

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARE OVARYUMUNDA POLİ (ADP-RİBOZİL)ASYON  
YOLU**

**Arş. Gör. Kanat GÜLLE**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANLAR**

**Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN**

**PhD. Denny SAKKAS**

**Bu tezi hazırlayan Kanat Gülle'nin yurtdışındaki yaşam giderleri  
TÜBİTAK (2214) bursuyla desteklenmiştir.**

**Tez No:  
2008-İSPARTA**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı**  
 Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
 Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07.03.2008

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN  
 Süleyman Demirel Üniversitesi  
 Histoloji ve Embriyoloji A.D.



Tez Danışmanı : PhD. Denny SAKKAS  
 Yale Üniversitesi  
 Kadın-Doğum A.D

Üye : Prof Dr. Hasan CÜCE  
 Selçuk Üniversitesi  
 Histoloji ve Embriyoloji A.D.



Üye : Doç Dr. Meral ÖNCÜ  
 Süleyman Demirel Üniversitesi  
 Histoloji ve Embriyoloji A.D.



Üye : Doç Dr. Osman SULAK  
 Süleyman Demirel Üniversitesi  
 Anatomi A.D.



Üye : Doç. Dr. M. Okan ÖZKAYA  
 Süleyman Demirel Üniversitesi  
 Kadın-Doğum A.D



ONAY : Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki  
 jüri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Halis KÖYLÜ

Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında ve deneylerle ilgili her konuda bana yardımcı olan Sayın Denny SAKKAS'a, akademik yaşantımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen anabilim dalı başkanımız ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, anabilim dalı öğretim üyelerimizden Doç. Dr. Meral ÖNCÜ'ye, yurtdışına gitmemde ve bu doktora tezinin oluşmasına öncülük eden Sayın Doç. Dr. Ümit A. KAYIŞLI'ya, yine yurtdışına çıkmamda emeği geçen Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan Hong Qian'a en derin teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, yurtdışında bulunduğum süre zarfında bölümümüzdeki iş yükümü üzerlerine alıp eksikliğimi hissettirmeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım araştırma görevlileri, Dilek ULUSOY KARATOPUK, Dilek BAYRAM, İ. Aydın CANDAN, Ahmet KOÇAK, Özgür FEDAKAR ve Hakan DARICI'ya, tezdeki imla hatalarını büyük bir sabırla bir kaç defa okuyarak düzelten sevgili eşim Elif GÜLLE'ye ve anabilim dalımız araştırma görevlisi Özgen SOYÖZ'e, bilimsel yönden katkılarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji A.D araştırma görevlisi Mustafa SOYÖZ'e ve son olarak yüksek lisans ve doktora süresince üzerimde emeği olan herkese içtenlikle teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>SİMGE ve KISALTMALAR</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER, TABLOLAR ve RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>4</b>
2.1. Ovaryumlar .....	4
2.1.1. Embriyolojik Gelişim .....	4
2.1.2. Anatomik Yapı .....	6
2.1.3. Ovaryum Histolojisi .....	6
2.1.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis) .....	7
2.1.4.1. Primordiyal Foliküller.....	8
2.1.4.2. Primer Foliküller .....	9
2.1.4.3. Sekonder (Antral) Folikül .....	11
2.1.4.4. Preovulatar (Olgun) Foliküller (Graaf Folikülleri) .....	13
2.2. Ovulasyon.....	15
2.3. Oogenezis (Oositin Gelişimi) .....	16
2.4. NAD <sup>+</sup> Metabolizması .....	18
2.5. Poli (ADP-riboz).....	20
2.6. PARP (Poli ADP-riboz Polimeraz) Yapısı .....	22
2.6.1. PARP Süperaillesi .....	23
2.6.1.1. PARP-1 ve PARP-2 .....	26
2.7. Poli (ADP-ribozil)asyon Reaksiyonlarının Biyolojik Önemi .....	28
2.7.1. Poli (ADP-ribozil)asyonun Telomer Uzunluğundaki Rolü.....	28
2.7.2. Mitozun Regülasyonunda Poli (ADP-ribozil)asyonun Rolü .....	29
2.7.3. Apoptozis Sürecinde Poli (ADP-riboz) Sentezi .....	30
2.8. PAR Katabolizması.....	30
2.9. DNA-hasarına Bağlı PAR Sentezi .....	32
2.10. PARP'ın Kimyasal Baskılayıcıları .....	35
2.10.1. Monosiklik Karboksiamidler .....	36

<b>3. MATERYAL ve METOD .....</b>	<b>37</b>
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Deney Hayvanları.....	37
3.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler .....	37
3.1.3. Gereçler.....	39
3.1.4. Solüsyonlar.....	39
3.2. Metod .....	41
3.2.1. Folikül Sayımı .....	41
3.2.2. İmmünohistokimya.....	41
3.2.3. İmmünofloresan.....	42
3.2.4. Werstern Blot Analizi .....	42
3.2.5. mRNA'nın Niceliğini RT-PCR ile Ölçülmesi .....	43
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>45</b>
4.1. Folikülogenezis ve Oogenez Sürecinde PARP-1'in Varlığı.....	45
4.2. Yaşa Bağlı Olarak Poli (ADP-ribozil)asyondaki Değişimler .....	57
4.3. Apoptozisde Poli (ADPribozil)asyonun Rolü .....	59
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
<b>ÖZET .....</b>	<b>68</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>69</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>70</b>

## SİMGE ve KISALTMALAR

Kısaltma	Türkçe Açılımı	İngilizce Karşılığı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri	
ADP	Adenozin di fosfat	Adenosine diphosphate
Cdk	Siklin bağımlı protein kinaz	cyclin-dependent protein kinaz
COC	Kümüls Oosit Bileşkesi	Cumulus-Oocyte Complex
DNA	Deoksiribonükleik asit	Deoksiribonucleic acid
ER	Endoplazmik Retikulum	Endoplasmic Reticulum
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon	Follicle-Stimulating Hormone
hCG	İnsan koryonik gonadotropini	Human Chorionic Gonadotropine
IVF	in vitro fertilizasyon	<i>in vitro</i> fertilization
LH	Luteinleştirici Hormon	Luteinizing Hormone
LH	Luteinleştirici Hormon	Luteinizng Hormone
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotit	Nicotinamide adenine dinucleotide
Nam	Nikotinamid	Nicotinamid
NaMN	Nikotinic asit mononükleotit	Nicotinic acid mononucleotide
NMN	Nikotinamid mononükleotit	Nicotinamide mononucleotide
NR	Nikotinamid ribozit	Nicotinamide riboside
PAR	Poli (ADP-riboz)	Poly (ADP-ribose)
PARG	Poli (ADP-riboz)glikohidrolaz	Poly (ADP-ribose)glycohidrolase
PARP	Poli (ADP-riboz)polimeraz	Poly (ADP-ribose)polymerase
PDE	Halkasal Nükleotid Fosfodiesteraz	cyclic nucleotide Phosphodiesterase
PEH	Primordiyal eşey hücreleri	Primordial germ cells
PI	Profaz 1	Prophase I
SSBR	Tek Zincir Kırık Onarımı	Single Strand Break Repair
ZP	Zona Pellusida	Zona Pellucida

## ŞEKİLLER, TABLOLAR ve RESİMLER DİZİNİ

### ŞEKİLLER

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
<b>Şekil 1:</b> 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü .....	4
<b>Şekil 2:</b> Ovaryumun Şematik Yapısı .....	7
<b>Şekil 3:</b> Foliküllerin Hormonal Bağımlı ve Bağımsız Gelişimleri.....	12
<b>Şekil 4:</b> Çeşitli Gelişim Aşamalarında Ovaryum Folikülleri .....	14
<b>Şekil 5:</b> Sığırlarda, FSH ile foliküllerin gelişimini karşılaştıran şematik diyagram ....	15
<b>Şekil 6:</b> Sığır oositlerinin,büyüme,kapasitasyon ve maturasyon aşamalarının folikül gelişimi ile karşılaştırılması.....	17
<b>Şekil 7:</b> NAD <sup>+</sup> Sentezinin Metabolik Yolları .....	19
<b>Şekil 8:</b> NAD <sup>+</sup> ın de novo Yoluyla Sentezi.....	20
<b>Şekil 9:</b> Poli (ADP-ribozun) Yapısı .....	21
<b>Şekil 10:</b> Poli (ADP-ribozun) Elektron Mikroskop Görünümü.....	22
<b>Şekil 11:</b> İnsan PARP Yapısının Şematik Organizasyonu .....	23
<b>Şekil 12:</b> PARP Ailesi Üyelerinin Domain Yapıları.....	25
<b>Şekil 13:</b> <i>C. diptheriae</i> toksini ile PARP-1 ve PARP-2 Yapısal Benzerliği .....	26
<b>Şekil 14:</b> PARP Süperailisi ve Hücre Bölünmesi .....	29
<b>Şekil 15:</b> İnsan PARG İzofomlarının Alt Birim Yapıları .....	32
<b>Şekil 16:</b> DNA Hasarı ve Tamirinde Poli (ADP-riboz) Metabolizması .....	33
<b>Şekil 17:</b> Tek Zincir Kırık Tamir Mekanizmasında PARP-1 .....	35
<b>Şekil 18:</b> DNA Hasarına Hücresel Yanıtta Çok Yönlü PARP Fonksiyonu .....	35
<b>Şekil 19:</b> Yaygın olarak Kullanılan PARP Baskılayıcıları .....	36
<b>Şekil 20:</b> Parp-1'in Western Blot Sonuçlarının Grafiği .....	55
<b>Şekil 21:</b> Aktinin Western Blot Sonuçlarının Grafiği.....	55
<b>Şekil 22:</b> Parp-1'in RT-PCR Sonuçlarının Grafiği .....	56
<b>Şekil 23:</b> Aktinin RT-PCR Sonuçlarının Gafiği .....	56
<b>Şekil 24:</b> Farede Yaşa Bağlı Folikül Sayısı Değişimi .....	57
<b>Şekil 25:</b> % PARP (+) İfadesinin Grafiği.....	59
<b>Şekil 26:</b> c-parp'ın Genç ve Yaşlı Hayvanlarda İfadesi.....	59
<b>Şekil 27:</b> c-parp'ın Western blot sonuçlarının İmagej programı ile değerlendirilmesi .....	60

**TABLolar**

<b>Tablo 1:</b> Genç ve Yaşlı Grubun Primordiyal Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi ..	58
<b>Tablo 2:</b> Genç ve Yaşlı Grubun Primer Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi.....	58
<b>Tablo 3:</b> Genç ve Yaşlı Grubun Preantral Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi .....	58
<b>Tablo 4:</b> Genç ve Yaşlı Grubun Antral Folikül Sayılarının Değerlendirilmesi.....	58



## RESİMLER

<b>Resim 1:</b> Ovaryum Dokusunun H-E İle Boyanmış Kesiti .....	6
<b>Resim 2:</b> Primordiyal ve primer foliküller .....	9
<b>Resim 3:</b> Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları .....	10
<b>Resim 4:</b> Zona pellusida ve Granüloza Hücrelerinin Görünümü .....	11
<b>Resim 5:</b> Sekonder (antral) bir folikülde oosit .....	13
<b>Resim 6:</b> Olgun bir folikül (Graaf folikülü) .....	14
<b>Resim 7: (a,b):</b> Parp-1'in fare ovaryumundaki dağılımı .....	46
<b>Resim 8:</b> Parp-1'in 3-4 haftalık fare ovaryumunda dağılımı .....	47
<b>Resim 9:</b> Genç fareye ait ovaryumda primordiyal ve antral foliküller .....	47
<b>Resim 10:</b> 3-4 haftalık fare ovaryumunda antral folikül .....	48
<b>Resim 11:</b> 3-4 haftalık fare ovaryumunda geç antral folikül .....	48
<b>Resim 12:</b> 12 aylık gruba ait tek tabakalı ve çok tabakalı primer folikül .....	49
<b>Resim 13:</b> Yaşlı Gruba ait antral folikül .....	49
<b>Resim 14:</b> 12 aylık fare ovaryumuna ait Graff Folikül .....	50
<b>Resim 15:</b> 12 aylık fare ovaryum dokusundaki foliküller .....	50
<b>Resim 16: (a,b,c,d):</b> Genç ve Yaşlı farelere ait kesitler .....	51
<b>Resim 17:</b> 3-4 haftalık fareye ait ovaryum kesitindeki primordiyal foliküller .....	52
<b>Resim 18:</b> 3-4 haftalık fare ovaryumunda Graff Folikül .....	52
<b>Resim 19:</b> 12 aylık fareye ovaryum kesiti .....	53
<b>Resim 20:</b> Ovaryumda Parp-1 için RT-PCR görüntüleri .....	53
<b>Resim 21:</b> Ovaryumda Aktinin RT-PCR görüntüleri .....	54
<b>Resim 22:</b> Parp-1 için western blot görüntüleri .....	54

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Bilim adamlarının erkek ve dişi üreme organlarının işlevlerinin yanında semen ve ovulasyon ile ilgili çalışmaları yüzyıllardır sürmektedir.

Regnier de Graff (1641-1723) eşey hücrelerinin oluşumunu ve çoğalmasını detaylı bir şekilde tarif etmiş ve 1668-1672 yılları arasında yayınladığı makalelerinde erkek-dişi üreme sistemlerini geniş bir biçimde açıklamıştır.

Bilim adamları 17. ve 18. yüzyıl başlarında, spermin semen içinde yer aldığını ve overlerde oluşan yumurtayı dölediğini bilmelerine karşın bu olayın fizyolojik mekanizmasını tam olarak açıklayamamışlardır (1).

Bilimdeki gelişmeler sonucunda M.Ö 40.000-16.000 dönemlerinden süregelen kısırlık, 20. yüzyıldan sonra hızla uygun araştırma ve tedavi olanaklarına kavuşabilmiştir.

En sık gözlenen kısırlık nedenleri arasında spermatogenezis ve ovulasyonda meydana gelen bozukluklar, endometriyozis ve yaşla ilgili problemler bulunmaktadır.

Ovaryumdaki oosit havuzu, yaşamın erken döneminden itibaren sabittir. Bu nedenle ovaryan yaşlılık, hem ovaryumdaki materyalin azalması hem de primordiyal folikül havuzundaki azalışa bağlıdır. Her folikül, ovulasyona ya da daha çoğunlukla harabiyete girmek üzere gelişimine başlar. Burada, foliküllerin kaderinin belirlenmesini sağlayan unsurlar ve ovaryum foliküllerin gelişimi sırasında gerçekleşen anahtar noktalar önemlidir(2).

Normal dişi üremesinde de oositin düzgün gelişmesi(oogenez) son derece önemlidir(3).

Oogenez ve folikülogenez olaylarına, DNA'ya yönelik epigenetik değişimler ve kromatinin yeniden şekillenmesi eşlik eder (4,5). Belirli genlerin uzaysal ve temporal yönlerden etkinleşmesi ve diğerlerinin baskılanması,

oogenez ve folikülogenez için önemli olaylardır (Mesela Nobox, Gdf9, Bmp15 ve Foxo3a gibi) (6-11). Bu olayları düzenleyen unsurlar ve gen düzenlenmesiyle kromatinin yeniden modellenmesi arasındaki muhtemel bağlantı halen tam olarak açık değildir. Bu durum ise sürecin düzenlenmesini tam olarak anlamamızı engellemektedir.

Poli(ADP-riboz) polimeraz (PARP) birçok ökaryotik hücrenin çekirdeğinde geniş bir yayılım gösteren çekirdek proteindir. Kabul edici (akseptör) proteinlere poli(ADP-riboz) birimlerini sentezler. Substrat olarak NAD ( $\beta$ -nicotinamide adenin dinucleotide; nikotinamid dinükleotit)'ı kullanır. Bu çekirdek proteini zaman zaman PARS, ADPRT ve pADPRT adlarıyla da anılmıştır. Çekirdekte bulunan bir çok poli(ADP-riboz) akseptör (kabul edici) protein DNA'nın doğruluğunun devam ettirilmesinden sorumludur (12).

Ökaryotik hücrelerdeki proteinlerde translasyon sonrasında görülen en keskin değişimlerden biri de, poli(ADP-riboz) polimeraz enzim ailesi tarafından katalizlenen poli(ADP-ribozil)asyon işlemidir (11). PARP enzimleri, ADP-ribozu NAD<sup>+</sup> molekülünden kabul edici (akseptör) proteinlere veya PARP moleküllerinin bizzat kendisine aktarma yoluyla, poli(ADP-riboz) (PAR) zincirlerinin oluşumunu katalizler (12,13).

PARG (poli ADP-riboz glikohidrolaz), poli(ADP-riboz) yapısının bozulmasından sorumlu olduğu bilinen tek enzimdir. Çekirdek proteinlerinin poli(ADP-ribozil)asyonunun, kromatin yapısının ve transkripsiyonunun epigenetik yönde düzenlenmesinde yer aldığı ileri sürülmüştür (14,15).

DNA'nın 3 boyutlu yapısının değişimi sırasında görülen poli(ADP-ribozil)asyon etkinliğinin % 90'ının daha fazlasından PARP-1 sorumludur (16). PARP-1 enziminin yokluğunda alkilleyici ajanlara ve iyonize radyasyona karşı aşırı hassasiyete yol açarken hem PARP-1 ve PARP-2 yönünden eksikliği olan fareler, embriyonik dönemde ölmektedir. Poli(ADP-ribozil)asyonun, klasik olarak DNA tamirinde, apoptozda ve nekrozda oldukça önemli bir molekül olduğu gösterilmiştir (17).

Ovaryum dişi üreme sisteminin temel işlevsel birimidir ve ovaryal döngü de apoptozis, hücre çoğalması ve farklılaşması, oosit maturasyonu ve folikül şekillenmesi gibi kompleks işlevlerde yer alan bir organdır.

