testiküler, testiküler veya post-testiküler olarak sınıflandırılabilir (Cocuzza ve ark., 2013). Pre-testiküler nedenler arasında hipotalamus-hipofiz-testis aksını ilgilendiren hormonal bozukluklar bulunur. Follikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron düşüklüğü ile ortaya çıkan hipogonadotropik hipogonadizm nadir görülmekle birlikte replasman tedavisinden yüksek oranda yanıt alınabilmektedir (Sahib ve ark., 2023). Anosmia ile karakterize Kallmann sendromu ve dışarıdan androjen kullanımı da endokrinolojik nedenler arasında geçer. Hipogonadotropik hipogonadizm tedavide koryonik gonadotropin ve menopozal gonadotropin, pürifiye FSH ya da rekombinan FSH kombinasyonlarından büyük oranda fayda görür (Foran ve ark., 2023). Erkeklerde doğuştan hipogonadotropik hipogonadizm olan çiftlerin %16-57'sinde tedaviyi takiben gebelik elde

edilebilmektedir (Young ve ark., 2019).

Azoosperminin testiküler nedenleri, testis torsiyonu, inmemiş testis, epididimorşit, varikozel, genetik bozukluklar gibi testis içinde spermatogenez sürecini bozan anormallikleri içerir (Sharma ve ark., 2021). Antisperm antikorlar, seminal kanal tıkanıklıkları, ejakulasyon bozuklukları ve erektil disfonksiyon infertilitenin post-testiküler nedenlerini oluşturur (Cocuzza ve ark., 2013). Seminal kanaldaki tıkanıklıklar azoospermi sonucu infertiliteye yol açar (Sigman ve Jarow, 1997). Azoospermi obstrüktif (OA) ya da non-obstrüktif (NOA) olarak sınıflandırılır. Pre-testiküler ve testiküler etyolojiye bağlı bozukluklar NOA'yı, seminal kanal tıkanıklıkları ise post-testiküler OA'yı oluştururlar. Genel olarak, OA'yı NOA'den ayırt etmede FSH için ortalama 7.6 mIU/mL ve testiküler uzun aks için de 4.6 cm'lik bir eşik değeri önerilmektedir (Schoor ve ark., 2002). Ancak bu ayrımın yapılmasında klinik değerlendirme her zaman kesin bir sonuç vermeyip, skrotal eksplorasyon sırasında testis, epididim ve vaz deferenslerin kontrolü ile obstrüksiyonun varlığı teyid edilir. Bu sırada alınan testis biyopsisi testiküler yapı ve spermatogenez süreci hakkında bilgi verir (Caroppo ve ark., 2019). Ancak testislerde sperm üretiminin olup olmadığı hakkında testis biyopsisinin tek başına bir anlamı yoktur. Bunun testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile doğrulanması gerekir (Colpi ve ark., 2005). Obstrüktif azospermili hastalarda rekonstrüktif cerrahi yüksek oranda başarılı sonuç vermekte olup buna uygun olmayan ya da sonuç alınamayan olgular epididim veya testislerden elde edilecek spermle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonundan (ICSI) fayda görebilir (ASRM ve SMRU 2019). NOA'nın başlıca nedeni primer testiküler yetmezliğe bağlı spermatogenez bozukluklarıdır. OA olan erkeklerden başarılı testiküler sperm elde etme olasılığı yüksek olsa da NOA olgularında başarı oranları oldukça düşüktür (Corona ve ark., 2019; Jow ve ark., 1993; Schlegel, 1999). Reprodüktif tıptaki ilerlemelere rağmen NOA'lı erkeklerin yaklaşık %50'sinde sperm elde edilememekte olup bu hastalara da donör spermi ile ICSI veya evlat edinme seçeneği önerilebilir.

1.2. Radyoterapi ve Sitotoksik Tedavilerin Testis Fonksiyonu Üzerindeki Etkisi

Testis hücreleri, özellikle hızla bölünen germ hücreleri, irradasyon ve kemoterapi tedavisine oldukça duyarlıdır. Günümüzde kemoterapi ya da radyoterapi sonrası erişkin ve çocuklarda beş-yıllık sağkalım yüzdeleri büyük oranda artmış olmakla birlikte fertil çağa geldiklerinde infertilite önemli bir yan etki olarak ortaya çıkmaktadır. Nitekim kanser olgularının yaklaşık dörtte birinde (%24) tedaviyi takiben spermatogenez bozukluğu ve infertilite bildirilmiştir (Bahadur ve Ralph, 1999). Anti-kanser tedavilerini takiben spermatogenezin iyileşmesi, spermatogonyal kök hücrelerin (SKH) canlılığına ve spermatogenez destekleyen nişteki hasarın boyutuna bağlıdır (Meistrich, 2013). Düşük sitotoksik dozlar farklılaşan spermatogonya havuzunu tüketerek muhtemelen spermatogenezin yalnızca geçici olarak kesilmesine neden olurken, yedek SKH'ler hayatta kalabilir ve farklılaşan spermatogonya üretmek için mitotik aktiviteye devam edebilir. Ancak hasarın şiddetli olup SKH sayısında ciddi düşüş geliştirse spermatogenezde düzelme yıllar alabilir. SKH'nin tamamı ortadan kalkmışsa kalıcı infertilite söz konusu olur. Gerek çocukluk gerekse erişkin dönemde spermatonyumlar bu tür bir tükenmeye duyarlıdır (Jahnukainen ve ark., 2011; Relander ve ark., 2000; Whitehead ve ark., 1982). Bunun yanı sıra yaş, önceki testis patolojileri, onkoterapi toksisitesine bireysel yatkınlık da tedavi sonrası seminifer epitelyumun spermatogenez restorasyonunu desteklemesinde önemli rol oynar (Rives ve ark., 2012; Wyns ve ark., 2010). Spermatogenez üzerine toksisitesi en yüksek ajanlar siklofosamid, mekloreタミン ve prokarbazindir (Skinner ve ark., 2017). Hematopoietik kök hücre naklinden önce yapılan busulfan ve siklofosamid, fludarabin, melfalan gibi alkilleyici tedaviler ile ifosfamidin de spermatogenezdeki bozulma ile ilişkisi gösterilmiştir. Alkilleyici ilaç dozu da germ hücre hasarının şiddetini arttırabilir. (Skinner ve ark., 2017). 4000 mg/m² altında siklofosamid dozlarında azoospermi ve oligozoospermi görülme sıklığı azalır (Green ve ark., 2014). Bununla birlikte, bozulmuş spermatogenez veya azoospermi için tamamen güvenli bir alt eşik dozu belirlenememiştir (Green ve ark., 2014; Skinner ve ark., 2017). Kombine alkilleyici ilaç tedavilerinin kümülatif bir etkiyle spermatogenez bozduğu ileri sürülmüştür (Skinner ve ark., 2017). Radyasyon ise testislerde germ

hücreleri, Sertoli hücreleri ve testosteron salgılayan Leydig hücrelerinde yaptığı hasarlanma sonucu spermatogenezi bozabilir (Kenney ve ark., 2012; Stukenborg ve ark., 2018). Kemoterapi kaynaklı Leydig hücre yetmezliği nispeten nadirdir (Sklar, 1999).

Busulfan, bimoleküler nükleofilik süstitüsyon yoluyla DNA'yı alkile ederek 5'-GA-3' dizisinde DNA zincir içi ve DNA ile proteinler arasında çapraz bağlanmalar ve tek-zincir kırıkları meydana getirir. Bu da SKH'lerin proliferasyonu ile farklılaşmasını engeller ve busulfan-kaynaklı DNA hasarı sonucunda apoptoz indüklenir (Furukawa ve ark., 2007; Iwamoto ve ark., 2004). Busulfan, Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler arasındaki sıkı bağlantıları koruyan vimentin filamentlerinin yapısını bozarak ve Sertoli hücreleri ile germ hücrelerince eksprese edilen ICAM-1 ifadesini azaltıp kan-testis bariyerine zarar vererek SKH'ler ve mikroçevrenin stabilitesini bozar (Amann, 2008; Cai ve ark., 2016; ElGhamrawy ve ark., 2014; Kopecky ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmada, busulfan ile muamele edilen farelerde erkek germ hücre kaybındaki hızlanmanın, c-kit/SCF sinyalinin kaybolmasıyla düzenlendiği, ancak p53- veya Fas/FasL'ye bağlı mekanizmaların aracılık etmediği gösterilmiştir (Choi ve ark., 2004). Busulfan BMP4 ifadesini azaltarak, BMP4/Bmpr1a/Smad'lar/Sohlh2/c-kit yolağı üzerinden SKH'nin spermatositlere farklılaşmasından sorumlu genlerin ekspresyonunu baskılayabilir (Carlomagno ve ark., 2010; Feng ve ark., 2000; Li ve ark., 2014). Dahası, kısa süreli koruyucu etki gösteren busulfan, proliferasyonu indükleyip farklılaşmayı inhibe eder ve Sertoli hücrelerinden GDNF salgılanmasını arttırıp bunun sonucunda SKH'lerde hem Akt hem de Src Ailesi Kinaz (Src Family Kinase, SFK) sinyalleşmesini aktive ederek spermatogenezi düzenler (Ebata ve ark., 2011; Oatley ve ark., 2007; Wu ve ark., 2011). Ayrıca busulfan, siklin E aktivitesini bozarak pRB fosforilasyonunu inhibe edebilir ki bu da SKH dormansisine neden olur (Choi ve ark., 2004). Aynı zamanda spermatogenik hücrelerde oksidatif hasara neden olarak redoks dengesini de bozar. Sonuç olarak busulfan, gösterdiği tüm bu etkilerle endojen spermatogenik hücrelerin depleksiyonuna yol açarak eksojen SKH'lerin migrasyonu ve kolonizasyonu için bir ortam sağlar.

1.3. Erkeklerde Reprodüktif Kök Hücreler

1.3.1. Embriyo Hücresi Benzeri Çok Küçük Hücreler

EKH ve uPKH'lerden 'yapay gamet' geliştirilmesi oldukça zorlayıcıdır ve henüz kliniğe ulaşamamıştır (Hendriks ve ark., 2015a; Kang ve ark., 2016; Tabar ve Studer, 2014; Vassena ve ark., 2015; Yoshihara ve ark., 2017). Fertilitenin korunmasında alternatif gamet kaynakları üzerinde çalışmalar devam ederken, 2006 yılında ilk kez fare kemik iliğinde (Kİ) embriyo hücresi benzeri çok küçük hücreler (VSELs) olarak adlandırılan nadir (Kİ mononükleer hücrelerinin %0.02'si) bir PKH popülasyonu bildirilmiş ve yetişkin farelerin birçok organında saptanabilmişlerdir (Kucia ve ark., 2006). Epiblasttan köken aldıkları varsayılan VSEL'lerin gastrulasyon ve organogenez sırasında dokularda adanmış monopotent kök hücreleri oluşturan PKH'ler olarak yerleştikleri ve sayılarının yaşla azaldığı düşünülmektedir (Ratajczak ve ark., 2008). Kİ'nde tanımlanan bu Sca-1+/lin-/CD45- hücrelerin SSEA-1, Oct-4, Nanog ve Rex-1 gibi PKH belirteçlerini mRNA ve protein düzeylerinde ifade ettikleri ve *in vitro* olarak SDF-1, HGF/SF ve LIF'e güçlü yanıt verip sırasıyla CXCR4, c-met ve LIF-R ifade ettikleri gösterilmiştir. Yüksek telomeraz aktivitesine sahip ve EKH'ler gibi MHC sınıf I ve HLA-DR antijenlerini ifade etmeyen bu diploid, küresel şekilli, küçük (farelerde 3-5 µm ve insanlarda 4-7 µm), yüksek nükleo-sitoplazmik oranlı, bol ökromatin bulunduran VSEL'ler (Shin ve ark., 2009); EKH, EpiKH ve primordiyal kök hücre (PGH) belirteçlerini ifade eder ve üç germ yaprağının hücrelerine de farklılaşabilirler (Shin ve ark., 2010).

VSEL'lerin küçük boyutu ve mitokondrilerinin azlığı, suskun yapı ve düşük metabolik aktivitenin belirtileri olup, bu nedenle de yakın tarihlere kadar standart laboratuvar mikroskoplarında saptanamamışlardır (Folmes ve ark., 2012; Nesti ve ark., 2007). Ancak Kİ, kordon kanı, mobilize edilmiş periferik kan gibi yetişkin dokularından multiparametrik hücre ayırıştırma yoluyla izole edilebilmiştir (Nakatsuka ve ark., 2016; Sovalat ve ark., 2011). VSEL'lerin detaylı karakterizasyonu kordon kanı (Shaikh ve ark., 2015), Kİ (Shaikh ve ark., 2016), overler (Parte ve ark., 2011), uterus

(Gunjal ve ark., 2015) ve pankreasta (Bhartiya ve ark., 2014a) yapılmıştır. VSEL'lerin varlığı testislerde de gösterilmiştir (Anand ve ark., 2014; Bhartiya ve ark., 2010; Patel ve Bhartiya, 2016). Bhartiya ve ark. (2016a) yetişkin gonadlarında SKH/ovarial kök hücrelere ek olarak VSEL'leri gametlerin öncüsü olarak göstermişlerdir. Mevcut veriler, VSEL'lerin testiste seminifer epitelyumda ve overde yüzey epitelyumunda lokalize olduklarını, en verimli olarak da diğer tüm germ hücrelerinden yoksun, kemoablate edilmiş testis ve overde incelenebileceğini göstermektedir (Bhartiya ve ark., 2017a). VSEL'lerin *Stella*, *Prdm14*, *Fragilis*, *Blimp1*, *Nanos3*, *Dnd1* gibi birçok PGH belirteci ifade etmesi ve pitüiter gonadotropinler ve gonadal seks hormonları tarafından uyarıldıklarında *in vivo* olarak çoğalmaları gelişimsel açıdan onları göç eden PGH'leriyle ilişkilendirir (Ratajczak ve ark., 2017a; Ratajczak, 2017b). Tüm bu çalışmalar fertilitenin korunmasında erken gelişim esnasında gonadlara ve gelişen organlara göç edip yaşam boyunca az sayılarda sağ kalan ve PGH'lerine gelişimsel olarak eşit VSEL'lerin, testislerde spermatogenezin yeniden yapılandırılmasında yetişkin gonadlarında bulunan alternatif bir öncü gamet hücre kaynağı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Testiste SKH'ler arasında bir alt popülasyon olarak PKH'lerin varlığı daha önce önerilmiştir. Izadyar ve ark. (2011) SKH'ler arasında pluripotent özelliklere sahip olan bir alt popülasyonu, Stimpfel ve ark. (2012) azoospermik erkeklerin donmuş testiküler biyopsilerinde pluripotent belirteçleri ve Virant-Klun ve ark. (2013) azoospermik erkeklerin testiküler doku biyopsilerinde SSEA-4 pozitif kök hücreleri bildirmişlerdir. Sonraki çalışmalar ise seminifer tubüllerin içerisinde spermatogonyumların arasında, bazal membrana oturmuş ayrı bir hücre popülasyonu olarak VSEL'lerin de bulunduğunu ve SgAd'ye farklılaştıklarını göstermiştir (Bhartiya ve ark., 2010). Embriyonun oluşması ile birlikte ortaya çıkıp, kendi kendilerine bölünerek hayat boyu varlıklarını sürdürebilmeleri nedeniyle de spermatogonyum doğuran hücreler oldukları önerilmiştir. Üzerlerinde FSH duyarlı reseptörlerin gösterilmiş olması, hormonal uyarım ile spermatogenezin tetiklenmesinde VSEL'lerin primer ya da dolaylı yoldan rolü olabileceğini düşündürmektedir. Spermatogenezde VSEL fonksiyonunu araştıran çalışmalar, bunların ifade ettikleri Oct-4, Nanog ve TERT proteinleriyle çoğalarak sperm serisi

hücrelere farklılaştıklarını göstermiştir. Bölünmeleri sırasında yandan tomurcuklanmaları da pluripotent hücrelerdeki asimetric hücre çiftlerine karakteristik görünümünü kazandırmaktadır. Başlangıçta 2-6 µm olan VSEL hücreleri daha sonra klonal çoğalma evresine girerek >10 µm SgAd spermatogonyumları oluşturur. Asimetric hücre çiftleri formundaki VSEL hücrelerinden farklı olarak bu hücreler çoğalarak birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmış simetric hücre klonları halinde zincir formu oluştururlar (Patel ve Bhartiya, 2016). Bu sırada pluripotent VSEL hücre DNA'sı, sperm yönünde farklılaşacak hedefe özelleşmiş hücreler oluşturmak için epigenetik değişiklikler geçirmektedir. Oct-4B miktarının 3-10 kat artması ve DNA'nın histon proteinlerine sıkıca sarılarak yoğunlaşmasının koyu renkli görünüm kazanmalarına neden olduğu gösterilmiştir.

Yakın tarihli çalışmalardan elde edilen görüşler; VSEL'lerin en primitif testiküler kök hücreler olup, homeostatik koşullar altında az sayıda bulundukları (%0.03) ve çok az bölünerek suskun vaziyette bekledikleri yönündedir. Stres/hastalık durumunda ise mobilize olup çoğalarak, hızla bölünen testis dokusuna özgü SKH'leri oluşturarak yenilenmeye ve homeostazi korumaya yardım etmektedir (Bhartiya ve ark., 2019; Shaikh ve ark., 2017). Busulfanın normal testiste akım sitometrisi ile %0.03 oranında bulunan LIN-/CD45-/SCA-1+ VSEL hücrelerini, tedavi sonrası artırarak %0.06'ya çıkardığı iddia edilmiştir (Anand ve ark., 2016). Yetişkin dokularda VSEL'ler, paternal olarak damgalanmış lokuslarda farklı metillenmiş bölgelerin silinmesine bağlı olarak büyümeyi baskılayıcı genleri (*H19*, *p57KIP2*, *Igf2R*) yüksek miktarda ifade ederken uyarıcı olanların (*Igf2* ve *Rasgrf1*) ifadesini azaltarak uykuda kalırlar ve silinen bu lokuslar ilk mayotik bölünmeden sonra gonadlardaki gelişim sırasında *de novo* DNA metiltransferazlar tarafından yeniden metillenirler (Maj ve ark., 2015). Kültür ortamında VSEL'leri remetilasyonu uyaracak HDAC inhibitörü valproik asit (VPA) ile muamele etmenin *ex vivo* ekspansiyonunu kolaylaştırdığı bulunmuştur (Ratajczak ve ark., 2011; Ratajczak ve ark., 2012b; Ratajczak, 2017b). Epigenetik durumları ve gelişimsel kökenleri nedeniyle suskun yapıda olduklarından VSEL'ler insanda (Bhartiya ve ark., 2010; Kurkure ve ark., 2015, Stimpfel ve ark., 2012; Virant-Klun ve ark., 2013) ve farede (Anand ve ark., 2014; Anand ve ark., 2016; Patel ve Bhartiya, 2016) onkoterapi sonrası sağ kalır ve dolayısıyla kanserden sağ

kalan gonadal yetmezlik gelişmiş bireylerde ve deneysel gonodatoksik tedaviyle germ hücre deplesyonu geliştirilen farelerde, gonadal fonksiyonu restore etmek için kullanılabilirler (Bhartiya, 2016b; Ratajczak ve ark., 2012a).

VSEL'lerin ve SKH'lerin testislerde ayrı kök hücre popülasyonları oldukları gösterilmiştir (Anand ve ark., 2014; Anand ve ark., 2016). VSEL'ler daha küçük boyutlu olup fare testisinde LIN-/CD45-/SCA-1+ yüzey fenotipiyle nükleer OCT-4 ifade ederlerken, SKH'ler sitoplazmik OCT-4 ifade etmektedir. Yanı sıra VSEL'ler, SSEA-1 pozitif kök hücreler olarak fare testisinden, SSEA-4 pozitif kök hücreler olarak da insan testiküler dokusundan izole edilebilirler (Bhartiya ve ark., 2016a). Ancak sınırlı sayıda çalışmada VSEL'lerin testisten izolasyon ve karakterizasyonlarının yapılmış olması, küçük boyutları ve sayıca azlığı nedeniyle tedavide kullanılabilecek hücreler olabileceği henüz yaygın olarak kabul edilmiş değildir. Az sayıdaki çalışma, germ hücrelerine farklılaştırmada VSEL'lerin ideal kök hücre kaynağı olarak kullanılabileceğini, dahası biyolojik ebeveynliğe olanak tanınmasıyla da onkofertilitenin legal ve etik sorunlarını aşarak güvenilir bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir (Bhartiya ve ark., 2015; Bhartiya ve ark., 2016c). Kemoterapi sonrası varlıklarını sürdüren VSEL'lerin farklılaşmayı ya da mayozu destekleyecek büyüme faktörleri eklenmeden sadece FSH ve Sertoli hücresi besiyeri kullanılarak kültüre edildiğinde sperme spontan farklılaştıkları bildirilmiştir (Anand ve ark., 2015). Kemoterapiden kurtulan VSEL'lerin kültür başlangıcında tek tek bulundukları, birkaç gün içinde asimetric, simetric bölünmelerle klonal ekspansiyon geçirdikleri gözlemlenmiştir. Üç haftalık kültür sürecinde sperme spontan farklılaşma ve değişik evrelerde spermiyogenez görülmüştür. Ancak, başlangıç hücreleri pürifiye edilmediğinden başlangıç kültürlerinde var olan birkaç olgun kök/germ hücresinin sperme farklılaşmış olabileceği üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Shaikh ve ark. (2017), kontaminasyon olasılığını ekarte etmek için fare Kİ'den pürifiye edilmiş VSEL'leri Sertoli hücre yatağı üzerinde ve FSH varlığında kültüre ettiklerinde, *DAZL*, *STR48* (mayoz tetikleyicisi) ve *GFRA* ifade eden germ hücrelerine farklılaştıklarını bildirmişlerdir. Aynı yıl, fare Kİ kaynaklı SSEA-1 pozitif pluripotent VSEL'lerin, kültür ortamında retinoik asit (RA) ile muamele edildiğinde mayozla ilişkili *SYCP3* gibi PGH'lere, SKH'lere ve spermatogonyumlara özgü belirteçleri ifade eden erkek

germ hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Shirazi ve ark., 2017).

1.3.2. Germline Kök Hücreleri

Germ hattı (*Germline*), bir organizmada hem oositlerin hem de sperm hücrelerinin oluşumuna kaynaklık eden, dolayısıyla türlerin çoğalması için gerekli olan bir hücre soyudur. Bu nedenle, germline hücrelerindeki gelişim anomalileri infertilite ve kanser gibi hastalıklar için ciddi bir risk teşkil eder. Germline kök hücresi (GKH), germline gelişimi sırasında kendini yenileyerek veya farklı evre/alt tipte kök hücrelere dönüşerek daha fazla kök hücre üreten ve yavru oluşturmak için spermatozoa ve ovaya farklılaşan benzersiz bir hücre türüdür. Memeli GKH'lerini; PGH'leri, EKH'ler veya uPKH'lerden indüklenmiş PGH-benzeri hücreleri (PGHBH), SKH ve dışı GKH'leri oluşturur (Cheng ve ark., 2022).

1.3.2.1. Germ Hücresi Öncüleri: İlkel Cinsiyet (Primordiyal Germ) Hücreleri

Erken embriyonik gelişim sırasında ilk ortaya çıkan germline hücreleri olan PGH'ler, germline'in kurucu hücreleridir ve yeni organizmaların oluşmasını sağladığından, bir dereceye kadar germline totipotensinin de kaynağıdır (Ohinata ve ark., 2009; Saitou ve Yamaji, 2012). Embriyonik gelişim döllenmeden sonra başlar. İnsanlarda implantasyon embriyonik gün (E)7-E8 sırasında blastokist aşamasının sonunda gerçekleşir (Shahbazi, 2020; Zhai ve ark., 2022). İç hücre kitlesi, yolk kesesini oluşturan hipoblasta ve embriyoyu düzgün bir şekilde oluşturan epiblasta ayrılır. İnsanlarda implante olmuş embriyo, trofoblastın yanı sıra epiblast ve hipoblasttan oluşan çift laminer germ diski ile düzdür, oysa farelerde silindirikdir (Kalthoff, 1996; Wolpert ve ark., 2002). İlkel çizgi embriyonik epiblastın arka kısmında, gastrulasyonun başlangıç aşamasında E14'te ortaya çıkar. Bunu takiben de hücrelerin pluripotensileri gittikçe kaybolur. Daha sonra epiblast hücreleri ilkel çizgi boyunca ilerleyerek mezoderm ve endodermi oluşturur. Geri kalan epiblast

hücrelerinin ektoderme dönüşmesi gastrulasyonun sonuna rastlar (Kalthoff, 1996; Shahbazi, 2020). Üç germ tabakası da geliştikten sonra organogenez başlar. İnsanlarda E28'de epiblast kökenli PGH'ler genital taslaklara göç eder (Witschi, 1948). İnsan PGH'leri genital taslaklara ulaştıklarında mitotik olarak bölünmeye devam ederler. XX dişi embriyolarda overdeki bazı PGH'leri mayoz sürecine girerek oositlere farklılaşır. Bu şekilde kök hücre potansiyellerini kaybederler. Diğer PGH'leri ise kök hücre özelliklerini koruyarak dişi GKH'leri olurlar (Zou ve ark., 2009). Erkek XY PGH'leri ise seminifer kordlara yerleşerek gonosit haline gelir ve doğuma kadar G0/G1 fazında bekler (Brinster, 2002; de Rooij, 1998a; Nikolic ve ark., 2016). Neonatal testiste gonositler bölünmeye ve SKH'lere farklılaşmaya devam eder, daha sonra da puberte başlangıcıyla birlikte mayoz yoluyla spermatozoa oluşturur.

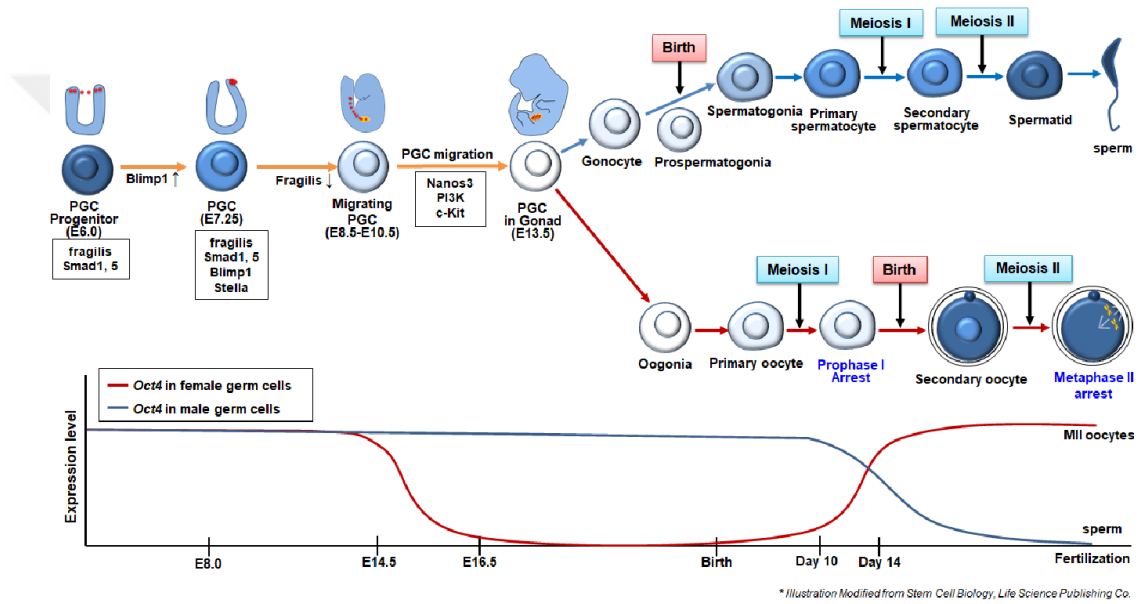
Farelerde germ hücreleri proksimal epiblasttan yaklaşık olarak E6.0'da ortaya çıkar ve burada PGH öncülleri PGH'ler olmak üzere hazırlanır (Lawson ve Hage, 2007) (Şekil 1.1). Ekstraembriyonik ektodermden kaynaklanan kemik morfogenetik protein 4 (BMP4), BMP2 ve BMP8 gibi sinyaller, PGH'lerin spesifikasyonunu indükler. Bu proteinlerin proksimal epiblast hücre reseptörlerine bağlanması küçük bir popülasyonda PR domain çinko parmak proteini 1 (*Prdm1*), diğer bilinen şekliyle *Blimp1*'in ekspresyonunu indükler (Pera ve ark., 2013). *Blimp1*'in somatik hücre programlanmasını baskılayıcı özelliği vardır. Bu şekilde BMP-reaktif epiblast hücreleri germline yönünde kararlanır. Anlaşılacağı üzere *Blimp1*, PGH belirlenmesinde kritik öneme sahiptir (Ohinata ve ark., 2005). E6.5'ten sonra öncül PGH'leri proksimal epiblastın arka bölgesine ilerleyerek posterior amniyotik kıvrımın ekstraembriyonik mezodermine ulaşır ve E7.25'te burada yaklaşık 40-45 hücreli bir kurucu PGH kümesi oluşmuş olur. Kurucu PGH'leri *Blimp1*, *Fragilis* ve *Stella*'yı ifade eder (Lawson ve Hage, 2007). E8.5'te PGH'ler *Fragilis*'i downregüle eder ve arka bağırsak yoluyla genital taslaklara göç ederler. Arka bağırsak göçü sırasında PGH'ler, göç eden PGH'lerin proliferasyonunu destekleyebilen ve apoptozu baskılayabilen *Nanos3*'ü ifade eder (Tsuda ve ark., 2003). PGH'ler farelerde E10.5–E13.5'te genital sırtlara ulaşır (Hayashi ve ark., 2007). Bu aşamada PGH proliferasyonu ve göçü, bir hücre yüzey reseptörü olan c-Kit tarafından düzenlenen fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K) ve ligandı Kit tarafından düzenlenir (Matsui ve ark., 1990). Göç sırasında

PGH'ler, DNA demetilasyonu, genomik damgalamada silinme ve histon modifikasyonu gibi bir takım epigenetik yeniden programlamaya tabi tutulur (Surani, 2001). Epigenetik durumun sıfırlanması, gametlerin cinsiyetine bağılı olarak yeni üretilen gamet genomunda epigenetik işaretlenmenin yeniden yapılması için önemlidir. Ayrıca, PGH spesifikasyonu sırasındaki epigenetik profil modifikasyonları, özellikle fare ve insan PGHBH'lerin yeniden programlanması sırasında tamamen etkilenen histon metilasyon ve asetilasyon kinetiğindeki varyasyonlar durumunda türe özgü farklılıklar gösterir (von Meyenn ve ark., 2016). PGH'ler, sayısının yaklaşık 25.000 olduğu genital sırta ulaştıklarında göçleri durur. Bundan sonra gonadal somatik hücrelerle birleşerek, cinsiyete özgü morfogenez ve gelişim başlar. Prenatal dönemde erkekte PGH'ler gonosit ve prospermatogonyaya, dişi PGH'ler ise mayoz I profazında (profaz I) duraklatılan primer oositlere dönüşür. Doğumdan kısa bir süre sonra prospermatogonya, pubertede primer spermatositlere, sekonder spermatositlere, spermatidlere ve olgun spermatozoaya dönüşen spermatogonyaya gelişir. Ayrıca pubertede primer oositler, mayoz II (MII) metafazında duraklatılan sekonder oositlere dönüşür (Culty, 2013; Donovan, 1986; Hamer ve de Rooij, 2018; Tam ve Snow, 1981).

Gerek embriyo gerekse germ hücrelerinin gelişim sürecinde *Oct4* ve *Nanog* ifadeleri önemli rol oynar. *Oct4* ve *Nanog* preimplantasyon aşamasındaki embriyolarda epiblast belirleyici faktörlerdir (Schöler ve ark., 1990). Gastrulasyon sırasında *Oct4* ifadesi PGH'lerle sınırlıdır. *Oct4* ifadesi PGH'lerin göçü sırasında ve spermatogonyumda korunur; ancak, spermatogenez başladığında susturulur (Kehler ve ark., 2004; Pesce ve ark., 1998). Dişide E14.5 civarında mayoz başlarken PGH'leri *Oct4*'ü downregüle ettikleri için, doğumda artık primer oositler *Oct4*'ü ifade etmezler. Susturulmuş *Oct4*, primer oositler büyüme fazına girerken (doğumu takiben 14. günde) yeniden ifade edilir ve MII oositlere dönüşür. PGH'lerin olgunlaşması sırasında *Oct4*'ün ifadesi için distal ve proksimal *enhancer*lar gibi farklı düzenleyici elemanlar rol alır. Erken göç eden PGH'ler (E9.5'te) esas olarak *Oct4* ifadesi için distal enhancerları kullanır; fakat, PGH'ler genital taslağa yaklaştığında, her iki enhancer da *Oct4* ifadesinin kontrolü için kullanılır (Choi ve ark., 2016). *Nanog*, E8.0'da migrasyonun başlangıcında yeniden ifade edilmiş olmasına rağmen, erken PGH spesifikasyonu sırasında ifade edilmez. *Nanog* ekspresyonu erkeklerde spermatogonya

aşamasında ve dişilerde mayozun başlangıcında tekrar susturulur (Wang ve ark., 2012; Yamaguchi ve ark., 2005).

Erkek embriyolarda *Sry* Y kromozomunda kodlanır ve henüz E10.5 ve E12.5'teyken gonadal somatik hücrelerde eksprese edilir (Koopman ve ark., 1991). *Sox9*'un *Sry* tarafından upregüle edilmesiyle, gonadal somatik hücreleri Sertoli hücrelerine dönüşür. Bu sırada Müllerian kanallarında dejenerasyon başlar (Burgoyne, 1988).



Şekil 1.1: Erkek ve dişi germ hücrelerinin oluşumu için *in vivo* gelişim sürecinin özeti ve germ hücresi gelişimi esnasında germ hücre-ilişkili genlerin ekspresyonu. Belirtilen süreler, fare gelişim aşamalarına karşılık gelir. Figür, Hong ve ark., (2021) derlemesinden alınmıştır.

1.3.2.2. İndüklenmiş Primordiyal Germ Hücresi-Benzeri Hücreler

Etik sorunlar nedeniyle insan PGH gelişiminin incelenmesi için *in vivo* erken insan PGH'lerine erişilemez. Bu sorunun önüne geçmek için ve insan germ hücre gelişimini daha iyi anlamada ve gelecekte *in vitro* olarak insan PGHBH'lerinden fonksiyonel insan gametleri üretebilmede kullanılabilecek insan EKH'leri/uPKH'leri insan PGHBH'lere farklılaştırmak amacıyla *in vitro* indüksiyon sistemleri

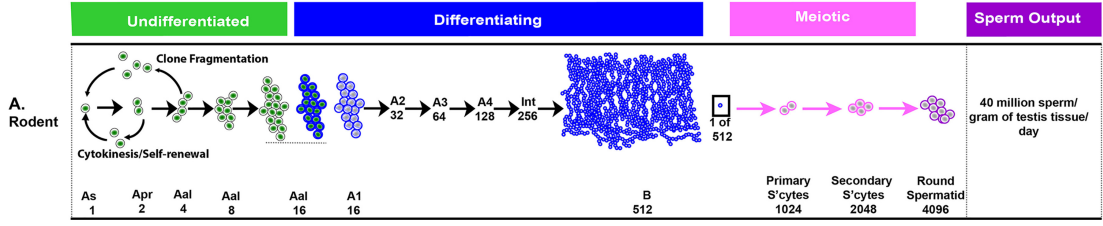
geliştirilmiştir (Irie ve ark., 2015; Sasaki ve ark., 2015; Sugawa ve ark., 2015). İnsan germ hücre gelişiminin *in vitro* olarak yeniden oluşturulması, infertilite ve kanser alanında yenilikçi tıp uygulamalarının önemli bir parçası olacaktır (Li ve ark., 2022; Saitou, 2021). Blastokistin iç hücre kitlesinden türetilen fare EKH'leri, *in vitro* olarak oogonya ve sperm hücrelerine farklılaştırılabilmiştir (Hübner ve ark., 2003; Toyooka ve ark., 2003). Farelerde indüklenen PGH'leriyle ilgili çalışmaların sonucunda, insan iç hücre kitlesi hücrelerinin de embriyoid cisimlere farklılaşmak üzere indüklenebilmiş olduğu ve indüklenen hücrelerin bazılarının VASA (DDX4) gibi germ hücre belirteçlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Clark ve ark., 2004), bu da insan EKH'lerinin de *in vitro* olarak PGHBH'lere indüklenebileceğine işaret eder. *In vitro* olarak insan PGHBH spesifikasyonu için geliştirilen birçok yaklaşım (Irie ve ark., 2015; Sasaki ve ark., 2015; Sugawa ve ark., 2015), PGHBH'lerin *in vivo* PGH'lerin çeşitli özelliklerine sahip olduğunu ortaya koymuştur: (i) İnsan PGHBH'ler, PGH genleri *SOX17*, *BLIMP1* ve *TFAP2C* dahil olmak üzere erken PGH'lerinkine benzer bir gen ekspresyonu paterni gösterir, ancak *DAZZ* ve *DDX4* dahil olmak üzere geç PGH belirteçlerini eksprese etmez (Irie ve ark., 2015; Sasaki ve ark., 2015). (ii) Hem PGHBH'ler hem de PGH'leri aynı zamanda pluripotensi genlerinin (NANOG ve OCT4) ve hücre yüzeyi belirteçlerinin (CD38, EPCAM ve ALPL) ifadesini paylaşır (Irie ve ark., 2015). (iii) PGHBH'ler, 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) ve TET1 demetilazın upregülasyonunu ve *de novo* DNA metiltransferaz 3A ve 3B (DNMT3A ve DNMT3B)'nin ifadesinde bir düşüş sergileyerek, erken bir DNA demetilasyon paterni gösterir (Irie ve ark., 2015; Tang ve ark., 2015). PGHBH genomunda global DNA metilasyonu kaybı, *in vivo* olarak insan PGH'lere benzer epigenetik yeniden programlama izlendiğini ortaya koymaktadır (Sugawa ve ark., 2015). (iv) Bu nedenle, PGHBH'ler *in vivo* erken evre PGH'lere karşılık gelir ve muhtemelen göç öncesi PGH'leri temsil eder. (v) Son olarak PGHBH'ler ve PGH'leri oogonya ve prospermatogonyaya farklılaşmada işlevsel bir benzerliği paylaşır (Hwang ve ark., 2020; Murase ve ark., 2020; Yamashiro ve ark., 2018). İndüksiyon kültür sistemlerinde insan PGHBH'leri, uzun süreli kültüre edilmiş ksenojenik rekonstrükte edilmiş testislerde fare fetal testis somatik hücreleriyle (Hwang ve ark., 2020) veya ksenojenik rekonstrükte edilmiş overlerde fare ovaryan somatik hücreleriyle kültüre edilir (Murase ve ark., 2020; Yamashiro ve ark., 2018). İnsan PGHBH'leri ayrıca postnatal

sıçan testislerinden elde edilen somatik hücrelerle birlikte de kültüre edilir (Mall ve ark., 2020). Bu somatik hücreler, PGHBH'lerin prospermatogonya veya oogonyaya matüre olması için uygun bir niş ortamı sağlar. İnsan EKH'lerinden ve insan uPKH'lerinden PGHBH'leri oluşturmak için iMeLC stratejisi ve 4i stratejisi geliştirilmiştir (Irie ve ark., 2015; Sasaki ve ark., 2015). Her iki stratejide de temelde, PGH'lerin gelişim kurallarına uyarak, PGH pluripotensisini sürdürmeye, PGH kaderini indüklemeye ve endodermal ve diğer somatik genleri inhibe etmeye dayanmaktadır.

1.3.2.3. Erkek Yetişkin Germline Kök Hücreleri

SKH'ler olarak tanımlanan erkek yetişkin GKH'leri (litertürde çoğu zaman GKH, SKH ile eş anlamlı olarak kullanılmıştır) memeli testislerinde seminifer tübüllerin bazal membranında bulunur ve gonositlerden postnatal gün (P) 3-P6 civarında oluşur (Yoshida ve ark., 2006). Hem SKH'ler hem de *in vivo* PGH'leri GKH'leri olarak sınıflandırılırken, PGH'leri potansiyel olarak pluripotent doğalarını korurlar (Saitou ve Yamaji, 2010; Thomson ve ark., 1998). Başlangıçta SKH'lerin sadece spermatogenez işlevine ve haploid hücrelere dönüşme yeteneğine sahip olan unipotent dokuya özgü kök hücreler olduğu düşünülüyordu. 2004 yılında Shinohara'nın grubu ilk kez, p53 geni *knockout* neonatal fareleri kullanılarak bir kültür mikro ortamındaki SKH'lerden multipotent hücre kolonilerinin türetildiğini bildirdi. EKH'lerden ayırt edilemeyen bu hücrelerin *in vivo* transplantasyonunu takiben teratom doku oluşturduğu gözlenmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004). Sonraki çalışmalar, pluripotent hücrelerin yetişkin fare testislerindeki SKH'lerden elde edilebileceğini göstermiş (Guan ve ark., 2006) ve fare testiküler SKH'lerinden germline-kaynaklı pluripotent kök (gPK) hücrelerin elde edilmesi için protokoller geliştirilmiştir (Ko ve ark., 2010). SKH'ler; (i) kendini yenileyerek kök hücre havuzunu korur (ii) farklılaşarak post-pubertal erkeklerde yaşam boyu sperm üretimini sürdürür (de Rooij ve Grootegoed, 1998b). Diğer dokuya özgü kök hücrelerinde olduğu gibi SKH'ler de çok az sayıda bulunur. Örneğin farede SKH'ler total germ hücrelerinin yalnızca %0.02-0.03'ünü oluşturmaktadır (Tegelenbosch ve ark., 1993). Bununla birlikte

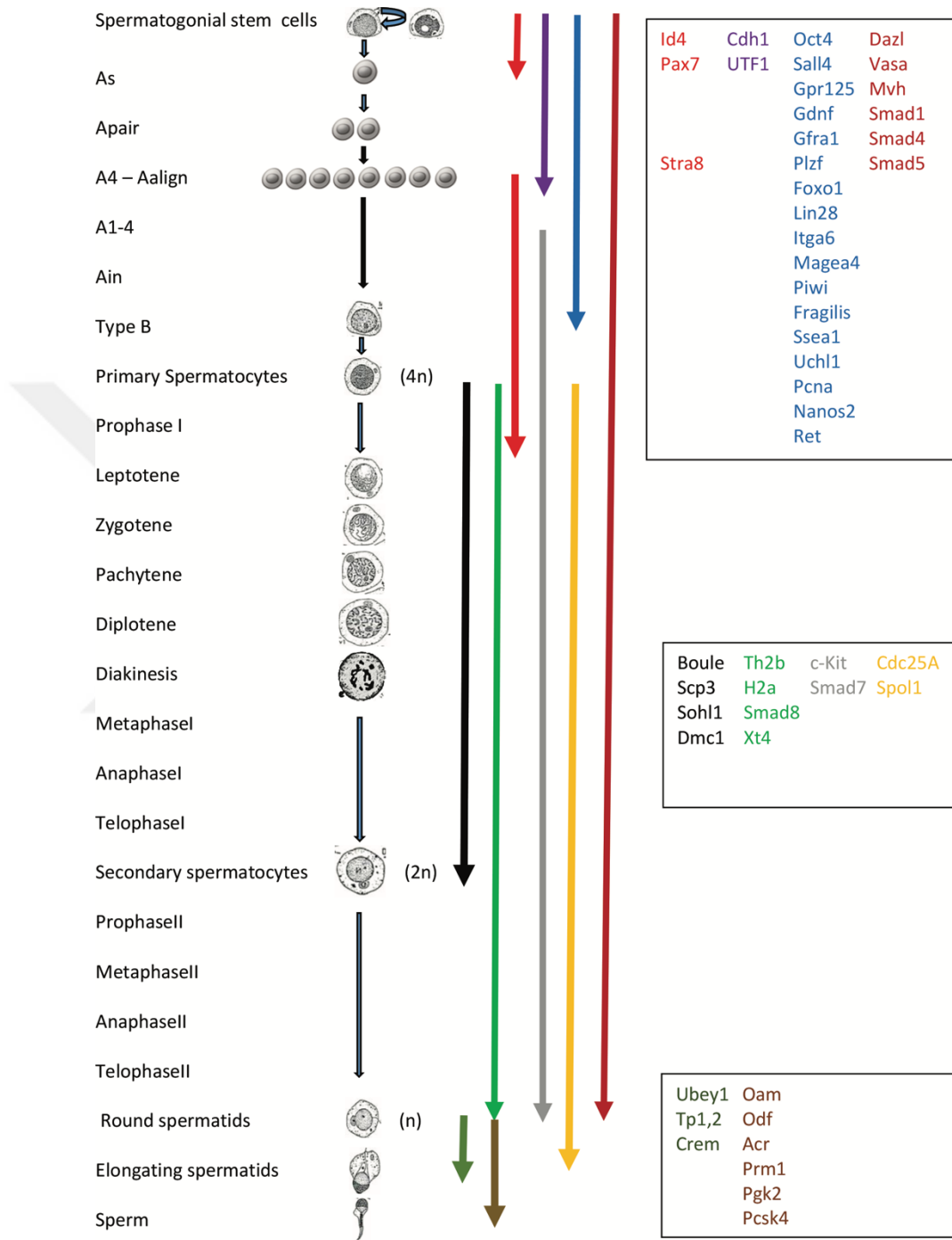
progenitördeki çok sayıdaki geçici çoğaltıcı mitotik bölünme ve farklılaşan spermatogonya, ardından iki mayotik bölünme her gün milyonlarca spermin ortaya çıkmasına neden olur (Phillips ve ark., 2010). Postnatal kemirgen testisinde SKH aktivitesinin, seminifer tübüllerin bazal membranında bulunan izole haldeki (*single*) spermatogonya popülasyonunda bulunduğu inanılmaktadır (de Rooij, 1973; Huckins, 1971; Oakberg, 1971). A_{single} spermatogonya (A_s) olarak adlandırılan bu nadir hücreler farede her üç günde bir bölünerek testisteki toplam germ hücrelerinin yaklaşık %0.03'ünü oluşturur (Huckins ve Oakberg, 1978; Tegelenbosch ve ark., 1993). A_s 'nin mitotik bölünmesi, iki yeni A_s (kendini yenileyen bölünme) üretmek için sitokinezi tamamlayacak veya intrasitoplazmik bir köprü ile bağlı kalarak bir sonraki bölünmede dört $A_{aligned}$ spermatogonya (A_{al4}) zinciri üretecek bir çift spermatogonya (A_{paired} ; A_{pr}) üretir (de Rooij ve Griswold, 2012; Phillips ve ark., 2010) (Şekil 1.2). A_{al4} spermatogonya bir veya daha çok sayıda mitotik bölünme ile 8, 16 ve bazen 32 A_{al} spermatogonyumdan oluşan uzun zincirler geliştirir. Neticede A_s , A_{pr} ve A_{al} birlikte, kemirgen testisinde germ hücrelerinin %0.3'ünü teşkil edecek şekilde farklılaşmamış spermatogonya popülasyonunu oluşturur. Farklılaşmamış spermatogonyanın %10'unu, yani toplam germ hücrelerinin %0.03'ünü ise A_s oluşturur (Huckins, 1971; Oakberg, 1971; Phillips ve ark., 2010; Valli ve ark., 2015). Daha büyük A_{al} spermatogonya klonları $A1$ spermatogonyaya farklılaşır. Klonlar o kadar büyür ki, birincil spermatositleri üretmek için bölünen $A2$, $A3$, $A4$, *Intermediate* ve B spermatogonya tiplerini üreten $A1$ spermatogonyadan peş peşe mitotik bölünmeler nedeniyle seminifer tübülün tüm segmentlerini doldururlar. Primer spermatositler iki mayoz bölünme geçirerek sekonder spermatositleri ve yuvarlak spermatidleri oluşturur. Bunlar daha sonra spermiyogeneze girerek morfolojik farklılaşma neticesi olgun spermi meydana getirir. Bu şekilde geçici güçlendirici mitotik ve mayotik bölünmelerle küçük bir kök hücre havuzundan, kemirgenlerde günde her gram testis parankimasında 40 milyon sperm üretilmiş olunur (Şekil 1.2) (Tegelenbosch ve ark., 1993; Thayer ve ark., 2001; Valli ve ark., 2015).



Şekil 1.2: Kemirgenlerin spermatogenez soylarında klonal gelişim. Farklılaşmamış spermatogonya, maymun ve insanda A_{dark} veya A_{pale} olarak tanımlanırken kemirgenlerde A_s , A_{pr} veya A_{al} olarak isimlendirilir. Kemirgenlerde klonal gelişim, farklılaşmamış A_s , A_{pr} ve A_{al} spermatogonya havuzunda 3-4 geçici çoğaltıcı mitoz bölünmeyi takiben farklılaşmış spermatogonya havuzunda (A_1 - A_4 , *Intermediate*, B) birincil spermatositleri meydana getiren 6 çoğaltıcı bölünmeyi içerir. Takip eden iki ek mayotik bölünme, spermiyogenez geçirerek sperm üretecek yuvarlak spermatidleri üretir. Kemirgenlerde tipik olarak 12 geçici çoğaltıcı bölünme meydana gelir. Fayomi ve Orwig, (2018) derlemesinden modifiye edilmiştir.

ID4, PAX7, BMI1 ve EOMES ifadelerinin A_s spermatogonya için en spesifik olduğu düşünülmektedir (Aloisio ve ark., 2014; Komai ve ark., 2014; Oatley ve ark., 2011a; Sharma ve ark., 2019). GFRa1, NANOS2 ve UTF1 ifadeleri A_s , A_{pr} ve A_{al4} 'te sınırlı iken (Meng ve ark., 2000; Suzuki ve ark., 2009; van Bragt ve ark., 2008), ZBTB16, SALL4, LIN28, CDH1 ve FOXO1 ise farklılaşmamış A_s , A_{pr} ve A_{al} spermatogonyalarının çoğu veya tamamında ifade edilir (Buaas ve ark., 2004; Costoya ve ark., 2004; Eildermann ve ark., 2012; Gassei ve Orwig, 2013; Goertz ve ark., 2011; Hobbs ve ark., 2012; Tokuda ve ark., 2007) ve $cKIT^+$ farklılaşan spermatogonya ile bazı örtüşmeler içerir. Daha ileri germ hücre evrelerine spesifik belirteçlerle birlikte SKH belirteçleri Şekil 1.3'te ayrıntılı olarak verilmiştir. Ancak, bu proteinlerden herhangi birinin tüm A_s spermatogonya popülasyonunu belirtip belirtmediği veya tüm fonksiyonel kök hücre popülasyonunun A_s spermatogonya popülasyonunda bulunup bulunmadığı açık değildir. Aslında tüm klon boyutlarındaki farklılaşmamış spermatogonyumlar arasındaki moleküler heterojenlik defalarca belgelenmiştir (Gassei ve Orwig, 2013; Hermann ve ark., 2015; Nakagawa ve ark., 2010; Suzuki ve ark., 2009; Zheng ve ark., 2009). Bugüne kadar bir SKH'yi kesin olarak tanımlamanın tek yolu, transplantasyon (Brinster ve Avarbock, 1994a; Brinster ve Zimmermann, 1994b) veya soy izleme (*lineage tracing*) (Aloisio ve ark., 2014; Komai ve ark., 2014; Nakagawa ve ark., 2007) yoluyla spermatogenez uzun vadede başlatma ve sürdürme kapasitesini gözlemlemektir. Diğer yandan, genel anlamda kabul edilen görüş küçük

klonlarda farklılaşmanın da az, büyük klonlarda daha fazla gerçekleştiği ve cKIT'in ise farklılaşmış tip A1 spermatogonyaya geçiş belirteci olduğu yönündedir.



Şekil 1.3: Evreye özgü germ hücre belirteçleri. Bunların çoğu germ hücresine özgüdür ve belirteçlerin bazıları hem germ hücresinde hem de az sayıdaki somatik soy hücresinde ortakdır. Figür, Dissanayake (2018) derlemesinden alınmıştır.

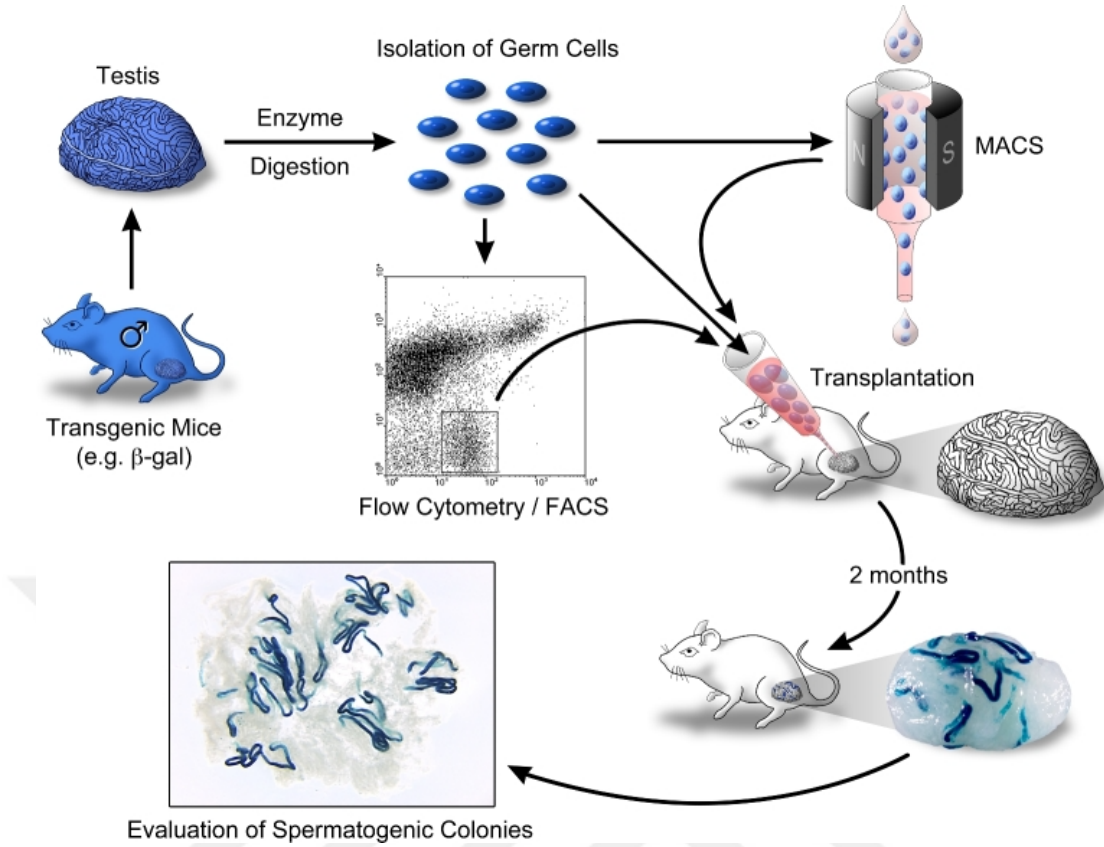
Bir transmembran proteini olup hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks etkileşiminde rol alan CD49f (integrin $\alpha 6$ veya ITGA6 olarak da bilinir) (Bigoni-Ordóñez ve ark., 2019), SKH'leri kemirgen, maymun ve insan testis hücre süspansiyonundan izole etmek ve zenginleştirmek için kullanılabilen bir başka korunmuş belirteçtir (Maki ve ark., 2009; Shinohara ve ark., 2000a; Valli ve ark., 2014). CD49f ifadesi, ne SKH'ler ne de germ hücreleri ile sınırlıdır, bununla birlikte CD49f ile tüm fonksiyonel SKH popülasyonu seçilebilir ve sonuçta ITGA6+ fraksiyonunda önemli ölçüde zenginleştirilmiş olunur (Shinohara ve ark., 2000a; Valli ve ark., 2014). Farede testiküler hücrelerden SKH elde edilmesinde CD49f'nin güvenilir ve etkin bir yüzey belirteci olduğu bildirilmiştir (Kubota ve ark., 2003; Phillips ve ark., 2010). CD49f ilk olarak 1999 yılında alıcı fare testisine nakledildikten sonra $\alpha 6$ -integrin ile seçim yapılmamış hücrelere ve $\beta 1$ -integrin+ fraksiyona kıyasla daha fazla koloni oluşturma kabiliyetine sahip hücrelerin $\alpha 6$ -integrin+ olmasıyla bulunmuştur (Shinohara ve ark., 1999). CD49f'nin, $\beta 1$ -integrin ile heterodimer oluşturarak bazal membranda laminin için bir reseptör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir. (Shinohara ve ark., 2000a). *In vitro* deneyler, lamininin EKH'lerde *Oct-4/Sox2* ekspresyonunu ve hücre proliferasyonunu koruduğunu göstermiştir (Ohinata ve ark., 2005; Ying ve ark., 2000). CD49f seminifer tübüller içinde yüksek oranda (%80) GFR- $\alpha 1$ ile ko-lokalize haldedir; bu da CD49f'nin ağırlıklı olarak primat SKH'lerin yüzeyinde eksprese edildiğini ve faredekinin aksine CD49f+ hücrelerin çoğunluğunun c-Kit- olduğunu gösterir (Maki ve ark., 2009). OCT4 ve SOX2'nin, CD49f'nin promotör bölgesine bağlanarak CD49f transkripsiyonunu indüklediği ve PI3K/AKT/GSK3 β yolağıyla CD49f'nin insan EKH'lerinde pluripotensiye koruduğu gösterilmiştir. Diğer yandan, insanda CD49f overeksprese edildiğinde mezenkimal kök hücrelerin (MKH) proliferasyonu, sfer-oluşturma etkinliği ile farklılaşması artar ve PI3K/AKT/GSK3 β yolağı aktive olur (Yu ve ark., 2012). CD49f, hematopoetik kök hücre (Notta ve ark., 2011) ve MKH (Lee ve ark., 2009b; Yang ve ark., 2015) de içinde olmak üzere otuzdan fazla kök hücre popülasyonunda ifade edilir (Krebsbach ve Villa-Diaz, 2017). AP+GKH'lerin CD49f ifade ettiği ve *in vitro* ve *in vivo* olarak PGH ile ilişkili pluripotensiye sahip olduğu bildirilmiştir (Huang ve ark., 2009; Huang ve ark., 2014). Huang ve ark., (2009) çalışmasında elde edilen pluripotent AP+GKH'lerin yüksek AP aktivitesi gösterme, SSEA-1 ve CD49f gibi hücre yüzeyi proteinlerini

yüksek miktarda ifade etme, PGH ile ilgili genleri (örn., *Oct-4*, *Nanog* ve *Blimp1*) ifade etme, göç etme, *in vitro* olarak birçok hücre tipine farklılaşma ve *in vivo* olarak kimera/teratom oluşturma yeteneğine sahip olma da dahil olmak üzere erken germ hücre özelliklerine sahip oldukları gösterilmiştir (Huang ve ark., 2009).

1.3.2.3.1. Spermatogonyal Kök Hücre Transplantasyon Tekniği

1994 yılında, Ralph Brinster ve meslektaşları, fare SKH'lerini infertil alıcı farelerin seminifer tübüllerine naklettiler ve canlı yavru üretmeye yetkin donör kaynaklı spermatogenez gözlemlediler (Brinster ve Avarbock, 1994a; Brinster ve Zimmermann, 1994b). O zamandan beri SKH transplantasyonu, testiküler hücre popülasyonu içinde SKH'lerin varlığının saptanmasını mümkün kılmış ve *in vitro* manipülasyondan sonra fonksiyonel özelliklerini incelemede altın standart haline gelmiştir (Brinster Brinster ve Avarbock, 1994a; Brinster ve Zimmermann, 1994b; Phillips ve ark., 2010). SKH transplantasyonunun potansiyel bir klinik uygulaması, azoospermik yetişkin erkeklerde ve radyoterapi veya kemoterapi alacak kanser teşhisi konmuş prepubertal erkek çocuklarında fertilitate restorasyonudur (Cheng ve ark., 2022).

Bu teknikte (Şekil 1.4), bir hücre süspansiyonundaki SKH'ler donörden izole edilir ve kültüre edilir veya doğrudan infertil bir alıcının seminifer tübüllerine enjekte edilir. Enjeksiyonu takiben seminifer tübüllerin bazal membranına giden donör SKH'leri buradaki kök hücre nişlerini kolonize eder. Eksojen SKH'ler daha sonra proliferere olabilir ve donör-kaynaklı spermatogenez kolonileri oluşturabilir. Eksperimental çalışmalarda gösterildiği üzere, alıcı erkeklerin dişileriyle çiftleştirilmesi üzerine donör haplotipli yavruların üremesi alıcı testis içinde donör kök hücre kaynaklı spermlerin geliştiğini gösterir (Brinster ve Avarbock, 1994a; Brinster ve Zimmermann, 1994b; Oatley ve Brinster, 2006b). Alıcı testisine nakledilen tek bir SKH'den klonal çoğalma ile donör-kaynaklı spermatogenez kolonileri türer (Dobrynski ve ark., 1999; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2006; Nagano ve ark., 1999; Zhang ve ark., 2003).

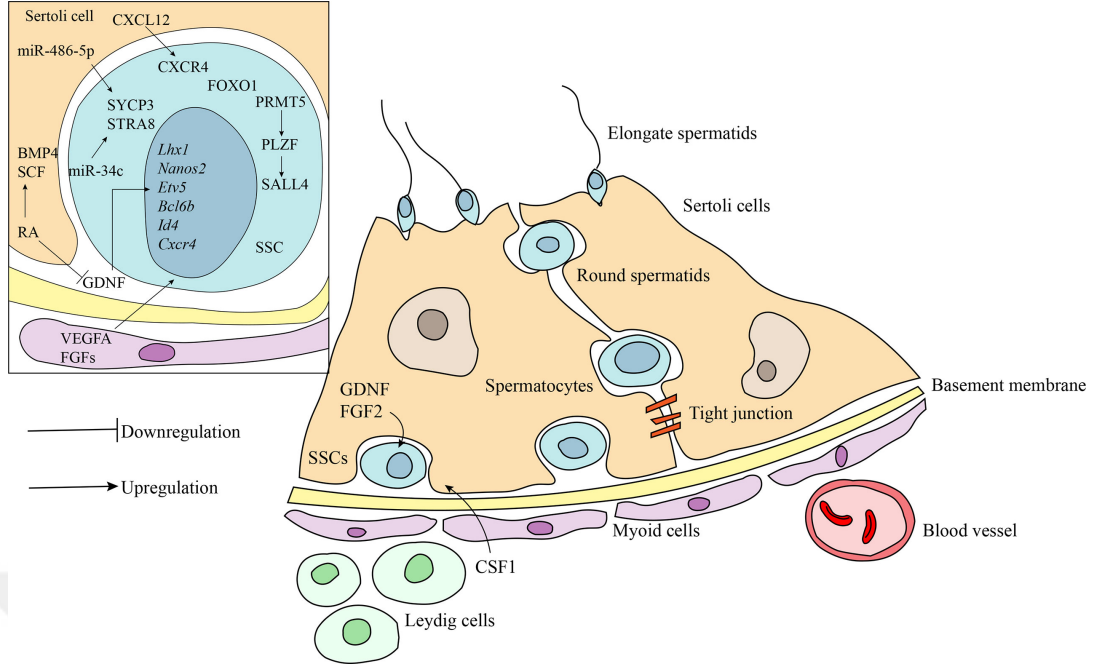


Şekil 1.4: Spermatogonyal transplantasyon yönteminin ana hatları ve SKH için kantitatif analiz. Enzimatik sindirim yoluyla bir raportör geni (örn. β -galaktosidaz) eksprese eden transgenik farelerin testislerinden hazırlanan hücre süspansiyonu, infertil bir alıcı farenin seminifer tübüllerine enjekte edilir. *In vitro* kültürden alınan hücreler veya FACS veya MACS ile fraksiyone edilen hücreler, donör hücre popülasyonu için kullanılabilir. Transplantasyondan iki ay sonra alıcı testislerde donör kaynaklı spermatogenez mavi koloniler olarak saptanabilir. Her bir spermatogenez kolonisi tek bir SKH'den geliştirildiğinden, koloni sayısı donör hücre süspansiyonundaki SKH sayısını temsil eder. Her koloninin uzunluğu, SKH ekspansiyonunun derecesini gösterir. Figür, Kubota ve Brinster, (2018) derlemesinden alınmıştır.

Donör germ hücrelerini alıcı fare testislerinin tübüllerine vermek için, *ductuli efferentes*, rete testise veya seminifer tübüllere enjeksiyon dahil olmak üzere birçok yol vardır. Fare ve sıçanlarda, *duktus efferentes* kullanılarak enjeksiyonların rete testis içine yapılması en verimli transplantasyon yöntemi olarak gösterilmiştir. Rete testis, seminifer tübüllerin her iki ucunu tek bir merkezde toplayarak birbirine bağlar. Farede rete, vasküler pedikülün kranialinde yer alır ve damarlarla birlikte dışarı doğru uzanarak caput epididimise giden *duktuli efferentes* olur. Enjeksiyon için, rete'den önceki bir noktada *duktus efferentes*'e bir mikropipet sokulup yavaşça kanal içerisine hücreler verilir (Ogawa ve ark., 1997; Oatley ve Brinster, 2006b).

1.3.2.3.2. Spermatogonyal Kök Hücre Nişi

Memeli testisi sıkı bir bağ dokudan oluşan tunika albuginea içinde yaklaşık 250 tane lobül içeren ve temel yapısını ince ve kıvrımlı seminifer tübüllerin oluşturduğu bir çift organdır; her lobül 1-4 adet, çok kıvrımlı tübül içerir ve tübüllerin lümeni seminifer epitel ile kaplıdır. Seminifer tübüllerin çevresinde de interstisyel alan bulunur (Şekil 1.5). Seminifer epitel içinde yer alan somatik Sertoli hücreleri birbirleriyle sıkı bağlantı kompleksleri kurarak seminifer epiteli, bazal ve adlüminal bölümlere ayırmak için kan-testis bariyerini oluşturur (Şekil 1.5) (Ogawa ve ark., 2005). Bu Sertoli hücrelerince oluşturulmuş kan-testis bariyeri, özellikle maddelerin/moleküllerin hücreler arası difüzyonunu önler ve ayrıca haploid germ hücrelerini innate immün sisteminden korumak için hayati önem taşır. Ek olarak, germ hücreleri adlüminal bölmeye girdiğinde, beslenme kaynağı olarak kandan gelen besinleri direkt olarak kullanamaz, bu bölgede germ hücreleri kan akışından 'kesilir'. Bu nedenle, bu germ hücre popülasyonları yalnızca Sertoli hücresinden gelen besin kaynağına bağlıdır (Bergmann, 2006; Cheng ve Mruk, 2012a; Mruk ve Cheng, 2004). Gelişmekte olan spermatogonya bazal membran üzerinde bulunur ve üç tipi vardır: farklılaşmamış spermatogonya (suskun SKH'ler), farklılaşan spermatogonya (aktif mitoz geçiren SKH'ler) ve farklılaşmış spermatogonya (Clermont, 1963; Rowley ve ark., 1971). Sertoli hücreleri testiste germ hücrelerinin gelişmesi için bir destek vazifesi görür. Bir yandan hücrel matriksi tesis ederken diğer yandan salgıladığı spesifik büyüme faktörleri ile spermatogenezin sağlıklı biçimde sürdürülmesinde temel gereksinimdir. (Griswold, 1998). İnterstisyel doku; lenf damarları, sinir lifleri ve bağ dokularının yanı sıra Leydig hücreleri, mezenkimal hücreler ve immün hücreleri içeren çeşitli hücre tiplerinden oluşur (Oatley ve Brinster, 2012). Leydig hücrelerinin ürettiği testosteron ve sitokinler otokrin ve parakrin etkileşimle SKH'lerin kendini yenilemesini düzenler. (Zaker ve ark., 2022).



Şekil 1.5: SKH nişinin şematik diyagramı ve SKH'lerin köklülüğünü ve kendini yenilemesini sürdürmede yer alan düzenleyici faktörler. Farklılaşmamış SKH'ler bazal membranda bulunur. Germ hücreleri, seminifer epitel içindeki Sertoli hücreleri ile yakın teması korur. Peritübüler miyoid hücreleri testis kordlarını oluşturmak için seminifer tübülleri çevreler. İnterstiyal bölme Leydig hücreleri, mezenkimal hücreler ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere birçok somatik hücre tipinden oluşur. Niş içindeki biyoaktif faktörler, SKH'lerin kendini yenilemesinde ve farklılaşmasında çok önemli rol oynamaktadır. CXCL12/CXCR4, FGF'ler ve VEGFA, SKH'leri idame ettirmek için GDNF ile sinerji içinde hareket eder. Retinoik asit (RA), en azından kısmen GDNF ekspresyonunu azaltarak ve SCF ve BMP4'ün aktivasyonu ile SKH'lerin farklılaşmasını indükler. Transkripsiyon faktörleri, PLZF ve FOXO1, SKH'lerin idamesinde ve spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynar. miR-1908-3p, miR-112-5p ve miR-31-5p dahil olmak üzere mikroRNA'lar da spermatogenezde kritik düzenleyiciler olarak işlev görür. Figür, Diao ve ark., (2022) derlemesinden alınmıştır.

1.3.2.3.3. Spermatogonyal Kök Hücreleri Düzenleyen Büyüme Faktörleri

Gliya kökenli nörotrofik faktör (*glial-derived neurotrophic factor*; GDNF), fosfatidilinositol 3-kinaz-AKT yolağını aktive ederek SKH'lerin kendini yenilemesini düzenler (Lee ve ark., 2007; Oatley ve ark., 2007). GDNF, RAS proto-onkogenini bir SFK yoluyla da aktive ederek SKH'lerin kendini yenilemesini aynı zamanda RAS-AKT-siklin yolağı üzerinden düzenlenir (Lee ve ark., 2009a). Önceki çalışmalar fibroblast büyüme faktörü 2/bazik fibroblast büyüme faktörünün (*fibroblast growth factor 2*; FGF2 veya *basic fibroblast growth factor*; bFGF) SKH'nin kendini yenilemesine katkıda bulunduğunu gösterdi (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; van Dissel-Emiliani ve ark., 1996). GDNF ve FGF2'nin somatik hücrelerde hem AKT hem

de MAP2K1 yollarını aynı anda aktive ettiği tespit edilmiş olsa da FGF2'nin GKH'lerde MAP2K1 yolağını GDNF'den daha güçlü bir şekilde aktive ettiği raporlanmıştır. FGF2 aracılı MAP2K1 yolunun aktivasyonu, ETV5 ve BCL6B'nin upregülasyonu yoluyla SKH'nin kendini yenilemesini uyarır. FGF8, CSF1, WNT3A, WNT5A, WNT6 ve VEGFA'nın da SKH'lerin kendini yenilemesinde etkili olduğu bulunmuştur (Hasegawa ve Saga, 2014; Lu ve ark., 2013; Oatley ve ark., 2009; Takase ve Nusse, 2016; Tanaka ve ark., 2016; Yeh ve ark., 2011; Yeh ve ark., 2012;). Sertoli hücreleri GDNF (Meng ve ark., 2000), FGF2 (Mullaney ve Skinner, 1992), SCF (Rossi ve ark., 1993), neuregulin 1 (Zhang ve ark., 2011), WNT5A (Yeh ve ark., 2011), activin A (De Winter ve ark., 1993), BMP4 (Pellegrini ve ark., 2003), EGF (Radhakrishnan ve ark., 1992), PDGF (Li ve ark., 1997; Loveland ve ark., 1995) ve CXCL12 (Yang ve ark., 2013) dahil olmak üzere spermatogenezi düzenleyen birçok önemli büyüme faktörünü üretir. Diğer testis somatik hücreleri de SKH'leri ve/veya spermatogenezi düzenleyen faktörleri ifade ederler. Leydig hücrelerinde IGF1 (Huang ve ark., 2009), CSF1 (Oatley ve ark., 2009) ve EGF (Zhang ve ark., 1997); testis endotel hücrelerinde GDNF (Bhang ve ark., 2018) ve FGF5 (Kitadate ve ark., 2019); peritübüler miyoid hücrelerde CSF1 (Oatley ve ark., 2009), GDNF (Chen ve ark., 2016) ve Aktivin A (De Winter ve ark., 1994); testiste yerleşik makrofajlarda da CSF1 (DeFalco ve ark., 2015) ifadeleri gösterilmiştir. Kök hücre faktörü reseptörü (*stem cell factor receptor*; c-Kit) testiste farklılaşan spermatogonya ve Leydig hücrelerinde ifade edilir (Manova ve ark., 1990; Rossi ve ark., 2000). Kök hücre faktörünün (*stem cell factor*; SCF; Kit ligand veya Kitl olarak da bilinir;) Leydig, endotelyal, vasküler düz kas veya Tcf21+ stromal hücrelerde koşullu *knockout* edilmesi spermatogenez sürecine zarar vermez. Özellikle Sertoli hücrelerinin ürettiği SCF farklılaşan spermatogonya havuzunu korur ve farklılaşmalarını indükler (Peng ve ark., 2023). İlginç olarak Izadyar ve ark., (2008) çalışmasında fare GKH'lerinin yalnızca POU5F1+/c-Kit+ alt kümesi, neonatal veya yetişkin testislerinden izole edilip de Kanatsu-Shinohara ve ark. (2004) çalışmasında kullanılan besi yerine yapılan küçük değişikliklerle epidermis büyüme faktörü (*epidermal growth factor*; EGF), FGF2, lösemi engelleyici faktör (*leukemia inhibitory factor*; LIF) ve GDNF büyüme faktörleri varlığında kültüre edildiğinde, pluripotent EKH belirteçlerini (*Pou5f1*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*, *Dppa5*, *SSEA-1* ve AP) ifade eden, yüksek telomeraz aktivitesi

sergileyen ve kontraktıl kardiyomiyositler, nöral hücreler ve kondrositler dahil olmak üzere birçok tabakaya özgü hücre tipine farklılaşan hücre hatları oluşturabilmiştir (Izadyar ve ark., 2008). İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (*insülin-like growth factor 1*; IGF1) ise parakrin olarak GKH'lerine etki ederek pluripotensisini ve kendini yenileyerek büyümelerini düzenler (Huang ve ark., 2009). IGF-2/IGF-1R sinyali, EKH'nin kendini yenilemesini destekler ve apoptozu önler (Bendall ve ark., 2007). Kubota ve ark., (2004a) çalışmasında IGF-1, LIF, bFGF2, EGF, SCF ve GDNF tek tek serumsuz besi yerine eklenerek SKH'ler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Buna göre; EGF 1–10 ng/ml seviyesine kadar nötr etki gösterirken 100 ng/ml'de inhibe edici olabileceği, SKH idamesi üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu görülen iki büyüme faktörünün, SCF ve GDNF olduğu sonucuna varılmıştır. SCF'nin eklenmesinin, SKH'lerin sayısını arttırmış olmasına rağmen, FACS analizi ile SKH'lerin hücre yüzeyi üzerinde c-Kit reseptörü ekspresyonuna rastlanmamış (Kubota ve ark., 2003) ve başka bir çalışma, SCF'nin kök hücrelerin uzun vadeli proliferasyonu üzerinde bir etkisi olmadığını göstermiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003).

