

Derleme

Fertilizasyonun Moleküler Temeli

Semin Gedikli*, Elvan Özbek**, Tuba Demirci***

Özet

Fertilizasyon, yumurta ve sperm arasında gerçekleşen, birbirini takip eden birtakım kompleks etkileşimleri içeren oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu olaylar folikülden olgunlaşmış yumurtanın atımı ile başlar, yumurtaya sperm girişinden sonra 2 pronukleusun oluşması ve 1. mitoz bölünmenin gerçekleşmesiyle sona erer. İnsanlarda ve bütün hayvanlarda türün devamlılığı için gerekli olan bu süreç her zaman bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Biz de çalışmamızda fertilizasyon olayının tüm aşamalarında hangi sinyalizasyon ağlarının rol aldığını ve fertilizasyon olayı esnasında meydana gelen olayların mekanizmalarını moleküler düzeyde literatür bilgileri ışığında derlemeyi amaçladık.

Anahtar kelimeler: Fertilizasyon, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu, sinyal proteinleri

İnsanlarda ve diğer memelilerde, germ hücrelerinin olgunlaşarak erkek ve dişi gametlere dönüşmesi olayına gametogenez denir. Bu süreçte erkek ve dişi germ hücrelerinin sitoplazma ve kromozomlarında bir seri değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin iki temel amacı vardır:

- Somatik hücrelerdeki (46,2n) diploid kromozom sayısının gametlerdeki (23,n) haploid sayıya indirgenmesi (Bu olay mayoz bölünme ile gerçekleştirilir).
- Fertilizasyona hazırlık olarak üreme hücrelerinin biçiminin değişmesi (1).

Fertilizasyon olayının temelini teşkil eden oosit-spermatozoon füzyonunun en başından sonuna kadar olan tüm aşamaları ve bu aşamaları düzenleyen proteinlerin, uyarıcı faktörlerin veya hücre-hücre etkileşimlerinin neler olduğu her zaman dikkat çekici konular olmuş ve pek çok bilim adamı tarafından da araştırılmıştır. Bu derlemede fertilizasyonun moleküler temelini araştıran pek çok çalışma bir araya getirilip bu konuyla ilgilenen araştırmacılara faydalı bilgiler sunulmaya çalışılmıştır.

*Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE

**Sakarya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Sakarya, TÜRKİYE

***Nenehatun Kadın Doğum Hastanesi, Erzurum, TÜRKİYE

Yazışma Adresi: Semin Gedikli

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 25240, Erzurum,
TÜRKİYE

Tel: 0537 0110081

Fax: 0442 3151958

E-mail: semingedikli@hotmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 25.04.2012

Makalenin Kabul Tarihi: 27.02.2013

Spermatogenezis

Testislerdeki, seminifer tübüleri çevreleyen epitel hücrelerinin çoğu farklı olgunlaşma aşamasındaki spermatogenik hücreler olarak görev yapmaktadır. Spermatogenezis sürecinde oluşan hücrelerden ilki spermatogonyumlardır. Bu hücreler, geçirdikleri mitoz bölünmelerle yeni spermatogonyumları ve primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler mayoz bölünmenin I. evresini tamamlayarak sekonder spermatositleri, onlar da II. evrenin sonunda haploid hücreler olan spermatidleri oluştururlar. Ardından bu haploid hücreler spermiyogenezis ile sitoplazmalarının çoğunu atarak, organellerini yeniden düzenleyerek ve flagellalarını oluşturarak, morfolojik olarak olgun sperm yani spermatozoa şekline dönüşürler (1-4).

Tamamen hipotalamik-pituiter-gonadal eksen tarafından düzenlenen bir süreç olan spermatogeneziste (4, 5) luteinize edici hormon (luteinizing hormone-LH) ve folikül stimüle edici hormon (follicle-stimulating hormone-FSH) önemli rol oynamaktadır. Germ hücrelerinde LH ve FSH reseptörleri bulunmamasına karşın Sertoli hücrelerinden germ hücrelerine doğru hormonal sinyalleri taşıyan oldukça yoğun bir iletişim ağı vardır. Bu hormonlardan LH, Leydig hücrelerinden testosteron sentezlenmesini uyarırken, Sertoli hücre yüzeylerindeki reseptörlerine bağlanan FSH ise prepubertal gelişim boyunca Sertoli hücrelerinin proliferasyonu için gereklidir. Fakat FSH, spermatogenezis için mutlaka olması gereken bir hormon değildir. Çünkü FSH reseptörlerinde ya da FSH β alt birimlerinde mutasyon olan farelerde de fertilizasyonun gerçekleştiği görülmüştür (4).

