

Spermatogonyal kök hücreler

Nilay Kuşçu, Doç. Dr. Çiler Çelik-Özenci

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve androjen salgılayan testislerden, sperm dışarıya taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sisteminden (epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçası), salgılarıyla semeni oluşturan ve ejaküle sperme besin sağlayan yardımcı bezlerden (seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bezler) ve çiftleşme organı olan penisten oluşmaktadır (Abraham L. Kierszenbaum 2006).

Testislerde, mediastunumdan içeriye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu lopçuklara böler ve her bir lopçuk bir ile dört seminifer tübülü içerir. Seminifer tübüller somatik Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere iki belirgin hücre popülasyonunu içerir.

Sertoli hücrelerinin aralarında yaptığı sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur. Kan-testis bariyeri, seminifer tübülü bazal ve adlüminal kompartman olmak üzere iki kısma ayırır. Bazal kompartman, Sertoli hücreleri sıkı bağlantıları ve bazal lamina arasındaki bölümdür ve burada mitoz bölünmeler geçiren spermatogenik hücreler bulunmaktadır. Spermatogenik hücreler, mayozun profaz evresine girdiklerinde Sertoli hücrelerinin geçici süreyle açılan sıkı bağlantıları arasından adlüminal kompartmana geçerler. Bölünmeler ilerledikçe spermatogenik hücreler de lümene doğru ilerlerler ve en sonunda olgun spermatozoa olarak lümene salınırlar (Shosei Yoshida 2010).

Seminifer tübüller içerisindeki spermatogenik hücreler spermatogenez olarak adlandırılan süreçte bölünürler, farklılaşırlar ve sperm üretirler. Bu süreç üç faz içerir:

1. Spermatogonyumların primer ve sekonder spermatositleri oluşturmak üzere mitotik bölünmeleri
2. Somatik kromozom sayısının yarıya düşürülmesini sağlayan spermatositlerin iki mayoz bölünme göstermesi ve bu süreç ile spermatidlerin üretilmesi
3. Spermatidlerin yapısal olarak sperme dönüştükleri spermiyogenez

Canlılarda kök hücreler tarafından desteklenen pek çok

kendini yenileme sistemi vardır. Spermatogenez süreci de bunlardan bir tanesidir ve spermatogenez sürecinin sürekliliği, spermatogonyal kök hücre sistemiyle sağlanmaktadır.

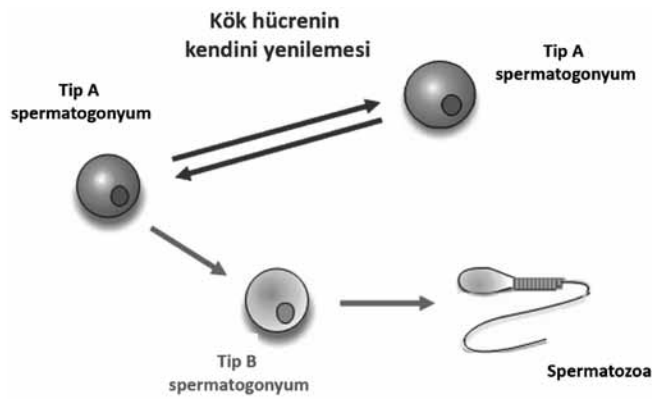
Fare Spermatogonyal Kök Hücreleri

Günümüze kadar spermatogonyal kök hücreler ile ilgili yapılmış olan çalışmalar esasen deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmiştir ve bu konuyla ilgili en çok bilgi fare modelleri üzerinden edinilmiştir.