1.4. Unipotent Erkek Germline Kök Hücrelerinde Pluripotensinin İndüklenmesi: Germline-Kökenli Pluripotent Kök Hücreler

İlk kez 2004 yılında, neonatal fare testislerinden GDNF, bFGF, EGF ve LIF varlığında genomik damgalama paternleri dışında fenotipik olarak embriyonik kök veya germ hücrelerine benzeyen ve kardiyomiyosit, nöron, astrosit ve oligodendrositlere *in vitro* farklılaşabilen EKH-benzeri hücreler geliştirilmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004). Bu EKH-benzeri hücrelerin farelere inoküle edildiklerinde teratom ve blastokistlere enjekte edildiklerinde germline kimera oluşturdukları gözlenmiştir. Daha sonra birçok çalışma, yetişkin fare testisinden elde edilen GKH'lerden pluripotent hücrelerin (multipotent GKH'ler) türetildiğini raporlamış ancak GKH'lerin EKH-benzeri hücrelere dönüştürülmesine dair yapılan bu çalışmalarda farklı terminolojiler kullanılması kavramsal karışıklığa yol açmıştır.

Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar beklenmediği, çünkü germ hücrelerinin çiftleşmeyi takiben 13.5 gün sonra (dpc) pluripotensilerini kaybettiği düşünülüyordu. Leroy C. Stevens, 11.5-12.5 dpc'de 129/Sv fareden alınan erkek genital taslaklarının, alıcı yetişkin testislerinde sıklıkla teratom oluşturduğunu, bununla birlikte, 13.5 dpc veya daha eski embriyolardan genital taslaklar toplandığında bu insidansın önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (Stevens, 1966). Ayrıca, 8.5 ila 12.5 dpc embriyolardan türetilen PGH'leri, KITL, FGF2 ve LIF içeren özel kültür koşulları altında embriyonik germ hücreleri (EGH) oluşturmuş olsa da aynı kültür koşullarının, 13.5 dpc veya daha eski embriyolardan toplanan hücrelerde pluripotensiyi indüklediği gözlemlenmiştir (Labosky ve ark., 1994; Matsui ve ark., 1992; Resnick ve ark., 1992). Doğum sonrası testislerde az sayıda ilkel PGHBH kalması mümkün olsa da mGKH'lerin GKH'lerden kaynaklanmış olması muhtemeldir çünkü elektroporasyondan sonra transfekte edilmiş klonların ilaç seçimi sırasında aynı transgen entegrasyon paternlerine sahip GKH'lerin ve mGKH'lerin ortaya çıktığı bulunmuştur (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008). Bu veriler, mGKH'lerin GKH'lerden kaynaklandığını gösterir. mGKH'lerin keşfi, postnatal germ hücrelerinin potansiyel pluripotensilerini koruduğunu düşündürmektedir.

Standart EKH kültür koşullarında EKH özellikleri kazanan multipotent yetişkin GKH'leri (*multipotent adult germline stem cells*, maGSCs) olarak adlandırılan *Stra8-enhanced green fluorescent protein* (EGFP)/*Rosa26* yetişkin farelerden FACS ile ayrıştırılan *Stra8-EGFP+* GKH'ler spontane olarak üç embriyonik germ tabakasına da farklılaştırılabilmiş, *in vivo* teratom oluşturabilmiş ve erken blastokiste enjekte edildiklerinde germline aktarımı göstermişlerdir (Guan ve ark., 2006). 5-haftalık Oct4-GFP transgenik fareden elde edilen Oct4-GFP+/c-kit- hücreler MEF besleyici hücreleri üzerinde germline-türevli PKH kolonileri görülünceye dek önce GKH besi yeri ile ve koloni seçiminden sonra da EKH besi yeri içerisinde çoğaltılarak kültüre edilmiştir. Elde edilen germline-türevli PKH'ler *in vitro* farklılaşma, teratom ve kimera oluşturma ve GKH'lerin paternal DNA damgalanma paternini koruma özelliği göstermiştir (Ko ve ark., 2009). GKH'lerin pluripotensisi, besleyici hücreler olmadan Matrigel-tabanlı kültür sistemi kullanılarak da indüklenebilmiştir (Lee ve ark., 2018). Bir diğer çalışmada, GPR125+ spermatogonyal

progenitör hücrelerin (GSPH) uzun süreli kültürlerinin GPR125+ multipotent yetişkin spermatogonyal-türevli kök hücre (*multipotent adult spermatogonial-derived stem cell*, MASC) kolonilerine dönüştüğü, bu GPR125+ MASC'lerin EKH'lere morfolojik olarak ve üç germ tabakasına da farklılaşma, teratom ve kimerik embriyoları oluşturma özellikleriyle benzeseler de EKH'lerin moleküler işaretlerini taşımadıkları fakat multipotent yetişkin progenitör hücreleri (*multipotent adult progenitor cells*, MAPCs) taklit ettikleri gösterilmiştir (Seandel ve ark., 2007). Kossack ve ark., (2009), testis biyopsisinden kültür ortamında elde ettikleri kolonileri manüel olarak MEF besleyici hücreleri üzerine transfer edip insan EKH kültür ortamında kültüre ederek *in vitro* olarak yaklaşık 20 pasaja kadar çoğaltabildikleri insan multipotent GKH'leri (human multipotent germline stem cells, hMGSCs) elde etmişlerdir. Hem SSEA4, TRA1-81, OCT4 ve SOX2 pluripotensi belirteçleri hem de EKH belirteci olan doku non-spesifik alkalen fosfataz (TNAP) ifadelerine sahip bu hücrelerin üç germ serisinin hücrelerine farklılaşabilen embriyoid cisimleri oluşturduğu, normal XY karyotipini koruduğu, H19 lokusunda hipometile olduğu ve yüksek seviyelerde telomeraz ifade ettikleri gösterilmiş olsa da insan EKH'lerinde sıklıkla görüldüğü kadar geniş ölçekli teratom oluşumu saptanmamıştır. Takip eden çalışmalarda epigenetik yeniden programlama ve bazı transkripsiyon faktörleriyle uyarılması durumunda SKH'nin germ hücresine spesifik gen ifadelerini terk ederek EKH-benzeri hücrelere dönüştürülebilme potansiyeli taşıdığı, bu şekliyle de erişkin kök hücre kaynağı olarak rejeneratif tıpta kullanılabileceği önerilmiştir (Liu ve ark., 2016). Fare testisinden elde edilen CD49f+ GKH kolonilerinin *Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, ve *Eras* gibi gen ifadesi paternlerinin ve AP aktivitelerinin EGF içeren kültür ortamında laminin-kaplı kültür plakalarında EKH özellikleri taşıdıkları, uzamış kültürlerinde ise bu hücrelerin hepatosit indükleyici besi yerinde hepatosit-benzeri hücrelere ve RA varlığında nöron, astrosit ve oligodendrositlere farklılaşmaya uğradıkları, blastokist içine enjekte edilmeleriyle de embriyonik kimeraların olduğu gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2009). Takiben, Stra8+ SKH'ler OP9 stromal hücrelerin üzerinde kültüre edildikten sonra elde edilen Flk-1+ kardiyovasküler progenitörler FACS ile ayrıştırılıp COLIV-kaplı kültür plakalarında VEGF ile indüklendiklerinde endotel-benzeri hücrelere farklılaştırılıp, *in vivo* olarak da yeni damar oluşumuna katkıda bulunmuştur (Cheng ve ark., 2012b). Her ne kadar yavru testis hücreleri, HRASV12, MYC ve dominant negatif TRP53 ile

transfekte edildiğinde EKH-benzeri koloniler üretilmiş olsa da, pluripotensinin kritik bir belirteci olan Nanog ifadesi gösterilememiştir (Morimoto ve ark., 2012). İlginç bir şekilde, aynı gen kombinasyonunu veya Yamanaka faktörlerini transfekte etmek, GKH'lerde (Morimoto ve ark., (2012) çalışmasında kültüre edilen SKH'ler için kullanılmıştır) belirgin değişikliklere neden olmamıştır, bu da bunların somatik hücre transformasyonu/yeniden programlama protokollerine dirençli olduklarını düşündürür. Buradan da anlaşılabileceği üzere, somatik hücre onkogenlerin overekspresyonu taze SKH'den mGKH'leri indüklememektedir. Dolayısıyla GKH'ler ile taze testis hücreleri ortak bir davranış modeli göstermez; bu gözlem, *in vivo* olarak GKH'ler ve SKH'ler arasında fenotipik farklılıkları gösteren önceki deneyleri destekler niteliktedir. Örneğin, genellikle *in vivo* SKH'lerin c-KIT ifade etmediği kabul edilir. Bununla birlikte, GKH kültürlerindeki hem KIT+ hem de KIT- popülasyonları karşılaştırılabilir SKH sıklığı sergiler (Morimoto ve ark., 2009). Bu farklılığın *in vitro* kendini yenilemenin aşırı uyarılmasından kaynaklanıyor olabildiği düşünülmüştür. Izadyar ve ark., (2008) çalışmasında fare POU5F1+/c-Kit+ GKH'leri EGF, FGF2, LIF ve GDNF büyüme faktörleri varlığında kültüre edildiğinde, pluripotent EKH belirteçlerini (*Pou5f1*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*, *Dppa5*, *SSEA-1*) ifade eden, yüksek telomeraz aktivitesi sergileyen ve üç germ tabakasının da hücrelerine farklılaşan multipotent germ hücre (mGH) hatları oluşturmuştur. Ancak mGH'ler testislere transplante edildikten sonra seminifer tübüllerinin çoğunda spermatogenez bulunmamıştır ki bu da bu hücrelerin SKH özelliklerine sahip olmadığını göstermiştir. mGK alan farelerin hiçbirinde teratom gözlenmemiştir. Bu veriler, EKH'lerden farklı olarak mGK'lerin tümörjenik olmadığını gösterir.

1.5. Germline-Kökenli Pluripotent Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları

In vitro ortamda embriyonik olmayan bir kaynaktan PKH'lerin eldesi daha güvenli olabileceği için, germline-kökenli bu hücreler insanda klinik uygulamalara geçilmesinde önemli bir temel kaynak teşkil edecek ve bilimsel çalışmaların hızlanmasını sağlayabilecektir. Germline-kökenli PKH'ler, insan PKH'lerin eldesi için embriyo kullanımına ilişkin etik kaygılardan kaçınmayı sağlayan, karaciğer, kalp,

nöral, ve hematopoetik hastalıklarının tedavisi için umut verici bir araçtır (Fagoonee ve ark., 2011).

mGKH'lerden türetilen hepatositler halihazırda ortotopik karaciğer transplantasyonu ile tedavi edilen metabolik hastalıklar, özellikle sadece az miktarda fonksiyonel protein ile düzeltilebilenler olmak üzere, hücre bazlı tedavi için gerekli temeli sağlayabilir. Albümin ve haptogloblin sekresyonu, üre sentezi, glikojen depolaması ve indosiyanin yeşili alımı yapabilen metabolik olarak aktif hepatositlerin *in vitro* olarak mGKH'lerden türetililebileceği gösterilmiştir (Fagoonee ve ark., 2010). mGKH'den türetilen nöral hücreler birçok farklı sinir sistemi bozukluğunun tedavisi için umut verici bir hücre kaynağı oluşturur. Streckfuss-Bomeke ve ark., (2009), uygun kültür ortamında mGKH'lerden nöral progenitörlerin elde edilebileceğini, bunların da fonksiyonel nöronlar (GABAerjik, glutamaterjik, serotonerjik ve dopaminerjik nöronlar) ve glial hücreler (astrositler ve oligodendrositler) şeklinde ileri maturasyona uğradıklarını göstermiştir. Pasif ve aktif membran özelliklerinin ve postsinaptik akımların elektrofizyolojik kayıtları, mGKH'den türetilen öncü hücrelerin fonksiyonel hücrelere olgunlaştığını göstermiştir. Keza Glaser ve ark., (2008) mGKH'den türetilen nöronların hem GABAerjik sinaptik iletim hem de senkronize salınım aktivitesi ile ilgili aktif işlevsel ağlar oluşturduğunu bildirmiştir. Bir başka ilginç gözlem, mGKH'den türetilen oligodendrositlerin tam olgunlaşmaya uğraması ve miyelin eksikliği olan sıçan serebellumunun organotipik dilim kültürlerinde miyelin eksikliği olan dokuda alıcı aksonlarını kaplamasıdır. Otolog hücre terapisi potansiyellerinin yanı sıra mGKHlerin nöral farklılaşması, nöral gelişim ve nöral rejenerasyon üzerine temel araştırmalar için yeni bir pencere açar. mGKH'ler gibi PKH'ler de kardiyomiyosit oluşumunda EKH'lerin yerini alabilir. mGKH'lerin fonksiyonel kardiyomiyositlere farklılaşmak için indüklenebileceği bildirilmiştir (Guan ve ark., 2007). Moleküler, hücresel ve fizyolojik deneyler mGKH'den türetilen kardiyomiyositlerin EKH'lerden türetilenlere benzer özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir. Dişi farelerin sol ventriküler duvarına mGKH'lerin transplantasyonu bu hücrelerin engraft olduğunu ve enjeksiyondan bir ay sonra kalp bölümlerinde varlığını göstermiştir. Bu hücrelerin normal kalpte teratom oluşumu yapmadan çoğalıp farklılaşabildiği rapor edilmiştir. Bunun yanı sıra, mGKH'ler *in loco* olarak vasküler

endotelial ve düz kas hücrelerine farklılaştırılabilmiştir. Normal kalpte kardiyomiyositlere spontan *in vivo* farklılaşma gözlenmemiştir. Bu durum lokal niş ortamının, engraft olmuş hücrelerin ilerleyişini yönlendirmede ciddi bir etkisi olmasından kaynaklanabilirdi. Miyokard enfarktüsü sırasında ortaya çıkan sitokinler veya büyüme faktörleri, mGKH'lerin *in vivo* olarak kardiyomiyositlere düzgün biçimde farklılaşmasını sağlamış olabilir. Ayrıca, farklılaşan mGKH'lerden elde edilen Flk1+ hücrelerin, EKH'ler kadar verimli bir şekilde olgun kardiyomiyositlere ve endotel hücrelere dönüşebileceği gösterilmiştir (Baba ve ark., 2007). Aynı grup, Flk1+ mGKH'lerin doğrudan iskemik farelerin kalbine naklinin kalp fonksiyonunu iyileştirdiğini de bulmuştur (Iwasa ve ark., 2010). mGKH'ler OP9 hücreleri üzerinde, Gr-1+Mac1+ miyeloid hücreleri ve Ter119+ eritroid hücreleri dahil olmak üzere CD45+ hematopoietik hücrelere farklılaşabilmektedir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003). Diğer yandan, OP9 besleyici hücre sistemi kullanılarak FLK1+-farklılaşan mGKH-kökenli miyeloid ve lenfoid potansiyele sahip multipotent hematopoietik progenitor hücrelerin oluşumu bildirilmiş ve immün yetmezliği olan farelerde Kİ'ne enjeksiyonundan sonra Kİ boşluğunda mGKH-türevli hematopoietik hücreler saptanmıştır (Yoshimoto ve ark., 2009). mGKH-türevli adipositler ise translasyonel plastik ve rekonstrüktif cerrahi uygulama çalışmalarının merkezi haline gelmiştir. mGKH'ler aynı zamanda, cerrahi operasyon için doğru yaşa ulaşması gereken genetik kusurlu yenidoğanlarda olduğu gibi, hastalık teşhisi ile organ nakli arasında "köprü tedavisi" görevi görebilir. Sonuç olarak; mGKH'ler doku rejenerasyonun yanı sıra doku gelişimi üzerine temel araştırmalar alanında yeni olanakların geliştirilmesi için umut verici bir hücre kaynağı olma potansiyeli taşımaktadır.

1.5.1. *In Vitro* Spermatogenez: Bir Fertilite Restorasyonu Stratejisi

Prepubertal erkekler fertilitenin korunması stratejisinin bir parçası olarak *in vitro* spermatogenez için en önemli adaylar arasındadır (Wyns ve ark., 2010), çünkü testis dokusu biyopsisi adayı erkek çocukların %35-41.7'si (Braye ve ark., 2019; Wyns ve de Michele, 2018), kontamine olmuş kriyoprezerve edilmiş testis dokusuna sahip olma riskinin yüksek olduğu hematolojik malignitelerden muzdariptir. En fazla endişe

edilen ise, çözdürülmüş testis doku örneklerinin veya pürifiye edilmiş GKH'lerin yeniden nakledilmesi durumunda, alıcıya kanser hücresinin yeniden verilme riskidir (Jahnukainen ve ark., 2001; Wyns ve ark., 2010). GKH'lerin ototransplantasyonundan önce malign hücrelerin uzaklaştırılması için harcanan çabalara rağmen (Del Vento ve ark., 2018), hematolojik veya metastaz yapan hastalıklardan muzdarip kanser hastalarında fertilitate restorasyonu için *in vitro* spermatogenez hala tercih edilen strateji olmaya devam etmektedir. Klinefelter hastalarının %90'ı erişkin yaşa geldiklerinde infertilite problemi ile karşılaşmaktadır, bunların da %50-60'ında mikro-TESE ile spermatozoa elde edilip yardımcı üreme teknolojileriyle %50'sinde gebelik elde edilebilmektedir (Corona ve ark., 2017; Plotton ve ark., 2014). Ancak mikro-TESE'de spermatozoa çıkmayan erişkin olguların %21'inde, peripubertal çocukların %31.5'inde ve prepubertal hastaların ise dörtte üçünde hala GKH bulunabilmektedir (Van Saen ve ark., 2018). Klinefelter sendromlu hastaların spermatogenik süreci engelleyen hasarlı bir testis ortamına sahip olduğuna dair bazı kanıtlar olsa da (Aksglaede ve ark., 2006; Giudice ve ark., 2019) XXY GKH'nin *in vitro* çoğaltıldığında ekstra X kromozomunu kaybedebildiği gösterilmiştir (Ardekani ve ark., 2018), bu da GKH'in daha sonra muhtemelen *in vitro* spermatogenez için kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ancak henüz Klinefelter sendromlu GKH'lerin *in vitro* spermatogenezini bildiren bir çalışma yapılmamıştır. NOA olgularının %4-30'unda testis biyopsi sonuçları mayotik duraklama göstermektedir. Bazı vakalar geri döndürülebilirken (yani varikosel, gonadotropin veya beslenme eksikliği), somatik veya genetik anomalilere bağlı diğerlerinde mayotik duraklama geri döndürülebilir değildir (Martin-du Pan ve Campana, 1993). Blokaj en sık olarak mayotik metafaz seviyesinde meydana gelir (Enguita-Marruedo ve ark., 2019) ve testiste mikroçevre hasarları mayotik duraklamaların ana nedeni olarak tanımlanır (Guichaoua ve ark., 2005). Bu nedenle, mikro-TESE'de yuvarlak spermatid enjeksiyonu (ROSI) veya intrasitoplazmik sperm enjeksiyonuna (ICSI) uygun germ hücrelerinin yokluğunda, bu hastalarda *in vivo* GKH farklılaşmasındaki elverişsiz koşulların üstesinden gelmek için *in vitro* spermatogenez bir seçenek olabilir.

İnsanda prepubertal (Sadri-Ardekani ve ark., 2011) ve yetişkin (Sadri-Ardekani ve ark., 2009) GKH'leri hali hazırda dondurularak saklanabilmekte, hatta *in*

vitro çoğaltılarak klinik uygulamalara hazır hale getirilebilmektedir. Teorik anlamda bir seçenek, GKH'lerde spermatogenik duraksamaya neden olan mutasyonu düzeltmek ve ardından otojenik olarak hastaya transplante etmek olabilir (Mulder ve ark., 2016). Fakat germline genom düzenlemesi ile ilgili etik sorunlara ve testiste hala düzeltilmemiş GKH'lerin kalma olasılığı gibi pratik soruna ek olarak, çoğu durumda spermatogenik bozulmanın arkasındaki genetik neden bilinmemektedir. Henüz klinik uygulamadan uzak olmasına rağmen, bunu önlemenin bir yolu, GKH'lerden *in vitro* ortamda fonksiyonel sperm elde etmek olacaktır (Sun ve ark., 2018). Spermatogenezi taklit edebilmek ve *in vitro* spermatozoa üretmek için bir sistemin oluşturulması, sadece *in vitro* fertilizasyon (IVF) veya ICSI gibi yardımcı üreme tekniklerinde doğrudan uygulamak için değil aynı zamanda erkek infertilitesinin moleküler mekanizmalarını ve genetik nedenlerini incelemek için de uygun bir ortam sağlar. Günümüzde organotipik ve iki-boyutlu (2-D) kültür ve testis hücre süspansiyonlarının üç-boyutlu (3-D) kültürü gibi intrinsik somatik mikroçevreden faydalanılacak çeşitli stratejiler geliştirilmiştir.

1.5.1.1. Organotipik kültür

60'lı yılların başından itibaren yetişkin sıçanların testis fragmanlarının kültürü için bir gaz-sıvı arayüzü kullanılmıştır (Trowell, 1959). Bu kültür sisteminde GKH'lerin farklılaşması pakiten spermatositleri ile sınırlı kalmıştır (Steinberger ve Steinberger, 1966). 2003 yılında, bir gaz-sıvı arayüz kültür sisteminde iki haftalık kültürden sonra yuvarlak spermatidler gözlenmiştir (Suzuki ve Sato, 2003). Daha sonra, *in vitro* olarak spermatogenezin farklı aşamalarının araştırılmasında organotipik kültür sistemleri devreye girmiştir. Araştırmalardaki çığır açan gelişmelerden biri, 2011 yılında *in vitro* üretilen haploid germ hücrelerinden canlı yavruların üretilmiş olmasıydı (Sato ve ark., 2011). Sato ve ark., (2011)'nin çalışmasında, neonatal fare testiküler doku fragmanları agaroz jel-temelli organ kültürü sisteminde serumsuz kültür ortamında kültüre edildiğinde *in vitro* fonksiyonel spermatid ve sperm üretilbildiği gösterilmiştir. Daha sonrasında gazların, besinlerin ve atık ürünlerin değişimini kolaylaştırarak GKH'ler için daha iyi bir kültür ortamı sağlamak amacıyla

organ kültüründe mikroakışkan teknolojisi benimsendi (Komeya ve ark., 2016). Yuan ve ark.'nın (2020) yaptıkları çalışmada fetal gonadlardan insan testiküler organogenezinin başarılı bir şekilde tekrarlanması sağlanmış, *in vitro* türevli haploid spermatidlerin mayotik rekombinasyona uğradığı gösterilmiş ve bu spermatidler oositleri fertilize edebilip blastokist oluşumunu destekleyebilmiştir (Yuan ve ark., 2020).

1.5.1.2. İki-Boyutlu Kültür

GKH'lerin çoğalması ve farklılaşması için yaygın olarak iki tip iki-boyutlu kültür sistemi kullanılır: (i) mitotik olarak inaktive edilmiş besleyici hücreler üzerinde kültüre edilen GKH'ler, (ii) somatik hücrelerle birlikte kültüre edilen GKH'ler (Ibtisham ve Honaramooz, 2020). İki-boyutlu kültür sistemlerinin desteğini kullanan çok sayıda çalışma, haploid erkek germ hücrelerinin oluşumunun indüklenebileceğini (Hue ve ark., 1998; Nagao, 1989; Rassoulzadegan ve ark., 1993; Staub ve ark., 2000; Wang ve ark., 2014) ve kemirgenlerde bu *in vitro* türetilmiş haploid erkek germ hücrelerinden yavru üretilebileceğini bildirmiştir (Marh ve ark., 2003). Klinik uygulamadan uzak olsa da *in vitro* ortamda spermatogenezi taklit etmek için birkaç girişimde bulunulmuştur. Bu kapsamda EKH'lerin doğrudan farklılaştırılması (Easley IV ve ark., 2012; Geijsen ve ark., 2004; Nayernia ve ark., 2006a; Zhou ve ark., 2016) veya fare EKH'lerinin infertil farelerin seminifer tübüllerine transplante edilmelerini takiben spermatogenez geçirebilen PGHBH'lere, SKH-benzeri hücrelere veya GKH-benzeri hücrelere (GKHBH) *in vitro* farklılaştırılması denenmiştir (Hayashi ve ark., 2011; Ishikura ve ark., 2016; Li ve ark., 2019). Tüm bu çalışmalar haploid spermatid-benzeri hücrelerin oluşumunu bildirmiş, ancak yalnızca bir çalışmada (Zhou ve ark., 2016), *in vitro* ortamda başarılı mayoz bölünme ve fertilizasyon potansiyeli olan haploid germ hücrelerinin oluşumundaki başlıca aşamalar gösterilebilmiştir (Handel ve ark., 2014). Bu çalışmada, fare EKH'lerinin PGHBH'lere farklılaşması ve ardından neonatal testis hücre süspansiyonu ile kültüre edilmesiyle haploid germ hücre oluşumu sağlanmıştır (Zhou ve ark., 2016). Kliniğe uygulanım söz konusu olduğunda, hastanın kendi genetik materyalini içeren EKH'lerin yetişkin bir insanda kullanımı mümkün

görünmemektedir. Olası bir alternatif strateji, hastanın kendi somatik dokusundan elde edilmiş uPKH'lerden insan PGHBH'lerinin (Kojima ve ark., 2017; Sasaki ve ark., 2015) veya fonksiyonel spermlerin (Easley IV ve ark., 2012; Eguizabal ve ark., 2011) *in vitro* olarak oluşturulmasıdır (Hendriks ve ark., 2015a; Hendriks ve ark., 2015b). *In vitro* gametogenez alanında uPKH'lerin katkısı göz ardı edilemez olsa da uPKH'lerin oluşturulması genetik yeniden programlamayla somatik epigenetik belirteçlerin silinmesini gerektirir ki bunun güvenilirliği yeterince araştırılmamıştır. Ayrıca, literatürde fareler için uygulanan mevcut germ hücre farklılaşma protokolleri (Zhou ve ark., 2016) doğrultusunda insanda klinik uygulamaya geçilecek olursa hala uyumlu bir insan neonatal testisinin kullanılmasına ihtiyaç vardır.

Bir çalışmada, fare GKH'leri kullanılarak mGKH hattı oluşturulup bunların pluripotent EKH yolağıyla haploid germ hücrelerine farklılaşmaları indüklenmiştir (Nolte ve ark., 2010). Yapılan başka bir çalışma fare tip A spermatogonyumlardan telomeraz immortalizasyonu ile elde edilen spermatogonyal hücre hattının SCF varlığında spermatosit ve spermatidlere farklılaşabildiğini göstermiştir (Feng ve ark., 2002). EKH'lerden oluşturulan erkek GKH'lerin mayoz geçirebildiği, *in vitro* haploid erkek gametleri üretebildiği ve fare oositlerine elde edilen haploid erkek gamet hücreleri ile yapılan ICSI sonucu başarılı fertilizasyon gösterilerek bu hücrelerin işlevsel olduğu bildirilmiştir (Nayernia ve ark., 2006a). ICSI ile oositleri PGHBH'lerden türetilen spermlerle dölediklerinde Hayashi ve ark., ortaya çıkan zigotların normal olarak geliştiğini ve blastokist aşamasına kadar embriyoların donör genomundan türetilen güçlü stella-ECFP ekspresyonu sergilediğini göstermiştir (Hayashi ve ark., 2011). Zhou ve ark. fare EKH'lerinden farklılaştırdıkları PGHBH'lerin neonatal testis hücre süspansiyonu ile kültüre edilmesiyle spermatid-benzeri hücreler elde etmiş ve fonksiyonel erkek gametogenezinin *in vitro* ortamda taklit edilebileceğini kanıtlamak için bunların oositlere ICSI'sini yaparak da canlı, fertil yavru oluşumu bildirmişlerdir (Zhou ve ark., 2016).

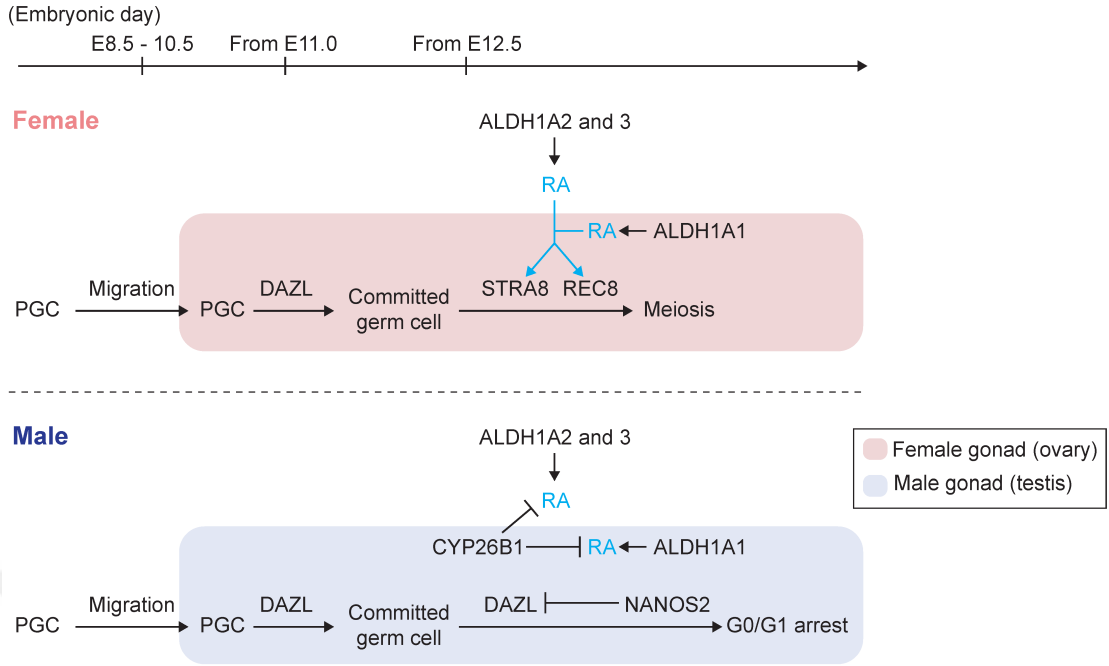
1.5.1.3. Üç-Boyutlu Kültür

Testis nişini daha iyi taklit etmek için çeşitli üç-boyutlu kültür sistemleri geliştirilmiştir. 2006 yılında, sıçanlardan izole edilen testis hücreleri seminifer tübüllerin bazal membran bileşimini taklit etmek için kollajen jeller üzerinde kültürlendi (Lee ve ark., 2006b). Daha sonra yumuşak agar kültür sistemi geliştirilmiş (Stukenborg ve ark., 2008) ve 2012 yılında bu sistemde farklılaşmamış germ hücrelerinden fare haploid germ hücreleri üretilmiştir (Abu ve ark., 2012). Üç-boyutlu kültür sisteminde sıklıkla metilselüloz kullanılmaktadır. Metilselüloz kültür sistemi de olgunlaşmamış germ hücrelerinin farklılaşmasını destekler. Seminifer epitelin *in vivo* biçimini ve işlevini yapay olarak taklit etmek için 2010 yılında üç-boyutlu bir kan-testis bariyeri sistemi tasarlanmıştır (Legendre ve ark., 2010). Önce kültür *insert* ünün altında testiküler peritübüler miyoid hücreleri kültüre edilmiş, bunu takiben ekstrasellüler matriks içinde germ hücreleri ve Sertoli hücreleri *insert* üstüne eklenmiştir. Seminifer tübülleri rekonstrükte etmeyi amaçlayan bir başka çalışmada, neonatal farelerinden alınan testis hücreleri V-tabanlı bir hücre kültürü plakası üzerinde kültüre edilerek oluşturulan agregatlar agaroz jel bloklarının üzerine ekilmiş ve 30-51 günlük inkübasyondan sonra haploid erkek germ hücreleri elde edilmiştir (Yokonishi ve ark., 2013). Ayrıca, hyaluronik asit ve kitosan içeren üç-boyutlu hücresizleştirilmiş testis iskelesi, fare GKHlerinin farklılaşması ve çoğalması için gerekli koşulları sağlamıştır (Naeemi ve ark., 2021). Keza, fare GKH'lerinin proliferasyonu ve kendini yenilemesi, Sertoli hücreli aljinat hidrojelinden oluşan üç-boyutlu yapı iskelesi üzerinde kültüre edilerek uyarılmıştır (Veisi ve ark., 2022). Bu kapsamda, germ hücrelerinin mayoz fazına farklılaşmasını ve uzun süreli hayatta kalmasını destekleyen tübül benzeri yapıları ve Leydig hücre işlevselliğini gösteren hava-besi yeri arayüzünde üç-boyut baskılı tek katmanlı yapı iskelelerinde iki farklı fare soyundan testis organoidleri üretilmiştir. Primer testis hücreleri ve EGFP+ GKH karışımından oluşan kimerik organoidler, daha iyi entrapman için iki katmanlı iskelelerde kültüre edilmiştir. Bu şartlarda testisin işlevsel birimini temsil eden, bozulmamış bir tübül benzeri yapı ve çevreleyen interstisyumdan oluşan gelişmiş bir sferoidal morfoloji gelişimi görülmüş ancak GKH'leri uzun süreli kültürde yaşamamışlardır (Richer ve ark., 2021). Önen ve ark. yaptıkları çalışmada (2022),

hava-sıvı interfazına katkıda bulunan syngeneic BM-MSC tarafından desteklenen ko-kültür sisteminin spermatogonial kök/progenitor hücrelerin *in vitro* olarak hayatta kalmasını, ekspansiyon ve farklılaşmasını desteklediğini bildirmişlerdir. İnsan GKH'lerinin 3-D kültür sisteminde kültüre edilmesi için yaygın olarak yumuşak agar ve agaroz jeli kullanılmaktadır. Yumuşak agar kültür sisteminin çoğalma ve farklılaşma bakımından insan SKH'lerine faydası gösterilmiştir . (Mohammadzadeh ve ark., 2019). İnsan GKH'leri için üç-boyutlu kültür sistemlerinde kullanılan bir başka malzeme de polikaprolakton nanofiber matriksidir (Bashiri ve ark., 2022). Polikaprolakton nanofiber, doğal ekstraselüler matriksteki kollajen lifleri ile benzer fiziksel yapı gösterir (Dash ve Konkimalla, 2012).

1.5.1.4. Mayozun Başlaması ve İlerlemesinde SB431542 ve Retinoik Asitin Rolü

PGH'leri spesifikasyonlarından sonra, gelişen gonadlara migrasyonları boyunca pluripotensi faktörlerini ifade ederler ve gelişimsel olarak kararlanmamış hücrelerin transkripsiyonel programını sürdürürler. E10.5–12.5'te (gonadal kolonizasyon yani PGH'den 'gonya'ya geçişten sonra) gonadal PGH'lerde, RNA'ya bağlanan proteinler DAZL ve DDX4 ekspresyonunun başlamasıyla (Anderson ve ark., 2007; Hu ve ark., 2015; Nicholls ve ark., 2019) birlikte, özellikle de gonadal çevre tarafından indüklenen DAZL, pluripotensi faktörlerinin ekspresyonunu downregüle eder ve PGH'ler pluripotent EGH hatlarına yeniden programlanma yeteneğini ve teratom oluşturma potensilerini kaybederek somatik soylara farklılaşmaları engellenir (Chen ve ark., 2014). Omurgalılar arasında geniş ölçüde korunan bu geçiş, germ hücre determinasyonu olarak adlandırılır ve böylece PGH'leri germline'a kararlanır (Nicholls ve ark., 2019).



Şekil 1.6: Her iki cinsiyetin fare fetal gonadlarında germ hücre gelişiminin şeması. Kırmızı kutu: dişi gonad (over). Mavi kutu: erkek gonad (testis). DAZL, STRA8, REC8 ve NANOS2 germ hücrelerinde ifade edilir. ALDH1A1 ve CYP26B1 fetal gonadlarda eksprese edilir. ALDH1A2 ve ALDH1A3 gonadların dışında eksprese edilir. Figür, Endo ve ark., (2019) derlemesinden alınmıştır.

DAZL'nin ekspresyonu üzerine germ hücreleri, RA'yı mayozu indükleyen bir sinyal olarak yorumlar (Şekil 1.6) (Bowles ve ark., 2006; Koubova ve ark., 2006; Lin ve ark., 2008). RA germ hücrelerini hem mayoz başlangıcı için gerekli bir gen olan *Stras8*'i (Baltus ve ark., 2006) hem de mayotik ilerleme için gerekli bir gen olan *Rec8*'i (Bannister ve ark., 2004; Xu ve ark., 2005) ifade etmeye teşvik eder (Koubova ve ark., 2014; Menke ve ark., 2003). Bu iki faktör bağımsız olarak RA tarafından aktive edilir (Şekil 1.6) (Koubova ve ark., 2014; Soh ve ark., 2015). Bu süreç *Dmcl*, *Sycp3* gibi diğer mayotik belirteçlerin ifadesinden ve mayotik çift zincir kırıklarının bir belirteci olan histon H2AX'in (γ H2AX) fosforilasyonundan önce gerçekleşir (Bullejos ve Koopman, 2004; Menke ve ark., 2003; Western ve ark., 2010; Yao ve ark., 2003). *Stras8*, mayozun başında hızlı bir şekilde yok olmadan önce, mayozun başlangıcında her iki cinsiyetin germ hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilir (Anderson ve ark., 2008; Baltus ve ark., 2006; Menke ve ark., 2003). Fetal overde *Stras8* ilk olarak, daha mayotik germ hücrelerinde kromatin yoğunlaşması ortaya çıkmadan bir gün önce gözlenir (Şekil 1.6) (Menke ve ark., 2003). STRA8 promotörlere bağlanan ve mayotik profaz I genlerinin, G1-S hücre döngüsü genlerini ve mitotik programı spesifik olarak

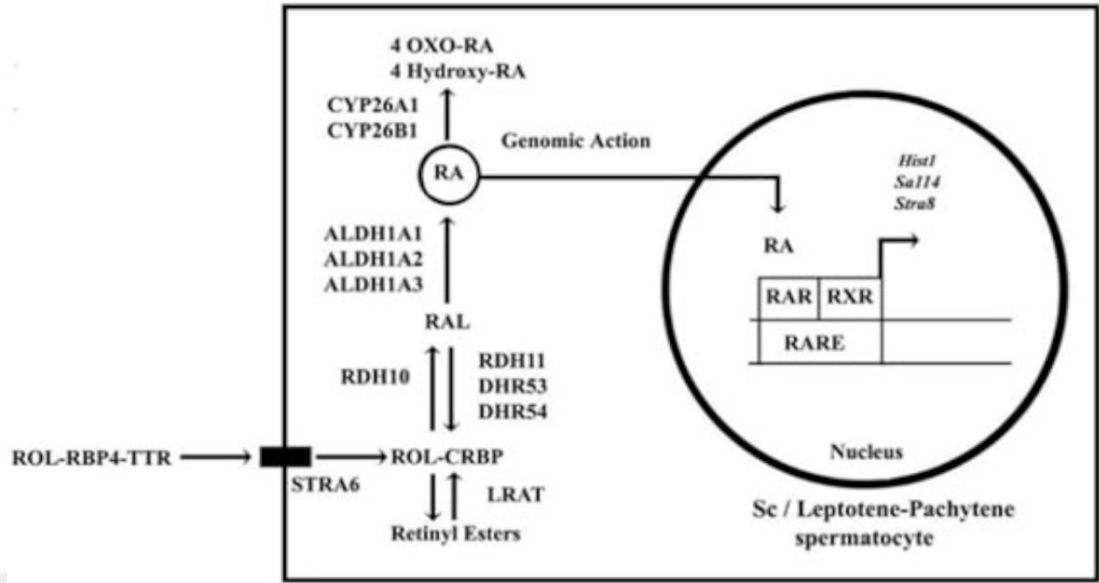
inhibe eden faktörler dahil olmak üzere binlerce genin ekspresyonunu artıran bir transkripsiyonel aktivatördür (Kojima ve ark., 2019). Erkek fetal testisinde germ hücrelerinde *Stra8* ifadesi yoktur (Şekil 1.6) (Menke ve ark., 2003). Bunun yerine, *Stra8* ilk olarak postnatal testislerin germ hücrelerinde çok daha sonra, farklılaşmaya gittiklerinde eksprese edilir (Oulad-Abdelghani ve ark., 1996; Zhou ve ark., 2008a; Zhou ve ark., 2008b). Fetal yumurtalıklarda all-*trans* RA, *Stra8* ekspresyonunu güçlü bir şekilde indükliyerek mayoz başlangıcını tetikler (Şekil 1.6) (Bowles ve ark., 2006; Koubova ve ark., 2006). Fetal overin somatik hücrelerinden ve mezonefrostan kaynaklanan RA muhtemelen mayoz başlangıcına katkıda bulunmaktadır (Şekil 1.6) (Bowles ve ark., 2006; Bowles ve ark., 2016). Mezonefros, iki RA sentezleyici enzimi (Şekil 1.6), *aldehit dehidrojenaz 1A2* (*Aldh1a2*) (Bowles ve ark., 2006) ve *Aldh1a3*'ü (Zhao ve ark., 2009) ifade eder. Fetal testislerde CYP26B1 RA'yı parçalayarak *Stra8*'in indüklenmesini ve mayozun başlamasını engeller (Şekil 1.6) (Bowles ve ark., 2006; Koubova ve ark., 2006). *Cyp26b1*, gelişmekte olan testis (seminifer) kordlarının somatik hücrelerinde eksprese edilir (Abu-Abed ve ark., 2002; Bowles ve ark., 2006; Koubova ve ark., 2006; Menke ve Page, 2002). *Cyp26b1*'in fare fetal testislerindeki ekspresyon seviyesi E13.5'e kadar korunur ve daha sonra kademeli olarak azalır (Suzuki ve Saga, 2008). *Cyp26b1*'in azalması, erkek germ hücrelerini bir miktar RA'ya maruz bırakabilir, ancak erkek germ hücreleri kısmen fetal testisteki mayoz başlangıcını önleyen *Nanos2* aracılığıyla doğrudan bir yanıttan kaçınmaktadır (Kato ve ark., 2016; Suzuki ve Saga, 2008; Suzuki ve ark., 2010). Germ hücre-spesifik RNA'ya bağlanan proteini kodlayan *Nanos2*'nin (Lehmann ve Nusslein-Volhard, 1991) ifadesi, E13.5'ten itibaren upregüle edilir (Suzuki ve Saga, 2008; Tsuda ve ark., 2003). *Nanos2* 'nin, kısmen *Dazl*'ı ve diğer *down-stream* hedeflerini destabilize ederek mayozu engellediği gösterilmiştir (Şekil 1.6) (Kato ve ark., 2016).

Memeli spermatogenezinde RA'nın anahtar faktör olduğu ilk kez 1925'te, A vitamini eksikliği (VAD) içeren bir diyetle beslenen kemirgenlerin infertil olduğunun bulunmasıyla anlaşılmıştır (Mason, 1933; Thompson ve ark., 1964; Wolbach ve Howe, 1925). VAD farelerinde ve sıçanlarda germ hücrelerinin çoğu farklılaşmamış spermatogonya olarak duraklamışlardır (Mitranond ve ark., 1979; Morales ve Griswold, 1987; Unni ve ark., 1983; van Pelt ve de Rooij, 1990a; van Pelt ve de Rooij,

1990b). VAD sıçan testislerinde bazı germ hücrelerinin mayozdan hemen önce preleptoten spermatositler olarak duraklamış olduğu saptanmıştır (Huang ve Hembree, 1979; van Pelt ve ark., 1990a; van Pelt ve ark., 1991). VAD hayvanlarına all-*trans* RA veya A vitamini enjekte edildiğinde, duraklayan spermatogonyanın farklılaşmaya (Morales ve Griswold, 1987; van Pelt ve de Rooij, 1990b; van Pelt ve de Rooij, 1991) başladıkları ve duraklayan preleptoten spermatositlerde ise mayozun başladığı gözlemlenmiştir (van Pelt ve de Rooij, 1991). Ayrıca, retinaldehit dehidrojenazları (ALDH1A1-3) inhibe eden ve böylece lokal RA üretimini önleyen WIN18446 (Amory ve ark., 2011; Hogarth ve ark., 2011) ile günlük olarak tedavi edilen farelerde, spermatogonyal farklılaşma ve mayoz girişin görülmediği rapor edilmiştir (Brooks ve Van der Horst, 2003; Endo ve ark., 2015; Hogarth ve ark., 2013). Bu nedenle erkeklerde, bu premeiotik geçişlerin her ikisinin de, spermatogonyal farklılaşma ve mayoz başlangıcının, RA gerektirdiği anlaşılmıştır. Postnatal fare testisinde STRA8 proteini spermatogonyumda P2'de (Snyder ve ark., 2010; Zhou ve ark., 2008a) spermatogonyal farklılaşma bulguları ilk ortaya çıktığında saptanmıştır (Drumond ve ark., 2011). Erişkin testisinde STRA8'in, A_{al} spermatogonyanın spermatogonyal farklılaşmasında ve mayozun başlangıcında preleptoten spermatositlerde eksprese edildiği saptanmıştır (Endo ve ark., 2015; Hogarth ve ark., 2015; Mark ve ark., 2015). Kültür deneyleri (Pellegrini ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2008b) farklılaşmamış spermatogonyumun RA ile tedavisinin, spermatogonyal farklılaşmanın belirteci olan *Kit* ve *Stra8* ekspresyonunu uyardığını göstermiştir (de Rooij ve ark., 1999; Schrans-Stassen ve ark., 1999; Yoshinaga ve ark., 1991). *In vivo* olarak, kısmen PLZF'nin (ZBTB16 olarak da bilinir) etkisine bağlı olarak farklılaşmamış spermatogonyada *Kit* ekspresyonu düşüktür. Germ hücrelerinde PLZF, *Kit* promotörüne bağlanıp ekspresyonunu baskılayarak (Filipponi ve ark., 2007) spermatogonyayı farklılaşmamış durumda tutar (Buaas ve ark., 2004; Costoya ve ark., 2004). Spermatogonya farklılaşmaya girerken RA, *Kit* promotöründen PLZF'yi ayıran hedef gen *Sall4*'ün ekspresyonunu indükler ve böylece *Kit* ekspresyonunu artırır (Şekil 1.7) (Gely-Pernot ve ark., 2015; Hobbs ve ark., 2012). RA'nın genom dışı yolla PI3K-AKT-mTOR sinyal akışını aktive ettiği ve *Kit* mRNA'sının translasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Busada ve ark., 2015). Bu nedenle RA, *Stra8*, *Sall4* ve *Kit* başta olmak üzere birkaç bağımsız yolu kullanarak spermatogonyal farklılaşmayı uyarabilir. Bu sırada RA, RAR'lar

üzerinden doğrudan germ hücreleriyle etkileşime girer. Farklılaşmamış spermatogonya birçok RAR eksprese eder (Gely-Pernot ve ark., 2012; Ikami ve ark., 2015) ve germ hücrelerinde hem RAR γ hem de RAR α 'nın aynı anda ablasyonu spermatogonyal farklılaşmayı bozar (Gely-Pernot ve ark., 2012). Sertoli hücrelerinde RAR α yoluyla RA sinyali hem spermatogonyal farklılaşmanın ilk turunda (Raverdeau ve ark., 2012) hem de pubertede Sertoli hücrelerinin farklılaşması (Nicholls ve ark., 2013) için kritik olduğundan, RA yanıtı RA'nın Sertoli hücreleri üzerindeki etkisiyle dolaylı olarak aktive edilebilir. RA aynı zamanda spermatid elongasyonunun ve spermiyasyonun başlamasında (postmayotik geçişler) da önemli bir rol oynar (Endo ve ark., 2017). Postnatal ve yetişkin testislerinde RA'yı parçalayan enzimler (*Cyp26a1*, *Cyp26b1* ve *Cyp26c1*) peritübüler miyoid hücreler tarafından eksprese edilir (Vernet ve ark., 2006). Peritübüler miyoid hücreler seminifer epitel dışında üretilen RA'nın izole halde tutulan germ hücrelerine ulaşmasında katabolik bir bariyer teşkil eder. Seminifer tübülde RA'yı, Sertoli hücreleri ve germ hücreleri (evre VII'den XII'ye kadar pakiten ve diploten spermatositler) üretir (Sugimoto ve ark., 2012; Vernet ve ark., 2006). Sertoli hücrelerinden üretilen RA, hem spermatogonyal farklılaşma hem de mayozun başlatılması için gereklidir (Endo ve ark., 2017). Pakiten spermatositlerin yetişkin testislerinde kimyasal veya genetik olarak deplesyonu, gerek yuvarlak spermatidlerin uzamasında gerekse spermiyasyonda gecikmelere neden olur, ancak spermatogonyal farklılaşma veya mayotik bölünmenin başlamasında gecikme yaratmaz (Endo ve ark., 2017).

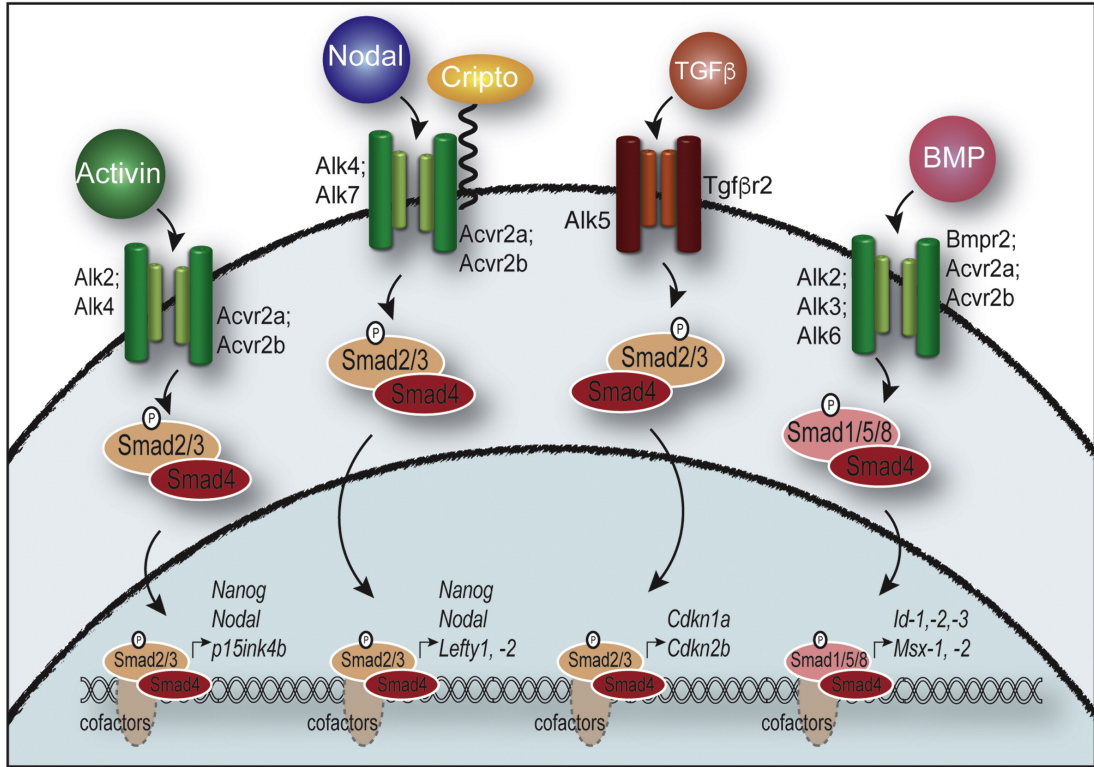
RA'nın Sertoli hücrelerinde retinoik asit reseptörü (RAR) sinyalini inhibe ederek kan-testis bariyeri oluşumundaki rolü daha önce gösterilmiştir (Hasegawa ve Saga, 2012). RAR'lar, genlerin promotör bölgelerinde retinoid X reseptörleri (RXR'ler) ile heterodimerize olmuş nükleer reseptörlerdir. RA etkileşimine bağlı olarak RAR/RXR'ler, transkripsiyonu düzenlemek için nükleer baskılayıcıları veya aktivatörleri ortama getirebilir (Ghyselinck ve Duester, 2019; Perissi ve Rosenfeld, 2005).



Şekil 1.7: Testiküler Sertoli ve/veya mayotik germ hücrelerde RA biyosentezi ve sinyalleşmesi. A vitamini veya retinol (ROL) karaciğerde sentezlenir ve retinol-bağlayıcı protein 4 (RBP4) ve transtiretin (TTR) yoluyla testislere iletilir. ROL, Sertoli hücreleri tarafından eksprese edilen *stimulated by retinoic acid 6* (STRA6) olarak adlandırılan membrana bağlı bir reseptör tarafından alınır. Sertoli hücrelerinde lesitin retinol asiltransferaz (LRAT), (hücrel retinol-bağlayıcı protein (CRBP) ile bağlı) ROL'i retinil esterlere dönüştürebilir veya ROL, NAD⁺ bağımlı retinol dehidrojenaz 10 (RDH10) tarafından RAL'e dönüştürülür. Tam ters adıma, yani RAL'in ROL'e dönüştürülmesine, NADPH-bağımlı retinal redüktazlar (RDH11, DHR53 ve DHR54) aracılık eder. Hem Sertoli hücrelerinde hem de mayotik germ hücrelerinde ikinci adım, yani RAL'in retinoik asite (RA) geri döndürülemez oksidasyonu, retinaldehit dehidrojenaz(lar) (ALDH1A1, ALDH1A2 ve ALDH1A3) tarafından katalize edilir. RA, CYP26A1 veya CYP26B1 enzimleri tarafından parçalanır ve 4-hidroksi RA/4-okso-RA'ya daha da oksidize edilir. RA sinyali, iki nükleer hormon reseptörü ailesini, yani retinoik asit reseptörlerini (RAR'lar) ve retinoid X reseptörlerini (RXR'ler) içerir. Hedef hücrelerde, RA ile aktive olan RAR-RXR heterodimerleri, RA'ya yanıt veren genlerin (Stra8, Hist1, Sall4, vb.) cis-etkili düzenleyici dizilerinde bulunan *retinoic acid response elements*'lere (RARE) bağlanır ve bunların transkripsiyonlarını indükler/modüle eder. Figür, Bhattacharya ve ark., (2022) derlemesine aittir.

Dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) ligand ailesi; TGF- β 'ler, Aktivinler, NODAL, BMP'ler ve GDF'lerden oluşmaktadır. Cripto varlığında Nodal'ın tip II reseptör ACVR2A/B'ya bağlanması, ACVR2A/B'nın ACVR1B/C ile dimerize olmasına yol açar (Şekil 1.8). ACVR2A/ACVR2B tarafından aktive (fosforile) edilmiş tip I reseptör ACVR1B/C, SMAD2 ve SMAD3 transkripsiyon faktörlerinin karboksicucundaki Ser-Ser-X-Ser motiflerini fosforile eder. Bunun sonucunda da üçlü bir kompleks oluşturmak üzere SMAD2/3 ve SMAD4 ile birleşerek çekirdeğe taşıyıp ko-aktivatörler ve ko-repressörlerin de katılımıyla genomik transkripsiyonu düzenler. Böylece de Nodal sinyalleşmesi, NANOG, LEFTY1/2 (Nodal'ın endojen inhibitörü), GDF3 ve NANOG'un gen transkripsiyonunu aktive eder (Greber ve ark., 2008; Harpelunde ve ark., 2019; Hayes ve ark., 2021; Kramer, 2016; Li ve ark., 2017). TGF-

β uyarımı sonucu TGFBR2, TGFBR1'i aktive (fosforile) eder, aktive olmuş TGFBR1 de daha sonra SMAD2 ve SMAD3'ü fosforile eder. SMAD4'ün de çağrılıp kompleksin çekirdeğe transloke olması sonucu TGF- β hedef genlerinin transkripsiyonu düzenlenir (Vander ve ark., 2018). XY fetal germ hücrelerinde Nodal sinyalleşmedeki bir azalmanın, pluripotensi ile ilişkili belirteçler *Oct4*, *Sox2* ve özellikle *Nanog*'un azalan ekspresyon seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Spiller ve ark., 2012). Spiller ve ark. (2012), XY germ hücrelerinde, pluripotensi süresinin uzatılması ve farklılaşmanın başlamasının geciktirilmesinin Nodal sinyalleşmesi ile gerçekleştiğini göstermiştir. Diğer çalışmalar ALK4 (*Acvr1b*)/5 (*Tgfr1*) ve -7 (*Acvr1c*) reseptörlerinin aktivitesinin inhibisyonuyla (önerilen 10 μ M'lik dozda SB431542 kullanılarak) *Nanog* ekspresyonunun azaldığını göstermiştir (Miles ve ark., 2013). Üçüncü bir çalışma, yüksek Nodal sinyalleşmesiyle pluripotensi marker ekspresyonunun sürdürülmesi ve ayrıca fonksiyonel pluripotensi (*in vitro* EGH kolonilerine eğilim) arasında bir ilişki olduğunu belgeledi (Tian-Zhong ve ark., 2016).



Şekil 1.8: TGFβ sinyalleşme yolağı bileşenleri. Her bir TGFβ morfojeni (Aktivin, Nodal, TGFβ ve BMP), Tip I ve Tip II reseptör kinazlarının farklı kombinasyonları aracılığıyla sinyalleşir. Tip I reseptörler, Alk2, -3, -4, -5, -6 ve -7'yi içerir. Tip II reseptörleri Acvr2a, Acvr2b, Tgfr2 ve Bmpr2'yi içerir. Aktive edilmiş reseptör kompleksleri daha sonra ortak aracı SMAD4 ile etkileşime giren spesifik hücre içi SMAD efektör proteinlerini (SMAD1, -2, -3, -5 ve -8) fosforile eder. SMAD kompleksi gen

transkripsiyonunu doğrudan düzenlemek için ko-aktivatörler ve ko-bastırcılarla birlikte hareket ettiği çekirdeğe transloke olur. Figür, Spiller ve ark., (2017) derlemesinden alınmıştır.

Gelişme sürecindeki testislerde endojen RA'nın parçalanması, somatik hücreler tarafından eksprese edilen Cyp26b1 tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle de testiküler germ hücreleri *Stra8* eksprese etmez ve mayoz bölünmeye girmezler. Nodal için gerekli Cripto ko-reseptörünün ekspresyonu, Sertoli hücreleri tarafından üretilen FGF9 ile uyarılır. FGF9'un germ hücreleri üzerine doğrudan etkisi vardır. Germ hücre yüzeyinde bulunan Cripto sayesinde, germ hücrelerini geri besleyen Nodal otomatik upregüle olarak, özellikle Nanog olmak üzere pluripotensi belirteçlerinin ekspresyonu sürdürülebilir. 12.5 dpc'den itibaren düşük konsantrasyonlarda FGF9, doğrudan germ hücreleri üzerine etki ederek erkek gelişimi yönünde belirteçleri, Nanos2, Dnmt3l ve P15'in ekspresyonunu indükler. Aktivinler ve/veya TGFβ'ler, erkek yönü belirteçlerinin ifadesini uyarmak, mitotik tutuklamayı indüklemek ve suskun durumu sürdürmek için doğrudan germ hücrelerine etki edebilir (Spiller ve ark., 2017).

12.5 dpc'de, germ hücrelerinin yüzeyinde Cripto'nun yanı sıra Nodal/Aktivin reseptörleri de bulunur. Germ hücreleri Nodal'ı, somatik hücreler de Aktivin'i üretirler. Hem Nodal hem de Aktivin proteinleri bol miktarda bulunur, ancak Cripto'nun varlığı nedeniyle, Smad2/3 aktivasyonu aracılığıyla germ hücresine özgü sinyalleşme muhtemelen zayıf olacaktır (Cripto'nun Tip I ve Tip II reseptörlerle kompleks oluşturduğunda, Aktivin sinyalinin gücü yaklaşık %50 oranında azalır (Gray ve Vale, 2012; Kelber ve ark., 2008)) ve sonuç olarak, yalnızca düşük seviyelerde SMAD2/3 sinyaline yanıt veren genler aktive olur (Gray ve Vale, 2012; Kelber ve ark., 2008). Bu derece düşük bir sinyalleşme pluripotensinin korunmasıyla ilişkilendirilmektedir. 13.5 dpc'de Nodal ve Cripto seviyeleri azalmaya başlar ve 14.5 dpc'de germ hücresi yüzeyinde çok az Cripto proteini mevcuttur; sonuç olarak Aktivinlerin sinyal kapasitesi, Nodal/Aktivin reseptör kompleksleri sayesinde güçlenir. Bu sinyalleşme özelliği, mitotik duraklamanın tetiklenmesi ve erkek yönü belirteçlerinin ifadesi ile ilişkili olabilir. Germ hücrelerinin doğrudan TGFβ sinyaline duyarlı hale gelmesi en az 15.5 dpc'ye kadar gerçekleşmez (Spiller ve ark., 2017).

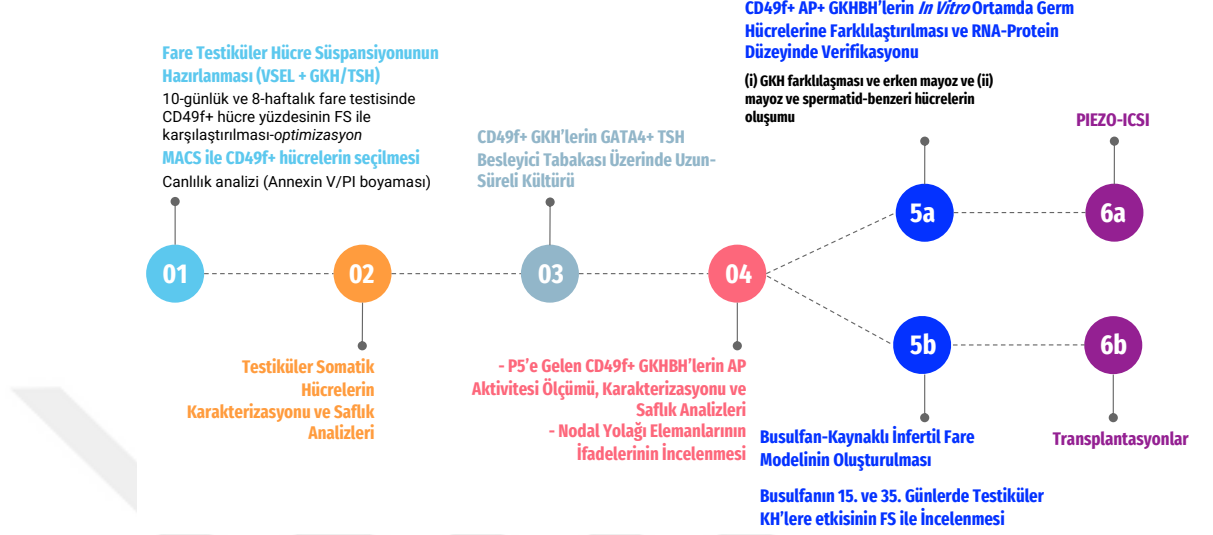
Fetal testis kültüründe ALK4, -5 ve -7 inhibitörü SB431542 (20 μ M) kullanılarak TGF β sinyal yolağının farmakolojik inhibisyonu (TGF β , Aktivin ve Nodal fonksiyonlarını bloke ederek), *ex vivo* kültürlerde mayoz belirteçlerinin (γ -H2AX ve Sycp3) ekspresyonunu tetiklemiştir (Souquet ve ark., 2012). Benzer bir çalışmada, fetal testis kültüründe SB431542 (40 μ M) ile TGF β sinyali inhibe edildiğinde mayoz belirteçlerinin (*Stra8*, *Rec8* ve *Dmcl*) upregüle olduğu gösterilmiştir (Wu ve ark., 2013). XX gonadları *ex vivo* olarak rekombinant Nodal ile tedavi edildiğinde, *Stra8* ekspresyonu normal seviyesinin yaklaşık 2/3'üne düşürülmesine rağmen, bu etkiyi elde etmek için çok yüksek konsantrasyonlarda Nodal gerekli olmuştur (5 μ g/ml). XX germ hücreleri, Cripito'yu kayda değer seviyelerde ifade etmediğinden, bu yaklaşımın muhtemelen her durumda ideal olmadığı düşünülmüştür (Souquet ve ark., 2012; Spiller ve ark., 2012). İki çalışma, SB431542'nin varlığında *ex vivo* fetal testis kültürünün, erkek germ hücre yönü belirteçleri *Nanos2* (mayozu baskılar) ve *Dnmt3l*'nin ekspresyonunda azalmaya yol açtığını bildirmiştir; bu da araştırmacıların Nodal sinyalleşmesinin germ hücrelerinin erkek tipi farklılaşmasını teşvik ettiği sonucuna varmalarını sağlamıştır (Souquet ve ark., 2012; Wu ve ark., 2013). Daha düşük bir dozda olsa da SB431542'nin kullanıldığı üçüncü bir çalışmada, başka bir erkek yönü belirteci olan MILI'nin ekspresyonunun, immünofloresan analizi ile değerlendirildiğinde görünüşte gecikmiş veya azalmış olduğunun saptanmasına rağmen, *Dnmt3l* ekspresyonunda herhangi bir değişiklik bulunamamıştır (Miles ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, 10-14 günlük fare testislerinden elde edilen SKH/GKH'lerin (i) köklülük ve canlılığını koruyarak *in vitro* uzun-sürelili kültüre edilmesiyle sayılarının artırılması ve (ii) germ hücre yönünde diferansiyasyonu için etkin *in vitro* kültür koşullarının oluşturulmasıyla mayozu tamamlamış fonksiyonel gamet hücresi elde edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmada, aralarında VSEL hücrelerinin de bulunduğu total testiküler kök hücreler arasından zenginleştirilen CD49f+ GKH'lerin testiküler somatik hücre (TSH) besleyici tabakası üzerinde GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF, mLIF büyüme faktörleriyle uzun-sürelili *in vitro* kültürünü takiben elde edilen GKHBH kolonilerinde *in vitro* olarak mayozu indüklemek ve ardından olgun spermatozoa elde etmede *Acvr1b/Tgfb1* ve *Acvr1c* reseptörlerinin aktivitesini

inhibe eden SB431542 ve sonrasında RA'in etkisi araştırılmıştır. Burada hipotezimiz, GKHBH farklılaşmasının ve erken mayozun indüklenmesinde SB431542'nin ve mayozun geç evrelerine geçiş ve spermatid-benzeri hücre oluşumunda ise RA'in etkili olacağı yönündedir. Ayrıca, ICSI işlemi sonrası *in vitro* ortamda farklılaşan sperm hücrelerinin oositleri aktive edebilme ve embriyoların kültüre edildiğinde blastokist aşamasına kadar gelişebilme potansiyelleri test edilerek, elde edilen post-mayotik hücrelerin işlevselliği incelenmiştir. Son olarak, sağlıklı niş hücreleri temin edildiğinde kemoablate olmuş testislerde *in vitro* ortamda ürettiğimiz GKHBH kolonilerinin *in vivo* işlevselliği ve endojen spermatogenez üzerindeki restorasyon etkisi test edilmiştir.



2. GEREÇ ve YÖNTEM



Şekil 2.1: Çalışmada izlenen yöntem basamaklarının genel gösterimi.

2.1. Fare Testislerinden Hücre Süspansiyonunun Hazırlanması

Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 2020-13-122 karar no.'su, 2021-13-108 karar no.'su ve 2023-6-42 karar no.'su ile onay alınan çalışma kapsamında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarından temin edilen 10-14 günlük erkek BALB/c farelere servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi uygulandı. Steril prosedürler kullanılarak ince uçlu forsepslerle çıkarılan testisler %1 Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B (P/S/A) (03-033-1B, Bioind, İsrail) içeren soğuk DMEM/F12 içerisinde buz üzerinde laboratuvara getirildi. Testisler yine buz üzerinde %1 P/S/A içeren soğuk 1X PBS bulunan 60-mm Petri kaplarında yıkanıp dekapsüle edildikten sonra seminifer tübüller 35-mm Petri kabına alınıp %1 P/S/A içeren soğuk DMEM/F12 içerisinde ince uçlu bir makas kullanılarak mekanik olarak parçalandı ve tübül fragmanları 1 ml/fare %1 P/S/A içeren soğuk 1X PBS içerisinde 60 x g, 10 dk, +4°C'de santrifüj edilerek yıkandı (Martin ve Seandel, 2013). Pelletin oda sıcaklığına getirilmiş 0.7 ml/fare kollajenaz IV solüsyonu (1 mg/ml kollajenaz IV (C5138, Sigma, Almanya) ve %1 P/S (03-031-1B, Bioind, İsrail) ile tamamlanmış DMEM/F12 (L0092, Biowest, Fransa)) içerisinde çözündürülüp fragmanların 5 dk

37°C’de inkübasyonunun ardından solüsyonun içerisinde daha küçük parçalara ayrılincaya kadar fragmanlara şiddetli pipetaj yapıp 15 dk daha 37°C’de inkübe edildi (Kim ve ark., 2021). 60 x g’de 10 dk santrifüj edilerek çöktürülen ayrışmamış parçalara oda sıcaklığına getirilmiş 0.3 ml/fare tripsin solüsyonu (1X %0.25 Tripsin/EDTA (X0930, Biowest, Fransa) ve %1 P/S ile tamamlanmış 1X PBS) içerisinde nazıkçe pipetaj yapılırken oda sıcaklığına getirilmiş 500 µl 7 mg/ml DNaz I (DN25, Sigma, Almanya) içeren 1X PBS parçalar kaybolana dek hücre süspansiyonuna damla damla eklenerek ölü hücrelerden kaynaklanan genomik DNA parçalandı (Goodyear ve Brinster, 2017). Tekli hücreleri içeren süpernatana ise 0.3 ml/fare %40 FBS (S181H, Biowest, Fransa) ve %1 P/S ile tamamlanmış yüksek glikozlu soğuk DMEM’in (11995065, Gibco, ABD) eklenmesiyle kollajenaz inaktive edildi ve geçici bir süre için buz üzerine alındı (Martin ve Seandel, 2013). Agregasyonunun ve hücre yüzeyi proteininin proteolitik parçalanmasının önüne geçmek için tripsin solüsyonu ile muamelesi kısa tutulan hücrelerin 3 dk 37°C’de inkübasyonunun ardından solüsyonun içerisinde pipetaj yapılarak hücreler tripsin solüsyonu ile toplamda 5 dk 37°C’de inkübe edildi. Tripsini inaktive etmek için final hacmi %10 olacak şekilde FBS eklendikten sonra buz üzerinde bekletilen önceki hücre süspansiyonuyla birleştirilip 300 x g’de 5 dk santrifüjünü takiben VSEL’leri içeren süpernatant, 1000 x g’de 10 dk daha santrifüj edilirken çoğunlukla GKH-TSH’lerden oluşan pellet ise 5 ml %5 FBS, %1 NEAA (X0557, Biowest, Fransa) ve %1 P/S’in tamamlanmasıyla hazırlanan DMEM/F12’li TSH kültür besiyeri içerisinde çözündürüldü (Ghasemzadeh-Hasankolaei ve ark., 2014; Kubota ve Brinster, 2008; Sato ve ark., 2013).