Spermatogenezisin düzenlenmesinde önemli rol oynayan faktörlerden biri de retinoidlerdir. Yapılan araştırmalarda vitamin A eksikliği olan kemiricilerde infertilitenin geliştiği gözlenmiştir. Germ hücrelerinin farklılaşmalarında ve yaşamlarını devam ettirmelerinde TGF- β (Transforming growth factor- β) süper ailesine bağlı olan kemik morfogenetik proteinlerin (Bone morphogenetic proteins-BMPs), aktivinlerin, inhibitörlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin de rol oynadığı tespit edilmiştir. Primordial germ hücrelerinin gonadal kabarıklığa göç etmesinde ve yaşamlarını sürdürmelerinde rol oynayan BMP4 geninde hedeflenen bir mutasyonun primordial germ hücre oluşumunda aksaklıklara yol açtığı gösterilmiştir (6).

İnsan semeninde prostazom denen prostatik orijinli küçük veziküller vardır. Bu veziküllerin içinde bol miktarda kolesterol, ayrıca enzimatik ya da daha başka aktiviteleri olan pek çok protein bulunmaktadır. Semen sıvılaştırılması, spermatozoonların motilitesi, antibakteriyel aktiviteler ve immunolojik fonksiyonların çoğu prostazomlarla ilişkilidir. Prostazomlar hareketsiz olduklarından ve dişi genital kanalın üst kısımlarına kadar spermleri takip edemediklerinden, sperm-prostazom etkileşimi vagina ile sınırlıdır. Spermin prostazomla kaynaşması sonucu kolesterol içeriği artar ve sperm sitoplazmik kalsiyumunda bir patlama olur. Kalsiyum artışı sperm motilitesini artırırken, kolesterol artışı spermi dekapasite ederek spermin zamansız aktivasyonunu önler (7).

Oogenezis

Oogonyumların olgun oositlere dönüştüğü bir süreç olan oogenezis, embriyonik hayatta başlar, duraklar ve puberte ile menopoz arasında periyodik olarak tamamlanır (8). Doğumdan önce oositlerin hepsi primer oosit halindedir ve ovarian kortekste yerleşim gösterirler. Tek katlı yassı, foliküler hücreler tarafından kuşatılan bu oositlere, primordial folikül adı verilmektedir (1, 9). Foliküler gelişme ve farklılaşma endokrin hormonlar, ovaryum içi düzenleyiciler ve hücre-hücre etkileşimleri tarafından düzenlenen ve birbirini takip eden olaylar dizisidir. Dominant folikülün belirlenmesinde dengelenmiş hücre çoğalması ve apoptozis önemli rol oynamaktadır. Primordial folikülün oluşumu, primordial germ hücrelerinin genital kabarıklığa göç etmesinden ve oradaki somatik hücrelerle belirli bir süre temasından sonra başlatılmaktadır. Primordial germ hücrelerinin göç ederek gonadal kabarıklığa ulaşabilmesi için primordial germ hücrelerinin ekstrasellüler matriks proteinleriyle ve hücrel bir takım elemanlarla etkileşimi, ayrıca gelişen

gonadlar tarafından çekilmesi gibi bir takım sinyallere ihtiyacı vardır. LH tarafından kontrol edilen kumulus-oosit kompleksinin olgunlaşması, granüloza hücrelerinde mitojen aktive edici protein kinazın (mitogen-activated protein kinase-MAP Kinase) uyarıcı etkisiyle olur (8). Primordial foliküllerin bir araya gelmesini ve gelişmesini lokal olarak üretilen parakrin ve otokrin büyüme faktörleri sağlamaktadır. Progesteron gibi endokrin faktörlerin foliküler toplanmayı sağladığı da tespit edilmiştir. Kit ligand (KL), lösemi inhibitör faktör (leukemia inhibitor factor-LIF), kemik morfogenetik proteinler (BMP's), keratinosit büyüme faktörü (keratinocyte growth factor-KGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor-bFGF) gibi lokal olarak üretilen büyüme faktörleri, primordial folikülün, primer folikül haline dönüşümüne yardımcı olmaktadır. Preantral ve antral foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından üretilen müllerian inhibe edici madde ise (Mullerian inhibiting substance, MIS-AMH) primordial-primer folikül dönüşümünü engelleyebilmektedir (10, 11).

Overdeki somatik hücrelerden ve gelişmekte olan oositlerden salınan çoğu TGF- β süper ailesine ait büyüme faktörlerindeki artış, evreyle ilişkili bir tutum sergiler ve folikülogenezisin intraovariyal düzenleyicisi olarak görev yapar. BMP-4 ve BMP-7 ovarian stromal hücrelerden ve/veya teka hücrelerinden salınmaktadır. Ayrıca primordial folikülden primer foliküle dönüşümü düzenledikleri de son zamanlarda tespit edilmiştir. TGF- β süper ailesinin üyelerinden olan GDF-9 (growth and differentiation factor-9) ve GDF-9B olarak da bilinen BMP-15 çok erken dönemde oosite spesifik bir halde eksprese edilir ve primer evreden sonra folikül büyümesinin devam etmesinde önemli rol oynar. GDF-9 geninde mutasyon olan farelerde folikül gelişiminin primer evrede kaldığı da tespit edilmiştir. Foliküler gelişimin daha sonraki aşamaları üzerine yapılan çalışmalarda, granüloza hücrelerinden kaynaklanan aktivin, BMP-2, BMP-5 ve BMP-6'nın, teka hücrelerinden kaynaklanan BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'nin ve oositten kaynaklanan BMP-6'nın granüloza hücre proliferasyonu, folikülün yaşamını sürdürmesi ve prematüre lüteinizasyon ve/veya atrezinin önlenmesi gibi durumlar üzerine önemli rol oynadıkları gösterilmiştir. Aynı zamanda aktivin, TGF- β ve çeşitli BMP proteinleri küçük ve orta boy antral foliküllerde LH'a bağlı androjen üretimini azaltmak için teka hücreleri üzerine parakrin etkiler de gösterebilir. İntrafoliküler aktivinlerde, GDF-9, AMH ve çeşitli BMP proteinlerindeki değişiklikler granüloza