Çalışmamızda poli(ADP-ribozil)asyonun çeşitli yaş gruplarındaki farelerin ovaryumundaki dağılımlarını ve bu molekülün folikülogenez ile oogenezis olaylarındaki önemini saptamaya çalıştık.

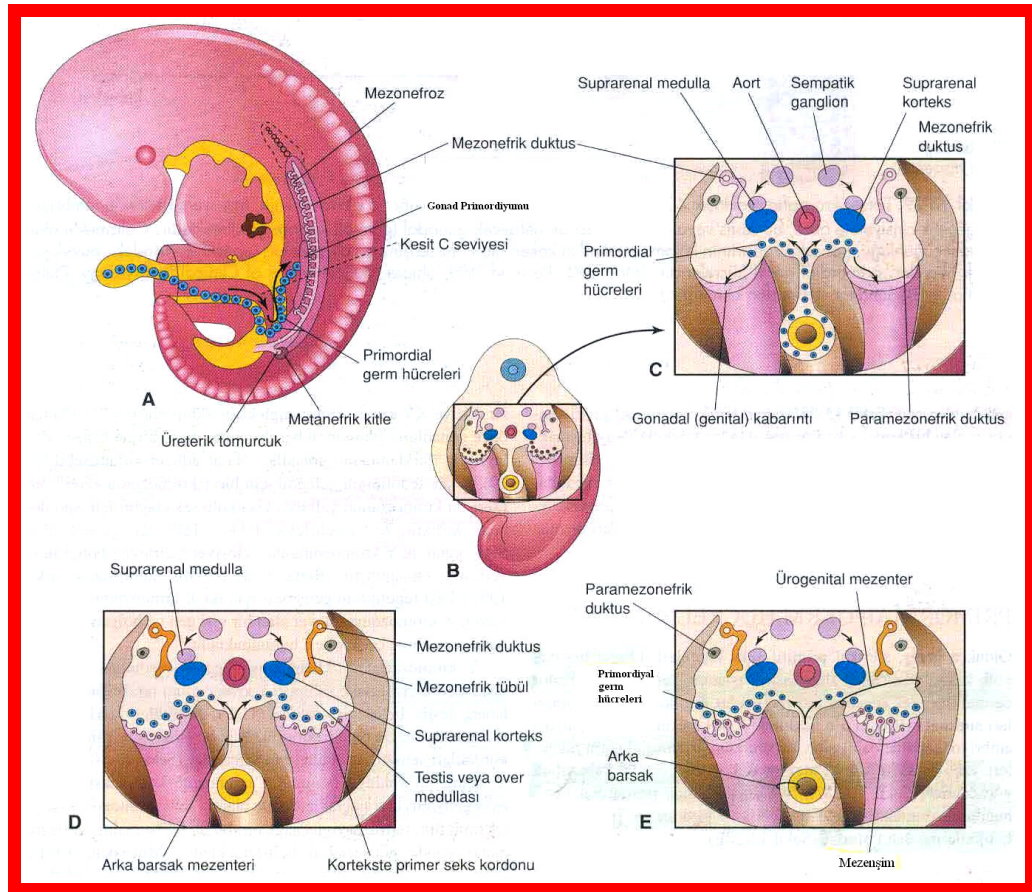
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryumlar

#### 2.1.1. Embriyolojik Gelişim

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar (Şekil 1):

- Posterior abdominal duvarın mezoteli
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri (ilkel eşey hücreleri)



**Şekil 1.** 5-6 haftalık embriyoda primordiyal germ hücrelerinin göçü, farklanmamış gonadlar, mezonefrik ve paramezonefrik kanallar izlenmektedir (18).

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma oluşur. Bu kalınlaşma, epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması ile gerçekleşir ve mezonefrozun medialinde bir kabarıklık - gonadal kabarıklık- şekillenir. Parmak şeklindeki epitel kordonlar olan birincil cinsiyet kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır medullası ise geriler.

Gelişimin 10. haftasına kadar, overler histolojik olarak ayırt edilemezler. Birincil cinsiyet kordonları belirgin değildirler, medulla içerisine doğru sokulurlar ve gelişmemiş bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Bu oluşan yapı ve birincil cinsiyet kordonları (kortikal kordonlar), erken fetal periyotta overin yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler.

Yaklaşık 16. haftada, kortikal kordonlar belirli hücre kümelerine parçalanırlar ve oluşan primordiyal foliküllerin her biri, ilkel germ hücrelerinden köken alan bir oogonyum içerir. Oogonyumlar, birincil cinsiyet kordonlarından gelişen, tek tabakalı yassı foliküler hücreler ile sarılmışlardır. Oogonyumlar mitozla çoğalırken, bu hücrelerden bir kısmı oosit-1'e dönüşürler. Bu evrede oosit-1'ler DNA miktarlarını iki katına çıkararak birinci mayoza başlar. İntrauterin hayatın 20. haftasında, fetal ovaryumlardaki üreme hücre sayısı yaklaşık 7.000.000'a ulaşır. Gelişimin 28-30. haftalarında ovaryum yüzeyine yakın bulunan az sayıdaki oogonyum dışındaki tüm oogonyumlar yok olur. Varlıklarını sürdürenler, birinci mayoza başlayan oosit-1'lerdir ve bunların yerleştikleri primordiyal foliküller dişi üreme hücrelerinin gelişmesi için birer sığınak ve gelişme ortamıdır (18).

Primordiyal foliküllerin yatakları fetal koyun ovaryumunda gebeliğin 75.gününde, insanda gebeliğin 154.gününde oldukça belirgindir. Primordiyal folikül büyüklüğü ve granüloza hücre öncüllerinin sayısı türden türe göre değişiklik göstermektedir. Primordiyal foliküllerdeki pre-granüloza hücrelerinin kaynağı tartışmalıdır. Germ hücrelerinin vitellus kesesinden köken aldığı

bilinirken; somatik hücrelerin, gonadal katlantının bir sonucu olarak ve fetal ovaryum retesi veya yüzey epitelinden köken aldığı düşünülmektedir (19-23).

### 2.1.2. Anatomik Yapı

Uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarica içinde yerleşen ovaryumların her biri, 3-8 g ağırlığında, 2.5-5 cm boyunda, 1.5-3 cm genişliğinde ve 0.7-1.5 cm kalınlığında badem şekilli üreme bezleridir. Ovaryumlar, organa damar ve sinirlerin girip çıktığı yer olan hilusda bulunan, kan damarlarını ovaryumlara ileten özel bir periton katlantısı olan ve mezovaryum olarak adlandırılan bir askı ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılıdır. Yüzeyi ovulasyon başlamadan önce düzgündür, ovulasyondan sonra bu düzgünlük kaybolur (24-26).

### 2.1.3. Ovaryum Histolojisi

Yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan basit prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitel altında tunika albuginea adı verilen yoğun bir düzensiz sıkı bağ dokusu bulunmaktadır. Bu tabakanın altında ise ovaryum foliküllerini içeren korteks bölgesi bulunmaktadır (Resim 1)(27).



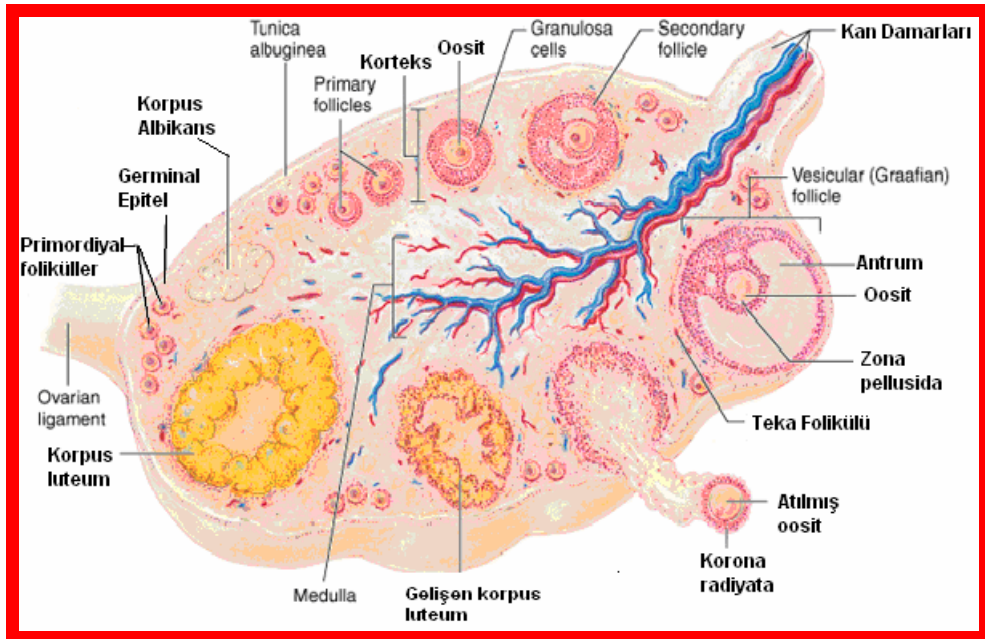
**Resim 1.** Ovaryum dokusunun hematoksilin-eozin ile boyanmış kesiti. A: antrum, GEp: germinal epitel, TA: Tunika albuginea, ZP: zona pellusida, PF: primordiyal foliküller, SF:sekonder foliküller (27).

### 2.1.4. Ovaryum Foliküllerinin Gelişimi (Folikülogenezis)

Bir ovaryum folikülü belli hücre tiplerinden oluşan oldukça karmaşık bir yapıdan meydana gelir(28). Her biri bir oosit içeren foliküller değişik çaplarda, ovaryum korteksi içine yayılmış durumdadırlar (Şekil 2). Folikülün çapı oositin gelişim durumunu gösterir. Yapısal olarak gelişim durumlarına göre üç tip folikül bulunur;

- Primordiyal foliküller
- Gelişmekte olan foliküller
- Olgun (Matür) foliküller (Graaf folikülleri)

Gelişmekte olan foliküller ayrıca **primer** (birincil) ve **sekonder** (ikincil veya antral) foliküller olarak ikiye ayrılırken primer foliküller de kendi içerisinde **unilaminar** (tek tabakalı veya erken) ve **multilaminar** (çok tabakalı veya geç) primer foliküller olarak ikiye ayrılır. Bir ovaryumda tüm folikül tipleri aynı anda görülmektedir ancak primordiyal foliküller en yaygın olan tiptir (19).



Şekil 2. Ovaryumun Şematik Yapısı (29).

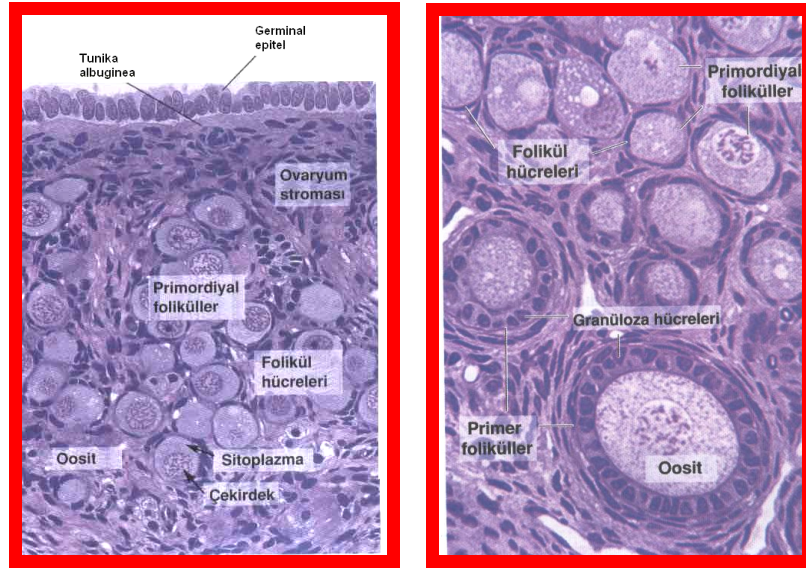


### 2.1.4.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal eşey hücreleri (PEH) insan fetal gelişimi sırasında, 4. haftanın başlarında vitellus kesesinin dorsal endoderminde allantoysise yakın bir bölgede belirir. Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olurken, PEH'ler arka barsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek ürogenital kabartıda gonadları oluşturacak bölgeye yerleşirler (26). Dişi bireylerde PEH'ler 25. haftada mitozla çoğalarak yaklaşık 7 milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitel hücreleri oogonyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordiyal folikülleri oluşturur.

Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp atreziye uğrar ve yok olurlar (30). Fetal hayatın beşinci ayında başlayan atrezi foliküllerin sayısını logaritmik olarak azaltır. Atrezi başlamadan önce beş milyon civarında olan oosit sayısı doğumda 1 milyon dan aza iner (27). Pubertede ise bu rakam 200.000' e kadar inmiştir (31). Puberteden itibaren her menstural döngüde bir kaç adet folikül gelişirken yalnızca bir tanesi baskın folikül olup son aşamaya kadar gelişir, diğerleri ise atreziye girerek yavaş yavaş yok olurlar.

Bir kadının üretken dönemi süresince yaklaşık 400 oosit bu aşamaya kadar gelip ovulasyonla atılır. Menopozdan sonra geri kalan oositler birkaç yıl içinde tamamen yok olur (27). Bununla beraber, son yıllarda bazı araştırmalar fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden, yaşamın erken yıllarında yeniden eşey hücresi oluşabildiğini göstermiştir. Bazı kurbağa türlerinde (*Xenopus laevis*) kök hücrelerden, yaşam süresinin çoğu boyunca eşey hücresi üretildiği yönündeki kanıtlar oldukça kuvvetlidir (3,18).



**Resim 2.** Primordiyal ve primer foliküller (32).

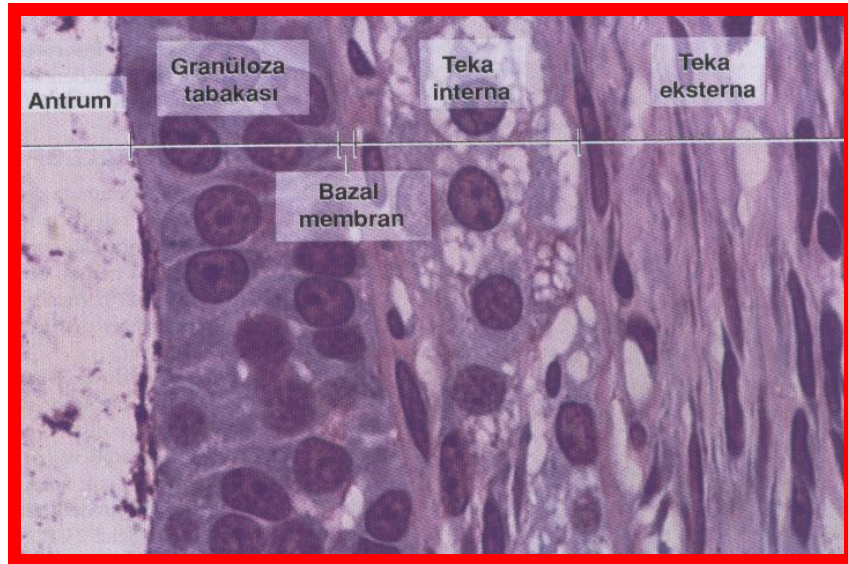
#### 2.1.4.2. Primer Foliküller

Puberteden itibaren çeşitli unsurların etkisiyle oositler ve bunlara eşlik eden folikül hücreleri bir büyüme evresine girerler. Büyümenin ilk işareti, yassı folikül epitel hücrelerinin kübiğe dönüşmesidir. Bu aşamada folikül **tek tabakalı (erken/unilaminar) primer folikül** adını alır (Resim 2). İlerleyen aşamalarda folikül hücrelerinin çoğalmasıyla **çok tabakalı (geç/multilaminar) primer folikül meydana gelir**. Çoğalan folikül epitel hücreleri de **granüloza hücreleri** adını alır (33). Folikül büyüdükçe korteksin daha derin kısımlarına doğru hareket eder. Çoğalan granüloza hücreleri, aralarındaki oluklu bağlantılar (gap junctionlar) aracılığıyla birbirleriyle temas kurarlar.

Sertoli hücrelerinden farklı olarak foliküller içerisindeki granüloza hücreleri birbirleriyle sıkı bağlantı oluşturmazlar. Böylece kan damarları ile folikül sıvısı arasında madde alış-verişi gerçekleşebilir. Oosit ve folikülün normal gelişimi için, besin maddeleri ve sinyal moleküllerinin folikül sıvısına, granüloza hücrelerinin oluklu bağlantıları aracılığıyla da oosite geçişi oosit ve folikülün normal gelişimi için gereklidir.

Granüloza hücreleri çoğalırken çevredeki stroma hücreleri de folikülü bağ dokusundan oluşmuş bir kılıfla sararak teka tabakasını oluşturur. Teka tabakası geliştikçe iki tabakaya farklılaşır. **Teka interna** adı verilen iç tabaka oldukça damarlanmış, kübik salgı hücrelerinden oluşur. Bu kübik hücreler farklılaşarak steroid üreten hücreler haline dönüşürler. Luteinleştirici Hormon (LH) reseptörü taşıyan hücreler östrojen öncülü androjenleri salgırlar. Teka interna tabakası fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağıyla tipik bir endokrin organ görünümü sergiler. Dışta bulunan diğer tabaka **teka eksterna** (Resim 3), içerdiği kollajen demetleri ve düz kaslarıyla daha çok bir kapsül görevi görür. Teka eksterna tabakası ile ovaryumun stroması arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamasına rağmen teka interna ile granüloza tabakası arası sınır burada bulunan bazal lamina (membrana limitans eksterna) ile oldukça iyi belirlenmiştir (27).