GKH-TSH’ler %0.2 jelatin (G1890, Sigma, ABD) kaplı T25 hücre kültürü şişelerine yaklaşık $4-5 \times 10^4$ hücre/cm² yoğunlukta ekildi ve MACS’ta kullanılmak üzere 30 dk inkübatöre kaldırıldı (37°C, %5 CO₂). TSH’lere 7 günün sonunda yapılacak ilk pasajdan sonra haftada iki gün besiyeri değişimi yapıldı. TSH’ler, karakterizasyonları, besleyici hücre tabakası olarak ve transplantasyon deneylerinde kullanılmaları için yeterli sayıya ulaştıkları en fazla pasaj 4’e (P4) kadar kültüre edilip P1-P4 arasındaki tüm pasajlarda %10 DMSO (D8418, Sigma, Almanya)/%90 FBS içerisinde dondurularak stok alındı ve alınan stoklar bir gece -80°C’de bekletildikten sonra sıvı nitrojene kaldırıldı.

VSEL fraksiyonu ise 5 ml %20 FBS, 10 µmol/l 2-merkaptoetanol (21985023, Gibco, ABD), 4 ng/ml GDNF (16187S, Cell Signaling Technology Inc., ABD), %1 NEAA ve %1 P/S ile tamamlanmış, yüksek glikozlu DMEM'den oluşan GKH kültür besi yeri I içerisinde çözdürüldükten sonra inkübatöre kaldırılan hücrelerin diferansiyel hücre adezyon seçimi süresi (30 dk) bittikten sonra hiç beklenmeden MACS'a sokuldu (Lim ve ark., 2010; Lim ve ark., 2013).

2.2. 10-günlük ve 8-haftalık Fare Testisinde CD49f+ Hücre Yüzdesinin Flow Sitometri ile Karşılaştırılması

GKH'lerin izole edileceği farelerin yaşına karar vermek için yöntem 2.1'deki testiküler hücre süspansiyonu elde etmedeki protokol eş zamanlı olarak 8-haftalık farelere de uygulandı ve elde edilen 4×10^5 testiküler hücre %3 BSA/%0.05 NaNO₃ (30175.01, Serva, Almanya)/1X PBS'ten oluşan soğuk FACS boyama tamponu (Ek 1.1) içerisinde çözdürülüp her bir flow tüpünde 1×10^5 hücre/100 µl hücre süspansiyonu olacak şekilde dağıtıldı. PE rat anti-mouse CD49f antikoru (1:20) (313612, Biolegend, ABD) ile +4°C'de 45 dk inkübe edildikten sonra üzerlerine 1'er ml soğuk 1X PBS eklenerek 1000 x g'de 7 dk santrifüj edilerek yıkanan hücreler 100 µl soğuk 1X PBS ile çözülerek ACEA NovoCyte flow sitometri (Agilent, ABD) ile analiz edildi. Boyanmamış örnek kapıların ayarlanması için kullanıldı.

2.3. MACS ile CD49f+ Hücrelerin Seçimi

Testiküler dokunun parçalanmasıyla elde edilen heterojen hücre süspansiyonundaki GKH'lerin zenginleştirilmesi için, yöntem 2.1'de %0.2 jelatin kaplı T25 hücre kültürü şişelerine ekilip 30 dk 37°C'de inkübe edilen GKH-TSH'lerine pipetaj yapılarak üzerlerinden toplanmış GKH'ler, VSEL hücre süspansiyonuyla birleştirilip içlerinden 1×10^5 testiküler hücre 1000 x g'de 7 dk çöktürüldükten sonra 100 µl PBS içerisinde boyanmamış (*unstained*) örnek olarak flow sitometri ile MACS'tan sonraki saflık analizi için ayrılıp analize kadar +4°C'de

saklandı. Her 100×10^6 hücre, 1% FBS, 10 mM HEPES, 1 mg/ml D-(+)-glukoz (G8769, Sigma, Almanya), 1 mM pirüvat (P4562, Sigma, ABD), 50 U/ml-50 µg/ml P/S'ten oluşan 200 µl PBS-S (Ek2.1) içerisinde çözündürüldü (Kubota ve Brinster, 2008). 100 µl PE rat anti-mouse CD49f antikoru (313612, Biolegend, ABD) eklenip nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra hücreler, +4°C'de 30 dk ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 1×10^5 hücre yine flow sitometri için ayrıldı ve 500 µl soğuk PBS içerisinde $1000 \times g$ 'de 7 dakika santrifüj edilerek yıkandıktan sonra pellet 100 µl PBS ile çözündürülüp boyalı ancak ayırım yapılmamış (*pre-sorted*) örnek olarak hücreler analize kadar +4°C'de saklandı. Yıkama için, 1.5 ml soğuk PBS-S eklenen geri kalan hücre süspansiyonu $1000 \times g$ 'de 7 dk santrifüj edildi. Pellet, 40 µl soğuk PBS-S içerisinde çözündürüldükten sonra hücreler, 45 µl Anti-PE Microbeads (130-105-639, Miltenyi Biotec., Almanya) ile +4°C'de 20 dk ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. İkinci bir yıkamadan sonra 600 µl soğuk PBS-S içerisinde hücreler autoMACS® Pro Separator (Miltenyi Biotec.) cihazına konuldu ve POSSEL programı başlatılarak CD49f ifade eden hücrelerin pozitif seçilimi yapıldı. Pozitif ve negatif olarak seçilmiş hücre fraksiyonlarının her birinden sırasıyla, 1×10^5 hücre flow sitometri için ve $1-5 \times 10^6$ hücre RNA izolasyonu için ayrıldı. Ayırım yapılan hücrelerin saflığı ACEA NovoCyte flow sitometri (Agilent, ABD) ile ölçüldü. Bunun için unstained, pre-sort ve ayırım sonrası elde edilen pozitif (CD49f+) ve negatif (CD49f- veya "*pre-sorted*") fraksiyondan ayrılan 1×10^5 hücre sırasıyla flow sitometriye okutuldu ve boyalı olmayan örnek üzerinden kapı alınarak pozitif hücrelerin saflığı tayin edildi.

2.4. Annexin V/Propidium İyodür Boyaması ile Apoptotik ve Nekrotik Hücrelerin Saptanması

Annexin V/Propidium İyodür (PI) boyaması FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI (640914, Biolegend, ABD) kullanılarak üretici firmanın protokolünde küçük değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi. Kısaca; 400 µl Annexin V binding buffer içerisinde çözündürülen 4×10^5 CD49f+ GKH, sadece FITC Annexin V, sadece PI, FITC Annexin V + PI eklenecek ve boyanmamış örnek olarak dört ayrı 1.5-ml eppendorfa 100 µl'şer alikotlandı. 5 µl FITC Annexin V ve 1 µl PI ilgili

eppendorflara eklendi. Nazikçe vorteks yapılan hücreler oda sıcaklığında 15 dk karanlıkta inkübe edildi. Üzerlerine 100 µl Annexin V binding buffer eklenen tüpler flow sitometri ile boyanmamış ve tekli boyanmış örnekler üzerinden kapı alınarak analiz edildi.

2.5. Testiküler Somatik Hücrelerin RNA ve Protein Düzeyinde Karakterizasyonu ve Saflık Analizleri

2.5.1. Yarı Kantitatif PZR

P4 TSH'lerde *Vim* ve *Wt1* (Sertoli hücresi), *Ddx4* (germ hücresi), *Hsd17b3* (Leydig hücresi), *Acta2* (peritübüler hücre) belirteçlerinin RNA düzeyinde ifadesi olup olmadığının bakılması için hücrelerden total RNA izolasyonu PureZOL™ RNA Isolation Reagent (7326880, Bio-Rad, ABD) kullanılarak yapıldı. RNA'lar, nükleaz içermeyen su içerisinde çözündürülüp yoğunlukları ve OD260 ile OD280 değerleri Epoch mikropilaka spektrofotometresiyle ölçüldü. RNA degradasyonu/DNA kontaminasyonu RNA denatüre edici jelde jel elektroforeziyle kontrol edildi. cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kit (1708891, Bio-Rad, ABD) ile yapıldı. cDNA'lardan One Taq Quick Load 2X Master Mix (M0486S, New England Biolabs, ABD) kullanılarak PZR reaksiyonu kuruldu. *Gapdh* referans gen olarak kullanıldı. Kullanılan primerler çizelge 2.1'de listelenmiştir. Örneklerle birlikte 100 bp DNA ladder'ı (N3231L, New England Biolabs, ABD) 1X TAE tampon ve etidyum bromür (30 ng/ml) ile hazırlanan %1'lik agaroz jele yüklendi. Örneklerle 100 V'ta 20-25 dk elektroforezde yürütme işlemi yapıp jel Chemidoc MP (Biorad, ABD) ile görüntülendi.

Çizelge 2.1: PZR ve qPZR primerleri, optimize edilen bağlanma sıcaklıkları ve beklenen ürün boyutları.

Gen Adı	Primer Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı	Ürün Uzunluğu
Wt1	FP: TTTATACCAAATGACCTCCCAG RP: CCTTCTGTCCATTTCACTGAG	62 °C	114 bp
Acta2	FP: ATCAGGGAGTAATGGTTGGA RP: GGATACTTCAGCGTCAGG	55 °C	91 bp
Ddx4	FP: TTGCACATTATCAGACAGG	57 °C	216 bp

	RP: AGCCATCAAATCTCGTCC		
Hsd17b3	FP: GCCGATGAGTTTGTAAAGAATCC RP: ATGTTGCGTTTGAGGTAATCTGAG	60 °C	179 bp
Vim	FP: TTTCCAAGCCTGACCTCACTG RP: TTCTCTTCCATCTCACGCATCTG	62 °C	271 bp
Gapdh	FP: GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA RP: CCCTCCACGATGCCAAAGT	60 °C	119 bp
Ki67	FP: AATCCAACCTCAAGTAAACGGGG RP: TTGGCTTGCTTCCATCCTCA	60 °C	127 bp
Gfra1	FP: AACTGCCAGCCAGAGTCAAG RP: TTCAGGCAATCTTCCAGGTC	62 °C	185 bp
Oct4	FP: CGGAAGAGAAAGCGAACTAGC RP: ATTGGCGATGTGAGTGATCTG	60 °C	108 bp
Oct4a	FP: CTGGGTTGATCCTCGGACCT RP: GCCGCAGCTTACACATGTTC	62 °C	503 bp
Ly6a	FP: CCATTTGAGACTTCTTGCCCA RP: ACGTTGACCTTAGTACCCAG	57 °C	176 bp
Stra8	FP: CAACCAACCCAGTGATGAT RP: CTATTCAGTACCTGCCACTTT	60 °C	189 bp
Sycp3	FP: CTTCTTTCAAAGCCAGTAACCAG RP: ATTTCTGTATATCCAGTCCAC	62 °C	135 bp
Prm2	FP: CCTCAATCCAGAACCCTCCT RP: TGTGTCCTCCCATAGTCCTC	62 °C	164 bp
Acr	FP: TGCCCACTGCTTCGATAAC RP: GTCATTTCCCTCCGTCCTAC	62 °C	169 bp
Sox2	FP: GCGGAGTGGAACTTTTGTCCT RP: GGGAAGCGTGTACTTATCCTTCT	60 °C	156 bp
Nanog	FP: CACAGTTGCTTAGTTCTGAGG RP: GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA	60 °C	87 bp
Nodal	FP: ATTTGCCAGACAGAAGCCAAC RP: TCCTCCACAATCATGTCCTTG	60 °C	313 bp
Cripto	FP: CACCTGGCTGCCCAAGAAGTGTTCC RP: GCCAGCTAGCATAAAAGTGGT	65 °C	172 bp
Acvr2b	FP: CTCGGGAGTGCATCTACTAC RP: ACACTCCTGCCTGTCGTA	62 °C	194 bp
Acvr1b	FP: TTACAAGAGATTATCGGCAAGGG RP: GTCCAGGTGCCATTATCTTTATTG	62 °C	203 bp
Tgfr1	FP: TTGATATTGCTCCAAACCACAG RP: ATTTCCAGAACACTAAGCCC	62 °C	139 bp
Lefty2	FP: GTGGCTTTGCTGGGCACTCT RP: CCTCACGTGGGTAGGGATGG	65 °C	194 bp

2.5.2. Flow Sitometri

P4 TSH'ler önceden ısıtılmış 2X %0.25 Tripsin/EDTA ile kaldırıldıktan sonra 300 x g'de 5 dk santrifüj edilerek pellet haline getirilip 500 µl %0.1 PFA/1X PBS içerisinde 37°C'de 10 dk fikse edildi. Üzerlerine 1 ml PBS eklenerek 500 x g'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandıktan sonra hücreler 200 µl soğuk %90 metanol içerisinde +4°C'de 20 dk permeabilize edildi. 1000 x g'de 5 dk çöktürülerek pellet haline getirilmelerinin ardından üzerlerine 1 ml %0.1 Triton X-100 (A4025, Biomatik, Kanada)/%2 FBS/1X PBS eklenip 1000 x g'de 5 dk daha santrifüj edilerek metanol

uzaklaştırıldı ve ardından %0.1 Triton X-100/%2 FBS/1X PBS içerisinde AF488 mouse anti-mouse GATA-4 antikoru (0.5 µg) (sc-25310, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD) ile oda sıcaklığında 30 dk karanlıkta inkübe edildi. Üzerlerine 500 µl %0.5 Triton X-100/%2 FBS/1X PBS eklenip 1500 x g'de 5 dk santrifüjün ardından pellet 100 µl %0.1 Triton X-100/%2 FBS/1X PBS içerisinde çözündürülüp AF488 floresanına göre boyalı olmayan örneğe göre kapı alınarak ACEA NovoCyte flow sitometri (Agilent, ABD) ile analizleri yapıldı (Rodin ve ark., 2014).

2.5.3. İkili İmmünohistokimyasal Boyama

%0.2 jelatin kaplı steril lameller konulmuş 6-kuyucuklu hücre kültürü plakasına ekilen 0.75×10^5 hücre/kuyucuk TSH'ler üzerindeki besi yeri çekilip iki kere PBS ile yıkandı. Soğuk metanol eklenen hücreler -20°C'de 10 dk fikse edilip bir kere hızlı ve iki kere 5'er dk %0.1 Triton X-100/1X PBS ile yıkanarak permeabilize edildi ve bir kere 1X PBS yıkamasının ardından %2 BSA (A4503, Sigma, Almanya)/%0.1 Tween-20/1X PBS içerisinde 1 saat bloklama işlemi yapıldı. %0.2 BSA/%0.1 Tween-20/1X PBS içerisinde rabbit anti-mouse INSL3 antikoru (1:100) (NBP3-04435, Novus Biologicals, ABD) ile gece boyu inkübe edildi. İki kere %0.1 Tween-20/ PBS ile 5'er dk yıkama sonrasında %0.2 BSA/%0.1 Tween-20/1X PBS içerisinde mouse anti-rabbit IgG-CFL 594 (1:250) (sc-516250, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD) antikoru ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İki kere yıkamanın ardından %0.2 BSA/%0.1 Tween-20 (P1379, Sigma, ABD)/1X PBS içerisinde AF488 mouse anti-mouse GATA-4 antikoru (1:50) ile 4.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. İki kere yıkama sonrasında lameller DAPI'li *mounting* medya (H-1200-NB, Novus Biologicals, ABD) ile kapatılıp preparatlar oda sıcaklığında karanlıkta kurutulduktan sonra Carl Zeiss LSM 880 konfokal mikroskopunda resimleri çekildi.

2.6. CD49f+ GKH'lerin GATA4+ TSH'ler ile Ko-kültürü

GKH kültürlerinin başlatılması ve sürdürülmesi için kullanılan protokol, temel olarak Kanatsu-Shinohara ve Kubota grupları tarafından küçük değişikliklerle geliştirilen yöntemleri takip etmiştir (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Kubota ve ark., 2004b). Kısaca; flow sitometri ile saflığı tayin edilen CD49f+ hücreler 1000 x g'de 7 dk çöktürüldükten sonra 6 mg/ml D-(+)-glukoz, 2 mM L-glutamin (X0550, Biowest, Fransa), 1X İnsülin-Transferrin-Selenyum (ITS-G) (41400045, Gibco, ABD), 1X MEM Non Essential Amino Acids (X0550, Biowest, Fransa), 1X MEM Vitamin Solution (11120052, Gibco, Almanya), %1 P/S, 30 ug/ml sodyum pirüvat, 60 µM putresin dihidroklorid (P7505, Sigma, Almanya), 1µl/ml sodyum DL-laktat (L4263, Sigma, ABD), 60 ng/ml progesteron (P8783, Sigma, Almanya), 30 ng/ml beta-östradiol (E2758, Sigma, ABD), 10⁻⁴ M L-askorbik asit (A4544, Sigma, ABD), 10 µg/ml d-Biotin (B4501, Sigma, ABD), %0.2 BSA (ALB001.100, BioShop, Kanada), 1X StemPro-34 Suplemeni ve %2 KnockOut™ Serum Replasmanı (KSR; 10828028, Gibco, ABD), 0.05 mM β-merkaptotanol (21985023, Gibco, ABD), 10 ng/ml GDNF, 20 ng/ml EGF (AF-100-15, PeproTech, ABD), 10 ng/ml bFGF (100-18B, PeproTech, ABD), 10 ng/ml IGF2 (792-MG, R&D Systems, ABD), 100 ng/ml SCF (455-MC, R&D Systems, ABD) ve 10³ U/ml mLIF (ESG1107, Sigma, ABD) ile tamamlanmış StemPro™-34 SFM (1X)'dan (10639-011, Gibco, ABD) oluşan GKH kültür besiyeri II içerisinde 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarının 1% oranında yüksek glikozlu DMEM besiyeri ile seyreltilmiş Matrigel® Basement Membrane Matrix (356234, Corning, ABD) kaplanmış her bir kuyucuğuna 7.5 x 10⁵ - 1 x 10⁶ hücre olarak ekildi. 7-10 gün sonra GKH'ler üzüm salkımı halinde koloniler oluşturmaya başladıktan ve tabana oturmuş somatik hücrelere gevşek bir şekilde yapıştıktan sonra kuyucuk başına 1 ml 0.5 mM EDTA (15575020, Invitrogen, ABD) ile hücreler oda sıcaklığında 7 dk inkübe edildiler. EDTA yavaşça uzaklaştırıldıktan sonra GKH kültür besiyeri II, hızla hücrelerin üzerine iki kez art arda fişkırtılıp santrifüj edilmeksizin yalnızca üstten toplanan hücreler 1:10 oranında yoğunlaştırılarak Mitomisin C (MMC; M4287, Sigma, Almanya) ile muamele edilmiş %1 Matrigel® kaplı 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekili GATA4+ hücreler üzerine ekildi (Örn., 30 kuyucuk üzerinden toplanan hücreler 3 kuyuya ekilmiştir). Bahsi geçen ko-kültür için; %1 Matrigel®

kaplanmış 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarına daha önce karakterize edilmiş P4 GATA4+ TSH'leri TSH kültür besiyeri içerisinde 3×10^5 hücre/kuyucuk yoğunlukta ekildi, doluluğa ulaşmalarına yakın çoğalmalarını durdurmak için 10 µg/ml MMC ile 37° C'de 3 saat inkübe edildi. MMC'nin 4 kez 1X PBS ile yıkanarak hücrelerden uzaklaştırıldı. Sınırları belirgin olmayan farklılaşmamış kolonilerin farklılaşmaya gidenlere göre sayıca azlığı gözlemlendiğinde ise bir mikromanipülatör yardımıyla stereomikroskop altında mekanik olarak koloni seçimi yapıldı.

4-7 gün sonra yine aynı şekilde EDTA veya mikromanipülatör ile pasajı yapılarak P5'e getirilmiş GKH'ler mRNA düzeyinde kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ve protein düzeyinde flow sitometri ile 0. gün GKH fraksiyonuyla karşılaştırılarak karakterize edildi. Besiyeri değişimi 2 günde bir yapıldı.

2.7. P5 CD49f+ GKH'lerin RNA ve Protein Düzeyinde Karakterizasyonu ve Saflık Analizleri

2.7.1. Alkalan Fosfataz Aktivitesi Ölçümü

GKH kolonilerinden alkalan fosfataz ölçümü alabilmek için vitronektin (VTN-N) (A31804, Gibco, ABD) kaplı sekiz kuyucuklu cam tabanlı kültür kabına (80807, Ibidi, Almanya) ekildi. Koloniler beklenen üzüm salkımı morfolojisine ulaştıktan sonra FBS içermeyen DMEM/F12 medyası ile iki kere yıkandı ve 1X alkalan fosfataz canlı boya (A14353, Invitrogen, ABD) çalışma çözeltisi her bir kuyucuğa 200 µl konularak 30 dk 37°C'de inkübe edildi. Ardından hücreler iki defa FBS içermeyen DMEM/F12 ile 5'er dk yıkandı. Son yıkamadan sonra tekrar FBS içermeyen DMEM/F12 medyası eklenerek FITC kanalında floresan mikroskopunda fotoğraf çekildi.

2.7.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR

P5 GKH'leri yöntem 2.6'daki gibi 0.5 mM EDTA ile kaldırıldıktan sonra yöntem 2.5.1'de tarif edildiği gibi total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra qPZR ile *Ddx4* (germ hücresi), *Ki67* (proliferasyon), *Stra8* (pre-mayotik ve GKH), *Gfra1* (GKH), *Oct4* (GKH), *Sca-1* (Ly6a olarak da bilinir) (VSEL), *Oct4a* (VSEL ve pluripotensi), *Nanog* (pluripotensi), *Sox2* (pluripotensi), *Sycp3* (mayotik), *Prm2* (post-mayotik) ve *Acr* (post-mayotik) ve Nodal yolağının karakterizasyonu içinse; *Nodal*, *Cripto*, *Acvr2b*, *Acvr1b*, *Tgfbr1* ve *Lefty2* ifadelerine LightCycler® 480 SYBR Green I Master (04 707 516 001, Roche, İsviçre) kullanılarak bakıldı. Kullanılan primerler çizelge 2.1'de listelenmiştir. Tüm ifade sonuçları kendi *Gapdh* (referans gen) ifade seviyelerine göre normalize edildi. Sonuçlar karşılaştırmalı metot ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ile 0. gün GKH'lere (kontrol) göre kat değişimi olarak analiz edildi. Her bir reaksiyonun sonunda erime eğrisi alınarak amplifikasyonun saflığı kontrol edildi.

2.7.3. Flow Sitometri

P5 GKH'leri 0.5 mM EDTA ile tarif edildiği gibi kaldırıldıktan sonra yöntem 2.2'deki gibi her flow tüpünde 1×10^5 hücre/100 µl soğuk FACS boyama tamponu (Ek1.1) olacak şekilde hücreler alikotlandı. PE rabbit anti-mouse GPR125 (1:50) (bs-12021R-PE, Bioss, ABD), Brilliant Violet 421 mouse anti-mouse SSEA-1 (1:20) (125613, Biolegend, ABD), ve üçlü boyama için PE anti-mouse Lineage Cocktail with Isotype Ctrl (1:20) (133303, Biolegend, ABD), FITC rat anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) (1.5 µg) (108106, Biolegend, ABD), PE/Cyanine5 rat anti-mouse CD45 (1:100) (103110, Biolegend, ABD) antikorlarıyla +4°C'de'te 45 dk inkübasyonlarının ardından üzerlerine 1'er ml soğuk 1X PBS eklenip 1000 x g'de 7 dk santrifüj edilerek yıkanan hücreler 100 µl soğuk 1X PBS ile çözülerek seri kapı alma stratejisine göre ACEA NovoCyte flow sitometri (Agilent, ABD) ile analiz edildi. Boyanmamış örnek ve/veya izotip kontroller kapıların ayarlanması için kullanılmıştır. Sonuçlar 0. gün GKH'lerle (kontrol) karşılaştırıldı.

2.7.4. İmmünohistokimyasal Boyama

GKH'ler vitronektin (A31804, Gibco, ABD) kaplanmış sekiz kuyucuklu cam tabanlı kültür kabına (80807, Ibidi, Almanya) ekilip beklenen morfolojilerine ulaştıktan sonra %3.7 PFA/1X PBS içerisinde 15 dk fikse edildiler. İki kere %0.1 Tween-20/1X PBS ile yıkandıktan sonra hücre içinde ifade edilen antijenler için %0.2 Triton X-100/1X PBS ile 15 dk permeabilizasyon işlemi uygulandı. Hücre yüzeyinde bulunan antijenler için bu adım atlandı. Ardından, %3 BSA/1X PBS ile 1 saat bloklanan hücrelerin üzerinden bloklama solüsyonu çekildi ve primer antikor dilüenti (ASE; 10 mM glisin (G46, Fisher Scientific, ABD), %0.05 Tween-20, %0.1 Triton X-100, %0.1 H₂O₂ (H3410, Sigma, ABD) ile tamamlanmış 1X PBS) (Ek3.1) içerisinde mouse anti-mouse Oct-3/4 (1:50) (sc-5279, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD) ve rabbit anti-mouse DDX4 (1:100) (ab13840, Abcam, İngiltere) antikorlarıyla 3 saat 37°C'de inkübe edildi (Rosas-Arellano ve ark., 2016). Nodal yolağının karakterizasyonu içinse, mouse anti-mouse Nodal (1:50) (sc-81953, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD), rabbit anti-mouse ACVR2B (1:50) (bs-12417R, Bioss, ABD) ve mouse anti-mouse TGFBR1 (1:50) (sc-518086, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD) antikorları ile yine 3 saat 37°C'de primer antikor inkübasyonu yapıldı. Kendinden konjuge PE rabbit anti-mouse GPR125 (1:50), Brilliant Violet 421 mouse anti-mouse SSEA-1 (1:50), ve FITC rat anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) (1:50) ile ise 4.5 saat 37°C'de inkübe edildi ve hemen ardından üç kere %0.1 Tween-20/1X PBS ile yıkamasının ardından DAPI'li mounting medyası ile kapatıldı. Konjuge olmayan antikorlar için iki kere %0.1 Tween-20/ PBS ile yıkandıktan sonra hücreler %0.1 Tween-20/PBS içerisinde Texas Red Goat anti-rabbit IgG (H&L) (1:300) (611-1902, Rockland, ABD) ve/veya Fluorescein Goat anti-mouse IgG (H&L) (1:300) (610-1202, Rockland, ABD) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildiler. Yıkamadan sonra mounting medya ile kapatıldı. Carl Zeiss LSM 880 konfokal mikroskopunda seçilen sekonder antikorların *Ex/Em* değerlerine göre uygun kanallardan görüntüleme alındı.

2.8. *In Vitro* Ortamda Germ Hücrelerine Farklılaştırılması

Bazal farklılaşma besi yeri 500 IU/ml FSH (GONAL-f 300IU/0.5 ml, Merck, İsviçre), 4 ng/ml GDNF, %4 KSR, %6 FBS, 1X NEAA, 1X ITS-G ve 1% P/S eklenerek tamamlanan α -MEM bazal medyasına (01-043-1A, Bioind, İsrail) 0.22- μ m filtreden geçirilmiş 1 mM pirüvat ve 10^{-4} M L-askorbik asitin taze olarak ilave edilmesiyle hazırlandı (Arkoun ve ark., 2015; Bai ve ark., 2018; Ibtisham ve ark., 2021; Travers ve ark., 2013; Xu ve ark., 2020). P5 GKHBH kolonilerinin bir kısmı tarif edildiği gibi MMC ile inaktive edilmiş Sertoli besleyici tabakası üzerine ekildikten 7 gün sonra GKH kültür besi yeri II, 10 μ M SB431542 (S4317, Sigma, ABD) eklenen bazal farklılaşma besi yeri ile değiştirildi (Moraveji ve ark., 2012; Moraveji ve ark., 2019; Tassinari ve ark., 2015). 5 mg SB431542 1300 μ l DMSO içerisinde çözündürülerek 10 mM SB431542 stoğu hazırlanıp alikotlandıktan sonra en fazla 1 ay -20°C 'de karanlıkta saklandı. 7 gün sonra hücrelerin bir kısmı 0.5 mM EDTA ile protein izolasyonu, RNA izolasyonu ve immünositokimyasal boyama için toplanırken geri kalanının besi yeri taze olarak 10^{-6} M retinoik asit (R2625, Sigma, ABD) eklenen bazal farklılaşma besi yeri ile değiştirildi (Travers ve ark., 2013; Wang ve ark., 2016). DMSO içerisinde hazırlanan 20 mM RA stok solüsyonu alikotlanıp en fazla 2 hafta -20°C 'de karanlıkta saklandı. Önceden ısıtılmış α -MEM içerisinde 4 mM ara stok hazırlanıp 0.22- μ m filtreden geçirilerek sterilize edildi ve her 4 ml besi yerine 1 μ l 4 mM ara stok kondu. 28. güne kadar farklılaştırılmaya devam edildi. Farklılaşma besi yerleri en fazla 1 hafta $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. 2 günde bir besi yeri değiştirildi. 28. günün sonunda tüm hücreler RNA izolasyonu ve immünositokimya için kaldırıldı. Farklılaşma kontrolü, GKH kültür besi yeri II ile aynı süre boyunca muamele edilen hücrelerden oluşuyordu.

2.8.1. Western Blotlama

2.8.1.1. Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonunun BCA Testi ile Ölçülmesi

10 μ M SB431542 ile 1 hafta kültüre edilen hücreler ve aynı süre boyunca SB431542 ilave edilmemiş bazal farklılaşma besi yeri ile kültüre edilen kontrol hücreleri total protein izolasyonu için 1X PBS içerisinde kazındıktan sonra 1000 x g, 10 dk, +4°C’de santrifüj edilerek pellet haline getirildi. Pellet 250 μ l/25 cm² lizis tamponu (Ek4.3) içerisinde çözündürüldükten sonra hücreler 30 dk buz üzerinde, her 10 dk’da bir karıştırılarak inkübe edildi. Hücre lizatlarının 13.000 rpm, 20 dk, +4°C’de santrifüj edilmesinin ardından süpernatantlar temiz eppendorflara aktarıldı. Protein konsantrasyonları Pierce BCA Protein Assay Kiti (Thermo Fisher, ABD) kullanılarak ve üreticinin protokolü izlenerek belirlendi. 40 μ l lizis tamponu ile dilüe edilmiş 10 μ l protein örneğinden ve her BSA protein standardından 20 μ l, düz tabanlı 96-kuyucuklu plakaya konuldu. Reaktif B:Reaktif A ile 1:50 oranında hazırlanan 200 μ l çalışma reaktifi kuyucuklara eklendi. 37°C’de karanlıkta 30 dk inkübasyonun ardından absorbans değerleri Epoch Mikroplaka Spektrofotometresiyle 562 nm’de ölçüldü.

Her bir kuyucuğa yüklemek üzere 30 μ g protein örneği, 5 μ l 4X Laemmli tamponu (Ek4.4), 2 μ l β -merkaptoetanol ile karıştırılıp final hacmi lizis tamponu ile 20 μ l’ye tamamlandı ve vortekslenip spinlendikten sonra 95°C’de 7 dk denatüre edildi. Buz üzerinde soğutulup tekrar vortekslenip spinlendikten sonra yüklemeye hazır hale getirilen örnekler ve uygun hacimlerde alikotlanan kalan proteinler daha sonra kullanılmak üzere -80°C 'e kaldırıldı.

2.8.1.2. SDS-PAGE

%10 ayırıcı jel (bkz. Ek4.12) ve %5 paketleyici jel (bkz. Ek4.13) hazırlandı. Kuyucuklara 20 μ l’şer protein karışımı ve 4.5 μ l renkli protein cetveli (Prime-Step™

Prestained Broad Range Protein Ladder; 773302, Biolegend, ABD) yüklendikten sonra koşturularak ayrılmaları için Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad, ABD) ekipmanı önce 60V'ta çalıştırıldı ve örneklerin ayırıcı jele geçişi tamamlandıktan sonra voltaj 100V'a yükseltildi.

2.8.1.3. Yarı-Kuru Transfer

Trans-Blot Turbo RTA Mini 0.45 µm LF PVDF Transfer Kitten (1704274, Bio-Rad, ABD) çıkan 0.45 µm'lik PVDF membranı önce %100 metanol içerisinde 30 sn ve sonra taze hazırlanmış soğuk 1X transfer tamponu (Ek4.15) içerisinde 3 dk çalkalandı. Sırasıyla; soğuk 1X transfer tamponuyla ıslatılmış Whatmann kağıtları, aktive edilmiş ve dengelenmiş PVDF membranı, jel ve soğuk 1X transfer tamponuyla ıslatılmış Whatmann kağıtları ile transfer kaseti içerisinde oluşturulan sandiviçin her katmanı üzerinden *roller* ile geçilerek baloncuk oluşumu engellendi. Transfer, Trans-Blot Turbo Transfer Sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak sabit voltajda 2.5 A/25 V/15 dk olarak gerçekleştirildi.

2.8.1.4. Bloklama, Antikor İnkübsasyonu ve Jel Görüntülemesi

PVDF membrana protein transferi gerçekleşikten sonra membran, bloklama tamponu (Ek4.7) içerisinde 2 saat çalkalamaya bırakılarak bloklandı. Bloklama tamamlandıktan sonra bloklama tamponu içerisinde hazırlanan rabbit anti-mouse Smad2/3 antikor (1:250) (3102S, Cell Signaling Technology Inc., ABD) ve rabbit anti-mouse p-Smad2 antikor (1:500) (3108S, Cell Signaling Technology Inc., ABD) ile bir gece +4°C'de çalkalanarak inkübe edildi. Ertesi gün bir kere hızlı ve dört kere 10'ar dk 1X TBST (Ek4.6) içerisinde yapılan yıkamalardan sonra membran, HRP goat anti-rabbit IgG (1:5000) (sc-2030, Santa Cruz Biotechnology Inc., ABD) ile 1 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda sekonder antikor yıkaması, primer antikor yıkamasına uygun olarak bir kere hızlı ve dört kere 10'ar dk 1X TBST içerisinde yapıldı. Kemilimünesans olarak WesternBright ECL HRP

substratı (NC0930892, Advansta Inc., ABD) kullanıldı ve görüntülemeler Chemidoc MP (Biorad, ABD) ile yapıldı.

Stripping işlemi, membranın 1X TBST’de bir kere 10 dk, *mild stripping* tamponunda (Ek4.16) iki kere 5’er dk, 1X TBS’te iki kere 10’ar dk, 1X TBST’de iki kere 5’er dk çalkalanmasıyla yapıldı. Stripping sonrası bloklama için, membran bloklama solüsyonu içerisinde 45 dk çalkalandı. Gapdh için, mouse anti-mouse Gapdh antikoru (1:1000) (919501, Biolegend, ABD) ve HRP goat anti-mouse IgG (1:5000) (1858413, Thermo Fisher, ABD) kullanıldı.

2.8.2. Kantitatif Eş Zamanlı PZR

RA eklenmemiş (SB431542 ile 7 gün kültüre edilmiş) ve RA eklenip 14 gün kültüre edilmiş GKHBH’lerde yöntem 2.7.2’de tarif edildiği gibi qPZR ile spermatogeneze özgü transkriptlerden *Ddx4*, *Gfra1*, *Oct4*, *Oct4a*, *Sca-1* (*Ly6a*), *Ki-67*, *Stra8*, *Sycp3*, *Prm2* ve *Acr* belirteçlerinin ifade seviyeleri ölçüldükten sonra kat değişimlerin analizleri karşılaştırmalı metot ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) ile yapıldı ve kontrol grubu olarak P5’teki GKHBH’ler kalibratör olarak kullanıldı. Kullanılan primerler çizelge 2.1’de listelenmiştir.

2.8.3. İmmünohistokimyasal Boyaması

GKH’ler rabbit anti-mouse PCNA (1:50) (MBS7602448, MyBioSource, ABD), rabbit anti-mouse Scp3 (1:100) (ab15093, Abcam, İngiltere), ve rabbit anti-mouse phospho-histone H2A.X (Ser139) (1:200) (9718S, Cell Signaling Technology Inc., ABD) antikorlarıyla yöntem 2.7.4’teki gibi boyanarak RA eklenmemiş hücrelerde (SB431542 ile 7 gün kültüre edilmiş) ve RA eklenip 14 gün kültüre edilmiş hücrelerde bahsedilen antijenlerin pozitif/negatifliği karşılaştırıldı.

2.9. Busulfan-Kaynaklı Fare İnfertilite Modelinin Oluşturulması

8-haftalık yetişkin erkek BALB/c farelere 30 mg/kg (n=6), 40 mg/kg (n=6) ve 45 mg/kg (n=6) busulfan i.p. yolla enjekte edildi. Her busulfan dozunun kontrol grubu farelerine (her doz için n=6) ise %50 DMSO (busulfanın çözücüsü) i.p. yolla verildi. Tam azoospermi için belirtilen busulfan dozlarının denenmesinin nedeni yetişkin erkek BALB/c farelerde yapılan daha önceki çalışmalarda 30 mg/kg'ın altındaki dozlarda endojen spermatogenezin yeniden başladığının gözlemlenmesi, daha yüksek dozlarda ise farelerin uzun süreli takipler için yeterince uzun süre yaşamamasıdır (Wang ve ark., 2010). Bunun için; busulfan (B2635, Sigma, ABD) DMSO içerisinde çözdürüldükten sonra eşit hacimde ddH₂O eklenerek 5 mg/ml olarak hazırlandı. Fareler tartıldıktan sonra 30 mg/kg busulfan için; (farenin gramı (g) x 6) µl 5 mg/ml busulfan, 40 mg/kg busulfan için; (farenin gramı (g) x 8) µl 5 mg/ml busulfan ve 45 mg/kg busulfan içinse; (farenin gramı (g) x 9) µl 5 mg/ml busulfan enjekte edildi. Kontrol grupları içinse, karşılık gelen hacimde 1:1 oranında karıştırılmış DMSO:ddH₂O enjekte edildi. Farelerde spermatogenez yaklaşık 35 gündür ve dört döngü 8.6 gündür (Sirlin ve Edwards, 1957). Bu nedenle, 35 günün sonunda (D35) busulfanın DMSO kontrolüne kıyasla germ hücre ablasyonunu ve testiküler kök hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi için fareler servikal dislokasyon yöntemiyle kurban edildi. Testisler hematoxilen-eozin (H&E) boyaması, immüno Floresan, RNA izolasyonu ve flow sitometri için kullanıldı.

Histolojik analizler ile ve protein düzeyinde tam azoospermi gözlemlediğimiz 40 mg/kg busulfan uygulandıktan 15 gün sonra (D15) testiküler kök hücrelerin oranı DMSO kontrolüne ve D35 busulfan grubuna göre flow sitometri ile karşılaştırmalı olarak kantifiye edildi.

2.9.1. Parafin Kesitlerde Hematoksilen-Eozin Boyaması

Farelerin testisleri, tespit amacıyla Bouin solüsyonu içerisinde +4°C’de 1 gece bekletildi ve fikse olan dokular rutin histolojik takip aşamalarından geçirildi. Kısaca; %70, %80, %90 ve %100’lük EtOH serilerinde bekletilerek dehidrate edilen dokular ksilol içerisinde şeffaflandırıldı. Etüvde 60°C’de iki kere 1’er saat sıvı parafin içerisinde infiltrasyonu takiben dokular sert parafin bloklara gömülüp Leica RM 2125 model rotary mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler H&E ile boyanıp Zeiss Axio Scope.M1 ışık mikroskobunda 40X’lik büyütmede AxioCam MRc5 kamera ile fotoğrafları çekildi. Bu iş paketi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. laboratuvarında yapılmıştır.

2.9.2. Parafin Kesitlerde İmmüno Floresan Boyaması

Etüvde 60°C’de 1 gece ksilol içerisinde deparafinize edilen doku kesitleri iki kere %100 EtOH’ta 10’ar dk, iki kere %95 EtOH’ta 10’ar dk, iki kere dH₂O’da 5’er dk hidrate edildikten sonra mikrodalgalanabilir bir şale içerisine alınıp slaytların üzerine 10 mM sodyum sitrat tamponu, pH 6.0 eklendi. Sıcaklık 98°C’ye ulaştığında 720W/800W’ta 5 dk kaynatıldı. Üzeri sıcak sodyum sitrat tamponuyla tamamlandı. Bu şekilde dört kere kaynatıldıktan sonra sodyum sitrat tamponunun sıcaklığı oda sıcaklığına gelinceye kadar kesitler buz üzerinde 30 dk bekletildi. İki kere 1X PBS’te 1’er dk, bir kere 1X PBS’te 5 dk ve iki kere %0.25 Triton X-100/1X PBS’te 5’er dk yıkanan dokular PAP kalemile işaretlendi, ıslak peçetelerle oluşturulan nemli kap içerisine yerleştirildi ve %5 BSA/%0.25 Triton X-100/1X PBS ile oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Bloklama solüsyonunun peçete üzerine akıtılmasından sonra, kesitler üzerine damlatılan %1 BSA/%0.25 Triton X-100/1X PBS içerisinde hazırlanan rabbit anti-mouse DDX4 (1:100) ve mouse anti-mouse Oct-3/4 (1:50) antikorları ile 1 gece +4°C’de inkübe edildi. Primer antikor solüsyonu peçete üzerine akıtıldı. İki kere 1X PBS’te 5’er dk, bir kere %0.25 Triton X-100/1X PBS’te 5 dk yıkandıktan sonra %1 BSA/%0.25 Triton X-100/1X PBS içerisinde hazırlanan Texas Red Goat anti-rabbit IgG (H&L) (1:500) ve Fluorescein Goat anti-mouse IgG (H&L) (1:500) sekonder

antikorları ile oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi. Üç kere 1X PBS'te 5'er dk yıkamanın ardından DAPI'li mounting medya ile lameller kapatıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta kurutulan slaytlar Carl Zeiss LSM 880 konfokal mikroskopu kullanılarak görüntülendi.

2.9.3. Testis Dokusundan RNA İzolasyonu ve Kantitatif Eş Zamanlı PZR

Testisler buz üzerinde dekapsüle edilip her bir testisten çıkarılan seminifer tübülleri 1 ml RNAlater bulunan 2-ml eppendorflara alındı. Gece boyu +4°C'de bekletildikten sonra uzun süreli saklama için RNAlater çekilip dokular -80°C'ye kaldırıldı. RNA izolasyonu için dokular buz üzerinde her 0.1 g doku için 1 ml PureZOL™ RNA Isolation Reagent içerisinde homojenizatör ile parçalandı. Bu aşamadan sonra üretici firmanın protokolü takip edilerek standart RNA izolasyonu yapıldı. Yöntem 2.7.2'deki qPZR protokolü izlenerek *Ddx4*, *Gfra1*, *Oct4*, *Oct4a*, *Sca-1* (*Ly6a*), *Sycp3*, *Prm2*, *Acr* belirteçlerinin ifade seviyeleri ölçüldükten sonra kat değişimlerin analizleri karşılaştırmalı metot ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) ile yapıldı ve kontrol grubu olarak D35 DMSO kalibratör olarak kullanıldı. Kullanılan primerler çizelge 2.1'de listelenmiştir.

2.9.4. 40 mg/kg Busulfan'ın 15. ve 35. günlerde Testiküler Kök Hücrelerin Oranına Etkisinin Flow Sitometrik İncelemesi

40 mg/kg Busulfan verildikten sonra 15 gün geçmiş (D15 Busulfan), D15 Busulfan grubunun DMSO kontrolü (D15 DMSO), 40 mg/kg Busulfan verildikten sonra 35 gün geçmiş (D35 Busulfan), D35 Busulfan grubunun DMSO kontrolü (D35 DMSO) grubu farelerin testislerinden hücre izolasyonu yöntem 2.1'deki gibi yapıldı. Yöntem 2.2'deki flow protokolü uygulandı. Üçlü boyama için PE anti-mouse Lineage Cocktail with Isotype Ctrl (1:20), FITC rat anti-mouse Ly-6A/E (Sca-1) (1.5 µg) ve PE/Cyanine5 rat anti-mouse CD45 (1:100); PE rabbit anti-mouse GPR125 (1:50); Brilliant Violet 421 mouse anti-mouse SSEA-1 (1:20); PE rat anti-mouse CD49f

(1:50); PE rat anti-mouse CD90.2 (1:50) (E-AB-F1094D, Elabscience); PE rat anti-mouse CD117 (c-Kit) (0.06 µg) (105808, Biolegend, ABD) antikorları kullanıldı.

2.10. Transplantasyon Deneyleri

Farelere transplantasyondan önce, sıvı nitrojenden çıkartılıp çözündürülmüş P4 TSH'ler ve P5 GKHBH'ler sırasıyla CM-DiI (C7001, Invitrogen, ABD) ve SP-DiOC (D7778, Invitrogen, ABD) lipofilik membran boyaları kullanılarak işaretlendi. DMSO ile hazırlanmış 1 mg/ml boyadan 10 µl, 1×10^6 hücre/ 1 ml PBS içerisine eklendikten sonra hücreler 37°C'de 30 dk inkübe edildiler. Üzerlerine serum fizyolojik eklenip santrifüj edilerek yıkanan hücreler 30 µg DNaz I/%10 Tripan mavisi (T8154, Sigma, ABD)/serum fizyolojik içerisinde çözündürüldü ve transplante edilinceye kadar buz üzerinde muhafaza edildi. İşaretli hücreler transplantasyon öncesinde sırasıyla TRITC ve FITC filtreleri ile Carl Zeiss LSM 880 konfokal mikroskopunda kontrol edildi.

15 adet yetişkin erkek 8-haftalık fareye yapılan transplantasyonlar 40 mg/kg busulfan enjekte edildikten 35 gün sonra (yaklaşık 4. döngü) gerçekleştirildi. Çalışmamızda 2 transplantasyon ve 1 sham grubu vardı. Birinci transplantasyon grubunda (n=5): her iki testise TSH enjekte edildi (TSHT), ikinci transplantasyon grubunda (n=5): her iki testise TSH ile GKHBH (etkilerinin eşit ölçüde değerlendirilebilmesi için total hücre konsantrasyonunu sabit tutarak 1:1 hacimde karıştırıldı) ko-transplantasyonu yapıldı (TS-GKHBHT). Sham grubu içinse, her hayvanın testislerine sadece serum fizyolojik enjekte edildi (Kontrol, n=5). Her testise serum fizyolojik içerisinde yaklaşık $1-2 \times 10^6$ işaretli hücre (10 µl hücre süspansiyonu) optik büyütme altında 32G mikro iğne yardımıyla rete testis içerisine verildi (Nayernia ve ark. 2006; Sinha ve ark. 2019; Jafarian ve ark. 2018); testis orta hat kesisi ile skrotum kesesinden çıkartıldı ve optik büyütme altında mikro iğnenin ucu testisin yüzeyine paralel direkt mediastinumda rete içine yerleştirildi. Testis skrotal kavite içine geri döndürüldü, abdominal duvar ve cilt absorbabıl sütürlerle dikildi (Kadam ve ark. 2018).

2.11. Alıcı Testislerinde *In Vivo* Floresan Görüntüleme, Histolojik Analizler ve Kantitatif Eş Zamanlı PZR

2.11.1. *In Vivo* Floresan Görüntüleme

Transplantasyon yapılan hayvanlar CM-Dil ve SP-DiOC floresan sinyalleri uygun dalga boyu kullanılarak, PerkinElmer IVIS *in vivo* görüntüleme cihazı ile transplantasyon sonrası 1. gün ve bunu takiben haftada bir floresans kaybolana dek görüntülendi ve elde edilen görüntüler Living Image Analiz Yazılımı (PerkinElmer, <https://www.perkinelmer.com/Product/li-software-for-lumina-1-seat-add-on-128110>) kullanılarak analiz edildi.

2.11.2. Histolojik Analizler

Donör hücrelerin, transplantasyondan sonra bazal laminaya tutunması ve çoğalması için genellikle 4 hafta (Nagano ve ark., 1999) ve spermatidler ve spermatozoa ile tam seminifer epitel oluşturmak için ek 4 hafta gerekir (Wang ve ark., 2016). Bu nedenlerden dolayı transplantasyonlardan yaklaşık iki ay sonra üç gruptaki farelerin testisleri (kontrol, TSHT, TS-GKHBHT) çıkarıldı ve yöntem 2.9.1'deki gibi 24 saat Bouin solüsyonunda fiks edilip parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında kesit alındı ve son olarak H&E ile boyandı. Her kesitteki seminifer tübüllerin sistematik olarak değerlendirilebilmesi için Johnsen skor sistemine göre derecelendirilme ve puanlama yapıldı (Johnsen, 1970). Bu iş paketindeki doku takibi, kesit alımı, H&E boyaması ve Johnsen skorlaması Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. laboratuvarında yapılmıştır.

İmmünohistokimya (İHK), Anti-Rabbit HRP-DAB Cell&Tissue Staining Kit (CTS005, R&D Systems, ABD) kullanılarak kitle belirtilen protokole uygun yapıldı. Slaytlar %0.1 BSA/1X PBS içerisinde hazırlanan rabbit anti-mouse DDX4 (1:100) veya rabbit anti-mouse Scp3 (1:50) (ab15093, Abcam, İngiltere) antikorları ile 4°C'de

gece boyu inkübe edilip %0.025 Triton X-100/1X PBS ile ikişer kez 5'er dk yıkandı. Ardından biotinli anti-rabbit sekonder antikorlarla 1 saat inkübe edilip yıkama solüsyonu ile ikişer kez 5'er dk yıkandı. Zemin boyası olarak hematoksilin kullanıldı ve kesitler sırasıyla su, %95 ve %100 etanol-ksilole yerleştirildi. Entellan ile lameller kapatılıp, kesitlerin fotoğrafları ışık mikroskobunda 63X büyütmede çekildi.

2.11.3. Kantitatif Eş Zamanlı PZR

Alıcı testislerinde germ hücrelerinin (*Ddx4*), VSEL'lerin (*Sca-1*, nükleer *Oct-4a*), SKH'lerin (*Gfra1*, *Oct4*), pre-mayotik (*Stra8*), mayotik (*Sycp3*) ve post-mayotik (*Prm2*, *Acr*) belirteç ifadeleri qPZR ile incelendi (yöntem 2.7.2). Kullanılan primerler çizelge 2.1'de listelenmiştir.

2.12. Intrasisitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

2.12.1. Süperovülasyon ve Oosit Toplanması

7-8 haftalık 5 tane dişi BALB/c fareye saat 16:00'da 10 IU gebe kısarak serum gonadotropini (PMSG) (Folligon; Intervet, İrlanda) ve 48 saat sonra saat 16:00'da 10 IU insan korionik gonadotropini (hCG) (Chorulon; Intervet, İrlanda) i.p. yolla enjekte edildi. hCG enjeksiyonundan 16 saat sonra (08:00) fareler sakrifiye edildi ve çıkarılan oviductlar global® total® LP w/ HEPES-tamponlu medyumda (H5TH-100, Cooper Surgical, ABD) oda sıcaklığında taşındı. Ampullalar stereomikroskop altında 27G iğnelerle yırtılarak kümülüs-oosit kompleksleri üzeri mineral yağ ile kapatılmış dengelenmiş global® total® LP kültür medyumuna (H5GT-030, Cooper Surgical, ABD) aktarıldı ve oositler 37°C 'de ve %6 CO₂, %5 O₂ ve %89 N₂'deki inkübatörde yaklaşık 30 dk bekletildi. Kümülüs hücrelerinin ortamdan uzaklaştırılması için, kümülüs-oosit komplekslerine 200 µl ICSI Cumulase® (1612, Cooper Surgical, ABD)/HEPES-tamponlu medyum dropu içerisinde yaklaşık 3-5 dk inkübe edilirken

pipetaj yapıldı. Kümülden arındırılmış oositlere HEPES-tamponlu medyum damlacıklarından geçirilirken pipetaj yapılarak yıkama işlemi yapıldı. HEPES-tamponlu medyumdan uzaklaştırmak için bir kez yıkayarak oositler *center-well* Petri kaplarındaki üzeri mineral yağ (10100060, Cooper Surgical, ABD) ile kapatılmış dengelenmiş kültür medyumuna aktarıldı ve 37°C 'de ve %6 CO₂, %5 O₂ ve %89 N₂'deki inkübatörde 15 dk-1 saat inkübe edildi. Sadece metafaz II (MII) oositleri enjeksiyona tabi tutuldu.

2.12.2. Spermlerin Hazırlanması

Önceden 37°C'ye getirilmiş %10 FBS ve 1X P/S ile tamamlanmış DMEM yüksek glikozlu besi yeri bulunan 15-ml falkona açılan spermlerin de bulunduğu farklılaşmış hücrelerden DMSO'nun uzaklaştırılması için hücre süspansiyonu 1500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve hücreler 2 ml Origio® Sperm Wash (84050060D, Cooper Surgical, ABD) içerisinde çözündürülüp %80/%40 PureSperm gradientin (1 ml/1 ml) (PS100-100, Nidacon, İsveç) üzerine kenardan yavaşça bırakıldı. 1500 rpm'de 15 dk santrifüjün ardından süpernatant atıldı ve sperm pelleti 1 ml yıkama tamponu içerisinde 2500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek yıkandı.

2.12.3. Piezo-ICSI Prosedürü

Piezo impact drive ünitesi (MB-S; Prime Tech Ltd., Japonya) ile donatılmış bir mikromanipülatöre sahip Olympus IX70 inverted mikroskobu kullanıldı. Piezo ünitesi bir kontrolör (PMM4G; Prime Tech Ltd., Japonya) ile çalıştırıldı. Operasyon sıvısı (Prime Tech Ltd.) enjeksiyon pipetinin ortasına uzunluğu 1 cm olacak şekilde yerleştirildi. Enjeksiyon için ultra ince duvarlı P-ICSI mikropipeti (PINU06-25FT; Prime Tech Ltd., Japonya) kullanıldı. Operasyon sıvısı mikropipet ucuna kadar itildi ve bir pnömatik enjektör yardımıyla ~200 µm uzunluğunda %6 PVP solüsyonu mikropipet içine aspire edildi. Mineral yağı ile kapatılmış dengelenmiş HEPES-tamponlu medyum damlacıklarıyla hazırlanan ICSI dishine (16006, Vitrolife, İsveç)

her seferinde 5 MII oosit/damlacık ve spermier için oluşturulan havuza 100 ul sperm süspansiyonu konuğ. Sperm süspansiyonu %6 PVP (PVP360, Sigma, ABD)/HEPES-tamponlu medyum damlacığına eklenip karıştırıldı. İkinci PVP damlacığındaki 10 spermden biri mikroenjeksiyon pipeti içerisine kuyruğundan çekilip başı kuyruktan ayırmak için birkaç piezo darbesi uygulandı (intensity=4, speed=6). Damlacıktaki tüm oositlere mikroenjeksiyon yapılıncaya dek havuzdaki tüm spermier için bu adım tekrarlandı. *Holding* pipeti (MPH-MED-30, Cooper Surgical, ABD) kullanılarak metafaz II spindle'ı saat 12 veya 6 konumunda olacak şekilde oosit nazikçe tutuldu ve enjeksiyon pipetinin ucu zona pellucidaya girerken aynı anda birkaç piezo darbesi (intensity=4, speed=6) uygulanarak zona delindi. Daha sonra, yeterince esnetildiğinde oolemma bir piezo darbesi (intensity=1, speed=2) ile delindi. Sperm, minimum hacimde PVP ile oosit içine enjekte edildi ve mikropipet yavaşça dışarı çekildi. 37°C 'de ve %6 CO₂, %5 O₂ ve %89 N₂'de toplamda 96 saat inkübe edilirken 12-24 saat aralıklarla embriyoların resmi inverted mikroskopunda çekildi (Yoshida ve Perry, 2007; Ward ve Yanagimachi, 2018). Fertilizasyon, ICSI'den 17-19 saat sonra doğrulandı. İki pronükleus (2PN) ve ikinci polar cisim (2PB) mevcut olduğunda normal fertilizasyon gerçekleşmiş kabul edildi. Embriyo gelişimi; iki hücreli (ICSI sonrası 24 saat), dört hücreli (48 saat), morula (72 saat) ve blastokist (96 saat) olacak şekilde belirlendi. Bu iş paketi Tüp Bebek Merkezi laboratuvarında insan-dışı uygulamalar için ayrılmış cihaz ve ekipmanlar kullanılarak yapılmıştır.

2.13. İstatistiksel Analizler

Araştırmamızda elde ettiğimiz sonuçların analizi, GraphPad Prism 9 programı kullanılarak normality ve lognormality testleri Shapiro-Wilk test yapılarak değerlendirildi. Dağılıma uyanlar parametrik Student's t-test veya Ordinary one-way ANOVA-Multiple comparisons uygulanarak değerlendirildi. Uymayanlar ise non-parametrik Mann-Whitney testi ve Kolmogorov-Smirnov kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz $p < 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi. Grafik değerleri ortalama $\pm$ SD * $p < 0.05$ kontrole göre şeklinde verildi.

3. BULGULAR

3.1. Testiküler Somatik Hücrelerin Karakterizasyonu ve Saflığı

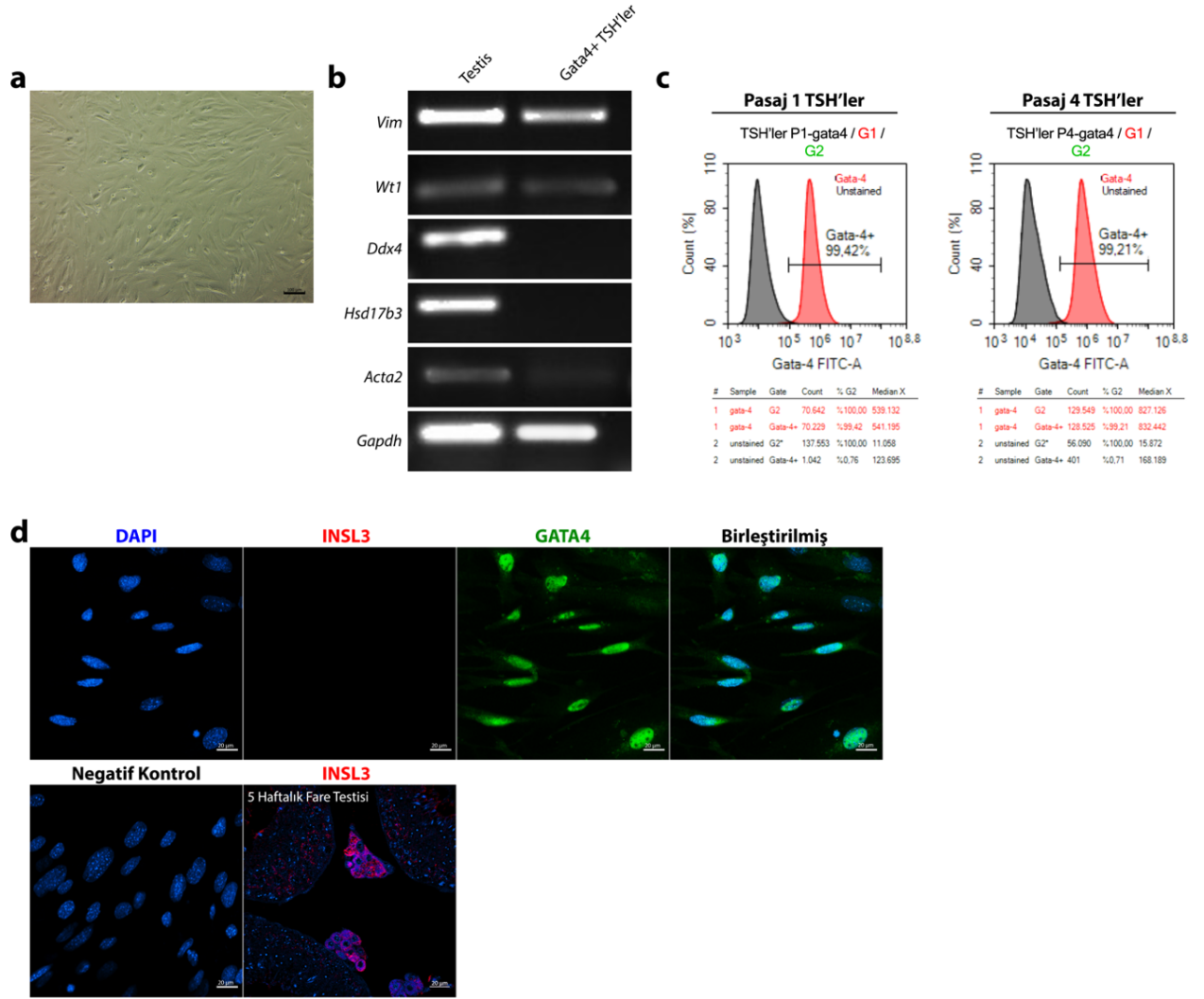
Seminifer tübüllerin iki aşamalı enzimatik sindiriminin ardından TSH'ler %0.2 jelatin kaplı T25 hücre kültürü şişelerine $4-5 \times 10^4$ hücre/cm² ekildiklerinin 2. gününde jelatin kaplı yüzeye yapışmaya başlayan poligonal şekilli ve birkaç uzantısı olan hücrelerin yanında daha uzun uzantılı fibroblast-benzeri morfolojide hücreler gözlemlendi (Ghasemzadeh-Hasankolaei ve ark., 2014). TSH'ler daha az yoğunlukta ekildiklerinde büyüme hızları yavaşladı ve zamanla büyümeleri durdu ve öldüler. Hücrelerin doluluğa ulaştığı 6-7. günde yapılan ilk pasaj sonrası benzer büyüme hızıyla çoğalmaya devam ettiler ve pasaj (P)4'te ilk ekildiklerinde görülen fibroblast-benzeri hücrelerin miktarında azalma gözlemlendi (Şekil 3.1a).

Daha ileri pasajlarda hücrelerin büyüme hızı yavaşladığı ve karakterizasyonları, besleyici hücre tabakası olarak ve transplantasyon deneylerinde kullanılmaları için yeterli sayıda TSH elde edildiği için hücreler en fazla P4'e kadar kültüre edildi. P4 TSH süspansiyonu içeriğinin sadece testisteki somatik hücrelerden oluştuğunu mRNA düzeyinde göstermek için *Vim* ve *Wt1* (Sertoli hücresi), *Ddx4* (*Vasa* olarak da bilinir; germ hücresi), *Hsd17b3* (Leydig hücresi) ve *Acta2* (*α Sma* olarak da bilinir; peritübüler miyoid hücre) belirteçlerinin ifadelerine RT-PZR ile bakıldı. Şekil 3.1b'de gösterildiği gibi TSH'lerde baskın olarak *Vim* ve total testisteki miktara benzer düzeyde *Wt1* ifade edilirken *Ddx4* ve *Hsd17b3* ifadelerine rastlanmadı. *Acta2* ifadesi ise çok düşük miktarda görüldü. *Vim*, Sertoli hücre saflığının değerlendirilmesinde kullanılan en yaygın belirteçtir, ancak bu ara filament proteini, tümü testis interstisyumunda veya tunica albuginea'da bulunan peritübüler miyoid hücreler, mezenkimal kök hücreler (MKH), fibroblastlar, makrofajlar ve endotelial hücreler gibi tüm mezenkimal-kaynaklı hücrelerde yaygın olarak eksprese edildiğinden, Sertoli hücrelerini karakterize etmede yeterli değildir (Zomer ve Reddi, 2020). *Wt1*, prenatal / immatür / yetişkin Sertoli hücrelerinde, endotelial hücrelerde, MKH'lerde ve fibroblastlarda ifade edilir. *Acta2*, peritübüler miyoid hücrelerde,

makrofajlarda, endotelyal hücrelerde ve bazı MKH ve fibroblast subpopülasyonlarında ifade edilir. Hsd17b3 ise postnatal olarak yetişkin Leydig hücrelerinde ve fetal Sertoli hücrelerinde eksprese edilir (Inoue ve ark., 2016). Dolayısıyla her ne kadar literatürdeki çoğu çalışmaya göre elde edilen popülasyon ‘Sertoli hücresi’ olarak tanımlanabilir olsa da test edilen belirteçlerin transkript düzeyinde pozitif/negatifliği bu hücreleri isimlendirmede bazı testiküler alt popülasyonları elimine etmeye yetmemiş olabileceğinden, mRNA düzeyinde karakterize edildiklerinde elde edilen popülasyonun TSH olarak tanımlanması uygun görüldü.

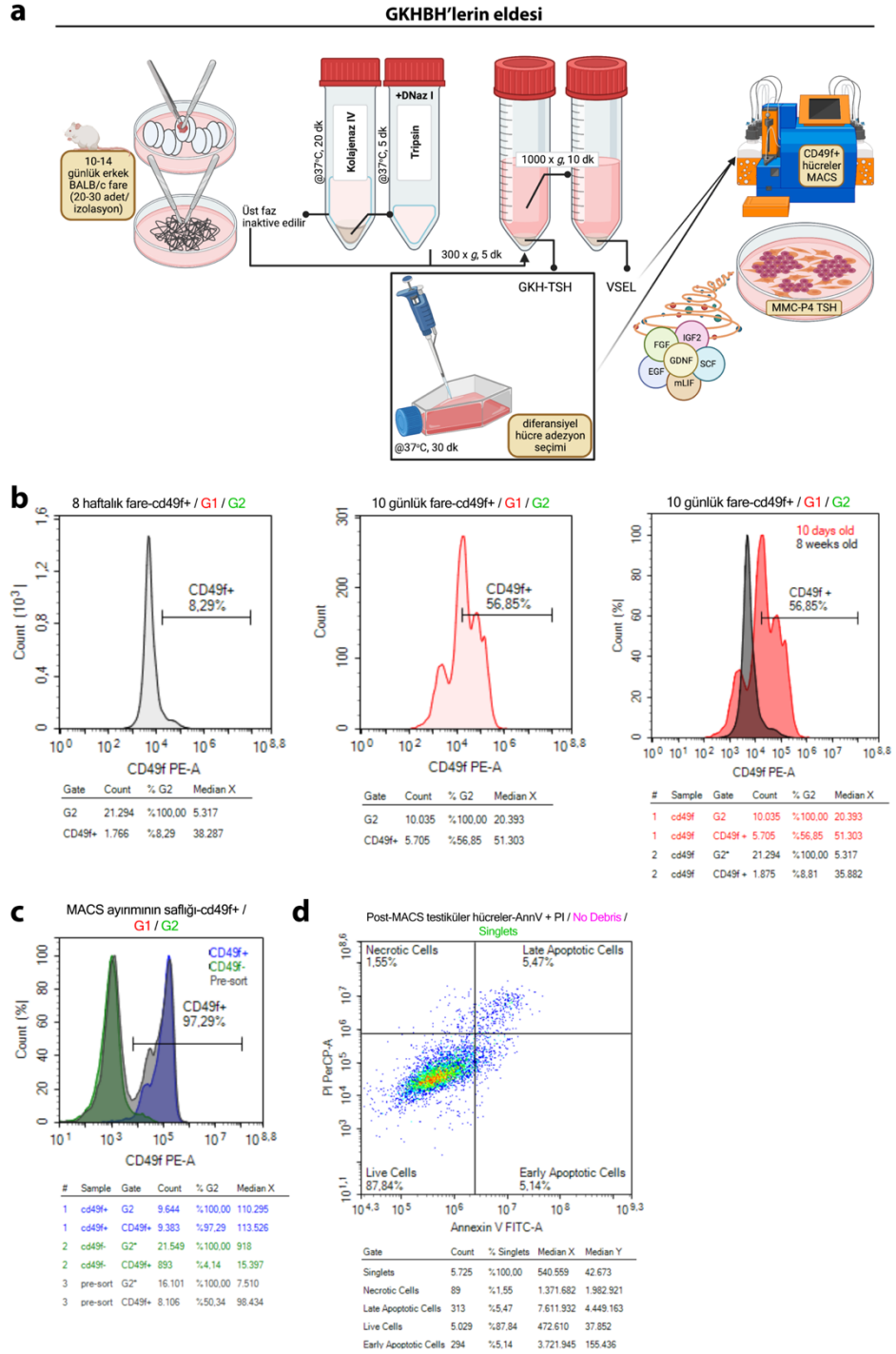
GATA4 testiste prenatal / immatür / yetişkin Sertoli hücrelerinde, peritübüler miyoid hücrelerde ve Leydig hücrelerinde eksprese edildiğinden, izole edilen hücrelerin ilk pasajda ve ileri pasajda bir TSH belirteci olarak GATA4’ü protein düzeyinde ifade etme yüzdesinin saptanması, TSH’lerin saflığına dair bir bilgi verebilir. Dolayısıyla, TSH’lerin P1’deki ve CD49f+ GKH’lerden GKH-benzeri hücre (GKHBH) elde etmede, GKHBH’lerin daha ileri aşamada germ hücrelerine *in vitro* farklılaştırmada bir besleyici hücre tabakası olarak ve aynı zamanda transplantasyon deneylerinde kullanıldığı P4’teki GATA4 pozitiflik yüzdesi incelendi. Hem P1’de (%99.42) hem P4’te (%99.21) GATA4 için yüksek pozitiflik saptandı (Şekil 3.1c).

P4 TSH’ler GATA4 ve INSL3 (Sertoli hücrelerinde ve peritübüler hücrelerde negatif, Leydig hücrelerinde pozitif) immünoboyamasıyla protein düzeyinde karakterize edildi (Ivell ve ark., 2013; Zomer ve Reddi, 2020). TSH’lerde GATA4 ifadesi görülürken INSL3 ifadesi saptanmadı (Şekil 3.1d). INSL3 boyaması saptanmamasının, INSL3 antikorunun çalışmadığından değil de hücrelerin gerçekten de INSL3 ifade etmediğinden kaynaklandığını göstermek için 5-haftalık fare testis kesitlerine aynı koşullarda INSL3 boyaması yapıldı. INSL3 ifadesi Leydig adacıklarına spesifik olarak görüldüğünden, TSH’lerin INSL3 için negatif oldukları doğrulandı (Şekil 3.1d).



Şekil 3.1: TSH'lerin karakterizasyonu. (a): P4 TSH'lerin aydınlık-alan mikroskopunda çekilmiş görüntüsü (10X; Ölçek çubuğu = 100 μm). (b): P4 TSH'lerde ve total testiste Sertoli, germ, peritübüler miyoid ve Leydig belirteçlerine özgü primerler kullanılarak yapılan RT-PZR ürünlerinin jel görüntüsü. Test edilen belirteçlerin ifade seviyeleri bant yoğunluklarına göre pozitif kontrol olarak kullanılan total testisinkilerle kıyaslanmıştır. (c): TSH'lerin P1'deki (sol panel) ve besleyici hücre tabakası olarak veya transplantasyon deneylerinde kullanıldığı P4'teki (sağ panel) GATA4 pozitifliğinin flow sitometri ile ölçülmesi. (d): P4 TSH'ler, GATA4 (yeşil) ve INSL3 (kırmızı) ifadesiyle immünohistokimyasal olarak boyanarak protein düzeyinde karakterize edilmiştir. Parafin testis kesitlerinde INSL3 immüno floresan boyamasının, Leydig hücrelerine spesifik olduğu teyit edilmiştir. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 20 μm).

3.2. GKH'lerden MACS ile CD49f+ Hücrelerin Ayrıştırılması



Şekil 3.2: GKH'lerin eldesi. (a): GKH'lerin izolasyon aşamalarının şematik gösterimi. (b): CD49f+ GKH yüzdesinin 8-haftalık ve 10-günlük fare testislerinde flow sitometri ile karşılaştırması. (c): MACS sonrası elde edilen *pre-sort*, CD49f- ve CD49f+ fraksiyonda CD49f ifade eden hücrelerin yüzdesinin flow sitometri ile ölçülmesi. Flow okumaları bir *sorting* deneyini temsil etmektedir. (d): MACS sonrası CD49f+ GKH'lerin canlılık analizi için yapılan FITC Annexin V-PI ikili boyamasının flow sitometrik incelenmesi. Annexin V-/PI- normal hücreleri, Annexin V+/PI- erken apoptotik hücreleri, Annexin V+/PI+ geç apoptotik hücreleri ve Annexin V-/PI+ nekrotik hücreleri işaret eder.