hücrelerinde dominant folikülün seçilmesine FSH ve IGF'ye (Insulin-like growth factor) bağlı sinyal yolları aracılığıyla katkıda bulunur. Aktivin aynı zamanda oositin olgunlaşmasında ve gelişimsel yeteneği kazanmasında pozitif bir rol de oynamaktadır. Erken foliküler evrede, folikül gelişimi üzerine otokrin/parakrin rol oynayan, tip-I ve tip-II aktivin reseptörleri, aktivin βA ve βB subünitleri ve aktivin bağlayan protein olan follistatin tespit edilmiştir (11-15). Tip-I ve tip-II aktivin reseptörleri teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oosit tarafından eksprese edilirken, aktivin βA - βB subünitleri ve follistatin granüloza hücreleri tarafından eksprese edilir. Granüloza hücreleri folikül gelişiminin erken döneminde inhibin ve aktivin sentezleme kapasitesine sahiptir (11, 14, 16).

Bir kız çocuğu doğduğunda her iki overinde yaklaşık 400 bin folikül vardır ve bu foliküllerdeki primer oositler puberteye kadar I. mayoz bölünmenin profaz safhasında beklemektedir. Puberteyle birlikte siklik olarak her ay çeşitli sayıda primer folikül gelişerek etraflarındaki tek katlı kübik epitel hücreleri çoğalmaya ve çok katlı granüloza hücrelerini meydana getirmeye başlar. Daha sonra folikül hücreleri arasında folikül sıvısı birikir ve böylece antrum oluşur. Bu safhadaki folikül artık sekonder foliküldür (1, 9).

Hemen II. mayoz bölünmeye giren sekonder oosit ovulasyondan 3 saat önce metafaz II evresinde duraklar. Bu duraklama oosit fertilize oluncaya kadar devam eder, fertilizasyon gerçekleşmediği takdirde ovulasyondan 24 saat sonra oosit dejenere olur ve mens kanyıyla dışarı atılır. Fertilizasyonun olması halinde ise sekonder oosit II. mayoz bölünmeyi tamamlar (3). Bu duraklamayı sağlayan oositin salınan sitostatik faktör (Cytostatic Factor, CSF) aktivitesidir (17). CSF, fertilizasyon meydana gelinceye kadar mayotik çıkışı ve siklin B destrüksiyonunu önleyerek anafaz başlatıcı kompleks/siklozomun (anaphase-promoting complex/cyclosome-APC/C) ubiquitin ligaz aktivitesini antagonize eder. Devam eden siklin B sentezi APC/C-aracılı siklin B yıkımının sınırlı miktarıyla dengelenir. Böylece siklin B/siklin bağımlı protein kinaz (Cdc2) aktivitesi sabit bir durumda kalır (18). Sitostatik faktör siklinin yıkımı aracılığıyla olan APC/C'yi inhibe ederek sekonder oositin metafaz II de beklemesini sağlar (19). Olgunlaşmayı sağlayıcı faktör (Maturation-Promoting Factor, MPF; CDK1/cyclin B) somatik hücreleri mitoz, yumurtaları mayoz bölünmeye sokar. Aktivitesi CDK1 fosforilasyonu ve siklin B'nin yıkımıyla kontrol edilmektedir. Sitostatik faktörle indüklenen metafaz evresindeki duraklama süreci,

sadece fertilize sperm tarafından başlatılan Ca^{+2} artışıyla ve siklin B'nin yıkılması sonucuyla durdurulur. Son zamanlarda yumurtaya özgü bir protein olduğu tespit edilen Emi2'nin (Early mitotic inhibitor 2 ya da Early mitotic inhibitor 1-related protein 1; Erp1) yıkımının Ca^{+2} a bağımlı olduğu ve muhtemelen APC/C' nin inhibisyonuyla CSF arrestini gerçekleştirme ve sürdürme fonksiyonlarını gördüğü de tahmin edilmektedir (17).