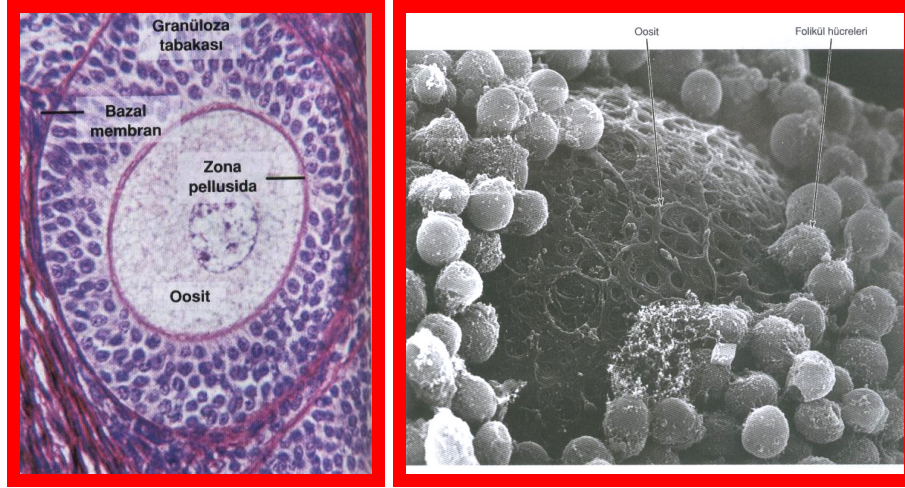
2001 yılında yapılan bir çalışmada, oogonyumların çevresini saran folikül epitel hücrelerinin, oogonyumlar için kontrollü bir çevre sağlayarak, kan akışıyla gelebilecek zararlı maddelere karşı korudukları belirlenmiştir (34).



**Resim 3.** Sekonder bir folikülde teka interna ve eksterna tabakaları (32).

Oosit, folikül gelişimi sırasında kendi çevresinde, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir membran olan **zona pellusidayı (zp)** oluşturur (Resim 4). ZP; homojen, asidofilik, PAS (+) ve oldukça iyi boyanan jel kıvamında bir yapıdır (27). Zona pellusida 3 farklı glikoproteinden meydana gelir: 200 kDa ağırlığında ve dimerik yapıda olan ZP1; 120 kDa ağırlığında olan ZP2 ve 83 kDa ağırlığında olan ZP3.

ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla ZP1 dimerleri tarafından birbirlerine bağlanarak uzun filament kompleksini oluştururlar. Sperm bağlanması sırasında, ZP3'e bağlı olan O-oligosakkaridler sperm reseptörleriyle ilişkiye girerler. Yalnızca akrozomal reaksiyona girmiş sperm ZP3'e bağlanabilir (35).



**Resim 4.** Solda ışık mikroskopik bir kesitte; çok tabakalı primer bir folikülde oosit, zp ve granüloza hücreleri görülmekte. Sağda ise zp ve granüloza hücrelerinin elektron mikroskopik görüntüleri izlenmekte (32).

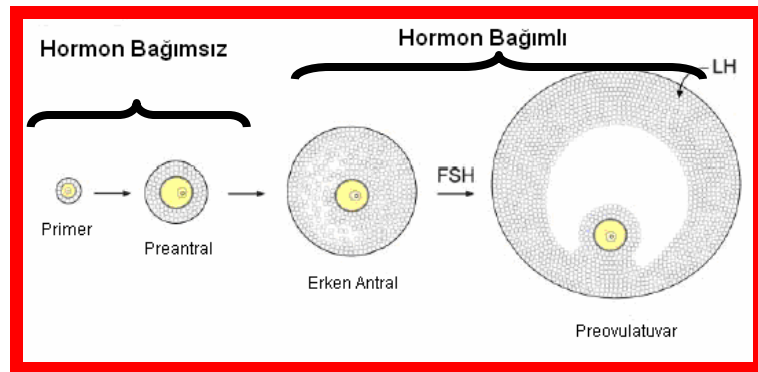
#### 2.1.4.3. Sekonder (Antral) Folikül

Büyümeye devam eden folikül içinde sıvı dolu bir boşluk (antrum) oluşur (33). Foliküler boşluğu dolduran sıvı kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşup yerel salgıların metabolik ürünleri ile değişmiş hale gelir (36). Antrum sıvısı (likör folikülü); hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir (35). Boşluk oluşuktan sonra folikül **sekonder (antral) folikül** adını alır. Bu aşamada oositler neredeyse olgun boyutlarına

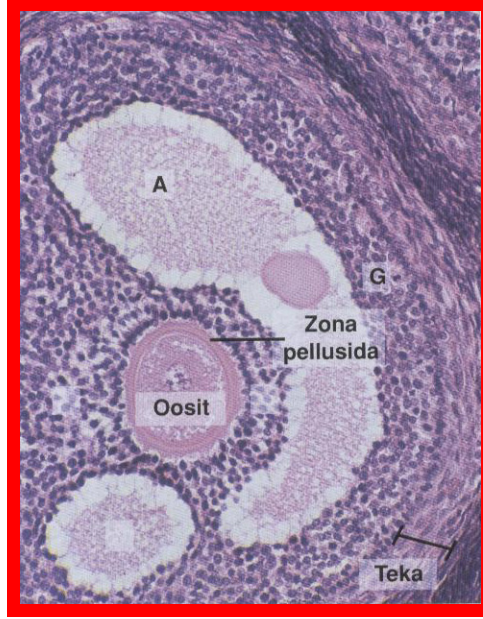
(~120µm) ulaşır ve büyümesi durur. Ancak granüloza hücreleri çoğalmaya devam eder (33).

Granüloza tabakası oositi çevreleyen bölge hariç her yerde aynı kalınlıktadır. Çevresel yerleşim gösteren oosit etrafında ise granüloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepelik oluştururlar. Burada **kümülüs ooforus** adını alan granüloza hücreleri ovulasyon sonrasına kadar oosit ile birleşik halde kalırlar. Ovulasyondan sonra **korona radiyata** tabakası adını alan bu tabaka ile oosit, aralarındaki oluklu bağlantılar aracılığıyla sürekli temasta olduklarından dolayı birlikte **kümülüs oosit bileşkesi (kompleksi) (COC)** olarak adlandırılır (27).

Ovaryumdaki gelişim unsurlarıyla belli bir çapa ulaşır boşluk meydana getiren foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerine devam edebilmek için gonadotropinlere ihtiyaç duyarlar. Yeterli miktarda hormona maruz kalan foliküller arasında meydana gelen seçilme sonucu, (canlı türüne göre değişmekle birlikte) insanlar için genellikle bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son aşamaya kadar sürdürür. Folikül gelişimi puberte öncesi ve hamilelik sırasında da meydana gelir ancak uygun bir hormonal uyarım olmadığından gelişim devam etmez (27,34). İnsanlarda preantral bir folikülden preovulatuvar folikül oluşumuna kadar yaklaşık 85 günlük bir süre geçer. Farelerde bu 10-12 gün kadardır (31).



**Şekil 3.** Gelişim halindeki foliküller. Primer ve preantral foliküllerdeki oositler izole edildiklerinde mayoz bölünmeye devam edemezken erken antral dönemden itibaren mayozu devam etme yeteneği kazanırlar. Erken antral döneme kadar oositler hormon bağımsız olarak gelişirlerken bu dönemden sonra ileri gelişim için FSH'a ihtiyaç duymaktadırlar (31,37).

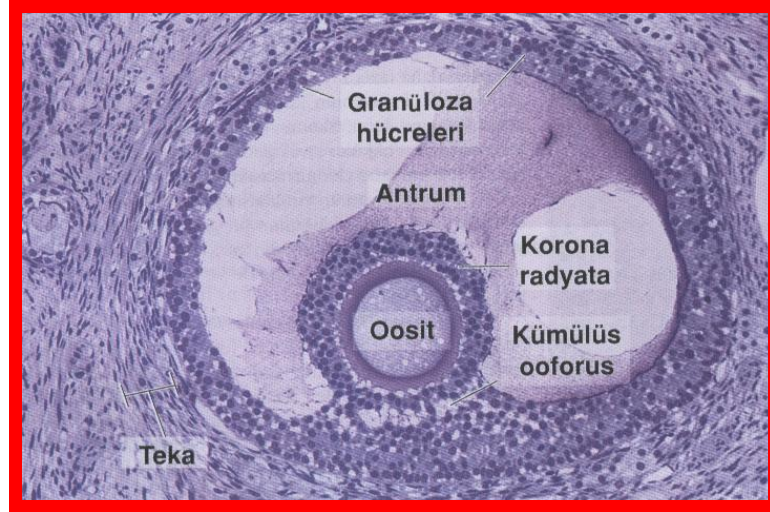


**Resim 5.** Sekonder (antral) bir folikülde oosit, zp ve granüloza hücreleri. Henüz tam birleşmemiş antrum boşlukları (A), granüloza hücrelerinin (G) arasında görülüyor (32).

#### 2.1.4.4. Preovulatar (Olgun) Foliküller (Graaf Folikülleri)

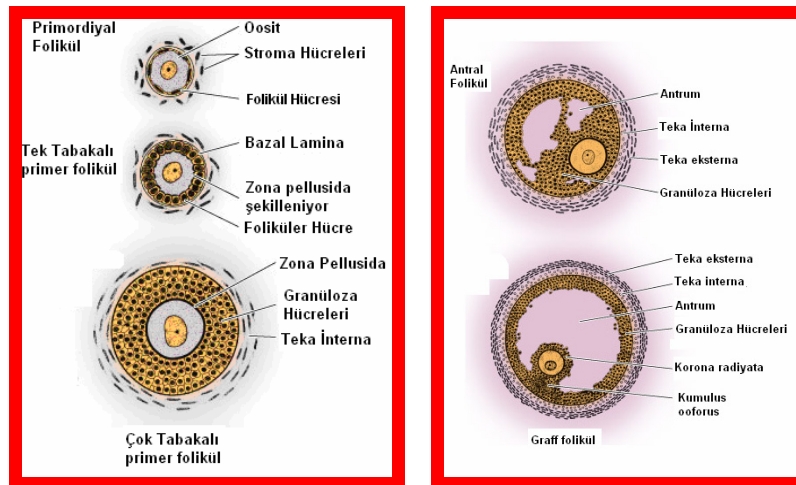
İnsanlarda, 10 mm veya daha büyük bir çapa ulaşan foliküller olgun folikül olarak adlandırılır. Oldukça büyük olduğundan dolayı ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanıp bir miktar da ovaryumun dışına doğru çıkıntı yapar. Folikül en büyük boyuna erişirken granüloza hücrelerinin mitotik aktiviteleri de azalmaya başlar. Granüloza tabakasının kalınlığı azaldıkça boşluk da genişler. COC'un, folikülün geri kalan kısmıyla bağlantısı gevşer ve ovulasyona hazırlanır.

Teka tabakası daha göze çarpar hale gelir. Teka interna hücrelerinin içinde lipit damlacıkları birikerek bu hücrelere tipik steroid sentezleyen hücre görünümü kazandırır. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerinde androjen üretimini tetikler. Östrojen öncülleri olarak görev alan androjenler buradan granüloza hücrelerinin düz endoplazmik retikulumlarına (ER) göç ederler ve FSH'ın etkisiyle östrojenlere dönüştürülürler. Artan östrojen seviyeleri granülozaların çoğalmasını ve dolayısıyla da folikülün genişlemesini artırır(27).



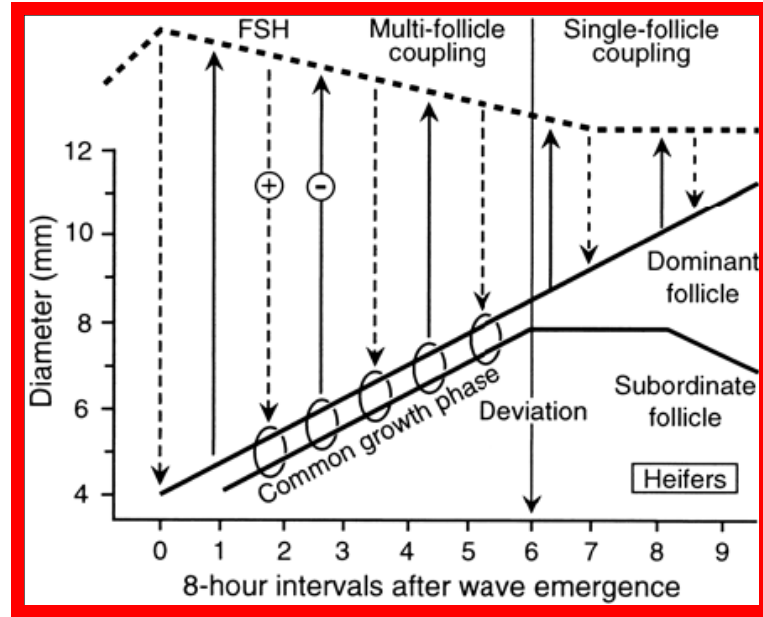
**Resim 6.** Olgun bir folikül (Graaf folikülü). Oosit kenara itilmiş durumda. Oositin hemen dışında zona pellusida oldukça belirgin. Granuloza hücrelerinin etrafında teka tabakasında gözlenmekte (32).

Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizden LH salınımı tetiklenir. Kandaki LH hormonu seviyesinde meydana gelen aşırı yükselme (pik) sonucu granuloza hücrelerindeki LH reseptörleri hassasiyetlerini kaybeder ve LH'a yanıt olarak daha fazla östrojen üretemezler. Oositin ilk mayotik bölünmesi bu dalga ile tetiklenerek durakladığı yerden devam etmeye başlar. LH yükselmesinden 12-24 saat kadar sonra gerçekleşen bu olay, oositin mayoz I'ı tamamlayarak ilk kutup cisimciğini oluşturması (maturasyonu-olgunlaşması) ve ovulasyonun meydana gelmesi ile sonuçlanır(27).



**Şekil 4.** Çeşitli gelişim aşamalarında ovaryum folikülleri (32).

Normalde her menstural döngüde bir ovaryumdaki bir folikül gelişimini tamamlar ve içindeki sekonder oositi atar. Her döngüde overler arasında dönüşümlü gerçekleştirilen bu olay zaman zaman, kendiliğinden veya *clomiphene sitrat* içeren ilaçlar gibi dış faktörler nedeniyle her iki ovaryumda da aynı anda meydana gelebilir. Bu durumda eğer döllenme gerçekleşirse çoklu gebelikler ortaya çıkabilir (27).



**Şekil 5.** Sığırlarda, FSH ile foliküllerin gelişimini karşılaştıran şematik diyagram. 0–9 arası rakamlar 8 saatlik zaman dilimlerini dikey eksen ise folikül çapını göstermektedir. 6. aralığa kadar birlikte gelişen foliküllerden biri baskın folikül olarak gelişimine devam ederken diğerleri atreziye giderek küçülmektedir (38).

## 2.2. Ovulasyon

Ovulasyon sekonder oositin Graaf folikülünden atılması işlemidir. Herhangi bir ovulasyonda atılacak olan folikül, pek çok primer folikül arasından, folikül gelişiminin daha ilk günlerinde belirlenir. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil tüm folikül duvarını geçerek karın boşluğuna atılır. Menstural döngünün tam ortası olan 14. günde gerçekleşen ovulasyon bir takım hormonal değişimlerin ve enzimatik olayların etkisiyle gerçekleşir. Bunları şöyle sıralayabiliriz:



- Glikozaminoglikanların, hormonal kontrolle, COC ile granüloza tabakası arasına yerleşmesi
- Folikül sıvısının artan hacmi ve iç basıncı
- Aktive olan plazminojen aracılığıyla folikül duvarının enzimatik proteolizi
- Prostoglandinler tarafından tetiklenen teka eksternadaki düz kasların kasılması.

Ovulasyondan hemen önce germinal epitelin preovulatar folikülle temasta olan kısmında kan akışı durur. Stigma adı verilen bir çukıntı yapar, ardından çatlayarak folikül içeriğinin karın boşluğuna dökülmesine olanak sağlar (27).

### 2.3. Oogenezis (Oositin Gelişimi)

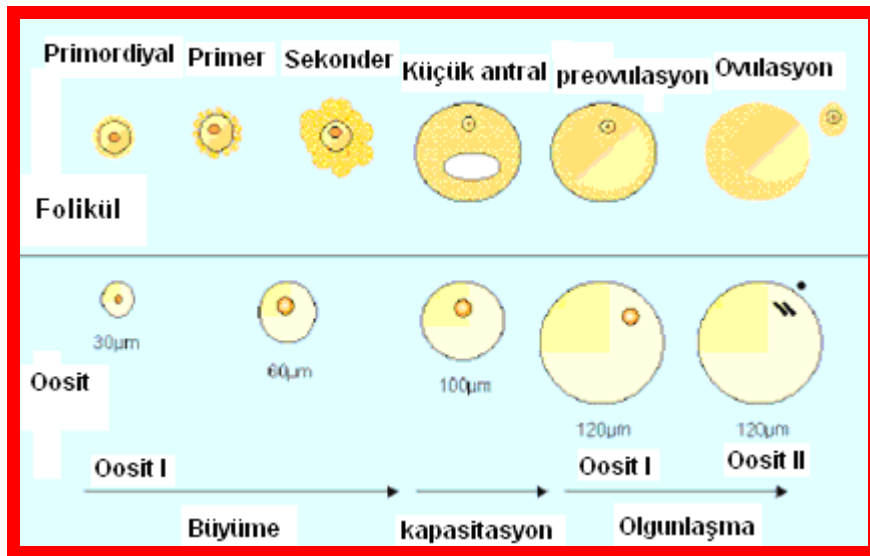
4. hafta başlarından itibaren vitellus kesesi endoderminden göç ederek gelen 10–100 kadar primordiyal germ hücresi ameboid hareketlerle, barsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca göç ederek henüz farklılaşmamış gonadlardaki birincil cinsiyet kordonları içine yerleşirler. Bu göç ve ardından gelen çoğalım, bir tirozin kinaz reseptörü olan **c-kit** ile ona bağlanan **kök hücre faktörü** tarafından kontrol edilir. Her iki madde de göç sırasında PEH tarafından üretilir. Bu iki faktörden birinin eksikliği PEH açısından gonad yetersizliği ile sonuçlanır.