Maksimum oranda ve en etkin şekilde CD49f⁺ GKH elde etmek için yaptığımız optimizasyon çalışmamızda eş zamanlı olarak 8-haftalık ve 10-günlük farelerin testislerinden Şekil 3.2a’da tarif edildiği gibi total testiküler kök hücreler izole edilip flow sitometri ile içlerindeki CD49f⁺ hücrelerin yüzdeleri karşılaştırıldı. 8-haftalıkla (%8.29) karşılaştırıldığında 10-günlük (%56.85) BALB/c fare testislerinde CD49f⁺ hücre yüzdesinin daha fazla olduğunu gördük (Şekil 3.2b). Bu nedenle çalışmanın geri kalan kısmında GKH izole edip saflaştırmada 10-günlük erkek BALB/c fareler kullanıldı.

İzolasyon aşamasında (Şekil 3.2a) testisteki tüm kök hücreleri (GKH + VSEL hücreleri) elde etmek için, kollajenaz IV parçalaması sonrasındaki santrifüjde küçük boyutlu olduğundan 60 x g, 10 dk’da santrifüjle çökmesi beklenmeyen VSEL’leri (Bhartiya ve ark., 2016a) kaybetmemek için içerisindeki kollajenaz inaktive edildikten sonra testiküler hücre süpernatantı saklandı. Tripsin solüsyonu ile tübüllerin ikinci parçalanması sonrasında da bu nedenle, saklanan süpernatant da tripsin sonrasındaki FBS ile tripsin inaktivasyonu yapılan hücre süspansiyonu içerisine katılıp TSH’lere ve GKH’lere yüksek santrifüj hızıyla zarar vermemek adına önce 300 x g, 5 dk santrifüjlemeyle TSH’ler ve GKH’ler çöktürüldükten sonra süpernatant yine atılmayıp VSEL’lerin de çöktürülebilmesi için literatürde belirtilen hız ve sürede (1000 x g, 10 dk) santrifüj edildi (Anand ve ark., 2016). Böylece aynı testisten ve aynı anda hem TSH’ler ve GKH’ler hem de VSEL hücreleri elde edilmiş olundu. Bundan sonraki aşama, GKH’leri TSH’lerden ayırıp GKH’ler ve VSEL’leri toplu olarak elde etmektir. Bunun için TSH’lerin %0.2 jelatin kaplı yüzeye yapışma özelliğinden faydalanıldı. Martin-Inaraja ve ark.’nın (2021) da önerdiği gibi 37°C’de 30 dk’nın TSH’lerinin büyük oranda hücre kültürü şişesinin tabanına yapışması için yeterli olduğunu gördük. Diferansiyel adezyon sonrası pipetaj yapılarak TSH’lerin üzerinden toplanan GKH’ler, bu süre boyunca inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırılan VSEL hücre süspansiyonuyla birleştirildi ve hiç beklenmeden MACS aşamasına geçildi.

Amacımız farklılaşmamış ve proliferasyon yeteneğini aynı morfolojiyle ileri pasajlarda da koruyabilen çok sayıda fonksiyonel GKH elde etmek olduğundan daha önce GKHBH elde etmede bir ön adım olan GKH’lerin anti-CD49f (α_6 integrin, GKH

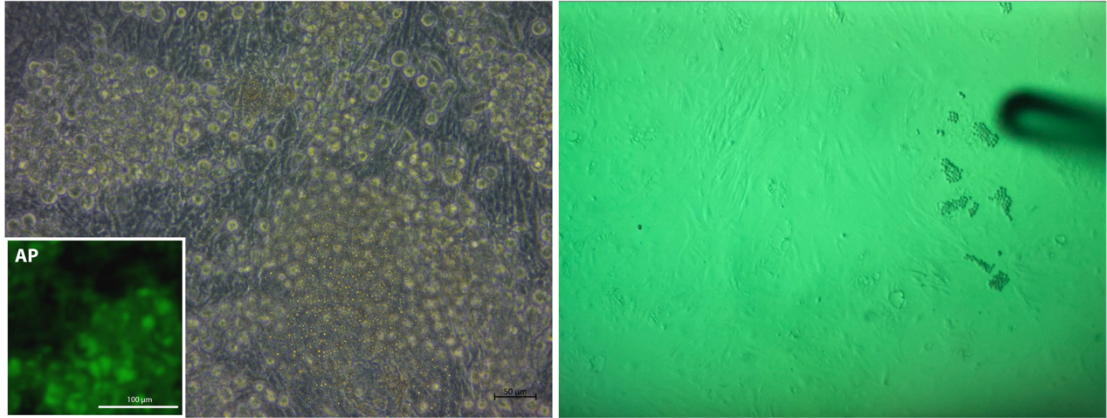
ve EKH belirteci) antikoru ile manyetik olarak işaretlenmesiyle seçildiği yöntemi denedik (Conrad ve ark., 2016; Krebsbach ve Villa-Diaz, 2017). Pürifiye edilmiş GKH'leri daha da zenginleştirmek için bu çalışmada GKH ayırımı için bir belirteç olarak CD49f kullanıldı. Literatürde her ne kadar VSEL'lerin CD49f ifade ettiklerine dair bir çalışma bulunmasa da VSEL'lerin bir belirteci olarak bilinen Sca-1 (Ly6a olarak da bilinir) ifadesi daha sonrasında CD49f+ hücrelerde hem protein düzeyinde flow sitometri ve immünohistokimyasal boyama ile hem de mRNA düzeyinde qPCR ile ölçüldü.

CD49f ifade eden hücrelerin yüzdesi *unstained* hücrelerin CD49f ifadelerine göre flow sitometri ile analiz edildiğinde, CD49f+ hücrelerin %90-99 oranında saflaştırılmış olduğu saptandı (Şekil 3.2c). CD49f- ("*flow-through*") fraksiyonda total hücrelerin yaklaşık %4.14'ünün CD49f ifade ettiği bulundu, ki bu da *pre-sort* fraksiyondakinden (%50.34) oldukça düşüktü. Daha önce literatürde yapılmamış bu total testiküler kök hücre izolasyonu protokolü ve sonrasında CD49f+ popülasyonun immünomanyetik seçilimi sonucunda tüm *sorting* deneylerinde %90-99 saflıkta elde edilen CD49f+ hücreler arasında %87.84 canlı, %1.55 nekrotik, %5.14 erken apoptotik ve %5.47 geç apoptotik hücrelere rastlandı (Şekil 3.2d).

3.3. CD49f+ GKH'lerin GKHBH'lere *In Vitro* İndüksiyonu ve Karakterizasyonu

Flow sitometri ile saflığı tayin edilen zenginleştirilmiş (CD49f+) GKH'ler, Kanatsu-Shinohara ve ark., (2003), Kubota ve ark., (2004b) çalışmalarında tarif edilen protokollere uygun olarak MMC ile inaktive edilmiş >%95 saflıktaki GATA4+ TSH'ler (Şekil 3.1c, sağ panel) üzerinde ve ortama eklenen GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF ve mLIF'in 2 günde bir yenilenmesiyle >3 ay boyunca *in vitro* olarak çoğaltılabilmektedir.

Kültür başlangıcında CD49f+ GKH'ler %1 Matrigel® kaplı 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarına ekildiğinde 1 haftanın sonunda sınırları belli olmayan 10-20 hücreden oluşan üzüm salkımı-benzeri yapıda koloniler oluşturmaya başladı. 10. günde koloniler gözle görülür bir şekilde büyüdüğünde EDTA ile non-enzimatik olarak kaldırılıp inaktive edilmiş TSH'ler üzerine ekildi ve her 4-7 günde bir aynı şekilde pasajları yapıldı (Şekil 3.2a). 5 pasaj boyunca yine aynı sınırları belli olmayan 50-70 hücreli koloniler oluşmaya devam etse de az sayıda farklılaşmaya başlamış birbirlerine daha gevşek bağlı hücrelerin oluşturduğu koloniler de gözlemlendi (Şekil 3.3, sol panel). Böyle bir durumla karşılaşıldığında, stereomikroskop altında ve bir mikromanipülatör yardımıyla farklılaşmamış koloniler manüel olarak seçildi (Şekil 3.3, sağ panel). Sınırları belli olmayan kompakt hücre kolonileri alkalen fosfotaz (AP) aktivitesi gösterdi (Şekil 3.3; sol panel, bkz. beyaz kenarlıklı eklenti).

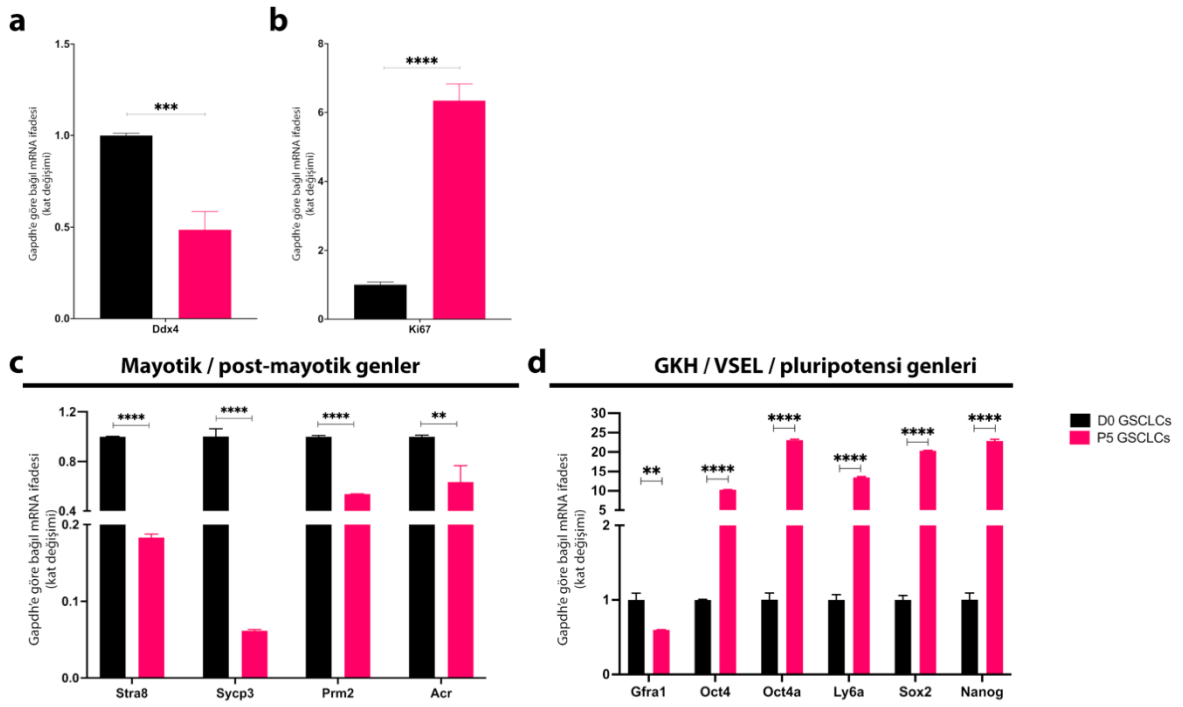


Şekil 3.3: (sol panel): GKHBH'lerin oluşturduğu iki farklı tipte koloninin P5'teki parlak alan mikroskopunda çekilmiş fotoğrafı (20X; Ölçek çubuğu = 50 µm). Farklılaşmamış GKH'ler, birbirlerine daha gevşek bağlı farklılaşmaya gitmiş GKH'lere kıyasla, daha kompakt ve sınırları belli olmayan koloniler oluşturur. Kompakt şekilli kolonilerde alkalen fosfataz aktivitesi (beyaz kenarlıklı eklentide yeşil boyalı, AP) görülmüştür (10X; Ölçek çubuğu = 100 µm). (sağ panel): Farklılaşmamış kolonilerin TSH besleyici tabakası üzerinden stereomikroskop altında bir mikromanipülatör yardımıyla seçimi.

Kanatsu-Shinohara ve ark., (2003) çalışmasında kullanılan medyada küçük modifikasyonlarla oluşturduğumuz GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF ve mLIF ile tamamlanmış StemPro-34 (Invitrogen)-bazlı serumsuz GKH kültür medyasında uzun süreli kültüre edilmiş AP+CD49f+ GKH'lerin (GKHBH) ve kültür ortamına konulmayan CD49f+ GKH'lerin moleküler kimliği qPZR ile ilgili belirteçlerin ifadelerine bakılarak karşılaştırıldı. Sonuçlarımız, kullandığımız zenginleştirilmiş kültür ortamının hücrelerin potansillerinde değişiklikler meydana getirdiğini gösterdi

(Şekil 3.4). Literatürde yer alan az sayıdaki çalışmada GKH'lerin spontan olarak pluripotent kök hücrelere dönüşebildiği bildirilmiştir (Cheng ve ark., 2012b; Guan ve ark., 2006; Huang ve ark., 2009; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004; Ko ve ark., 2009; Kossack ve ark., 2009; Lee ve ark., 2018; Liu ve ark., 2016; Seandel ve ark., 2007). P5'teki GKHBH'lerin (P5 GSCLCs grubu), farklılaşmamış EKH'leri idame ettirmek için gerekli olan *Oct4a* (**** $p<0.0001$), *Sox2* (**** $p<0.0001$) ve *Nanog* (**** $p<0.0001$) pluripotensi belirteçlerini MACS sonrası 0. güne (D0 GSCLCs grubu) göre yaklaşık 20 kat daha fazla ifade ettiği saptandı. GKH belirteçlerinden *Gfra1* gen ekspresyonu 1.7 kat azalırken (** $p<0.01$), *Oct4* (*Oct4b* olarak da bilinir) (Guo ve ark., 2012) ifadesinde 10 kat artış görüldü (**** $p<0.0001$). *Ly6a*'nın mRNA ifadesi ise D0 GSCLCs grubuna göre 13 kat artış gösterdi (**** $p<0.0001$) (Şekil 3.4d). Ayrıca, P5 GKHBH kolonilerinin çoğalma kapasitesi, CD49f belirteciyle saflaştırıldığı ilk duruma göre *Ki67* mRNA ifadesinin 6 kat artmasıyla (**** $p<0.0001$) belirlendiği üzere, artış gösterdi (Şekil 3.4b). CD49f+ GKH kültüründe ifade edilen genler arasında germ hücresine özgü *Ddx4* de olmasına rağmen, P5 GKHBH'lerdeki gen ifadesi 2 katlık bir düşüş gösterdi (** $p<0.001$) (Şekil 3.4a). P5'e getirmek için yaklaşık 7 hafta kültür ortamında kalan GKH'lerin spontan spermatogenik farklılaşmasını ekarte etmek için, farklılaşmış germ hücrelerine özgü transkriptler incelendi ve *Stra8* (**** $p<0.0001$), *Sycp3* (**** $p<0.0001$), *Prm2* (**** $p<0.0001$) ve *Acr* (** $p<0.01$) genlerinin transkript seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (Şekil 3.4c).

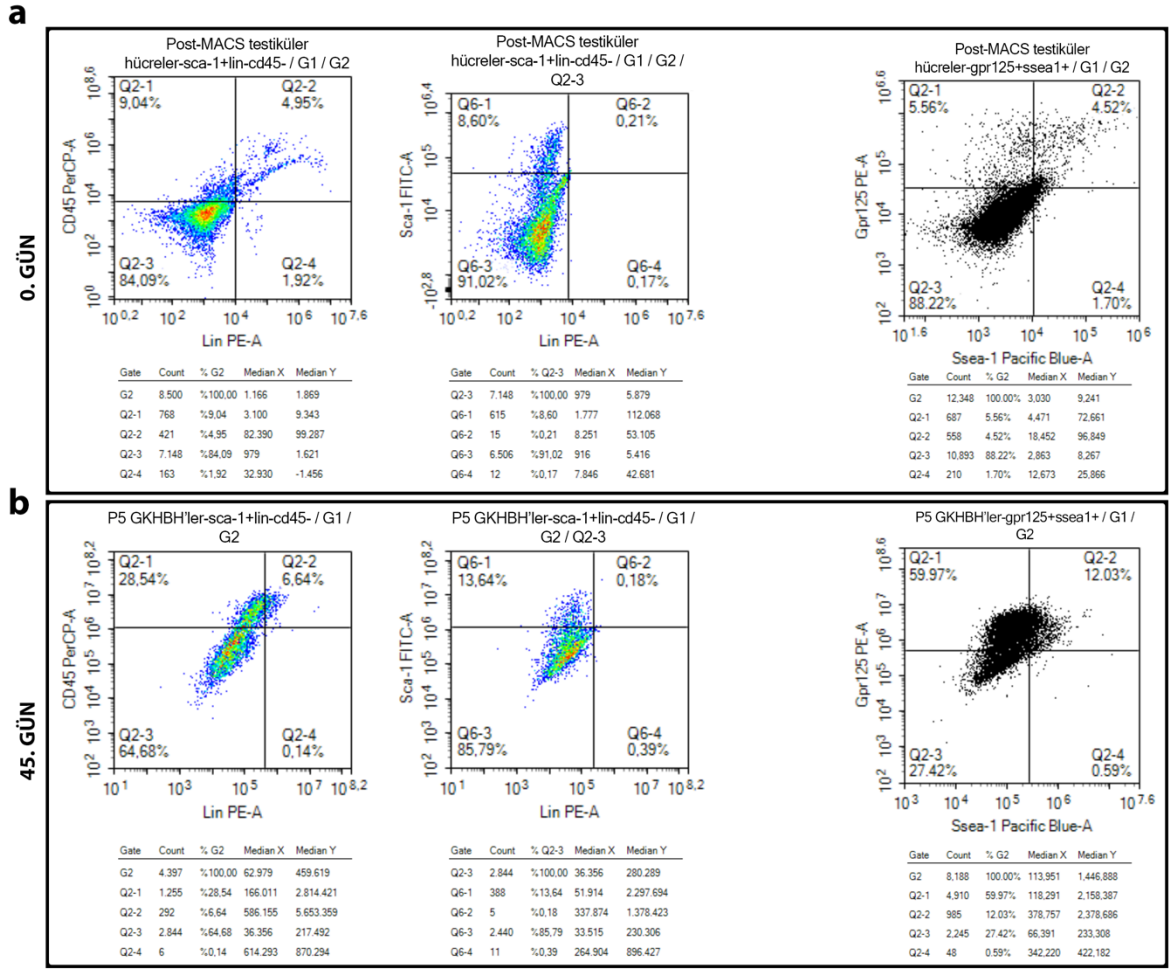
Bu da GKH/GKHBH dönüşümünü sağlayan *in vitro* kültür sistemimizin, hücreleri undiferansiye durumda tutup proliferasyon yeteneğini arttırırken, undiferansiye spermatogonyum kimliklerinden uzaklaştırıp daha ilkel pluripotent özellikteki hücrelerin belirteçlerini kazandırdığını gösterebilir.



Şekil 3.4: AP+CD49f+ GKH/BH kolonilerde (pembe sütun) (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): proliferasyon (*Ki67*), (c): mayotik/post-mayotik (*Stra8* ve *Sycp3/Prm2* ve *Acr*), (d): GKH/VSEL/pluripotensi (*Gfra1* ve *Oct4/Ly6a/Oct4a*, *Sox2* ve *Nanog*) belirteçlerinin mRNA düzeyindeki ifadelerinin zenginleştirilmiş kültür ortamına koyulmamış CD49f+ GKH'lerdekilere (siyah sütun) göre kat değişimi olarak verilmiştir. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

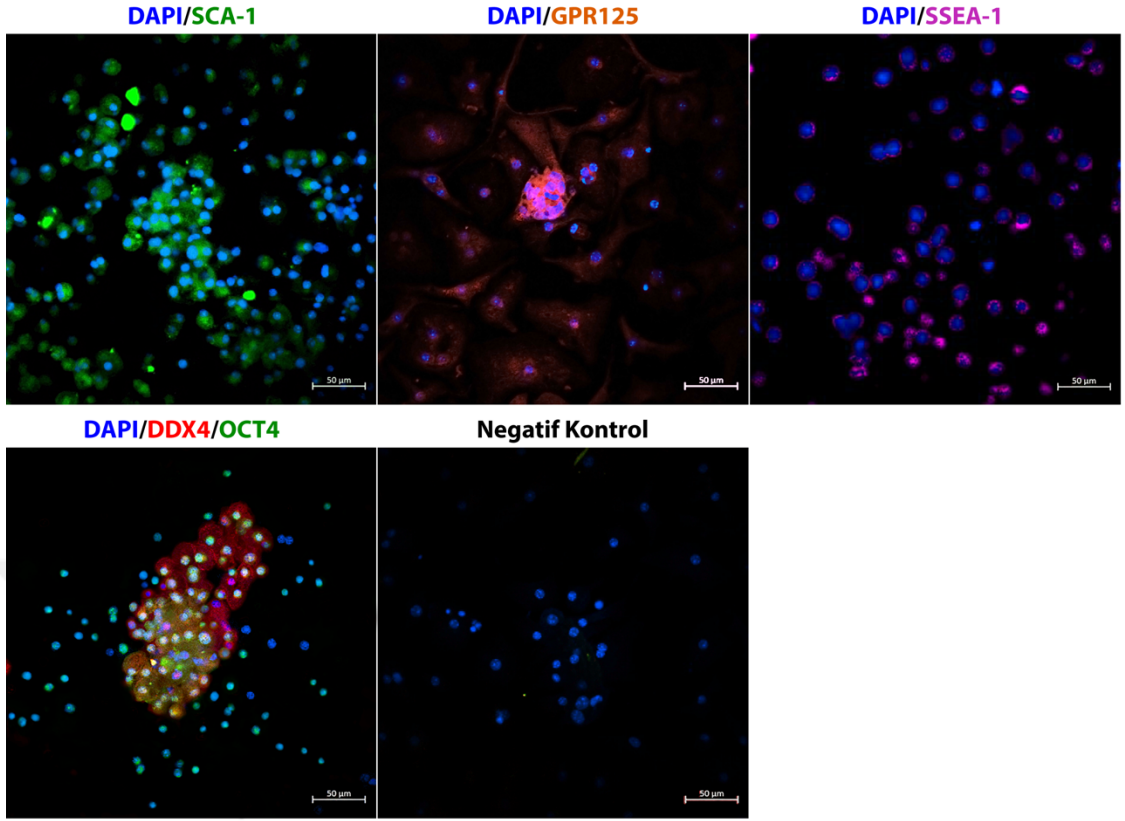
P5'teki GKH/BH'ler SSEA-1 (EKH belirteci) (Solter ve Knowles, 1978), GPR125 (multipotent yetişkin spermatogonyal-kökenli kök hücre; MASC belirteci) (Seandel ve ark., 2007) ve SCA-1+/CD45-/LIN- (VSEL'lerin immünofenotipik ifade profili) (Bhartiya ve ark., 2014; Kucia ve ark., 2006; Patel ve Bhartiya, 2016) protein ifadesi için flow sitometrik olarak incelendiğinde, GPR125 ifade eden hücrelerin yüzdesi MACS ile ayırım yapılmamış örneğe göre %10.08'den (Şekil 3.5a) %72'ye (Şekil 3.5b) artış gösterirken, SSEA-1+ hücrelerin yüzdesi %6.22'den (Şekil 3.5a) %12.62'ye (Şekil 3.5b) yükseldi. SCA-1+/CD45-/LIN- VSEL'lerin oranı ise %8.60'tan (Şekil 3.5a) %13.64'e (Şekil 3.5b) yükseldi.

Sonuçlar, geliştirdiğimiz zenginleştirilmiş *in vitro* kültür ortamının, SSEA-1 fare EKH-spesifik belirtecini, GPR125 multipotent yetişkin kök hücre belirtecini ve CD45-/LIN- popülasyon içerisindeki SCA-1 VSEL belirtecini ifade eden hücrelerde sırasıyla yaklaşık 2 kat, 7 kat ve 1.6 kat artış meydana getirdiğini gösterdi.



Şekil 3.5: (a): MACS sonrası 0. günkü CD49f+ GKH'lerde ve (b): AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinde SCA-1, CD45, LIN, GPR125 ve SSEA-1 ifadelerinin flow sitometrik incelenmesi.

İmmünohistokimyasal boyama ile de TSH besleyici tabakası üzerine ekilmiş P5'teki GKHBH kolonilerinde protein düzeyinde SCA-1, GPR125, SSEA-1 ve DDX4/OCT4 ifadeleri incelendiğinde (Şekil 3.6), hücrelerin çoğunda SCA-1'in yoğunlukla sitoplazmada ve SSEA-1'inse nükleusta immüno lokalize olduğu bulundu. GPR125 ise çoğunlukla kompakt kolonilerde güçlü pozitifliği. DDX4 ifadesi büyük oranda sitoplazmada ve membranda görülüp hücrelerin çoğunda zayıf pozitiflikte saptanırken bunların bir kısmında nükleusa ve/veya sitoplazmaya lokalize OCT4 ifadesi gözlemlendi. DDX4-/OCT4+ hücreler DDX4+ hücrelere göre boyut olarak daha küçüktü ve daha az miktardaydı (Şekil 3.6).



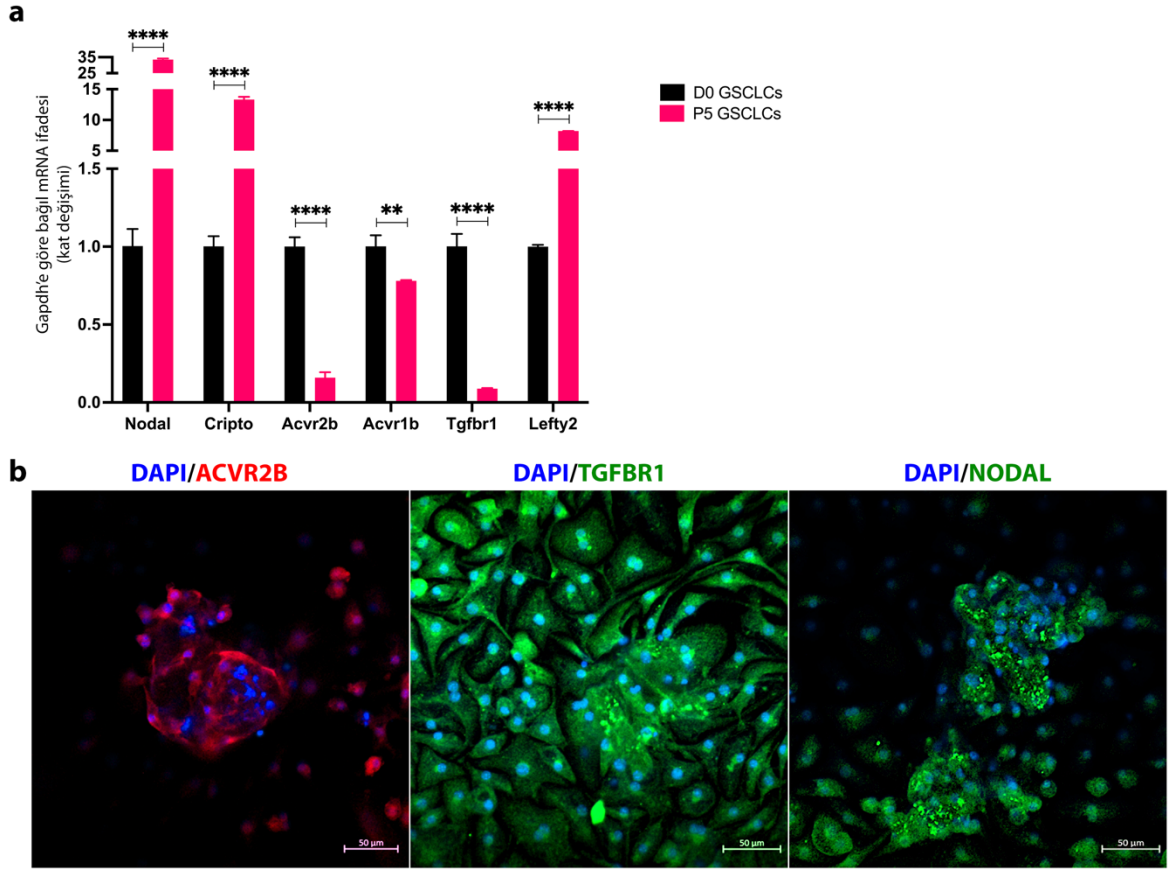
Şekil 3.6: AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinin immünohistokimyasal boyaması ile protein düzeyinde karakterizasyonu. P5 GKHBH'ler SCA-1 (yeşil), GPR125 (turuncu), SSEA-1 (magenta) ve DDX4 (kırmızı)/OCT4A (yeşil) ifadesiyle karakterize edilmiştir. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 50 μ m).

3.4. GKHBH'lerde Nodal Yolağı Elemanlarının Tanımlanması

In vitro kültür ortamında TSH'ler üzerinde ve bahsettiğimiz altı büyüme faktörüyle muamele edilen GKH'lerde 45. günde (P5) pluripotensi belirteçlerinde mRNA ve protein düzeyinde artış saptadığımız için GKH'lerde spontan olarak pluripotensinin tetiklenmiş olabileceğini düşündük. Bu hücreleri germline kök hücre-benzeri hücreler (GKHBH) olarak isimlendirdik ve bu durumun pluripotensinin korunmasıyla daha önceden ilişkilendirilen Nodal yolağıyla bağlantılı olup olmadığını test etmek için Nodal yolağı elemanlarının ifadelerinde de 45. günün sonunda benzer bir artış olup olmadığını yine mRNA ve protein düzeyinde inceledik. 45. gün hücrelerinde (P5 GSCLCs), *Acvr1b* (*Alk4*), *Lefty2*, *Acvr2b*, *Cripto* ve *Nodal*'ın yanında *Tgfbr1* gen ifadeleri kültür ortamına alınmamış CD49f+ hücrelerinkine (D0

GSCLCs) kıyasla qPZR ile incelendi (Şekil 3.7). 0. güne göre mRNA seviyelerindeki artış kat değişimi olarak; *Nodal* için 34 (**** $p<0.0001$), *Cripto* için 13 (**** $p<0.0001$) ve *Lefty2* için 8 (**** $p<0.0001$) şeklinde bulunmuştur. Öte yandan, 0. güne göre, *Acvr2b* gen ifadesi 6 kat (**** $p<0.0001$), *Acvr1b* gen ifadesi 1.3 kat (** $p<0.01$) ve *Tgfbr1* gen ifadesi de 11 kat (**** $p<0.0001$) azalmıştır (Şekil 3.7a). P5 GKHBH'lerin protein düzeyinde de, ACVR2B (Nodal kinaz reseptör kompleksi reseptörü), TGFBR1 (TGF- β kinaz reseptör kompleksi reseptörü) ve NODAL'ı eksprese ettikleri bulundu (Şekil 3.7b). TGFBR1 boyaması aynı zamanda TSH besleyici tabakasında da saptandı.

Nodal sinyalleşmesi, pluripotensiyi korumak ve erken erkek germ hücre farklılaşmasını önlemek için önemli olduğundan (Miles ve ark., 2013; Spiller ve ark., 2012), zenginleştirilmiş kültür ortamı ve metodumuzun, Nodal sinyalleşme elemanlarının ifadesinde de pluripotensi belirteçlerinde olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olması, 45. gündeki hücrelerin, literatürde yer alan undiferansiye morfolojideki ve AP+ EKH-benzeri hücre (Şekil 3.3, sol panel) seviyesine spontan olarak dönüşmüş olabileceğini gösterebilir.



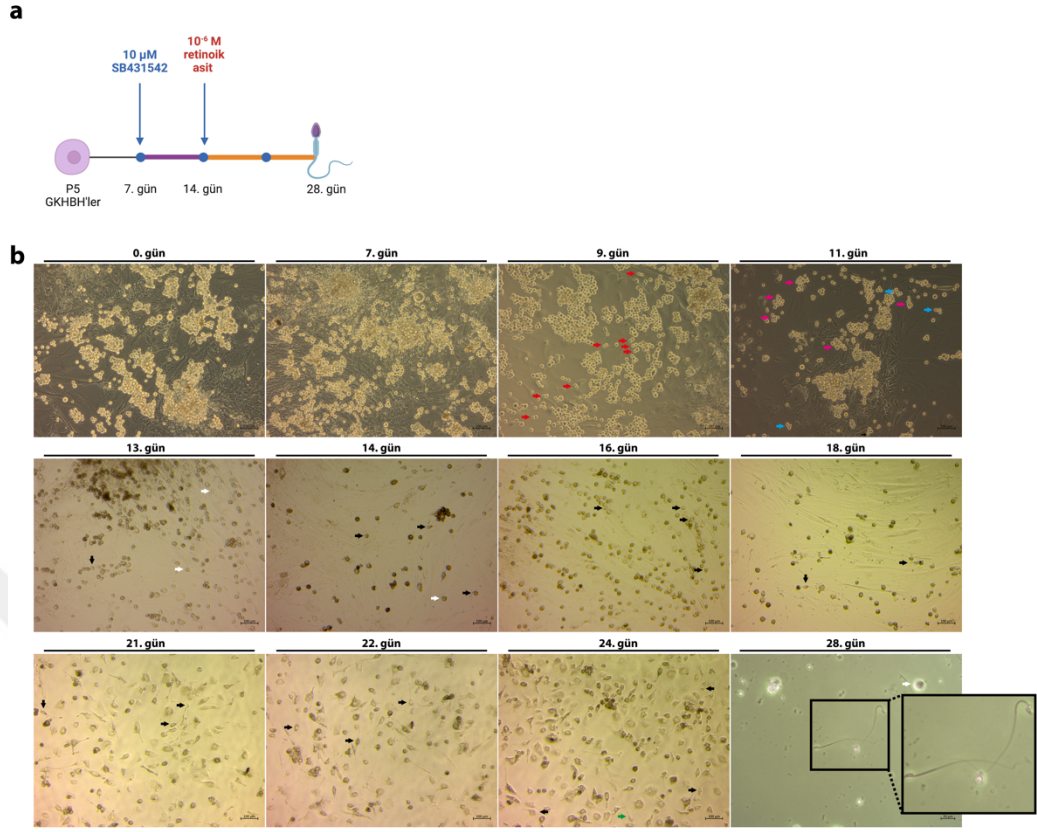
Şekil 3.7: AP+CD49f+ GKHBH'lerde Nodal sinyalleşme yolağı elemanlarının gen ekspresyonu ve immüno boyanması. (a): *Nodal*, *Cripto*, *Acvr2b*, *Acvr1b*, *Tgfr1* ve *Lefty2* gen ekspresyonu qPCR ile 0. gün CD49f+ GKH'lerinde (siyah sütun) ve 45. gün GKHBH'lerde (pembe sütun) ölçüldü. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder. (b): ACVR2B (kırmızı), TGFBR1 (yeşil) ve NODAL (yeşil) P5 GKHBH'lerinde saptandı. Nükleuslar DAPI ile mavi renkte boyanmıştır (40X; Ölçek çubuğu = 50 μm).

3.5. GKHBH'lerin *In Vitro* Ortamda Mayotik Germ Hücrelerine ve Sperm-Benzeri Hücrelere Farklılaştırılması

AP+CD49f+ GKHBH'lerin *in vitro* ortamda mayotik germ hücrelerine farklılaşabilme yeteneklerini test etmek için bu aşamadaki hücreler MMC ile inaktive edilmiş TSH besleyici tabakası üzerine ekilip yine beklenilen morfolojide koloni oluşumu gözlemlendiği 7. günde GKH kültür besiyeri II, 10 uM SB431542 eklenen bazal farklılaşma besiyeri ile değiştirildi. Bu, 7 gün SB431542 ile başlayan, ardından 14 gün 10^{-6} M RA ile devam eden toplamda 28 gün süren iki-aşamalı bir farklılaştırma

(Şekil 3.8a) olduğundan hücrelerin farklılaşma durumu SB431542 eklenmesinden 7 gün sonra ve 28. günde (7 gün SB431542 + 14 gün RA) mRNA ve protein düzeyinde değerlendirildi. Farklılaşma kontrolü olarak bir grup hücre, aynı süre boyunca ve aynı işlemler uygulanarak GKH besi yeri II ile kültüre edildi.

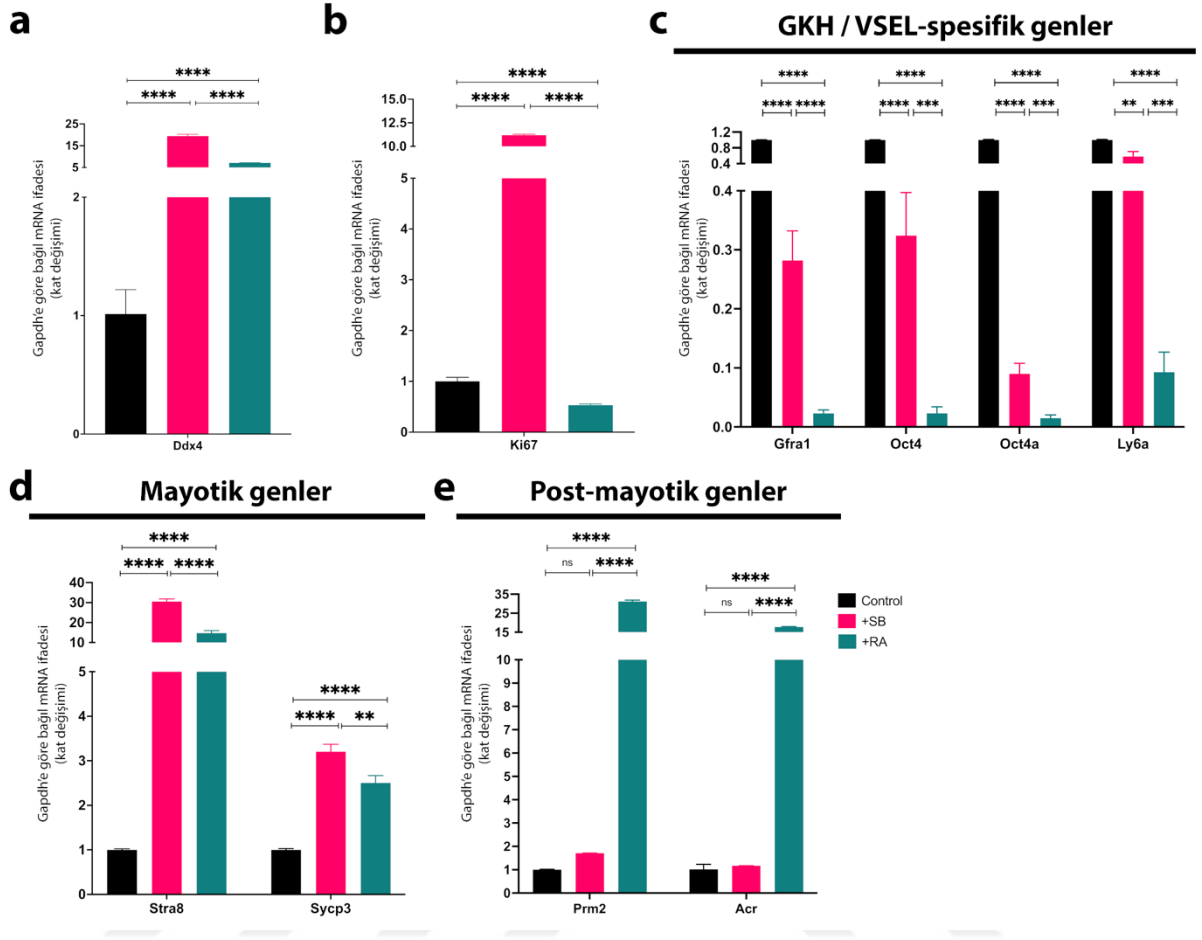
In vitro olarak spermatozoaya farklılaşma kapasiteleri incelendiğinde, kültürün 9. gününde kümeleşmesi artan GKHBH kolonileri paired (A_{pr}) spermatogonya (2 hücre) olarak ayrıldı ve 11. günde aligned (A_{al-4}) spermatogonya (4 hücre) ve A_{al-8}/A_{al-16} spermatogonya (8/16-hücre) oluşturdu ve spermatonyumların rengi daha koyulaşarak 13. günde büyümeleri yavaşladı ve çoğu hücre TSH besleyici tabakadan ayrılmaya başladı. 13. gün aynı zamanda ilk defa spermatosit-benzeri hücreden SA spermatid-benzeri hücrenin görüldüğü zamandı. SB431542 içeren besi yerinin RA içerenle değiştirilmesi 14. günde olup, bundan 2 gün sonra koyu renkli spermatogenik hücre kümeleri yerini esas olarak tekli hücrelere bıraktı. 21. günde birden fazla uzantıları olan hücreler tabana yapışık halde gözlendi. 24. günde makrosefalik amorf sperm görülmesi ve çok sayıda hücrenin ölümüyle beraber 28. günde az sayıda immotil sperm-benzeri hücreye rastlandı (Şekil 3.8b).



Şekil 3.8: (a): AP+CD49f+ GKHBH’lerin mayotik/sperm hücrelerine iki-aşamalı *in vitro* farklılaşma protokolünün şematik gösterimi. (b): AP+CD49f+ GKHBH kolonilerinin sperme *in vitro* farklılaşmalarının indüklenmesi sırasında parlak alan mikroskopunda çekilmiş fotoğraflar. Fotoğrafların çekildiği günler üstlerinde verilmiştir (10X; Ölçek çubukları = 100 µm). Koloniler TSH besleyici hücreleri üzerinde 7 gün SB431542 ile kültüre edilmelerini takiben RA ile 14 gün kültüre edildi. Kültürün 9., ve 11. günlerinde sırasıyla Apr spermatogonya (2-hücreli; kırmızı ok) ve Aal-4 ve Aal-8/Aal-16 spermatogonya (4-hücreli ve 8-hücreli/16-hücreli; açık mavi ve pembe ok) oluşturdu. Spermatositler (beyaz ok) ve spermatidler (siyah ok) kültürün 13-24. günlerinde görüldü. Uzun kuyruklarıyla amorf sperm-benzeri hücreler (yeşil ok) ise çoğunlukla kültürün 24. gününde gözlemlendi. Kültürün 28. gününde ise geniş çaplı hücre ölümüyle birlikte az sayıda primer spermatosit ile sperm-benzeri hücre (siyah çerçeve) de görüldü (40X; Ölçek çubuğu = 20 µm).

Morfolojik olarak gözlenen mayotik indüksiyon ve post-mayotik germ hücrelerine farklılaşmayı transkripsiyonel olarak ve protein düzeyinde verifiye etmek için qPZR ve immünohistokimyasal boyama yapıldı. AP+CD49f+ GKHBH’lerde 0. gün CD49f+ GKH’lere göre daha az ifade edilen *Ddx4*’ün ifadesi (Şekil 3.4a) SB431542 varlığında 19 kat artış gösterirken (****p<0.0001), RA ile muammele edilen germ hücrelerinde, SB431542 ile kültüre edilmiş germ hücrelerinkine göre ifadesi azalmış olarak bulundu (****p<0.0001) (Şekil 3.9a). DDX4, germ hücrelerinde spermatogonyumdan yuvarlak spermatidlere kadar olan aşamalarda ifade edilirken, en güçlü ifade erken spermatosit aşamasında görülür (Toyooka ve ark.,

2000). Bu sonuç SB431542 tedavisinin 6. ve 7. günlerinde GKHBH'lerden spermatosit-benzeri hücre farklılaşmasının mikroskopik incelemede görülmesiyle tutarlıydı (Şekil 3.8b). Spermatogenik hücre çoğalma durumunu ölçmek için *Ki-67* ifadesine bakıldığında, SB431542 varlığında indüklenmemiş kontrol hücrelerine göre mRNA seviyesinin 6 kat arttığı (**** $p<0.0001$), RA sonrası ise kontrole kıyasla azaldığı saptandı (**** $p<0.0001$) (Şekil 3.9b). Ki67 bir hücre proliferasyonu belirtecidir (Scholzen ve Gerdes, 2000) ve esas olarak spermatogonya ve primer spermatositlerde, sadece spermatogonya ve primer spermatositlere sahip, tip I seminifer tübüllerde eksprese edilir. Bununla birlikte yuvarlak spermatidler tip II seminifer tübüllerde görüldüğünde, Ki67 esas olarak spermatogonyunda eksprese olur (Mengmeng ve ark., 2016). Bu sonuçlar bize, primer spermatositlerin yuvarlak spermatidlere farklılaştığı zaman proliferatif yeteneğin azalabileceğini düşündürdü. Beklenildiği gibi *Gfra1* ve *Oct4* GKH belirteçleri transkript düzeyinde SB431542 grubunda kontrole göre sırasıyla 3.5 kat (**** $p<0.0001$) ve 3 kat (**** $p<0.0001$) ve RA grubunda SB431542 grubuna göre sırasıyla 12 kat (**** $p<0.0001$) ve 14 kat (** $p<0.001$) azaldı. Benzer şekilde *Oct4a* ve *Ly6a* VSEL belirteçleri transkript düzeyinde SB431542 grubunda kontrole göre sırasıyla 11 kat (**** $p<0.0001$) ve 1.7 kat (** $p<0.01$) ve RA grubunda SB431542 grubuna göre 6'şar kat (her ikisi de *** $p<0.001$) istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (Şekil 3.9c). Şekil 3.9d'de germ hücrelerinde mayozun başlatılması için gerekli olduğu bilinen *Stra8*'in ve sinaptonemal kompleks proteini *Sycp3*'ün mRNA seviyelerinin SB431542 ilavesiyle sırasıyla 31 kat (**** $p<0.0001$) ve 3.2 kat (**** $p<0.0001$) arttığı, ardından RA grubunda ise SB431542'li gruba göre sırasıyla 2 kat (**** $p<0.0001$) ve 1.3 kat (** $p<0.01$) düştüğü saptandı. Bu sonuç da SB431542 eklenmesiyle amaçladığımız mitotik/mayotik geçişin transkripsiyonel olarak tetiklenerek mayozun indüklenmiş olabileceğini gösterir. *Prm2* ve *Acr* ifadesi SB431542 eklenmesiyle kontrole göre sırasıyla 1.7 kat (^{ns} $p>0.05$) ve 1.2 kat (^{ns} $p>0.05$) arttı ve SB431542'den sonra RA eklenmesiyle kontrole göre sırasıyla 31 kat (**** $p<0.0001$) ve 18 kat (**** $p<0.0001$) arttı. Yalnızca SB431542 verilen gruba göre RA tedavisi ise *Prm2* ifadesini 18 kat arttırırken (**** $p<0.0001$) *Acr* ifadesini de 15 kat yükseltti (**** $p<0.0001$) (Şekil 3.9e).

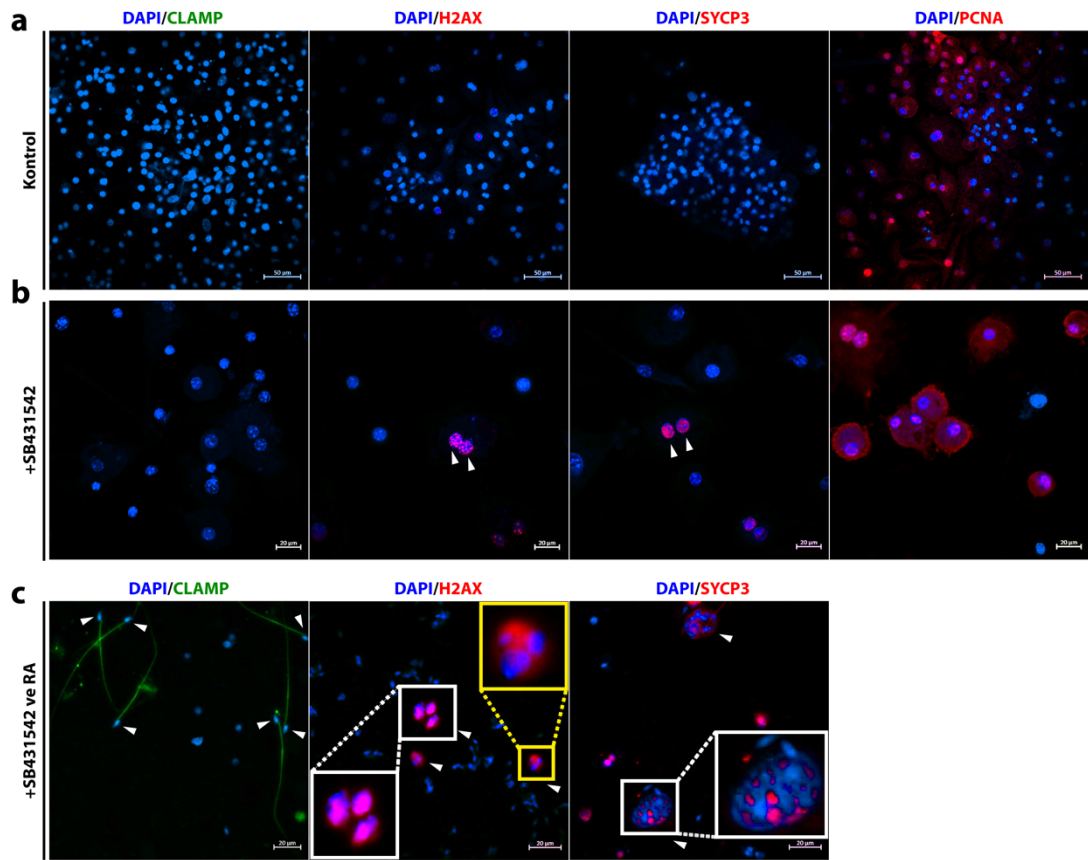


Şekil 3.9: AP+CD49f+ GKHBH'lerin *in vitro* ortamda sperme farklılaştırıldıkları (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): proliferasyon (*Ki67*), (c): GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), (d): mayotik (*Stra8* ve *Sycp3*) ve (e): post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin ifadelerinin indüklenmemiş kontrol hücrelerine (siyah sütun) kıyaslanmasıyla qPZR ile gösterildi. SB, SB431542 eklenerek (pembe sütun) ve RA, retinoik asit eklenerek (yeşil sütun) oluşturulmuş kültür ortamındaki örnekleri temsil eder. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

In vitro farklılaşma, SB431542 ile 7 gün kültüre edilen ve SB431542 ile 7 günün ardından RA ile 14 gün kültüre edilen hücrelerde (Şekil 3.8a) protein düzeyinde immünohistokimyasal olarak da doğrulandı (Şekil 3.10). H2AX/SYCP3 immünoboyaması, hem yalnızca SB431542 ile muamele edilen hem de SB431542'yi takiben RA verilen germ hücrelerinde nükleusta görüldü (Şekil 3.10b, c). Bununla birlikte kontrol grubunda H2AX/SYCP3 boyaması görülmedi ve dolayısıyla kontrol hücreleri mayozu girmediler ancak çoğunluğunun PCNA ekspresyonu göstermesiyle anlaşıldığı üzere, proliferasyona devam ettiler (Şekil 3.10a). Mikroskopik gözlem sonucu morfolojik olarak saptanan sperm-benzeri hücrelerin flagellumlarının güçlü bir şekilde CLAMP (SPEF1, sperm flagellar protein 1) ile boyandığı gözlemlendi (Şekil

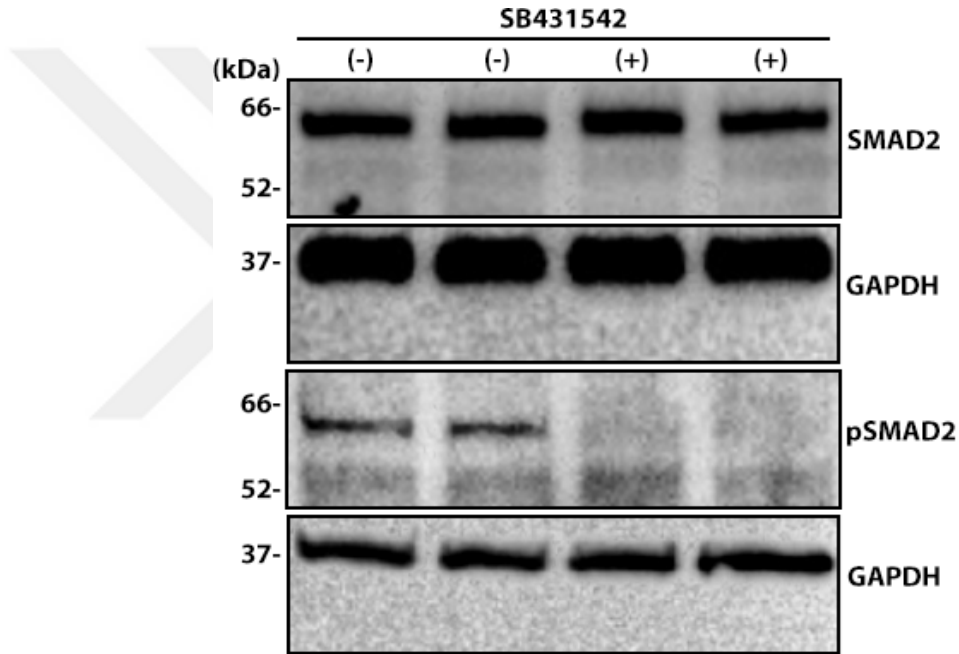
3.10c). CLAMP ifadesine farklılaşmaya sokulmamış kontrol grubu hücrelerinde ve SB431542 verilen grupta rastlanmadı (Şekil 3.10a, b).

Sonuç olarak SB431542 ilavesi, GKHBH'leri çoğunlukla leptoten spermatositlere indüklemişti, ki bu da mayoz bölünmenin başladığını gösterir. Bunu takiben RA uygulamasıyla, içlerinde mayozun daha ileri aşamasındaki pakiten ve diploten spermatositler ile kuyruk gelişimi olan spermilerin bir arada bulunduğu faza geçtiği izlendi.



Şekil 3.10: AP+CD49f+ GKHBH'lerden *in vitro* olarak farklılaştırılan spermatosit ve spermilerin immünohistokimyasal olarak boyanması ile protein düzeyinde karakterizasyonu (40X; Ölçek çubuğu = 20 µm). (a): GKH kültür besiyeri II ile kültüre edilmiş indüklenmemiş GKHBH'ler (kontrol grubu) ve (b): SB431542 içeren besiyeri ile 7 gün kültüre edilen GKHBH'lerin her ikisinde de PCNA (kırmızı) ekspresyonu saptanırken, H2AX (kırmızı) ve SYCP3 (kırmızı) ekspresyonunun sadece SB431542 verilmiş grupta leptoten aşamasındaki spermatositlerin (beyaz ok) nükleusuna lokalize olduğu bulundu. (c): SB431542'i takiben RA içeren besiyeri ile 14 gün ileri farklılaşması indüklenen spermatogonik hücrelerde spermatositlerin varlığı (beyaz ok), H2AX (kırmızı) ve SYCP3 (kırmızı) ekspresyonunun nükleusta spesifik olarak görülmesiyle gösterilirken aynı zamanda az sayıda CLAMP (yeşil) pozitif kuyruklu sperm hücrelerine (beyaz ok) rastlandı. Orta panelde pakiten (beyaz çerçeve) ve diploten (sarı çerçeve) aşamasındaki spermatositler büyütülmüş olarak verildi. En sağ panelde zigoten aşamasındaki bir spermatosit (beyaz çerçeve) büyütülerek gösterildi. Nükleus DAPI ile boyandı.

ALK4/ALK7 (ACVR1C) ve ALK5 (TGFB1) sinyalleşmesinin bloklandığını konfirm etmek için, 1 hafta boyunca 10 uM SB431542 ile muamele edilmiş GKHBH kolonilerinden farklılaşan mayotik/post-mayotik germ hücrelerinde total SMAD2 ve fosforile edilmiş SMAD2 (pSMAD2) seviyelerini değerlendirmek üzere Western blotlama yapıldı (Şekil 3.11). SB431542 ile farklılaştırılan ve SB431542 uygulamasıyla aynı süre boyunca ve aynı miktarda DMSO (SB431542'nin çözücüsü) ile muamele edilmiş, kontrol grubu örnekleri de benzer biçimde yüksek seviyede SMAD2 proteini içeriyordu. SB431542 muamelesi, DMSO kontrolüne kıyasla, P-SMAD2 seviyelerini neredeyse tespit edilemez seviyelere düşürdü (Şekil 3.11).

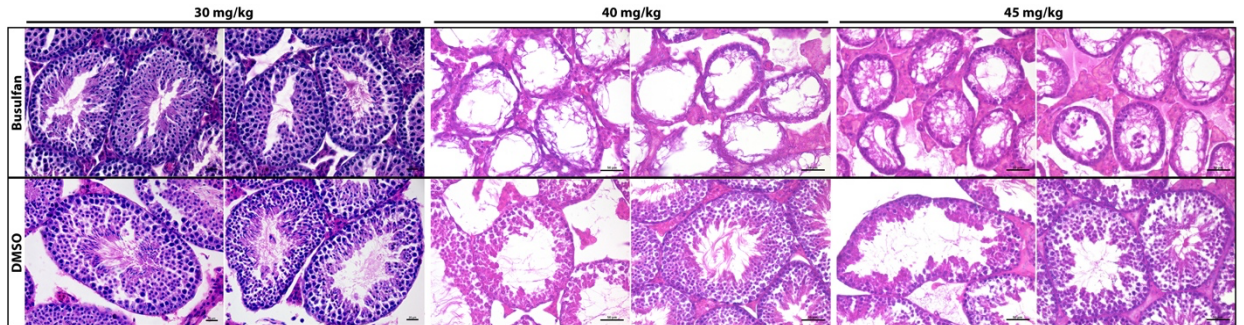


Şekil 3.11: AP+CD49f+ GKHBH'ler DMSO veya 10 uM SB431542 içeren bazal farklılaşma besi yeriyle 2 günde bir besi yeri değişimi yapılarak toplamda 1 hafta kültüre edildi ve SMAD2 ve fosforile SMAD2'ye (pSMAD2) özgü antikorlarla immünoblotlama kullanılarak kullanılan doz ve sürenin ALK4/5/7 sinyalleşmesi üzerindeki inhibe edici etkisine bakıldı. Blotlamanın prob edildiği antikorlar panellerin yanında verilmiştir. Temsili sonuçlar, n=4.

3.6. Busulfan-Kaynaklı İnfertil Fare Testislerine Transplante Edilen GKHBH'lerin TSH'lere Kıyasla Spermatogenez Restorasyonundaki Etkisi

Fare infertilite modeli oluşturmak için yapılan optimizasyon çalışmasında 30 mg/kg, 40 mg/kg ve 45 mg/kg olmak üzere üç farklı busulfan dozunun 8-haftalık

farelere i.p. olarak enjeksiyonundan sonra 35 gün beklenip testisleri, hematoksilin-eozin (H&E) ve immüno Floresan boyaması yapılarak ve qPZR ile germ hücresi belirteçlerinin ifadelerine bakılarak çalışıldı. Buna göre, 30 mg/kg busulfan dozunun DMSO kontrolü grubunda tübül çapı busulfan grubuna göre daha büyüktü. DMSO grubundaki tübüllerde spermatidler baskınken busulfan grubunda spermatositler baskındı. Johnsen skoru busulfan grubunda: 8.62 ve DMSO grubunda: 9.62 olarak hesaplandı. 40 ve 45 mg/kg busulfan gruplarında busulfan tedavisi gören testislerde seminifer tübüllerin çapları DMSO gruplarının neredeyse yarısı kadardı. Johnsen skorları 40 mg/kg busulfan grubunda: 3.07, 40 mg/kg DMSO grubunda: 9.02; 45 mg/kg busulfan grubunda: 3.16 ve 45 mg/kg DMSO grubunda: 9.05 olarak hesaplandı. 35 mg/kg busulfan-DMSO, 40 mg/kg busulfan-DMSO ve 45 mg/kg busulfan-DMSO gruplarına ait fotoğraflar Şekil 3.12’de verilmiştir. 40 mg/kg busulfanın infertil fare modeli oluşturmaya yeterli olduğunu gördüğümüz ve daha yüksek dozlara çıkıldığında farelerde busulfan-kaynaklı ölüm olasılığının önüne geçmek için bundan sonraki busulfan-kaynaklı germinal ablasyon oluşturulmuş testislerle ilgili deneylerde 40 mg/kg busulfan dozu kullanılmıştır.



Şekil 3.12: 30 mg/kg, 40 mg/kg veya 45 mg/kg busulfan ve her bir doz için karşılık gelen miktarda DMSO uygulanan 8-haftalık BALB/c erkek farelerin 35 gün sonra 5-um kalınlığındaki testis kesitlerine ait H&E boyanmış fotoğraflar (40X; Ölçek çubuğu= 20 um). Her bir doz ve her dozun çözücüsü için n=6 fare.

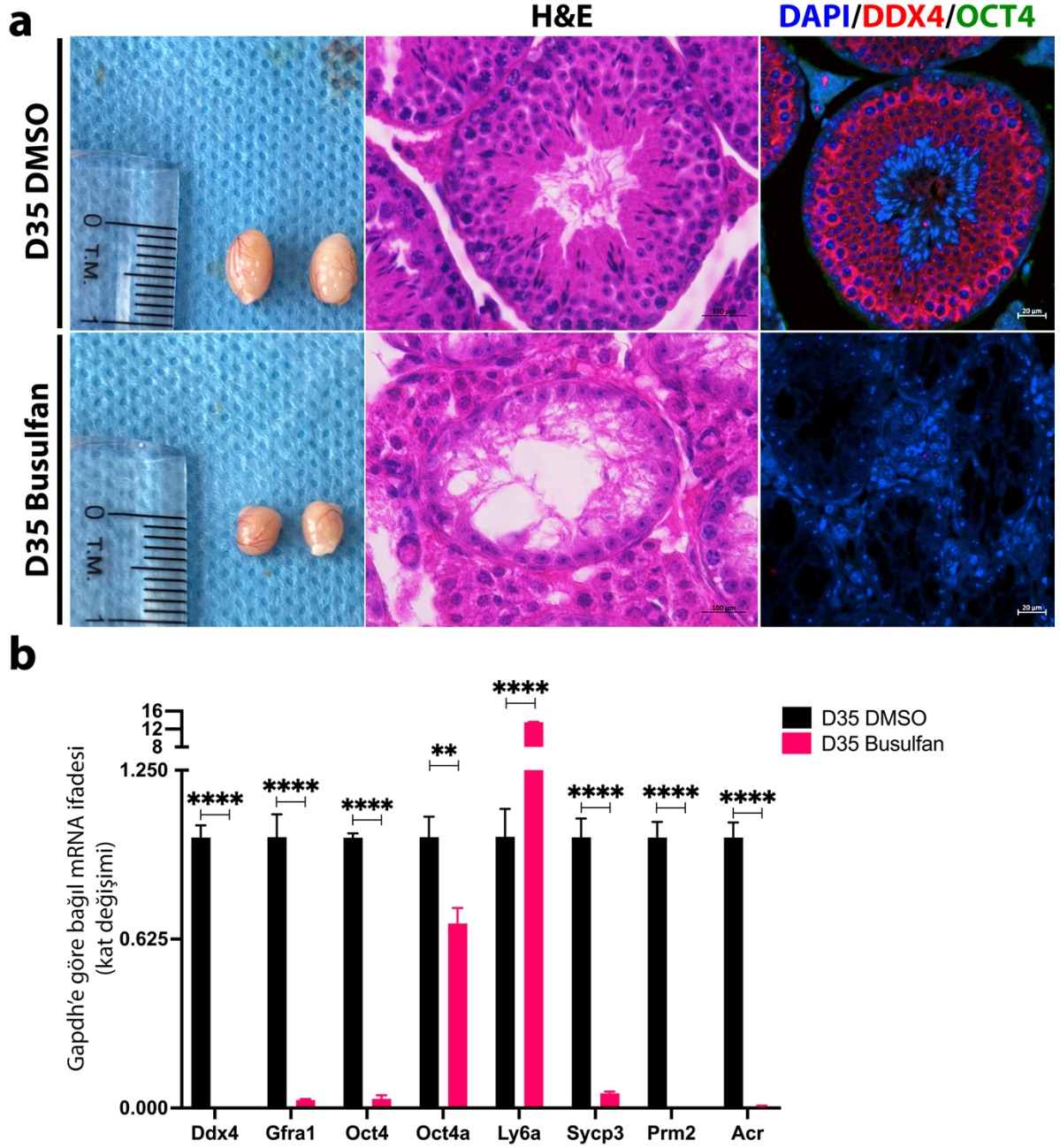
Busulfanın testiküler kök hücrelere olan etkisinin değerlendirilebilmesi için *Gfra1*, *Oct4*, *Oct4a* ve *Ly6a*’nın ifadeleri ve spermatogenezin tespiti için *Ddx4*, *Sycp3*, *Prm2* ve *Acr* genlerinin ifade seviyeleri qPZR kullanılarak mRNA düzeyinde incelendi (Şekil 3.13b). Aynı zamanda, 40 mg/kg busulfanın germ hücrelerinin deplesyonu ve testiküler nişte yarattığı hasarın undiferansiye GKH’ler üzerinde ne ölçüde etkili olduğuna ise busulfan uygulanan testis kesitlerine DDX4 ve OCT4 immüno boyaması

yapılarak bakıldı (Şekil 3.13a). DMSO kontrolüne kıyasla busulfan grubunda, *Gfra1* (****p<0.0001), *Oct4* (****p<0.0001) ve *Oct4a* (**p<0.01) gen ifadeleri sırasıyla 34, 30 ve 1.5 kat düşüş gösterirken, *Ly6a* ifadesinde 14 kat artış görüldü (****p<0.0001) (Şekil 3.13b). Bir grup araştırmacı Sca-1'in testiste bir VSEL belirteci olduğunu savunurken (Bhartiya ve ark., 2014; Kucia ve ark., 2006; Patel ve Bhartiya, 2016), diğerleri germ hücrelerinin Sca-1 ifade etmediğini; fakat, Sca-1'in peritübüler miyoid, endotelyal ve küresel şekilli peritübüler mezenkimal hücreler üzerinde interstisyel dokuda eksprese olduğunu savunmaktadır (van Bragt ve ark., 2005). Dolayısıyla DMSO grubuna göre *Sca-1* gen ifadesindeki 14 kat artış, Şekil 3.12, orta panelde morfolojik incelemede atrofi gözlenen tübülleri çevreleyen artan interstisyel yoğunlukla ilişkili olabilir.

Şekil 3.13a'da DMSO kontrol grubunda, bazal membranın üzerindeki hücrelerde testis lümeninin orta kısmına kadar DDX4 proteininin sitoplazmik ekspresyonu gözlemlendi. DDX4 sadece spermatogonyayı boyamakla kalmadı, aynı zamanda spermatositlerde de daha düşük yoğunlukta ifade edildi. DDX4+ hücreler ise beklenildiği gibi busulfan grubunda saptanmadı (Şekil 3.13a) ve bununla tutarlı olarak *Ddx4* transkript seviyesi de DMSO kontrolüne göre busulfan grubunda neredeyse sıfıra yaklaştı (****p<0.0001) (Şekil 3.13b). Şekil 3.13a'da OCT4 protein ekspresyonu, busulfan grubunda da DMSO grubunda da gözlenmedi. OCT4 ifadesinin bazal membranın üstündeki GKH'lerde gözlenmemesi kullanılan OCT4 antikoruyla bağlantılı olabilir (Niknejad ve ark., 2021). Çalışmada kullandığımız anti-Oct4 antikoru, insan OCT4 proteininin 1-134 amino asitlerini tanıyan bir fare monoklonal anti-Oct4 antikoru (sc-5279, Santa Cruz, ABD) ve literatürde daha önce Oct4a deteksiyonu için kullanılmıştır (Fong ve ark., 2011). Fare monoklonal anti-Oct4 antikorunun (sc-5279) fare pluripotent embriyonik karsinoma (P19) hücrelerinin Western blotlamasında tek protein bandı verip yalnızca nükleusta lokalize olduğu, buna karşın tüm insan OCT4'üne karşı üretilen bir tavşan poliklonal antikorunun (CSB-PA11579A0Rb) ise hem Oct4a hem de Oct4b'yi tespit ettiği ve Western blotlamada çift protein bandı verip sitoplazmada ve nükleusta lokalize olduğu daha önce gösterilmiştir (Liu ve ark., 2018). OCT4A transkripti ve proteini EKH'lerin pluripotensi özelliklerinden sorumlu olan bir transkripsiyon faktörüken, OCT4'un

non-pluripotensi varyantı ise OCT4B'dir (Jez ve ark., 2014). Gkountela ve ark., (2013), PGH'lerdeki OCT-4A'nın ya sitoplazmaya transloke olduğunu ya da muhtemelen degradasyon için orada attenüe edildiğini ve sitoplazmik OCT4A'nın öneminin bilinmediğini, ancak büyük global epigenetik değişikliklerle özellikle çakıştığını öne sürmüşlerdir (Gkountela ve ark., 2013). OCT4'ün sitoplazmik lokalizasyonu, OCT4B splice varyantının ifadesinden kaynaklanır (Atlasi ve ark., 2008). OCT4A ve OCT4B pluripotent kök hücrelerde eksprese edilirken (VSEL'ler de buna dahildir), OCT4B testiste unipotent GKH'lerinde ifade edilir. Dolayısıyla unipotent özellikteki GKH'lerinin DMSO kontrolünde sc-5279 fare monoklonal anti-Oct4 antikoru ile OCT4B+ GKH'leri saptayamamamız normaldir. Ancak, DMSO grubunda OCT4A+ VSEL hücrelerini de saptayamadık. Bu sonuç, Bhartiya ve ark.'nın (2010) orşiektomi geçiren erkeklerin testiküler germ hücre smearlerinde ve testis kesitlerinde sc-5279 antikoru kullanarak nükleer Oct-4A+ VSEL'lerin varlığını gösterdiği çalışmasıyla çakışmaktadır (Bhartiya ve ark., 2010). Yine görmeyi beklediğimiz gibi kemoablate edilen grubun testislerinde *Sycp3*, *Prm2* ve *Acr* ifadeleri, DMSO kontrolüne göre sırasıyla yaklaşık olarak 18, 1288 ve 179 kat azaldı (her üçü de **** $p<0.0001$) (Şekil 3.13b).

Sonuçlarımız 40 mg/kg busulfan verilmiş 8-haftalık farelerin 35 gün sonra infertil olduğunu ve transplantasyon deneyinde kullanılabileceğini gösterdi.



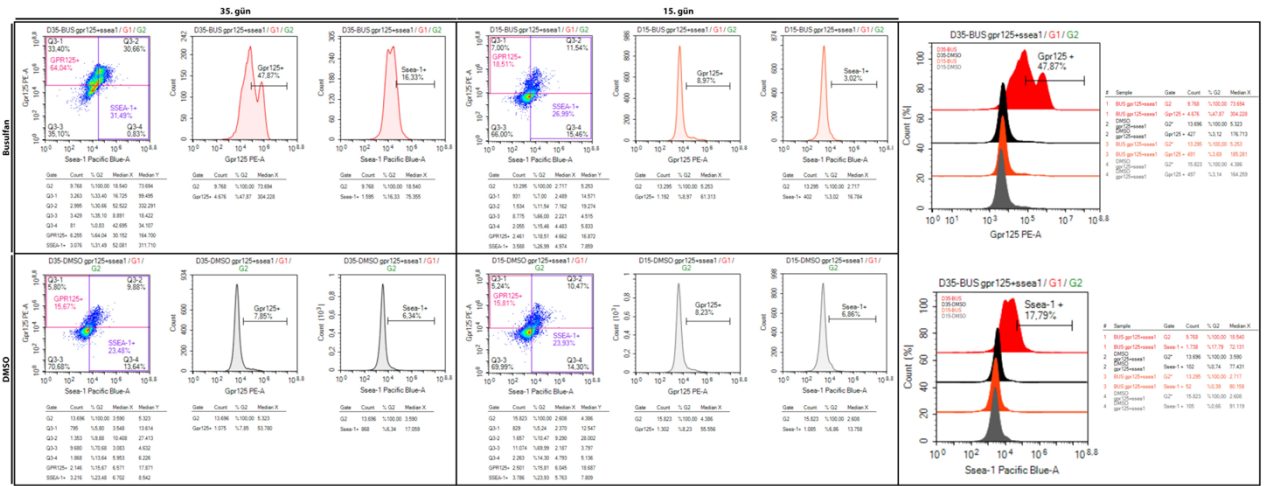
Şekil 3.13: (a): 40 mg/kg busulfan veya eşit miktarda DMSO verildikten 35 gün sonra testislerden alınan parafin kesitlerde DDX4 (germ hücresi belirteci) ve OCT4A (pluripotensi belirteci) boyaması (n=3; 40X, Ölçek çubuğu = 20 µm). Belirtilen dozda ve sürede busulfan ile atrofik ve germ hücrelerince deplete olmuş ve DMSO'ya kıyasla boyut olarak küçülmüş testislerde DDX4 ifadesine rastlanmamışken DMSO grubunda DDX4 sinyalleri bazal bölgede zayıftı ve farklılaşan hücrelerde daha güçlüydü. OCT4A ifadesinin ise sadece busulfan grubunda bazal laminanın hemen üstündeki bölgedeki az sayıdaki hücrede görece zayıf olduğu gözlenmiştir. Testis resimlerinin yanında H&E boyamaları da konulmuştur (n=3; 40X, Ölçek çubuğu = 100 µm). (b): 40 mg/kg busulfan (pembe sütun) ve eşit miktarda DMSO (siyah sütun) enjekte edildikten 35 gün sonra testislerde germ hücre (*Ddx4*), GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), mayotik (*Sycp3*) ve post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin transkript miktarları qPZR ile ölçüldü. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

35 gün sonrasında tam azoospermi gözlemlediğimiz 40 mg/kg busulfan (Şekil 3.12, orta panel; Şekil 3.13) uygulandıktan 15 gün sonra testiküler kök hücrelerin oranı, DMSO kontrolüne ve busulfan enjeksiyonu sonrası 35 gün geçmiş gruba göre flow sitometri ile karşılaştırıldı. Busulfandan sonra 15. günde testisteki hücrelerin %3.02'si SSEA-1 ifade ederken bu oran busulfanın 35. gününde %16.33'e yükseldi. Bu grupların DMSO kontrollerinde ise testiküler hücreler arasında SSEA-1+ hücreler, sırasıyla %6.86 ve %6.34 oranında vardı. Busulfan sonrası 15. günde GPR125+ hücreler, tüm hücreler içerisinde %8.97 oranında bulunurken bu oran 35. günde %47.87'ye yükselmiştir. 15. gün DMSO kontrolünde ve 35. gün DMSO kontrolünde tüm hücreler arasında GPR125 ifade eden hücreler, sırasıyla %8.23 ve %7.85'ti (Şekil 3.14).