Koitusla vaginaya gelen sperm serviks geçerek (yaklaşık %1) dişi genital kanal içine girerler ve burada saatlerce canlı kalabilirler. Sperm serviksten fallop tüplerine olan bu yolculuğu primer olarak kendi hareketleriyle tamamlarlar. Epitel hücrelerinin silleri de dalgalanma hareketi yaparak sıvıları iter ve böylece spermin hareketine yardım etmiş olurlar (sillerin hareketi sperm hareketinin aksi yönünde dışa doğrudur). Bu yolculuk yaklaşık 2 ile 7 saat kadar sürer, sperm fallop tüplerinin isthmus kısmına vardıklarında hareketleri yavaşlar ve hızları düşer. Ovulasyon sırasında atılan oositin etrafındaki kumulus hücrelerinden salgılanan kemotaktik maddelerin etkisiyle sperm yeniden hareketlenerek ampullaya doğru ilerlemeye devam ederler. Ejakulat içindeki milyonlarca sperm yalnızca birkaç yüz tanesi fertilizasyon bölgesine ulaşır ve korona radyata ile çevrili sekonder oosit ile karşılaşır (3). Memelilerde fertilizasyon, spermin kumulus ooforus, zona pellusida ve oosit plazma membranı ile birbirini izleyen etkileşimlere girmesi sonucu meydana gelir. İnsan spermindeki proteazom aktivitesi fertilizasyon olayında önemli rol oynar. İntakt sperm ve sperm ekstreleri proteazom aktivitesine sahiptir. Bu aktivite spesifik proteazom inhibitörü olan klasto-beta laktasistin β -lakton tarafından inhibe edilebilir. Klasto-beta laktasistin β -lakton sperm-zona pellusida bağlanmasını inhibe etmez, zona pellusida ve progesteron tarafından indüklenen akrozom reaksiyonunu inhibe eder. Aynı zamanda progesteron tarafından uyarılan Ca^{+2} akışının devamlı fazını da bloke eder (20).

Fertilizasyon esnasında gametlerin birbirini tanıması önemli bir olaydır. Bu sıklıkla türe sınırlı ve muhtemelen bazı zamanlar da tamamen türe spesifik olan bir olaydır. Bazı memelilerde zona pellusida interspesifik fertilizasyona büyük bir bariyer oluşturur. Bunu sperm bağlanmasını ya da akrozom reaksiyonunun uyarılmasını önleyerek yapmaktadır (21, 22). Bu kısıtlamayı zona pellusida glikoproteinlerini tanıyan ve bağlayan sperm yüzey proteinleri (zona pellusida-binding proteins) gerçekleştirmektedir. Daha spesifik olarak ise zona pellusidanın sperm reseptör aktivitesinin ZP3'e (zona pellusida

glycoprotein 3) dayandığı düşünülmektedir (21, 23). Sperm ve ZP3 arasındaki etkileşimin, ZP3'un spesifik O-bağlı oligosakkarit zincirlerine bağlanmasıyla meydana geldiği de gösterilmiştir (21, 24, 25). Fertilizasyon için gerekli olan iyon kanalları ve taşıyıcıları, sperm-yumurta sinyalizasyonunda ve çevreyi algulamalarında anahtar element olarak görev yapmaktadır. Yumurtanın dış zarlarına ait bileşenler ve dıştan gelen işaretler, spermın iyon geçirgenliğini ve davranışını etkilemektedir (26).

Akrozom reaksiyonu ve kapasitasyon süreçlerinin gerçekleşmesinde moleküler mekanizmalar ve sinyalizasyon yolları aracılık etmektedir. Bunlar intrasellüler Ca^{+2} ve diğer iyonların modifikasyonu, lipit transferi ve sperm plazma membranındaki fosfolipidlerin yeniden yapılanması gibi olaylardır. Ca^{+2} akışıyla eşzamanlı olarak ya da hemen ardından adenilat siklaz (cAMP) aktive olur ve bu durum cAMP bağımlı kinaz, protein fosforilasyonunun ve cAMP aktivasyon konsantrasyonunun artması ile sonuçlanır (27).

Kapasitasyon

Kapasitasyon, spermın fertilizasyon yeteneği kazanabilmesi için dışı genital kanalı içinde geçirdiği dönemdir. Bu dönem insanda yaklaşık 7 saat sürer ve bu olayın büyük bir kısmı fallop tüpleri içinde gerçekleşir (3). Kapasitasyon olayında serin-treonin fosforilasyonunun rolü tam olarak bilinmemekle birlikte, kapasitasyon ve tirozin fosforilasyonunun artışı arasında bir korelasyon olduğu bilinmektedir. Kapasitasyon, sperme kolesterol girişi ile bağlantılı olan prolin kontrolündeki fosforilasyonun artışıyla bağlantılıdır. Prolin tarafından gerçekleştirilen fosforilasyon (Proline-directed phosphorylation) hücre çoğalması ve farklılaşması gibi pek çok hücrel olaydaki fosforilasyonun en büyük düzenleyicilerinden biridir (28).

