

## Spermatogenesis Süreçlerinin Düzenlenmesinde GDNF'nin ( gliyal hücre türevi nörotropik factor ) Rolü

Ayhan YILMAZ<sup>1\*</sup>      Bünyamin HAKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bitlis Eren Üniversitesi Hizan Meslek Yüksekokulu, 13000, Bitlis  
<sup>2</sup>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, 65080, Van  
\*Yazışma yazarı: ayilmaz@yyu.edu.tr.

Geliş tarihi:23.03.2010, Yayına kabul tarihi:05.05.2010

**Özet:** Spermatogenesis pek çok faktörün direk/dolaylı etkilediği ve hayat boyu devam eden karmaşık bir süreçtir. Spermatogonial kök hücre transplantasyonu ve spermatogenesisin in-vitro kültüründeki teknik gelişmeler bu faktörler kombinasyonunun anlaşılması yönünde özgün deneme kurgularının oluşturulmasına olanak tanımaktadır. Bu bağlamda spermatogenesisinde önemli bir büyüme faktörü olarak GDNF (gliyal hücre türevi nörotropik faktör), spermatogonial kök hücrelerinin kendilerini yenileme ve farklılaşmasında belirleyici rol oynamaktadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda GDNF'in spermatogenesisin düzenlenmesindeki bu eşsiz rolü apaçık gösterilmekte ve spermatogoninin kendini yenileme ve farklılaşma yönündeki aktivitesinin GDNF karmaşık işaretsel ağı içinde gerçekleştiği belirtilmektedir. Sonuç olarak çiftlik hayvanlarında döl verimi moleküler düzeyde tanımlanabilmekte ve buna ilişkin problemlerin giderilmesi yönünde etkili yöntemlerin geliştirilmesi sağlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** GDNF, spermatogonia, GDNF reseptör, sertoli hücresi

### The Role of the GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotropic Factor) in Regulating of the Spermatogenesis Processes

**Abstracts:** Spermatogenesis is a complex and continuing process in which many factor plays a role directly or indirectly. Transplantation of the spermatogonial stem cells and its culture as in-vitro offers an immense potential to set up original experiment designs concerning with understanding of these factor combinations in spermatogenesis mechanism. As an important factor in spermatogenesis, GDNF (Glial Cell Line-Derived Neurotropic Factor) plays a vital role in renewal and differentiation of the spermatogonial stem cells. So far, studies done have clearly showed that GDNF plays an important role in regulating of the spermatogenesis and determines renewal or differentiation of the spermatogonial stem cells, maintaining spermatogonia population. As a result, spermatogenesis has been defined in molecular level and effective methods to study the problems of the infertilities in domesticated animals iw being developed.

**Key Words:** GDNF, spermatogonia, GDNF receptor, sertoli cell

#### Giriş

Çiftlik hayvanlarında üreme diğer verimlerin dönemsel yenilenmesinde temel bir verim özelliğidir. Özellikle erkeklerde üreme bağlamındaki problemler ciddi ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Döl veriminin seleksiyonla ıslahı noktasında bir generasyonda sağlanan genetik ilerleme son derece düşüktür (Kaymakçı ve Sönmez,

1996). O nedenle döl verimi/sperma üretimi açısından sorunların moleküler düzeyde değerlendirilmesi önemli bir konu olarak belirmektedir. Son yıllarda sperma üretim mekanizmasının organ/doku/hücre/gen düzeyinde araştırılması yönünde çeşitli çalışmalar yapılmakta ve döl verimi bakımından problemler moleküler

boyutlarıyla tanımlanmaktadır (Hu et al., 1999; Meng et al., 2001).