Daha önce GPR125'in yalnızca germ hücrelerine spesifik olmadığı, aynı zamanda testiküler somatik hücre kültürlerinde de ifade edildiği gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2014). Testiküler kesitlerde GPR125 boyaması GKH'lerde ve Leydig hücrelerinde görülmüştür (He ve ark., 2010; Seandel ve ark., 2007). 40 mg/kg busulfan 35. gün fotoğraflarında, histolojik preparatlarda interstisyel alanda daha yoğun hücrelerin gözlenmesi ve busulfana görece dirençli GKH'lerin tedavi sonrasında kalması (Zheng ve ark., 2018) (Şekil 3.12, orta panel), Şekil 3.14'teki GPR125-zayıf pozitif ve GPR125-kuvvetli pozitif iki ayrı popülasyonu açıklayabilir.

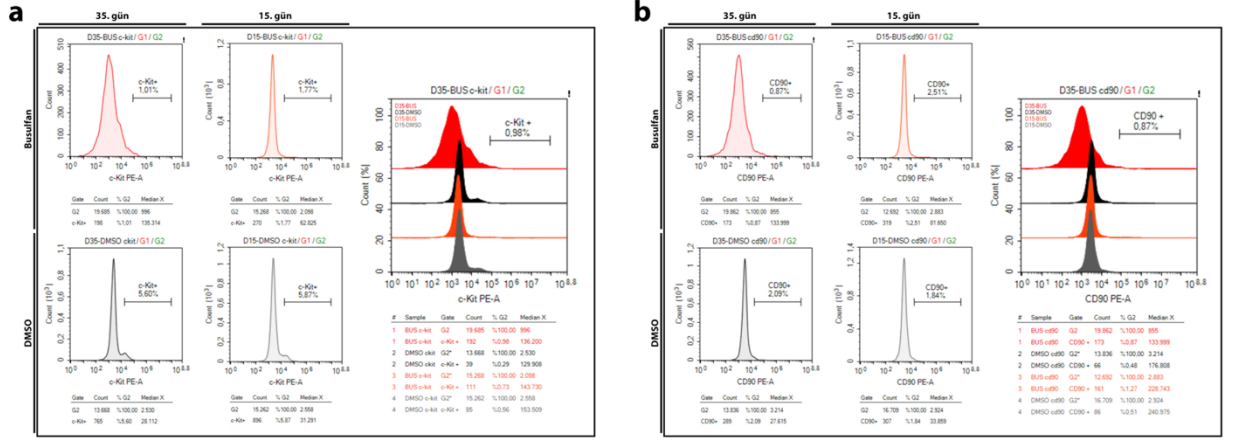
SSEA-1'in fare embriyolarında, EKH'lerinde (Solter ve Knowles, 1978), PGH'lerinde (Fox ve ark., 1981), gonositlerde (Kerr ve ark., 2008; Park ve ark., 2009), yenidoğan testisinden izole edilen fare GKH'lerinde (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004) ve VSEL'lerde (Kucia ve ark., 2006) ifade edildiği bilinmektedir. Ayrıca Kim ve ark., (2013) çalışmasında testisteki SSEA-1+ hücrelerin %40'ından fazlasının germline belirteci VASA, tip A spermatogonya belirteci PGP9.5 ve GKH belirteci PLZF için pozitif olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışma, SSEA-1'in GKH'lerinde ve interstisyel hücrelerde eksprese olduğu sonucuna varmıştır.

SSEA-1 ifadesinin 15. güne göre 35. günde 5 kat artış olması, busulfanın 35. gündeki etkisiyle mikroçevreyi onarmak veya germ hücrelerine transdiferansiye olmak amacıyla aktive olan busulfana-dirençli SSEA1+ VSEL hücrelerinin (Bhartiya ve ark., 2014; Grymala ve ark., 2014; Kassmer ve Krause, 2013) veya Kİ'ndeki mezenkimal kökenli SSEA1+ hücrelerin (Anjos-Afonso ve Bonnet, 2007; Kashani ve ark., 2014; Nayernia ve ark., 2006b; Nifontova ve ark., 2008; Zhang ve ark., 2014b) testise migrasyonu ile ilişkili olabilir.



Şekil 3.14: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra tüm testiküler hücreler içerisinde GPR125 ve SSEA-1 ifade edenler flow sitometri ile kantifiye edildi.

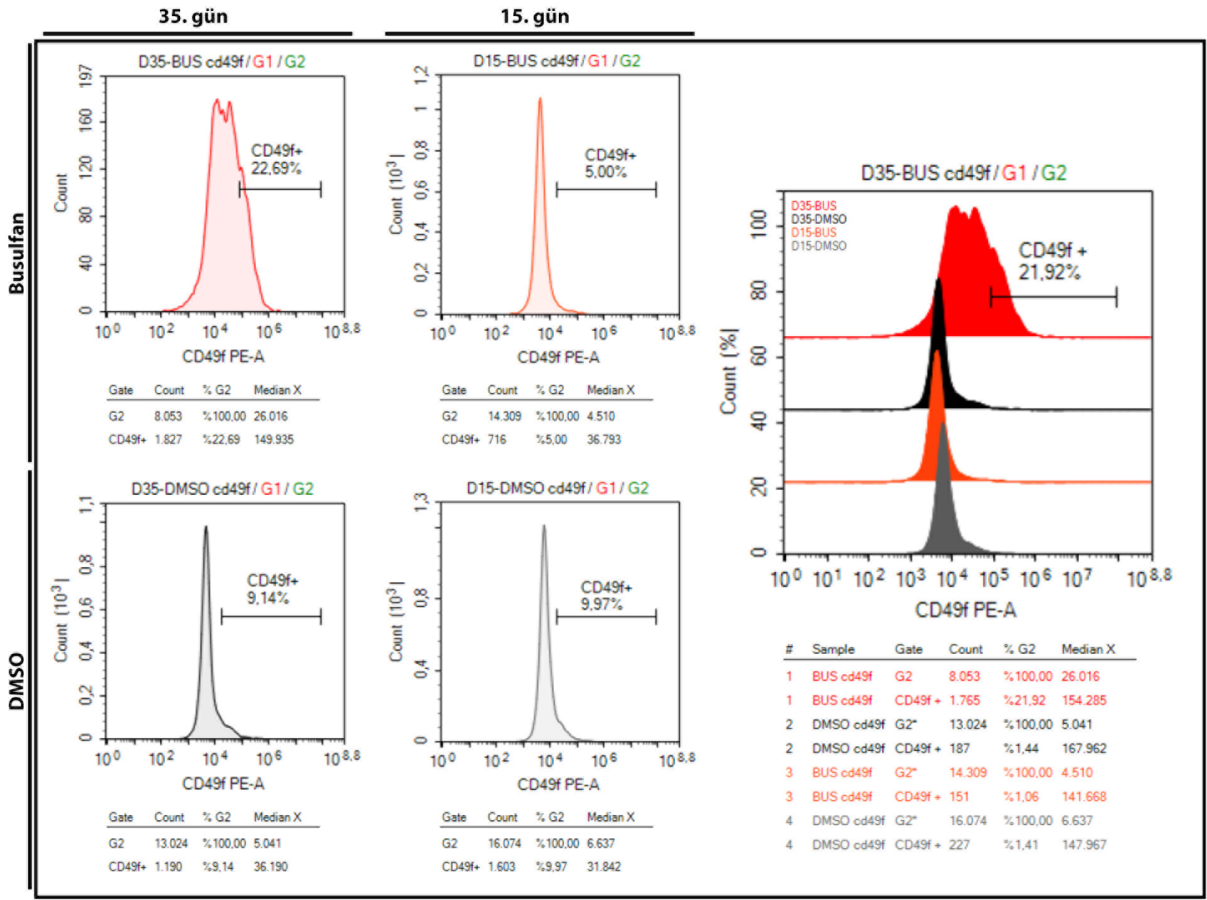
Busulfan sonrasında testisteki hücrelerin %1.77 ve %2.51'si sırasıyla c-KIT (farklılaşan spermatogonya belirteci) (Schrans-Stassen ve ark., 2009) ve CD90 (GKH belirteci) (Kubota ve ark., 2004a) ifade ederken bu oran busulfanın 35. günde %1.01 ve %0.87'ye düşüş gösterdi. 15. gün DMSO grubunda testiküler hücrelerin %5.87'si c-KIT+ ve %1.84'ü CD90+'ti ve 35. gün DMSO grubunda testiküler hücrelerin %5.60'ı c-KIT+ ve %2.09'u CD90+'ti (Şekil 3.15).



Şekil 3.15: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra total testiküler hücre popülasyonunda (b): c-KIT ve (c): CD90 ifadesi flow sitometri ile ölçüldü.

Busulfan enjeksiyonundan 15 gün sonra testisteki hücrelerin %5'i CD49f ifadesi gösterdi. Bu oran 35. günde %22.69'a çıktı. Eşit miktarda DMSO verildikten 15 gün geçen grupta bu oran %9.97'ydi ve 35 gün geçen grupta ise %9.14'tü (Şekil 3.16). OCT4 ve SOX2'nin CD49f promotörüne bağlanarak CD49f'nin ifadesini indüklediği, CD49f'nin pluripotensinin korunmasında rol oynadığı ve MKH'lerde sfer-oluşturma etkinliğini ve farklılaşmalarını geliştirdiği bilinmektedir (Yu ve ark., 2012).

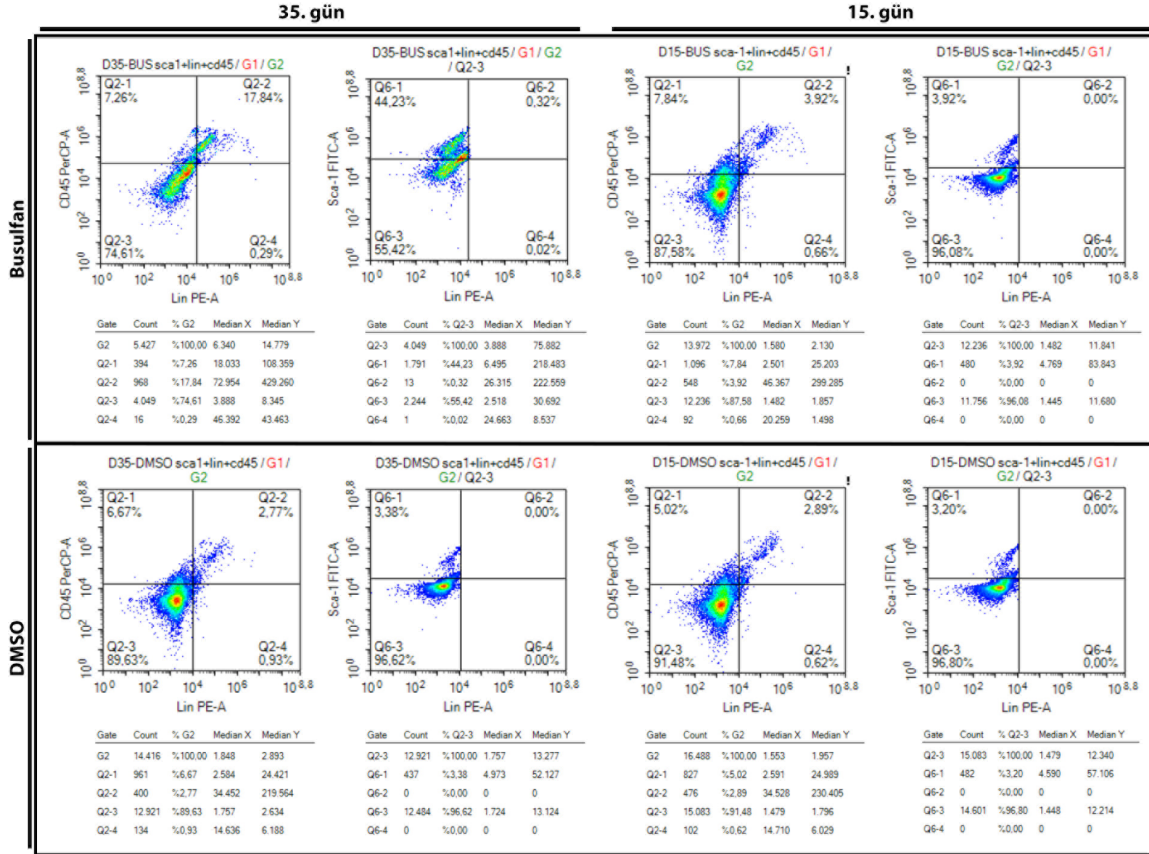
Sonuç olarak, sitotoksik bir kemoterapötik olan busulfan verilmesinden 35 gün sonra bulduğumuz pluripotensi (SSEA-1) belirteçlerinin ve multipotensiyi tetkiklediği ve pluripotensiyi koruduğu bilinen CD49f ifadelerindeki transkripsiyonel düzeydeki artış, stres/hastalık durumlarında rejenerasyon ve homeostazın korunmasıyla ilişkili olabilir.



Şekil 3.16: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra total testiküler hücre popülasyonunda CD49f ifadesi flow sitometri ile ölçüldü.

Çok az sayıda çalışmada busulfan ile tedavi edilmiş fare testis dokusunda VSEL hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonunu sürdürerek sayılarının ilk 15 gün içerisinde 2 katına çıktığı, ancak 30. günde bazal değerine düştüğü gösterilmiştir (Anand ve ark., 2016). VSEL'lerin, SCA-1+/CD45-/LIN- olduğu bilinmektedir (Bhartiya ve ark., 2014; Kim ve ark., 2014; Kucia ve ark., 2006; Patel ve Bhartiya, 2016). 40 mg/kg busulfanın 15. günde SCA-1+/CD45-/LIN- hücrelerin sayısını DMSO kontrolüne göre değiştirmedığı görülürken 35. günün sonunda DMSO kontrol grubuna göre yaklaşık 13.09 katına çıkardığı görüldü (Şekil 3.17). Bu sonuç busulfanın 35. günde Sca-1 ifadesinin mRNA düzeyinde 14 kat artış meydana getirmesiyle örtüşmektedir (****p<0.0001) (Şekil 3.13b). Ancak burada daha önce de Şekil 3.13b için de tartıştığımız gibi, busulfanla meydana gelen CD45 ve LIN ifadesince negatif popülasyondaki SCA1 ifadesindeki artışı VSEL'lerin sayısındaki artışa bağlamak doğru değildir. Çünkü histolojik deneylerde busulfan-kaynaklı atrofi

gözlenen tübüllerin çevresinde interstisyel yoğunlukta önemli derecede bir artış gözledik (Şekil 3.12, orta panel) ve bununla uyumlu olarak testiste LY6A'nın seminifer tübüllerde değil, sadece interstisyel dokuda eksprese edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.

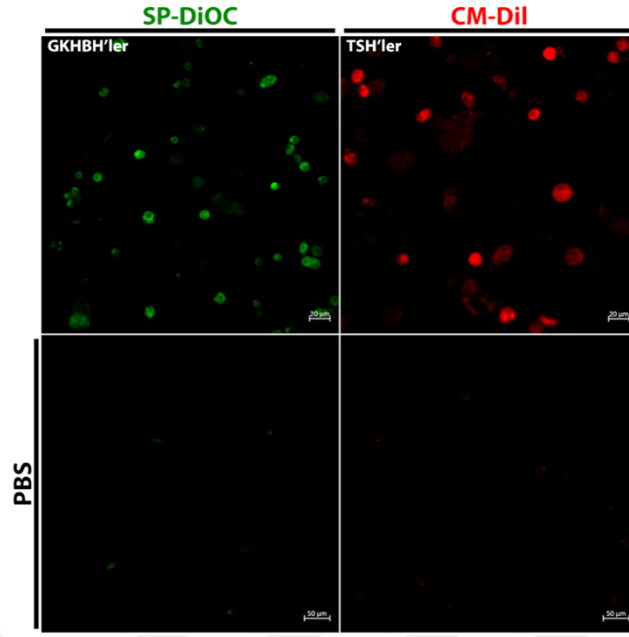


Şekil 3.17: 40 mg/kg busulfan ve eşit hacimde DMSO enjeksiyonundan 15 ve 35 gün sonra testiküler hücrelerde SCA-1+/CD45-/LIN- hücreler flow sitometri ile kantifiye edildi.

Tanım gereği, yalnızca bir kök hücre bir spermatogenez kolonisi üretebilir ve sürdürebilir ve her koloni tek bir GKH'nin klonojenik proliferasyonu ve farklılaşmasından doğar. Biz de AP+CD49f+ GKHBH'lerin *in vivo* germ hücresine farklılaşma potansiyelini göstermek için, koloni hücreleri germ hücre yönelimli olduğundan, bu hücreleri TSH'lerle beraber doğrudan testise transplante ettik. *In vivo* busulfan verilerimiz, 35. günde germ hücrelerinin neredeyse tamamen deplete olmasına rağmen GKH belirteci GPR125'in ve multipotensi/pluripotensi belirteçlerinin ifadelerinde DMSO kontrolüne göre protein düzeyinde artış gösterdiğine işaret ediyordu. Aslında flow sitometriyle, CD45 ve LIN ifadesince

negatif olan hücre popülasyonu içerisinde daha yüksek SCA-1 ifadesi görmemiz (Şekil 3.17) ve GPR125, SSEA-1 ve CD49f ifadesindeki artışlar (Şekil 3.14, 3.16) hep translasyonel düzeyde olup her zaman bu belirteçler için pozitif olan popülasyonların sayıca artmış olduğu anlamına gelmez. Şayet eğer bahsi geçen belirteçlerin protein düzeyindeki artışı, spermatogenezin yeniden başlaması için yetersizse ve/veya busulfan sonrasında testise mobilize olan busulfana dirençli SSEA1+ VSEL'ler (Bhartiya ve ark., 2014) veya Kİ-kökenli SSEA1+ veya CD49f+ mezenkimal hücreler (Anjos-Afonso ve Bonnet, 2007; Nifontova ve ark., 2008) gibi hücrelerin kendilerini yenilemesi, proliferasyonu ve trans-diferansiyasyonu için ya da busulfan sonrası kalan az sayıdaki GPR125+ hücrelerin farklılaşması için gerekli faktörleri eksojen TSH'ler sağlayamazsa, sadece TSH transplantasyonu sonuç vermeyecekti. Bu durumda sağlıklı niş hücreleri ile *in vitro*-türettiğimiz AP+CD49f+ GKHBH'leri transplante ettiğimiz, TS-GKHBHT grubunu bu hipotezimizi test etmek için oluşturduk ve sadece TSH transplante edilen grubumuzla karşılaştırdık.

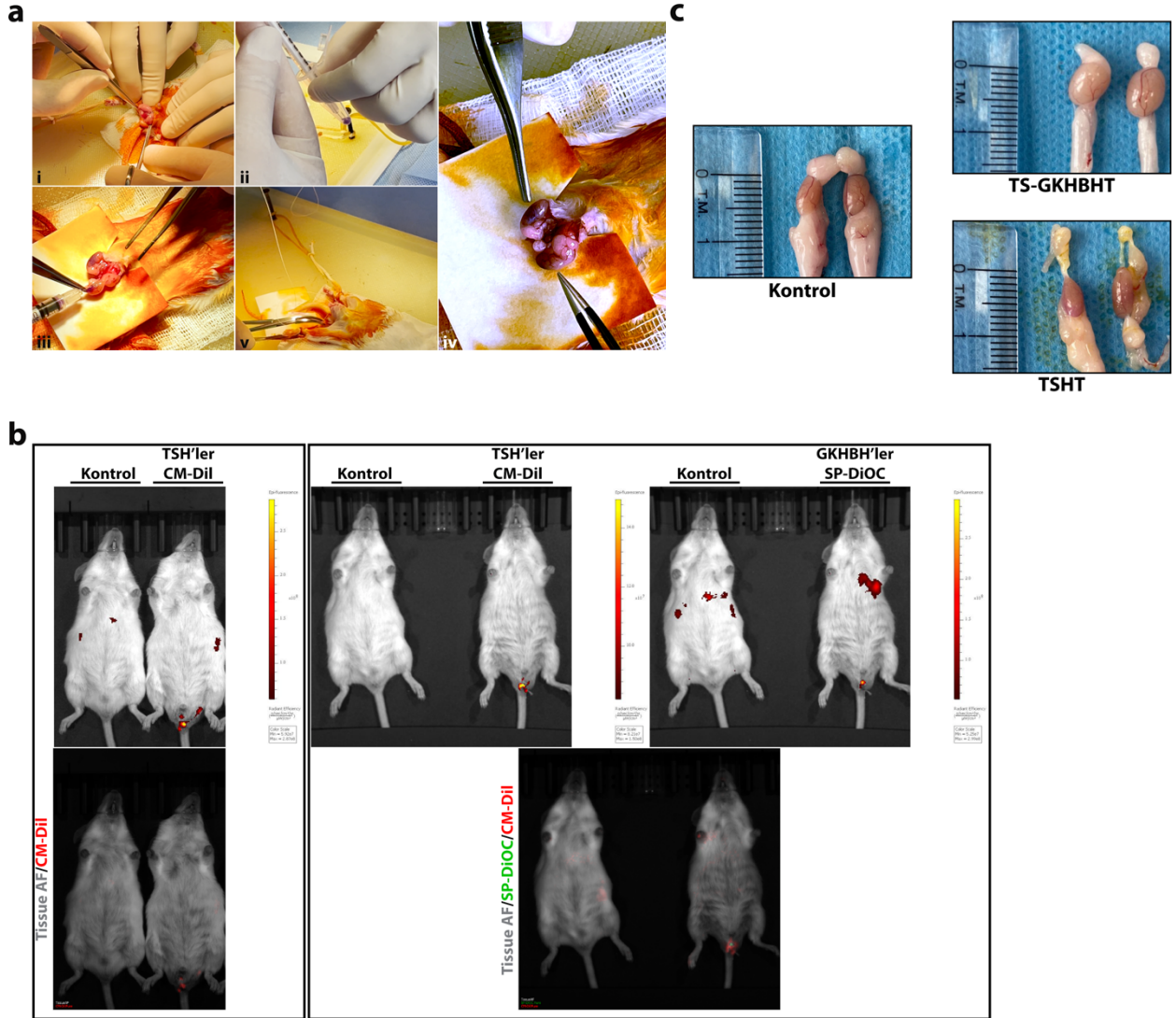
Transplantasyon öncesinde, infertilite modeli oluşturmak için optimize ettiğimiz doz (40 mg/kg) busulfan ile spermatogenezin tamamen deplete olduğunu verifiye ettikten sonra (Şekil 3.12, orta panel, Şekil 3.13), yeniden başlayacağını umduğumuz spermatogenezin transplante edilen eksojen kök hücrelerden kaynaklandığını değerlendirebilmek için hayvanlar enjeksiyon sonrası 35 gün boyunca transplantasyon yapılarına kadar bırakıldı (Şekil 3.12, orta panel; Şekil 3.13). Transplantasyon sonrası hücrelerin testise inkorpore olduklarının doğrulanması için, P4 TSH'ler ve P5 GKHBH'ler sırasıyla CM-DiI ve SP-DiOC floresan karbosiyanin boya kullanılarak işaretlendi. TSH'ler ve GKHBH'ler başarılı bir şekilde sırasıyla CM-DiI ve SP-DiOC ile boyanırken, PBS kontrol grubunda ne kırmızı ne de yeşil bir floresan sinyali rastlandı (Şekil 3.18).



Şekil 3.18: GKHBH'lerin ve TSH'lerin sırasıyla SP-DiOC (yeşil) ve CM-Dil (kırmızı) ile işaretlendiklerinin transplantasyondan hemen önce konfokal mikroskopunda çekilen resimlerle doğrulanması. Negatif kontrol olarak PBS, SP-DiOC veya CM-Dil ile boyandı (40X; Ölçek çubuğu = 20 μ m).

TSH'ler tek başına (TSHT grubu, n=5) ve GKHBH'lerle beraber (TS-GKHBHT grubu, n=5), spermatogenez restorasyonundaki potansiyel etkilerini değerlendirmek için mediastinumda rete testisine transplante edildi. Kontrol grubunun (sham grubu, n=3) testislerine ise sadece serum fizyolojik enjekte edildi (Şekil 3.19a). Busulfan verilmiş farelerin her birinin testisine CM-Dil-TSH'ler (1×10^6 hücre/10 μ l) veya CM-Dil-TSH (0.5×10^6 hücre/5 μ l) + SP-DiOC-GKHBH'ler (0.5×10^6 hücre/5 μ l) transplante edildiğinin ertesi günü floresan sinyallerin testise lokalize olduğu saptandı, ancak sinyal bundan 1 hafta sonra saptanamaz hale geldi (Şekil 3.19b). Bu sonuç, enjeksiyon bölgesinde işaretli hücrelerin saptandığı, dolayısıyla da transplante edilen hücrelerin testise başarılı bir şekilde inkorpore oldukları anlamına gelir. Sinyalin bir haftadan sonra izlenememesi, floresan boyaların biyolojik kararsızlığından ve hücreler bölünürken kademeli olarak seyrelmesinden kaynaklanabilir (Herrid ve ark., 2013; Parish, 1999). Operasyon sonrası TSHT grubundan 1 hayvan ve TS-GKHBHT grubundan 2 hayvanda ölüm olduğu için transplantasyon sonrası yapılacak deneylerde TSHT grubunda n sayısı 4'e düşerken TS-GKHBHT grubunda 3'e düştü. Transplantasyonlardan 2 ay sonra, fareler sakrifiye edilip testisleri toplandı. Ortalama testis boyutları karşılaştırıldığında, sham grubunda

(0.4 ± 0.1 cm) testis boyutu TSHT grubuyla (0.5 ± 0.1 cm) yaklaşık olarak aynıydı. TS-GKHBHT grubundaki (0.7 ± 0.1 cm) diğer gruplardan daha büyüktü (Şekil 3.19c).



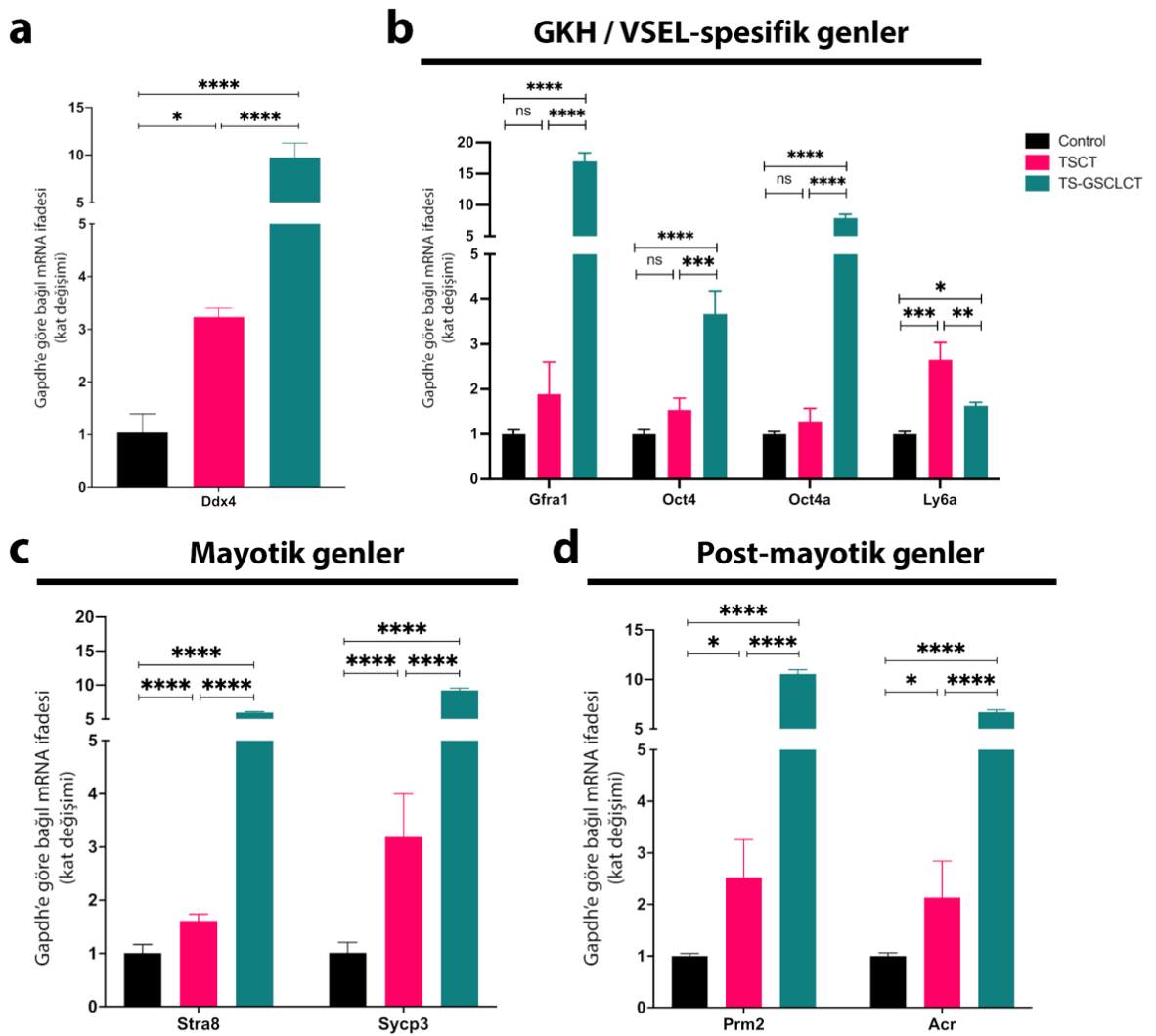
Şekil 3.19: (a): Skrotum üzerinde orta hattın yapıldığı kesile her iki testis dışarı çıkarılıp steril karton plak üzerine alındı (i). 32G mikro iğne takılı enjektöre 10 ul hacimde 30 ug DNaz I/%10 Tripan mavisinin içerisinde $1-2 \times 10^6$ işaretli hücre süspansiyonu çekildi (ii). Optik büyütme altında, sırayla her iki testise mediastinum hizasından rete testis içerisinde iğne 30°C açılıyla ilerletilerek interstisyuma kaçmayacak şekilde 10 ul hücre süspansiyonu enjekte edildi (iii). Seminifer tübüllerin dolduğu, Tripan mavisinin tunica albuginea üzerinden homojen bir şekilde dağıldığının gözlenmesiyle teyit edildi (iv). Testisler skrotal boşluğa yerleştirildi ve cilt 5/0 abzorbaril sütürlü dikişle kapatıldı. (b): CM-Dil-TSH'ler ve CM-Dil-TSH + SP-DiOC-GKHBH'lerin transplantasyonun ertesi gününde IVIS ile *in vivo* floresan görüntüleme yapıldı. Doku otofloresansından arındırılmış floresan ışıma *Spectral Unmixing* sonucu elde edilmiş olup her iki grupta da testise lokalize sinyal alınmış ve serum fizyolojik verilmiş kontrol grubunda herhangi bir sinyal saptanmamıştır. Her gruptan birer fare temsili olarak sunulmuştur. Her grubun altında CM-Dil (kırmızı) ve SP-DiOC (yeşil) ışımalarının doku otofloresansı (gri) birleştirilmiş resimleri konulmuştur. (c): Transplantasyondan 2 ay sonra servikal dislokasyonla ötenazi uygulanan üç grubun testis boyutlarının görsel olarak karşılaştırılabilmesi için her gruptan bir hayvanın cetvel yanına konmuş temsili fotoğrafları.

TS-GKHBHT grubunda *Ddx4*'ün gen ifadesi kontrole göre 10 kat artış gösterirken (**** $p<0.0001$), bu oran TSHT grubunda 3'tü (* $p<0.05$) (Şekil 3.20a). *Gfra1* ve *Oct4* transkript miktarları TS-GKHBHT grubunda sırasıyla yaklaşık 17 kat (**** $p<0.0001$) ve 4 kat (**** $p<0.0001$) artış gösterirken, TSHT grubunda kontrole göre görülen artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. *Oct4a* gen ekspresyonu kontrole göre TS-GKHBHT grubunda 8 kat artış gösterdi (**** $p<0.0001$). TSHT grubunda *Oct4a* için kontrole kıyasla artış görülse de bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. VSEL belirteci *Ly6a*'nın mRNA seviyesiye TSHT ve TS-GKHBHT gruplarında kontrole kıyasla sırasıyla 3 kat (** $p<0.001$) ve 2 kat (* $p<0.05$) artış gösterdi (Şekil 3.20b).

Testiküler kök hücre belirteçlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre TS-GKHBHT grubundaki istatistiksel olarak anlamlı artışı yalnızca transplante edilen GKHBH'lerin testise engrafmanını takiben kolonize olmalarından kaynaklanıp bu hücreler *in vivo* spermatogenez geçirememiş olabilir. Bu duruma netlik kazandırmak ve eğer spermatogenez yeniden başlatılabilmişse de germ hücrelerinin hangi aşamaya kadar matüre olduklarını görmek için mayotik *Stra8* ve *Sycp3* (Şekil 3.20c) ve post-mayotik *Prm2* ve *Acr* (Şekil 3.20d) genlerinin ifadeleri incelendiğinde, TS-GKHBHT grubunda kontrole göre bu genlerin ifadelerinin hepsinde artış gözlemlendi (dördü için de **** $p<0.0001$), bu da donör-kaynaklı GKHBH'lerin kolonize olup gerçekten de *in vivo* diferansiye olduğuna işaret eder. TSHT grubunda *Stra8* (**** $p<0.0001$), *Sycp3* (**** $p<0.0001$), *Prm2* (* $p<0.05$) ve *Acr* (* $p<0.05$) mRNA seviyelerinin TS-GKHBHT grubundakilere göre daha az, ancak kontrole göre yine de istatistiksel olarak anlamlı artış göstermesi, TSH'lerin busulfana bağlı bozulmuş nişi düzelterek endojen spermatogenezin restorasyonuna katkı sağladıklarına işaret eder (Şekil 3.20c, Şekil 3.20d).

Bu durumda flow sitometri ile saptadığımız GPR125, SSEA1, CD49f ve SCA-1+/CD45-/LIN- ifadelerindeki protein düzeyindeki artışın (Şekil 3.14, Şekil 3.16, Şekil 3.17) spermatogenezin yeniden başlaması için yetersiz olduğu ve/veya dolaşımdan mobilize olup bazal laminaya göç etmiş busulfana-dirençli Kİ-kökenli VSEL/mezenkimal hücrelerin transdiferansiye olması için veya busulfan sonrası kalan

az sayıdaki GPR125+ GKH'nin (Şekil 3.14, Şekil 3.16) ileri evrelere matüre olmaları için gerekli ortamın transplante ettiğimiz TSH'ler ile yüksek ölçüde sağlanamadığı söylenebilir. Ko-transplantasyon grubunda ise, sağlıklı TSH'ler hasar görmüşlerin yerine geçerek, *de novo* tübüller oluşturarak ve/veya salgıladıkları parakrin faktörlerle bozulmuş nişi onararak ve *in vitro*-türettiğimiz GKHBH'ler ise TSH'lerin sağladığı katkılar varlığında tübüllerde kolonize olmalarını takiben *in vivo* olarak spermatozoaya kadar farklılaşarak deplete olmuş tübülleri repopüle ettiği sonucuna varılabilir.

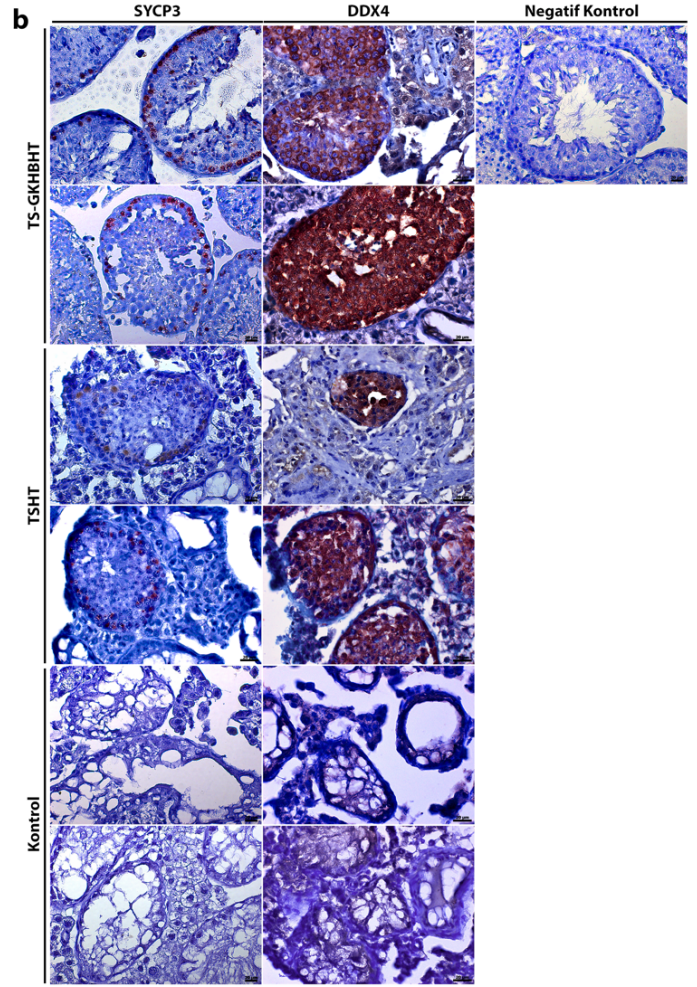
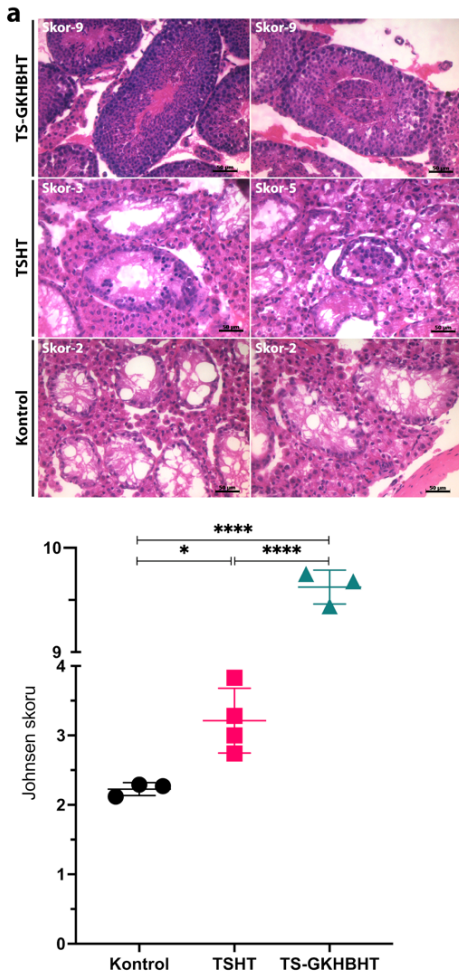


Şekil 3.20: CM-Dil-TSH'lerin ve CM-Dil-TSH + SP-DiOC-GKHBH'lerin transplantasyonu sonrası sırasıyla TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının testislerinde spermatogenezin ne ölçüde restore edildiği, (a): germ hücre (*Ddx4*), (b): GKH/VSEL (*Gfra1* ve *Oct4/Oct4a* ve *Ly6a*), (d): mayotik (*Stra8* ve *Sycp3*) ve (e): post-mayotik (*Prm2* ve *Acr*) belirteçlerinin transkripsiyonel düzeydeki ifadelerinin qPZR ile kontrolünkülerle karşılaştırılmasıyla değerlendirildi. Ekspresyon sonuçları kendi *Gapdh* ekspresyon seviyelerine göre normalize edildi; n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001; sonuçlar ortalama ± standart sapma'yı temsil eder.

Histolojik incelemelerde kontrol grubunda 40-50 tübülde yaklaşık 2 tübülde spermatogenik hücre gözlemlendi. Diğer tübüllerde spermatogonyum hariç spermatogenik hücre gözlenmedi. Yalnızca Sertoli hücreleri barındıran tübüller sayıca fazlaydı. İnterstisyel alanda çok sayıda büyük, eozinofilik ve sitoplazmalarında yağ inklüzyonu içeren hücreler mevcuttu (Şekil 3.21a). TSHT grubunda spermatogenik hücreleri içeren tübüller mevcuttu. İnterstisyel alanda yoğun hücre gözlemlendi (Şekil 3.21a). TS-GKHBHT grubunda spermatogenik hücreler ve spermatozoa gözlemlendi (Şekil 3.21a).

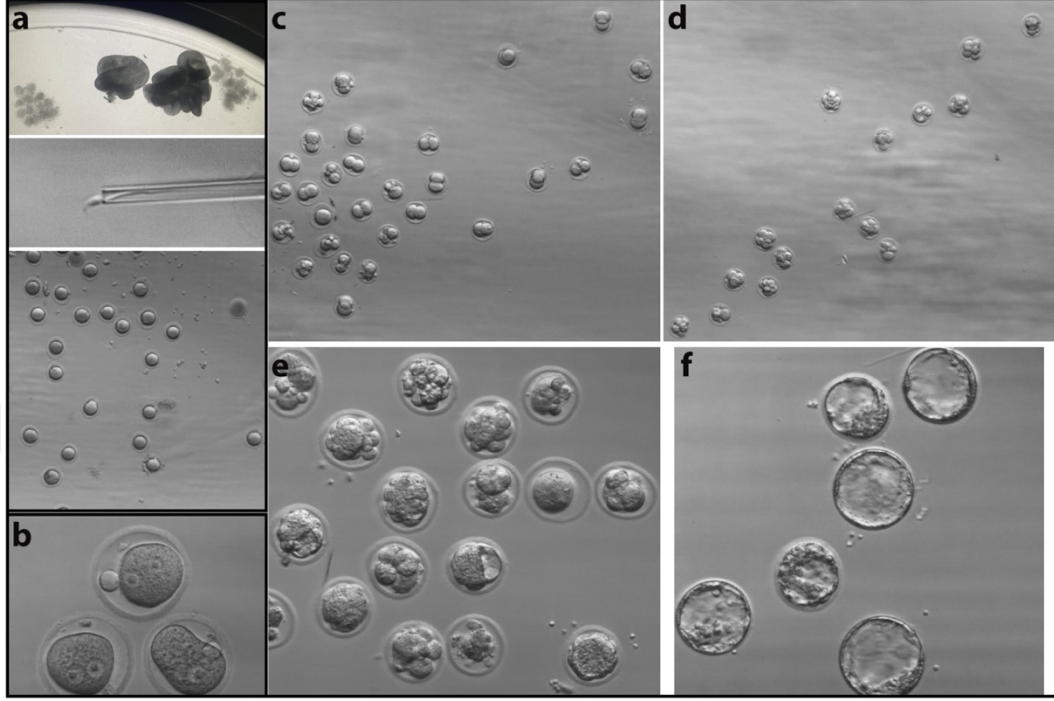
Teratom oluşumu, pluripotensiyi değerlendirmede altın standart olarak kabul edilir. *In vitro* kültür ortamına bağlı EKH belirteçlerinin (Oct4a, Sox2, Nanog, SSEA-1) ifadesindeki artış ve AP aktivitesi göstermesi nedeniyle GKHBH'lerin her ne kadar pluripotent özellik kazandıklarını düşünsük de, biz BALB/c fare testisine transplantasyon sonunda 56 gün içinde teratom oluşumu gözlemedik. Bu durum, AP+CD49f+ hücrelerin teratom oluşturmak için yeterince yeniden programlanmamış olabileceğini gösterir veya pluripotensilerini idame ettiren oluşturduğumuz büyüme faktörü kokteyli içeren zenginleştirilmiş kültür ortamından kopartılıp TSH'lerle ko-transplante edilmesiyle erken safhada GKHBH'lerin *in vivo* farklılaşmasından kaynaklanmış olabilir. Eş zamanlı transplante edilen TSH'ler, GKHBH'lerin pluripotent durumlarını kaybetmelerine neden olarak teratom oluşumu olmadan nasıl alıcı farede spermatogenez restorasyonunu gerçekleştirdiğini açıklayabilir. Bunu verifiye etmek ve pluripotensi karakterini doğrulamak için GKHBH'lerin tek başına transplante edileceği başka bir teratom oluşturma deneyi yapılmalıdır.

Germ hücresi-spesifik (DDX4) ve spermatosit-spesifik (SYCP3) proteinlerin H&E ile belirlenen hücre tiplerindeki ekspresyonunun sağlıklı TSH'lerin yanında GKHBH verilmesiyle, yalnızca TSH transplante edilen gruba kıyasla, ne ölçüde değiştiğini görmek için immünohistokimyasal boyama yaptık. İki grupta ve grupların tüm tekrarlarında hem DDX4 hem de SYCP3 ifadesi gözlemlendi. TS-GKHBHT grubunda DDX4+ ve SYCP3+ tübüllerin sayısı TSHT grubuna göre daha fazlaydı (Şekil 3.21b).



Şekil 3.21: (a): TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının ve kontrol grubu (n=3) parafin kesitlerinin H&E boyaması (40X; Ölçek çubuğu = 50 um) her hayvanın testisleri ayrı ayrı incelenerek yapılmış ve her gruptan temsili olarak iki testisin Johnsen skorları H&E boyalı preparat fotoğrafları üzerinde ve grafik halinde tüm biyolojik tekrarlar için ortalama ± standart sapma halinde verilmiştir. TS-GKHBHT ve TSHT gruplarında *de novo* tübüller görülmüştür (bkz. üst panel). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001. (b): TSHT (n=4) ve TS-GKHBHT (n=3) gruplarının ve kontrol grubu (n=3) parafin kesitlerinin İHK ile SYCP3 ve DDX4 boyaması (63X; Ölçek çubuğu = 20 um).

3.7. GKHBH'lerden *In Vito*-Türetilen Spermlerin İşlevselliğinin Piezo-ICSI ile Değerlendirilmesi



Şekil 3.22: AP+CD49f+ GKHBH'lerden *in vitro* olarak farklılaştırılan sperm işlevselliği Piezo-ICSI ile değerlendirildi. (a): Ampullaların yırtılmasıyla toplanan BALB/c dişilerin MII oositleriyle yapılan Piezo-ICSI sonrası *in vitro* kültürde gelişen (b): zigot, (c): iki-hücreli embriyo, (d): dört/sekiz-hücreli embriyo, (e): morula ve (f): blastokist fotoğrafları.

GKHBH'lerin *in vivo* işlevselliğini transplantasyonlarıyla test ettikten sonra SB431542 ve RA uygulanarak *in vitro* ortamda farklılaştırılan sperm hücrelerinin işlevselliğini de test etmek için dondurduğumuz spermleri, 7-8 haftalık haftalık dişi BALB/c farelerin ampullalarını yırtarak açığa çıkarılan kümülüs-oosit-komplekslerinden izole ettiğimiz MII oositlerine Piezo-ICSI işlemiyle mikroenjekte ettik (Şekil 3.22a). Piezo-ICSI ile, *in vitro* türettiğimiz sperm hücreleri oositleri aktive edebildi ve zigotlar global® total® LP kültür medyumuna ile kültüre edildiğinde iki hücreli embriyo, dört hücreli embriyo ve blastosist aşamalarına gelişti (Şekil 3.22b-f). GKHBH'den türetilen sperm enjekte edilen 40 oositte 22'si aktivasyondan sonra iki-hücreli aşamaya geldi. Global® total® LP kültür medyumunda içlerinden 4'ü dejenere olup 18'i dört/sekiz-hücreli aşamaya gelebildi ve kültürün 3. gününde 13 morula aşamasında embriyo gözlemlendi. Kültürün 4. gününde bu 13 moruladan 9 blastokist elde edilebildi. Sonrasında blastokistlere kriyoprezervasyon işlemi yapıldı.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda aynı testisten testisteki tüm fonksiyonel kök hücreleri (VSEL ve GKH) ve aynı zamanda TSH'leri izole etmeyi amaçladık (Şekil 3.2a). Kollajenaz IV/tripsin ile enzimatik parçalamayı takiben 300 x g, 5 dk santrifüjlemeyle oluşan pellette TSH ve GKH'ler bir arada bulunmalıydı. VSEL'leri ise küçük boyutları nedeniyle hücre süspansiyonu bu hızla santrifüj edildiğinde süpernatantta bulmayı bekleriz. Dolayısıyla kollajenaz IV aşamasından hemen sonra ve parçalanmayan kümelerin tripsin/DNaz I ile parçalanmasından hemen önceki 60 x g'de 10 dk santrifüj adımından sonra süpernatant atılmadı ve içerisindeki kollajenaz, FBS'li inaktivasyon besisiyle inaktive edildikten sonra buz üzerinde saklandı. Tripsin/DNaz I aşamasından sonra ise GKH ve TSH'lerin literatürde yer alan izolasyon protokolünde yukarıda bahsedildiği gibi 300 x g'de 5 dk çöktürme işlemi vardı (Ko ve ark., 2010; Martin ve Seandel, 2013; Sato ve ark., 2013; Tan ve ark., 2021). Eğer bu hız ve süre yerine, VSEL'leri de GKH ve TSH'lerle çöktürmek için 1000 x g, 10 dk'yı kullansaydık (Anand ve ark., 2016; Kaushik ve Bhartiya, 2020), bu kadar yüksek bir hız GKH/TSH fraksiyonuna zarar verebilirdi. Dolayısıyla buz üzerinde saklanan VSEL'leri içerdiğini düşündüğümüz süpernatant, FBS eklenmesiyle inaktive edilen GKH/TSH süspansiyonu ile birleştirildikten sonra, önce 300 x g'de 5 dk santrifüjle GKH ve TSH'ler çöktürüldü, ardından süpernatant 1000 x g'de 10 dk santrifüj edilerek VSEL'ler çöktürüldü. Daha sonra, GKH popülasyonunu pürifiye etmek ve TSH'leri ayrı olarak kültüre etmek için diferansiyel adezyon adımını (%0.2 jelatin kaplı plakalarda 37°C'de 30 dk inkübasyon) uyguladık (Martin-Inaraja ve ark., 2021). 30 dk'nın sonunda TSH'lerinin büyük oranda hücre kültürü şişesinin tabanına yapışması için yeterli olduğunu gördük. Diferansiyel adezyon sonrası pipetaj yapılarak TSH'lerin üzerinden toplanan GKH'ler, bu süre boyunca inkübatöre (37°C, %5 CO₂) kaldırılan VSEL hücre süspansiyonuyla birleştirildi ve hiç beklenmeden MACS aşamasına geçildi. Bu şekilde, TSH'lerden yüksek oranda arındırılmış ve içlerinde VSEL'lerin de olduğunu düşündüğümüz bugüne kadar testislerde tanımlanan tüm germline-kökenli kök hücreleri izole etmiş olduk.

Laminin, kök hücrenin kendini yenilemesi, migrasyonu, yapışması ve farklılaşmasında yer alan ana ECM bileşenidir ve aynı zamanda GKH'leri çevreleyen mikroçevredeki önemli bir niş faktörüdür (Au ve ark., 2021; Covello ve ark., 2006). Başlıca reseptörleri heterodimerik integrinler $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ ve $\alpha 6\beta 4$ 'dir (Lawson ve ark., 1999). GKH'ler fibronektin ve kollajene kıyasla tercihen laminine bağlanır ve laminin reseptörünün bileşenleri olan hem $\alpha 6$ -integrini (CD49f olarak da bilinir) hem de $\beta 1$ -integrini ifade eder (Shinohara ve ark., 1999); testiküler kök hücreler, laminin kaplı bir plaka üzerinde seçimden sonra 3 ila 8 kat zenginleştirilebilir (Orwig ve ark., 2002; Shinohara ve ark., 2000a). $\beta 1$ -integrinin genellikle hücre matriksinde bulunduğu normal epitelden farklı olarak, Sertoli hücrelerinin $\beta 1$ -integrini, apikal ve bazal ektoplazmik uzmanlaşmada (ES) aktin demetleri ile kolokalize olan belirli hücreler arası temas bölgeleriyle sınırlıdır (Yan ve ark., 2007). *In vitro* analizler, lamininin EKH'lerde Oct-4/Sox2 ekspresyonunu ve hücre proliferasyonunu koruduğunu göstermiştir (Ohinata ve ark., 2005; Ying ve ark., 2000). Laminin/CD49f aktivasyonunun, insan MKH'lerde PI3K/AKT/GSK3 β yolağıyla Oct-4 ekspresyonunu düzenlediği de gösterilmiştir (Yu ve ark., 2012). Bununla tutarlı olarak lamininin, insan uPKH'lerinin büyük ölçekli ekspansiyonu için güçlü bir substrat olduğu bildirilmiştir (Paccola Mesquita ve ark., 2019). Huang ve ark. (2009) tarafından CD49f+AP+GKH'ler olarak adlandırılan pluripotent GKH'ler, yüksek AP aktivitesi, SSEA-1 ve CD49f gibi çok sayıda hücre yüzeyi proteinini bulundurma, PGH ile ilgili genleri (örn., *Oct-4*, *Nanog* ve *Blimp1*) ifade etme yeteneği, *in vitro* migrasyon ve birçok hücre tiplerine farklılaşma ve ayrıca *in vivo* kimera/teratom oluşturma yeteneği gibi erken germ hücre özelliklerini göstermektedir (Huang ve ark., 2009).

Spermatogonya testis hücrelerinin çok nadir bir alt popülasyonu olduğundan (Desjardins ve Ewing, 1993; Tagelenbosch ve de Rooij, 1993), olgun yetişkin testislerinden yeterli sayıda GKH elde etmek zorlayıcıdır (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2012) ve izolasyonu sonrası analizlerde kullanımları saflaştırma gerektirir (Ibtisham ve Honaramooz, 2020). Bu, yalnızca farklılaşmamış spermatogonya içeren kriptorşid testisler kullanılarak çözülebilir (de Rooij ve ark., 1999; Shinohara ve ark., 2000b). Çalışmamızda, çoğunlukla GKH'lerinin ve maksimum zigoten evresine kadar matüre olmuş germ hücrelerinin bulunduğu 10-günlük fare testislerindeki CD49f

ekspresyonunu spermatozoa da dahil tüm matürasyon evrelerinden germ hücresi içeren 8-haftalıklarınkiyle (Drumond ve ark., 2011) karşılaştırdığımızda, 10-günlüklerde CD49f+ hücreler tüm testis hücrelerinin %57'sini oluştururken 8-haftalıklarda bu oran %8'di (Şekil 3.2b). Dolayısıyla CD49f+ başlangıç popülasyonunu en optimize ve etkin şekilde 10-günlük fare kullanılarak elde edilebildi.

10-günlük fare testislerinden izole ettiğimiz total germline-kökenli kök hücreleri fonksiyonel GKH'lerce zenginleştirmek için anti-CD49f antikoru kullanarak MACS ile pozitif seleksiyon yaptık. Tüm denemelerimizde, pozitif fraksiyonda CD49f+ hücrelerin %95-99 saflıkta bulunduğunu (Şekil 3.2c) ve CD49f+ hücrelerin %85-93 oranında canlı olduğunu saptadık (Şekil 3.2d).

GKH'ler kendini yenilemek ve farklılaşmak için karmaşık endokrin ve oto-/parakrin düzenlemenin yanı sıra hücrelerel etkileşimleri gerektirir. GKH'ler Sertoli hücreleri ile yakın temas halinde ve peritübüler miyoid hücrelere bitişik olarak seminifer tübüllerin bazal membranında lokalizedir (Aponte ve ark., 2005). Sertoli hücreleri tarafından üretilen ve GKH'nin kendini yenilemesi ve idame ettirilmesi için kritik olan faktörler arasında GDNF (Meng ve ark., 2000), FGF2 (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Kubota ve ark., 2004b), CSF1 (Oatley ve ark., 2009), WNT ailesi proteinleri (Yeh ve ark., 2011; Yeh ve ark., 2012) ve LIF (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2007) yer alır. Sertoli hücrelerinden salgılanan sitokinlerin *in vivo* GKH'lerin korunmasındaki önemi, hedeflenen *ERM* (anahtar GKH genlerinin ekspresyonunu etkileyen bir Sertoli hücre faktörü) delesyonu ile farelerin seminifer tübüllerinde GKH'lerin deplete olduğunun gösterilmesiyle doğrulanmıştır (Chen ve ark., 2005).

Kültüre edilmiş Sertoli hücreleri tarafından GDNF ekspresyonu FSH'ın yanı sıra ayrıca FGF2, TNF α ve IL-1 β tarafından da uyarılır (Simon ve ark., 2007). GKH'leri, Sertoli hücrelerinde NOTCH yolağını aktive etmek için JAG1'i (NOTCH ligandı) kullanır, bu da GDNF'nin ifadesini azaltır ve böylece GKH'leri kendi sayılarını kontrol ederek uygun germ hücre homeostazını ve sperm üretimini sağlamış

olurlar (Johnston ve ark., 2011; Tadokoro ve ark., 2002; Ryu ve ark., 2006). Sertoli hücreleri FGF2 de üretir ve FGF2 de FSH tarafından uyarılır (Mullaney ve Skinner, 1992; Smith ve ark., 1989). FGF2, ETV5 ve BCL6B transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla GDNF'den bağımsız olarak GKH'lerin kendini yenilemesini teşvik eder, ancak daha az etkilidir (Ishii ve ark., 2012; Takashima ve ark., 2015). Sertoli hücrelerinde LIF üretimi TNF α 'ya bağlıdır ve PGH'ler, prospermatogonya ve GKH'lerin kültürlerinde yaygın olarak kullanılır (Aponte ve ark., 2008; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Nikolova ve ark., 1997; Pesce ve ark., 1993). LIF, GKH'lerin hayatta kalmasını sağlarken ve uzun vadeli kültürleri başlatmak için yararlı olsa da kendini yenilemeyi desteklemez (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2007). WNT5A, Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve JNK'yı aktive eden CTNNB1'den bağımsız bir mekanizma yoluyla GKH'lerin hayatta kalmasını destekler (Yeh ve ark., 2011), ancak kendi başına kendini yenilemeyi indüklemez. Son olarak, VEGFA ailesi üyeleri ve reseptörlerinin tümü germ hücreleri, Sertoli hücreleri ve interstisyel hücreler tarafından üretilse de (Lu ve ark., 2013; Nalbandian ve ark., 2003) yalnızca pro-anjiyojenik izoform VEGFA164, GKH transplantasyon deneyi ile belirlendiği üzere GKH'lerin kendini yenilemesini destekler (Caires ve ark., 2012b). Sertoli hücrelerinin bir diğer eşsiz özelliği de anti-inflamatuar sitokinler ve Sertoli hücre greftlerini reddedilmekten koruyabilen TGF β üretmesidir (Hedger, 2015; Kaur ve ark., 2014; Luca ve ark., 2018), bu da onların immün tepkileri değiştirme ve immün baskılayıcı testis ortamına katkıda bulunma yeteneklerini gösterir. Testis, enfeksiyonu ve gelişmekte olan germ hücrelerinin bağışıklık sistemi tarafından tanınmasını önlemek için bağışıklık bastırıcı özelliklere sahip özel bir ortamdır; bu önemlidir, çünkü sperm ilk olarak bağışıklık sisteminin kurulmasından çok sonra ergenlik çağında üretilir ve bu nedenle yabancı olarak tanınabilir. Bahsi geçen ikinci süreç, testisin immün ayrıcalıklı bir bölge olması yoluyla gerçekleştirilir ve lokal immünosüpresif mekanizmaları ve sistemik toleransı içerir (O'Donnell ve ark., 2022). Fare EGF'i özel olarak submandibular bezde üretilir ve buradan salgılanır. Bununla birlikte Sertoli hücreleri, pakiten spermatositler ve round spermatidlerde olgun tip EGF için immünoreaktivite tespit edilmiş, EGF'nin öncü tipindeki içinse pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerle sınırlı olduğu bildirilmiştir (Radhakrishnan ve ark., 1992).

Büyüme faktörlerine ek olarak, çoğu GKH kültür sisteminde ayrıca besleyici katmanlar kullanılır. Besleyici katman, farklı kök hücre metabolizmalarını destekleyen çok yönlü bir metabolik, biyokimyasal ve fiziksel niş olan niş mikro çevresini taklit edebilir (Hamilton ve ark., 2015; Rodríguez-Colman ve ark., 2017; Suda ve ark., 2011). Fare embriyonik fibroblastları (*mouse embryonic fibroblast*, MEF) ve Sertoli hücreleri GKH'lerinin kültüründe en sık kullanılan besleyici tabakalardır (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Nasiri ve ark., 2012; Song ve Wilkinson, 2014). Sıçan GKH'leri, Sertoli hücrelerinde, STO hücrelerinde (SIM farelerinden elde edilen fibroblastların bir alt hattıdır ve tiyoguanin ve ouabain dirençlidir) olduğundan daha uzun süre hayatta kalmış (Hamra ve ark., 2004), ancak başka bir çalışma, Sertoli hücrelerinin fare GKH'leri üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Nagano ve ark., 2003b). Sertoli hücreleri besleyici tabaka olarak kullanıldığında fare (Hamidabadi ve Bojnordi, 2018; Kuruji ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2008) ve insan (Liu ve ark., 2011) GKH'lerinin proliferasyonu, koloni boyutu ve köklülük belirteçlerinin ifadeleri artmıştır. İnsan testiküler ECM'inin hidrojel formu, kontrol STO besleyici hücre tabakasına kıyasla önemli ölçüde daha yüksek sayıda UTF1+ GKH'sini farklılaşmadan ve apoptoza sokmadan korumuş ve proliferetmiştir, ancak ikinci haftanın sonunda her iki koşul altında da GKH sayısı azalmıştır (Murdock ve ark., 2019). Bununla birlikte, Sertoli hücreleri, kök hücrenin kendini yenilemesini engellediğini düşünülen inhibin gibi faktörleri de ürettiği için, araştırmacılar diğer yaygın besleyici hücre tiplerine başvurmuşlardır (Hess ve ark., 2006). Kanatsu-Shinohara ve ark. dahil olmak üzere birçok grup (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004) LIF üreten MEF'leri kullanırken, Brinster grubu (Brinster ve Zimmermann, 1994b; Kubota ve ark., 2004a) STO hücrelerini kullanmış ve Seandel ve ark. (Seandel ve ark., 2007) murin testis stromasını (MTS) oluşturmuştur.

Seandel ve ark. 2007 yılında, testis ortamını daha sadık bir şekilde yeniden yaratma fikrinden yola çıkarak kullandıkları MTS besleyici tabakasının spermatogonyal progenitor hücrelerin üretilmesi ve proliferasyonu için yeterli olduğunu göstermiştir (Seandel ve ark., 2007). Spermatogonyal progenitor hücrelere düşük serumlu medyada kültüre edilerek birçok pasaj atlatıldıktan sonra, CD34+ hücrelerce zenginleştirilmiş testiküler stromal hücrelerin spontan dönüşümünden

kaynaklanan ölümsüzleştirilmiş bir hücre hattı oluşturulmuştur. Bu hücre hattının yüksek serumlu medya ile sürekli pasajlanması, MASC'ler gibi germ hattından türetilmiş kök hücrelerin yanı sıra EKH'ler ve PGH'den türetilmiş EGH'leri de dahil olmak üzere çok sayıda farklı kök hücre tipinin uzun süreli çoğalmasını destekleme kapasitesine sahip, JK1 olarak adlandırılan heterojen bir SMA+ CD34+ hücre hattının üretilmesiyle sonuçlanmıştır (Kim ve ark., 2008). Biz de *in vivo* niş ortamını taklit etmek için, fare GKH'lerin kendini yenilemesi, klonalite özelliklerini koruması ve proliferasyonunu desteklemesinde önemli olduğuna inanılan MMC ile inaktive edilmiş TSH tabakası üzerinde uzun-süreli kültüre ettirmeyi denedik. Çalışmamızda, GKH'lerin idame ettirilmesi ve çoğaltılmasında önemli parakrin faktörleri salgıladığı bilinen Sertoli hücrelerinde, peritübüler miyoid hücrelerde ve Leydig hücrelerinin tümünde eksprese edilen GATA4'ün, TSH'lerin %99.42'sinde eksprese edildiğini gördük (Şekil 3.1c). Ancak bu GATA4+ TSH'lerinde, INSL3 immünoboyamasının saptanmaması (Şekil 3.1d) ve *Hsd17b3* transkript ifadesinin olmadığı gözlenmesi (Şekil 3.1b) nedeniyle, Leydig hücresi içermediği tespit edildi. TSH'lerde peritübüler miyoid hücre belirteci *Acta2* az miktarda ifade ediliyordu (Şekil 3.1b). Dolayısıyla elde ettiğimiz TSH'lerin Sertoli hücrelerince zengin GATA4+ TSH'ler olduğuna karar verdik.

Knockout serum replasmanı (KSR) tek başına, MEF hücreleri besleyici hücreler olarak kullanıldığında BSA'nın yerini alarak GKH'lerin *in vitro* proliferasyonu korunabilmiştir. Ayrıca, BSA'nın KSR'ye eklenmesi (%0.2 BSA + %2 veya %10 KSR), BSA kendi başına hücre büyümesini destekleyemese de, hücre büyümesini önemli ölçüde hızlandırmaktadır. Buna karşılık, STO besleyici hücrelerinin kullanılması durumunda hem KSR hem de BSA varlığında bile GKH'lerde proliferasyon gözlenmemiştir (Aoshima ve ark., 2013). KSR'nin BSA ile kombinasyonu aynı zamanda GDNF konsantrasyonunun 20 ng/ml'den 5 ng/ml'ye ve BSA oranının %0.5'ten %0.2'ye düşürülmesine izin verirken, büyüme hızı ve GKH belirteçlerinin ekspresyonunu korur. Bu %0.2 BSA + %2 KSR kombinasyonu daha önce Sertoli hücre tabakaları üzerinde GKH'lerinin büyütülmesi için kullanılmamıştır (Aoshima ve ark., 2013). Kubota ve Brinster (2008) çalışmasında %0.2 BSA ilavesiyle kimyasal olarak tanımlanmış kültür koşulları oluşturmuş ve GDNF, GFRA1 ve FGF2

dahil olmak üzere belirli ekstrinsik sitokinleri tanımlamıştır (Kubota ve Brinster, 2008).

IGF1R ve IGF2 (ancak IGF-I değil) transkriptleri hem insan hem de fare blastokistlerinde eksprese edilir (Lighten ve ark., 1997) ve fare iç hücre kitlesinin hayatta kalması için IGF1R aracılı sinyalleşme gerekir (Chi ve ark., 2000). Tek başına IGF2, uzun süreli kültürde pluripotent insan EKH'lerinin ekspansiyonunu sürdürebilir ve Akt aktivasyonu yoluyla IGF sinyalleşme yolağı, insan EKH'sinin kendini yenilemesi için kritik öneme sahiptir (Bendall ve ark., 2007). IGF2 insüline yakın bir afinite ile IGF1R ve INSR-A'ya ve ayrıca daha düşük afinite ile de INSR-A/IGF1R ve INSR-B/IGF1R'ye bağlanır (Frasca ve ark., 1999). *Igf2* geni, damgalanmış genler kümesinin bir parçasıdır (Paulsen ve ark., 1998) ve bu nedenle yalnızca paternal alelden üretilir, maternal alel transkripsiyonel olarak sessizdir (DeChiara ve ark., 1991; Reik ve ark., 2000). IGF2 embriyonik ve fetal gelişimde temel bir rol oynar, oysa postnatal gelişimdeki rolü, büyük ölçüde IGF1 ile değiştirilebildiği için daha az önemli görünmektedir. Yine de *Igf2* ekspresyonu postnatal fare testislerinde GKH'lerde, Leydig hücrelerinde ve daha az miktarda (~10-kat düşük) Sertoli hücrelerinde saptanmış olup, Sertoli hücrelerinde ve GKH'lerde *Insr*, *Igf1r* ve ortak efektörler olan *Irs1* ve *Irs2*'yi kodlayan transkriptlerin varlığı IGF1 ve IGF2'nin otokrin-parakrin olarak GKH'lerin proliferasyonunu düzenlediğini önermektedir (Pitetti ve ark., 2013; Soder ve ark., 1992). AP+GKH'ler hem INSR hem de IGF-1R'yi gen ve protein seviyelerinde ifade ettiğinden ve IGF-1R sinyalleşmesinin AP+ GKH'lerde *OCT4*, *SOX2* ve *NANOG*'un pluripotensi gen ekspresyonunu desteklediği gösterildiğinden (Huang ve ark., 2009), biz de çalışmamızda GKH'lerin uzun-süreli kültüründe Kanatsu-Shinohara ve Kubota grupları tarafından tarif edilen besi yerini (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2003; Kanatsu-Shinohara ve Shinohara, 2010; Kubota ve ark., 2004a; Wu ve ark., 2015; Zhang ve ark., 2014a) modifiye ederek buna IGF2'yi ekledik. GKH'nin idamesi ve proliferasyonu üzerinde faydalı bir etkiye sahip olduğu gösterilen SCF (Kubota ve ark., 2004a) ve GKH kültüründe sıklıkla kullanılan LIF, EGF, bFGF ve GDNF'yi çoğu grup gibi biz de 17 bileşeni içeren StemPro-34 serumsuz kültür ortamına dahil ettik ve besi yerinde %0.2 BSA ve %2 KSR kullandık. Medyamızı GKH'lerinin elde edilmesi için daha önce Kanatsu-Shinohara ve ark.

(2010) çalışmasında tarif edilen medyayla karşılaştırmadığımız için, GKH medyamızdaki küçük modifikasyonların GKH elde edilmesi üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

CD49f+ hücreler %1 Matrigel® kaplı 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarında kültüre edildiğinde 1 hafta içinde çoğalıp kuyunun tabanına yayıldılar; yuvarlak çoğalan hücreler, adheren somatik hücreler üzerinde yaklaşık 10-20 GKH kolonisi oluşturdu. Bu primer kolonilerin çoğu, belirsiz sınırları olan kompakt hücre kümelerinden oluşuyordu. 10. günde non-enzimatik (EDTA ile) veya stereomikroskop altında manüel olarak kaldırılan GKH kolonileri %1 Matrigel® kaplı 6-kuyucuklu hücre kültürü plakalarındaki MMC ile inaktive edilmiş TSH'ler üzerine ekildi. Her 4-7 günde bir pasaj yapıldı ve her pasajın sonunda 50-70 hücreli koloniler gözlemlendi; GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF ve mLIF'in 2 günde bir yenilenmesiyle GKH'ler >3 ay boyunca *in vitro* olarak çoğaltılabildi. P5'te sınırları belli olmayan kompakt GKH kolonileri AP aktivitesi gösterdi (Şekil 3.3).

P5'teki GKHBH'lerde, *in vitro* kültür ortamına alınmamış GKH'lerine göre farklılaşmamış EKH'leri idame ettirmek için gerekli olan pluripotensi belirteçlerinden *Oct4a*, *Sox2* ve *Nanog* genlerinin (Chambers ve ark., 2003; Guo ve ark., 2012; Mitsui ve ark., 2003; Pesce ve Schöler 2001; Zhang ve Cui, 2014c) ve total *Oct4* (Guo ve ark., 2012) geninin ifadesinde artış görüldü (Şekil 3.4).