Kapasitasyon esnasında endometriyal hücrelerden sekrete edilen interlökin-6 (IL-6) spermın fertilizasyon yeteneğini olumlu yönde etkiler, kapasitasyonu artırır. IL-6 etkilerini muhtemelen en çok, spermde bulunan IL-6Ra reseptörüne bağlanmak suretiyle meydana getirir (29).

Bazı kapasitasyon önleyici faktörler erkek genital kanallarında ve dışı genital kanallarında ilerleyen spermın erkenden kapasitasyon yeteneği kazanmasını önlerler. Kapasitasyon esnasında bu faktörler spermden uzaklaştırılır ve spermmler ampullaya ulaştığında fertilizasyon yeteneğini kazanmış olurlar (30). Kolesterol sperm motilitesini azaltmakta ve kapasitasyonun başlamasına engel olmaktadır. Bu nedenle

kapasitasyonun başlatılmasındaki en önemli etken sperm membranından kolesterolün bağlanarak dışarı alınmasıdır (30, 31).

Kalsiyum, kinaz, cAMP, G-protein ve redoks bağımlı bir olay olan kapasitasyonun (30, 32) gerçekleşebilmesi için ortamda kalsiyum, bikarbonat, serum albumin, glikoz ve enerji kaynakları bulunmalıdır. Kapasitasyon olayında ikinci mesajcı olarak cAMP rol oynar. Protein kinaz A, hücre içinde gerçekleşen kapasitasyondan sorumludur ve inhibisyonu da kapasitasyonu bloke eder. Kapasitasyon gerçekleşirken meydana gelen diğer bir olay tirozin fosforilasyonunun artmasıdır. cAMP bu fosforilasyonda rol alan önemli bir enzimdir. cAMP-bağımlı sinyal mekanizması ve ROS (serbest oksijen türevleri) ürünleri tirozin fosforilasyonunu başlatır. Bu sırada Ca^{+2} artışı da gözlenir (30, 33, 34). Tirozin ile fosforile edilen proteinler insan spermde ZP3 için reseptör görevi yapmaktadırlar (35). Bu proteinler akrozomda bulunur ve tirozin kinaz aktivasyonu gösterirler. Zona pellusidadaki proteinler ile temas ettiğinde tirozin kinaz aktive olur, tirozin fosforillenir ve fosfotirozin oluşur. Sperm membranında bulunan AKAP (A-kinase anchor protein) adı verilen diğer bir protein de kinaz aktivitesi gösterir ve zona pellusida proteinleri için reseptör görevi görür (30, 34). Spermle dışı üreme kanallarını döşeyen epitel hücreleri arasında bir etkileşim olur, spermın akrozomal bölgesini örten plazma membranı üzerindeki glikoprotein kılıf ve seminal plazma proteinleri ortadan kaldırılır. Ancak kapasitasyonunu tamamlayan bir sperm korona radyata hücreleri arasından geçerek akrozom reaksiyonuna girebilir (3).

Akrozom Reaksiyonu

Zona pellusida oogenezis esnasında oosit ve folikül hücreleri arasındaki ilişkiyi destekler, gelişimleri boyunca oositleri, yumurtaları ve embriyoları korur. Ayrıca fertilizasyon anında ve sonrasında ovulasyonla atılmış yumurta ve sperm arasındaki etkileşimi de kontrol eder. Zona pellusidası eksik bir yumurtaya sahip dişiler infertilirdir. Fertilizasyon sürecinde zona pellusidanın fonksiyonları, üzerindeki glikoproteinler tarafından gerçekleştirilir (36). Bu glikoproteinler, glikozilasyon ve sülfatasyonu kapsayan yoğun post-translasyonel modifikasyonlara bağlı olarak heterojenite gösteren ZP1, ZP2 ve ZP3'tür (37). Bu glikoproteinler sperm reseptörü olarak fonksiyon görürler. ZP3 molekülünün sperm reseptörü olarak fonksiyon görmesi fertilizasyon olayının birinci basamağında anahtar rol oynar. Sperm

oosite bağlandıktan sonra ZP3, sperm akrozom reaksiyonunu tetikler (38). ZP2 sadece akrozom reaksiyonunun indüklenmesinden sonra sperm bağlayan sekonder sperm reseptörü olarak fonksiyon görür (37, 39).

Spermin baş kısmının 2/3'lük bölümünü kaplayan akrozomun içinde akrozim ve hyaluronidaz enzimleri vardır. Kapasitasyon yeteneğini kazanan spermin zona pellusidaya penetre olabilmesi için akrozom reaksiyonuna uğraması gerekir. Sperm zona pellusidaya bağlandığında spermin başında bulunan spesifik reseptörler aktive olur ve ekzositoz gerçekleşir. Sperm plazma membranı ile dış akrozomal membran birleşince akrozom içeriği dışarı çıkar. Akrozom reaksiyonunu geçirmeyen bir sperm zona pellusida veya oolemmaya bağlanamaz (40).