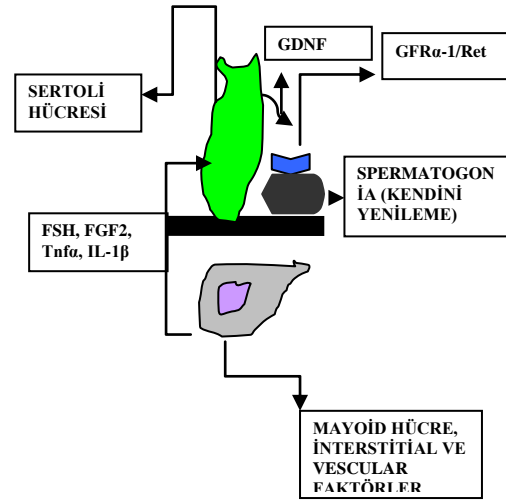
Bilindiği üzere spermatogenesis, karmaşık ve sürekli bir olgu olup kendini yenileme/farklılaşma özelliğine sahip spermatogonial kök hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu olgu, hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini bağlamında pek çok büyüme faktörünün birlikte katıldığı bir süreçler bütünüdür. Bu büyüme faktörlerinden biri olarak GDNF ilk olarak merkezi sinir sistemindeki fonksiyonlarıyla tanımlanmış olup, takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda GDNF mesajcı RNA'nın beyin dışında pek çok dokuda olduğu saptanmıştır. Temelde GDNF, sinir hücrelerinin yaşama gücünü geliştiren ve böbrek gelişmesine katılan bir büyüme faktörü olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda GDNF spermatogenesisin düzenlenmesinde, testis mikro çevresi içinde önemli görevler üstlenmektedir. Özellikle doğum sonrasında erken dönemlerinde sertoli hücre çoğalması üzerine uyarıcı bir etkisi olduğu saptanmış olup spermatogonial kök hücrelerinin yenileme/farklılaşma olgularında belirleyici rolü bulunmaktadır (Hu et al., 1999; Meng et al., 2001; Ryu et al., 2005; Schmidt et al., 2009; Wu et al., 2009). Bu çalışma hem GDNF'in spermatogenesisindeki bu eşsiz rolünü hem de bu etkinin nasıl bir mekanizma içinde gerçekleştiğini mevcut literatür kapsamında derlemeyi amaçlamaktadır.

### **Spermatogenesisinde Gdnf'in Etki Mekanizması**

Spermatogonial kök hücreleri kendini yenileme/farklılaşma aktivitelerini dengeleyerek (1:1) spermatogenesisi düzenlemektedir. Spermatogonial kök hücrelerinin kendini yenileme (self-renewal) ve farklılaşma (differentiating) davranışı arasındaki denge testis mikro çevresi ve niş'i tarafından oluşturulmaktadır. "Niş" temelde yenileme/farklılaşma süreçlerinin uygun yer ve zamanda ilgili faktör/faktörlerinin işaretel ağının sağlanmasını ifade eder. Spermatogonial kök hücrelerinin testis mikro çevresi içinde söz konusu dengesinin

GDNF ve reseptörleri tarafından kontrol edildiği bildirilmektedir (Meng et al., 2001).

Temelde mekanizma, şöyledir. FSH hormonunun etkisiyle sertoli hücrelerinde salgılanan GDNF, GFNF familyasından GFR  $\alpha$ 1/RET ko-reseptör faktörleri ile spermatogonial kök hücrelerini yenileme (self-renewal) veya farklılaşma (differentiating) yönünde aktive etmektedir (Şekil 1). Hem yenilenme hem de farklılaşma aktiviteleri hücre içi faktörler tarafından yönlendirilerek gerçekleştirilmektedir (Hofmann et al., 2008; Sariola and Sarma, 2003).



Şekil 1. GDNF yoluyla spermatogonial kök hücrelerinin kendi popülasyonlarını koruması (Hofmann et al., 2008)

### **Gdnf'in Spermatogenesisindeki Eşsiz Rolü**

Spermatogenesis hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini bağlamında pek çok büyüme faktörünün birlikte katıldığı bir süreçler bütünüdür. Bu üçlü ekseninde etkiler, birbirinden bağımsız değil tersine bütünleyen/denetleyen bir mekanizma içinde gerçekleşir. Özellikle spermatogonial kök hücrelerinin kültürü bakımından sağlanan gelişmeler spermatogenesis süreçlerinin araştırılmasında önemli olanaklar sunmaktadır. Bugün spermatogonial kök hücrelerinin GDNF ve diğer büyüme faktörleri kullanılarak kültürü yapılabilen ve spermatogonial kök hücre transplantasyonu ile alıcı hayvanlarda

verici kökenli spermatogenesis elde edilebilmektedir (Nagano et al., 1998; Kubota et al., 2004a). Spermatogenesis testis mikro çevresi çok belirleyici olmakla birlikte GDNF'in salgılanması FSH hormonunun sinerjik etkisiyle olduğu 6 günlük ratlarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Özellikle rat testis gelişiminin erken evrelerinde GDNF önemli bir büyüme faktörü olarak sertoli hücre çoğalmasında/düzenlenmesinde can alıcı bir öneme sahiptir (Hu et al., 1999).