Fare *Oct4* geninin alternatif *splicing* (uç birleştirme) mekanizması ile *Oct4a* ve *Oct4b* izoformları mevcuttur (Guo ve ark., 2012; Liu ve ark., 2018; Mizuno ve Kosaka, 2008). Hem *Oct4a* hem de *Oct4b* varyantları yalnızca PKH'lerde saptanabilmiş, somatik hücrelerde saptanamamıştır. *Oct4a* ve *Oct4b* varyantlarının, fare pluripotent embriyonik karsinoma (P19) hücreleri, fare OG2-uPKH'leri ve fare EKH hattı J1 hücreleri farklılaştığında downregüle olduğu hem transkript hem de protein düzeyinde gösterilmiştir (Liu ve ark., 2018). *OCT4*'ü amplifiye etmek için için *OCT4A* ve *OCT4B* spliced varyantları için tasarlanmış primerleri kullanarak gerçekleştirilen PZR analizi sonucunda OCT4A ekspresyonunun, insan EKH'leri ve insan embriyonal karsinoma

hücreleri ile sınırlı olduğu, ancak BeWo ve JAR gestasyonel koryokarsinoma insan hücre hatları ve teratokarsinoma-türevli yolk sac karsinoma insan hücre hattı 1411H dahil olmak üzere incelenen diğer pluripotent olmayan hücre tiplerinde saptanabilir bir ifadesinin olmadığı sonucuna varılmıştır. İncelenen hücrelerin hemen hemen tümünde ise OCT4B ekspresyonu görülmüştür (Atlasi ve ark., 2008). Daha önce *Oct4a*'nın, çalışmamızda kullandığımız Oct4a primer çiftiyle (Çizelge 2.1) amplifiye edildiği gösterilmiştir (Liu ve ark., 2018).

Çalışmamızda, GDNF reseptörü olan, farklılaşmamış GKH'lerde ifade edilen ve GKH'lerin idame ettirilmesi için önemli olan *Gfra1* (Gassei ve ark., 2009; Grasso ve ark., 2012) ifadesinde ise 1.7 katlık bir azalma gözlemlendi (Şekil 3.4). Bununla birlikte, GKHBH'lerde *Ly6a*'nın mRNA ifadesinde de GKH'lere göre artış görüldü (Şekil 3.4). Ayrıca, P5 GKHBH kolonilerinin çoğalma kapasitesi *Ki67* mRNA ifadesinin artmasıyla belirlendi ve ilk izole edildiği duruma göre artış gösterdiği saptandı (Şekil 3.4). GKH'lerde ifade edilen genler arasında, germ hücresine özgü *Ddx4* de olmasına rağmen P5'te ifade seviyesi GKH'lere göre 2 katlık bir azalma gösterdi (Şekil 3.4). Erişkin testisinde, spermatositlerin ve yuvarlak spermatidlerin sitoplazmasında DDX4 (VASA olarak da bilinir) proteini ifade edilir (Fujiwara ve ark., 1994). DDX4, gelişim sırasında erkek germ hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir (Tanaka ve ark., 2000). Şekil 3.13a'da DDX4'ün progenitör GKH'lerde ifade edildiğini ve spermlere farklılaşma sırasında downregüle edildiğini gösterdik. *Ddx4* mRNA seviyesinin azalması pluripotensi belirteçlerinin artmasıyla paralel olarak progenitör GKH'lerinin undiferansiye duruma geçişlerini doğrular niteliktedir. P5'e getirmek için yaklaşık 7 hafta kültür ortamında kalan GKH'lerde *Stra8*, *Sycp3*, *Prm2* ve *Acr* farklılaşmış germ hücrelerine özgü transkriptlerin seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü (Şekil 3.4); bu da spontan spermatogenik farklılaşmanın gerçekleşmediğini gösterdi.

Kullandığımız GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF ve mLIF ile zenginleştirilmiş kültür ortamında AP+CD49f+ GKHBH'lerin mRNA düzeyindeki ekspresyon paterninin PKH'lerle benzer özellikleri paylaştığını söyleyebiliriz (Kanatsu-Shinohara ve ark., 2008).

AP+CD49f+ GKHBH'lerdeki SSEA-1 (EKH belirteci) (Solter ve Knowles, 1978), GPR125 (multipotent yetişkin spermatogonyal kaynaklı kök hücre; MASC belirteci) (Seandel ve ark., 2007) ve SCA-1+/CD45-/LIN- (VSEL'lerin immünofenotipik ifade profili) (Bhartiya ve ark., 2014; Kucia ve ark., 2006; Patel ve Bhartiya, 2016) protein ifadeleri *in vitro* kültüre alınmamış GKH'lere göre artış gösterdi (Şekil 3.5). GKHBH'lerin çoğunda SCA1'in yoğunlukla sitoplazmada ve SSEA-1'in nükleusta ifade edildiğini, GPR125'in ise yoğunlukla kompakt kolonilerde güçlü pozitif sinyal verdiğini bulduk. DDX4 ifadesi büyük oranda sitoplazmada ve membranda görülüp hücrelerin çoğunda zayıf pozitiflikte saptanırken bunların bir kısmında nükleusa ve/veya sitoplazmaya lokalize OCT4 ifadesi gözlemlendi. DDX4-/OCT4+ hücreler DDX4+ hücrelere göre boyut olarak daha küçüktü ve daha az miktardaydı. DDX4 zayıf pozitif/OCT4A sitoplazmik ekspresyon gösteren az sayıdaki hücrenin GKH'leri oldukları, DDX4-/OCT4A nüklear ekspresyon gösterenlerin ise pluripotent karakterdeki GKHBH'ler olduğu sonucuna vardık (Şekil 3.6). Sonuç olarak GKH'ler sağladığımız *in vitro* koşullarda büyük ölçüde DDX4-/OCT4A+ GKHBH'lere dediferansiye oldu, bu da PZR sonuçlarımızı doğrular nitelikte idi.

Nodal transkriptinin ve Nodal olgun proteinin, immatür farelerin taze izole edilmiş A tipi spermatogonyasında ve C18-4 hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve ekspresyonunun yetişkin farelerin germ hücrelerinde azaldığı ve Sertoli hücrelerinde bulunmadığı daha önce gösterilmiştir (He ve ark., 2009). Araştırmacılar bu çalışmada, otokrin Nodal sinyalleşmesi sonucu, *Oct-4* transkripsiyonunun upregüle olmasının, spermatogonyal kök/progenitör hücrelerin çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol oynadığını bildirmiştir (He ve ark., 2009). Ancak önceki bir mikroarray çalışmasında, Nodal transkriptinin kültüre edilmiş GKH'lerde çok az olduğu veya hiç bulunmadığı bildirilmiştir (Oatley ve ark., 2006a). He ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada, Sertoli hücrelerinin aynı zamanda ACVR1B, ACVR1C ve ACVR2B reseptörlerini eksprese ettiğini bulmuştur, bu nedenle spermatogonyadan salgılanan Nodal ligandın bir parakrin yol aracılığıyla Sertoli hücrelerinin düzenlenmesinde de rol oynadığı tahmin edilmektedir (He ve ark., 2009). Fare EKH'leri NODAL ifade eder ve fosforile SMAD2/3 sergiler (Mullen ve ark., 2011; Ogawa ve ark., 2004). Fare fetal testislerinde Nodal sinyalleşmesinin pluripotensi faktörlerinin ekspresyonunu

düzenlediği gösterilmiştir (Miles ve ark., 2013; Spiller ve ark., 2012; Tian-Zhong ve ark., 2016). Hipomorfik *Nodal* fare modelinde pluripotensi faktörlerinin (Nanog, Oct4 ve Sox2) ekspresyonu downregüle edilirken, erkek germ hücre farklılaşması belirteçleri upregüle edilmiş olup (Nanos2, p15 ve Dnmt3l) bu, Nodal'ın erkek germ hücrelerinde pluripotensiyi korumak ve farklılaşmayı geciktirmek için işlev gördüğünü gösterir (Spiller ve ark., 2012). Genç erişkinlerde testiküler germ hücre tümörleri, yaygın bir öncü olan germ hücre neoplazi in situ'dan (GCNIS, daha önce karsinoma in situ olarak bilinir) kaynaklanır. GCNIS hücrelerinin büyük olasılıkla somatik nişten gelen değişen sinyalleşmenin bir sonucu olarak, fetal testis gelişimi sırasında prespermatogonyaya farklılaşmayı başaramayan dönüştürülmüş gonositler olduğu düşünülmektedir (Rajpert-De Meyts ve ark., 2006). Harpelunde ve ark. (2020) çalışmasında Nodal sinyalleşme faktörlerinin GCNIS hücrelerinde, seminomalarda ve embriyonal karsinomalarda pluripotensi faktörü OCT4 ile eşzamanlı olarak belirgin şekilde ifade edildiğini, Nodal sinyalleşmesinin *in vitro* inhibisyonunun ise pluripotensi faktörlerinin ve Nodal yolağı genlerinin ekspresyonunu azaltırken, yolağın uyarılmasının bunların ekspresyonunu arttırdığını saptamıştır (Harpelunde ve ark., 2020).

Serum veya büyüme faktörlerinden yoksun kimyasal olarak tanımlanmış koşulda kültüre edilen insan EKH'leri, insan uPKH'leri ve fare EpiKH'leri kendiliğinden nöroektoderm soyuna farklılaşır (Chng ve ark., 2010; Vallier ve ark., 2004; Vallier ve ark., 2009a; Vallier ve ark., 2009b). Aktivin/Nodal sinyalinin, Nodal veya Aktivin A'nın eksojen olarak eklenerek veya Nodal transgenin konstitütif overekspresyonu ile aktivasyonu, spontan nöroektoderm farklılaşmasını bloke ederek kök hücre pluripotensisini korur (Vallier ve ark., 2004; Vallier ve ark., 2005). Benzer şekilde, Lefty'nin overekspresyonu ile Nodal'ın inhibisyonu, nöroektoderm farklılaşmasını artırır (Smith ve ark., 2008) ve Aktivin/Nodal sinyalinin SB431542 tarafından bloke edilmesi, besleyici tabakalarda, serum varlığında veya kimyasal olarak tanımlanmış koşullarda büyüyen insan EKH'lerinin farklılaşmasını indükler (Chng ve ark., 2010; James ve ark., 2005).

Çalışmamızda AP+CD49f+ GKHBH'lerde ko-reseptör *Cripto (Tdgfl)*, *Nodal*'ın kendisi ve endojen inhibitör *Lefty2* dahil olmak üzere Nodal sinyalleşme faktörleri GKH'lere oranla daha yüksek seviyede eksprese edildi (Şekil 3.7a). Öte yandan, reseptörlerin *Alk4 (Acvr1b)* (Ser/Thr reseptör ve *Acvr2b* (ActRIIB'yi kodlar) ifadeleri de GKH'lerine kıyasla AP+CD49f+ GKHBH'lerde daha düşüktü (Şekil 3.7a) ve bu da, *in vitro* kültürde pluripotensinin spontan olarak indüklenmesi sırasında Nodal sinyal yolağının bir rol oynadığına işaret edebilir. Tanımlanmış transkripsiyon faktörleriyle TGF- β sinyalinin inhibisyonu, fare ve insan fibroblastlarından uPKH üretiminin etkinliğini önemli ölçüde artırır (Ichida ve ark., 2009; Lin ve ark., 2009; Maherali ve ark., 2009; Zhu ve ark., 2010). TGF- β sinyali inhibe edilip aynı zamanda connexin43 (Cx43) geni susturularak fare neonatal kardiyomiyositlerinden transgen içermeyen uPKH'ler üretilmiştir (Dai ve ark., 2014). Bizim elde ettiğimiz AP+CD49f+ GKHBH'lerde TGF- β kinaz reseptör kompleksi reseptörü olan *Tgfr1* ifadesi de GKH'lere oranla daha düşüktü (Şekil 3.7a). GKHBH kolonilerinde protein düzeyinde ACVR2B, TGFBR1 ve NODAL ekspresyonu görüldü (Şekil 3.7b). Ayrıca, aktif Nodal/TGF β sinyali, AP+CD49f+ GKHBH'lerde fosforile SMAD2'nin varlığıyla gösterildi (Şekil 3.11) (Spiller ve ark., 2012; Wu ve ark., 2013). Sonuçlarımız, Nodal yolağı elemanlarının yanında *Tgfr1* ekspresyonlarının ve Oct4a, Sox2 ve Nanog gen ekspresyonları ile SSEA1 protein ifadesinin birbiriyle uyumlu şekilde arttığını göstermektedir.

Hem dişi hem de erkek germ hücrelerinde mayozun başlaması veya ilerlemesi için *Stra8* gereklidir (Griswold ve ark., 2012). *Stra8* iki rolde işlev görür: (i) pluripotensi genlerini downregüle etmek için farklılaşmadan önce bir transkripsiyonel baskılayıcı olarak ve (ii) pre-mayotik başlatılma ile ilişkili genleri aktive etmek için bir transkripsiyonel aktivatör olarak (Sinha ve ark., 2021). *Nanos2*'nin gelişim sırasında erkek germ hücrelerinde *Stra8* ekspresyonunu ve mayoz başlangıcını önlemek için gerekli olduğu gösterilmiştir (Suzuki ve Saga, 2008). 20 μ M SB431542 varlığında 96 saat kültüre edilen XY gonadlarında, DNA çift zincir kırılmalarının bir belirteci ve mayozun ayırt edici özelliği olan γ H2AX ve sinaptonemal kompleksten bir protein olan SYCP3, germ hücrelerinde immünolokalize edilmiştir (Souquet ve ark., 2012). 72 saat kültür sonucunda ise XY gonadlarında *Nanos2*'nin ifadesi önemli

ölçüde azalmış ve ayrıca mayozun iki spesifik işaretleyicisini, bir kohezin olan REC8 ve bir rekombinaz olan DMC1'i kodlayan genlerin ekspresyonu indüklenmiştir. *Stra8* (RA sinyalleşmesinden bağımsız bir yolakla) ve *Msx1* gibi mayoz başlangıcına dahil olan genler de kontrole göre upregüle olmuştur (Souquet ve ark., 2012). E11.5'teki farelerin testisleri 40 µM SB431542 ile 72 saat kültüre edildiğinde NANOS2+ hücreler önemli ölçüde azalmış ve E12.5'teki farelerin testisleri 40 µM SB431542 ile 24 saat kültüre edildiğinde *Stra8*, *Dmc1* ve *Rec8* ifade seviyeleri önemli ölçüde upregüle olmuştur (Wu ve ark., 2013). SB431542 ve RA reseptörü antagonisti AGN 193109'un eşzamanlı eklenmesi yoluyla hem nodal/aktivin hem de RA sinyal yollarının eşzamanlı inhibisyonu, mayozun başlamasını bastırmıştır (Wu ve ark., 2013). Sonuç olarak Wu ve ark. (2013) çalışmasında, nodal/aktivin sinyalinin, hem Nanos2'nin bir indükleyicisi hem de RA'nın bir baskılayıcısı (ki bu mayozu indükleyecektir) olarak çalıştığını ve bu iki fonksiyonun bağımsız olarak hareket ettiği sonucuna varmıştır. SB431542'nin *ex vivo* kültürler haricinde *in vitro* GKH kültürlerinde mayozu başlatmasındaki etkisini inceleyen bir çalışma yapılmamıştır. GKH'leri SB431542'in eklenmesiyle *in vitro* kültüre eden tek çalışma Moraveji ve ark.'na (2019) aittir. Moraveji ve ark. (2019)'nın yaptıkları çalışmada kültürün 3-10. günlerinde her 3 günde bir besi yeri değiştirilerek 10 µM SB431542 uygulanmasının, insan GKH proliferasyonunda iki-kat artışa yol açtığı bulunmuş ve busulfan ile tedavi edilen farelere *in vivo* SB431542 uygulamasının ise, testis boyutu, ağırlığını arttırdığı ve inhibin B'nin serum seviyesinde artışıyla gösterildiği üzere, spermatogenez iyileşmesini ve spermatogenezin hem başlamasını hem de tamamlanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (Moraveji ve ark., 2019). Daha önce SB431542'yi GKH'lerin *in vitro* diferansiyasyonu için kullanan bir çalışma yapılmadığından, uygulanılacak doz ve süre için biz de çalışmamızda Moraveji ve ark.'nın (2019) çalışmasında kullanılan 10 µM ve 1 haftayı baz aldık. Araştırmacılar burada 10 µM SB431542 ile 1 hafta kültüre edilmiş GKH'lerin ROS seviyelerinde önemli düşüşler görmüşler ve ayrıca karyotip analizleriyle de uygulamadan sonra kromozomal stabilitenin korunduğunu göstermiştir (Moraveji ve ark., 2019). Çalışmamızda, SB431542 tedavisi, pSmad2'nin Smad2 oranında büyük bir düşüşle sonuçlanmış, bu da SB431542'nin TGFβ sinyalleşmesini bloke etmedeki etkinliğini ortaya koymuştur (Şekil 3.11).

RA'e spermatogenez süresince birçok kez ihtiyaç duyulur. RA ilk olarak *Stra8* gibi düzenleyici genleri aktive ederek spermatogonya farklılaşmasını ve pre-mayotik aktivasyonu düzenler. Bunu takiben RA, kan-testis bariyerini oluşturan sıkı bağlantıları oluşturmada gerekli transkriptlerin düzenlenmesi için lazım olan RA-RAR/RXR sinyalleşmesini kolaylaştırır. Son olarak RA, Sertoli hücrelerinden olgun spermatidlerin lümene salımına (spermiyasyon) yardımcı olur (Chung ve ark., 2005; Gewiss ve ark., 2020; Griswold ve ark., 2012). RA kaynaklı spermatogonyal farklılaşma daha önce karakterize edilmiştir (Dann ve ark., 2008; Wang ve ark., 2016; Zheng ve ark., 2018). 1 μ M RA'nın GKH'lerine eklenmesi, 3. günde OCT4 ve PLZF seviyelerini büyük ölçüde azaltmış, bu da kültürlerin artık farklılaşmamış spermatogonya içermediğini göstermiş ve c-KIT+ popülasyonu yaklaşık iki kat artmıştır. 3 günlük RA tedavisinden sonra kolonizasyon, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında 10 kattan daha fazla azalmış ve transplante edilen hücrelerin canlı olduğu doğrulandığından, kolonizasyondaki azalmanın canlı hücre popülasyonundaki daha az sayıdaki GKH'ye bağlı olduğu bulunmuştur (Dann ve ark., 2008). Western blot, qPCR ve RNA-dizi analizleri, GKH kendini yenileme genleri *Plzf* ve *Oct4*'ün önemli ölçüde downregülasyonunu gösterirken, *Stra8*'in RNA ve protein seviyeleri 2 μ M RA'ya maruz kaldıktan 3 gün sonra belirgin şekilde artmıştır (Zheng ve ark., 2018). Daha önce yayınlandığı gibi (Wang ve ark., 2016), RA kullanılarak farklılaşmaya teşvik edildiğinde ve MEF besleyici tabakasında *in vitro* büyütüldüğünde, GKH'lerin zigoten spermatositlere ve hatta bazen pakiten-benzeri spermatositlere dönüşebileceğini gözlemlense de bu kültür sistemi kullanılarak daha fazla germ hücre gelişimi gerçekleşmemiştir (Lei ve ark., 2020).

Kültür sistemimiz, (i) GKH farklılaşmasını ve erken mayozu ve (ii) mayozu ve spermatid-benzeri hücrelerin oluşumunu indükleyen iki farklı kültür ortamının kullanıldığı iki aşamadan oluşuyordu (Şekil 3.8a). İki aşama için de FSH, GDNF, KSR, FBS, 1X NEAA, 1X ITS-G, pirüvat ve L-askorbik asitten oluşan bazal farklılaşma besi yeri (Arkoun ve ark., 2015; Bai ve ark., 2018; Ibtisham ve ark., 2021; Travers ve ark., 2013; Xu ve ark., 2020,) sabit tutulup sadece birinci aşama için besi yerine SB431542 eklenip ikinci aşamada da besi yerine RA eklendi. AP+CD49f+ GKHBH kolonileri, SB431542 ile kültürün 9. gününde paired (A_{pr}) spermatogonya (2

hücre), 11. gününde aligned (A_{al-4}) spermatogonya (4 hücre) ve A_{al-8}/A_{al-16} spermatogonya (8/16-hücre) oluşturdu ve spermatonyumların rengi daha koyulaşarak 13. günde büyümeleri yavaşladı ve geniş çaplı hücre ölümü başladı (Şekil 3.8b). 13. günde spermatosit-benzeri hücreden SA spermatid-benzeri hücre geçişi saptandı. SB431542 içeren besi yerinin RA içerenle değiştirilmesi 14. günde yapıldı, bundan 2 gün sonra koyu renkli spermatogenik hücre kümeleri yerini esas olarak tekli hücrelere bıraktı. 21. günde birden fazla uzantıları olan hücreler tabana yapışık halde gözlemlendi. 24. günde makrosefalik amorf sperm görülmesi ve çok sayıda hücrenin ölümüyle beraber 28. günde immotil sperm hücrelerine rastlandı (Şekil 3.8b).

Spermatogonyumdan yuvarlak spermatidlere kadar olan aşamalarda ifade edilen ve en güçlü olarak erken spermatosit aşamasında görülen *Ddx4*'ün ifadesi, SB431542 varlığında kontrol hücrelerine göre 19 kat artış gösterirken, RA ile muamele edilen germ hücrelerinde, SB431542 ile kültüre edilmiş hücrelerinkine göre azalmış olarak bulundu (Şekil 3.9). Spermatogenik hücre çoğalma durumunu ölçmek için *Ki-67* ifadesine bakıldığında, SB431542 varlığında, indüklenmemiş kontrol hücrelerine göre mRNA seviyesinin 6-kat arttığı, RA sonrası ise kontrole kıyasla azaldığı saptandı (Şekil 3.9). SB431542'deki *Ki-67* ifadesindeki artış muhtemelen farklılaşmış spermatogonyanın artan çoğalmasını yansıtmaktadır (Dann ve ark., 2008). Beklenildiği gibi, *Gfra1* ve *Oct4* GKH belirteçleri transkript düzeyinde SB431542 grubunda kontrole göre ve RA grubunda SB431542 grubuna göre önemli ölçüde azaldı. Benzer şekilde *Oct4a* ve *Ly6a* VSEL belirteçleri transkript düzeyinde SB431542 grubunda kontrole göre ve RA grubunda SB431542 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (Şekil 3.9). Germ hücrelerinde mayozun başlatılması için gerekli olduğu bilinen *Stra8*'in mRNA seviyesinin SB431542 ilavesiyle 31-kat arttığı, ardından RA grubunda ise SB431542'li gruba göre 2-kat düştüğü kaydedildi (Şekil 3.9). Bu sonuç da SB431542 eklenmesiyle amaçladığımız mitotik/mayotik geçişin transkripsiyonel olarak tetiklenerek mayozun indüklenmiş olabileceğini gösterir. *Prm2* ve *Acr* ifadesi SB431542'den sonra RA eklenmesiyle kontrole göre sırasıyla 31-kat ve 18-kat arttı (Şekil 3.9). H2AX/SYCP3 protein ifadesi, hem yalnızca SB431542 ile muamele edilen hem de SB431542'yi takiben RA verilen germ hücrelerinin çoğunda nükleusta ve sinaptonemal komplekse doğru yüklenmiş

şekilde görüldü (Şekil 3.10). SB431542 uygulaması sonrasında farklılaşmış spermatogonyanın proliferere olduğu, hücrelerin çoğunun PCNA ekspresyonu göstermesiyle teyit edildi. Mikroskopik gözlem sonucu morfolojik olarak saptanan sperm-benzeri hücrelerin flagellumlarının güçlü bir şekilde CLAMP ile boyandığı gözlenirken, CLAMP ifadesine farklılaşmaya sokulmamış kontrol grubu hücrelerinde ve SB431542 verilen grupta rastlanmadı. Bu sonuçlar SB431542 ilavesinin, AP+CD49f+ GKHBH'leri çoğunlukla mayoz bölünmenin başlangıç aşamasındaki leptoten spermatositlere indüklediğini gösterir. Bunu takiben RA uygulamasıyla, içlerinde mayozun daha ileri aşamasındaki pakiten ve diploten spermatositler ile kuyruk gelişimi olan spermilerin bir arada bulunduğu faza geçtiği izlendi (Şekil 3.10). *In vitro* üretilen sperm hücrelerinin fonksiyonelliğini doğrulamak için ICSI yapıldı (Şekil 3.22). ICSI uygulanan spermiler, oositleri aktive edebildi ve zigotlar global® total® LP kültür medyumunda kültüre edildiğinde iki-hücreli ve dört-hücreli embriyolar ve blastokistler gelişti. 6-8 haftalık dişi BALB/c farelerde süperovüle olan dişi yüzdesi literatürde yaklaşık olarak %38 olarak verilmiştir (Golkar-Narenji ve ark., 2012) ve BALB/c farelerden blastokist gelişim başarısı çok düşüktür (Auerbach ve Auerbach, 2011). Çalışmamızda ise, 40 BALB/c fare oositinin *in vitro* sperm ile mikroenjeksiyonunu takiben 9 embriyo blast aşamasına erişti (%22.5) (Şekil 3.22).

GKH transplantasyonunun, insan olmayan primatlar dahil olmak üzere çeşitli hayvan modellerinde spermatogenezi restore ettiği kanıtlanmıştır (Hermann ve ark., 2012; Honaramooz ve ark., 2002; Izadyar ve ark., 2003; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004; Kubota ve ark., 2009; Ryu ve ark., 2007; Schlatt ve ark., 1999; Wu ve ark., 2012). Ancak, GKH'lerin *homing* (yuvalanma) verimliliği yalnızca %12'dir (Nagano, 2003a). Kemo- ve radyoterapi sadece GKH'leri değil aynı zamanda niş hücrelerini de (Sertoli, Leydig ve peritübüler hücreler) etkilediğinden (Bhartiya ve Anand, 2017b; Tröndle ve ark., 2017), GKH nişinin eski haline getirilmesi GKH transplantasyonunun etkinliğini artırabilir.

Testisin tamamının immün ayrıcalıklı olduğuna dair kanıtlar birçok çalışmada gösterilmiştir. Örneğin, allojeneik veya ksenojenik pankreatik adacıklar, deri fragmanları veya paratiroid greftleri gibi yabancı dokular testise transplante

edildiğinde, testise nakledilen hücreler kan-testis bariyerinin dışında interstisyel boşlukta yer alsa da immün ayrıcalıklı olmayan bölgelere transplantasyondan sonraki hayatta kalma süreleri ile karşılaştırıldığında greftin hayatta kalma süresi daha uzundur (Mital ve ark., 2010; Selawry, 1994; Setchell, 1990). Ayrıca, seminifer tübüllerin bazal kompartmanında germ hücre kolonizasyonu ile sonuçlanan başarılı allojenik GKH transplantasyonu, immünsupresyon olmaksızın çok çeşitli türlerde gerçekleştirilmiştir (Kaur ve ark., 2013). Bu, spermatogonya ve preleptoten spermatositlerin kan-testis bariyerinin dışında olduğunu, otoimmünojenik antijenleri eksprese ettiğini ve yine de bu germ hücrelerine karşı normalde bir immün tepkisi üretilmediğini gösteren önceki bir çalışmayla tutarlıdır (Yule ve ark., 1988). Bu nedenle, testisin immünolojik olarak ayrıcalıklı ortamını oluşturmak için kan-testis bariyerine ek olarak başka mekanizmalara ihtiyaç vardır. Sertoli hücrelerinin immünolojik bariyerleri geçerek yalnızca allojenik veya ksenojenik olarak transplante edildiğinde kendileri için değil, aynı zamanda hem immünomodülatör hem de trofik faktörleri üreterek diyabet tedavisi için pankreas adacıkları, nörodejeneratif hastalıklar için adrenal kromafin hücreleri, hepatositler ve deri greftleri gibi ko-transplante edildiği hücrelerin hayatta kalma süresini de uzattıkları birçok transplantasyon çalışmasında gösterilmiştir (Kaur ve ark., 2015). NOD farelerindeki islet β -hücreleri/Sertoli hücreleri ko-transplantasyonunda Sertoli hücreleri tarafından salgılanan TGF- β 'nın islet β -hücrelerini otoimmün yıkımdan koruduğu bulunmuştur (Suarez-Pinzon ve ark., 2000). Sertoli hücreleri aynı zamanda düzenleyici immün hücrelerini (düzenleyici T hücreleri ve M2 makrofajları) indüklerken, innate, humoral ve hücre-aracılı immün tepkilerini aktif olarak baskılayan immün düzenleyici faktörleri de ifade ederek bu ayrıcalıklı immün ortamını yaratır. Sertoli hücreleri immün tepkiyi modifiye etmek ve germ hücrelerini korumak için toleransı indüklemek üzere birlikte hareket eden apoptoz inhibitörlerini (SERPINA3N, SERPINB9), kompleman inhibitörlerini (serping1, DAF veya CD55, MCP veya CD46, clusterin), immünomodülatör faktörleri (IDO, galektin-1), anti-inflamatuar sitokinleri (TGFB1) ve kemokinleri (CCL27) ifade eder (Doyle ve ark., 2012; Guazzone ve ark., 2009; Meinhardt ve Hedger, 2011; Wang ve ark., 1994).

Sertoli hücreleri dejenere Sertoli hücreleriyle yer değiştirerek (Shinomura ve ark., 2014) veya *de novo* tübüller oluşturarak ve anti-apoptotik, anti-inflamatuar ve

anti-oksidatif (Barati ve ark., 2020; Izuka ve ark., 2020) özelliklere sahip parakrin faktörleri salgılayarak, hasarlı GKH nişinin geri kazanılmasına yardımcı olabileceğinden, biz çalışmamızda bir gruba sadece çoğunlukla Sertoli hücrelerinden oluşan sağlıklı TSH'leri transplante edip sonuçta hasarlı nişi onarıp spermatogenezi yeniden başlatabilme kapasitelerini test ettik. Çünkü busulfan uygulanan fare testislerinde sayıca az da olsa undiferansiye GKH bulunduğu tespit edilmiştir (Caires ve ark., 2012a; Chen ve ark., 2018). Normal donörlerden alınan GKH'lerin transplantasyonu için alıcı olarak PTU ile tedavi edilmiş farelerin (geçici hipotiroidizm indüksiyonu sonucu Sertoli hücrelerinde sayıca artış) kullanılması, normal sayıda Sertoli hücresine sahip PTU ile tedavi edilmemiş alıcı farelerin testislerine kıyasla erişilebilir nişlerde 3 kattan daha fazla bir artış ortaya koymuştur (Oatley ve ark., 2011b). Eksojen sağlıklı TSH'lerin hasar görmüşlerin yerine geçmesi ve parakrin etkilerinin spermatogenezi düzeltmede yetersiz kalıp eksojen AP+CD49f+ GKHBH'lere ihtiyaç duyacağını test etmek ve GKHBH'lerin kolonizasyon etkinliğini arttırmak için de TSH'leri GKHBH'lerle birlikte transplante ettiğimiz TS-GKHBHT grubunu oluşturduk ve sadece TSH verdiğimiz (TSHT) grupla spermatogenezi yeniden oluşturmadaki etkilerini kıyasladık.

Busulfan tercihen primitif spermatogonyayı öldürdüğünden, genellikle boş seminifer tübüller oluşturmak için birden fazla spermatogenez döngüsü (farelerde 35 gün) gerekir. Germ hücre ablasyonu için yeterli olduğunu gözlemlediğimiz 40 mg/kg busulfan enjeksiyonundan 35 gün sonra sırasıyla CM-DiI ve SP-DiOC floresan karbosiyanin boyaları ile işaretlenmiş P4 TSH'leri ve P5 GKHBH'leri (Şekil 3.18) rete testis yoluyla testislere transplante ettik. Fareler IVIS *in vivo* floresans görüntülemesiyle izlendiğinde transplante edilen hücrelerin testise başarılı bir şekilde inkorpore oldukları görüldü. Transplantasyondan 56 gün sonra çıkartılan alıcı testisleri takip eden deneylerde kullanıldı. TS-GKHBHT grubunun testis boyutları hem kontrole hem de TSHT grubuna göre daha büyüktü (Şekil 3.19). TS-GKHBHT grubunda *Ddx4*'ün gen ifadesi kontrole göre 10 kat artış gösterirken, bu oran TSHT grubunda 3'tü (Şekil 3.20). TSHT grubunda kontrol grubuna göre *Oct4a*, *Gfra1* ve *Oct4* transkript miktarları artarken, TS-GKHBHT grubunda bu artış çok daha fazlaydı. VSEL belirteci *Ly6a*'nın mRNA seviyesiyse sırasıyla TSHT ve TS-GKHBHT

gruplarında 3 kat ve 2 kat artış gösterdi. TSHT grubunda mayotik ve post-mayotik genlerin mRNA seviyelerinin TS-GKHBHT grubundakilere göre daha az, ancak kontrole göre yine de istatistiksel olarak anlamlı artış göstermesi, TSH'lerin busulfana bağlı bozulmuş nişi düzelterek endojen spermatogenezin restorasyonuna katkı sağladıklarına işaret eder. TS-GKHBHT grubunda kontrole göre mayotik *Stra8* ve *Sycp3* ve post-mayotik *Prm2* ve *Acr* genlerinin ifadelerinin tümünde artış gözlemlendi, bu da donör-kaynaklı GKHBH'lerin kolonize olup gerçekten de *in vivo* diferansiye olduğuna işaret eder (Şekil 3.20). Tüm gruplarda ve grupların tüm tekrarlarında hem DDX4 hem de SYCP3 ifadesi gözlemlendi. TS-GKHBHT grubunda DDX4+ ve SYCP3+ tübüllerin sayısı TSHT grubuna göre daha fazlaydı (Şekil 3.21b). TSH'ler varlığında elde ettiğimiz AP+CD49f+ GKHBH'lerin *in vivo* germ hücresine farklılaşma potansiyeli ile spermatogenezin yeniden oluşturulması sağlandı ve transplante edilen BALB/c testislerde teratom oluşumu görmedik.

Germ hücre-kökenli PKH'lerin elde edildiği çoğu çalışmada (Conrad ve ark., 2008; Guan ve ark., 2006; Kanatsu-Shinohara ve ark., 2004; Ko ve ark., 2009; Seandel ve ark., 2007) embriyonik kök-benzeri hücrelerin pluripotensisini ortaya koymak için bu hücrelerin teratom oluşturma yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. TSH'lerle serumsuz ortamda ko-kültüre edilen neonatal testislerden elde edilmiş GKH'ler güçlü AP aktivitesi göstermiş, EKH ve PGH özellikleri sergilemiş ve AP+GKH'lerin pluripotensi özellikleri, hepatik ve nöronal soylara doğru *in vitro* farklılaşma ve blastokistlere enjeksiyondan sonra embriyonik kimeraların oluşumu ile doğrulanmıştır (Huang ve ark., 2009). NOD/SCID farelerde AP+GKH'ler subkütan olarak verildiğinde teratom oluşturmuş, EGFP-AP+GSC koloniler, bulsufan verilmiş FVB farelerinin testislerine transplante edildikten 8 hafta sonra ise seminifer tübüllerde spermatogenezin tamamıyla restore edildiği gösterilmiştir (Huang ve ark., 2009). Fare POU5F1+/c-Kit+ GKH'leri EGF, FGF2, LIF ve GDNF büyüme faktörleri varlığında kültüre edildiğinde, pluripotent EKH belirteçlerini (*Pou5f1*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*, *Dppa5*, *SSEA-1* ve AP) ifade eden, yüksek telomeraz aktivitesi sergileyen ve üç germ tabakasının da hücrelerine farklılaşan multipotent germ hücre (mGH) hatları oluşturmuştur (Izadyar ve ark., 2008). Ancak mGH'ler testislere transplante edildiğinde tübüllerde spermatogenez başlamamış ve ayrıca nüde farenin deri, kas ve

testisine enjekte edildiğinde teratom oluşmamıştır (Izadyar ve ark., 2008). Testis biyopsisinden elde edilen insan mGKH'lerinin farklı pluripotensi belirteçlerini ifade ettiği, üç germ tabakasının tümünün türevlerini içeren embriyoid cisimleri oluşturduğu, normal bir XY karyotipini koruduğu, H19 lokusunda hipometile edildiği ve yüksek seviyelerde telomeraz ifade ettiği doğrulanmıştır; ancak SCID farenin böbrek kapsülünün altına enjekte edildiğinde teratom oluşturmamıştır (Kossack ve ark., 2009). Hem farelerde hem de sıçanlarda farklılaşmamış EKH'lerin intramiyokardiyal transplantasyonu da tümör oluşumu ile sonuçlanmamıştır (Min ve ark., 2002; Singla ve ark., 2006). Testisten pluripotent EKH-benzeri hücrelerin elde edildiği bazı çalışmalarda olduğu gibi, bizim çalışmamız da teratom oluşumunun saptanmaması bu yönüyle bu çalışmalar ile uyumlu olup, pluripotensi belirteçlerinde artış gösteren AP+CD49f+ hücrelerin teratom oluşturmak için yeterince yeniden programlanmamış olabileceğini düşündürmektedir.

Farklılaşmamış spermatogonya arasında, alkilleyici ajan busulfan veya irradasyon tarafından indüklenen DNA hasarına karşı en dirençli olan popülasyon kendi kendini yenileyen GKH'lerdir (Aloisio ve ark., 2014; Komai ve ark., 2014; Van Beek ve ark., 1990; Zheng ve ark., 2018). Çalışmamızda, 40 mg/kg busulfan verilen farelerin testislerinde *Gfra1*, *Oct4* ve *Oct4a* gen ifadeleri düşüş gösterirken, *Ly6a* (Sca-1) ifadesinde 14 kat artış görüldü (Şekil 3.13). Literatürde ise Sca-1'in testisteki ifadesi üzerine çelişkili çalışmalar yer almaktadır; bir grup, Sca-1'in testiste bir VSEL belirteci olduğunu savunurken (Bhartiya ve ark., 2014; Kucia ve ark., 2006; Patel ve Bhartiya, 2016), diğerleri germ hücrelerinin Sca-1 ifade etmediğini, fakat Sca-1'in interstisyel dokuda eksprese edildiğini göstermiştir (van Bragt ve ark., 2005). Dolayısıyla, bizim çalışmamızda her ne kadar *Sca-1* gen ifadesi busulfan verilen grupta DMSO grubuna göre artmış olsa da (Şekil 3.13) bu grupta aynı zamanda histolojik incelemelerde interstisyel hücrelerin oranında da göreceli artış görüldüğünden (Şekil 3.12, orta panel), busulfan uygulanan grupta direkt olarak busulfanın VSEL sayısını arttırmış olacağı sonucuna varamayız. Ayrıca, testiküler VSEL'lerin bir belirteci olan *Oct4a* ifadesinin de busulfana bağlı olarak hem transkript düzeyinde 1.5 kat azalmış (Şekil 3.13) olduğunun tespit edilmesi, hem de protein ifadesinin hem DMSO hem de busulfan uygulanan testis kesitlerinde saptanmamış

olması (Şekil 3.13) dikkate alındığında, elde ettiğimiz bulguların 8-haftalık fare testislerinde VSEL'lerin bulunmadığına işaret ettiğini düşündürmektedir.

Literatürde yapılan bir çalışmada, RA ile 21 gün indüksiyondan sonra, Kİ kök hücreleri Stra8 ekspresyonu gösteren germ hücrelerine farklılaştırılmıştır. Kİ kök hücrelerinin 21 gün boyunca RA indüksiyonundan sonra FACS ile ayrıştırılan Stra8+ germ hücreleri, fragilis, stella, Rnf17, Mvh ve Oct4 gibi PGH'lerin bilinen moleküler belirteçlerini; yanı sıra Rbm, c-Kit, Tex18, Stra8, Piwil2, Dazl, Hsp90 α , β 1- ve α 6-integrinler dahil olmak üzere GKH'lerin/spermatogonyumların moleküler belirteçlerini eksprese etmiştir (Nayernia ve ark., 2006b). Benzer şekilde başka bir çalışmada RA, fare Kİ kaynaklı SSEA1+, OCT4+ ve CXCR4+ hücrelerinin *in vitro* olarak erkek germ hücrelerine farklılaşmasını indüklemiştir (Kashani ve ark., 2014). Zhang ve ark. (2014b) çalışmasında, sıçan Kİ kök hücreleri Sertoli hücrelerinin *conditioned* medyası ile *in vitro* olarak indüklendikten sonra spesifik spermatogonik gen ve protein belirteçlerini ifade etmiş ve busulfan-kaynaklı azoospermik sıçan testislerine transplantasyondan sonra alıcı testislerinde Vasa, Stella, SMAD1, Dazl, GCNF, HSP90 α , integrin β 1 ve c-kit gibi GKH/spermatogonyum belirteçlerinin ifadesi saptanmıştır (Zhang ve ark., 2014b). Yetişkin murin Kİ'ndeki en ilkel mezenkimal progenitör hücreler SSEA-1+ mezenkimal hücrelerdir ve yalnızca birkaç mezenkimal hücre tipine değil, aynı zamanda astrosit-, endotelyal- ve hepatosit benzeri hücreler gibi geleneksel olmayan hücre tiplerine de *in vitro* olarak negatif muadillerinden farklılaşma konusunda çok daha yüksek bir kapasiteye sahiptir (Anjos-Afonso ve Bonnet, 2007). Busulfan ile tedavi edilen farelerin Kİ'nde CFU-F konsantrasyonu yarıya inmiş ancak MKH'nin proliferatif potansiyeli ve farklılaşma yetenekleri sabit kalmıştır (Nifontova ve ark., 2008). Çalışmamızda, 40 mg/kg busulfanın DMSO kontrolüne göre total testis hücreleri arasında SSEA-1+ hücrelerin oranında 2.5 katlık bir artış meydana getirdiğini bulduk (Şekil 3.14). Yine spermatogonyal kök ve progenitör yüzey belirteci GPR125'in protein ifadesi de DMSO kontrolüne göre busulfan verilmiş grupta 35 günün sonunda artarak iki ayrı popülasyonda zayıf- ve güçlü-pozitif olarak gözlenmiştir (Şekil 3.14). Bu, busulfana bağlı interstisyel alandaki artan hücre yoğunluğuyla ve busulfana görece dirençli GPR125+ hücrelerin sağ kalımıyla ilişkili olabilir. PODXL/CD49f güçlü pozitif Kİ-MKH'lerin, zayıf

pozitiflere göre intravenöz infüzyondan sonra yaralı dokulara göç etme olasılığı daha yüksektir (Lee ve ark., 2009b). Proinflamatuvar sitokin TNF- α , Kİ MKH'lerde CD49f'nin ekspresyonunu azaltır ve bu da lamininlere adezyon kabiliyetini düşürdüğünden Kİ MKH'lerinin migrasyon kabiliyetini arttırıp nişten çıkmalarına katkıda bulunabilir (Pronk ve ark., 2011; Yang ve ark., 2015). Öte yandan, CD49f'nin downregülasyonu, MKH'lere hasarlı dokulara gelişmiş bir göç kabiliyeti kazandırmak için ICAM-1, CD106, CXCR4 gibi diğer moleküllerin upregülasyonu ile iş birliği yapabilir (Fu ve ark., 2009; Shi ve ark., 2007; Xiao ve ark., 2012; Ziaei ve ark., 2014). Bizim sonuçlarımızda CD49f ifadesi busulfan sonrasında DMSO kontrolüne göre 2.5 kat arttığından (Şekil 3.16), bunun Kİ'nden hasarlı testis dokusuna göç eden Kİ-kökenli mezenkimal hücrelerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, CD49f antikoruyla pozitif seçilimi yapılan fare GKH'leri sayıca efektif bir şekilde arttırıp bazı pluripotent belirteçleri daha yüksek ifade eden GKHBH'lere dönüştürdükten sonra, *in vitro* ortamda GKHBH'lerin sırasıyla SB431542 ve RA ile matür germ hücrelerine diferansiyasyonunu sağlayıp mayozu indüklediğimiz kültür koşullarını geliştirdik ve GKHBH'leri TSH'lerle birlikte busulfanla kemoablate edilmiş fare testislerine transplante edip spermatogenez restorasyonunun gerçekleştiğini gözlemledik.

İnsan için halen klinik uygulamadan uzak olmasına rağmen, *in vitro* spermatogenez gerçekleştirilmek için literatürde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalardan bazıları EKH'lerin *in vitro* tam olarak farklılaştırılmasını (Easley IV ve ark., 2012; Geijsen ve ark., 2004; Nayernia ve ark., 2006a; Zhou ve ark., 2016), bazıları ilk olarak EKH'lerin PGHBH'lere, SKH-benzeri hücrelere veya GKHBH'lere *in vitro* olarak farklılaştırılıp, infertil farelerin seminifer tübüllerine transplante edildikten sonra spermatogenezin *in vivo* devam ettirildiği çalışmalardır (Hayashi ve ark., 2011; Ishikura ve ark., 2016; Li ve ark., 2019). Tüm bu çalışmalar haploid spermatid benzeri hücrelerin oluşumunu bildirmiş olsa da, yalnızca bir çalışma (Zhou ve ark., 2016), başarılı mayozu ve *in vitro* fertil haploid germ hücrelerinin oluşumunu karakterize eden en önemli olayları gösterebilmiştir. Böyle olsa bile kişinin kendi EKH'lerinden sperm elde edebilme, azoospermik hastaların tedavisinde kullanılabilir bir yöntem olmaktan uzaktır. Olası alternatif strateji kişinin kendi somatik hücrelerinden elde edilen uPKH'lerden gamet elde edilmesi olsa da bu hücrelerin *in vitro* gamet üretiminde yeniden programlama için gerekli epigenetik modifikasyonlar açısından güvenliği ile ilgili kaygılar bulunmaktadır, bu konuda yapılan çalışmalar halen bu sorunları çözebilecek düzeyde değildir.

Maturasyon arresti olan hastaların, GKH'leri olmasına karşın, mayoz öncesi veya mayoz aşamasında duraklama olduğu için haploid spermatid oluşumunda bozukluk olmaktadır (Jan ve ark., 2018). Bu hastalar için kendi GKH'lerini kullanarak

olgun sperm elde edilmesi fertilite tedavisi sağlar. *Rhesus macaque*'a kendi otolog prepubertal testis dokusunun greft olarak transplante edilmesi ile sperm üretimi ve yavru elde edilmiştir (Fayomi ve ark., 2019).

Alıcı fare testisine nakledildikten sonra daha fazla koloni oluşturma yeteneğine sahip olan CD49f+ hücrelerin (Shinohara ve ark., 1999) fare erkek GKH'lerinin geçerli bir belirteci olduğu gösterilmiştir ve son zamanlarda, CD49f pozitif hücrelerinin Sertoli hücreleriyle ko-kültürden sonra sperm benzeri hücreler oluşturduğuna inanılmaktadır (Lee ve ark., 2006a). Sonuçlar, CD49f'nin erkek GKH'lerin etkili bir belirteci olduğunu ve erkek GKH proliferasyonunu artırmak için Oct4 ve kromozom modifiyer histon H3-lizin 9 (H3K9) arasında “crosstalk” olabileceğini göstermektedir (Zheng ve ark., 2016).

In vitro koşullarda GKH'lerin proliferasyonu ve diferansiyasyonunu gerçekleştiren efektif olarak kullanılabilecek kültür koşulları henüz geliştirilememiştir. SB431542, ATP bağlama bölgesi için rekabet ederek ALK5 ALK4 ve ALK7'yi inhibe eden TGF- β /Aktivin/NODAL yolağının seçici ve güçlü bir inhibitörüdür. Literatürde *in vitro* olarak GKH'lerin diferansiyasyonu ve diploid germ hücrelerini mayoza indüklemek için küçük molekül SB431542'inin kullanıldığı mevcut bir çalışma yoktur. Ayrıca literatürde, uygun *in vitro* kültür koşulları sağlanarak GKH'lerden türetilmiş pluripotent özellik gösteren AP+CD49f+ GKHBH'lerin, sağlıklı niş ortamı sağlamak ve GKH-türevli GKHBH'lerin unipotent hale gelmelerini hızlandırmak üzere, Sertoli hücrelerinden zengin TSH'lerle azoospermik farelerin testislerine ko-transplantasyonunun yapıldığı bir çalışma da bulunmamaktadır.

Bu nedenle, çalışmamız, tüm testiküler kök hücreler arasından fonksiyonel GKH'lerin CD49f antikoruyla pozitif seçiliminin yapılmış olması; SCF, IGF2, LIF, EGF, bFGF ve GDNF büyüme faktörleri kombinasyonunun ilk defa 17 bileşeni içeren StemPro-34 serumsuz kültür ortamına eklenip bu zenginleştirilmiş kültür ortamında CD49f+ GKH'lerin GATA4+ TSH besleyici tabakası üzerinde canlılığını

kaybetmeden uzun süreli *in vitro* olarak çoğaltılabildiği bir çalışma olması bakımından literatürde ilk olma özelliği taşımaktadır. CD49f+ GKH'lerin bir aydan uzun süreli kültürü sonucunda elde edilen bu hücreleri, EKH belirteçlerinin (Oct4a, Sox2, Nanog, SSEA-1) ifadesindeki artış ve AP aktivitesi göstermesi nedeniyle GKH-benzeri hücreler (GKHBH) olarak isimlendirdik. Literatürde daha önce yapılmamış bu *in vitro* diferansiyasyon sistemimiz sırasıyla, (i) GKH farklılaşmasını ve erken mayozu indüklemek için SB431542 uygulanan ve (ii) mayozu ve spermatid-benzeri hücrelerin oluşumunu sağlamak için RA uygulanan ardışık iki aşamadan oluşuyordu. SB431542, GKHBH'leri çoğunlukla leptoten spermatosit-benzeri hücrelere farklılaştırıp, mayozu başlatmak için yeterli olsa da mayozun daha ileri aşamasındaki pakiten ve diploten spermatositler ile kuyruk gelişimi olan sperm-benzeri hücrelerin bir arada bulunduğu faza geçiş ancak SB431542'yi takiben RA uygulanmasıyla başarıldı. *In vitro* elde edilen sperm-benzeri hücreler, ICSI sonrasında kültürde blastokist aşamasındaki embriyoların gelişmesiyle anlaşıldığı üzere, fertilizasyon yeteneğine sahipti. GKHBH'lerin *in vivo* germ hücresine farklılaşma potansiyeli, koloni hücreleri germ hücre yönelimli olduğundan, bu hücrelerin ilk defa çoğunlukla Sertoli hücrelerinden oluşan GATA4+ TSH'lerle beraber testise transplante edilmesiyle gösterildi.

Transplantasyon sonrasında donör-kaynaklı spermatogenezin tanımlanmasının en iyi yolu, germ hücrelerinde bir marker transgen ifade eden bir donör hayvanın kullanılmasıdır; örneğin, LacZ ifade eden fareler (B6.129S7-Gtrosa26, ROSA) veya yeşil floresan protein (GFP) ifade eden fareler (C57BL/6-TgN ACTbEGFP 10sb). Donör kaynaklı spermatogenez, donör hücre bir transgen ifade etmedikçe, alıcının yeniden oluşturulmuş endojen spermatogenezinden kesin olarak ayırt edilemez. Homozigot W fareleri (W^v/W^v veya W/W^v) (Brinster ve Zimmermann, 1994b; Silvers, 1979) gibi doğal olarak veya busulfan enjeksiyonuyla sonradan oluşturulmuş infertil bir alıcının kullanılması, alıcının yeniden oluşturulmuş spermatogenez sorununun üstesinden gelebilir ve böylece bir raportör geni olmayan hücre popülasyonunda GKH varlığını doğrulamak için kullanılabilir. Fakat koloni sayısı belirlenemez; bu nedenle, işaretlenmemiş donör hücreler kullanıldığında, enjekte edilen hücre popülasyonundaki GKH sayısını belirlemek için transplantasyon kullanılamaz. Koloni sayısı, bir popülasyondaki GKH sayısı ile doğrudan ilişkilidir ve koloni uzunluğu, bir GKH'nin

çoğalma ve spermatogenezi yeniden oluşturma yeteneğinin bir ölçüsünü sağlar (Dobrinski ve ark., 1999; Nagano ve ark., 1999). Bu çalışmanın devamı olarak, GKHBH kolonilerinin *in vitro* kültür ortamına almadığımız GKH'lerine kıyasla Oct4a, Sox2, Nanog, SSEA-1 pluripotensi belirteçlerinin ifadelerinde anlamlı artış ve AP aktivitesi göstermesiyle pluripotent olabileceğini varsaydığımız GKHBH'lerin pluripotensisinin *in vitro* olarak üç germ yaprağının hücrelerine farklılaştırılarak gösterilmesinin, 'sadece' GKHBH'lerin NOD-SCID fareye enjekte edildiğinde teratom oluşturabildiğinin gösterilmesinin proje çıktısına eklenmesi; GKHBH'lerin aynı zamanda, pluripotent hücreler üretmek için diğer yetişkin hücrelere göre daha güvenli bir yol sunabileceği ve hastaya özel rejeneratif tedavi almak için yeni fırsatlar sağlayabileceğini göstermek için bir gerekliliktir.

Bu çalışmamızdan elde edilen veriler ile GKHBH'lerin azoospermik yetişkin erkeklerde ve radyoterapi veya kemoterapi alacak kanser teşhisi konmuş prepubertal erkek çocuklarında spermatogenez restorasyonu için otolog transplantasyon veya *in vitro* matür sperm elde edilmesi çalışmalarına yol göstereceği kanısındayız.

ÖZET

Erkek Germline Kök Hücre-Benzeri Hücrelerin Olgun Sperme In Vitro Farklılaşması ve In Vivo Spermatogenez Restorasyonuna Etkisi

Germline kök hücresi (GKH), germ hattı gelişimi sırasında kendini yenileyerek veya farklı evre/alt tipte kök hücrelere dönüşerek daha fazla kök hücre üreten ve yavru oluşturmak için spermatozoa ve ovaya farklılaşan benzersiz bir hücre türüdür. Testis biyopsisinden elde edilen spermatogonyal kök hücreler (SKH)/GKH'ler veya yetişkin dokulardan elde edilen uPKH'lerden türetilen primordiyal germ hücresi-benzeri hücreler (PGHBH), Klinefelter sendromu gibi genetik hastalıklara veya başka nedenlere bağlı non-obstrüktif azoospermik yetişkin erkeklerde ve radyoterapi/kemoterapi alacak kanser teşhisi konmuş prepubertal erkek çocuklarında spermatogenez restorasyonu amacıyla otolog transplantasyon için veya *in vitro* spermatogenez için kullanılabilirler. Gen mutasyonları taşıyan hastaların GKH'leri veya PGHBH'leri, CRISPR/CAS9 teknolojisi kullanılarak transplantasyondan önce düzeltilebilir. Bununla birlikte, uPKH'lerin *in vitro* gametogenez alanına katkısı hafife alınamasa da, yeniden programlama ile ilişkili epigenetik modifikasyonlar açısından güvenliği ile ilgili kaygılar bulunmaktadır. Bu çalışmada ilk kez CD49f+ GKH'lerin GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF ve mLIF varlığında pluripotensi belirteçlerinin ifadelerinde anlamlı artış ve alkalen fosfataz aktivitesi gösteren GKHBH'lere dönüşebileceğini gösterdik; özellikle, bu AP+CD49f+ GKHBH kolonileri, >%95 GATA4+ testiküler somatik hücre (TSH) besleyici tabakası üzerinde iki aydan uzun bir süre çoğaltılabildi. AP+CD49f+ GKHBH'ler, TGF- β /Aktivin/Nodal yolu inhibitörü, SB431542 ve ardından retinoik asit uygulandığında *in vitro* ortamda mayozu tamamladı ve kuyruk gelişimi olan sperm-benzeri hücrelere farklılaştı. SB431542 ön aşamasından sonra leptoten spermatositler gözlenmiş olsa da, retinoik asidin kombine etkisi üzerine mayozun daha ileri aşamasındaki pakiten ve diploten spermatositler ile sperm-benzeri hücrelerin bir arada bulunduğu heterojen bir popülasyon saptandı. Elde edilen sperm-benzeri hücreler, intrasitoplazmik enjeksiyondan sonra blastokist oluşumunu tetikleyebildi. GKHBH'lerin ve Sertoli hücrelerince zengin TSH'lerin germ hücre ablasyonu yapılmış fare testislerine ko-transplantasyonunun ardından, tübül başına düşen DDX4+SYCP3+ hücreler, yalnızca TSH transplante edilenlerden daha yüksekti. Sonuç olarak, TSH'ler bozulmuş nişi yeniden oluşturarak endojen spermatogenezi yeniden başlatabilirken, eksojen GKHBH'ler sağlıklı niş hücreleri varlığında başarılı bir şekilde spermatogenezi tamamlayabildi. Genel olarak yaklaşımımız, tanımlanmış kültür koşulları altında GKH'lerin fonksiyonunu ve canlılığını kaybetmeden sayıca arttırılabileceğini ve GKH-GKHBH hücre dönüştürme yöntemimizin, Oct4a, Sox2, Nanog, SSEA-1 pluripotensi belirteçlerinin ekspresyonunu upregüle edebileceğini, GKHBH'lerin *in vitro* olarak fonksiyonel sperm-benzeri hücrelere farklılaşabileceğini ve somatik niş hücresi desteğiyle de *in vivo* spermatogenezi yeniden başlatabileceğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Spermatogenez, Non-obstrüktif Azoospermi, Onkofertilite, GKH, GKHBH, *in vitro* mayoz

SUMMARY

In Vitro Differentiation of Male Germline Stem Cell-Like Cells into Mature Sperm and Their Effect on In Vivo Spermatogenesis Restoration

Germline stem cell (GSC) is a unique cell type that produces more stem cells through self-renewal or generating different stage/subtype stem cells during germline development and differentiates into spermatozoa and ova to produce offspring. Spermatogonial stem cells (SSCs)/GSCs obtained from testicular biopsy or primordial germ cell-like cells (PGCLCs) derived from iPSCs obtained from adult tissues can be used for autologous transplantation to restore spermatogenesis or for *in vitro* spermatogenesis in adult men with non-obstructive azoospermia due to genetic diseases such as Klinefelter syndrome or other causes, and in prepubertal boys diagnosed with cancer who will receive radiotherapy/chemotherapy. Patients carrying gene mutations can have their SSC or PGHBH corrected prior to transplantation using CRISPR/CAS9 technology. However, although the contribution of iPSCs to the field of *in vitro* gametogenesis cannot be underestimated, there are concerns regarding their safety in terms of epigenetic modifications associated with reprogramming. In this study, we showed for the first time that CD49f⁺ GSCs can transform into GSCLCs that show a significant increase in the expression of pluripotency markers and alkaline phosphatase activity in the presence of GDNF, EGF, bFGF, IGF2, SCF and mLIF; notably, those GSCLC colonies could be propagated for more than two months on >95% GATA4⁺ testicular somatic cell (TSC) feeders. AP⁺CD49f⁺ GKHBHs completed meiosis *in vitro* and differentiated into sperm-like cells with tail development when TGF- β /Activin/Nodal pathway inhibitor, SB431542 followed by retinoic acid were introduced. Although leptotene spermatocytes were observed after the SB431542 pre-treatment, upon the combined effect of retinoic acid, a heterogeneous population of pachytene and diplotene spermatocytes and sperm-like cells in more advanced meiosis were detected. The resulting sperm-like cells were able to induce blastocyst formation after intracytoplasmic injection. After co-transplantation of GSCLCs and Sertoli cell-rich TSCs into germ cell ablated mouse testes, DDX4⁺SYCP3⁺ cells per tubule were higher than those transplanted with TSCs alone. TSCs were able to restore endogenous spermatogenesis by reforming the impaired niche, whereas exogenous GSCLCs were able to undergo successful spermatogenesis in the presence of healthy niche cells. Overall, our approach suggests that under defined culture conditions, GSCs can be expanded in number without losing their function and viability and our GSC-GSCLC conversion method can upregulate the expression of Oct4a, Sox2, Nanog, SSEA-1 pluripotency markers, GSCLCs can undergo stepwise differentiation into functional sperm-like cells *in vitro* and can also reinitiate spermatogenesis *in vivo* with somatic niche cell support.

Key words: Spermatogenesis, Non-obstructive Azoospermia, Oncofertility, GSC, GSCLC, *in vitro* meiosis

KAYNAKLAR

- ABU ELHİJA M., LUNENFELD E., SCHLATT S., HULEİHEL M. (2012). Differentiation of Murine Male Germ Cells to Spermatozoa in a Soft Agar Culture System. *Asian J Androl.* **14**: 285–93.
- ABU-ABED S., MACLEAN G., FRAULOB V., CHAMBON P., PETKOVİCH M., DOLLE P. (2002). Differential expression of the retinoic acid-metabolizing enzymes CYP26A1 and CYP26B1 during murine organogenesis. *Mech Dev.* **110**: 173–177.
- AGARWAL A., MULGUND A., HAMADA A., CHYATTE M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **13**.
- AGARWAL A., PAREKH N., PANNER SELVAM M. K., HENKEL R., SHAH R., HOMA S. T., RAMASAMY R., KO E., TREMELLEN K., ESTEVES S., MAJZOUB A., ALVAREZ J. G., GARDNER D. K., JAYASENA C. N., RAMSAY J. W., CHO C. L., SALEH R., SAKKAS D., HOTALİNG J. M., LUNDY S. D., VİJ S., MARMAR J., GOSALVEZ J., SABANEĞH E., PARK H. J., ZİNİ A., KAVOUSSİ P., MİCİC S., SMİTH R., BUSETTO G. M., BAKIRCIOĞLU M. E., HAİDL G., BALERCİA G., PUCHALT N. G., BEN-KHALİFA M., TADROS N., KİRKMAN-BROWNE J., MOSKOVTSSEV S., HUANG X., BORGES E., FRANKEN D., BAR-CHAMA N., MORİMOTO Y., TOMİTA K., SRİNİ V. S., OMBELET W., BALDİ E., MURATORİ M., YUMURA Y., LA VİGNERA S., KOSGİ R., MARTİNEZ M. P., EVENSON D. P., ZYLBERSZTEJN D. S., ROQUE M., COCUZZA M., VİEİRA M., BEN-MEİR A., ORVİETO R., LEVİTAS E., WİSER A., ARAFA M., MALHOTRA V., PAREKATTİL S. J., ELBARDİSİ H., CARVALHO L., DADA R., SİFER C., TALWAR P., GUDELOGLU A., MAHMOUD A. M. A., TERRAS K., YAZBECK C., NEBOJSA B., DURAIRAJANAYAGAM D., MOUNİR A., KAHN L. G., BASKARAN S., PAİ R. D., PAOLİ D., LEİSEGANG K., MOEİN M. R., MALİK S., YAMAN O., SAMANTA L., BAYANE F., JİNDAL S. K., KENDİRCİ M., ALTAY B., PEROVİC D., HARLEV A. (2019). Male Oxidative Stress Infertility (MOSI): Proposed Terminology and Clinical Practice Guidelines for Management of Idiopathic Male Infertility. *World J Mens Health.* **37**: 296-312.
- AKSGLAEDE L., WİKSTROM A. M., RAJPERT-DE MEYTS E., DUNKEL L., SKAKKEBAEK N. E., JUUL A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Update.* **12**: 39–48.
- ALOİSİO G. M., NAKADA Y., SAATCİOĞLU H. D., PEÑA C. G., BAKER M. D., TARNAWA E. D., MUKHERJEE J., MANJUNATH H., BUGDE A., SENGUPTA A. L. ve AMATRUDA J. F. (2014). PAX7 expression defines germline stem cells in the adult testis. *The Journal of clinical investigation*, **124**: 3929-3944.
- AMANN R. P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *J Androl.* **29**: 469–487.
- AMORY J. K., MULLER C. H., SHİMSHONİ J. A., ISOHERRANEN N., PAİK J., MOREB J. S., AMORY D. W. SR., EVANOFF R., GOLDSTEİN A. S., GRİSWOLD M. D. (2011). Suppression of spermatogenesis by bisdichloroacetyldiamines is mediated by inhibition of testicular retinoic acid biosynthesis. *J. Androl.* **32**, 111–119.
- ANAND S., BHARTİYA D., SRİRAMAN K. ve MALLİCK A. (2016). Underlying Mechanisms that Restore Spermatogenesis on Transplanting Healthy Niche Cells in Busulphan Treated Mouse Testis. *Stem Cell Reviews and Reports.* **12**: 682-697.

- ANAND S., BHARTIYA D., SRIRAMAN K., PATEL H., MANJRAMKAR D. D. (2014). Very small embryonic-like stem cells survive and restore spermatogenesis after busulphan treatment in mouse testis. *J Stem Cell Res Ther.* **4**.
- ANAND S., PATEL H. ve BHARTIYA D. (2015). Chemoablated mouse seminiferous tubular cells enriched for very small embryonic-like stem cells undergo spontaneous spermatogenesis in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology.* **13**.
- ANDERSON E. L., BALTUS A. E., ROEPERS-GAJADIEN H. L., HASSOLD T. J., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M., PAGE D. C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 14976–14980.
- ANDERSON R. A., FULTON N., COWAN G., COUTTS S., SAUNDERS P. T. (2007). Conserved and divergent patterns of expression of Dazl, vasa and Oct4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. *BMC Developmental Biology.* **7**.
- ANJOS-AFONSO F., BONNET D. (2007). Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* **109**: 1298-306.
- AOSHIMA K., BABA A., MAKINO Y., OKADA Y.. (2013). Establishment of alternative culture method for spermatogonial stem cells using knockout serum replacement. *PLoS One.* **8**: e77715.
- APONTE P. M., SODA T., TEERDS K. J., MIZRAK S. C., VAN DE KANT H. J. ve DE ROOIJ D. G. (2008). Propagation of bovine spermatogonial stem cells in vitro. *Reproduction.* **136**: 543–557.
- APONTE P. M., VAN BRAGT M. P., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M. (2005). Spermatogonial stem cells: Characteristics and experimental possibilities. *Apmis.* **113**: 727–742.
- ARAKI R., UDA M., HOKI Y., SUNAYAMA M., NAKAMURA M., ANDO S., SUGIURA M., IDENO H., SHIMADA A., NIFUJI A., ABE M. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature.* **494**: 100-4.
- ARDEKANI H. S., GALDON G., ZARANDI N. P., PETTENATI M. J., KOGAN S., ATALA A. (2018). MP60-10 in vitro propagation of XXY and XY spermatogonial stem cells from non-mosaic human Klinefelter (XXY) syndrome testes. *J Urol.* **199**: e793.
- ARKOUN B., DUMONT L., MILAZZO J. P., WAY A., BIRONNEAU A., WILS J., MACÉ B., RIVES N. (2015). Retinol Improves In Vitro Differentiation of Pre-Pubertal Mouse Spermatogonial Stem Cells into Sperm during the First Wave of Spermatogenesis. *PLOS ONE.* **10**: e0116660.
- ATLASI Y., MOWLA S. J., ZIAEE S. A., GOKHALE P. J., ANDREWS P. W. (2008). OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells.* **26**: 3068–3074.
- AU H. K., PENG S. W., GUO C. L., LIN C. C., WANG Y. L., KUO Y. C., LAW T. Y., HO H. N., LING T. Y. ve HUANG Y. H. (2021). Niche Laminin and IGF-1 Additively Coordinate the Maintenance of Oct-4 Through CD49f/IGF-1R-Hif-2α Feedforward Loop in Mouse Germline Stem Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology.* **9**: p.646644.

- AUERBACH W. ve AUERBACH A. B. (2011). The importance of mouse es cell line selection. *Springer Protocols Handbooks*. 327–356.
- AYDOS O. S., YUKSELTEN Y., AYDOS D., SUNGUROGLU A., AYDOS K. (2021). Relationship between functional Nrf2 gene promoter polymorphism and sperm DNA damage in male infertility. *Syst Biol Reprod Med*. **67**: 399-412.
- BAAZEEM A., BELZİLE E., CIAMPÌ A., DOHLE G., JARVÌ K., SALONÌA A., WEIDNER W. ve ZİNİ A. (2011). Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *European urology*. **60**: 796–808.
- BABA S., HEİKE T., UMEDA K., IWASA T., KAİCHİ S., HİRAUMİ Y., DOİ H., YOSHİMOTO M., KANATSU-SHİNOHARA M., SHİNOHARA T. ve NAKAHATA T. (2007). Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells. *Stem Cells*. **25**: 1375-83.
- BAHADUR G. ve RALPH D. Gonadal tissue cryopreservation in boys with paediatric cancers. (1999). *Hum. Reprod*. **14**: 11–17.
- BAİ Y., ZHU C., FENG M., WEİ H., Lİ L., TİAN X., ZHAO Z., LİU S., MA N., ZHANG X., SHİ R., FU C., WU Z. ve ZHANG S. (2018). Previously claimed male germline stem cells from porcine testis are actually progenitor Leydig cells. *Stem Cell Research & Amp Therapy*, **9**: 200.
- BALTUS A. E., MENKE D. B., HU Y. C., GOODHEART M. L., CARPENTER A. E., DE ROOIJ D. G., PAGE D. C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat. Genet*. **38**: 1430–1434.
- BANNİSTER L. A., REİNHOLDT L. G., MUNROE R. J., SCHİMENTİ J. C. (2004). Positional cloning and characterization of mouse mei8, a disrupted allele of the meiotic cohesin *Rec8*. *Genesis*. **40**: 184–194.
- BARATİ E., NİKZAD H., KARİMİAN M. (2020). Oxidative stress and male infertility: Current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol. Life Sci*. **77**: 93–113.
- BASHİRİ Z., ZAHİRİ M., ALLAHYARİ H., ESMAEİLZADE B. (2022). Proliferation of Human Spermatogonial Stem Cells on Optimized PCL/gelatin Nanofibrous Scaffolds. *Andrologia*. e14380.
- BENDALL S. C., STEWART M. H., MENENDEZ P., GEORGE D., VİJAYARAGAVAN K., WERBOWETSKİ-OGİLVİE T., RAMOS-MEJİA V., ROULEAU A., YANG J., BOSSÉ M., LAJOİE G., BHATİA M. (2007). IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature*. **448**: 1015-21.
- BERGMANN M. (2006). Physiology of spermatogenesis. *Andrology for the Clinician*. Eds: Schill, W.B., Comhaire, F.H., Hargreave, T.B., Springer, Berlin, Heidelberg. 272-281.
- BHANG D. H., KİM B. J., KİM B. G., SCHADLER K., BAEK K. H., KİM Y. H., HSİAO W., DİNG B. S., RAFİİ S., WEİSS M. J., CHOU S. T., KOLON T. F., GİNSBERG J. P., RYU B. Y. VE RYEOM S. (2018). Testicular endothelial cells are a critical population in the germline stem cell niche. *Nat. Commun*. **9**: 4379.

- BHARTIYA D., ANAND S. (2017b). Effects of oncotherapy on testicular stem cells and niche. *Mol Hum Reprod.* **23**: 654–5.
- BHARTIYA D., ANAND S. ve PARTE S. (2015). VSELs may obviate cryobanking of gonadal tissue in cancer patients for fertility preservation. *Journal of Ovarian Research.* **8**.
- BHARTIYA D., ANAND S. ve PATEL H. (2016c). Making gametes from pluripotent stem cells: embryonic stem cells or very small embryonic-like stem cells?. *Stem Cell Investigation.* **3**: 57–57.
- BHARTIYA D., ANAND S., KAUSHIK A., SHARMA D. (2019). Stem Cells in the Mammalian Gonads. *Advances in experimental medicine and biology.* **1201**: 109–123.
- BHARTIYA D., ANAND S., PATEL H. ve PARTE S. (2017a). Making gametes from alternate sources of stem cells: past, present and future. *Reproductive Biology and Endocrinology.* **15**.
- BHARTIYA D., KASIVISWANATHAN S., UNNI S., PETHE P., DHABALIA J., PATWARDHAN S. ve TONGAONKAR H. (2010). Newer Insights Into Premeiotic Development of Germ Cells in Adult Human Testis Using Oct-4 as a Stem Cell Marker. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* **58**: 1093–1106.
- BHARTIYA D., MUNDEKAR A., MAHALE V. ve PATEL H. (2014). Very small embryonic-like stem cells are involved in regeneration of mouse pancreas post-pancreatectomy. *Stem Cell Research & Therapy.* **5**: 106.
- BHARTIYA D., SHAIKH A., ANAND S., PATEL H., KAPOOR S., SRIRAMAN K., PARTE S. ve UNNI S. (2016a). Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. *Human Reproduction Update.* **23**: 41–76.
- BHARTIYA, D. (2016b). Use of Very Small Embryonic-Like Stem Cells to Avoid Legal, Ethical, and Safety Issues Associated With Oncofertility. *JAMA Oncology.* **2**: 689.
- BHATTACHARYA I., SHARMA P., PUROHIT S., KOTHİYAL S., DAS M., BANERJEE A. (2022). Recent Update on Retinoic Acid-Driven Initiation of Spermatogonial Differentiation. *Front Cell Dev Biol.* **10**: 833759.
- BIGONI-ORDÓÑEZ G. D., CZARNOWSKI D., PARSONS T., MADLAMBAYAN G. J. ve VILLA-DÍAZ L. G. (2019). Integrin $\alpha 6$ (CD49f), The Microenvironment and Cancer Stem Cells. *Current stem cell research & therapy.* **14**: 428–436.
- BOWLES J., FENG C. W., MILES K., INESON J., SPILLER C., KOOPMAN P. (2016). ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic acid in mouse fetal ovaries. *Nat. Commun.* **7**: 10845.
- BOWLES J., KNIGHT D., SMITH C., WILHELM D., RICHMAN J., MAMIYA S., YASHIRO K., CHAWENGSAKSOPHAK K., WILSON M. J., ROSSANT J., HAMADA H. ve KOOPMAN P. (2006). Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* **312**: 596–600.
- BRACKEN M. B., ESKENAZI B., SACHSE K., MCSHARRY J. E., HELLENBRAND K., LEO-SUMMERS L. (1990). Association of cocaine use with sperm concentration, motility, and morphology. *Fertil Steril.* **53**: 315–22.