Somatik hücrelerde fosfoinozitol-3 kinaz'ın (phosphoinositide 3-kinase-PI 3-kinase) aktivasyonu hem reseptör tirozin kinaz (RTK) hem de G-proteinleri ile etkileşime girmesi sonucu gerçekleşir. G-proteinler, RTK, inozitol fosfolipidler ve fosfoinozitol 3-kinaz insan sperm akrozom reaksiyonunda yer alırlar. Fosfoinozitol 3-kinazın selektif bir inhibitörü olan Wortmannin'in insan sperm akrozom reaksiyonunu büyük ölçüde inhibe ettiği de gösterilmiştir (41).

Sperm akrozom reaksiyonu, spermin yumurta ile kaynaşması için ön şarttır. Tamamlanmış akrozom reaksiyonu akrozomal vezikülün ekzositozunu ve akrozomal aktinin polimerizasyonunu içerir. Deniz kestanelerinde yapılan bir çalışmada, yumurta jelinin fukoz sülfat polimerinin (FSP), Ca^{2+} 'un iki farklı kanal içinden içeri girmesini uyardığı ve tamamlanmış akrozom reaksiyonunu indüklediği gösterilmiştir. İkinci kanal, depo kontrollü (store-operated) bir kanal olup akrozomal vezikülün ekzositozunu başlatır (42). Akrozom reaksiyonu, tripsin benzeri maddeleri ve akrozini de içeren bazı enzimlerin salgılanmasıyla en üst noktaya ulaşır (3). Ancak akrozom reaksiyonunu tamamlayan bir sperm zona pellusidayı geçebilir (43). Anjiyotensin dönüştürücü enzim (Angiotensin converting enzyme-ACE) spermin akrozomunda bulunur ve muhtemelen akrozom reaksiyonunu ve fertilizasyonu indükler. Kapasitasyonunu tamamlamış olan sperm korona radyata ile temas ettiklerinde akrozomda delinmeler olur. Spermin plazma membranı ile akrozomun dış membranı pek çok noktadan kaynaşır. Bu kaynaşma noktalarında sperm plazma membranında delinmeler olur ve akrozom içindeki enzimler dışarıya verilir. Bu enzimlerden; hyaluronidaz spermin korona radyataya penetrasyonunu, tripsin benzeri

maddeler zona pellusidanın sindirimini ve zona lizin ise spermin zona pellusidayı geçmesini kolaylaştırır. (44). Son zamanlarda spermin akrozomal kılıfı üzerinde sperm akrozom antijeni-1 (SAA-1) adı verilen bir antijen tespit edilmiştir. Monoklonal antikör tekniği kullanılarak analiz edilen bu antijenin akrozom reaksiyonunda önemli rolü olduğu ortaya konmuştur. İnfertil hastalarda, sperm immünfloresan veya RIA ile analiz edildiğinde sperm SAA-1 değeri fertillere göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur. SAA-1 değerindeki düşüklük ile sperm morfolojisi arasında ise bir ilişki gösterilememiştir (45).

Oosit ve Sperm Hücre Membranlarının Birleşmesi

Spermin üzerinde bulunan bir dimerik glikoprotein olan fertilin oosit plazma membranı üzerindeki bir protein ile bağlanır ve sperm oosit birleşmesini indükleyebilir (46).

Fertilizasyondan sonra polispermiyi önleyen iki önemli değişiklik olur. İlki yumurta plazma membranının hızlı elektriksel depolarizasyonu, ikincisi ise zona pellusidanın biyokimyasal modifikasyonlarıdır. ZP2 ve ZP3 ün her ikisi de zona reaksiyonu aracılığıyla değişikliğe uğrarlar. ZP2, proteolitik bir yarıma geçirir ve ZP3 akrozom reaksiyonunu indüklemeye yeteneğini ve sperm reseptör aktivitesini kaybeder (39).

Fertilizasyondan önce sekonder oosit, 2. mayoz bölünmenin metafazında sakin bir dönemdedir. Sperm zona pellusidaya temas eder etmez hızla penetre olur, spermin başı oosite temas eder ve zona pellusidanın geçirgenliği değişir, diğer spermelere karşı impermeabl olur. Bu olaya zona reaksiyonu denir (44). Bu esnada yumurtada ise yumurta aktivasyonu denen bir dizi metabolik ve fiziksel değişiklik olur. Bunların en başta geleni intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonunun artması ve 2. mayoz bölünmenin tamamlanmasıdır (46). Oositin üzerinde bulunan integrinler ve spermin üzerinde bulunan disintegrinler birbirleriyle bağlanırlar. Spermin oolemmaya temasıyla Ca^{+2} artışı olur. Kortikal granüller aktif hale gelir ve bu granüllerden lizozomal enzimler perivitellin aralığa salınır, böylece zona pellusida kalınlaşır. Meydana gelen membran depolarizasyonu hızlı blok oluşur ve başka sperm geçişi engellenmiş olur (47, 48).