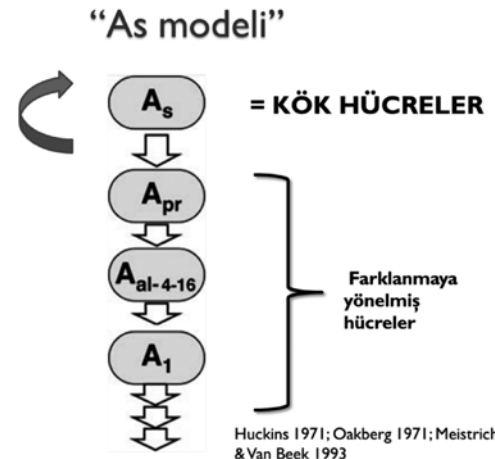
Fare germ hücreleri, epiblasttan vitellus kesesine göç eden ve buradan da embriyonik 10.5-12.5'uncu günler arasında gelişmekte olan gonada ulaşan primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri, fare erkek gonadlarında embriyonik 13.5'uncu günde gonosit olarak isimlendirilirler. Spermatogonyal kök hücrelerin kökeni de postnatal testisteki bu gonositlerdir. Doğum sonrasında, gonositler seminifer tübül bazal membranına göç ederler ve spermatogonyal kök hücreye farklılaşırlar. Doğumdan sonraki 6. günde, gonositler tip A spermatogonyumlara farklılaşırlar ve 8. günde de tip B spermatogonyumlar oluşurlar (Bellvè et al. 1977). Sonuç olarak, tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum olmak üzere iki temel spermatogonyum hücre tipi vardır.

Tip A spermatogonyumların geleceği 3 yol ile belirlenir (Şekil 1). (i) Mitoz bölünmeler ile çoğalarak kök hücre havuzunu korumak için tip A spermatogonyumları oluşturur (kendini yeniler), (ii) farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluşturur ki bunlar farklılaşarak spermatogenik serinin diğer hücrelerini oluştururlar, (iii) kontrollü hücre ölümü yani apoptoz gerçekleşir.

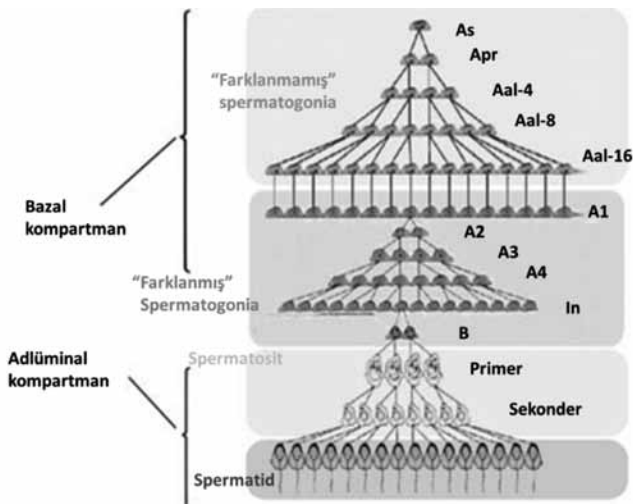
Seminifer tübüllerin bazal ve adlüminal kompartmanlarında gerçekleşen spermatogenez süreci ve bu süreçte oluşan spermatogenik seri hücreleri detaylı olarak Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu süreçte A single (tek), A paired



Şekil 1: Tip A spermatogonyumunun izleyebileceği yolları gösteren şematik çizim (<http://tu-dresden.de>). İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.



Şekil 3: A tekli modelini gösteren şematik çizim (Shosei Yoshida 2010). İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.



Şekil 2: Spermatogenez sürecini ve bu süreçte oluşan spermatogonik seri hücrelerini detaylı olarak gösteren şematik çizim (Shosei Yoshida 2010). İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.

(çiftli) ve A aligned (sıralı) tipteki spermatogonyumlar farklanmamış spermatogonyum olarak adlandırılırken, A1, A2, A3, A4, intermediate ve tip B spermatogonyumlar farklanmış spermatogonyum olarak adlandırılmaktadır.

Spermatogenez sürecinde önemli görevleri olan ve bu sürecin devamlılığını sağlayan spermatogonyal kök hücrelerin hangileri olduğu ile ilgili uzun yıllar boyunca pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda "A single modeli" ortaya atılmıştır (Huckins 1971, Oakberg 1971, Meistrich & Van Beek 1993). Bu modele göre, A tek spermatogonyumlar kök hücrelerdir ve sürekli olarak kendilerini yenileme yeteneğine sahiptirler. Bu sayede oluşturdukları kök hücre havuzu ile spermatogenezin devamlılığını sağlamaktadırlar. A tek (At) dışındaki A çiftli (Aç) ve A sıralı (As) gibi birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlan-

tılı olan spermatogonyumlar ise kök hücre potansiyelini kaybeden ve farklılaşmaya yönelen hücrelerdir (Şekil 3). Ancak bazı araştırmacılara göre bu modelin bir eksiği vardır ki o da modelin morfolojik gözlemlere dayalı olarak kurulmuş olmasıdır. Bu nedenle, bu modeli destekleyici fonksiyonel değerlendirmelerin de yapılması gerektiği farklı araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır.