Birincil cinsiyet kordonları 6. hafta dolaylarında haraplanarak yerlerini ikincil cinsiyet kordonlarına bırakır. İkincil kordonlar tarafından çevrelenen PEH, mitoz bölünme ile oogonyumlara dönüşürler.

Mitozla sayıları 7 milyona kadar ulaşan oogonyumlar, primer oosite dönüşerek mayoz bölünmeye girerler. Profaz I'de crossing over ile kardeş kromatid değişiminin ardından diplotende uzun yıllar sürecektir bir duraklama evresine girerler (35). **Mayotik arrest** olarak adlandırılan bu evre ovulasyonun hemen öncesine kadar tamamlanmaz ki bu 12–50 yıl kadar sürebilir. Oositlerin mayoz I'de beklediği süre ne kadar uzarsa dış etkenlere

maruz kaldığı süre de artacağından sonraki bölünmelerde trizomi 21 (Down Sendromu) gibi yapısal bozukluklarının meydana gelme olasılığı artar.

Puberteden sonra gelişmekte olan foliküllerde bulunan oositler, LH hormonunun salınımından yaklaşık 24–36 saat sonra ilk mayoz bölünmesini tamamlarlar. Sonrasında oluşan iki kardeş hücreden biri bölünme sırasında sitoplazmanın çoğunu alarak hacim olarak oldukça büyük olan sekonder oositi diğeri de sekonder oosite kıyasla oldukça küçük olan birinci kutup cisimciğini oluşturur. Primer oosit mayoz I'in tamamlanmasının hemen ardından mayoz II'ye geçer ancak bölünme bu kez de metafaz aşamasında kesintiye uğrar. Mayozun tamamlanması ancak döllenme gerçekleşirse olur ve oosit mayoz bölünmesini tamamlamış, II. Kutup cisimciğini atmış ovum haline gelir. İnsanlarda birinci kutup cisimi mayoz bölünmeye devam etmez. Bu nedenle mikroskop altında, zp içinde bir kutup cisimciği gözlenen oositler olgunlaşmasını (Mayoz I'i) tamamlamış, iki kutup cisimciği gözlenen oositler ise mayoz bölünmesini tamamlamış dolayısıyla döllenmiş oositler olarak kabul edilir (27).



**Şekil 6.** Sığır oositlerinin, büyüme, kapasitasyon ve olgunlaşma aşamalarının folikülün gelişim durumu ile karşılaştırılması (38).

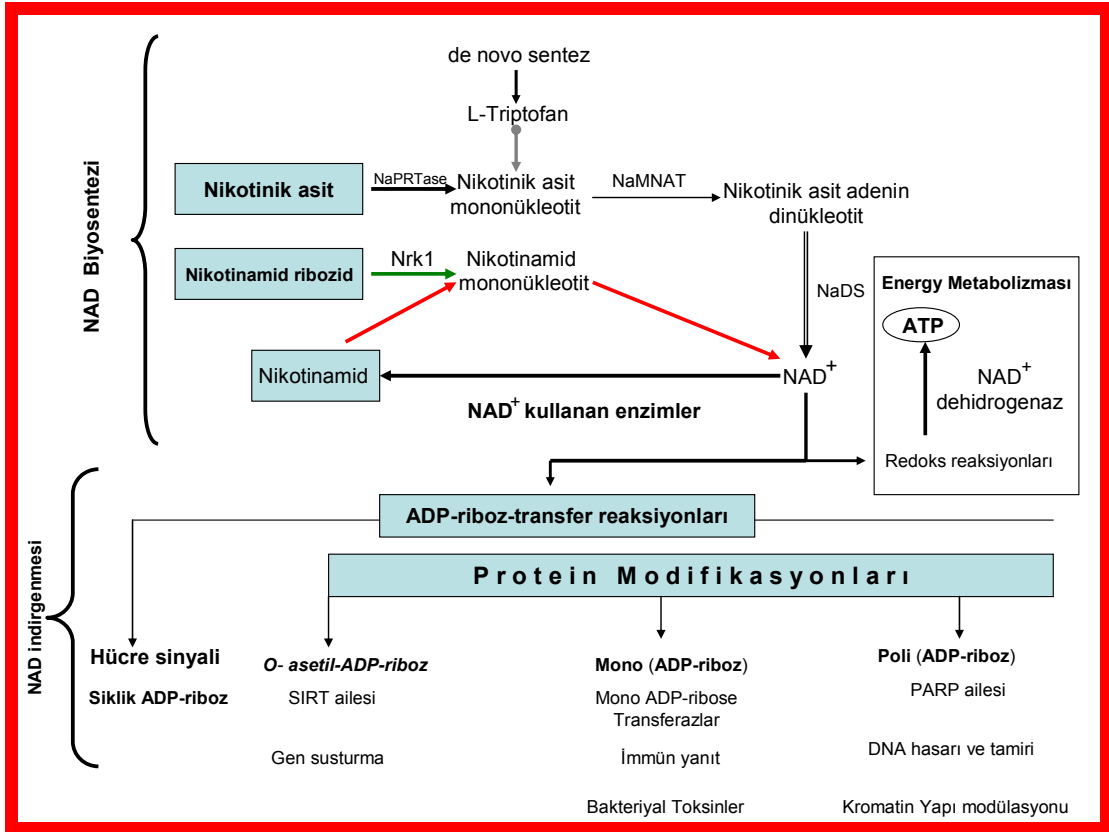
## 2.4. NAD<sup>+</sup> Metabolizması

Ökaryotik hücrelerde, NAD<sup>+</sup> in biyoenerjitik olaylarda temel bir koenzim/transmitter molekül olduğu gösterilmiştir (39-41). Mevcut redoks tepkimelerinin dengelenmesi ve ATP üretimi doğrudan olarak hücrelerdeki NAD<sup>+</sup> düzeylerine bağlıdır. Bu molekülün kimyasal yapısı, oksidatif fosforilasyon sırasında ATP'nin üretimine öncülük eden mitokondriyal elektron transport zinciri enzimleri aracılığıyla katalizlenen reaksiyonlarda hem elektron kabul edici (NAD<sup>+</sup> in oksidasyonu) hem de elektron verici (NAD<sup>+</sup> in redüksiyonu ürünü ) olarak görev yapmasına olanak tanır.

Enerji metabolizmasındaki iyi bilinen rolüne ek olarak, NAD<sup>+</sup> aynı zamanda çok yönlü ADP-ribozilasyon reaksiyonları için bir substrat veya öncül molekül gibi ayrı bir fonksiyona da sahiptir. Bu tip reaksiyonlar; nikotinamid, serbest mono-ADP-riboz, mono-ADP-ribozilasyon proteinleri, siklik ADP-riboz, NAADP<sup>+</sup>, O-AADP-riboz ve poli-ADP-ribozu da içeren çeşitli metabolitlerin şekillenmesi, hücrenin düzenlenmesi ve metabolik işlevleri de kapsamaktadır (32-35). Nikotinamid ve riboz arasındaki yüksek enerjili bağın hidrolizi sonucunda 34.3kJ/mol (8.2 kcal/mol)'luk serbest enerji açığa çıkar (44). Bu enerji, NAD<sup>+</sup> metabolizmasının dışında, ADP (ribozil)asyon enzimlerinin ADP-riboz polimerlerinin sentezinde ve ADP-riboz yapılarının proteinlere transferinde kullanılır. Serbest ve protein ilişkili poli ADP-ribozun protein düzenlenmesinde ve yenilenmesinde olduğu kadar, ikincil mesajcıların üretimi ve biyoenerjitiklerde de NAD<sup>+</sup> in çok yönlü rolleri, değişik hücresel işlevlerin düzenlenmesinde önemli fizyolojik sonuçlara sahiptir (39,40,42,45).

NAD<sup>+</sup>'ın ADP-ribozun bir alıcısı olarak bulunduğu bu düzenleyici işlevlerde, hücre içi NAD<sup>+</sup> miktarının azalmaması için devamlı bir NAD üretimine ihtiyaç vardır. Ökaryotlarda, NAD<sup>+</sup> in biyosentezi de novo sentez ve 3 farklı kurtarma yolu ile meydana gelir. NAD<sup>+</sup>, 4 farklı öncül molekülden sentezlenir: L-triptofan (de novo sentezi temsil eder), nikotinik asit, nikotinamid (Nam), nikotinamid ribozid (3 farklı kurtarma yoludur) (39,40,46). Nam kurtarma yolu, Nam dan NAD<sup>+</sup> sentezine öncülük eden ve tek bir

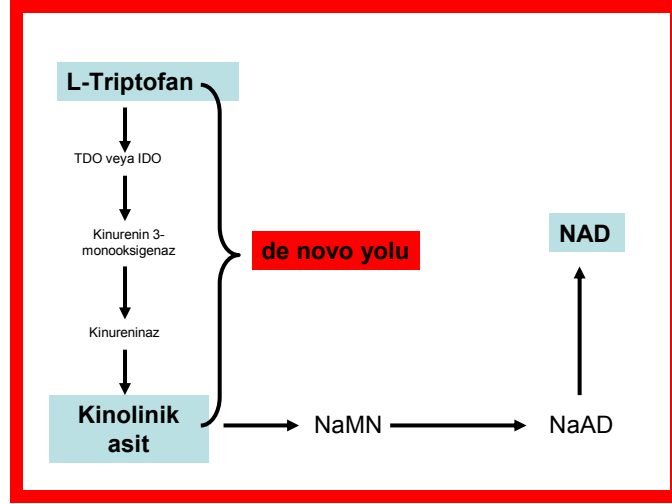
arayolu bulunan (NMN) bir yoldur. Preiss-Handler olarak bilinen nikotinik asit kurtarma yolu, iki ara yol ile devam eder; nikotinik asit mononükleotit ve nikotinik asit adenin dinükleotit. Nikotinamid ribozid kurtarma yolu nikotinamid bir öncül molekül olarak kullanır ve Nam kurtarma yolunu NMN ye bağlar (47). De novo sentez yolu triptofandan kuolinata ordanda preiss-Handler yoluna bağlanarak NaMN ye devam eder. Alternatifli  $NAD^+$  biyosentez yollarının varlığı,  $NAD^+$  metabolizmasının hücre içi bölmelenmesinde ve/veya dokudaki dağılımı büyük olasılıkla farklılıkları düşündürmektedir (39-41,48,49). Nam (nikotinamid) belkide çoğu memeli hücresinde  $NAD^+$  ın biyosentezi için temel kaynaktır (39,40).  $NAD^+$  için biyosentetik yollar ve metabolizması şekil 7'de gösterilmiştir.



**Şekil 7.** Dört farklı öncül molekülden  $NAD^+$  sentezinin izlendiği çeşitli metabolik yollar (Schreiber et al., 2006'dan değiştirilmiştir)(50).

Memeli hücrelerinde,  $NAD^+$ 'ın de novo sentezine öncülük eden kinurenin yolunda serbest halde bulunan triptofan %90 oranında metabolize edilir. Kinurenin yolu vasıtasıyla L-triptofandan kinolinik asit verilen endojen

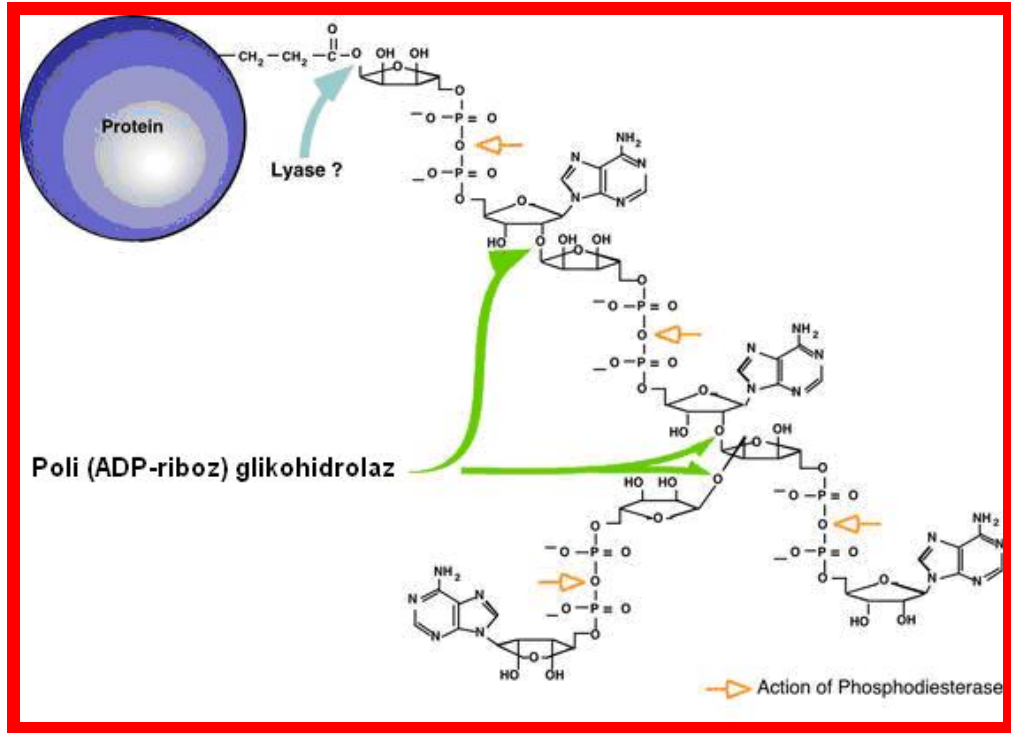
bir nörotoksin meydana gelir. Daha sonra sırasıyla NaMN (nikotinik asit mononükleotit, NaAD (Nikotinik asit adenin dinükleotit) ve sonunda  $NAD^+$  oluşumu gerçekleşir (50) (şekil 8).



**Şekil 8.**  $NAD^+$ 'ın de novo yoluyla sentezi (Rongvaux, A et al. değiştirilmiştir) (40).

## 2.5. Poli (ADP-riboz)

ADP-ribozun proteinlere aktarımı ilk olarak *Corynebacterium diphtheria*' dan elde edilen bakteriyal bir toksinde bulunmuştur. ADP-ribozun negatif yüklü polimerlerinin proteinlere eklenmesi,  $NAD^+$ 'dan PAR polimerazların (PARPs) sentezlemesi aracılığıyla gerçekleşir ve tek taraflı bir translasyon sonrası düzenlenimdir. Poli (ADP-riboz) sadece hücrenin yaşamsal faaliyetleri ve programlı hücre ölümü ile ilgili değil aynı zamanda PARP ailesinin yeni üyelerinin sahip olduğu ilişkileri ile diğer biyolojik işlevleri de düzenler. Bu işlevler arasında, transkripsiyonun düzenlenmesi, telomer kohezyonu, hücre bölünmesi esnasında mitotik içcik şekillenmesi, hücre içi beslenme ve enerji metabolizması sayılabilir (50).



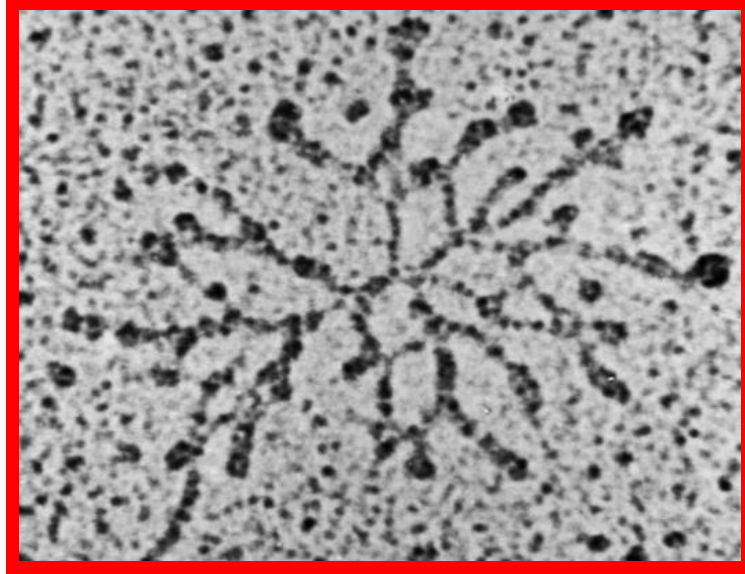
**Şekil 9.** Poli (ADP-ribozun) Yapısı (<http://betelgeuse.ustrasbg.fr>) (51).

Poli (ADP-riboz) şekillenmesi ilk olarak 1963 yılında rapor edilmiştir (52). Bu çalışma tavuk karaciğerinden hazırlanan asitte çözünmeyen nükleer preparat kesitine C-adenin işaretli ATP nin eklenmesi, nikotinamid mononükleotid ile 1000 katlanma meydana gelmesini sağlamıştır. 1966'da, Mandel'in (53) grubu pADPR'nin ve linkaj bölgesinde bağlantılı ADPR parçalarının tanımlandığı, önemli bir hidroliz ürünü olan ADP-ribozun yapısını ifade ettiler. Aynı süreç boyunca, pADPR çalışmaları Sugimura ve arkadaşları ile Hayaishi grubu tarafından yürütüldü. Fare karaciğerinden hazırlanan nükleer preparat kullanarak, NMN'nin C-adenin-ATP'den asitte çözünmeyen materyal oluşumunu büyük oranda sağladığı ile ilgili daha önceki yapılan çalışmaları kanıtladılar. Reaksiyon ürünü yılan zehiri fosfodiesteraz ile hidrolize edilmiştir. Buna rağmen, poly(A) yı adenosin monofosfata hidrolize ettiği düşünülen ürün, alkaliye karşı dirençliydi (54-58). Buna karşın, yılan zehiri fosfodiesteraz tarafından şekillenen ürünün kromotografik mobilitesi 5' AMP den farklı olup 5' ADP'ye benzerdi. Bu temel hidroliz ürünü nükleotit başına 1 mol adenin, 2 mol riboz ve 2 mol fosfat ihtiva etmekteydi. Fosfatlar ortamdaki alkali fosfomonoesterazlar tarafından

uzaklaştırılabilirdi bu da onların fosfodiester veya pirofosfat bağı içermediğini göstermekteydi. Temel hidroliz ürünü (2' veya 3')- (5'-fosforibozil)-5'AMP olduğu anlaşıldı ve fosforibozil AMP olarak adlandırıldı ve bu ürün  $\gamma$ -ADP-riboz olarak adlandırılması önerildi.