GDNF'in spermatogonial kök hücre popülasyonunun korunması noktasındaki önemine ilişkin en etkili çalışma Meng et al. (2001) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar GDNF'den yoksun farelerde spermatogonial kök hücre kaynaklarının tükendiğini, GDNF'in aşırı ifadesi (ekspresyonu) durumunda ise farklılaşmamış spermatogonialarda bir birikme olduğunu ve spermatogonial kök hücre büyüklüğünün düzenlenmesinin GDNF/FSH (folikül uyarıcı hormon) tarafından kontrol edildiğini bildirmişlerdir (Meng et al., 2001; Tadokoro et al., 2002). Daha sonraki çalışmalarda spermatogonial kök hücre kültüründe GDNF'in yanı sıra diğer büyüme faktörlerinin etkisi de önem kazanmıştır. Böylece uygun kültür koşullarının geliştirilmesi sağlanarak spermatogenesis mekanizmasının daha etkili olarak çalışması mümkün olmaktadır (Kubota et al., 2004a,b; Aponte et al., 2006; Wu et al., 2009). Burada GDNF'in hem spermatogonia hem de sertoli hücreler için önemli bir büyüme faktörü olduğu açık bir şekilde ortaya çıkmaktadır (Buageaw et al., 2005; Stolle et al., 2005; Lee et al., 2007). Sığır spermatogonial kök hücrelerinde yapılan bir çalışmada da (Aponte et al., 2006) GDNF'in bu önemli etkisi apaçık olarak gösterilmiştir. Aynı şekilde Jijiwa et al. (2008) GDNF'in fare spermatogonial kök hücrelerinin kendini yenilemesinin düzenlenmesinde rol alan önemli bir molekül olduğunu bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada GDNF ve diğer büyüme faktörlerinden yoksun spermatogonial kök hücre kültüründe fare spermatogonial kök hücrelerinin kendilerini yenileyemediği ve spermatogonial kök hücrelerinde dejenerasyon gözlemlendiği saptanmıştır.

Bununla birlikte GDNF'in aşırı açıklanması farklılaşmamış spermatogonia popülasyonunu artırmakta ve hücrelerin farklılaşma aktivitesine giremediği bildirilmektedir (Jijiwa et al., 2008).

GDNF'in bu önemli etkisi spermatogenesisin kimi evrelerinde değişim göstermektedir. Fouchecourt et al. (2006) 1–90 günlük ratlarda GDNF, reseptörleri ve dönüşümünde rol alan faktörlerin post-natal gelişme sırasında rat testisinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca GDNF ve reseptörlerinin etkilerinin veya etki düzeylerinin spermatogenesisin çeşitli evrelerinde (level of expression) değişiklik gösterdiğini bildirmişlerdir. Söz konusu çalışmada GDNF'in sertoli hücrelerinin düzenlenmesi üzerine önemli etkisi 7–8 günlük ratlarda saptanmıştır. GDNF mevcut kültür koşullarında spermatogonia A'nın S-fazına girmelerini engellemekte ve sonuç olarak GDNF, spermatogonianın farklılaşmasına izin vermemektedir. Bu, hücre içi bir dizi reaksiyonun sonucunda oluşmaktadır. Naughton et al. (2006) farelerde GDNF, GFR  $\alpha 1$  reseptörü ve taşıyıcı faktörlerin özellikle doğum sonrası testis gelişmesi çok önemli olduğunu ancak embriyolojik gelişme sırasında söz konusu büyüme faktörleri ve reseptörlerine ihtiyaç duyulmadığını bildirilmişlerdir.