Farklanmamış spermatogonyum olarak adlandırılan At, Aç, As spermatogonyumlar tüm testiküler hücrelerin %1'inden az kısmını oluşturmaktadırlar ve yapılan deneysel çalışmalara göre kök hücre fonksiyonu göstermektedirler (Shin ohara et al. 2000, Ohbo et al. 2003).

Bazı çalışmaların bulgularına göre; farklanmış spermatogonyum olarak adlandırılan A1'den tip B'ye kadar olan spermatogonyumların da, daha zayıf da olsa, kendilerini yenileme potansiyeli bulunmaktadır (Barroca et al. 2009).

Tüm bu bilgiler sonucunda araştırmacılar çeşitli sorulara yanıt aramaktadırlar. Bu sorulardan bazıları şöyledir:

- Farklanmamış spermatogonyumlardan hangileri gerçek kök hücrelerdir?
- Kök hücre olarak görev yapan hücreler bunu nasıl başarmaktadırlar?
- Spermatogonyal kök hücre fonksiyonlarını kontrol eden mekanizmalar nelerdir?
- A tekli modeli önermesi gerçekten doğru mudur?

Araştırmacılar bu sorulara yanıt bulmak ve testis dokusunda az sayıda olan kök hücre popülasyonunu ayırt etmek için çalışmaktadırlar. Günümüzde, spermatogonyal kök hücre belirteci olarak kullanılacak moleküller üzerinde araştırma-

lar yapılmaktadır ve bunlardan bazıları tanımlanmıştır.

Bu moleküllerden; $\alpha 6$ -integrin, $\beta 1$ -İntegrin, CD9, GFRA1, PLZF, POU5F1 (Oct-4), RET ve CD90 yalnızca spermatogonyal kök hücrelerde ifade edilirken, farklanmış spermatogonyumlarda (tip A1 – 4, intermediate, tip B) ifade edilmemektedirler (Shinohara et al. 1999, Kanatsu – Shinohara et al. 2004b, Meng et al. 2000, Buaas et al. 2004, Ohbo et al. 2003, Naughton et al 2006, Kubota et al. 2003). Ayrıca Kit molekülü de, farklanmış olan spermatogonyal hücrelerde ifade edilen ayırt edici bir moleküldür (Yoshinaga et al. 1991).

Spermatogonyal kök hücreleri kontrol eden hücre içi (intrensek) faktörler ve hücre dışı (ekstrensek) faktörler

Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklanma gibi davranışları düzenli bir şekilde kontrol edilir. Bu sürece, hem hücrelerin kendi ifade ettikleri hücre içi faktörlerin hem de hücre dışı faktörlerin etkisi vardır.

Hücre İçi Faktörler

Özellikle son on yılda yapılan çalışmalar sonucunda spermatogonyal kök hücrelerin kaderini belirleyen pek çok gen ve bu süreçteki görevleri tanımlanmıştır (Payne & Braun 2006, Seydoux & Braun 2006). Bu moleküllerden hücre içinde ifade edildiği bilenen faktörler ve işlevleri detaylı olarak aşağıda belirtilmektedir.

PLZF (Promyelocytic Leukemia Zinc Finger)

$A_t / A_c / A_s$ spermatogonyum popülasyonundan ifade edilen bir transkripsiyon baskılayıcısıdır. Kök hücrelerin kendini yenileme sürecinin devamlılığını sağlar (Buaas et al. 2004, Costoya et al. 2004).

BCL6B (B-cell CLL/Lymphoma 6 member B)

BTB/POZ ailesinin üyesidir. Kök hücre devamlılığında önemli rolleri bulunur (Oatley et al. 2006).