Tüm bu bulgular ışığında, çekirdekte NAD pirofosforilasyon aracılığıyla ATP ve NMN den NAD'ın oluştuğunu ve oluşan NAD'ında Poli (ADP-riboz) enzimi aracılığıyla ADP-riboza dönüştürüldüğü anlaşılmıştır (59).

Poli (ADP-ribozun) yapısına (şekil 8 ve 9) baktığımızda hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak sentezlenen düz ya da dallanmış bir kaç polimerden 200 den fazla polimere kadar oluştuğunu görebiliriz (60,61).



**Şekil 10.** Poli (ADP-riboz)'un elektron mikroskop görünümü (62).

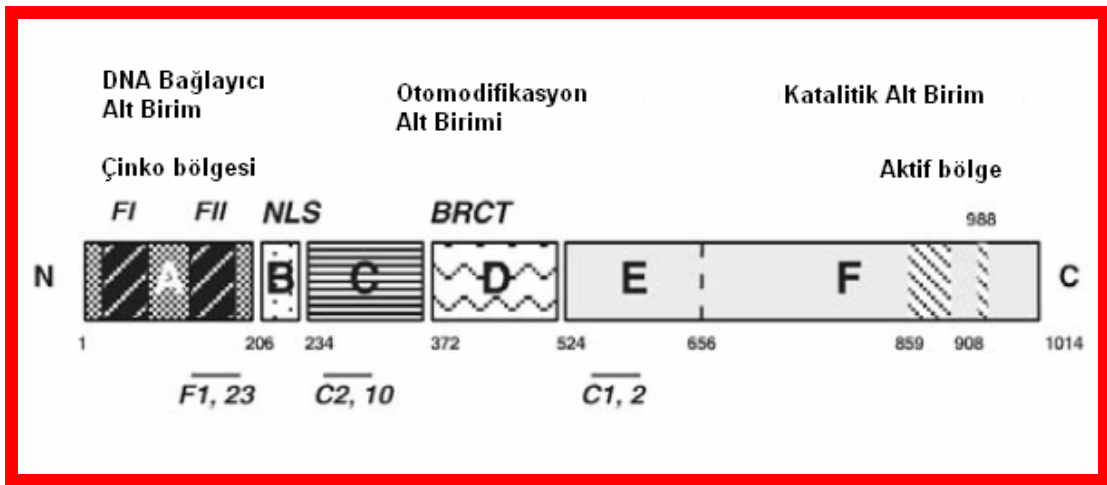
Poli (ADP-ribozil)asyon, DNA hasarına bağlı olarak hemen ortaya çıkan, histonların ve çekirdek proteinlerinin translasyon sonrası düzenlenimidir.

## 2.6. PARP (Poli ADP-riboz Polimeraz) Yapısı

PARP, çekirdekte geniş bir dağılım gösteren 113 kDa ağırlığında bir proteindir.  $\text{NAD}^+$  ( $\beta$ -nikotinamid adenin dinükleotit)'ı substrat olarak kullanıp 200 veya daha üzeri Poli (ADP-riboz) birimleri sentezleyebilir. Bir çok Poli

(ADP-riboz) akseptör protein DNA'nın doğruluğunun sürdürülmesinden sorumludur. Bunlar ; histonlar, topoizomerazlar,DNA ve RNA polimerazlar, DNA ligazlar, ve  $Ca^{+}$  ve  $Mg^{++}$  bağımlı endonüklezlerdir (63). Son çalışmalarda tümör baskılayıcı protein olarak adlandırılan p53'ün de PARP substratı olduğu bildirilmiştir (64,65).

Artık PARP'ın çok işlevsel ve son derece iyi korunmuş bir protein olduğu, mRNA'sının 3042 nükleotitten kodlandığı, 113,135 Da ağırlığında ve 1014 amino asitten meydana geldiği kesin olarak belirlenmiştir (Şekil 10)(66).



**Şekil 11.** İnsan PARP yapısının şematik organizasyonu. FI ve FII: çinko parmakları, NLS: Çekirdek bölgesi sekansı (nuclear localization sequence), Fonksiyonel alt birimler F1,23; C2,10 ve C1,2 bölgeleridir (66).

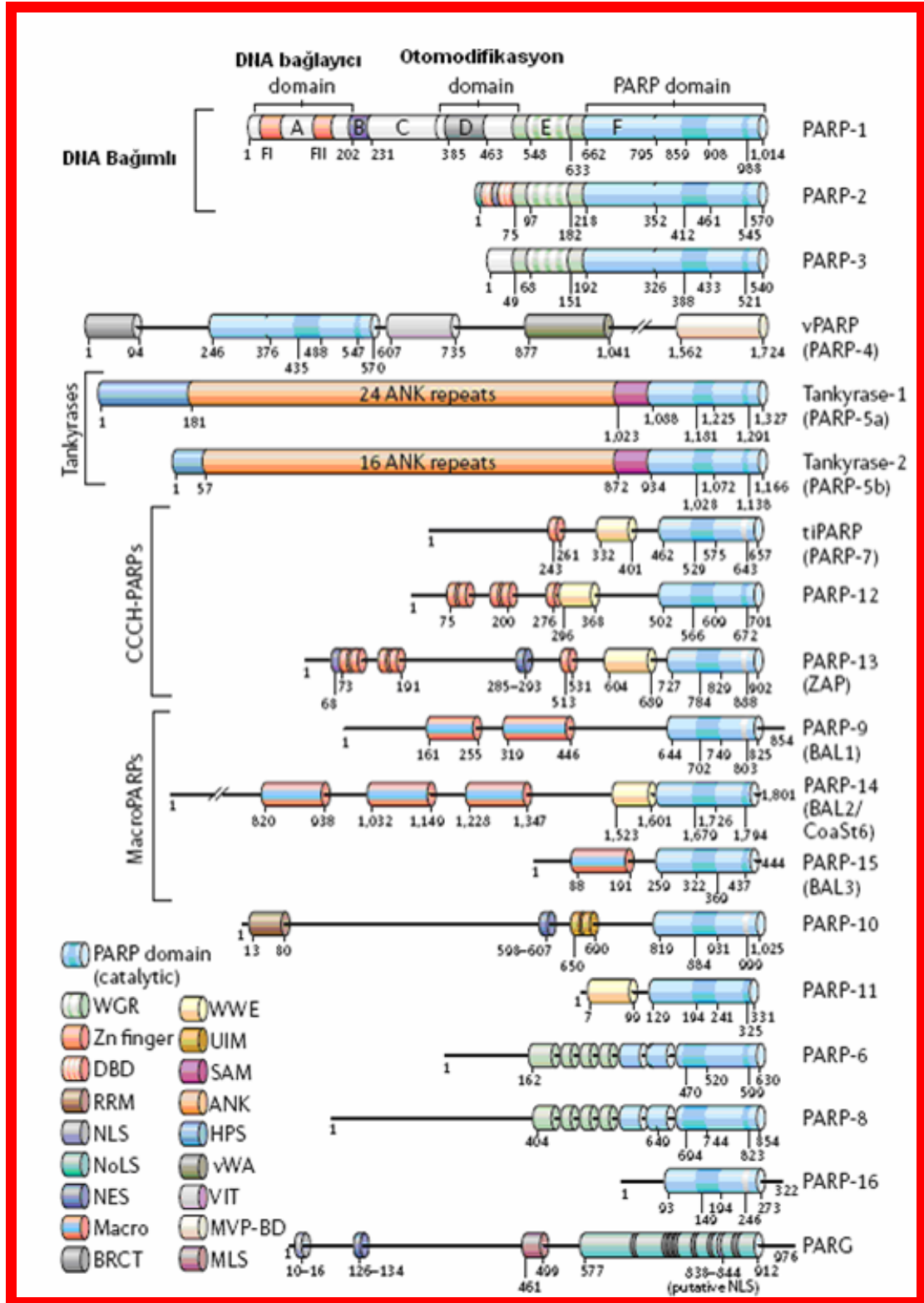
### 2.6.1. PARP Süperailisi

Uzun zamandır, memeli hücrelerinde Poli (ADP-ribozil)asyon faaliyetinden sorumlu olan tek enzimin PARP-1 olduğu düşünülüyordu. *parp1* geni olmayan farelerdeki çalışmalar ve yeni Poli (ADP-ribozil)asyon enzimlerinin tanımlanmasıyla bu düşünce değişmiştir. *parp1*<sup>-/-</sup> farelerden elde edilen primer kültür hücrelerde DNA hasarını takiben hala Poli (ADP-riboz) sentezlenebildiği gözlemlendi (67-70). Son yıllarda PARP enzimlerini kodlayan 5 yeni gen daha tanımlanmış ve böylece PARP ailesinin üye sayısı 18'i bulmuştur (71-75).



Altı temel PARP süperailesi üyeleri kendi aralarında domain yapılarına, katalitik domainlerin sekanslarına, ve enzimatik aktivitelerine göre üç alt gruba ayrılırlar (71). Şekil 9' da makalelerden derlenmiş PARP ailesinin protein yapılarının karşılaştırmaları ve sınıflandırılmaları izlenmektedir. Altgrup I de PARP-1, PARP-1b, PARP-2 ve PARP-3 yer almaktadır. Bunlardan PARP-1b, daha önceleri kısa PARP-1 olarak tanımlanmış ve *parp-1* gen bölgelerinin alternatif transkripsiyon başlatma ürünü gibi görünmektedir (71,72). Deneysel çalışmalar hem PARP-1 hem de PARP-2'nin strese karşı yanıtta farklı yolları kullanarak önemli bir rol oynadığını göstermektedir (73-78). Altgrup II'nin tek üyesi olan PARP-4'e atlayan (vault) PARP denilen PARP adı verilir. PARP-4, PARP ailesinin en büyük molekül ağırlığa sahip üyesi olup (192.6 kDa) atlamış (vault) bir komplekse sahip olduğu tanımlanmıştır. Bu atlayan kompleks, 2 tane yüksek oranda korunmuş protein ve kodlanmamış RNA ile ilişkili işlevi bilinmeyen sitoplazmik bir ribonükleoproteindir (79-81). Altgrup III'ün üyeleri ise tankiraz-1, tankiraz-2 ve bunun alternatif transkript şekli tankiraz-2b olup PARP-5, PARP-6a ve PARP-6b olarak bilinirler. Hem PARP-5 hem de PARP-6 telomerik kompleksin kısımları gibi tanımlanmıştır (80,82-86).

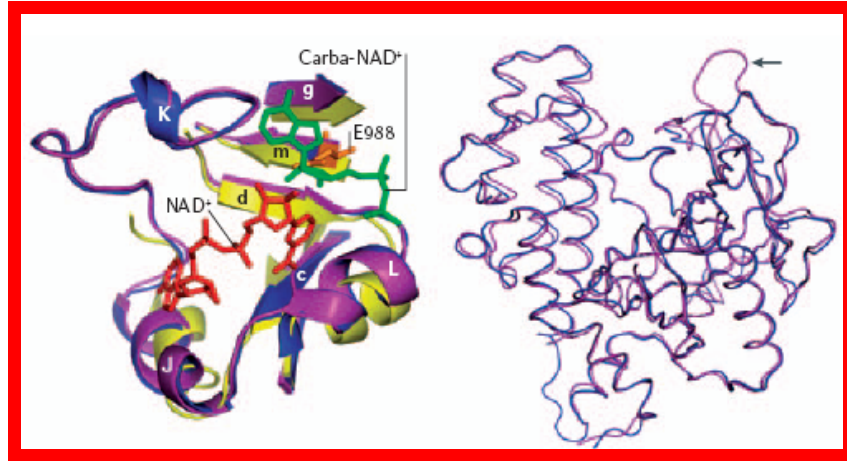
Tüm bu temel PARP enzimleri otomodifikasyon ve daha çok kovalent oto-ADP-ribozilasyon faaliyetine sahiptirler (78,80-82,84,87).



Şekil 12. Parp ailesinin domain yapıları (50).

### 2.6.1.1. PARP-1 ve PARP-2

Tavuk PARP-1 ve fare PARP-2 katalitik domainlerinin 3 boyutlu yapısının belirlenmesi ve bu proteinlerin *C.diphtheriae* toksininin bakteriyal ADP-ribozillenmiş bölgeleriyle yapısal olarak benzerlikler gösterdiği bulunmuştur (50).



**Şekil 13.** *Cornebacterium diphtheriae* toksini ile PARP-1 ve PARP-2 yapısal benzerliği (50).

PARP süperaillesinin üzerinde en çok çalışılan üyesi PARP-1 dir. DNA hasarına bağlı olarak  $NAD^{+}$ ı kullanarak daima kromatin ile ilişkili çekirdekteki kabul edici (aksptör) proteinlere çok dallı veya düz olacak şekilde ADP-riboz polimerlerini sentezler.

PARP-1 in yapı-işlev ilişkisi oldukça iyi anlaşılmıştır. Altı domainden dördünün özel fonksiyonları gösterilmiştir;

- Domain A, DNA bağlayıcı domain olarak bilinir ve DNA kırıkları ile PARP-1 arasındaki ilişkiden sorumlu olup 2 adet çinko parmak modeli içermektedir.
- Domain B, NLS için çift taraflı bir PARP-1 ve Kaspaz-3 cleavage bölgesinin bulunduğu domain.
- Domain D, otomodifikasyon bölgesidir.
- Domain F, PARP-1'in katalik bölgesidir (75).

PARP-1, DNA kırıkları ve DNA kırıklarının uzaysal onarımında anahtar bir role sahip olup bu kırıkların tanımlanmasında rol alan moleküler algılayıcıdır. Oldukça iyi korunmuş çok işlevsel bir enzim olup, katalitik faaliyet DNA kırıklarının üzerinde 500 den fazla katlantı ile ortaya çıkar. Bu fiziksel birliktelik boyunca DNA metabolizması ve kromatin yapısı poli (ADP-ribozil)asyon ve yardımcı proteinler (histonlar, HMG proteinleri, topoizomeraz I ve II, DNA helikaz, tek zincir kırık tamiri proteinleri (SSBR), baz çıkarım onarım proteinleri(BER) ve çeşitli transkripsiyon faktörleri) tarafından düzenlenir.

Kimyasal baskılayıcılar kullanılarak PARP faaliyetinin durdurulduğu *Parp-1* den yoksun farelerde yapılan çalışmalarda PARP-1'in genomik yapının bütünlüğünü ve doğruluğunun korunmasında son derece önemli bir işleve sahip olduğu gösterilmiştir (77,88-91).

PARP-2, PARP-1 eksikliği olan farelerin embriyonik fibroblastlarında PARP aktivitesinin DNA- bağımlı ucunda tanımlanmasıyla bulundu. PARP-2'nin katalitik alt biriminin PARP-1'in ki ile çok güçlü bir benzerliğe (%69) sahip olduğu bulunmuştur. Kristal yapıları oldukça benzer olan PARP-1 ve PARP-2'nin, akseptör protein bölgelerindeki farklılık metaboik yollarda kullanılan substratlarında farklı olabileceğini düşündürmektedir. PARP-2, *parp-1* eksikliği olan farelerin embriyonik fibroblastlarında PARP aktivitesinin DNA-bağımlı ucunda varlığının tespitiyle bulundu(92).

PARP-2 çekirdek proteini olup DNAaz I tarafında işlenmiş DNA ya bağlanır ve aktive olur. Bununla beraber, DNA bağlayıcı alt birimler PARP-1 den farklı olup, hedefi DNA üzerindeki çentikler değil boşluklardır. Bu DNA bağlayıcı alt birim 75 aa içermektedir. Proteini çekirdekte lokalize olup SAP alt birimi ile bazı benzerlikler göstermektedir (93).

Günümüzde PARP-2 nin kromatin düzenleyicisi olarak görev yaptığı henüz kesinlik kazanmamıştır. Genel olarak PARP-2 ve PARP-1 in birçok yolda kullandıkları yardımcı proteinler benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, TRF2 (telomerik protein) olarak adlandırılan bir proteinin sadece

PARP-2'de bulunduğu gösterilmiştir. Bu protein telomerin doğruluğunu kontrol etmektedir (94).

## **2.7. Poli (ADP-ribozil)asyon Reaksiyonlarının Biyolojik Önemi**

### **2.7.1. Poli (ADP-ribozil)asyonun Telomer Uzunluğundaki Rolü**

Telomerler, ökaryotik kromozomlarda altılı gruplar şeklinde dizilen, tekrar eden nükleotitlerden meydana gelir ve bu dizilim bazı koruyucu kompleksler ile ilişkilidir. Bu kompleksler telomer-bağlayıcı proteinler Rap1, TRF-1 ve TRF-2, POT-1, Parp-5, Parp-6/tankiraz-1 ve tankiraz-2'dir. Bu proteinler ile telomerazların telomer uzunluğunun birlikte düzenlediği düşünülmektedir. İnsanlarda telomer uzunluğunun sürdürülmesi kısmi bir feed-back mekanizması aracılığıyla kontrol edilmektedir. Örneğin TRF-1 gibi negatif bir düzenleyici kompleks telomer uzunluğu limit sınıra ulaştığında, uzunluğun son bulacağı noktada toplanır ve kromozom sonlanır.