GDNF'in spermatogenesis ve sertoli hücre çoğalmasında/düzenlenmesindeki önemli etkisinin yanı sıra gen ekspresyonundaki rolü de önemlidir (He et al., 2007; Schmidt et al., 2009). Oatley et al. (2006) 6 gen üzerinde çalışarak GDNF'in kültürden uzaklaştırılması durumunda söz konusu genlerin ekspresyonunda önemli bir düşüş olduğunu saptamışlardır. Simon et al. (2007) sertoli hücre kültüründe Fibroplast Büyüme Faktörünün (FGF) gen ekspresyonunu ve GDNF'in salgılama mekanizmasını düzenlediğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Hamster spermatogonial kök hücre kültüründe GDNF'in spermatogonial kök hücre çoğalma için tek başına yeterli olmadığını ve başka büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (Kanatsu-Shinohara et al., 2008).

GDNF sadece spermatogenesisde değil aynı zamanda folliküljenesisde de önemli

rol oynamaktadır. Dole et al. (2008) dört günlük dişi rat yavrularından alınan ovaryumları GDNF ve başka büyüme faktörleri kullanarak kültüre alarak değerlendirmişlerdir. Dişilerin üremesinde GDNF, primordial folliküllerinin gelişmesini sağlar ve follikülgenesi sırasında hücre-hücre interaksiyonlarında önemli görevler üstlenir. Nitekim GDNF ve GFR $\alpha$ 1 primordial folliküllerin sitoplazmasında bulunmuş ve follikülgenesi olgusunun önemli bir unsuru olduğu ortaya konmuştur.

Sonuç olarak temelde GDNF'nin yüksek seviyeleri spermatogonial kök hücrelerinde yenilemeyi, düşük düzeyleri ise farklılaşmayı uyarmaktadır. GDNF'in bu etkisinin tek başına gerçekleştirilmediği başka büyüme faktörlerinin de bunda önemli rol oynadığı açık bir şekilde anlaşılmaktadır. Takip eden araştırmalarda spermatogenesiste önemli rolü bulunan bu faktörler kombinasyonunun birlikte etkilerinin araştırılması önemli ve özgün bir konu olarak belirmektedir. Böylece erkeklerde döl verimi özellikleri molekül düzeyde tanımlanmakta ve damızlık değeri yüksek erkeklerden yararlanma olanakları sunulmaktadır.

### Kaynaklar

- Aponte, P.M., Soda, T., van de Kant, H.J.G. and de Rooij D.G. 2006. Basic Features of Bovine Spermatogonial Culture and Affects of Glial Cell Line-Derived Neuro Trophic Factor. *Theriogenology*, 2003, 65: 1828-1847.
- Buageaw, A., Sukhwani, M., Ben-Yehudah, A., Ehmcke, J., Rawe, V.Y., Pholpramool, C., Orwig, K.E. and Scfatt, S. 2005. GDNF Family Receptor Alpha1 Phenotype of Spermatogonial Stem Cells in Immature Mouse Testes. *Biology of Reproduction*, 2005, 73: 1011-1016.
- Dole, G., Nilsson and E.E., Skinner, M.K. 2008. Glial-Derived Neurotrophic Actor Promotes Ovarian Promordial Follicle Development and Cell-Cell Interactions during Folliculogenesis. *Reproduction*, 2008, 135: 671-682.
- Fouchecourt, S., Godet, M., Sabido, O. and Durand, P. 2006. Glial Cell-Line-Derived Neurotrophic Factor and Receptors are Expressed by Germinal and Somatic Cells of the Rat Testis. *Journal of Endocrinology*, 2006, 190: 59-71.
- He, Z., Jiang, J., Hofmann, M.C. and Dym, M. 2007. GFR $\alpha$ 1 Silencing in Mouse Spermatogonial Stem Cells Results in their Differentiation via the Activation of RET Tyrosine Kinase. *Biology of Reproduction*, 2007, 77: 723-733.
- Hofmann, M.C. 2008. GDNF Signaling Pathways within the Mammalian Spermatogonial Stem Cell Nich. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 228: 95-103.
- Jijiwa, M., Kawai, K., Fukihara, J., Nakamura, A., Hasegawa, M., Suzuki, C., Sato, T., Enomoto, A., Asai, N., Murakumo, Y. and Takahashi, M. 2008. GDNF-Mediated Signaling via RET Tyrosine 1062 is Essential for Maintenance of Spermatogonial Stem Cells. *Genes to cells*, 2008, 13: 365-374.
- Hu, Jianguo, Shima, H. and Nakagawa, H. 1999. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Simulates Sertoli Cell Proliferation in the Early Postnatal Period of Rat Testis development. *Endocrinology*, 1999, 140: 3416-3421.
- Kanatsu-Shinohara, M., Muneto, T., Lee, J., Takenaka, M., Chuma, S., Nakatsuzi, N., Horiuchi, T. and Shinohara, T. 2008. Long-Term Culture of Male Germline Stem Cells from Hamster Testes. *Biology of Reproduction*, 2008, 78: 61-617.
- Kubota, H., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. 2004a. Culture Conditions and Single Growth Factors Affect Fate Determination of Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Biology of Reproduction*, 2004a, 71: 722-731.
- Kubota, H., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. 2004b. Growth Factors Essential for Self-Renewal and Expansion of