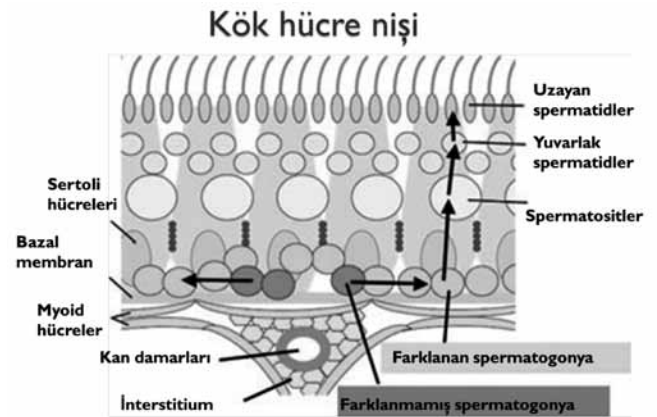
Nanos2

Hayvan türleri arasında korunan bir moleküldür. Özellikle At ve A_c spermatogonyumlarda ifade edilmekte ve

spermatogenik kök hücrelerin kendini yenilemelerini sağlamaktadır. Aşırı ekspresyonu spermatogenik farklılaşmayı durdurur ve kök hücre benzeri olgun olmayan hücrelerin seminifer tübüllerde birikimine neden olur. Nanos2'nin eksikliği ise kök hücre havuzunun tükenmesine ve kaybına yol açar (Sada et al. 2009, Suzuki et al. 2009).

Hücre Dışı Faktörler

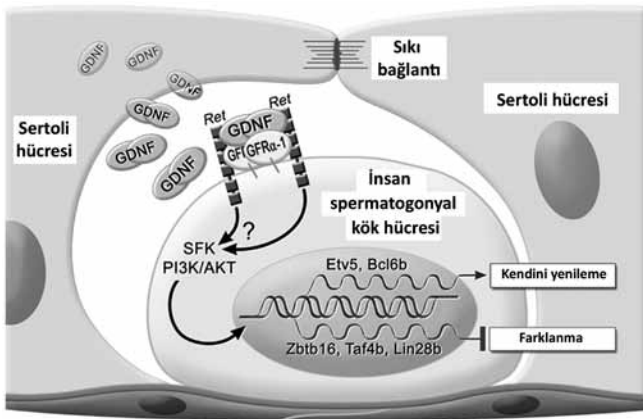
Bilindiği gibi hücrelerin belirli bir nişi (özelleşmiş mikroçevresi) vardır ve bu nişlerinde onları etkileyen mekanizmalar aracılığıyla kimlik kazanmaktadırlar. Spermatogonyal kök hücrelerin de nişi vardır ve bu nişi oluşturan yapılar; Sertoli hücreleri, bazal membran, myoid hücreler ve kan damarlarıdır (Şekil 4). Özellikle $A_t / A_c / A_s$ spermatogonyumlar seminifer tübüllerdeki intersitsiyel alanda bulunan kan damarlarına yakın şekilde yerleşmiş olarak bulunmaktadır. Bu spermatogonyumlar A1 spermatogonyuma farklılandıklarında buradan tübülün lümenine doğru göç ederler (Chiarini-Garcia et al. 2001, 2003; Yoshida et al. 2007b).



Modified from Yoshida 2008[©Kyoritsu Shuppan]

Şekil 4: Spermatogonyumların nişini gösteren şematik çizim (Shosei Yoshida 2010). İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.

Spermatogonyal kök hücrelerin nişlerinin hücrel ve moleküler mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen şüphesiz ki hücrelerden salgılanan faktörler, kök hücre ve niş etkileşiminde önemli oynamaktadır. Bu moleküllerden spermatogonyal hücreler dışındaki diğer hücrelerden üretildiği bilinen faktörler ve işlevleri detaylı olarak aşağıda belirtilmektedir.



Şekil 5: Sertoli hücrelerinden ifade edilen GDNF molekülünün spermatogonyal kök hücreler üzerindeki etkisini gösteren şematik çizim (Xin Wu et al. 2009). İlgili kaynaktan modifiye edilmiştir.