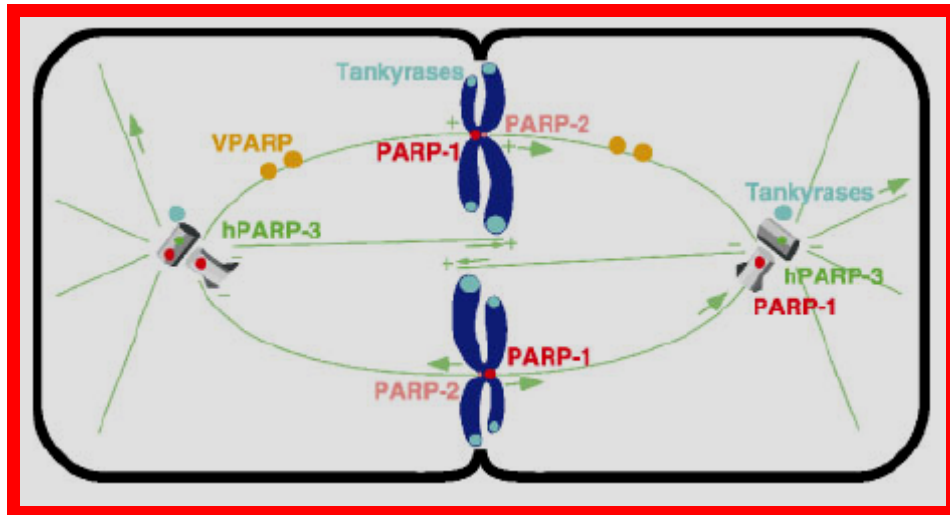
Hem parp-5 hem de parp-6'nın yani tankiraz-1 ve tankiraz-2'nin insan telomerlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Ancak TRF-1'in poli ADP-ribozilasyonu bir akseptör protein gibi olmadığı bilinmektedir. TRF-1'in, tankiraz-1 ve tankiraz-2 aracılığıyla kovalent ya da doğrudan veya serbest poli ADP-ribozun kovalent olmayan bir şekilde mi ADP-ribozillenmesi henüz kesinlik kazanmamıştır. TRF-2 fiziksel olarak parp-2 ile etkileşimdedir ve *in vitro* olarak parp-2 aracılığıyla serbest Poli ADP-riboz ürünlerini kovalent olmayan bir şekilde bağlayabildiği gösterilmiştir. TRF-2, kromozomun uçlarında koruyucu bir anahtar role sahiptir.

Tüm veriler insan hücrelerinde telomeraz aktivitesiyle uzayan telomerlerin poli ADP-ribozilasyon ile pozitif yönde düzenlenebileceğini göstermektedir. Çünkü tüm knockout fare modelleri (parp1<sup>-/-</sup>, parp2<sup>-/-</sup>, parp4<sup>-/-</sup> ve parp6<sup>-/-</sup>) anormal telomeraz aktivitesi göstermiştir(83).

### 2.7.2. Mitozun Regülasyonunda Poli (ADP-ribozil)asyonun Rolü

Mitoz, bir çift sentriyolün sentrozomları oluşturmak üzere çekirdeğin karşı kutuplarına gitmesinin ardından oluşur. Gerçekte sentrozomlar, telomerler ve mikrotübüllerin poli (ADP-ribozil)asyon enzimleriyle ilişki içinde olması süpriz olmamalıdır (şekil 11). *Drosophila* embriyoları ile yapılan son çalışmalar, DNA lezyonlarında genomik kararsızlık gösteren hücrelerin çoğalmasını önlemek ve kromazomların ayrılmasını engellemek için sentrozomların aktivasyonunu engelleyen bir yanıtın oluştuğunu göstermektedir. Bu yanıtta sentrozomun Chk2 kinaz gibi bir noktaya ihtiyacı olduğu belirlenmiştir. Mitoz süresinde DNA hasarına yanıtta PARP-1 ve/veya PARP-2'i aracılığıyla Aurora B'nin Poli (ADP-ribozil)asyonu, histon H3'ün Ser10 üzerindeki kinaz aktivitesini negative yönde düzenler.

PARP-1'in metafaz-anafaz geçişinde, anafaz-telofaz geçişi kadar mitoz bölünme esnasında çeşitli lokalizasyonda yer aldığı belirtilmiştir. PARP-2 de prometafaz esnasında sentromerlerde yerleşmiş ve PARP-1 ile aynı araçları kullanmaktadır. Bu araçlar; CENP-A, CENP-B ve Bub3'tür (67).



**Şekil 14.** PARP süperalesi ve hücre bölünmesi. PARP süperalesi üyelerinin mitoz bölünmede hücre içi yerleşimleri izlenmekte (67).

### 2.7.3. Apoptozis Sürecinde Poli (ADP-riboz) Sentezi

Apoptozis, çok hücreli organizmaların homeostazis ve gelişiminin kontrolünün sağlanması amacıyla gerçekleşen fizyolojik bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu hücre ölümü organogenezisi de kapsar. Apoptotik hücre ölümünün gerçekleşmemesi kanser ile sonuçlanır. Apoptotik uyaranlar arasında, DNA hasarı, kimyasal ajanlar (proteinlerin veya nükleik asitlerin sentezini baskılayanlar), büyüme faktörlerinin bulunmaması ve hücre ölüm reseptörlerinin aktive edilmesi yer alır.

PARP aktivitesinin DNA hasarını takip eden süreçte hücre içindeki NAD miktarı ile yakından ilişkili olduğu bulunmuştur. Apoptozis esnasında hücre içi NAD miktarının azalmasının PARP aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Apoptozis sürecinde PARP aktivasyonunun rolü daha çok Poli (ADP-riboz) seviyelerinin ölçümünden sonra anlaşılmıştır. Poli (ADP-riboz)'a karşı kullanılan bir antikor ile apoptotik HeLa ve HL60 hücrelerinde Poli (ADP-riboz) sentezinin varlığı gösterilmiştir. Knockout fare modellerinden elde edilen bilgiler apoptozisi uyaran faktörler arasında yer alan anti-FAS ajanının, PARP yokluğunda apoptozisi engellediği rapor edilmiştir (66).

### 2.8. PAR Katabolizması

PAR zincirinin parçalanması ADP-riboz birimleri arasındaki glikozidik bağı hidroliz eden böylece serbest ADP-riboz oluşturan, hem ekzo hem de endo glikosidaz aktiviteli bir enzim olan poli (ADP-riboz) glikohidrolaz (PARG) aracılığı ile yapılır.

Memelilerde aynı gen tarafından kodlanan çeşitli PARG proteinleri aynı zamanda PARP proteinlerini de içeren çeşitli hücresel bölümlere yerleşmiş olup aynı genler tarafından kodlanmaktadır. Nispeten daha aktif çekirdek PARG proteini (110 kDa) ve kısa bir mitokondriyal izoform (65 kDa) bu PARG proteinlerinin baskın izoformlardır (95). Bu izoformların rolü ve sitoplazmadaki yerleşimi henüz tam olarak anlaşılmamıştır.

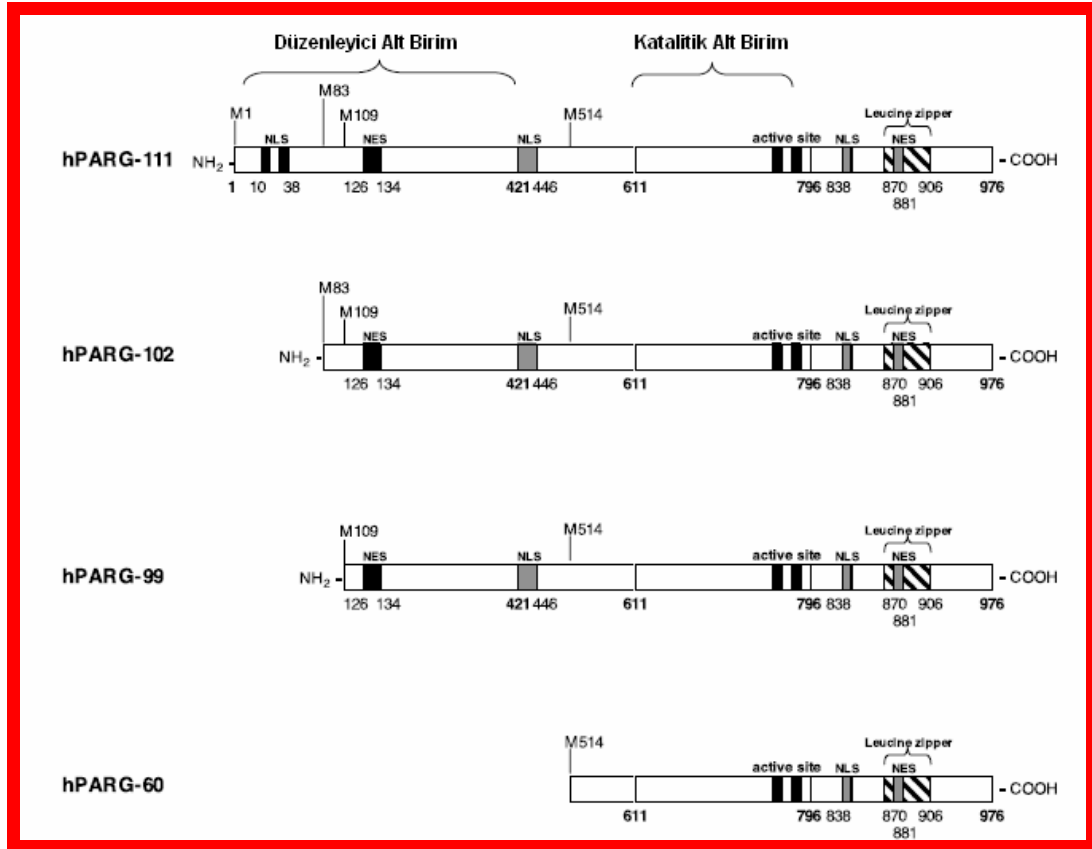
PARG'nin biyolojik rolünün detaylı bir analizi özgün ve seçici baskılayıcıların yoksunluğundan dolayı yapılamamıştır. PAR katabolizması son yapılan çalışmalarda gen-bozulma stratejileri kullanılarak araştırılmıştır. Tüm PARG izoformlarının tamamen silinmesi neticesine yol açan ekson 4'ün bilerek yok edilmesinde homozigot olan fareler PAR birikimi tarafından indüklenen apoptozinin bir sonucu olarak 3.5 embriyonik günde öldükleri gözlenmiştir(96).

Benzer şekilde *D.melanogaster* PARG geninde işlev kaybı mutasyonu, larva aşamasında (97) PAR-birikiminin - uyardığı nörodejenerasyon ile ilişkili olup artan bir öldürücülüğe yol açar. 2. ve 3. eksonlarının bilerek silinmesi sonucunda ise homozigot olan farelerin belirgin bir fenotipleri ve normal PAR metabolizmaları olmadıkları görülmüştür (98).

İlginç bir şekilde bu knockout fare modellerinde 110-kDa ağırlığındaki PARG izoformunun tüketilmesi ama 65-kDa ağırlığındaki mitokondriyal versiyonunun 3.3 kat birikmesi ve mutant farelerin genellikle translasyon başlangıç bölgesinde tespit edilmesi gözlemlendi. PAR'ın mitokondriden apoptozis indükleyen faktörün serbest bırakılmasını tetikleyen PAR eğilimini göz önüne alınca PAR aşırı birikimi ve bunun doğal sonucu AIF tarafından uyarılan hücre ölümü 65-kDa PARG izoformunun yukarı yönde düzenlenmesi ile telafi edilebildiği bildirilmiştir. (99,100)

Bu genetik yaklaşımların dışında PARG'nin mevcut işlevi ve çeşitli izoformlarının (şekil 11) hala moleküler ve hücresele seviyelerde araştırılması gerekebilir. PAR yıkımı için alternatif bir yolun son zamanlarda tanımlanması, yapısal olarak PARG ile ilişkisiz (ARH3 (ADP-ribozilarjinin hidrolaz-3)) olan 39-kDa ağırlığındaki proteini aracılığı ile yapıldı, fakat bu olay PAR'ın hidroliz aktivitesi göstermesine ve dolayısıyla PAR metabolizmasının daha da karmaşıklaşmasına yol açtığı gözlenmiştir (101).

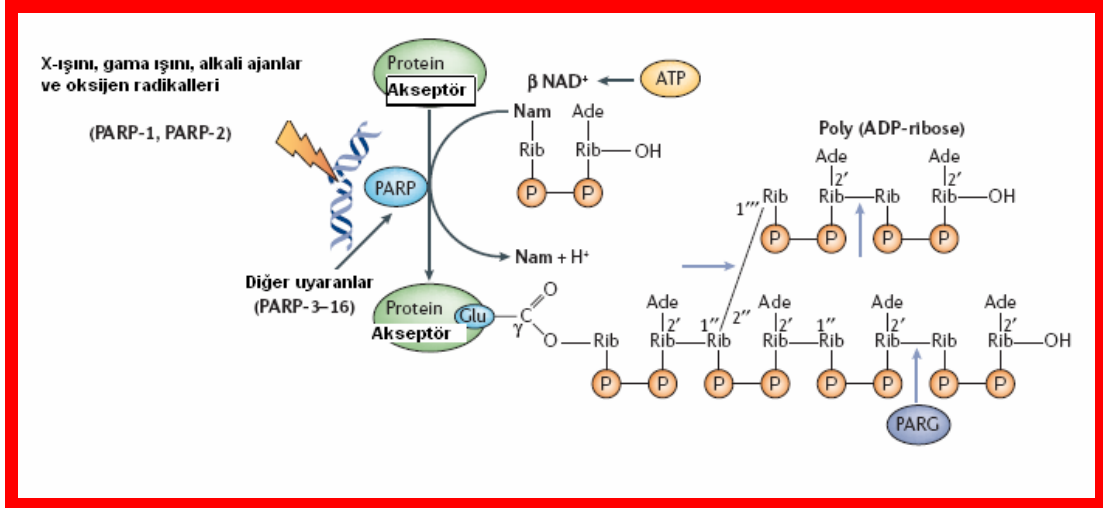




Şekil 15. İnsan PARG izofomlarının alt birim yapıları (83).

## 2.9. DNA-hasarına Bağlı PAR Sentezi

Şimdiye kadar sadece PARP-1 ve PARP-2 aktivitelerinin DNA da ki kesiklerin varlığı ile yüksek derecede uyarıldığı gösterilmiştir (şekil 16) (78). PARP-1, aynı zamanda SSB/BER enzimi DNA ligaz III ve *Arabidopsis thaliana*'dan tamir enzimi DNA 32 fosfoesterazda da buluna DNA kırmada hassas motifi tanımlayan iki  $CX_2CX_{28,30}HX_2C$  çinko parmakçıklar yoluyla DNA tespitinde oldukça etkindir.

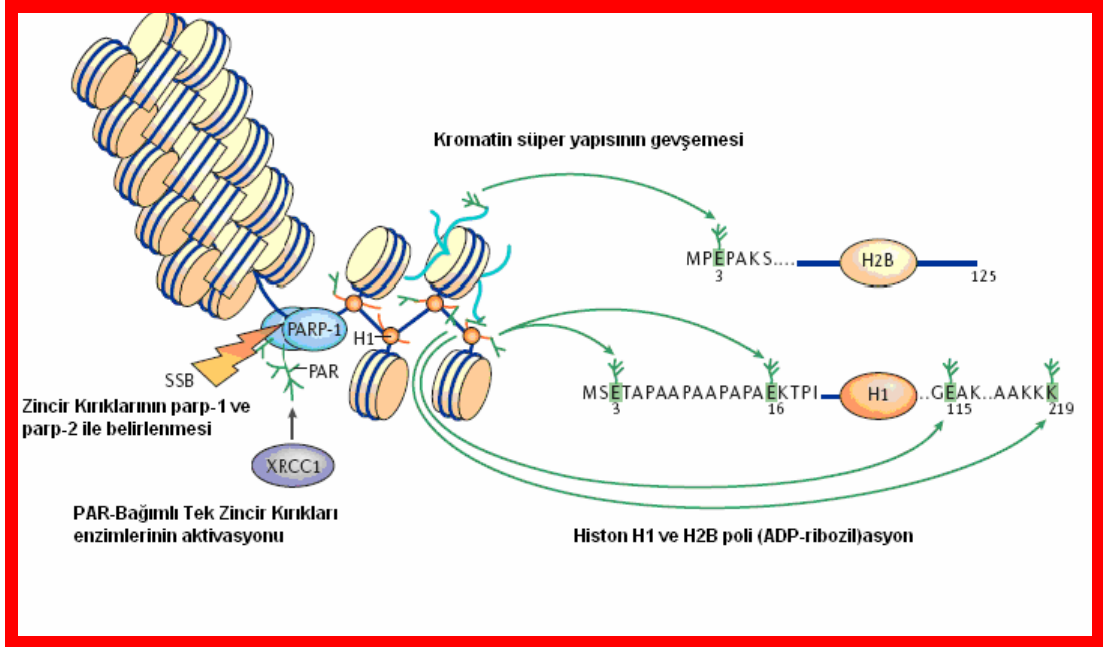


**Şekil 16.** DNA hasarı ve tamirinde poli (ADP-riboz)'un metabolizması. DNA zincir kırıklarına bir yanıt olarak poli (ADP-riboz) polimerazlar (özellikle parp-1 ve parp-2)  $\text{NAD}^+$  hidrolize olur ve Nam (nikotinamid) ve bir proton ( $\text{H}^+$ ) açığa çıkar (50).