- Mouse Spermatogonial Stem Cells. PNAS, 2004b, 101: 47.
- Kaymakçı, M. ve R. Sönmez, 1996. İleri Koyun Yetiştiriciliği. E. Üniv. Zir. Fakt. Yay., Bornova, İzmir.
- Lee, J., Kanatsu-Shinohara, M., Inoue, K., Ogonuki, N., Miki, H., Toyokuni, S., Kimura, T., Nakono, T., Ogura, A. and Shinohara, T. 2007. Akt Mediates Self-Renewal Division of Mouse Spermatogonial Stem Cells. Development, 2007, 134: 1853-1859.
- Meng, X., Lindahl, M., Hyvönen, M.E., Parvinen M., de Rooij, D.G., Hess, M.W., Raatkainen-Ahokas, A., Sainio, K., Rauvala, H., Lakso, M., Pichel, J.G., Westphal, H., Saarma, M. and Sariola, H. 2001. Regulation of Cell Fate Decision of Undifferentiation Spermatogonia by GDNF. Science, 2001, 287: 1489-1493.
- Naughton, C.K., Jain, S., Strickland, A.M., Gupta, A. and Milbrandt, J. 1998. Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor Mediated Ret Signaling Regulates Spermatogonial Stem Cell Fate. Biology of Reproduction, 1998, 74: 314-312.
- Oatley, J.M., Avarbock, M.R., Telaranta, A.I., Fearon, D.T. and Brinster, R.L. 2006. Identifying Genes Important for Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal and Survival. PNAS, 2006, 103 (25): 9524-9529.
- Ryu, Buom-Yong, Kubota, H., Avarbock, M.R. and Brinster, R.L. 2005. Conservation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal Signaling between Mouse and Rat. PNAS, 2005, 102 (40): 14302-14307.
- Sariola, H. and Saarma, M. 2003. Novel Functions and Signaling Pathways for GDNF. Journal of Cell Science, 2003, 116, 3855-3862.
- Schmidt JA, Avarbock MR, Tobias JW and Brinster RL. 2009. Identification of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Regulated Genes Important for Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in the Rat. Biology of Reproduction, 2009, 81(1): 56-66.
- Simon, L., Ekman, G.C., Tyagi, G., Hess, R.A., Murpy, K.M. and 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. Experimental Cell Research, 2007, 313: 3090-3099.
- Stolle, L.B., Nolan, C., Dym, M. and Hofmann, M.C. 2005. Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Germ-Line Stem Cell Fate. Ann. N.Y. Acad. Sci., 2005, 1061: 94-99.
- Tadokoro, Y., Yomogida, K., Ohta, H., Tohda, A. and Nishimune, Y. 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by GDNF/FSH pathway. Mechanisms of Development, 2002, 113: 29-39.
- Wu Z, Falciatori I, Molyneux L.A., Richardson T.E., Chapman K.M. and Hamra FK. 2009. Spermatogonial Culture Medium: an Effective and Efficient Nutrient Mixture for Culturing Rat Spermatogonial Stem Cells. Biology of Reproduction, 2009, 81(1):77-86.