- BRAYE A., TOURNAYE H., GOOSSENS E. (2019). Setting up a cryopreservation programme for immature testicular tissue: lessons learned after more than 15 years of experience. *Clin Med Insights Reprod Health*. **13**: 1179558119886342.
- BRÏNSTER R. L. (2002). Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*. **296**: 2174–2176.
- BRÏNSTER R. L. ve AVARBOCK M. R. (1994a). Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**: 11303–11307.
- BRÏNSTER R. L. ve ZÏMMERMANN J. W. (1994b). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **91**: 11298–11302.
- BROOKS N. L., VAN DER HORST G. (2003). Short-term effects of N’N-bis(dichloroacetyl)-1,8-octamethylenediamine (WIN 18446) on the testes, selected sperm parameters and fertility of male CBA mice. *Lab Anim*. **37**: 363–373.
- BUAAS F. W., KÏRSH A. L., SHARMA M., MCLEAN D. J., MORRÏS J. L., GRÏSWOLD M. D., DE ROOÏJ D. G., BRAUN R. E. (2004). *Plzf* is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet*. **36**: 647–652.
- BULLEJOS M., KOOPMAN P. (2004). Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Mol. Reprod. Dev*. **68**: 422–428.
- BURGOYNE P. S. (1988). Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci*. **322**: 63–72.
- BUSADA J. T., CHAPPELL V. A., NÏEDENBERGER B. A., KAYE E. P., KEÏPER B. D., HOGARTH C. A., GEYER C. B. (2015). Retinoic acid regulates Kit translation during spermatogonial differentiation in the mouse. *Dev. Biol*. **397**: 140–149.
- CAÏ Y., LÏU T., FANG F., SHEN S., XÏONG C. (2016). Involvement of ICAM-1 in impaired spermatogenesis after busulfan treatment in mice. *Andrologia*. **48**: 37–44.
- CAÏRES K. C., DE AVÏLA J. M., CUPP A. S. ve MCLEAN D. J. (2012b). VEGFA family isoforms regulate spermatogonial stem cell homeostasis in vivo. *Endocrinology*. **153**: 887–900.
- CAÏRES K. C., DE AVÏLA J. ve MCLEAN D. J. (2012a). Endocrine regulation of spermatogonial stem cells in the seminiferous epithelium of adult mice. *BioResearch Open Access*. **1**: 222–230.
- CARLOMAGNO G., VAN BRAGT M. P., KORVER C. M., REPPÏNG S., DE ROOÏJ D. G., VAN PELT A. M. (2010). BMP4-induced differentiation of a rat spermatogonial stem cell line causes changes in its cell adhesion properties. *Biol Reprod*. **83**: 742–749.
- CARLSEN E., GÏWERCMAN A., KEÏDÏNG N., SKAKKEBAEK N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ*. **305**: 609–613.
- CAROPPO E., COLPÏ E. M., D’AMATO G., GAZZANO G. ve COLPÏ G. M. (2019). Prediction model for testis histology in men with non-obstructive azoospermia: evidence for a limited predictive

- role of serum follicle-stimulating hormone. *Journal of assisted reproduction and genetics*. **36**: 2575–2582.
- CHAMBERS I., COLBY D., ROBERTSON M., NICHOLS J., LEE S., TWEEDIE S., SMITH A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. **113**: 643–55.
- CHEHAB M., MADALA A., TRUSSELL J. C. (2015). Onlabel and offlabel drugs used in the treatment of male infertility. *Fertil Steril*. **103**: 595–604.
- CHEN C., OUYANG W., GRIGURA V., ZHOU Q., CARNES K., LIM H., ZHAO G. Q., ARBER S., KURPIOS N., MURPHY T. L., CHENG A. M., HASSELL J. A., CHANDRASHEKAR V., HOFMANN M. C., HESS R. A. ve MURPHY K. M. (2005). ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*. **436**: 1030–1034.
- CHEN H-H., WELLING M., BLOCH D. B., MUÑOZ J., MIENTJES E., CHEN X., TRAMP C., WU J., YABUUCHI A., CHOU Y-F., BUECKER C., KRAINER A., WILLEMSSEN R., HECK A. J., GEIJSEN N. (2014). *Dazl* limits pluripotency, differentiation, and apoptosis in developing primordial germ cells. *Stem Cell Reports*. **3**: 892–904.
- CHEN L. Y., WILLIS W. D. ve EDDY E. M. (2016). Targeting the *Gdnf* gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**: 1829–1834.
- CHEN X., LIANG M. ve WANG D. (2018). Progress on the study of the mechanism of busulfan cytotoxicity. *Cytotechnology*, **70**: 497–502.
- CHENG C. Y. ve MRUK D. D. (2012a). The blood–testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*. **64**: 16–64.
- CHENG H., SHANG D. ve ZHOU R. 2022. Germline stem cells in human. *Sig Transduct Target Ther*. **7**: 345.
- CHENG I. F., KAISER D., HUEBSCHER D., HASENFUSS G., GUAN K., ve SCHÄFER K. (2012b). Differentiation of multipotent adult germline stem cells derived from mouse testis into functional endothelial cells. *Journal of vascular research*. **49**: 207–220.
- CHI M. M., SCHLEIN A. L. ve MOLEY K. H. (2000). High insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and insulin concentrations trigger apoptosis in the mouse blastocyst via down-regulation of the IGF-1 receptor. *Endocrinology*. **141**: 4784–4792.
- CHNG Z., TEO A., PEDERSEN R. A., VALLIER L. (2010). SIP1 mediates cell-fate decisions between neuroectoderm and mesendoderm in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **6**: 59–70.
- CHOI H. W., JOO J. Y., HONG Y. J., KIM J. S., SONG H., LEE J. W., WU G., SCHÖLER H. R., DO J. T. (2016). Distinct Enhancer Activity of Oct4 in Naive and Primed Mouse Pluripotency. *Stem Cell Rep*. **7**: 911–926.
- CHOI Y. J., OK D. W., KWON D. N., CHUNG J. I., KIM H. C., YEO S. M., KIM T., SEO H. G., KIM J. H. (2004). Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression in a Fas/FasL- and p53-independent manner. *FEBS Lett*. **575**: 41–51.

- CHUNG S. S. W., WANG X., WOLGEMUTH D. J. (2005). Male sterility in mice lacking retinoic acid receptor α involves specific abnormalities in spermiogenesis. *Differentiation*. **73**: 188–198.
- CLARK A. T., BODNAR M. S., FOX M., RODRÍQUEZ R. T., ABEYTA M. J., FÍRPO M. T. ve PERA, R. A. (2004). Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum. Mol. Genet.* **13**: 727–739.
- CLERMONT Y. (1963). The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Man. *Am J Anat.* **112**: 35–51.
- COCUZZA M., ALVARENGA C., PAGANÌ R. (2013). The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics (Sao Paulo)*. **68 Suppl 1**: 15-26.
- COLPÌ G. M., PÌEDÌFERRO G., NERVA F., GIACCHETTA D., COLPÌ E. M. ve PÌATTÌ E. (2005). Sperm retrieval for intra-cytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Minerva urologica e nefrologica = The Italian journal of urology and nephrology*. **57**: 99–107.
- CONRAD S., AZİZİ H., HATAMÍ M., KUBÍSTA M., BONÍN M., HENNENLOTTER J., SIEVERT K. D., SKUTELLA T. (2016). Expression of Genes Related to Germ Cell Lineage and Pluripotency in Single Cells and Colonies of Human Adult Germ Stem Cells. *Stem Cells Int*, 8582526.
- CONRAD S., RENNİNGER M., HENNENLOTTER J., WİESNER T., JUST L., BONÍN M., AİCHER W., BÜHRİNG H. J., MATTHEUS U., MACK A., WAGNER H. J., MİNGER S., MATZKİES M., REPPPEL M., HESCHELER J., SİEVERT K. D., STENZL A., SKUTELLA T. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*. **456**: 344-9.
- CORONA G., PİZZOCARO A., LANFRANCO F., GAROLLA A., PELLİCCİONE F., VİGNOZZİ L., FERLİN A., FORESTA C., JANNİNİ E. A., MAGGİ M., LENZİ A., PASQUALİ D., FRANCAVİLLA S. ve KLİNEFELTER ITALIAN GROUP (KING). (2017). Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. **23**: 265–75.
- COSTOYA J. A., HOBBS R. M., BARNA M., CATTORETTİ G., MANOVA K., SUKHWANİ M., ORWİG K. E., WOLGEMUTH D. J., PANDOLFİ P. P. (2004). Essential role of *Plzf* in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet.* **36**: 653–659.
- COVELLO K. L., KEHLER J., YU H., GORDAN J. D., ARSHAM A. M., HU C. J., LABOSKY P. A., SİMON M. C. ve KEİTH B. (2006). HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*, **20**: 557–570.
- CULTY M. (2013). Gonocytes, from the Fifties to the Present: Is There a Reason to Change the Name?. *Biol. Reprod.* **89**: 46.
- DAİ P., HARADA Y., MİYACHİ H., TANAKA H., KİTANO S., ADACHİ T., SUZUKİ T., HİNO H. ve TAKAMATSU T. (2014). Combining TGF- β signal inhibition and connexin43 silencing for iPSC induction from mouse cardiomyocytes. *Sci Rep.* **4**: 7323
- DAMSGAARD J., JOENSEN U. N., CARLSEN E., ERENPREİSS J., BLOMBERG JENSEN M., MATULEVİCİUS V., ZİLAİTİENE B., OLESEN I. A., PERHEENTUPA A., PUNAB M., SALZBRUNN A., TOPPARİ J., VİRTANEN H. E., JUUL A., SKAKKEBÆK N. E. ve JØRGENSEN N. (2016). Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive

hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six European countries. *Eur Urol*. **70**: 1019–29.

DANN C. T., ALVARADO A. L., MOLYNEUX L. A., DENARD B. S., GARBERS D. L. ve PORTEUS M. H. (2008). Spermatogonial stem cell self-renewal requires OCT4, a factor downregulated during retinoic acid-induced differentiation. *Stem Cells*. **26**: 2928–2937.

DASH T. K., KONKIMALLA V. B. (2012). Poly-ε-Caprolactone Based Formulations for Drug Delivery and Tissue Engineering: A Review. *J Controlled Release*. **158**: 15–33.

DE ROOIJ D. G. (1973). Spermatogonial stem cell renewal in the mouse: I. Normal situation. *Cell Proliferation*. **6**: 281–287.

DE ROOIJ D. G. (1998a). Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol*. **79**: 67–80.

DE ROOIJ D. G. ve GRISWOLD M. D. (2012). Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *Journal of andrology*. **33**: 1085–1095.

DE ROOIJ D. G. ve GROOTEGOED J. A. (1998b). Spermatogonial stem cells. *Current opinion in cell biology*. **10**: 694–701.

DE ROOIJ D. G., OKABE M. ve NISHIMUNE Y. (1999). Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, Sl17H/Sl17H, and cryptorchid mice. *Biology of reproduction*. **61**: 842–847.

DE WINTER J., VANDERSTICHELE H., TIMMERMAN M., BLOK L., THEMME A. ve DE JONG F. (1993). Activin is produced by rat Sertoli cells in vitro and can act as an autocrine regulator of Sertoli cell function. *Endocrinology*. **132**: 975–982.

DE WINTER J., VANDERSTICHELE H., VERHOEVEN G., TIMMERMAN M., WESSELING J. ve DE JONG F. (1994). Peritubular myoid cells from immature rat testes secrete activin-A and express activin receptor type II in vitro. *Endocrinology*. **135**: 759–767.

DECHIARA T. M., ROBERTSON E. J., EFSTRATIADIS A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. **64**: 849–859.

DEFALCO T., POTTER S. J., WILLIAMS A. V., WALLER B., KAN M. J. ve CAPEL B. (2015). Macrophages contribute to the spermatogonial niche in the adult testis. *Cell Rep*. **12**: 1107–1119.

DEL VENTO F., VERMEULEN M., DE MICHELE F., GIUDICE M. G., POELS J., DES RIËUX A. ve WYNS C. (2018). Tissue engineering to improve immature testicular tissue and cell transplantation outcomes: one step closer to fertility restoration for prepubertal boys exposed to gonadotoxic treatments. *Int J Mol Sci*. **19**: 286.

DESJARDINS C., EWING L. L. (1993). Cell and Molecular Biology of the Testis. Oxford University Press, New York.

DEUSE T., HU X., AGBOR-ENOH S., KOCH M., SPITZER M. H., GRAVINA A., ALAWI M., MARISHTA A., PETERS B., KOSALOGU-YALCIN Z., YANG Y., RAJALINGAM R., WANG D., NASHAN B., KIEFMANN R., REICHENSPURNER H., VALANTINE H., WEISSMAN I. L ve SCHREPFER S. (2019). De novo mutations in mitochondrial DNA of

- iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nature Biotechnology*, **37**: 1137-1144.
- DIAO L., TUREK P. J., JOHN C. M., FANG F., REIJO PERA R. A. (2022). Roles of Spermatogonial Stem Cells in Spermatogenesis and Fertility Restoration. *Front Endocrinol (Lausanne)*. **13**: 895528.
- DÍSSANAYAKE D. M. A. B. (2018). In vitro spermatogenesis; past, present, and future. *Spermatozoa - Facts and Perspectives*.
- DOBRŃSKI I., OGAWA T., AVARBOCK M. R., BRŃSTER R. L. (1999). Computer assisted image analysis to assess colonization of recipient seminiferous tubules by spermatogonial stem cells from transgenic donor mice. *Mol Reprod Dev*. **53**: 142-8.
- DONOVAN P. (1986). Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell*. **44**: 831-838.
- DONOVAN P. J., GEARHART J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*. **414**: 92-7.
- DOYLE T. J., KAUR G., PUTREVU S. M., DYSON E. L., DYSON M., MCCUNNĪFF W. T., PASHAM M. R., KĪM K. H. ve DUFOUR J. M. (2012). Immunoprotective properties of primary Sertoli cells in mice: potential functional pathways that confer immune privilege. *Biol Reprod*. **86**: 1-14.
- DRUMOND A. L., MEĪSTRĪCH M. L., CHIARĪNĪ-GARCĪA H. (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction*. **142**: 145-55.
- DURAIRAJANAYAGAM D. (2018). Lifestyle causes of male infertility. *Arab J Urol*. **16**: 10-20.
- EASLEY IV C. A., PHĪLLĪPS B. T., MCGUIRE M. M., BARRĪNGER J. M., VALLĪ H., HERMANN B. P., SĪMERLY C. R., RAJKOVĪC A., MĪKĪ T., ORWĪG K. E. (2012). Direct differentiation of human pluripotent stem cells into haploid spermatogenic cells. *Cell Rep*. **2**: 440-446.
- EBATA K. T., YEH J. R., ZHANG X., NAGANO M. C. (2011). Soluble growth factors stimulate spermatogonial stem cell divisions that maintain a stem cell pool and produce progenitors in vitro. *Exp Cell Res*. **317**: 1319-1329.
- EGUIZABAL C., MONTSERRAT N., VASSENA R., BARRAGAN M., GARRETA E., GARCĪA-QUEVEDO L., VĪDAL F., GĪORGETTĪ A., VEĪGA A., BELMONTE J. I. (2011). Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **29**: 1186-1195.
- EĪLDERMANN K., AECKERLE N., DEBOWSKI K., GODMANN M., CHRISTĪANSEN H., HEĪSTERMANN M., SCHWEYER S., BERGMANN M., KLĪESCH S., GROMOLL J., EHMCKE J., SCHLATT S., BEHR R. (2012). Developmental expression of the pluripotency factor sal-like protein 4 in the monkey, human and mouse testis: restriction to premeiotic germ cells. *Cells Tissues Organs*, **196**: 206-220.

- EISENBERG M. L., KIM S., CHEN Z., SUNDARAM R., SCHISTERMAN E. F., BUCK LOUIS G. M. (2014). The relationship between male BMI and waist circumference on semen quality: data from the LIFE study. *Hum Reprod.* **29**: 193–200.
- ELGHAMRAWY T. A., HELMY D., ELALL H. F. (2014). Cadherin and vimentin immunoexpression in the testis of normal and induced infertility models of albino rats. *Folia Morphol (Warsz)*. **73**: 339–346.
- ENDO T., FREINKMAN E., DE ROOIJ D. G., PAGE D. C. (2017). Periodic production of retinoic acid by meiotic and somatic cells coordinates four transitions in mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **114**: E10132–E10141.
- ENDO T., MIKEDIS M. M., NICHOLLS P. K., PAGE D. C., DE ROOIJ D. G. (2019). Retinoic Acid and Germ Cell Development in the Ovary and Testis. *Biomolecules*. **9**: 775.
- ENDO T., ROMER K. A., ANDERSON E. L., BALTUS A. E., DE ROOIJ D. G., PAGE D. C. (2015). Periodic retinoic acid-STRA8 signaling intersects with periodic germ-cell competencies to regulate spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **112**: E2347–E2356.
- ENGUITA-MARRUEDO A., SLEDDENS-LINKELS E., OOMS M., DE GEUS V., WILKE M., BLOM E., DOHLE G. R., LOOIJENGA L. H. J., VAN CAPPELLEN W., BAART E. B. ve BAARENDS W. M. (2019). Meiotic arrest occurs most frequently at metaphase and is often incomplete in azoospermic men. *Fertil Steril*. **112**: 1059–1070.e3.
- FAGOONEE S., HOBBS R. M., DE CHIARA L., CANTARELLA D., PIRO R. M., TOLOSANO E., MEDICO E., PROVERO P., PANDOLFI P. P., SILENGO L. ve ALTRUDA F. (2010). Generation of functional hepatocytes from mouse germ line cell-derived pluripotent stem cells in vitro. *Stem Cells Dev*. **19**: 1183–94.
- FAGOONEE S., PELLICANO R., SILENGO L. ve ALTRUDA F. (2011) Potential applications of germline cell-derived pluripotent stem cells in organ regeneration. *Organogenesis*, **7**: 116.
- FAYOMI A. P., ORWIG K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. *Stem Cell Res*. **29**: 207–214.
- FAYOMI A. P., PETERS K., SUKHWANI M., VALLI-PULASKI H., SHETTY G., MEISTRICH M. L., HOUSER L., ROBERTSON N., ROBERTS V. ve RAMSEY C. (2019). Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*. **363**: 1314–1319.
- FENG L. -X., CHEN Y., DETTIN L., PERA R. A. R., HERR J. C., GOLDBERG E., DYM M. (2002). Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*, **297**: 392–395.
- FENG L. X., RAVINDRANATH N., DYM M. (2000). Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem*. **275**: 25572–25576.
- FILIPPONI D., HOBBS R. M., OTTOLENGHI S., ROSSI P., JANNINI E. A., PANDOLFI P. P., DOLCI S. (2007). Repression of *kit* expression by *Plzf* in germ cells. *Mol. Cell Biol*. **27**: 6770–6781.

- FOLMES C., DZEJA P., NELSON T. ve TERZİC A. (2012). Metabolic Plasticity in Stem Cell Homeostasis and Differentiation. *Cell Stem Cell*. **11**: 596-606.
- FONG Y. W., INOUE C., YAMAGUCHI T., CATTOGLIO C., GRUBISIC I., TJIAN R. (2011). A DNA repair complex functions as an Oct4/Sox2 coactivator in embryonic stem cells. *Cell*. **147**: 120-131.
- FORAN D., CHEN R., JAYASENA C. N., MINHAS S. ve THARAKAN T. (2023). The use of hormone stimulation in male infertility. *Current opinion in pharmacology*. **68**: 102333.
- FOX N., DAMJANOV I., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ A., KNOWLES B. B. ve SOLTER D. (1981). Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev. Biol.* **83**: 391-398.
- FRASCA F., PANDINI G., SCALIA P., SCIACCA L., MINEO R., COSTANTINO A., GOLDFINE I. D., BELFIORE A., VIGNERI R. (1999). Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* **19**: 3278-3288.
- FRONCZAK C. M., KIM E. D., BARQAWI A. B. (2012). The insults of illicit drug use on male fertility. *J Androl.* **33**: 515-28.
- FU X., HAN B., CAI S., LEI Y., SUN T. ve SHENG Z. (2009). Migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced by tumor necrosis factor-alpha and its possible role in wound healing. *Wound Repair Regen.* **17**: 185-191.
- FUCHS E. ve SEGRE J. (2000). Stem cells a new lease on life. *Cell*. **100**: 143-155.
- FUJIIWARA Y., KOMIYA T., KAWABATA H., SATO M., FUJIMOTO H., FURUSAWA M. ve NOCE T. (1994). Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila VASA and its specific expression in germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**: 12258-62.
- FURUKAWA S., USUDA K., ABE M., HAYASHI S., OGAWA I. (2007). Busulfan-induced apoptosis in rat placenta. *Exp Toxicol Pathol.* **59**: 97-103.
- GASKINS A. J., AFEICHE M. C., HAUSER R., WILLIAMS P. L., GILLMAN M. W., TANRIKUT C., PETROZZA J. C. ve CHAVARRO J. E. (2014). Paternal physical and sedentary activities in relation to semen quality and reproductive outcomes among couples from a fertility center. *Hum Reprod.* **29**: 2575-82.
- GASSEI K. ve ORWIG K. E. (2013). SALL4 expression in gonocytes and spermatogonial clones of postnatal mouse testes. *PloS one*. **8**: e53976.
- GASSEI K., EHMCKE J. ve SCHLATT S. (2009). Efficient enrichment of undifferentiated GFR alpha 1+ spermatogonia from immature rat testis by magnetic activated cell sorting. *Cell and tissue research*. **337**: 177-183.
- GEIJSEN N., HOROSCHAK M., KIM K., GRIBNAU J., EGGAN K., DALEY G. Q. (2004). Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, **427**: 148.

- GELY-PERNOT A., RAVERDEAU M., CELEBİ C., DENNEFELD C., FERET B., KLOPFENSTEIN M., YOSHIDA S., GHYSELINCK N. B., MARK M. (2012). Spermatogonia differentiation requires retinoic acid receptor gamma. *Endocrinology*. **153**: 438–449.
- GELY-PERNOT A., RAVERDEAU M., TELETIN M., VERNET N., FÉRET B., KLOPFENSTEIN M., DENNEFELD C., DAVIDSON I., BENOÎT G., MARK M. ve GHYSELINCK N. B. (2015). Retinoic Acid Receptors Control Spermatogonia Cell-Fate and Induce Expression of the SALL4A Transcription Factor. *PLoS Genet*. **11**: e1005501.
- GEWISS R., TOPPING T., GRISWOLD M. D. (2020). Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis. *Andrology*. **8**: 892–897.
- GHASEMZADEH-HASANKOLAEI M., ESLAMINEJAD M. B., SEDIGHI-GILANI M. ve MOKARIZADEH A. (2014). Starvation is more efficient than the washing technique for purification of rat Sertoli cells. *In Vitro Cell Dev Biol. Animal*. **50**: 723–730.
- GHYSELINCK N. B., DUESTER G. (2019). Retinoic acid signaling pathways. *Development*. **146**: dev167502.
- GIUDICE M. G., VERMEULEN M., WYNS C. (2019). Blood testis barrier and somatic cells impairment in a series of 35 adult Klinefelter syndrome patients. *Int J Mol Sci*. **20**: 5717.
- GKOUNTELA S., LI Z., VINCENT J. J., ZHANG K. X., CHEN A., PELLEGRINI M., CLARK A. T. (2013). The ontogeny of cKIT⁺ human primordial germ cells proves to be a resource for human germline reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation. *Nat Cell Biol*. **15**: 113–122.
- GLASER T., OPITZ T., KISCHLAT T., KONANG R., SASSE P., FLEISCHMANN B. K., ENGEL W., NAYERNIA K. ve BRÜSTLE O. (2008). Adult germ line stem cells as a source of functional neurons and glia. *Stem Cells*. **26**: 2434–43.
- GOERTZ M. J., WU Z., GALLARDO T. D., HAMRA F. K. ve CASTRILLON D. H. (2011). Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, **121**: 3456–3466.
- GOLKAR-NARENJI A., GOURABI H., EIMANI H., BAREKATI Z., AKHLAGHI A. (2012). Superovulation, in vitro fertilization (IVF) and in vitro development (IVD) protocols for inbred BALB/cJ mice in comparison with outbred NMRI mice. *Reprod Med Biol*. **11**: 185–192.
- GOODYEAR, S., BRINSTER, R. (2017). Isolation of the Spermatogonial Stem Cell-Containing Fraction from Testes. *Cold Spring Harb Protoc*. **2017**: pdb.prot094185.
- GRASSO M., FUSO A., DOVERE L., DE ROOIJ D. G., STEFANINI M., BOITANI C. ve VICINI E. (2012). Distribution of GFRA1-expressing spermatogonia in adult mouse testis. *Reproduction*. **143**: 325–32.
- GRAY P. C. ve VALE W. (2012). Cripto/GRP78 modulation of the TGF- β pathway in development and oncogenesis. *FEBS letters*. **586**: 1836–1845.
- GREBER B., LEHRACH H. ve ADJAYE J. (2008). Control of early fate decisions in human ES cells by distinct states of TGFbeta pathway activity. *Stem Cells Dev*. **17**: 1065–1077.

- GREEN D. M., LIU W., KUTTEH W. H., KE R. W., SHELTON K. C., SKLAR C. A., CHEMAITILLY W., PUÍ C. H., KLOSKY J. L., SPUNT S. L., METZGER M. L., SRIVASTAVA D., NESS K. K., ROBİSON L. L. ve HUDSON M. M. (2014). Cumulative alkylating agent exposure and semen parameters in adult survivors of childhood cancer: a report from the St Jude Lifetime Cohort Study. *Lancet Oncol.* **15**: 1215–1223.
- GRİSWOLD M. D. (1998). The Central Role of Sertoli Cells in Spermatogenesis. *Sem Cell Dev Biol.* **9**: 411–6.
- GRİSWOLD M. D., HOGARTH C. A., BOWLES J. ve KOOPMAN P. (2012). Initiating meiosis: the case for retinoic acid. *Biology of reproduction.* **86**.
- GRYMULA K., TARNOŃSKI M., PIOTROWSKA K., SUSZYNSKA M., MIERZEJEWSKA K., BORKOWSKA S., FIEDOROWICZ K., KUCIA M. ve RATAJCZAK M. (2014). Evidence that the population of quiescent bone marrow-residing very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs) expands in response to neurotoxic treatment. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* **18**: 1797-1806.
- GUAN K., NAYERNIA K., MAIER L. S., WAGNER S., DRESSEL R., LEE J. H., NOLTE J., WOLF F., LI M., ENGEL W. ve HASENFUSS G. (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, **440**: 1199-1203.
- GUAN K., WAGNER S., UNSÖLD B., MAIER L. S., KAİSER D., HEMMERLEIN B., NAYERNIA K., ENGEL W. ve HASENFUSS G. (2007). Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res.* **100**: 1615-25.
- GUAZZONE V. A., JACOBO P., THEAS M. S. ve LUSTİG L. (2009) Cytokines and chemokines in testicular inflammation: a brief review. *Microsc Res Tech.* **72**: 620–628.
- GUHA P., MORGAN J. W., MOSTOSLAVSKY G., RODRİGUES N. P. ve BOYD A. S. (2013). Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, **12**: 407-412.
- GUİCHAOUA M. R., PERRİN J., METZLER-GUİLLEMAIN C., SAİAS-MAGNAN J., GİORGİ R., GRİLLO J. M. (2005). Meiotic anomalies in infertile men with severe spermatogenic defects. *Hum Reprod.* **20**: 1897–902.
- GUNDERSEN T. D., JØRGENSEN N., ANDERSSON A. M., BANG A. K., NORDKAP L., SKAKKEBÆK N. E., PRİSKORN L., JUUL A. ve JENSEN T. K. (2015). Association between use of marijuana and male reproductive hormones and semen quality: a study among 1,215 healthy young men. *Am J Epidemiol.* **182**: 473–81.
- GUNJAL P., BHARTİYA D., METKARİ S., MANJRAMKAR D. ve PATEL H. (2015). Very small embryonic-like stem cells are the elusive mouse endometrial stem cells- a pilot study. *Journal of Ovarian Research.* **8**.
- GUO C. L., LIU L., JIA Y. D., ZHAO X. Y., ZHOU Q., WANG L. (2012). A novel variant of Oct3/4 gene in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* **9**: 69-76.
- HAMER G., DE ROOIJ D. G. (2018). Mutations causing specific arrests in the development of mouse primordial germ cells and gonocytes. *Biol. Reprod.* **99**: 75–86.

- HAMİDABADI H. G. ve BOJNORDI M. N. (2018). Co-culture of mouse spermatogonial stem cells with sertoli cell as a feeder layer, stimulates the proliferation and spermatogonial stemness profile. *Middle East Fertility Society Journal*. **23**: 107-111.
- HAMILTON L. K., DUFRESNE M., JOPPÉ S. E., PETRYSZYN S., AUMONT A., CALON F., BARNABÉ-HEIDER F., FURTOS A., PARENT M., CHAURAND P. ve FERNANDES K. J. (2015). Aberrant Lipid Metabolism in the Forebrain Niche Suppresses Adult Neural Stem Cell Proliferation in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell*. **17**: 397-411.
- HAMRA F. K., SCHULTZ N., CHAPMAN K. M., GRELLHESL D. M., CRONKHİTE J. T., HAMMER R. E. ve GARBERS D. L. (2004). Defining the spermatogonial stem cell. *Developmental biology*. **269**: 393-410.
- HANDEL M. A., EPPİG J. J., SCHİMENTİ J. C. (2014). Applying “gold standards” to in-vitro-derived germ cells. *Cell*. **157**: 1257-1261.
- HARPELUNDE POULSEN K. ve JØRGENSEN A. (2019). Role of nodal signalling in testis development and initiation of testicular cancer. *Reproduction*. **158**.
- HARPELUNDE POULSEN K., NİELSEN J. E., GRØNKÆR TOFT B., JOENSEN U. N., RASMUSSEN L. J., BLOMBERG JENSEN M., MITCHELL R. T., JUUL A., RAJPERT-DE MEYTS E., JØRGENSEN A. (2020). Influence of Nodal signalling on pluripotency factor expression, tumour cell proliferation and cisplatin-sensitivity in testicular germ cell tumours. *BMC Cancer*. **20**: 349.
- HASEGAWA K., SAGA Y. (2012). Retinoic acid signaling in Sertoli cells regulates organization of the blood-testis barrier through cyclical changes in gene expression. *Development*. **139**: 4347-4355.
- HASEGAWA K., SAGA Y. (2014). FGF8-FGFR1 signaling acts as a niche factor for maintaining undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Biol Reprod*. **91**: 145.
- HAYASHİ K., LOPES S. M. C. D. S., SURANİ A., CHUNG H. -Y., WEİNBERGER M. B., LEVİNE J. B., KAVNER A., YANG J. -M., TOLBERT S. H., KANER R. B. (2007). Germ Cell Specification in Mice. *Science*. **316**: 394-396.
- HAYASHİ K., OHTA H., KURİMOTO K., ARAMAKİ S., SAİTOU M. (2011). Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*. **146**: 519-532.
- HAYES K., KİM Y. -K. ve PERA, M. F. (2021). A case for revisiting nodal signaling in human pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **39**: 1137-1144.
- HE Z., JİANG J., KOKKİNAKİ M., DYM M. (2009). Nodal signaling via an autocrine pathway promotes proliferation of mouse spermatogonial stem/progenitor cells through Smad2/3 and Oct-4 activation. *Stem Cells*. **27**: 2580-90.
- HE Z., KOKKİNAKİ M., JİANG J., DOBRİNSKİ I., DYM M. (2010). Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod*. **82**: 363-72.
- HEDGER M. P. (2015). The immunophysiology of male reproduction. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*, **805**.

- HENDRIKS S., DANCET E. A., VAN PELT A. M., HAMER G., REPPING S. (2015a). Artificial gametes: a systematic review of biological progress towards clinical application. *Hum. Reprod. Update*. **21**: 285–296.
- HENDRIKS S., DONDORP W., DE WERT G., HAMER G., REPPING S., DANCET E. A. (2015b). Potential consequences of clinical application of artificial gametes: a systematic review of stakeholder views. *Hum. Reprod. Update*. **21**: 297–309.
- HERMANN B. P., MUTOJİ K. N., VELTE E. K., KO D., OATLEY J. M., GEYER C. B. ve MCCARREY J. R. (2015). Transcriptional and translational heterogeneity among neonatal mouse spermatogonia. *Biology of reproduction*. **92**: 54-1.
- HERMANN B. P., SUKHWANI M., WINKLER F., PASCARELLA J. N., PETERS K. A., SHENG Y., VALLI H., RODRIGUEZ M., EZZELARAB M., DARGO G., PETERSON K., MASTERSON K., RAMSEY C., WARD T., LIENESCH M., VOLK A., COOPER D. K., THOMSON A. W., KISS J. E., PENEDO M. C., SCHATTEN G. P., MÍTALÍPOV S., ORWIG K. E. (2012). Spermatogonial stem cell transplantation into rhesus testes regenerates spermatogenesis producing functional sperm. *Cell Stem Cell*. **11**: 715–26.
- HESS R. A., COOKE P. S., HOFMANN M. C. ve MURPHY K. M. (2006). Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell cycle*. **5**: 1164-1170.
- HOBBS R. M., FAGOONEE S., PAPA A., WEBSTER K., ALTRUDA F., NISHINAKAMURA R., CHAI L., PANDOLFİ P. P. (2012). Functional antagonism between *Sall4* and *Plzf* defines germline progenitors. *Cell Stem Cell*. **10**: 284–298.
- HOGARTH C. A., ARNOLD S., KENT T., MITCHELL D., ISOHERRANEN N., GRISWOLD M. D. (2015). Processive pulses of retinoic acid propel asynchronous and continuous murine sperm production. *Biol. Reprod*. **92**: 37.
- HOGARTH C. A., EVANOFF R., MITCHELL D., KENT T., SMALL C., AMORY J. K., GRISWOLD M. D. (2013). Turning a spermatogenic wave into a tsunami: Synchronizing murine spermatogenesis using WIN 18,446. *Biol. Reprod*. **88**: 40.
- HOGARTH C. A., EVANOFF R., SNYDER E., KENT T., MITCHELL D., SMALL C., AMORY J., GRISWOLD M. D. (2011). Suppression of Stra8 Expression in the Mouse Gonad by WIN 18,446. *Biol. Reprod*. **84**: 957–965.
- HONARAMOOZ A., MEGEE S. O., DOBRINSKI I. (2002). Germ cell transplantation in pigs. *Biol Reprod*. **66**: 21–8.
- HONG T. K., SONG J. H., LEE S. B., DO J. T. (2021). Germ cell derivation from pluripotent stem cells for understanding in vitro gametogenesis. *Cells*. **10**: 1889.
- HU Y. C., NICHOLLS P. K., SOH Y. Q. S., DANIELE J. R., JUNKER J. P., VAN OUDENAARDEN A., PAGE D. C. (2015). Licensing of primordial germ cells for gametogenesis depends on genital ridge signaling. *PLOS Genetics* **11**: e1005019.
- HUANG H. F., HEMBREE W.C. (1979). Spermatogenic response to vitamin A in vitamin A deficient rats. *Biol. Reprod*. **21**: 891–904.

- HUANG Y. H., CHIN C. C., HO H. N., CHOU C. K., SHEN C. N., KUO H. C., WU T. J., WU Y. C., HUNG Y. C., CHANG C. C., LING T. Y. (2009). Pluripotency of mouse spermatogonial stem cells maintained by Igf-1- dependent pathway. *FASEB J.* **23**: 2076–2087.
- HUANG Y. H., LIN M. H., WANG P. C., WU Y. C., CHIANG H. L., WANG Y. L., CHANG J. H., HUANG Y. K., GU S. Y., HO H. N., LING T. Y. (2014). Hypoxia inducible factor 2alpha/insulin-like growth factor receptor signal loop supports the proliferation and Oct-4 maintenance of mouse germline stem cells. *Mol. Hum. Reprod.* **20**: 526–537.
- HUCKINS C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *The Anatomical Record.* **169**: 533–557.
- HUCKINS C. ve OAKBERG E. F. (1978). Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules. II. The irradiated testes. *The Anatomical Record*, **192**: 529–541.
- HUE D., STAUB C., PERRARD-SAPORI M. H., WEISS M., NICOLLE J. C., VIGIER M., DURAND P. (1998). Meiotic Differentiation of Germinal Cells in Three-Week Cultures of Whole Cell Population From Rat Seminiferous Tubules. *Biol Reprod.* **59**: 379–87.
- HÜBNER K., FUHRMANN G., CHRISTENSON L. K., KEHLER J., REINBOLD R., DE LA FUENTE R., WOOD J., STRAUSS J. F. 3rd., Boiani M., Schöler H. R. (2003). Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science.* **300**: 1251–1256.
- HWANG Y. S., SUZUKI S., SEITA Y., ITO J., SAKATA Y., ASO H., SATO K., HERMANN B. P., SASAKI K. (2020). Reconstitution of prospermatogonial specification in vitro from human induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **11**: 5656.
- IBTISHAM F. ve HONARAMOOZ A. (2020). Spermatogonial stem cells for in vitro spermatogenesis and in vivo restoration of fertility. *Cells.* **9**: 745.
- IBTISHAM F., ZHAO Y., NAWAB A., WU J., MEI X., HONARAMOOZ A., AN L. (2021). In vitro production of haploid germ cells from murine spermatogonial stem cells using a two-dimensional cell culture system. *Theriogenology.* **162**: 84–94.
- ICHIDA J. K., BLANCHARD J., LAM K., SON E. Y., CHUNG J. E., EGLI D., LOH K. M., CARTER A. C., DI GIORGIO F. P., KOSZKA K., HUANGFU D., AKUTSU H., LIU D. R., RUBIN L. L., EGGAN K. (2009). A small-molecule inhibitor of tgfbeta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell.* **5**: 491–503.
- IKAMI K., TOKUE M., SUGIMOTO R., NODA C., KOBAYASHI S., HARA K., YOSHIDA S. (2015). Hierarchical differentiation competence in response to retinoic acid ensures stem cell maintenance during mouse spermatogenesis. *Development.* **142**: 1582–1592.
- INOUE M., SHIMA Y., MIYABAYASHI K., TOKUNAGA K., SATO T., BABA T., OHKAWA Y., AKIYAMA H., SUYAMA M., MOROHASHI K. (2016). Isolation and Characterization of Fetal Leydig Progenitor Cells of Male Mice. *Endocrinology.* **157**: 1222–1233.
- IRIE N., WEINBERGER L., TANG W. W., KOBAYASHI T., VIUKOV S., MANOR Y. S., DIETMANN S., HANNA J. H., SURANI M. A. (2015). SOX17 is a critical specifier of human primordial germ cell fate. *Cell.* **160**: 253–268.

- ISHII K., KANATSU-SHİNOHARA M., TOYOKUNİ S. ve SHİNOHARA T. (2012). FGF2 mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. *Development*. **139**: 1734–1743.
- ISHIKURA Y., YABUTA Y., OHTA H., HAYASHİ K., NAKAMURA T., OKAMOTO I., YAMAMOTO T., KURİMOTO K., SHİRANE K., SASAKİ H. (2016). In vitro derivation and propagation of spermatogonial stem cell activity from mouse pluripotent stem cells. *Cell Rep*. **17**: 2789–2804.
- IVELL R., WADE J. D., ANAND-IVELL R. (2013). INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod*. **88**: 147-152.
- IWAMOTO T., HIRAKU Y., OİKAWA S., MİZUTANİ H., KOJİMA M., KAWANİSHİ S. (2004). DNA intrastrand cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci*. **95**: 454–458.
- IWASA T., BABA S., DOİ H., KAİCHİ S., YOKOO N., MİMA T., KANATSU-SHİNOHARA M., SHİNOHARA T., NAKAHATA T., HEİKE T. (2010). Neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells improve the cardiac function of acute ischemic heart mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. **400**: 27-33.
- IZADYAR F., DEN OUDEN K., STOUT T. A., STOUT J., CORET J., LANKVELD D. P., SPOORMAKERS T. J., COLENBRANDER B., OLDENBROEK J. K., VAN DER PLOEG K. D., WOELDERS H., KAL H. B., DE ROOIJ D. G. (2003). Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*. **126**: 765–74.
- IZADYAR F., PAU F., MARH J., SLEPKO N., WANG T., GONZALEZ R., RAMOS T., HOWERTON K., SAYRE C., SİLVA F. (2008). Generation of multipotent cell lines from a distinct population of male germ line stem cells. *Reproduction*. **135**: 771-84.
- IZADYAR F., WONG J., MAKİ C., PACCHİAROTTİ J., RAMOS T., HOWERTON K., YUEN C., GREİLACH S., ZHAO H. H., CHOW M., CHOW Y. C., RAO J., BARRİTT J., BAR-CHAMA N. ve COPPERMAN A. (2011). Identification and characterization of repopulating spermatogonial stem cells from the adult human testis. *Human reproduction (Oxford, England)*. **26**: 1296-1306.
- IZUKA E., MENUBA I., SENGUPTA P., DUTTA S., NWAGHA U. (2020). Antioxidants, anti-inflammatory drugs and antibiotics in the treatment of reproductive tract infections and their association with male infertility. *Chem. Biol. Lett*. **7**: 156–165.
- JAFARIAN A., LAKPOUR N., SADEGHİ M. R., SALEHKHOU S., AKHONDİ M. M. (2018). Transplantation of Spermatogonial Stem Cells Suspension into Rete Testis of Azoospermia Mouse Model. *Urol J*. **15**: 40-47.
- JAHNUKAİNEN K., HEİKKİNEN R., HENRİKSSON M., COOPER T. G., PUUKKO-VİERTOMİES L. R., MAKİTİE O. (2011). Semen quality and fertility in adult long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Fertil Steril*. **96**: 837–842.
- JAHNUKAİNEN K., HOU M., PETERSEN C., SETCHELL B., SODER O. (2001). Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia. *Cancer Res*. **61**: 706–10.

- JAMES D., LEVINE A. J., BESSER D., HEMMATI-BRIVANLOU A. (2005). TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. **132**: 1273-82.
- JAN S. Z., JONGEJAN A., KORVER C. M., VAN DAALEN S. K., VAN PELT A. M., REPPING S. ve HAMER G. (2018). Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development*. **145**: dev160614.
- JEZ M., AMBADY S., KASHPUR O., GRELLA A., MALCUIT C., VILNER L., ROZMAN P., DOMINKO T. (2014). Expression and differentiation between OCT4A and its Pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS One*. **9**: e89546.
- JOHNSEN S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. **1**: 2-25.
- JOHNSTON D. S., OLIVAS E., DICANDELORO P. ve WRIGHT W. W. (2011). Stage-specific changes in GDNF expression by rat Sertoli cells: a possible regulator of the replication and differentiation of stem spermatogonia. *Biol Reprod*. **85**: 763–769.
- JOO J. Y., CHOI H. W., KIM M. J., ZAEHRES H., TAPIA N., STEHLING M., JUNG K. S., DO J. T., SCHÖLER H. R. (2014). Establishment of a primed pluripotent epiblast stem cell in FGF4-based conditions. *Sci Rep*. **4**: 7477.
- JOW W. W., STECKEL J., SCHLEGEL P. N., MAGID M. S., GOLDSTEIN M. (1993). Motile sperm in human testis biopsy specimens. *J Androl*. **14**: 194–98.
- KADAM P., NTEMOU E., BAERT Y., VAN LAERE S., VAN SAEN D. ve GOOSSENS E. (2018). Co-transplantation of mesenchymal stem cells improves spermatogonial stem cell transplantation efficiency in mice. *Stem Cell Research & Therapy*. **9**.
- KALTHOFF K. (1996). Analysis of Biological Development. Chapter 10. McGraw-Hill, New York. 213-239.
- KANATSU-SHINOHARA M., INOUE K., LEE J., YOSHIMOTO M., OGONUKI N., MIKI H., BABA S., KATO T., KAZUKI Y., TOYOKUNI S., TOYOSHIMA M., NIWA O., OSHIMURA M., HEIKE T., NAKAHATA T., ISHINO F., OGURA A., SHINOHARA T. (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*. **119**: 1001–1012.
- KANATSU-SHINOHARA M., INOUE K., MIKI H., OGONUKI N., TAKEHASHI M., MORIMOTO T., OGURA A., SHINOHARA T. (2006). Clonal origin of germ cell colonies after spermatogonial transplantation in mice. *Biol Reprod*. **75**: 68-74.
- KANATSU-SHINOHARA M., INOUE K., OGONUKI N., MIKI H., YOSHIDA S., TOYOKUNI S., LEE J., OGURA A. ve SHINOHARA T. (2007). Leukemia inhibitory factor enhances formation of germ cell colonies in neonatal mouse testis culture. *Biol Reprod*. **76**: 55–62.
- KANATSU-SHINOHARA M., LEE J., INOUE K., OGONUKI N., MIKI H., TOYOKUNI S., IKAWA M., NAKAMURA T., OGURA A., SHINOHARA T. (2008). Pluripotency of a single spermatogonial stem cell in mice. *Biol Reprod*. **78**: 681-7.

- KANATSU-SHİNOHARA M., MORİMOTO H. ve SHİNOHARA T. (2012). Enrichment of mouse spermatogonial stem cells by melanoma cell adhesion molecule expression. *Biology of reproduction*. **87**: 139-1.
- KANATSU-SHİNOHARA M., OGONUKİ N., INOUE K., MİKİ H., OGURA A., TOYOKUNİ S. ve SHİNOHARA T. (2003). Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol Reprod*. **69**: 612–616.
- KANATSU-SHİNOHARA M., SHİNOHARA T. (2010). Germline modification using mouse spermatogonial stem cells. *Methods Enzymol*. **477**: 17-36.
- KANG E., WANG X., TİPPNER-HEDGES R., MA H., FOLMES C. D., GUTİERREZ N. M., LEE Y., VAN DYKEN C., AHMED R., Lİ Y. ve KOSKİ A. (2016). Age-related accumulation of somatic mitochondrial DNA mutations in adult-derived human iPSCs. *Cell stem cell*. **18**: 625-636.
- KASHANİ I. R., ZARNANİ A. H., SOLEİMANİ M., ABDOLVAHABİ M. A., NAYERNİA K., SHİRAZİ R. (2014). Retinoic acid induces mouse bone marrow-derived CD15+, Oct4+ and CXCR4+ stem cells into male germ-like cells in a two-dimensional cell culture system. *Cell Biol Int*. **38**: 782–789.
- KASSMER S. ve KRAUSE D. (2013). Very small embryonic-like cells: Biology and function of these potential endogenous pluripotent stem cells in adult tissues. *Molecular Reproduction and Development*. **80**: 677-690.
- KATO Y., KATSUKİ T., KOKUBO H., MASUDA A., SAGA Y. (2016). *Dazl* is a target RNA suppressed by mammalian NANOS2 in sexually differentiating male germ cells. *Nat. Commun*. **7**: 11272.
- KAUR G., MİTAL P. ve DUFOUR J. M. (2013). Testis immune privilege - assumptions facts. *Anim Reprod*. **10**: 3–15.
- KAUR G., THOMPSON L. A. ve DUFOUR J. M. (2015). Therapeutic potential of immune privileged Sertoli cells. *Anim Reprod* **12**: 105–117.
- KAUR G., THOMPSON L. A., DUFOUR J. M. (2014). Sertoli cells - immunological sentinels of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, **30**: 36–44.
- KAUSHİK A., BHARTİYA D. (2020). Additional Evidence to Establish Existence of Two Stem Cell Populations Including VSELs and SSCs in Adult Mouse Testes. *Stem Cell Rev Rep*. **16**: 992-1004.
- KEHLER J., TOLKUNOVA E., KOSCHORZ B., PESCE M., GENTİLE L., BOİANİ M., LOMELİ H., NAGY A., MCLAUGHLİN K. J., SCHÖLER H. R., TOMİLİN A. (2004). Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*. **5**: 1078–1083.
- KELBER J. A., SHANİ G., BOOKER E. C., VALE W. W. ve GRAY P. C. (2008). Cripto is a noncompetitive activin antagonist that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *Journal of Biological Chemistry*, **283**: 4490-4500.
- KENNEY L. B., COHEN L. E., SHNORHAVORİAN M., METZGER M. L., LOCKART B., HİJİYA N., DUFFEYLİND E., CONSTİNE L., GREEN D., MEACHAM L. (2012). Male reproductive

health after childhood, adolescent, and young adult cancers: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. **30**: 3408–3416.

KERR C. L., HILL C. M., BLUMENTHAL P. D., GEARHART J. D. (2008). Expression of pluripotent stem cell markers in the human fetal testis. *Stem Cells*. **26**: 412-421

KIM J., SEANDEL M., FALCIATORI I., WEN D., RAFII S. (2008). CD34+ testicular stromal cells support long-term expansion of embryonic and adult stem and progenitor cells. *Stem Cells*. **26**: 2516-22.

KIM Y. H., KIM B. J., KIM B. G., LEE Y. A., KIM K. J., CHUNG H. J., HWANG S., WOO J. S., PARK J. K., SCHMIDT J. A., PANG M. G., RYU B. Y. (2013). Stage-specific embryonic antigen-1 expression by undifferentiated spermatogonia in the prepubertal boar testis. *J Anim Sci*. **91**: 3143-54.

KIM Y., JEONG J., KANG H., LIM J., HEO J., RATAJCZAK J., RATAJCZAK M. ve SHIN D. (2014). The Molecular Nature of Very Small Embryonic-Like Stem Cells in Adult Tissues. *International Journal of Stem Cells*. **7**: 55-62.

KIM C., NODA T., OKADA Y., IKAWA M., ve BAEK S. (2021). Protocol for isolation of spermatids from mouse testes. *STAR Protocols*. **2**: 100254.

KITADATE Y., JÖRG D. J., TOKUE M., MARUYAMA A., ICHIKAWA R., TSUCHIYA S., SEGİ-NISHIDA E., NAKAGAWA T., UCHIDA A., KIMURA-YOSHIDA C., MIZUNO S., SUGIYAMA F., AZAMI T., EMA M., NODA C., KOBAYASHI S., MATSUO I., KANAİ Y., NAGASAWA T., SUGIMOTO Y., TAKAHASHI S., SIMONS B. D., YOSHIDA S. (2019). Competition for mitogens regulates spermatogenic stem cell homeostasis in an open niche. *Cell Stem Cell*. **24**: 79-92.e76.

KO K., ARAÚZO-BRAVO M. J., KIM J., STEHLING M. ve SCHÖLER H. R. (2010). Conversion of adult mouse unipotent germline stem cells into pluripotent stem cells. *Nature Protocols*. **5**: 921-928.

KO K., TAPIA N., WU G., KIM J. B., BRAVO M. J. A., SASSE P., GLASER T., RUAU D., HAN D. W., GREBER B. (2009). Induction of pluripotency in adult unipotent germline stem cells. *Cell Stem Cell*. **5**: 87–96.

KOJIMA M. L., DE ROOIJ D. G., PAGE D. C. (2019). Amplification of a broad transcriptional program by a common factor triggers the meiotic cell cycle in mice. *Elife*. **8**: e43738.

KOJIMA Y., SASAKI K., YOKOBAYASHI S., SAKAI Y., NAKAMURA T., YABUTA Y., NAKAKI F., NAGAOKA S., WOLTJEN K., HOTTA A. (2017). Evolutionarily distinctive transcriptional and signaling programs drive human germ cell lineage specification from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **21**: 517–532.e5.

KOMAI Y., TANAKA T., TOKUYAMA Y., YANAİ H., OHE S., OMACHI T., ATSUMI N., YOSHIDA N., KUMANO K., HISHA H. ve MATSUDA T. (2014). Bmi1 expression in long-term germ stem cells. *Scientific reports*, **4**: 6175.

KOMEYA M., KIMURA H., NAKAMURA H., YOKONISHI T., SATO T., KOJIMA K., HAYASHI K., KATAGIRI K., YAMANAKA H., SANJO H., YAO M., KAMIMURA S., INOUE K.,

- OGONUKI N., OGURA A., FUJII T., OGAWA T. (2016). Long-Term Ex Vivo Maintenance of Testis Tissues Producing Fertile Sperm in a Microfluidic Device. *Sci Rep.* **6**: 21472.
- KOOPMAN P., GUBBAY J., VIVIAN N., GOODFELLOW P., LOVELL-BADGE R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nat. Cell Biol.* **351**: 117–121.
- KOPECKY M., SEMECKY V., NACHTIGAL P. (2005). Vimentin expression during altered spermatogenesis in rats. *Acta Histochem.* **107**: 279–289.
- KORUJI M., MOVAHEDIN M., MOWLA S. J., GOURABI H., ARFAEE A. J. (2009). Efficiency of adult mouse spermatogonial stem cell colony formation under several culture conditions. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* **45**: 281-9.
- KOSSACK N., MENESES J., SHEFI S., NGUYEN H. N., CHAVEZ S., NICHOLAS C., GROMOLL J., TUREK P. J., REJO-PERA R. A. (2009). Isolation and characterization of pluripotent human spermatogonial stem cell-derived cells. *Stem Cells.* **27**: 138-49.
- KOUBOVA J., HU Y. C., BHATTACHARYA T., SOH Y.Q., GILL M. E., GOODHEART M. L., HOGARTH C. A., GRISWOLD M. D., PAGE D. C. (2014). Retinoic Acid activates two pathways required for meiosis in mice. *PLoS Genet.* **10**: e1004541.
- KOUBOVA J., MENKE D. B., ZHOU Q., CAPEL B., GRISWOLD M. D., PAGE D. C. (2006). Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**: 2474–2479.
- KRAMER I. J. M. (2016). TGFB and signaling through receptor serine/threonine protein kinases. *Signal Transduction.* 887–933.
- KRAUSZ C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **25**: 271–85.
- KREBSBACH P. H., VILLA-DÍAZ L. G. (2017). The Role of Integrin $\alpha 6$ (CD49f) in Stem Cells: More than a Conserved Biomarker. *Stem Cells Dev.* **26**: 1090-1099.
- KUBOTA H., AVARBOCK M. R. ve BRINSTER R. L. (2004a). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biology of reproduction.* **71**: 722-731.
- KUBOTA H., AVARBOCK M. R. ve BRINSTER R. L. (2004b). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 16489–16494.
- KUBOTA H., AVARBOCK M. R., SCHMIDT J. A., BRINSTER R. L. (2009). Spermatogonial stem cells derived from infertile W^v/W^v mice self-renew in-vitro and generate progeny following transplantation. *Biol Reprod.* **81**: 293–01.
- KUBOTA H., AVARBOCK M.R., BRINSTER R. L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **100**: 6487–92.

- KUBOTA H., BRÏNSTER R. L. (2008). Culture of rodent spermatogonial stem cells, male germline stem cells of the postnatal animal. *Methods Cell Biol.* **86**: 59–84.
- KUBOTA H., BRÏNSTER R. L. (2018). Spermatogonial stem cells. *Biol Reprod.* **99**: 52-74.
- KUCÏA M., RECA R., CAMPBELL F., ZUBA-SURMA E., MAJKA M., RATAJCZAK J. ve RATAJCZAK M. (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA-1+Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia.* **20**: 857-869.
- KURKURE P., PRASAD M., DHAMANKAR V. ve BAKSHÏ G. (2015). Very small embryonic-like stem cells (VSELs) detected in azoospermic testicular biopsies of adult survivors of childhood cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology.* **13**.
- LABOSKY P. A., BARLOW D. P., HOGAN B. L. (1994). Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development.* **120**: 3197-204.
- LAWSON K. A., DUNN N. R., ROELEN B. A., ZEÏNSTRA L. M., DAVIS A. M., WRÏGHT C. V., KORVÏNG J. P., HOGAN B. L. (1999). Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev.* **13**: 424-36.
- LAWSON K. A., HAGE W. J. (2007). Clonal Analysis of the Origin of Primordial Germ Cells in the Mouse. *Novartis Found. Symp.* **182**: 68–91.
- LEE D. R., KÏM K. S., YANG Y. H., OH H. S., LEE S. H., CHUNG T. G., CHO J. H., KÏM H. J., YOON T. K., CHA K. Y. (2006a) Isolation of male germ stem cell-like cells from testicular tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. *Hum. Reprod.* **21**: 471–476.
- LEE J. H., KÏM H. J., KÏM H., LEE S. J., GYE M. C. (2006b). In Vitro Spermatogenesis by Three-Dimensional Culture of Rat Testicular Cells in Collagen Gel Matrix. *Biomaterials.* **27**: 2845–53.
- LEE J., KANATSU-SHÏNOHARA M., INOUE K., OGONUKÏ N., MÏKÏ H., TOYOKUNÏ S., KÏMURA T., NAKANO T., OGURA A., SHÏNOHARA T. (2007). Akt mediates self-renewal division of mouse spermatogonial stem cells. *Development.* **134**: 1853-9.
- LEE J., KANATSU-SHÏNOHARA M., MORÏMOTO H., KAZUKÏ Y., TAKASHÏMA S., OSHÏMURA M., TOYOKUNÏ S., SHÏNOHARA T. (2009a). Genetic reconstruction of mouse spermatogonial stem cell self-renewal in vitro by Ras-cyclin D2 activation. *Cell Stem Cell.* **5**: 76-86.
- LEE R. H., SEO M. J., PULÏN A. A., GREGORY C. A., YLOSTALO J. ve PROCKOP D. J. (2009b). The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood.* **113**: 816–826.
- LEE S. W., WU G., CHOÏ N. Y., LEE H. J., BANG J. S., LEE Y., LEE M., KO K., SCHÖLER H. R., KO K. (2018). Self-Reprogramming of Spermatogonial Stem Cells into Pluripotent Stem Cells without Microenvironment of Feeder Cells. *Mol Cells.* **41**: 631-638.

- LEGENDRE A., FROMENT P., DESMOTS S., LECOMTE A., HABERT R., LEMAZURIER E. (2010). An Engineered 3D Blood-Testis Barrier Model for the Assessment of Reproductive Toxicity Potential. *Biomaterials*. **31**: 4492–505.
- LEHMANN R., NUSSLEIN-VOLHARD C. (1991). The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Development*. **112**: 679–691.
- LEI Q., LAI X., ELIVELD J., DE SOUSA LOPES S. M. C., VAN PELT A. M. ve HAMER G. (2020). In vitro meiosis of male germline stem cells. *Stem Cell Reports*. **15**: 1140–1153.
- LEVINE H., JØRGENSEN N., MARTÍNO-ANDRADE A., MENDIOLA J., WEKSLER-DERRI D., MINDLIS I., PINOTTI R., SWAN S. H. (2017). Temporal trends in sperm count: A systematic review and meta-regression analysis. *Hum. Reprod Update*. **23**: 646–659.
- LI H., PAPADOPOULOS V., VIDIC B., DYM M. VE CULTY M. (1997). Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol: identification of signaling mechanisms involved. *Endocrinology*. **138**: 1289–1298.
- LI L., YUAN Y. ve SHA J. (2022). Potential clinical value of in vitro spermatogenesis†. *Biol. Reprod*. **107**: 95–100.
- LIN, MA W., SHEN Q., ZHANG M., DU Z., WU C., NIU B., LIU W., HUA J. (2019). Reconstitution of male germline cell specification from mouse embryonic stem cells using defined factors in vitro. *Cell Death Differ*. **26**: 2115–2124.
- LI Y., TOUFAILY C., BERNARD D. J. (2017). Mechanisms of inhibin action. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology. Elsevier Inc. US. 3–5.
- LI Y., ZHANG Y., ZHANG X., SUN J., HAO J. (2014). BMP4/Smad signaling pathway induces the differentiation of mouse spermatogonial stem cells via upregulation of *Sohlh2*. *Anat Rec (Hoboken)*. **297**: 749–757.
- LIGHTEN A. D., HARDY K., WINSTON R. M. ve MOORE G. E. (1997). Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev*. **47**: 134–139.
- LIM J. J., KIM H. J., KIM K. S., HONG J. Y., LEE D. R. (2013). In vitro culture-induced pluripotency of human spermatogonial stem cells. *Biomed Res Int*. **2013**: 143028.
- LIM J. J., SUNG S. Y., KIM H. J., SONG S. H., HONG J. Y., YOON T. K., KIM J. K., KIM K. S., LEE D. R. (2010). Long-term proliferation and characterization of human spermatogonial stem cells obtained from obstructive and non-obstructive azoospermia under exogenous feeder-free culture conditions. *Cell Prolif*. **43**: 405–17.
- LIN T., AMBASUDHAN R., YUAN X., LI W., HILCOVE S., ABUJAROUR R., LIN X., HAHM H. S., HAO E., HAYEK A., DING S. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat. Methods*. **6**: 805–808.
- LIN Y., GILL M. E., KOUBOVA J., PAGE D. C. (2008). Germ cell-intrinsic and -extrinsic factors govern meiotic initiation in mouse embryos. *Science*. **322**: 1685–1687.

- LİU S., TANG Z., XİONG T., TANG W. (2011). Isolation and characterization of human spermatogonial stem cells. *Reprod Biol Endocrinol*. **9**: 141.
- LİU X., YU T., SUN Y., WANG H. (2018). Characterization of novel alternative splicing variants of Oct4 gene expressed in mouse pluripotent stem cells. *J Cell Physiol*. **233**: 5468-5477.
- LİU Y., GIANNOPOULOU E. G., WEN D., FALCIATORİ I., ELEMENTO O., ALLİS C. D., RAFİİ S. ve SEANDEL M. (2016). Epigenetic profiles signify cell fate plasticity in unipotent spermatogonial stem and progenitor cells. *Nature communications*. **7**: 11275.
- LOVELAND K. L., ZLATİC K., STEİN-OAKLEY A., RİSBRİDGER G. ve DEKRETSER D. M. (1995). Platelet-derived growth factor ligand and receptor subunit mRNA in the Sertoli and Leydig cells of the rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol*. **108**: 155-159.
- LU N., SARGENT K. M., CLOPTON D. T., POHLMEİER W. E., BRAUER V. M., MCFEE R. M., WEBER J. S., FERRARA N., SİLVERSİDES D. W. ve CUPP A. S. (2013). Loss of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) isoforms in the testes of male mice causes subfertility, reduces sperm numbers, and alters expression of genes that regulate undifferentiated spermatogonia. *Endocrinology*. **154**: 4790-4802.
- LUCA G., ARATO I., SORCİ G., CAMERON D. F., HANSEN B.C., BARONİ T., DONATO R., WHITE D. G. J. ve CALAFİORE R. (2018). Sertoli cells for cell transplantation: pre-clinical studies and future perspectives. *Andrology*. **6**: 385-395.
- MAHERALİ N. ve HOCHEDLINGER K. (2009). Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr. Biol*. **19**: 1718-1723.
- MAJ M., SCHNEİDER G., RATAJCZAK J., SUSZYNSKA M., KUCİA M. ve RATAJCZAK M. (2015). The cell cycle- and insulin-signaling-inhibiting miRNA expression pattern of very small embryonic-like stem cells contributes to their quiescent state. *Experimental Biology and Medicine*. **240**: 1107-1111.
- MAKİ C. B., PACCHİAROTTİ J., RAMOS T., PASCUAL M., PHAM J., KİNJO J., ANORVE S., IZADYAR F. (2009). Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. *Human Reproduction*. **24**: 1480-1491.
- MALL E. M., ROTTE N., YOON J., SANDHOWE-KLAVERKAMP R., RÖPKE A., WİSTUBA J., HÜBNER K., SCHÖLER H. R., SCHLATT S. (2020). A novel xeno-organoid approach: exploring the crosstalk between human iPSC-derived PGC-like and rat testicular cells. *Mol. Hum. Reprod*. **26**: 879-893.
- MANDAİ M., KURİMOTO Y., TAKAHASHİ M. (2017). Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *New England Journal of Medicine*. **376**: 1038-1046.
- MANOVA K., NOCKA K., BESMER P. ve BACHVAROVA R. F. (1990). Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development*. **110**: 1057-1069.
- MARH J., TRES L. L., YAMAZAKİ Y., YANAGİMACHİ R., KİERSZENBAUM A. L. (2003). Mouse Round Spermatids Developed In Vitro From Preexisting Spermatocytes can Produce Normal Offspring by Nuclear Injection Into In Vivo-Developed Mature Oocytes. *Biol Reprod*. **69**: 169-76.

- MARK M., TELETİN M., VERNET N., GHYSELİNCK N. B. (2015). Role of retinoic acid receptor (RAR) signaling in post-natal male germ cell differentiation. *Biochim. et Biophys. Acta.* **1849**: 84–93.
- MARTÍN L., SEANDEL M. (2013). Serial Enrichment of Spermatogonial Stem and Progenitor Cells (SSCs) in Culture for Derivation of Long-term Adult Mouse SSC Lines. *Journal of Visualized Experiments.* e50017.
- MARTÍN-DU PAN R. C., CAMPANA A. (1993). Physiopathology of spermatogenic arrest. *Fertil Steril.* **60**: 937–46.
- MARTÍN-INARAJA M., FERREIRA M., Taelman J., EGUÍZABAL C. ve CHUVA DE SOUSA LOPES S. M. (2021). Improving in vitro culture of human male fetal germ cells. *Cells.* **10**: 2033.
- MASON K. E. (1933). Differences in testis injury and repair after vitamin A-deficiency, vitamin E-deficiency, and inanition. *Am. J. Anat.* **52**: 153–239.
- MATSUI Y., ZSEBO K. M., HOGAN B. L. M. (1990). Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the SI locus and the ligand for c-kit. *Nat. Cell Biol.* **347**: 667–669.
- MATSUI Y., ZSEBO K., HOGAN B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* **70**: 841–7.
- MEINHARDT A. ve HEDGER M. P. (2011). Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Mol Cell Endocrinol.* **335**: 60–68.
- MEISTRICH M. L. (2013). Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* **100**: 1180–1186.
- MENG X., LINDAHL M., HYVÖNEN M. E., PARVINEN M., DE ROOIJ D. G., HESS M. W., RAATIKAINEN-AHOKAS A., SAINIO K., RAUVALA H., LAKSO M., PICHEL J. G., WESTPHAL H., SAARMA M., SARIOLA H. (2000). Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science.* **287**: 1489–1493.
- MENGMENG H., LIJUN W., YINGHUI C., TINGTING Z. ve JIAN G. (2016). Effect of Wuziyanzong pill on levels of sex hormones, and expressions of nuclear-associated antigen Ki-67 and androgen receptor in testes of young rats. *Journal of Traditional Chinese Medicine.* **36**: 743–748.
- MENKE D. B., KOUBOVA J., PAGE D. C. (2003). Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. *Dev. Biol.* **262**: 303–312.
- MENKE D. B., PAGE D. C. (2002). Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expr. Patterns.* **2**: 359–367.
- MILES D. C., WAKELING S. I., STRINGER J. M., VAN DEN BERGEN J. A., WILHELM D., SINCLAIR A. H. ve WESTERN P. S. (2013). Signaling through the TGF beta-activin receptors ALK4/5/7 regulates testis formation and male germ cell development. *PloS one.* **8**: e54606.
- MIN J. Y., YANG Y., CONVERSO K. L., LIU L., HUANG Q., MORGAN J. P. ve XIAO Y. F. (2002). Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J. Appl. Physiol.* **92**: 288–296.

- MISHRA P., NEGI M. P. S., SRIVASTAVA M., SINGH K., RAJENDER S. (2018). Decline in seminal quality in Indian men over the last 37 years. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **16**: 103.
- MITAL P., KAUR G. ve DUFOUR J. (2010). Immunoprotective Sertoli cells: making allogeneic and xenogeneic transplantation feasible. *Reproduction.* **139**: 495–504.
- MITRANOND V., SOBHON P., TOSUKHOWONG P., CHINDADUANGRAT W. (1979). Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. *Acta Anat.* **103**: 159–168.
- MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., SEGAWA K., MURAKAMI M., TAKAHASHI K., MARUYAMA M., MAEDA M., YAMANAKA S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* **113**: 631–42.
- MIZUNO N., KOSAKA M. (2008). Novel variants of Oct-3/4 gene expressed in mouse somatic cells. *The Journal of biological chemistry.* **283**: 30997–31004.
- MOHAMMADZADEH E., MIRZAPOUR T., NOWROOZI M. R., NAZARIAN H., PIYAEI A., ALIPOUR F., MODARRES MOUSAVI S. M., GHAFARI NOVIN M. (2019). Differentiation of Spermatogonial Stem Cells by Soft Agar Three-Dimensional Culture System. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* **47**: 1772–81.
- MORALES C., GRISWOLD M. D. (1987). Retinol-induced stage synchronization in seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology.* **121**: 432–434.
- MORAVEJI S. F., ATTARI F., SHAHVERDI A., SEPEHRI H., FARROKHI A., HASSANI S. N., FONOUDI H., AGHDAMI N., BAHARVAND H. (2012). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 promotes efficient derivation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Human Reproduction.* **27**: 2312–2324.
- MORAVEJI S. F., ESFANDIARI F., TALEAHMAD S., NIKEGHBALIAN S., SAYAHPOUR F. A., MASOUDI N. S., SHAHVERDI A., BAHARVAND H. (2019). Suppression of transforming growth factor-beta signaling enhances spermatogonial proliferation and spermatogenesis recovery following chemotherapy. *Hum Reprod.* **34**: 2430–2442.
- MORIMOTO H., KANATSU-SHINOHARA M., TAKASHIMA S., CHUMA S., NAKATSUJI N., TAKEHASHI M., SHINOHARA T. (2009). Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One.* **4**: e7909.
- MORIMOTO H., LEE J., TANAKA T., ISHII K., TOYOKUNI S., KANATSU-SHINOHARA M., SHINOHARA T. (2012). In vitro transformation of mouse testis cells by oncogene transfection. *Biol Reprod.* **86**: 148, 1–11.
- MRUK D. D. ve CHENG C. Y. (2004). Sertoli–Sertoli and Sertoli–germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine Reviews.* **25**: 747–806.
- MULDER C. L., ZHENG Y., JAN S. Z., STRUIJK R. B., REPPING S., HAMER G., VAN PELT A. M. (2016). Spermatogonial stem cell autotransplantation and germline genomic editing: a future cure for spermatogenic failure and prevention of transmission of genomic diseases. *Hum. Reprod. Update.* **22**: 561–573.

- MULLANEY B. P. ve SKINNER M. K. (1992). Basic fibroblast growth factor (bFGF) gene expression and protein production during pubertal development of the seminiferous tubule: follicle-stimulating hormone-induced Sertoli cell bFGF expression. *Endocrinology*. **131**: 2928–2934.
- MULLEN A. C., ORLANDO D. A., NEWMAN J. J., LOVÉN J., KUMAR R. M., BÉLODEAU S., REDDY J., GUENTHER M. G., DEKOTER R. P., YOUNG R. A. (2011). Master transcription factors determine cell-type-specific responses to TGF- β signaling. *Cell*. **147**: 565–576.
- MURASE Y., YABUTA Y., OHTA H., YAMASHIRO C., NAKAMURA T., YAMAMOTO T., SAÏTOU M. (2020). Long-term expansion with germline potential of human primordial germ cell-like cells in vitro. *EMBO J*. **39**: e104929.
- MURDOCK M. H., DAVID S., SWINEHART I. T., REING J. E., TRAN K., GASSEI K., ORWIG K. E. ve BADYLAK S. F. (2019). Human Testis Extracellular Matrix Enhances Human Spermatogonial Stem Cell Survival In Vitro. *Tissue Eng Part A*. **25**: 663–676.
- NAEEMI S., EIDI A., KHANBABAEE R., SADRI-ARDEKANI H., KAJBAFZADEH A. M. (2021). Differentiation and Proliferation of Spermatogonial Stem Cells Using a Three-Dimensional Decellularized Testicular Scaffold: A New Method to Study the Testicular Microenvironment In Vitro. *Intl Urol Nephrol*. **53**: 1543–50.
- NAGANO M. C. (2003a). Homing efficiency and proliferation kinetics of male germ line stem cells following transplantation in mice. *Biol Reprod*. **69**: 701–7.
- NAGANO M., AVARBOCK M. R. ve BRINSTER R. L. (1999). Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biology of reproduction*. **60**: 1429–1436.
- NAGANO M., RYU B. Y., BRINSTER C. J., AVARBOCK M. R. ve BRINSTER R. L. (2003b). Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biology of reproduction*. **68**: 2207–2214.
- NAGAO Y. (1989). Viability of Meiotic Prophase Spermatocytes of Rats is Facilitated in Primary Culture of Dispersed Testicular Cells on Collagen Gel by Supplementing Epinephrine or Norepinephrine: Evidence That Meiotic Prophase Spermatocytes Complete Meiotic Divisions in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol*. **25**: 1088–98.
- NAKAGAWA T., NABESHIMA Y. I. ve YOSHIDA S. (2007). Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Developmental cell*. **12**: 195–206.
- NAKAGAWA T., SHARMA M., NABESHIMA Y. I., BRAUN R. E. ve YOSHIDA S. (2010). Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*. **328**: 62–67.
- NAKATSUKA R., IWAKI R., MATSUOKA Y., SUMIDE K., KAWAMURA H., FUJIOKA T., SASAKI Y., UEMURA Y., ASANO H., KWON A. ve SONODA Y. (2016). Identification and Characterization of Lineage-CD45-Sca-1+ VSEL Phenotypic Cells Residing in Adult Mouse Bone Tissue. *Stem Cells and Development*. **25**: 27–42.