Sonuçta PAR üretiminin üç amacı vardır (şekil 17): Birincisi DNA-hasarını indükleyen histon H1 ve H2B N- ve C-terminallerinin poli(ADPibozil)asyonu veya serbest veya PARP-1-bağlı PAR ile bu proteinlerin seçici etkileşimi 30-nm kromatin lifinin gevşemesine katkıda bulunur ve kırılmalara erişimini artırır; ikincisi, DNA hasarının vuku bulmasını ve boyutunun sinyalini verir. Böylece hücre yaralanmanın şiddetine göre uyarlamalı bir yanıt kurabilir (DNA tamiri veya hücre intiharı); üçüncüsü, lezyon alanına SSBR/BER faktörlerinin hızlı bir şekilde alınmasına aracılık eder.

XRCC1'in poli(ADPribozil)'lenmiş PARP-1 ile etkileşimde olduğu gösterilmiştir. In vivo olarak katı biçimde PAR'a bağlı hasar gören yere XRCC1 alımı tek kenarlı kırılmaları (SSBler) veya çift kenarlı kırılmaları (DSBler) bölgesel olarak mikroskop filtreler veya fotoaktivatör Hoescht 33258 varlığında lazer mikroirrdasyon ile tanıtıldığı hücreler içinde hassasiyetle gösterilmiştir. İki yaklaşım içinde PAR sentezinin kimyasal baskılanması hasarlı bölgeye XRCC1 alımını durdurdu. Benzer bir sonuca *Parp-1<sup>-/-</sup>* hücreleri ışınlanması sonrasında ulaşıldı. XRCC1 alımının engellenmesi sonraki tamir sürecini etkiler çünkü XRCC1 tamir enzimlerinin çoğunu uyararak ederek SSBR/BER sistemini işletir. Bu durum muhtemelen *Parp-1<sup>-/-</sup>*

hücrelerinde gözlemlenen kenar kırığının yeniden birleşmesini ve genom entegrasi üzerindeki ve hücre yaşamının sürdürülmesindeki zararlı etkisini izah etmektedir.



**Şekil 17.** Tek zincir kırık tamir mekanizmasında PARP-1 (50).

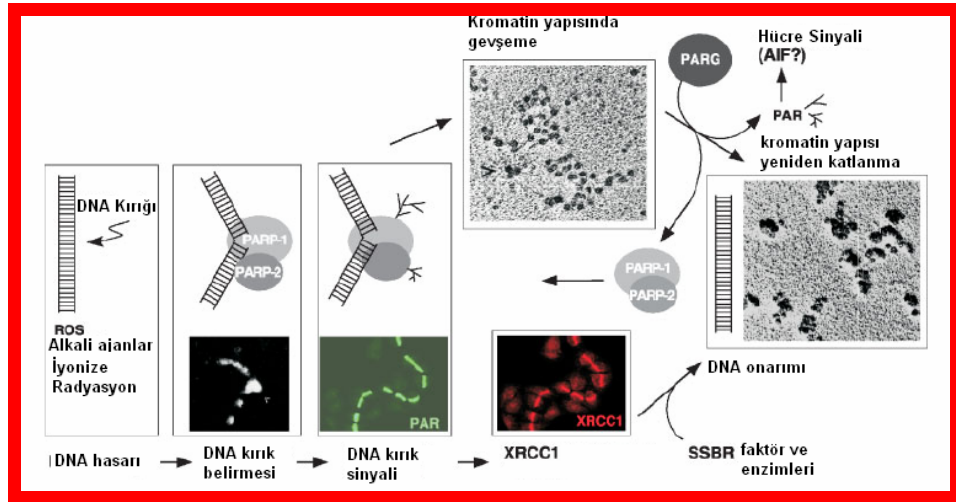
Son zamanlarda rapor edilen kromozom organize eden kompleks yoğunluğunun baz hasara yanıt olarak PARP-1 ve XRCC1 ile etkileşim kurması rapor edilmiştir. Dolayısıyla bölgesel kromatin ve DNA yapısal organizasyonunun etkin BER'e imkan vermesine katkıda bulunabildiği belirlenmiştir (50).

PARP-2 PARP-1'e benzer şekilde XRCC1 ve diğer SSB/BER faktörleriyle etkileşim içindedir (DNA polimeraz ve ligaz III). Parp-2<sup>-/-</sup> hücreleri genotoksik araçlara oldukça duyarlıdır ve SSB yeniden birleşmesinde bir gecikme gösterdikleri ifade edilmiştir(90).

PARP-1 in memeli hücrelerindeki tek zincir kırıklarını onarımındaki rolü şimdi daha iyi anlaşılmaktadır, sadece PARP1 aktivitesinin olayı tamamen yürüttüğü *in vitro* ortam değil, aynı zamanda DNA lezyon bölgelerinde PAR sentezinin yapıldığı canlı hücrelerde de PARP1, anahtar role sahip XRCC1'in

toplanma kinetiğinde de önemlidir. Bu önemli özellik Okano ve arkadaşları tarafından gözlenmiş ve (şekil 18)'te gösterilmiştir. Artan PAR sentezi prolifere hücrelerde laser microışıında Hoechst varlığında 337nm de anında tesbit edilmiştir. PARP-1 olmayan hücrelerde XRCC1'in dinamik toplanmasının olmayışı, zincir kırığında yeniden birleşmenin gecikmesini ve oluşan büyük DNA tamir defektini açıklamaktadır (75).

Bununla beraber PARP-2 XRCC1 alımı için gerekli değildir ve SSB'leri fark etmez ama bunun yerine boşlukları veya dalgalı yapıları fark eder bu da PARP-2'nin tamir adımlarının sonraki adımlarında muhtemelen ilişkili olduğunu gösterir. PARP-1, PARP-2 ve PAR doğrudan DSB tamirinde katılımı açık bir soru olarak kalmaktadır. PARP-1 homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uç birleştiren (NHEC) ile DSB tamiri için elzem görülmeyebilir ama alternatif bir yol olarak işlev gösterebilir. DT40 tavuk hücreleriyle yapılan bir çalışmada PARP-1'nin aslında NHEJ karışmasından HR'yi koruyabileceğini gösterdi (50).



Şekil 18. DNA hasarına hücresel yanıtta çok yönlü PARP fonksiyonu (67).

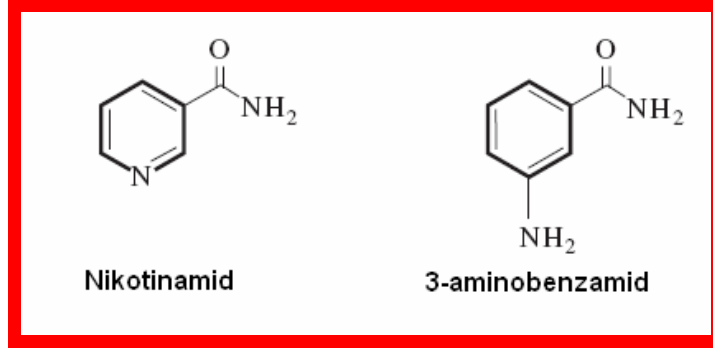
## 2.10. PARP'ın Kimyasal Baskılayıcıları

Son yıllarda çok çeşitli PARP baskılayıcıları tanımlanmıştır. Bu bileşikler PARP'ın biyolojik işlevlerinin ve fizyolojik öneminin anlaşılması amacıyla kullanılmıştır. Hasta hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda

PARP baskılayıcıları test edilmiştir. Bu testlerin sonuçlarında doku hasarı ve hücre ölümünde PARP faaliyetinin çok önemli olduğu bildirilmiştir (66).

### 2.10.1. Monosiklik Karboksiamidler

Nikotin amid (Niyasinamid veya B3 vitamini) ve 3-aminobenzamid bu grupta yer alan PARP baskılayıcılarıdır (Şekil 19) (66).



Şekil 19. Yaygın olarak kullanılan PARP baskılayıcıları (66).

### 3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada 3-4 haftalık ve 12 aylık fare ovaryum dokularında Parp-1 enziminin varlığını gösterebilmek için, western blot, pcr ve çeşitli immün boyama yöntemleri kullanıldı. Ayrıca genç ve yaşlı bireylerin ovaryumdaki folikül sayılarının dağılımını ve bu dağılım ile poli (ADP-ribozil)asyon olayının arasındaki ilişkisinin anlaşılabilmesi için folikül sayımı da yapılmıştır.

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Yale Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından elde edilen 3-4 haftalık ve 12 aylık olan CD-1 ve 129S cinsi toplam 32 adet dişi fare kullanılmıştır. Fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda, oda ısısında, yiyecek ve suya sınırsız erişim şartlarında korunmuştur.

##### 3.1.2. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

KİMYASAL ADI	MARKA	KATALOG NO
2-Mercaptoethanol (HOCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SH)	Sigma	60-24-2
30% ACRYL/BIS SOL 37.5	Bio-Rad	161-0158
Biotinylated Anti-mouse PARP antibody	R&D	BAF600
CeLlytic™ MT Cell Lysis Reagent	Sigma	C-3228
Chemiluminescent detection	NEN Life Sci.	NEL-103
Cleaved PARP p25	abcam	Ab32064
Cy™3 eşek Anti-Tavşan IgG	Jackson IR	711-167-003
Dry milk	Nestle	
ECL (detection reagent 1)	Amersham	RPN2106V1
ECL (detection reagent 2)	Amersham	RPN2106V2
Eozin-Y	Merck	1.09844.1000
Etil Alkol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)		
Formaldehit (CH <sub>2</sub> O)	J.T. Baker	7041
Hematoksilen	Sigma	HHS-32
Hidroklorik asit (HCl)	J.T. Baker	6081

Kaleidoscope Precision Plus Prestained STDS	Bio-Rad	161-0375
Kodak Biomax Mr Film	Kodak	
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	161-0737
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	J.T. Baker	9070-05
Methyl Green	Vector	H-3402
N,N,N,N-Tetramethylethylenediamine (Temed)	Bio-Rad	161-0801
Normal Eşek Serumu	Jackson IR	017-000-001
Normal Keçi Serumu	Jackson IR	005-000-121
Normal Tavşan immünoglobulin	R&D	AB-105-C
Normal Tavşan Serumu	Pierce	31883
Paraformaldehit	J.T. Baker	S898-07
PVDF membrane	Bio-Rad	162-0218
RGEL, 4-15% TRIS-HCL, 12 WELL	Bio-Rad	161-1176
SDS	Fisher	BP166500
Separating Buffer	American Bio.	AB13076
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Amresco	0583
Sodyum Klorür (CaCl <sub>2</sub> )	J.T. Baker	0070
Sodyum sitrat HOC(COONa)(CH <sub>2</sub> COONa) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Sigma	6132-04-3
Stacking Buffer	American Bio.	AB13075
Stripping Buffer	Pierce	21059
Substrat Kit for peroxidase	Vector	SK-4600
Triton <sup>®</sup> X-100 4-(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OH	Sigma	9002-93-1
Trizol	Invitrogen	15596-018
β-aktin	Santa Cruz	Sc-47778
Hidrojen peroksit (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma	31642
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Sigma	67-56-1
PBS	Sigma	P4417
10x running buffer	Bio-Rad	161-0772
10x transfer buffer	Bio-Rad	161-0771
1M Tris-HCl	Milipore	20-160

### 3.1.3. Gereçler

ADI	MARKA	ÜLKE
10 mL Falkon Tüp	Eppendorf	A.B.D
50 mL Falkon Tüp	Eppendorf	A.B.D
Buzdolabı	Whitehouse	A.B.D
Dijital Kurutma Banyosu	Labnet	
Dikey elektroforez düzeneği	Bio-Rad	Almanya
Distile su cihazı	Milipore	Fransa
Doğru Akım Güç Kaynağı	Bio-Rad	Almanya
Eppendorf Tüpler	Eppendorf	A.B.D
Etüv		
Hassas terazi		
Manyetik karıştırıcı		
Mikrotom	Bright	A.B.D
Otomatik Pipet Seti	Eppendorf	A.B.D
Otomatik Pipet Uçları	Eppendorf	A.B.D
pH metre	Corning 340	Kanada
Santrifüj (5415D)	Eppendorf	Hollanda
Vortex	Eppendorf	A.B.D

### 3.1.4. Solüsyonlar

#### 1. %4 lük Paraformaldehit

Protokol:

- 90 ml H<sub>2</sub>O
- 4gr paraformaldehit
- 10 NaOH
- 10 ml PBS

90 ml su kaynatıldı, paraformaldehit suya eklendi, 1-2 damla NaOH ilave edilip soğutmaya bırakıldı ve üzerine PBS eklendi. +4 °C' de saklandı.



2. %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Protokol:

- 90 ml methanol
- 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30)

## 3. %2 lik Triton X-100

Protokol:

- 998 ml PBS
- 2ml Triton

## 4. %10 luk Normal Keçi Serumu

Protokol:

- 900 ml PBS
- 100 ml Normal Keçi Serumu

## 5. Na-Sitrat

Protokol:

- 58.8 g Na-sitrat
- 2000 ml distile su

pH=6.0 olacak biçimde hazırlandı.

## 6. Transfer Buffer

Protokol:

- 400 ml 10x transfer buffer
- 800 ml methanol
- 2800 ml distile su

## 7. Running Buffer

Protokol:

- 100 ml 10 running buffer
- 900 ml distile su

## 8. Stripping Buffer

Protokol:

- 31.25 ml 1M Tris-HCl
- 50 ml %20 SDS
- 3.5 ml Merkapttoethanol
- 415 ml distile su

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Folikül Sayımı

%4'lük Paraformaldehit ile tespit edilen ovaryum dokuları rutin histolojik takiplerden sonra parafine gömüldü ve bright marka rotary mikrotom ile 6µm kalınlığındaki kesitler lamlara alındı. Kesitler rutin Hematoksilen-eozin boyası ile boyandı ve rastgele başlamak koşuluyla her 5. kesit Harvard Üniversitesi Tıp Okulu Üreme Biyolojisi Bölümü Vincent Merkezinin protokoluna (94) göre, primordiyal, primer, preantral ve antral folikül sayıları araştırıldı. Elde edilen veriler sigmastat 3.0 programıyla istatistiksel olarak değerlendirildi.

#### 3.2.2. İmmünohistokimya

Folikül sayımı dışında kalan kesitler immünohistokimyasal çalışmalar için pozitif yüklenmiş lamlara alındı. Deparafinizasyon işlemleri sonrasında Vectastain Elite ABC kit laboratuvarın talimatları doğrultusunda immünohistokimyasal çalışmalar için kullanıldı.

Parp-1 için Boyama Protokolu:

- Deparafinizasyon (parafini giderme)
- Sodyum sitrat tamponu içerisinde mikrodalga
- %0.2 Triton-X-100
- PBS ile yıkama
- %3 lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- PBS ile yıkama
- %10 luk Eşek Serumumu
- Parp-1 Antikoru
- PBS ile yıkama
- HRP ile Muamele
- PBS ile yıkama
- DAB
- Zıt Boyama
- Dehidratasyon
- Kapama

### 3.2.3. İmmünofloresan

Floresan işaretli sekonder antikolar kullanılarak immünohistokimyasal çalışma esasına benzer şekilde gerçekleştirildi. Değerlendirmeler Bx51 Olympus marka floresan mikroskobunda değerlendirildi.

### 3.2.4. Werstern Blot Analizi

Alınan ovaryum örnekleri sıvı nitrojen ile dondurulup -80°C de saklanacak ve CelLytic™-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MD) ile proteaz baskılayıcı kullanılarak parçalandı ve protein konsantrasyonları hesaplandı. Örnekler %4 lük ve % 15 lik SDS-

PAGE den PVDF e aktarıldı (Biorad). PARP 1 için uygun primer antikor ve HRP işaretli sekonder antikor ile belirlendi. Eşit yüklemenin saptanması amacıyla aktin kullanıldı. Oluşan bantlar İmageJ programı ile karşılaştırıldı.