Perivitellin aralığa çıkan enzimler zona pellusida üzerindeki sperm reseptörlerini sindirir ve zona pellusidanın diğer spermelere geçirgenliğini engeller. Başka spermeler de zona pellusidaya gömülmüş olsa bile bu sayede tek bir sperm zona pellusidayı geçip oositin içine

girebilir (47). Bu aşamada bölünmenin metafaz safhasında bekleyen oosit sitoplazması, spermin girmesiyle aktive olur ve sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Böylece olgun oosit yani ovum ve ikinci polar cisimcik oluşur. Bu andan itibaren ovumun nükleusuna dışı pronükleus adı verilir (44).

Oosit sitoplazması içine giren spermin nükleer içeriği dağılır ve kromatin hızlı bir şekilde sıkıca paketlenmiş durumdan gevşek bir duruma geçer. Spermin kuyruğu ve mitokondrisi dejenere olur. Spermin (ve yumurtanın her ikisinin) kromatininin nükleer membran içinde küçülmesiyle erkek pronükleus oluşur. Pronükleusların büyümesi sırasında DNA sayıları replike olur (46).

Molecular Basis of Fertilization

Abstract

Fertilization, a complex sequence of interactions between the spermatozoon and the egg, is a highly complicated process. These events start with the release of a mature egg from the follicle, continue with the appearance of the two pronuclei after sperm entry, and are completed with the first mitotic divisions. This process, required for permanence of speciation in humans and all animals, has always attracted the attention of scientists. In our study we aimed to compile which signaling networks took place in each stage of fertilization and the mechanism of the actions happened at molecular level during the fertilizations in the light of literature information.

Key words: Fertilization, capacitation, acrosome reaction, signalling proteins

Kaynaklar

- Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human, Clinically Oriented Embryology. 8th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2009:14-40.
- Elder K, Dale B. In Vitro Fertilization. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge (UK), 2000:22.
- Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviri). Ankara: Palme Yayıncılık, 2005:7-38.
- Hogeveen KN, Sassone-Corsi P. Regulation of gene expression in post-meiotic male germ cells: CREM-signalling pathways and male fertility. Hum Fertil (Camb) 2006; 9(2):73-79.
- Xia W, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. Cytokines and junction restructuring during spermatogenesis--a lesson to learn from the testis. Cytokine Growth Factor Rev 2005; 16(4-5):469-493.
- Baleato RM, Aitken RJ, Roman SD. Vitamin A regulation of BMP4 expression in the male germ line. Dev Biol 2005; 286(1):78-90.
- Arienti G, Carlini E, Saccardi C, Palmerini CA. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. J Cell Mol Med 2004; 8(1):77-84.
- Liu YX. Interaction and signal transduction between oocyte and somatic cells in the ovary. Front Biosci 2007; 12:2782-2796.
- Ross Mh, Pawlina W, Kaye GI. Histology A Text and Atlas. Baltimore. Lippincott Williams & Wilkins, 2006:784-785.
- Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update 2005; 11(5):461-471
- Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction 2006; 132(2):191-206.
- Drummond AE, Le MT, Ethier JF, Dyson M, Findlay JK. Expression and localization of activin receptors, Smads, and beta glycan to the postnatal rat ovary. Endocrinology 2002; 143(4):1423-1433.
- Pangas SA, Rademaker AW, Fishman DA, Woodruff TK. Localization of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(6):2644-2657.
- McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, et al. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. Mol Cell Endocrinol 2000; 163(1-2):11-20.
- Rabinovici J, Goldsmith PC, Roberts VJ, Vaughan J, Vale W, Jaffe RB. Localization and secretion of inhibin/activin subunits in the human and subhuman primate fetal gonads. J Clin Endocrinol Metab 1991; 73(5):1141-1149.
- Montgomery GW, Galloway SM, Davis GH, McNatty KP. Genes controlling ovulation rate in sheep. Reproduction 2001; 121(6):843-852.
- Madgwick S, Jones KT. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. Cell Div 2007; 2:4.
- Hansen DV, Pomerening JR, Summers MK, Miller JJ, Ferrell JE Jr, Jackson PK. Emi2 at the crossroads: where CSF meets MPF. Cell Cycle 2007; 6(6):732-738.
- Tung JJ, Padmanabhan K, Hansen DV, Richter JD, Jackson PK. Translational unmasking of Emi2 directs cytoskeletal arrest in meiosis II. Cell Cycle 2007; 6(6):725-731.
- Morales P, Kong M, Pizarro E, Pasten C. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. Hum Reprod 2003; 18(5):1010-1017.