- NALBANDIAN A., DETTIN L., DYM M. ve RAVINDRANATH N. (2003) Expression of vascular endothelial growth factor receptors during male germ cell differentiation in the mouse. *Biol Reprod.* **69**: 985–994.
- NARGUND V. H. (2015). Effects of psychological stress on male fertility. *Nat Rev Urol.* **12**: 373–82.
- NASIRI Z., HOSSEINI S. M., HAJIAN M., ABEDI P., BAHADORANI M., BAHARVAND H. ve NASR-ESFAHANI M. H. (2012). Effects of different feeder layers on short-term culture of prepubertal bovine testicular germ cells in-vitro. *Theriogenology.* **77**: 1519–1528.
- NAYERNIA K., LEE J. H., DRUSENHEIMER N., NOLTE J., WULF G., DRESSEL R., GROMOLL J. ve ENGEL W. (2006b). Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest.* **86**: 654–663.
- NAYERNIA K., NOLTE J., MICHELMANN H. W., LEE J. H., RATHSACK K., DRUSENHEIMER N., DEV A., WULF G., EHRLMANN I. E., ELLIOTT D. J. (2006a). In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell.* **11**: 125–132.
- NESTI C., PASQUALI L., VAGLINI F., SICILIANO G. ve MURRI L. (2007). The Role of Mitochondria in Stem Cell Biology. *Bioscience Reports.* **27**: 165-171.
- NICHOLLS P. K., HARRISON C. A., RAJNCZUK K. E., WAYNE VOGL A., STANTON P. G. (2013). Retinoic acid promotes Sertoli cell differentiation and antagonises activin-induced proliferation. *Mol. Cell Endocrinol.* **377**: 33–43.
- NICHOLLS P. K., SCHORLE H., NAQVI S., HU Y. C., FAN Y., CARMELL M. A., DOBRINSKI I., WATSON A. L., CARLSON D. F., FAHRENKRUG S. C., PAGE D. C. (2019). Mammalian germ cells are determined after PGC colonization of the nascent gonad. *PNAS.* **116**: 25677–25687.
- NIFONTOVA I., SVINAREVA D., PETROVA T., DRIZE N. (2008). Sensitivity of mesenchymal stem cells and their progeny to medicines used for the treatment of hematoproliferative diseases. *Acta Haematol.* **119**: 98-103.
- NIKNEJAD P., AZIZI H., SOJODI K. (2021). *POU5F1* Protein and Gene Expression Analysis in Neonate and Adult Mouse Testicular Germ Cells by Immunohistochemistry and Immunocytochemistry. *Cell Reprogram.* **23**: 349-358.
- NIKOLIC A., VOLAREVIC V., ARMSTRONG L., LAKO M. ve STOJKOVIC M. (2016). Primordial germ cells: current knowledge and perspectives. *Stem Cells Int.* **2016**: 1741072.
- NIKOLOVA D. B., MARTINOVA Y. S., SEIDENSTICKER M. ve BELLVE A. R. (1997) Leukaemia inhibitory factor stimulates proliferation of prospermatogonial stem cells. *Reprod Fertil Dev.* **9**: 717–721.
- NOLTE J., MICHELMANN H. W., WOLF M., WULF G., NAYERNIA K., MEINHARDT A., ZECHNER U., ENGEL W. (2010). PSCDGs of mouse multipotent adult germline stem cells can enter and progress through meiosis to form haploid male germ cells in vitro. *Differentiation.* **80**: 184–194.

- NOTTA F., DOULATOV S., LAURENTI E., POEPPL A., JURISICA I. ve DICK J. E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. **333**: 218–221.
- O'DONNELL L., SMITH L. B., REBOURCET D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. *Semin Cell Dev Biol*. **121**: 2–9.
- OAKBERG E. F. (1971). Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *The Anatomical Record*. **169**: 515–531.
- OATLEY J. M. ve BRINSTER R. L. (2006b). Spermatogonial stem cells. *Methods in enzymology*. **419**: 259–282.
- OATLEY J. M., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (2007). Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J Biol Chem*. **282**: 25842–25851.
- OATLEY J. M., AVARBOCK M. R., TELARANTA A. I., FEARON D. T. ve BRINSTER R. L. (2006a). Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**: 9524–9529.
- OATLEY J. M., BRINSTER R. L. (2012). The Germline Stem Cell Niche Unit in Mammalian Testes. *Phys Rev*. **92**: 577–95.
- OATLEY J. M., OATLEY M. J., AVARBOCK M. R., TOBIAS J. W. ve BRINSTER R. L. (2009). Colony stimulating factor 1 is an extrinsic stimulator of mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Development*. **136**: 1191–1199.
- OATLEY M. J., KAUCHER A. V., RACICOT K. E. ve OATLEY, J. M. (2011a). Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biology of reproduction*. **85**: 347–356.
- OATLEY M. J., RACICOT K. E. ve OATLEY J. M. (2011b). Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis. *Biology of reproduction*. **84**: 639–645.
- OGAWA K., MATSUI H., OHTSUKA S., NIWA H. (2004). A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes Cells*. **9**: 471–477.
- OGAWA T., ARÉCHAGA J. M., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (1997). Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. *Int J Dev Biol*. **41**: 111–22.
- OGAWA T., OHMURA M., OHBO K. (2005). The Niche for Spermatogonial Stem Cells in the Mammalian Testis. *Intl J Hematol*. **82**: 381–8.
- OHINATA Y., OHTA H., SHIGETA M., YAMANAKA K., WAKAYAMA T. ve SAÏTOU M. (2009). A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. **137**: 571–584.
- OHINATA Y., PAYER B., O'CARROLL D., ANCELIN K., ONO Y., SANO M., BARTON S. C., OBUKHANYCH T., NUSSENZWEIG M., TARAKHOVSKY A., SAÏTOU M. ve SURANI M. A. (2005). Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature*. **436**: 207–213.

- OKİTA K. ve YAMANAKA S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. **366**: 2198-2207.
- ORWİG K. E., SHİNOHARA T., AVARBOCK M. R. ve BRİNSTER R. L. (2002). Functional analysis of stem cells in the adult rat testis. *Biology of reproduction*. **66**: 944-949.
- OULAD-ABDELGHANİ M., BOUİLLET P., DECİMO D., GANSMULLER A., HEYBERGER S., DOLLE P., BRONNER S., LUTZ Y., CHAMBON P. (1996). Characterization of a premeiotic germ cell-specific cytoplasmic protein encoded by Stra8, a novel retinoic acid-responsive gene. *J. Cell Biol.* **135**: 469-477.
- ÖNEN S, KÖSE S, YERSAL N, KORKUSUZ P. (2022). Mesenchymal stem cells promote spermatogonial stem/progenitor cell pool and spermatogenesis in neonatal mice in vitro. *Sci Rep*. **12**: 11494.
- PACCOLA MESQUİTA F. C., HOCHMAN-MENDEZ C., MORRİSSEY J., SAMPAİO L. C. ve TAYLOR D. A. (2019). Laminin as a potent substrate for large-scale expansion of human induced pluripotent stem cells in a closed cell expansion system. *Stem Cells International*. **2019**: 9704945.
- PARİSH C. R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* **77**: 499-508.
- PARK T. S., GALİC Z., CONWAY A. E., LİNDGREN A., VAN HANDEL B. J., MAGNUSSON M., RİCHTER L., TEİTELL M. A., MİKKOLA H. K., LOWRY W. E., PLATH K. ve CLARK A. T. (2009). Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells*. **27**: 783-795.
- PARTE S., BHARTİYA D., TELANG J., DAİTHANKAR V., SALVİ V., ZAVERİ K. ve HİNDUJA I. (2011). Detection, Characterization, and Spontaneous Differentiation In Vitro of Very Small Embryonic-Like Putative Stem Cells in Adult Mammalian Ovary. *Stem Cells and Development*. **20**: 1451-1464.
- PATEL H. ve BHARTİYA D. (2016). Testicular Stem Cells Express Follicle-Stimulating Hormone Receptors and Are Directly Modulated by FSH. *Reproductive Sciences*. **23**: 1493-1508.
- PAULSEN M., DAVİES K. R., BOWDEN L. M., VİLLAR A. J., FRANCK O., FUERMANN M., DEAN W. L., MOORE T. F., RODRİGUES N., DAVİES K. E., HU R. J., FEİNBERG A. P., MAHER E. R., REİK W., WALTER J. (1998). Syntenic organization of the mouse distal chromosome 7 imprinting cluster and the Beckwith-Wiedemann syndrome region in chromosome 11p15.5. *Hum Mol Genet*. **7**: 1149-1159.
- PELLEGRİNİ M., FİLİPPONİ D., GORİ M., BARRİOS F., LOLİCATO F., GRİMALDİ P., ROSSİ P., JANNİNİ E. A., GEREMİA R., DOLCİ S. (2008). ATRA and KL promote differentiation toward the meiotic program of male germ cells. *Cell Cycle*. **7**: 3878-3888.
- PELLEGRİNİ M., GRİMALDİ P., ROSSİ P., GEREMİA R. ve DOLCİ S. (2003). Developmental expression of BMP4/ALK3/SMAD5 signaling pathway in the mouse testis: a potential role of BMP4 in spermatogonia differentiation. *J. Cell Sci*. **116**: 3363-3372.

- PENG Y. J., TANG X. T., SHU H. S., DONG W., SHAO H., ZHOU B. O. (2023). Sertoli cells are the source of stem cell factor for spermatogenesis. *Development*. **150**: dev200706.
- PERA R. A. R., SÍMON C., MEDRANO J. V. (2013). Germ Cell Differentiation from Pluripotent Cells. *Semin. Reprod. Med.* **31**: 014–023.
- PERISSI V., ROSENFELD M. G. (2005). Controlling nuclear receptors: The circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 542–554.
- PESCE M, FARRACE M. G., PIACENTINI M., DOLCI S. ve DE FELICI M. (1993) Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*. **118**: 1089–1094.
- PESCE M., SCHÖLER H. R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells*. **19**: 271–8.
- PESCE M., WANG X., WOLGEMUTH D. J., SCHÖLER H. (1998). Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* **71**: 89–98.
- PHILLIPS B. T., GASSEI K. ve ORWIG K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **365**: 1663–1678.
- PITETTI J. L., CALVEL P., ZIMMERMANN C., CONNE B., PAPAIOANNOU M. D., AUBRY F., CEDERROTH C. R., URNER F., FUMEL B., CRAUSAZ M., DOCQUIER M., HERRERA P. L., PRALONG F., GERMOND M., GUÏLOU F., JEGOU B., NEF S. (2013). An essential role for insulin and IGF1 receptors in regulating sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. *Mol Endocrinol*. **27**: 814–827.
- PLOTTON I., BROSSE A., CUZIN B., LEJEUNE H. (2014). Klinefelter syndrome and TESE-ICSI. *Ann Endocrinol*. **75**: 118–25.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Society for Male Reproduction and Urology (2014). Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. **102**: 1556–1560.
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine in collaboration with the Society for Male Reproduction and Urology (2019). The Management of Obstructive Azoospermia: A Committee Opinion. *Fertil Steril*, **111**: 873–880.
- PRONK C. J., VEIBY O. P., BRYDER D. ve JACOBSEN S. E. (2011). Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: Involvement of two distinct receptors. *J Exp Med*. **208**: 1563–1570.
- RADHAKRISHNAN B., OKE B. O., PAPADOPOULOS V., DIAUGUSTINE R. P., SUAREZ-QUIAN C. A. (1992). Characterization of epidermal growth factor in mouse testis. *Endocrinology*. **131**: 3091–3099.
- RAJPERT-DE MEYTS E. (2006). Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update*. **12**: 303–23.

- RASSOULZADEGAN M., PAQUIS-FLUCKLINGER V., BERTINO B., SAGE J., JASIN M., MIYAGAWA K., VAN HEYNINGEN V., BESMER P. ve CUZIN F. (1993). Transmeiotic Differentiation of Male Germ Cells in Culture. *Cell*. **75**: 997–1006.
- RATAJCZAK M. (2017b). Why are hematopoietic stem cells so ‘sexy’? on a search for developmental explanation. *Leukemia*. **31**: 1671-1677.
- RATAJCZAK M. Z., SHIN D. M., LIU R., MIERZEJEWSKA K., RATAJCZAK J., KUCIA M., ZUBA-SURMA E. K. (2012b). Very small embryonic/epiblast-like stem cells (VSELs) and their potential role in aging and organ rejuvenation--an update and comparison to other primitive small stem cells isolated from adult tissues. *Aging (Albany NY)*. **4**: 235-46.
- RATAJCZAK M. Z., ZUBA-SURMA E. K., SHIN D. M., RATAJCZAK J., KUCIA M. (2008). Very small embryonic-like (VSEL) stem cells in adult organs and their potential role in rejuvenation of tissues and longevity. *Exp Gerontol*. **43**: 1009-17.
- RATAJCZAK M., KUCIA M., LIU R., SHIN D., BRYNDZA E., MASTERNAK M., TARNOWSKI M., RATAJCZAK J. ve BARTKE A. (2011). RasGrfl: genomic imprinting, VSELs, and aging. *Aging*. **3**: 692-697.
- RATAJCZAK M., RATAJCZAK J., SUSZYNSKA M., MILLER D., KUCIA M. ve SHIN D. (2017a). A Novel View of the Adult Stem Cell Compartment From the Perspective of a Quiescent Population of Very Small Embryonic-Like Stem Cells. *Circulation Research*. **120**: 166-178.
- RATAJCZAK M., SHIN D., SCHNEIDER G., RATAJCZAK J. ve KUCIA M. (2012a). Parental imprinting regulates insulin- like growth factor signaling: a Rosetta Stone for understanding the biology of pluripotent stem cells, aging and cancerogenesis. *Leukemia*. **27**: 773-779.
- RAVERDEAU M., GELY-PERNOT A., FERET B., DENNEFELD C., BENOÎT G., DAVIDSON I., CHAMBON P., MARK M., GHYSELINCK N. B. (2012). Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**: 16582–16587.
- REİK W., CONSTANCIA M., DEAN W., DAVIES K., BOWDEN L., MURRELL A., FEIL R., WALTER J., KELSEY G. (2000). Igf2 imprinting in development and disease. *Int J Dev Biol*. **44**: 145–150.
- RELANDER T., CAVALLIN-STAHN E., GARWICZ S., OLSSON A. M., WILLEN M. (2000). Gonadal and sexual function in men treated for childhood cancer. *Med Pediatr Oncol*. **35**: 52–63.
- RESNICK J. L., BIXLER L. S., CHENG L., DONOVAN P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. **359**: 550-1.
- RICCI E., AL BEITAWI S., CIPRIANI S., CANDIANI M., CHIAFFARINO F., VIGANÒ P., NOLI S., PARAZZINI F. (2017). Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. **34**: 38–47.
- RICHER G., HOBBS R. M., LOVELAND K. L., GOOSSENS E., BAERT Y. (2021). Long-Term Maintenance and Meiotic Entry of Early Germ Cells in Murine Testicular Organoids Functionalized by 3D Printed Scaffolds and Air-Medium Interface Cultivation. *Front Physiol*. **12**: 757565.

- RIVES N., PERDRIX A., HENNEBICQ S., SAIAS-MAGNAN J., MELIN M. C., BERTHAUT I., BARTHELEMY C., DAUDIN M., SZERMAN E., BRESSON J. L., BRUGNON F., BUJAN L. (2012). The semen quality of 1158 men with testicular cancer at the time of cryopreservation: results of the French National CECOS Network. *J Androl.* **33**: 1394–1401.
- RODIN S., ANTONSSON L., HOVATTA O., TRYGGVASON K. (2014). Monolayer culturing and cloning of human pluripotent stem cells on laminin-521-based matrices under xeno-free and chemically defined conditions. *Nat Protoc.* **9**: 2354–68.
- RODRIGUEZ-COLMAN M. J., SCHEWE M., MEERLO M., STIGTER E., GERRITS J., PRASRAVES M., SACCHETTI A., HORNSVELD M., OOST K. C., SNIPPET H. J., VERHOEVEN-DUIF N., FODDE R., BURGERING B. M. (2017). Interplay between metabolic identities in the intestinal crypt supports stem cell function. *Nature.* **543**: 424–427.
- ROSAS-ARELLANO A., VILLALOBOS-GONZÁLEZ J.B., PALMA-TIRADO L., BELTRÁN F.A., CÁRABEZ-TREJO A., MISSIRLIS F., CASTRO M.A. (2016). A simple solution for antibody signal enhancement in immunofluorescence and triple immunogold assays. *Histochem Cell Biol.* **146**: 421–30.
- ROSSI P., DOLCI IANNINI S., ALBANESI C., GRIMALDI P., RICCA R. ve GEREMIA R. (1993). Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev. Biol.* **155**: 68–74.
- ROSSI P., SETTE C., DOLCI S. ve GEREMIA R. (2000). Role of c-kit in mammalian spermatogenesis. *J. Endocrinol. Investig.* **23**: 609–615.
- ROWLEY M. J., BERLIN J. D., HELLER C. G. (1971). The Ultrastructure of Four Types of Human Spermatogonia. *Zellforsch Mikrosk Ana.* **112**: 139–57.
- RYU B. Y., ORWIG K. E., OATLEY J. M., AVARBOCK M. R. ve BRINSTER R. L. (2006) Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells.* **24**: 1505–1511.
- RYU B. Y., ORWIG K. E., OATLEY J. M., LIN C. C., CHANG L. J., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (2007). Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. *J Androl.* **28**: 353–60.
- SADRI-ARDEKANI H., AKHONDI M. A., VAN DER VEEN F., REPPING S., VAN PELT A. M. (2011). In vitro propagation of human prepubertal spermatogonial stem cells. *JAMA.* **305**: 2416–2418.
- SADRI-ARDEKANI H., MIZRAK S. C., VAN DAALEN S. K., KORVER C. M., ROEPERS-GAJADIEN H. L., KORUJI M., HOVINGH S., DE REIJKE T. M., DE LA ROSETTE J. J., VAN DER VEEN F. (2009). Propagation of human spermatogonial stem cells in vitro. *JAMA.* **302**: 2127–2134.
- SAHIB B. O., HUSSEIN I. H., ALIBRAHIM N. T. ve MANSOUR A. A. (2023). Management Outcomes in Males With Hypogonadotropic Hypogonadism Treated With Gonadotropins. *Cureus.* **15**: e35601.
- SAÏTOU M. (2021). Mammalian germ cell development: from mechanism to in vitro reconstitution. *Stem Cell Rep.* **16**: 669–680.

- SAÏTOU M. ve YAMAJİ M. (2010). Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reproduction*. **139**: 931.
- SAÏTOU M. ve YAMAJİ M. (2012). Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**: a008375.
- SALONİA A., BETTOCCHI C., CARVALHO J., CORONA G., JONES T. H., KADIOĞLU A., MARTINEZ-SALAMANCA J. I., MINHAS S., SEREFOĞLU E. C., VERZE P. (2020). EAU Guidelines on Sexual and Reproductive Health. EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands. 106-108.
- SALONİA A., RASTRELLİ G., HACKETT G., SEMİNARA S. B., HUHTANIEMI I. T., REY R. A., HELLSTROM W. J. G., PALMERT M. R., CORONA G., DOHLE G. R., KHERA M., CHAN Y. M., MAGGI M. (2019). Paediatric and adultonset male hypogonadism. *Nat Rev Dis Primers*. **5**: 38.
- SASAKİ K., YOKOBAYASHİ S., NAKAMURA T., OKAMOTO I., YABUTA Y., KURİMOTO K., OHTA H., MORİTOKİ Y., IWATANİ C., TSUCHİYA H. (2015). Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. **17**: 178–194.
- SATO T., KATAGİRİ K., GOHBARA A., INOUE K., OGONUKİ N., OGURA A., KUBOTA Y., OGAWA T. (2011). In Vitro Production of Functional Sperm in Cultured Neonatal Mouse Testes. *Nature*. **471**: 504–7.
- SATO Y., YOSHIDA K., NOZAWA S., YOSHİIKE M., ARAİ M., OTOİ T., IWAMOTO T. (2013). Establishment of adult mouse Sertoli cell lines by using the starvation method. *Reproduction*. **145**: 505-16.
- SCHLATT S., ROSİEPEN G., WEİNBÄUER G. F., ROLF C., BROOK P. F., NİESCHLAG E. (1999). Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Hum Reprod*. **14**: 144–50.
- SCHLEGEL P. N. (1999). Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod*. **14**: 131–35.
- SCHOLZEN T. ve GERDES J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. **182**: 311-322.
- SCHOOR R. A., ELHANBLY S., NİEDERBERGER C. S., ROSS L. S. (2002). The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol*. **167**: 197–200.
- SCHÖLER H., RUPPERT S., SUZUKİ N., CHOWDHURY K., GRUSS P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nat. Cell Biol*. **344**: 435–439.
- SCHRANS-STASSEN B. H., VAN DE KANT H. J., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M. (2009). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*. **140**: 5894–900.
- SCHRANS-STASSEN B. H., VAN DE KANT H. J., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M. (1999). Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*. **140**: 5894–5900.

- SEANDEL M., JAMES D., SHMELKOV S. V., FALCIATORI I., KIM J., CHAVALA S., SCHERR D. S., ZHANG F., TORRES R., GALE N. W., YANCOPOULOS G. D., MURPHY A., VALENZUELA D. M., HOBBS R. M., PANDOLFİ P. P., RAFİİ S. (2007). Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125+ germline progenitors. *Nature*. **449**: 346–350.
- SELAWRY H. P. (1994). Islet Transplantation to Immuneprivileged Sites. *Pancreatic Islet Transplantation: Immunomodulation of Pancreatic Islets*. Eds.: Lanza, R.P., Chick, W.L., Landes/CRC Press, Austin, TX. 75-86.
- SETCHELL B. P. (1990). The testis and tissue transplantation: historical aspects. *J Reprod Immunol*. **18**: 1–8.
- SHAHBAZİ M. N. (2020). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*. **147**: dev190629.
- SHAİKH A., ANAND S., KAPOOR S., GANGULY R., BHARTİYA D. (2017). Mouse Bone Marrow VSELs Exhibit Differentiation into Three Embryonic Germ Lineages and Germ & Hematopoietic Cells in Culture. *Stem cell reviews and reports*. **13**: 202-216.
- SHAİKH A., BHARTİYA D., KAPOOR S. ve NİMKAR H. (2016). Delineating the effects of 5-fluorouracil and follicle- stimulating hormone on mouse bone marrow stem/progenitor cells. *Stem cell research & therapy*. **7**: 59.
- SHAİKH A., NAGVENKAR P., PETHE P., HİNDUJA I. ve BHARTİYA D. (2015). Molecular and phenotypic characterization of CD133 and SSEA4 enriched very small embryonic-like stem cells in human cord blood. *Leukemia*. **29**: 1909- 1917.
- SHARMA A., MİNHAS S., DHİLLO W. S. ve JAYASENA C. N. (2021). Male infertility due to testicular disorders. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. **106**: e442–e459.
- SHARMA M., SRIVASTAVA A., FAIRFIELD H. E., BERGSTROM D., FLYNN W. F., BRAUN R. E. (2019). Identification of EOMES-expressing spermatogonial stem cells and their regulation by PLZF. *eLife*, **8**, e43352, 1-24.
- SHARMA R., HARLEV A., AGARWAL A., ESTEVES S. C. (2016). Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen. *Eur Urol*. **70**: 635–45.
- SHARMA R., KHRİSTOV V., RİSİNG A., JHA B. S., DEJENE R., HOTALİNG N., Lİ Y., STODDARD J., STANKEWİCZ C., WAN Q., ZHANG C., CAMPOS M. M., MİYAGİSHİMA K. J., MCGAUGHEY D., VİLLASMİL R., MATAPALLİL M., STANZEL B., QİAN H., WONG W., CHASE L., CHARLES S., MCGİLL T., MİLLER S., MAMİNİSHKİS A., AMARAL J., BHARTİ K. (2019). Clinical-grade stem cell–derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med*. **11**: eaat5580.
- SHİ M., Lİ J., LİAO L., CHEN B., Lİ B., CHEN L., JİA H., ZHAO R. C. (2007). Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: Role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*. **92**: 897–904.

- SHÏN D., LÏU R., KLÏCH I., WU W., RATAJCZAK J., KUCÏA M. ve RATAJCZAK M. (2010). Molecular signature of adult bone marrow-purified very small embryonic-like stem cells supports their developmental epiblast/germ line origin. *Leukemia*. **24**: 1450-1461.
- SHÏN D., ZUBA-SURMA E., WU W., RATAJCZAK J., WYSOCZYNSKÏ M., RATAJCZAK M. ve KUCÏA M. (2009). Novel epigenetic mechanisms that control pluripotency and quiescence of adult bone marrow-derived Oct4+ very small embryonic-like stem cells. *Leukemia*. **23**: 2042-2051.
- SHÏNOHARA T., AVARBOCK M. R. ve BRÏNSTER R. L. (2000b). Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile mouse models. *Developmental biology*. **220**: 401-411.
- SHÏNOHARA T., AVARBOCK M. R., BRÏNSTER R. L. (1999). β 1-and α 6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* **96**: 5504–5509.
- SHÏNOHARA T., ORWÏG K. E., AVARBOCK M. R. ve BRÏNSTER R. L. (2000a). Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**: 8346-8351.
- SHÏNOMURA M., KÏSHÏ K., TOMÏTA A., KAWASUMÏ M., KANEZASHÏ H., KURODA Y., TSUNEKAWA N., OZAWA A., AÏYAMA Y., YONEDA A., SUZUKÏ H., SAÏTO M., PÏCARD J. Y., KOHNO K., KUROHMARU M., KANAÏ-AZUMA M., KANAÏ Y. (2014). A novel Amh-Treck transgenic mouse line allows toxin-dependent loss of supporting cells in gonads. *Reproduction*. **148**: H1–H9.
- SHÏRAZÏ R., ZARNANÏ A. H., SOLEÏMANÏ M., NAYERNÏA K., RAGERDÏ KASHANÏ I. (2017). Differentiation of bone marrow- derived stage-specific embryonic antigen 1 positive pluripotent stem cells into male germ cells. *Microscopy research and technique*. **80**: 430-440.
- SILVERS W. K. (1979). The Coat Colors of Mice: A Model for Mammalian Gene Action and Interaction. Springer-Verlag, New York Inc.
- SÏGMAN M., JAROW J. P. (1997). Endocrine evaluation of infertile men. *Urology*. **50**: 659–664.
- SÏMON L., EKMAN G. C., TYAGÏ G., HESS R. A., MURPHY K. M. ve COOKE P. S. (2007). Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res*. **313**: 3090–3099.
- SÏNGLA D. K., HACKER T. A., MA L., DOUGLAS P. S., SULLÏVAN R., LYONS G. E. ve KAMP T. J. (2006). Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J. Mol. Cell. Cardiol*. **40**: 195–200.
- SÏNHA N., WHELAN E. C. ve BRÏNSTER R. L. (2019). Isolation, Cryopreservation, and Transplantation of Spermatogonial Stem Cells. *Methods Mol Biol*. **2005**: 205-220.
- SÏNHA N., WHELAN E. C., TOBÏAS J. W., AVARBOCK M., STEFANOVSKÏ D., BRÏNSTER R. L. (2021). Roles of *Stra8* and *Tcerg1l* in retinoic acid induced spermatogonial differentiation in mouse. *Biol. Reprod*. **105**: 503–518.

- SİRLİN, J.L., EDWARDS, R.G. (1957). Duration of Spermatogenesis in the Mouse. *Nature*. **180**: 1138-9.
- SKINNER R., MULDER R. L., KREMER L. C., HUDSON M. M., CONSTINE L. S., BARDI E., BOEKHOUT A., BORGMANN-STAUDT A., BROWN M. C., COHN R., DIRKSEN U., GIWERCMAN A., ISHIGURO H., JAHNUKAINEN K., KENNEY L. B., LOONEN J. J., MEACHAM L., NEGGERS S., NUSSEY S., PETERSEN C., SHNORHAVORIAN M., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK M. M., VAN SANTEN H. M., WALLACE W. H., GREEN D. M. (2017). Recommendations for gonadotoxicity surveillance in male childhood, adolescent, and young adult cancer survivors: a report from the International Late Effects of Childhood Cancer Guideline Harmonization Group in collaboration with the PanCareSurFup Consortium. *Lancet Oncol*. **18**: e75–e90.
- SKLAR C. (1999). Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production. *Med Pediatr Oncol*. **33**: 2–8.
- SMITH E. P., HALL S. H., MONACO L., FRENCH F. S., WILSON E. M. ve CONTI M. (1989). A rat Sertoli cell factor similar to basic fibroblast growth factor increases c-fos messenger ribonucleic acid in cultured Sertoli cells. *Mol Endocrinol*. **3**: 954–961.
- SMITH J. R., VALLIER L., LUPO G., ALEXANDER M., HARRIS W. A., PEDERSEN R. A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol*. **313**: 107-17.
- SNYDER E. M., SMALL C., GRISWOLD M. D. (2010). Retinoic acid availability drives the asynchronous initiation of spermatogonial differentiation in the mouse. *Biol. Reprod*. **83**: 783–790.
- SODER O., BANG P., WAHAB A., PARVINEN M. (1992). Insulin-like growth factors selectively stimulate spermatogonial, but not meiotic, deoxyribonucleic acid synthesis during rat spermatogenesis. *Endocrinology*. **131**: 2344–2350.
- SOH Y. Q., JUNKER J. P., GILL M. E., MUELLER J. L., VAN OUDENAARDEN A., PAGE D. C. (2015). A Gene Regulatory Program for Meiotic Prophase in the Fetal Ovary. *PLoS Genet*. **11**: e1005531.
- SOLTER D. ve KNOWLES B. B. (1978). Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **75**: 5565–5569.
- SONG H. W., WILKINSON M. F. (2014). Transcriptional control of spermatogonial maintenance and differentiation. *Semin Cell Dev Biol*. **30**: 14-26.
- SOUQUET B., TOURPIN S., MESSIAEN S., MOISON D., HABERT R. ve LIVERA G. (2012). Nodal signaling regulates the entry into meiosis in fetal germ cells. *Endocrinology*. **153**: 2466-2473.
- SOVALAT H., SCROFANI M., EIDENSCHENK A., PASQUET S., RIMELEN V., HENON P. (2011). Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34(+)/CD133(+)/CXCR4(+)/ Lin(-)CD45(-) cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Experimental hematology*. **39**: 495-505.

- SPILLER C. M., FENG C. W., JACKSON A., GILLIS A. J., ROLLAND A. D., LOOIJENGA L. H., KOOPMAN P. ve BOWLES J. (2012). Endogenous Nodal signaling regulates germ cell potency during mammalian testis development. *Development*. **139**: 4123–4132.
- SPILLER C., BURNET G. ve BOWLES J. (2017). Regulation of fetal male germ cell development by members of the TGFB superfamily. *Stem Cell Research*. **24**: 174–180.
- STAUB C., HUE D., NICOLLE J. C., PERRARD-SAPORI M. H., SEGRETAIN D., DURAND P. (2000). The Whole Meiotic Process can Occur In Vitro in Untransformed Rat Spermatogenic Cells. *Exp Cell Res*. **260**: 85–95.
- STEINBERGER A., STEINBERGER E. (1966). Stimulatory Effect of Vitamins and Glutamine on the Differentiation of Germ Cells in Rat Testes Organ Culture Grown in Chemically Defined Media. *Exp Cell Res*. **44**: 429–35.
- STEVENS L. C. (1966). Development of resistance to teratocarcinogenesis by primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst*. **37**: 859–67.
- STIMPFEL M., SKUTELLA T., KUBISTA M., MALICEV E., CONRAD S. ve VIRANT-KLUN I. (2012). Potential Stemness of Frozen-Thawed Testicular Biopsies without Sperm in Infertile Men Included into the In Vitro Fertilization Programme. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **2012**: 291038.
- STRECKFUSS-BÖMEKE K., VLASOV A., HÜLSMANN S., YIN D., NAYERNIA K., ENGEL W., HASENFUSS G., GUAN K. (2009). Generation of functional neurons and glia from multipotent adult mouse germline stem cells. *Stem Cell Res*. **2**: 139–54.
- STUKENBORG J. B., JAHNUKAINEN K., HUTKA M., MITCHELL R. T. (2018). Cancer treatment in childhood and testicular function: the importance of the somatic environment. *Endocr Connect*. **7**: R69–R87.
- STUKENBORG J. B., WISTUBA J., LUETJENS C. M., ELHİJA M. A., HULEİHEL M., LUNENFELD E., GROMOLL J., NIESCHLAG E., SCHLATT S. (2008). Coculture of Spermatogonia With Somatic Cells in a Novel Three-Dimensional Soft-Agar-Culture-System. *J Androl*. **29**: 312–29.
- SUAREZ-PINZON W., KORBUTT G. S., POWER R., HOOTON J., RAJOTTE R.V., RABINOVITCH A. (2000). Testicular sertoli cells protect islet beta-cells from autoimmune destruction in NOD mice by a transforming growth factor-beta1-dependent mechanism. *Diabetes*. **49**: 1810–8.
- SUDA T., TAKUBO K., SEMENZA G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. **9**: 298–310.
- SUGAWA F., ARAÚZO-BRAVO M. J., YOON J., KIM K. P., ARAMAKI S., WU G., STEHLING M., PSATHAKI O. E., HÜBNER K., SCHÖLER H. R. (2015). Human primordial germ cell commitment in vitro associates with a unique PRDM14 expression profile. *EMBO J*. **34**: 1009–1024.
- SUGIMOTO R., NABESHIMA Y.I., YOSHIDA S. (2012). Retinoic acid metabolism links the periodical differentiation of germ cells with the cycle of Sertoli cells in mouse seminiferous epithelium. *Mech. Dev*. **128**: 610–624.

- SUN H., GONG T. T., JIANG Y. T., ZHANG S., ZHAO Y. H., WU Q. J. (2019). Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990-2017: Results from a global burden of disease study, 2017. *Aging*. **11**: 10952–10991.
- SUN M., YUAN Q., NIU M., WANG H., WEN L., YAO C., HOU J., CHEN Z., FU H., ZHOU F. (2018). Efficient generation of functional haploid spermatids from human germline stem cells by three-dimensional-induced system. *Cell Death Differ*. **25**: 749–766.
- SURANI M. A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nat. Cell Biol*. **414**: 122–128.
- SUZUKI A. ve SAGA Y. (2008). Nanos2 suppresses meiosis and promotes male germ cell differentiation. *Genes & development*. **22**: 430-435.
- SUZUKI A., IGARASHI K., AISAKI K., KANNO J., SAGA Y. (2010). NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**: 3594–3599.
- SUZUKI H., SADA A., YOSHIDA S. ve SAGA Y. (2009). The heterogeneity of spermatogonia is revealed by their topology and expression of marker proteins including the germ cell-specific proteins Nanos2 and Nanos3. *Developmental biology*. **336**: 222-231.
- SUZUKI S., SATO K. (2003). The Fertilising Ability of Spermatogenic Cells Derived From Cultured Mouse Immature Testicular Tissue. *Zygote*. **11**: 307–16.
- SWAN S. H., ELKIN E. P., FENSTER L. (2000). The question of declining sperm density revisited: An analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ. Health Perspect*. **108**: 961–966.
- TABAR V. ve STUDER L. (2014). Pluripotent stem cells in regenerative medicine: challenges and recent progress. *Nature Reviews Genetics*. **15**: 82-92.
- TACHIBANA M., AMATO P., SPARMAN M., GUTIERREZ N. M., TIPPNER-HEDGES R., MA H., KANG E., FULATI A., LEE H. S., SRITANAUDOMCHAI H., MASTERSON K., LARSON J., EATON D., SADLER-FREDD K., BATTAGLIA D., LEE D., WU D., JENSEN J., PATTON P., GOKHALE S., STOUFFER R. L., WOLF D., MITALPOV S. (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. **153**: 1228-1238.
- TADA M., TAKAHAMA Y., ABE K., NAKATSUJI N. ve TADA T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*. **11**: 1553-1558.
- TADOKORO Y., YOMOGIDA K., OHTA H., TOHDA A. ve NISHIMUNE Y. (2002) Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*. **113**: 29–39.
- TAGELENBOSCH R. A. ve DE ROOIJ D. G. (1993). A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **290**:193-200.

- TAHA E. A., EZ-ALDİN A. M., SAYED S. K., GHANDOUR N. M., MOSTAFA T. (2012). Effect of smoking on sperm vitality, DNA integrity, seminal oxidative stress, zinc in fertile men. **80**: 822–25.
- TAKAHASHI K., TANABE K., OHNUKI M., NARITA M., ICHISAKA T., TOMODA K. ve YAMANAKA S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **131**: 861-872.
- TAKASE H. M., NUSSE R. (2016). Paracrine Wnt/ β -catenin signaling mediates proliferation of undifferentiated spermatogonia in the adult mouse testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **113**: E1489-97.
- TAKASHIMA S., KANATSU-SHINOHARA M., TANAKA T., MORIMOTO H., INOUE K., OGONUKI N., JIJIWA M., TAKAHASHI M., OGURA A. ve SHINOHARA T. (2015). Functional differences between GDNF-dependent and FGF2-dependent mouse spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cell Reports*. **4**: 489–502.
- TAM P. P. L., SNOW M. H. L. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J. Embryol Exp. Morphol*. **64**: 133–147.
- TAN K., SONG H. W., WILKINSON M. F. (2021). RHOX10 drives mouse spermatogonial stem cell establishment through a transcription factor signaling cascade. *Cell Rep*. **36**: 109423.
- TANAKA S. S., TOYOOKA Y., AKASU R., KATOH-FUKUI Y., NAKAHARA Y., SUZUKI R., YOKOYAMA M., NOCE T. (2000). The mouse homolog of Drosophila VASA is required for the development of male germ cells. *Genes & development*. **14**: 841-53.
- TANAKA T., KANATSU-SHINOHARA M., LEI Z., RAO C. V., SHINOHARA T. (2016). The Luteinizing Hormone-Testosterone Pathway Regulates Mouse Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal by Suppressing WNT5A Expression in Sertoli Cells. *Stem Cell Reports*. **7**: 279-91.
- TANG W. W., DIETMANN S., IRIE N., LEITCH H. G., FLOROS V. I., BRADSHAW C. R., HACKETT J. A., CHINNERY P. F., SURANI M. A. (2015). A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. *Cell*. **161**: 1453–1467.
- TASSINARI V., CAMPOLO F., CESARINI V., TODARO F., DOLCI S. ve ROSSI P. (2015). Fgf9 inhibition of meiotic differentiation in spermatogonia is mediated by Erk-dependent activation of Nodal-Smad2/3 signaling and is antagonized by Kit Ligand. *Cell Death & Disease*. **6**: e1688-e1688.
- THAYER K. A., RUHLEN R. L., HOWDESHELL K. L., BUCHANAN D. L., COOKE P. S., PREZIOSI D., WELSHONS W. V., HASEMAN J., VOM SAAL F. S. (2001). Altered prostate growth and daily sperm production in male mice exposed prenatally to subclinical doses of 17 α -ethinyl oestradiol. *Human Reproduction*. **16**: 988-996.
- THOMPSON J. N., HOWELL J. M., PITT G. A. (1964). Vitamin a and Reproduction in Rats. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. **159**: 510–535.
- THOMSON J. A., ITSKOVITZ-ELDOR J., SHAPIRO S. S., WAKNITZ M. A., SWIERGIEL J. J., MARSHALL V. S. ve JONES J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282**: 1145-1147.

- TIAN-ZHONG M., BI C., YING Z., XIA J., CAI-LING P., YUN-SHAN Z., MEI-WEN H., YAN-RU N. (2016). Critical role of Emx2 in the pluripotency - differentiation transition in male gonocytes via regulation of FGF9/NODAL pathway. *Reproduction*. **151**: 673-81.
- TOKUDA M., KADOKAWA Y., KURAHASHI H. ve MARUNOUCHI T. (2007). CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biology of reproduction*. **76**: 130-141.
- TOYOOKA Y., TSUNEKAWA N., AKASU R. ve NOCE T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **100**: 11457–11462.
- TOYOOKA Y., TSUNEKAWA N., TAKAHASHI Y., MATSUI Y., SATOH M., NOCE T. (2000). Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev*. **93**: 139-49.
- TRAVERS A., ARKOUN B., SAFSAF A., MILAZZO J. P., ABSYTE A., BIRONNEAU A., PERDRIX A., SIBERT L., MACÉ B., CAULIEZ B., RIVES N. (2013). Effects of Vitamin A on In Vitro Maturation of Pre-Pubertal Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Plos ONE*. **8**: e82819.
- TROWELL O. A. (1959). The Culture of Mature Organs in a Synthetic Medium. *Exp Cell Res*. **16**: 118–47.
- TRÖNDLE I., WESTERNSTRÖER B., WISTUBA J., TERWORT N., SCHLATT S., NEUHAUS N. (2017). Irradiation affects germ and somatic cells in prepubertal monkey testis xenografts. *Mol Hum Reprod*. **23**: 141–54.
- TSUDA M., SASAOKA Y., KISO M., ABE K., HARAGUCHI S., KOBAYASHI S., SAGA Y. (2003). Conserved Role of nanos Proteins in Germ Cell Development. *Science*. **301**: 1239–1241.
- UNNI E., RAO M. R., GANGULY J. (1983). Histological & ultrastructural studies on the effect of vitamin A depletion & subsequent repletion with vitamin A on germ cells & Sertoli cells in rat testis. *Indian J. Exp. Biol*. **21**: 180–192.
- VALLI H., PHILLIPS B. T., ORWIG K. E., GASSEI K. ve NAGANO M. C. (2015). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 595-635.
- VALLI H., SUKHWANI M., DOVEY S. L., PETERS K. A., DONOHUE J., CASTRO C. A., CHU T., MARSHALL G. R., ORWIG K. E. (2014). Fluorescence-and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertility and sterility*. **102**: 566-580.
- VALLIER L., ALEXANDER M. ve PEDERSEN R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell Sci*. **118**: 4495–4509.
- VALLIER L., REYNOLDS D., PEDERSEN R. A. (2004). Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. *Dev Biol*. **275**: 403-21.
- VALLIER L., TOUBOUL T., BROWN S., CHO C., BILICAN B., ALEXANDER M., CEDERVALL J., CHANDRAN S., AHRLUND-RICHTER L., WEBER A., PEDERSEN R. A. (2009a). Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. **27**: 2655–2666.

- VALLIER L., TOUBOUL T., CHNG Z., BRİMPARİ M., HANNAN N., MİLLAN E., SMİTHERS L. E., TROTTER M., RUGG-GUNN P., WEBER A., PEDERSEN R. A. (2009b). Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS ONE*. **4**: e6082.
- VAN BEEK M. E. A. B., MEİSTRİCH M. L. ve DE ROOIJ D. G. (1990). Probability of self-renewing divisions of spermatogonial stem cells in colonies, formed after fission neutron irradiation. *Cell Proliferation*. **23**: 1-16.
- VAN BRAGT M. P., CİLİBERTİ N., STANFORD W. L., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M. (2005). LY6A/E (SCA-1) expression in the mouse testis. *Biol Reprod*. **73**: 634-8.
- VAN BRAGT M. P., ROEPERS-GAJADIEN H. L., KORVER C. M., BOGERD J., OKUDA A., EGGEN B. J., DE ROOIJ D. G., VAN PELT A. M. (2008). Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis. *Reproduction*. **136**: 33-40.
- VAN DISSSEL-EMİLİANİ F. M., DE BOER-BROUWER M., DE ROOIJ D. G. (1996). Effect of fibroblast growth factor-2 on Sertoli cells and gonocytes in coculture during the perinatal period. *Endocrinology*. **137**: 647-54.
- VAN PELT A. M., DE ROOIJ D. G. (1990a). The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol. Reprod*. **42**: 677-682.
- VAN PELT A. M., DE ROOIJ D. G. (1990b). Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol. Reprod*. **43**: 363-367.
- VAN PELT A. M., DE ROOIJ D. G. (1991). Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. *Endocrinology*. **128**: 697-704.
- VAN SAEN D., VLOEBERGHES V., GİES I., MATEİZEL I., SERMON K., DE SCHEPPER J., TOURNAYE H., GOOSSENS E. (2018). When does germ cell loss and fibrosis occur in patients with Klinefelter syndrome?. *Hum Reprod*. **33**: 1009-22.
- VANDER ARK A., CAO J., Lİ X. (2018). TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal*. **52**: 112-120.
- VANDER BORGHT M., WYNS C. (2018). Fertility and infertility: definition and epidemiology. *Clin Biochem*. **62**: 2-10.
- VASSENA R., EGUİZABAL C., HEİNDRYCKX B., SERMON K., SİMON C., VAN PELT A. M., VEİGA A., ZAMBELLİ F., ESHRE SPECIAL İNTEREST GROUP STEM CELLS. (2015). Stem cells in reproductive medicine: ready for the patient?. *Human Reproduction*. **30**: 2014-2021.
- VEİSİ M., MANSOURİ K., ASSADOLLAHİ V., JALİLİ C., PİRNIÄ A., SALAHSHOOR M. R., HOSEİNKHANİ Z., GHOLAMİ M. R. (2022). Evaluation of co-cultured spermatogonial stem cells encapsulated in alginate hydrogel with Sertoli cells and their transplantation into azoospermic mice. *Zygote*. **30**: 344-351.

- VERNET N., DENNEFELD C., ROCHETTE-EGLY C., OULAD-ABDELGHANI M., CHAMBON P., GHYSELINCK N. B., MARK M. (2006). Retinoic acid metabolism and signaling pathways in the adult and developing mouse testis. *Endocrinology*. **147**: 96–110.
- VIRANT-KLUN I., STIMPFEL M., CVJETICANIN B., VRTACNIK-BOKAL E., SKUTELLA T. (2013). Small SSEA-4-positive cells from human ovarian cell cultures: related to embryonic stem cells and germinal lineage?. *Journal of ovarian research*. **6**: 24.
- VON MEYENN F., BERRENS R. V., ANDREWS S., SANTOS F., COLLIER A., KRUEGER F., OSORNO R., DEAN W., RUGG-GUNN P., REIK W. (2016). Comparative Principles of DNA Methylation Reprogramming during Human and Mouse In Vitro Primordial Germ Cell Specification. *Dev. Cell*. **39**: 104–115.
- WAGERS A. ve WEISSMAN I. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell*. **116**: 639-648.
- WANG D. Z., ZHOU X. H., YUAN Y. L., ZHENG X. M.. (2010). Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. *Asian J Androl*. **12**: 263-70.
- WANG J., WREFORD N. G., LAN H. Y., ATKINS R. ve HEDGER M. P. (1994). Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol Reprod*. **51**: 551–561.
- WANG P., SUO L. J., SHANG H., LI Y., LI G. X., LI Q. W., HU J. H. (2014). Differentiation of Spermatogonial Stem Cell-Like Cells From Murine Testicular Tissue Into Haploid Male Germ Cells in vitro. *Cytotechnol*. **66**: 365–72.
- WANG S., WANG X., MA L., LIN X., ZHANG D., LI Z., WU Y., ZHENG C., FENG X., LIAO S., FENG Y., CHEN J., HU X., WANG M. ve HAN C. (2016). Retinoic Acid Is Sufficient for the In Vitro Induction of Mouse Spermatocytes. *Stem Cell Reports*. **7**: 80-94.
- WANG Z., ORON E., NELSON B., RAZIS S., IVANOVA N. (2012). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. **10**: 440–454.
- WARD M. A., YANAGIMACHI R. (2018). Intracytoplasmic Sperm Injection in Mice. *Cold Spring Harb Protoc*. **2018**.
- WESTERN P. S., VAN DEN BERGEN J. A., MILES D. C., SINCLAIR A. H. (2010). Male fetal germ cell differentiation involves complex repression of the regulatory network controlling pluripotency. *FASEB J*. **24**: 3026–3035.
- WHITEHEAD E., SHALET S. M., JONES P. H., BEARDWELL C. G., DEAKIN D. P. (1982). Gonadal function after combination chemotherapy for Hodgkin's disease in childhood. *Arch Dis Child*. **57**: 287–291.
- WITSCHI E. (1948). Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal folds. *Contr. Embryol. Carne. Inst*. **32**: 67–80.
- WOLBACH S. B., HOWE P. R. (1925). Tissue Changes Following Deprivation of Fat-Soluble a Vitamin. *J. Exp. Med*. **42**: 753–777.

- WOLPERT L., BEDDINGTON R., JESSELL T., LAWRENCE P., MEYEROWITZ E., SMITH J. (2001). Principles of Development. 2nd Ed. Chapter 8. Oxford University Press, London. 253-287.
- WU Q., KANATA K., SABA R., DENG C. X., HAMADA H. ve SAGA Y. (2013). Nodal/activin signaling promotes male germ cell fate and suppresses female programming in somatic cells. *Development*. **140**: 291-300.
- WU X., GOODYEAR S. M., ABRAMOWITZ L. K., BARTOLOMEI M. S., TOBIAS J. W., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (2012). Fertile offspring derived from mouse spermatogonial stem cells cryopreserved for more than 14 years. *Hum Reprod*. **27**: 1249–59.
- WU X., GOODYEAR S. M., TOBIAS J. W., AVARBOCK M. R., BRINSTER R. L. (2011). Spermatogonial stem cell self-renewal requires ETV5-mediated downstream activation of Brachyury in mice. *Biol Reprod*. **85**: 1114–1123.
- WU Y., ZHOU H., FAN X., ZHANG Y., ZHANG M., WANG Y., XIE Z., BAI M., YIN Q., LIANG D., TANG W., LIAO J., ZHOU C., LIU W., ZHU P., GUO H., PAN H., WU C., SHI H., WU L., TANG F., LI J. (2015). Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells. *Cell Res*. **25**: 67-79.
- WYNS C., CURABA M., VANABELLE B., VAN LANGENDONCKT A., DONNEZ J. (2010). Options for fertility preservation in prepubertal boys. *Hum Reprod Update*. **16**: 312–328.
- WYNS C., DE MICHELE F. (2018). Fertility preservation in pre-pubertal boys: follow-up data after 13 years of clinical experience. *Fertil Steril*. **110**: e87.
- XIAO Q., WANG S. K., TIAN H., XIN L., ZOU Z. G., HU Y. L., CHANG C. M., WANG X. Y., YIN Q. S., ZHANG X. H., WANG L. Y. (2012). TNF-alpha increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues. *Cell Biochem Biophys*. **62**: 409–414.
- XU H., BEASLEY M. D., WARREN W. D., VAN DER HORST G. T., MCKAY M. J. (2005). Absence of mouse REC8 cohesin promotes synapsis of sister chromatids in meiosis. *Dev. Cell*. **8**: 949–961.
- XU H., YANG M., TIAN R., WANG Y., LIU L., ZHU Z., YANG S., YUAN Q., NIU M., YAO C., ZHI E., LI P., ZHOU C., HE Z., LI Z., GAO W. Q. (2020). Derivation and propagation of spermatogonial stem cells from human pluripotent cells. *Stem Cell Res Ther*. **11**: 408.
- YAMAGUCHI S., KIMURA H., TADA M., NAKATSUJI N., TADA T. (2005). Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr. Patterns*. **5**: 639–646.
- YAMANAKA S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell stem cell*. **27**: 523-531.
- YAMASHIRO C., SASAKI K., YABUTA Y., KOJIMA Y., NAKAMURA T., OKAMOTO I., YOKOBAYASHI S., MURASE Y., ISHIKURA Y., SHIRANE K., SASAKI H., YAMAMOTO T., SAITOU M. (2018). Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. *Science*. **362**: 356–360.

- YAN H. H., MRUK D. D., LEE W. M. ve CHENG C. Y. (2007). Ectoplasmic specialization: a friend or a foe of spermatogenesis?. *Bioessays*. **29**: 36-48.
- YANG Q.-E., KİM D., KAUCHER A., OATLEY M. J. ve OATLEY J. M. (2013). CXCL12–CXCR4 signaling is required for the maintenance of mouse spermatogonial stem cells. *J. Cell Sci.* **126**: 1009-1020.
- YANG Z., DONG P., FU X., Lİ Q., MA S., WU D., KANG N., LİU X., YAN L. ve XİAO R. (2015). CD49f acts as an inflammation sensor to regulate differentiation, adhesion, and migration of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. **33**: 2798–2810.
- YAO H. H., DİNAPOLİ L., CAPEL B. (2003). Meiotic germ cells antagonize mesonephric cell migration and testis cord formation in mouse gonads. *Development*. **130**: 5895–5902.
- YEH J. R., ZHANG X. ve NAGANO M. C. (2011). Wnt5a is a cell-extrinsic factor that supports self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *J. Cell Sci.* **124**: 2357-2366.
- YEH J. R., ZHANG X. ve NAGANO M. C. (2012). Indirect effects of Wnt3a/beta-catenin signalling support mouse spermatogonial stem cells in vitro. *PLoS One*. **7**: e40002.
- YİNG Y., LİU X. M., MARBLE A., LAWSON K. A. ve ZHAO G. Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol. Endocrinol.* **14**: 1053–1063.
- YOKONİSHİ T., SATO T., KATAGİRİ K., KOMEYA M., KUBOTA Y., OGAWA T. (2013). In Vitro Reconstruction of Mouse Seminiferous Tubules Supporting Germ Cell Differentiation. *Biol Reprod.* **89**: 15.
- YOSHİDA S., SUKENO M., NAKAGAWA T., OHBO K., NAGAMATSU G., SUDA T., NABESHİMA Y. (2006). The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*. **133**: 1495–1505.
- YOSHİDA N., PERRY A. (2007). Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nat Protoc.* **2**: 296–304.
- YOSHİHARA M., HAYASHİZAKİ Y., MURAKAWA Y. (2017). Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem cell reviews and reports*. **13**: 7-16.
- YOSHİMOTO M., HEİKE T., CHANG H., KANATSU-SHİNOHARA M., BABA S., VARNAU J. T., SHİNOHARA T., YODER M. C., NAKAHATA T. (2009). Bone marrow engraftment but limited expansion of hematopoietic cells from multipotent germline stem cells derived from neonatal mouse testis. *Exp Hematol.* **37**: 1400-10.
- YOSHİNAGA K., NİSHİKAWA S., OGAWA M., HAYASHİ S., KUNİSADA T., FUJİMOTO T. (1991). Role of c-kit in mouse spermatogenesis: Identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*. **113**: 689–699.
- YOUNG J., XU C., PAPADAKİS G. E., ACİERNO J. S., MAİONE L., HİETAMÄKİ J., RAİVİO T., PİTTELOUD N. (2019). Clinical management of congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Rev.* **40**: 669–710.

- YU J., VODYANIK M. A., SMUGA-OTTO K., ANTOSIEWICZ-BOURGET J., FRANE J. L., TIAN S., NIE J., JONSDOTTIR G. A., RUOTTI V., STEWART R., SLUKVIN I. I., THOMSON J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. **318**: 1917-1920.
- YU K. R., YANG S. R., JUNG J. W., KIM H., KO K., HAN D. W., PARK S. B., CHOI S. W., KANG S. K., SCHÖLER H. ve KANG K. S. (2012). CD49f enhances multipotency and maintains stemness through the direct regulation of OCT4 and SOX2. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. **30**: 876–887.
- YUAN Y., LI L., CHENG Q., DIAO F., ZENG Q., YANG X., WU Y., ZHANG H., HUANG M., CHEN J., ZHOU Q., ZHU Y., HUA R., TIAN J., WANG X., ZHOU Z., HAO J., YU J., HUA D., LIU J., GUO X., ZHOU Q., SHA J. (2020). In Vitro Testicular Organogenesis From Human Fetal Gonads Produces Fertilization-Competent Spermatids. *Cell Res*. **30**: 244–55.
- YULE T. D., MONTOYA G. D., RUSSELL L. D., WILLIAMS T. M. ve TUNG K. S. (1988). Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J Immunol*. **141**: 1161–1167.
- ZAKER H., RAZI M., MAHMOUDIAN A., SOLTANALINEJAD F. (2022). Boosting Effect of Testosterone on GDNF Expression in Sertoli Cell Line (TM4): Comparison Between TM3 Cells-Produced and Exogenous Testosterone. *Gene*. **812**: 146112.
- ZEGERS-HOCHSCHILD F., ADAMSON G. D., DYER S., RACOWSKY C., DE MOUZON J., SOKOL R., RIENZI L., SUNDE A., SCHMIDT L., COOKE I. D., SIMPSON J. L., VAN DER POEL S. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Fertil Steril*. **108**: 393–406.
- ZHAI J., XIAO Z., WANG Y. ve WANG H. (2022). Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. *Trends Cell Biol*. **32**: 18–29.
- ZHANG D. Y., HE D. W., WEI G. H., SONG X. F., LI X. L., IN T. (2008). Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer in vitro. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. **39**: 6-9.
- ZHANG D., LIU X., PENG J., HE D., LIN T., ZHU J., LI X., ZHANG Y., WEI G. (2014b). Potential spermatogenesis recovery with bone marrow mesenchymal stem cells in an azoospermic rat model. *International Journal of Molecular Sciences*. **15**: 13151–13165.
- ZHANG J., ETO K., HONMYOU A., NAKAO K., KIYONARI H. ve ABÉ S.-I. (2011). Neuregulins are essential for spermatogonial proliferation and meiotic initiation in neonatal mouse testis. *Development*. **138**: 3159-3168.
- ZHANG M. L., YAN Y. C., SUN Y. P. ve KOIDE S. (1997). Identification and expression of epidermal growth factor gene in mouse testis. *Cell Res*. **7**: 51-59.
- ZHANG M., ZHOU H., ZHENG C., XIAO J., ZUO E., LIU W., XIE D., SHI Y., WU C., WANG H., LI D., LI J. (2014a). The roles of testicular c-kit positive cells in de novo morphogenesis of testis. *Scientific reports*. **4**: 5936.
- ZHANG S., CUI W. (2014c). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*. **6**: 305-11.

- ZHANG X., EBATA K. T., NAGANO M. C. (2003). Genetic analysis of the clonal origin of regenerating mouse spermatogenesis following transplantation. *Biol Reprod.* **69**: 1872-8.
- ZHAO T., ZHANG Z. N., RONG Z. ve XU Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature.* **474**: 212-215.
- ZHAO X., SÎRBU I. O., MÎC F. A., MOLOTKOVA N., MOLOTKOV A., KUMAR S., DUESTER G. (2009). Retinoic acid promotes limb induction through effects on body axis extension but is unnecessary for limb patterning. *Curr. Biol.* **19**: 1050-1057.
- ZHENG K., WU X., KAESTNER K. H. ve WANG P. J. (2009). The pluripotency factor LIN28 marks undifferentiated spermatogonia in mouse. *BMC developmental biology.* **9**: 1-11.
- ZHENG L., ZHU H., MU H., WU J., SONG W., ZHAI Y., PENG S., LI G., HUA J. (2016). CD49f promotes proliferation of male dairy goat germline stem cells. *Cell Prolif.* **49**: 27-35.
- ZHENG Y., LEI Q., JONGEJAN A., MULDER C. L., VAN DAALEN S. K. M., MASTENBROEK S., HWANG G., JORDAN P. W., REPPING S., HAMER G. (2018). The influence of retinoic acid-induced differentiation on the radiation response of male germline stem cells. *DNA Repair (Amst).* **70**: 55-66.
- ZHENG Y., THOMAS A., SCHMIDT C. M., DANN C. T. (2014). Quantitative detection of human spermatogonia for optimization of spermatogonial stem cell culture. *Hum Reprod.* **29**: 2497-511.
- ZHOU Q., LI Y., NIE R., FRIEL P., MITCHELL D., EVANOFF R. M., POUCHNIK D., BANASIK B., MCCARREY J. R., SMALL C., GRISWOLD M. D. (2008b). Expression of *stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8)* and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol. Reprod.* **78**: 537-545.
- ZHOU Q., NIE R., LI Y., FRIEL P., MITCHELL D., HESS R.A., SMALL C., GRISWOLD M. D. (2008a). Expression of *stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8)* in spermatogenic cells induced by retinoic acid: An in vivo study in vitamin A-sufficient postnatal murine testes. *Biol. Reprod.* **79**: 35-42.
- ZHOU Q., WANG M., YUAN Y., WANG X., FU R., WAN H., XIE M., LIU M., GUO X., ZHENG Y., FENG G., SHI Q., ZHAO X. Y., SHA J., ZHOU Q. (2016). Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro. *Cell Stem Cell.* **18**: 330-340.
- ZHU S., LI W., ZHOU H., WEI W., AMBASUDHAN R., LIN T., KIM J., ZHANG K., DING S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell.* **7**: 651-655.
- ZIAEI R., AYATOLLAHI M., YAGHOBI R., SAHRAEIAN Z., ZARGHAMI N. (2014). Involvement of TNF-alpha in differential gene expression pattern of CXCR4 on human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep.* **41**: 1059-1066.
- ZOMER H. D. ve REDDI P. P. (2020). Characterization of rodent sertoli cell primary cultures. *Molecular Reproduction and Development.* **87**: 857-870.

ZOU K., YUAN Z., YANG Z., LUO H., SUN K., ZHOU L., XIANG J., SHI L., YU Q., ZHANG Y., HOU R., WU J. (2009). Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat. Cell Biol.* **11**: 631–636.



EKLER

EK1–Flow Sitometri

EK1.1–FACS Boyama Tamponu (PBS-BSA-Na Azid Tamponu):

- 2 ml 1X PBS
- 0.06 g BSA
- 0.001 g Na-Azide

EK2–MACS

EK2.1–PBS-S (PBS-Supplemented):

- 23 ul D-glukoz
- 0.001 g Pirüvat
- 50 ul P/S
- 100 ul FBS
- 0.02383 g HEPES
- 9827 ul PBS

*(taze hazırlanır ve +4°C’de saklanır; Kubota ve Brinster, 2008)

EK3–İmmünositokimya

EK3.1–Primer Antikor Dilüenti (Antibody Solution Enhancer; ASE):

- 0.00751 g glisin
- 5 ul Tween-20
- 10 ul Triton X-100
- 20 ul H₂O₂
- 10 ml 1X PBS

*(H₂O₂ taze eklenir; Rosas-Arellano 2016)

EK4–İmmünoblotlama

EK4.1–2M NaCl:

- 1.169 g NaCl
- 10 ml ddH₂O

EK4.2–1M Tris-HCl, pH 8.2:

- 3.028 g Tris base
- 15 ml ddH₂O
- %37 HCl ile pH 8.2'e ayarlanır
- ddH₂O ile 25 ml'e tamamlanır

*(+4°C'de saklanır)

EK4.3–Lizis Tamponu:

- 500 ul 2 M NaCl
- 200 ul 1 M Tris, pH 8.2
- 40 ul IgePal (%0.9)
- 2688 ul ddH₂O

*(8 tane 1.5-ml eppendorflara 498 ul'şer alikotlanır ve alikotlar -20°C'de saklanır; 83 ul 7X PIC taze eklenir)

EK4.4–4X Laemmli Tamponu:

- 2 ml %100 gliserol
- 1.2 ml 1M Tris-HCl, pH 6.8
- 0.4 g SDS
- 2 mg bromfenol mavisi (bromophenol blue; BFB)
- 1.4 ml ddH₂O

*(+4°C’de saklanır)

EK4.5–10X Tris-Tamponlu Salin (10X TBS):

- 24 g Tris base
- 88 g NaCl
- 900 ml ddH₂O
- %37 HCl ile pH 7.6’ya ayarlanır
- ddH₂O ile 1 L’ye tamamlanır

EK4.6–1X TBS-T, pH 7.6:

- 100 ml 10X TBS
- 900 ml ddH₂O
- %37 HCl ile pH 7.6’ya ayarlanır
- 500 ul Tween-20

EK4.7–%5 BSA/TBST (Bloklama Tamponu):

- 100 ml 1X TBS-T
- 5 g BSA

*(-20°C’de saklanır)

EK4.8–1.5 M Tris-HCl, pH 8.8:

- 9.086 g Tris base
- 25 ml ddH₂O
- %37 HCl ile pH 8.8’e ayarlanır
- ddH₂O ile 50 ml’e tamamlanır

*(+4°C’de saklanır)

EK4.9–1 M Tris-HCl, pH 6.8:

- 6.057 g Tris base
- 25 ml ddH₂O

- %37 HCl ile pH 6.8'e ayarlanır
- ddH₂O ile 50 ml'e tamamlanır

*(+4°C'de saklanır)

EK4.10-%10 SDS:

- 5 g SDS
- 45 ml ddH₂O
- ddH₂O ile 50 ml'e tamamlanır

*(45 ml ddH₂O eklendikten sonra karıştırılıp çözündürülür)

EK4.11-%10 APS:

- 0.1 g APS
- 1 ml ddH₂O

*(taze hazırlanır ve +4°C'de saklanır; ddH₂O eklendikten sonra iyice vortekslenir)

EK4.12-ALT JEL, %10:

- 1.948 ml ddH₂O
- 1.25 ml 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
- 1.7 ml %30 Akrilamid
- 50 ul %10 SDS
- 50 ul %10 APS
- 3 ul TEMED

EK4.13-ÜST JEL, %5:

- 2.54 ml ddH₂O
- 500 ul 1M Tris-HCl, pH 6.8
- 876 ul %30 Akrilamid
- 40 ul %10 SDS
- 40 ul %10 APS
- 4 ul TEMED

EK4.14–5X Koşturma Tamponu:

- 15 g Tris base
- 72 g glisin
- 700 ml ddH₂O
- 5 g SDS
- ddH₂O ile 1L'ye tamamlanır

*(SDS eklendikten sonra karıştırılarak özündürölür; kullanmadan önce 1X'e seyreltilir)

EK4.15–1X Transfer Tamponu:

- 60 ml ddH₂O
- 20 ml 5X Transfer Tamponu (Trans-Blot Turbo RTA Mini 0.45 µm LF PVDF Transfer Kitinden (1704274, Bio-Rad, ABD))
- 20 ml MeOH

*(taze hazırlanır ve +4°C'de saklanır)

EK4.16–Mild Stripping Tamponu, pH 2.2:

- 3.75 g glisin
- 2.5 ml Tween-20
- 0.25 g SDS
- 200 ml ddH₂O
- %37 HCl ile pH 2.2'ye ayarlanır
- ddH₂O ile 250 ml'e tamamlanır

*(glisin, Tween-20 ve SDS eklendikten sonra karıştırılarak özündürölür)



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 14/07/2021
TOPLANTI NO : 2021-13
DOSYA NO : 2020-30
KARAR NO : 2021-13-109

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kaan AYDOS'un yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. K. Can AKÇALI, Doç. Dr. Oya Sena AYDOS, Zeynep Büşra AKSOY ve Dünya AYDOS'un katıldığı "Gonadotoksik kemoterapi sonrasında fare testisinde sağ kalan embriyo hücresi benzeri çok küçük hücrelerin (VSELs) karakterizasyonu ve poliferasyonunda Nodal yolağının rolü" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 04.03.2020 tarihli toplantısında alınan 2020-5-39 sayılı kararıyla onaylanmıştır. Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 20.07.2020 tarih ve 19391 sayılı dilekçe ile proje yürütücülüğünün Doç. Dr. Oya Sena AYDOS'a devredilmesi talep edilmiş ve Kurulumuzun 22.07.2020 tarihli toplantısında alınan 2020-13-122 sayılı karar ile bu talep uygun görülmüştür.

Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 09.07.2021 tarih ve 42964 sayılı dilekçe ile proje süresinin 30.06.2022 tarihine kadar uzatılması, proje ekibinde yer alan Zeynep Büşra AKSU'nun çıkarılarak yerine Nurbanu GÖNÜLKIRMAZ'ın dâhil edilmesi ve çalışma içeriğine birtakım analizlerin ilave edilmesi talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş; proje süresinin 30.06.2022 tarihine kadar uzatılmasının uygun olduğuna, talep edilen araştırmacı değişikliğinin BAP Koordinatörlüğü tarafından uygun görülmesini müteakip yeniden değerlendirilmesine ve çalışma içeriğine ilave edilmesi talep edilen analizlerin çalışmaya eklenmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 30/06/2020-30/06/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 14/07/2021
TOPLANTI NO : 2021-13
DOSYA NO : 2020-31
KARAR NO : 2021-13-108

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Oya Senâ AYDOS'un yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. K. Can AKÇALI, Prof. Dr. Kaan AYDOS, Zeynep Büşra AKSOY ve Dünya AYDOS'un katıldığı "Fare kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin testisteki embriyo hücresi benzeri çok küçük hücrelerden (VSELs) farklılaştırılan spermatogenik hücrelerle ko-transplantasyonunun spermatogenez restorasyonundaki etkisi" başlıklı araştırma projesinin içeriği Kurulumuzun 04.03.2020 tarihli toplantısında alınan 2020-5-40 sayılı kararıyla onaylanmıştır. Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 20.07.2020 tarih ve 19392 sayılı dilekçe ile proje yürütücülüğünün Prof. Dr. Kaan AYDOS'a devredilmesi talep edilmiş ve Kurulumuzun 22.07.2020 tarihli toplantısında alınan 2020-13-123 sayılı karar ile uygun görülmüştür.

Proje yürütücüsü tarafından Kurulumuza verilen 28.05.2021 tarih ve 31651 sayılı dilekçe ile bazı değişikliklerle birlikte başlık değişimi talep edilmiş, Kurulumuzun 02/06/2021 tarihli toplantısında alınan karar ile çalışma başlığının "Farelerde sağlıklı sertoli hücrelerinin testisteki embriyo hücresi benzeri çok küçük hücrelerden (VSELs) farklılaştırılan spermatogenik hücreler ile ko-transplantasyonunun spermatogenez restorasyonundaki etkisi" olarak değiştirilmesi uygun bulunmuştur.

Proje yürütücüsünün 29.06.2021 tarihli dilekçesinde ise; projede danışman olarak görev alan Doç. Dr. Sinan ÖZKAVUKÇU'nun yurt dışı görevi nedeniyle projeden ayrılması üzerine yerine Dr. Öğr. Üyesi Ferda Topal Çelikkın'ın danışman olarak yer alması ve Arş. Gör. Bilge SERDAROĞLU'nun proje ekibine dâhil edilmesi talep edilmektedir.

Söz konusu dilekçe, Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi"nin 11 (5) maddesi kapsamında değerlendirilmiş, talep edilen danışman değişikliğinin Tübitak tarafından uygun görülmesini müteakip yeniden değerlendirilmesine ve Arş. Gör. Bilge SERDAROĞLU'nun proje ekibine dâhil edilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 30/06/2020-30/06/2022

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 22/03/2023
TOPLANTI NO : 2023-6
DOSYA NO : 2023-38
KARAR NO : 2023-6-42

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kaan AYDOS'un yaptığı; araştırmacı olarak Prof. Dr. Kâmil Can AKÇALI, Doç. Dr. Oya Sena AYDOS ve Dünya AYDOS'un katıldığı "CD49f+ Fare Germline Kök Hücre-Benzeri Hücrelerden Farklılaştırılan Spermier Kullanılarak BALB/c Farelerinde İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)" başlıklı çalışma Üniversite senatosunun 12/2/2016 tarihli toplantısında 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" ne göre değerlendirilmiş ve çalışmanın aşağıda belirtilen kapsamda yapılmasının uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Hayvan Türü : Fare
Hayvan Sayısı : 12
Geçerlilik Süresi : 01/09/2023-01/09/2024

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof. Dr. Halit KANCA (Üye)	Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	