GDNF (Glial cell line Derived Neurotrophic Factor)

Bu molekül Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve salınır (Tadokoro et al. 2002). Spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenilemelerini sağlar. Sertoli hücreleri ve spermatogonyal kök hücreler arasında gerçekleşen iletişim şu şekildedir: GDNF reseptörleri olan Ret ve GFR α 1 kök hücre karakterinde olan spermatogonyumlar tarafından ifade

Kaynaklar:

1. Abraham L. Kierszenbaum.; *Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş*. Ankara, Palme yayıncılık, 2006; 530- 564.
2. Yoshida S. Stem cells in mammalian spermatogenesis. *Dev Growth Differ*. 2010 Apr;52(3):311-7.
3. Anthony R. Bellve, J. C. Cavicchia, Clarke F. Millette, Deborah A. O'brien, Y. M. Bhatnagar, Ve Martin Dym. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse :Isolation and Morphological Characterization. *J Cell Biol*. 1977 Jul;74(1):68-85.
4. Wu X, Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW, Carlson CA, Kolon TF, Ginsberg JP, Brinster RL. Prepubertal human spermatogonia and mouse gonocytes share conserved gene expression of germline stem cell regulatory molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Dec 22;106(51):21672-7.
5. De Rooij DG, Mizrak SC. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development*. 2008 Jul; 135 (13):2207-13.
6. Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat Rec*. 1971 Mar;169(3):533-57.
7. Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schöler HR, Suda T. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice small star, filled. *Dev Biol*. 2003 Jun 1;258(1):209-25.
8. Barroca V, Lassalle B, Coureuil M, Louis JP, Le Page F, Testart J, Allemand I, Riou L, Fouchet P. Mouse differentiating spermatogonia can generate germinal stem cells in vivo. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):190-6.
9. Hermann BP, Sukhwani M, Simorangkir DR, Chu T, Plant TM, Orwig KE. Molecular dissection of the male germ cell lineage identifies putative spermatogonial stem cells in rhesus macaques. *Hum Reprod*. 2009 Jul;24(7):1704-16.
10. Payne C, Braun RE. Glial cell line-derived neurotrophic factor maintains a POZ-itive influence on stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 27;103(26):9751-2.

edilir ve Sertoli hücrelerinden ifade edilen GDNF molekülü spermatogonyal kök hücrelerde kendini yenileme ile ilgili genlerin aktivasyonunu, farklılaşma ile ilgili genlerin de baskılanmasını sağlamaktadır (Meng et al. 2000, Tokuda et al.2007, Hofmann 2008, Suzuki et al. 2009, Xin Wu et al. 2009) (Şekil 5).

CSF1 (Colony Stimulating Factor 1)

G-CSF (granülosit- koloni stimüle edici faktör) olarak da bilinmektedir. İntersitisyel ve myoid hücrelerde ifade edilir. Spermatogonyumlarda kök hücre aktivitesini artırır (Kokkinaki et al. 2009, Oatley et al. 2009).

Anlatılan tüm bu bilgilere ek olarak cevap bulmayı bekleyen pek çok soru bulunmaktadır. Bunlardan bazıları şöyledir:

- Tanımlanmış olan ve tanımlanamayan diğer faktörler hücre içi ve hücre dışı mekanizmalarda nasıl etki gösterirler?
- Bu faktörler kök hücrelerin aktivitelerini nasıl kontrol ederler?
- Bu faktörlerin kendi aralarındaki etkileşim nasıldır?

11. Buas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):647-52.
12. Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP. Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat Genet*. 2004 Jun;36(6):653-9.
13. Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL. Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 20;103(25):9524-9.
14. Shen R, Xie T. NANOS: a germline stem cell's Guardian Angel. *J Mol Cell Biol*. 2010 Apr;2(2):76-7.
15. Chiarini-Garcia H, Hornick JR, Griswold MD, Russell LD. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod*. 2001 Oct;65(4):1179-85.
16. Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A, Nishimune Y. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mech Dev*. 2002 Apr;113(1):29-39.
17. Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 2000 Feb 25;287(5457):1489-93.
18. Kostereva N, Hofmann MC. Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reprod Domest Anim*. 2008 Jul;43 Suppl 2:386-92.
19. Hofmann MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Jun 25;288(1-2):95-103.
20. Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, Chan WY, Dym M. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod*. 2009 Apr;80(4):707-17.