21. Vieira A, Miller DJ. Gamete interaction: is it species-specific? *Mol Reprod Dev* 2006; 73(11):1422-1429.
22. Wassarman PM. Sperm receptors and fertilization in mammals. *Mt Sinai J Med*. 2002; 69(3):148-155.
23. Mortillo S, Wassarman PM. Differential binding of gold-labeled zona pellucida glycoproteins mZP2 and mZP3 to mouse sperm membrane compartments. *Development* 1991; 113(1):141-149.
24. Johnston DS, Wright WW, Shaper JH, Hokke CH, Van den Eijnden DH, Joziase DH. Murine sperm-zona binding, a fucosyl residue is required for a high affinity sperm-binding ligand. A second site on sperm binds a nonfucosylated, beta-galactosyl-capped oligosaccharide. *J Biol Chem* 1998; 273(4):1888-1895.
25. Litscher ES, Juntunen K, Seppo A, Penttilä L, Niemelä R, Renkonen O, et al. Oligosaccharide constructs with defined structures that inhibit binding of mouse sperm to unfertilized eggs in vitro. *Biochemistry* 1995; 34(14):4662-4669.
26. Darszon A, Beltran C, Felix R, Nishigaki T, Trevino CL. Ion transport in sperm signaling. *Dev Biol* 2001; 240(1):1-14.
27. Guraya SS. Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Int Rev Cytol* 2000; 199:1-64.
28. Jha KN, Salicioni AM, Arcelay E, Chertihin O, Kumari S, Herr JC, et al. Evidence for the involvement of proline-directed serine/threonine phosphorylation in sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 2006; 12(12):781-789.
29. Laflamme J, Akoum A, Leclerc P. Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6*. *Mol Hum Reprod* 2005; 11(2):141-150.
30. Androloji. Erkek Sağlığı. Üreme Sağlığı-Cinsel Fonksiyon Bozuklukları. http://www.androloji.info/kapasitasyon_patofizyoloji.php
31. Zarintash RJ, Cross NL. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. *Biol Reprod* 1996; 55(1):19-24.
32. Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Krausz C, Forti G. Human sperm activation during capacitation and acrosome reaction: Role of calcium, protein phosphorylation and lipid remodelling pathways. *Front Biosci* 1996; 15(1):189-205.
33. Leclerc P, de Lamirande E, Gagnon C. Interaction between Ca²⁺, cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. *J Androl* 1998; 19(4):434-443.
34. Mandal A, Naaby-Hansen S, Wolkowicz MJ, Klotz K, Shetty J, Retief JD, et al. FSP95, a testis-specific 95-kilodalton fibrous sheath antigen that undergoes tyrosine phosphorylation in capacitated human spermatozoa. *Biol Reprod* 1999; 61(5):1184-1197.
35. Burks DJ, Carballada R, Moore HD, Saling PM. Interaction of a tyrosine kinase from human sperm with the zona pellucida at fertilization. *Science* 1995; 269(5220):83-86.
36. Wassarman P, Chen J, Cohen N, Litscher E, Liu C, Qi H, et al. Structure and function of the mammalian egg zona pellucida. *J Exp Zool* 1999; 285(3):251-258.
37. Prasad SV, Skinner SM, Carino C, Wang N, Cartwright J, Dunbar BS. Structure and function of the proteins of the mammalian Zona pellucida. *Cells Tissues Organs* 2000; 166(2):148-164.
38. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Updated: 1 March 2013. <http://omim.org/entry/182889>
39. OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Updated: 1 March 2013. <http://omim.org/entry/182888>
40. Zulfikaroğlu G, Özgür H, Polaturkey S. Molecular Aspects of Capacitation. *Archives Medical Review Journal* 2010; 19(1): 12-24.
41. Fisher HM, Brewis IA, Barratt CLR, Cooke ID, Moore HD. Phosphoinositide 3-kinase is involved in the induction of the human sperm acrosome reaction downstream of tyrosine phosphorylation. *Mol Hum Reprod* 1998; 4(9):849-855.
42. Hirohashi N, Vacquier VD. Store-operated calcium channels trigger exocytosis of the sea urchin sperm acrosomal vesicle. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(2):285-292.
43. Androloji. Erkek Sağlığı. Üreme Sağlığı-Cinsel Fonksiyon Bozuklukları. <http://www.Androloji.İnfo/Kruger.Php>
44. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dönem I Hücre Bilimleri Ders Kurulu 3. Genel Embriyoloji Ders Notları. Prof. Dr. Ali OTLU. <http://www.belgeler.com/blg/2su5/genel-embriyoloji-ders-notlari>
45. Androloji. Erkek Sağlığı. Üreme Sağlığı-Cinsel Fonksiyon Bozuklukları. http://www.androloji.info/membran_yapisi_fertilizasyon.php
46. Pathophysiology of the Reproductive System. Pregnancy and Embryology in Mammals. Fertilization and Early Embryonic Development: Introduction and Index. Fertilization. Last updated on April 1, 2000 <http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/fert/fert.html>

Gedikli ve ark.

47. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı. Sunumlar ve Ders Notları. Güncelleme: 15.02.2012 <http://histemb.medicine.ankara.edu.tr/Fertilizasyon-Blastosist.pdf>
48. Bebitođlu FG. Döllenme ve döllenme anomalilerinin yardımla üreme tekniklerindeki önemi. Uluslararası İnsan Bilimleri Dergisi 29.09.2004. www.insanbilimleri.com/ojs/index.php/uib/article/download/172/172