### 3.2.5. mRNA'nın Niceliğini RT-PCR ile Ölçülmesi

Overlerdeki toplam RNA, TRizol reagent kullanılarak ayrıldı (Invitrogen Teknolojileri). Çıkarılan RNA, DEPC suda tutularak, 260 / 280 nanometre dalga boyundaki emilme oranıyla kantifiye edildi (nicelik değeri belirlendi) ve kullanılana kadar – 80 derecede depolandı. RNA kalıbı, oligo-dT (Qiagen) kullanan Omniscript reverse transkripsiyon kiti aracılığıyla transkribe edildi. Her 25 mikrolitrelik gerçek zamanlı PCR reaksiyonu, 12.5 mikrolitre 2x SybrGreen supermix (Biorad), her primerden 0.4 mikromolar ve 1 mikrolitre kalıp cDNA içermekteydi ve iCyclerIQ PCR sistemi (Bio-Rad) kullanılarak gerçekleştirildi. Dört genç ve dört yaşlı farelerden alınan overler testten geçirildi. Gerçek zamanlı PCR için, şu primerler kullanıldı:

Parp-1; F:GCAGAGCCTGGTGAAGTGGTG

R:GACGTGTGCAGAGTGTTCCAG

Aktin ; F:GACCTCTATGCAACACAGT

R:TTGCTGATCCACATCTGCT

Elde edilen veriler, Aktine göre normalleştirildi. Yaşlı fare grubu ile genç fare grubu overlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılmasında, Student'in t-testi kullanıldı ve 0.05'ten daha küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

### RNA izolasyonu:

- Homojenizasyon
- 5' oda sıcaklığında bekletme
- Tüplere kloroform ekleme
- 3' oda sıcaklığında bekletme
- Santrifüj 15' 11.000 rpm
- 2-isopropanol ekleme
- 10' oda sıcaklığında bekletme
- Santrifüj 10' 11.000 rpm
- Süpernatant atılır, peletin kuruması beklenir
- %70'lik alkol ile yıkama
- Vorteks
- Santrifüj 5' 7000 rpm
- Süpernatant atılır, 15' kuruma için beklenilir
- Distile su ile yıkama
- 55°C lik su banyosu 10'
- Buzda bekletme
- Kontrol tüpü hazırlama
- Spektrofotometrede okutma

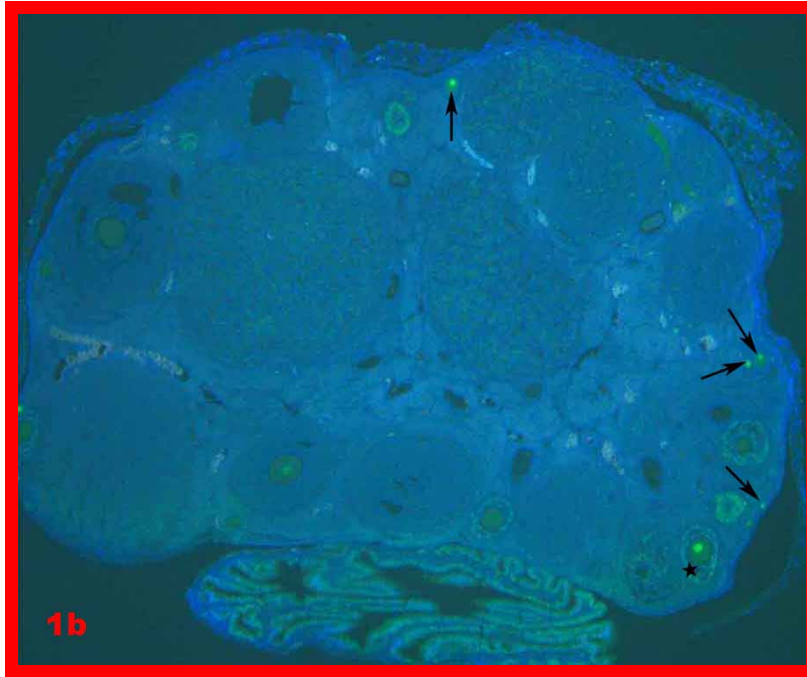
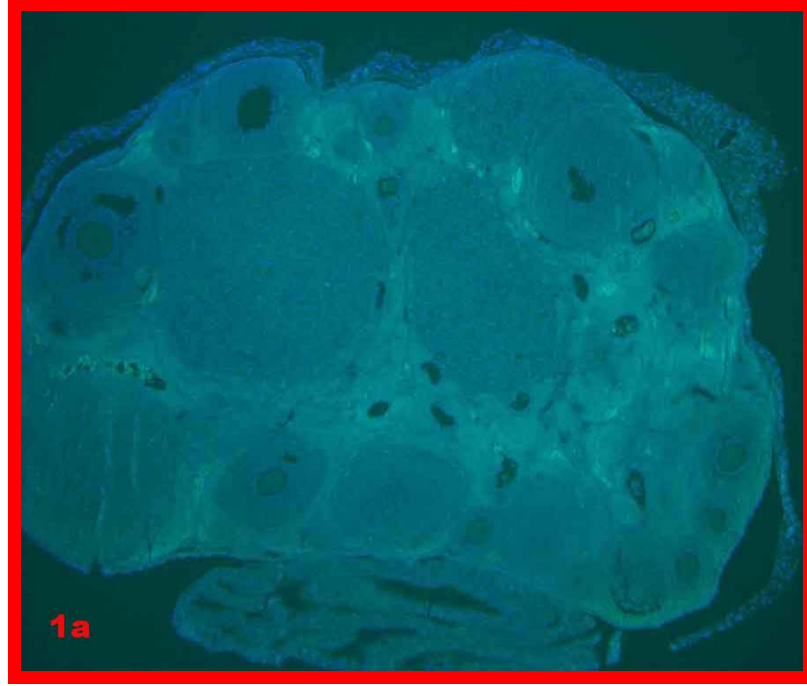
## 4. BULGULAR

### 4.1. Folikülogenezis ve Oogenez Sürecinde PARP-1'in Varlığı

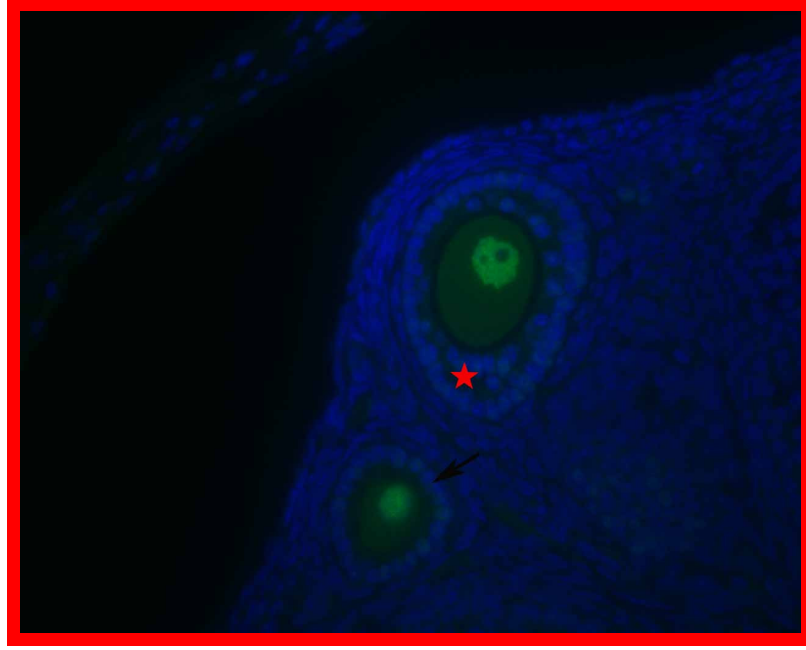
Fare ovaryumunda uyguladığımız immünohistokimyasal ve immünofloresan yöntemler sonucunda PARP-1 in foliküler gelişim esnasında ovaryum dokusunda ifade edildiğini gözlemledik. PARP-1 primordiyal folikülden olgun foliküle kadar tüm folikül gelişim evrelerinde özellikle oosit çekirdeğinde oldukça kuvvetli bir boyanma gösterdiğini bulduk. Buna ek olarak primer folikül evresi ve sonrasında çok kuvvetli olmamakla beraber PARP-1 in bazı granüloza hücrelerinde de var olduğunu gözlemledik (Resim 7-19).

PARP-1'in ovaryum dokusunda varlığını tespit etmek amacıyla hem western blot yöntemi hem de RT-PCR yöntemini kullandık. Western blotlama yöntemine göre hem grup I (genç hayvan grubu) hem de grup II (yaşlı hayvan grubu) Parp-1'in varlığını tespit ettik. Gruplar arasında farklılık yoktu. Ancak bireyler arasında farklılık belirgindi. Eşit yükleme yapıp yapılmadığını test etmek amacıyla aktin yöntemini kullandık. Sonuç olarak sadece yaşlı grubun 4. hayvanında eşit yükleme yapılamadığını gözlemledik. Tüm bu sonuçları yorumladığımızda PARP-1 proteinin hem yaşlı bireylerde hem de genç bireylerde varlığını tespit ettik (Resim 22). Hem parp-1 hem de aktin için western blot sonuçları imageJ programıyla değerlendirilip grafik halinde şekil 20 ve 21'de gösterildi.

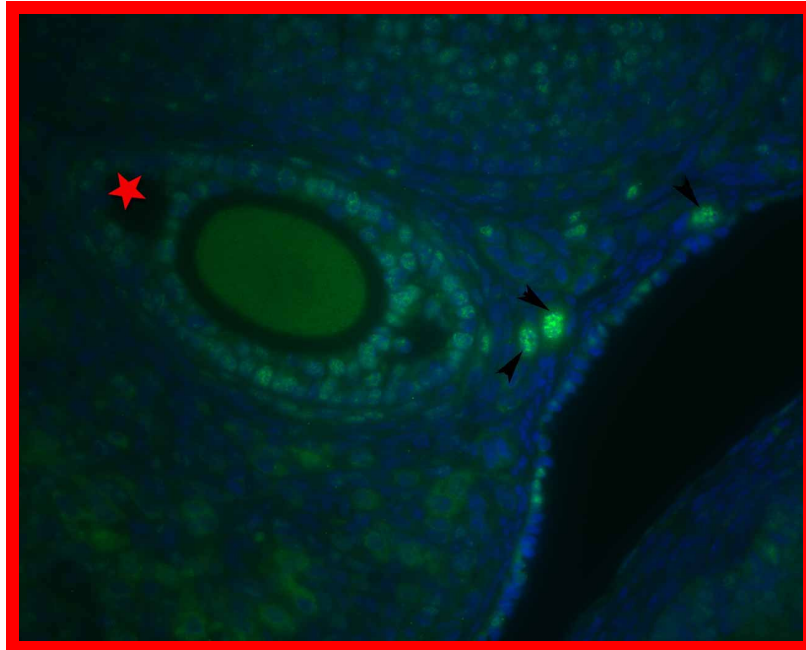
Yine PARP-1'in ovaryumda varlığını belirlemek için mRNA ifadesinin olup olmadığını saptamak amacıyla RT-PCR yöntemini kullandık. Elde ettiğimiz sonuçlarda hem genç bireylerde hem de yaşlı bireylerde PARP-1 mRNA'sının varlığını gözlemledik (Resim 20). Ancak genç bireylerin bir tanesinin ovaryumundan yeterli miktarda RNA elde edilemedi ve değerlendirme dışı tutuldu. Kontrol amacıyla için aktin mRNA'sı da yüklenip test edildi (Resim 21). Western blot yönteminde olduğu gibi sonuçlar imageJ programı şekil 22 ve 23'de tartışılmıştır.



**Resim 7.** Genç (3-4 haftalık) farelerden alınan ovaryum dokusuna ait seri kesitler izlenmekte. 1a: parp-1 antikoruna yerine normal rabbit IgG kullanarak immüno Floresan yöntemi uygulanarak boyanmış ovaryum dokusu. Kontrol amacıyla boyanmış resimde herhangi bir pozitif immün reaksiyon izlenmiyor. 1b: parp-1 antikoruna uygulanmış ovaryum dokusu gözlenmektedir. Çeşitli foliküler evrelerdeki oosit çekirdekleri (oklar) parp-1 için pozitif. Aynı zamanda preantral (yıldız) döneme ait bir foliküde kuvvetli bir immün reaksiyon göstermektedir (x4).

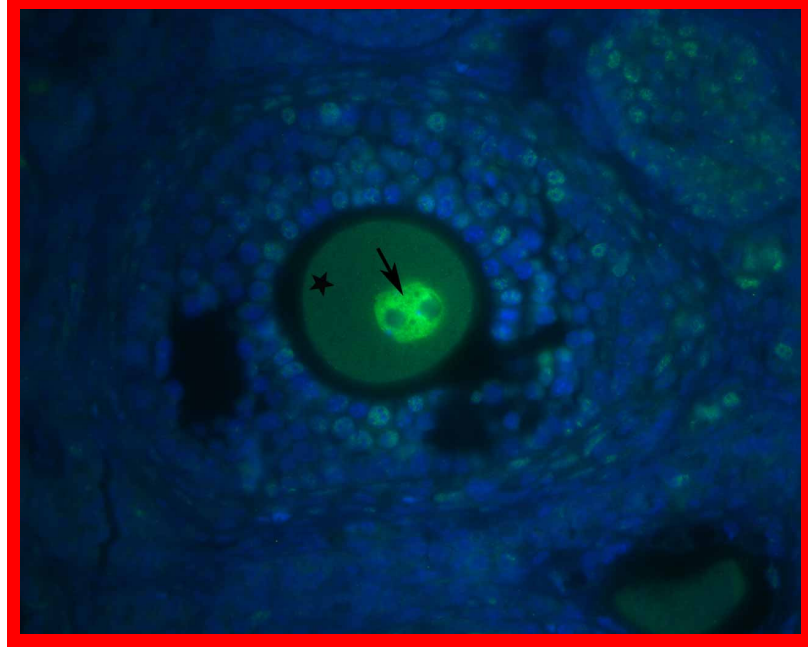


**Resim 8.** 3-4 haftalık fare ovaryumundan geçen kesitte primer folikül (siyah ok) ve preantral folikül (kırmızı yıldız) parp-1 için pozitif reaksiyon göstermekte (x60).

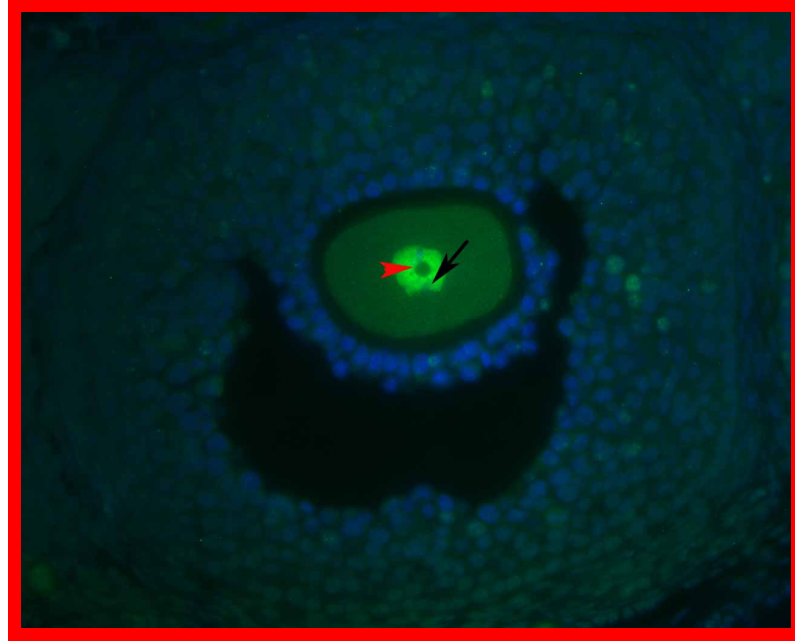


**Resim 9.** Genç fareye ait ovaryum dokusunda primordiyal foliküller (ok başları) ve antral foliküle (yıldız) ait bazı granüloza hücrelerinde pozitif reaksiyon izlenmekte. (x60)

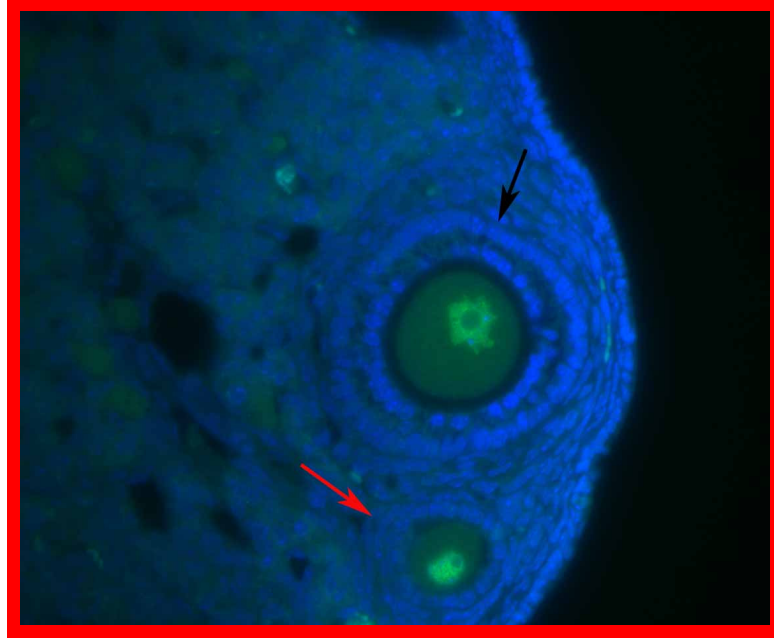




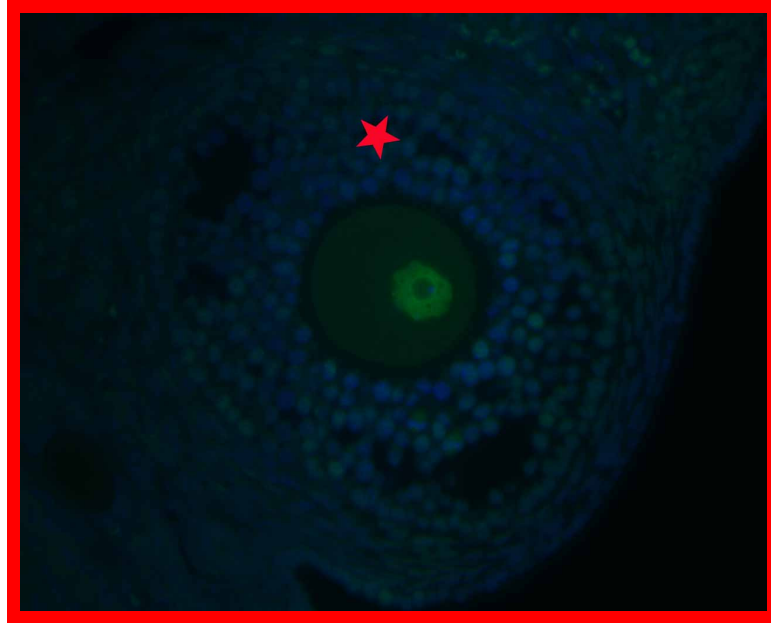
**Resim 10.** 3-4 haftalık fare ovaryum dokusuna ait fotoğrafta antral foliküldeki oositin sitoplazması (yıldız) ve çekirdek (ok) gözleniyor. Çekirdek ve bazı granüloza hücreleri parp-1 için pozitif (x60).



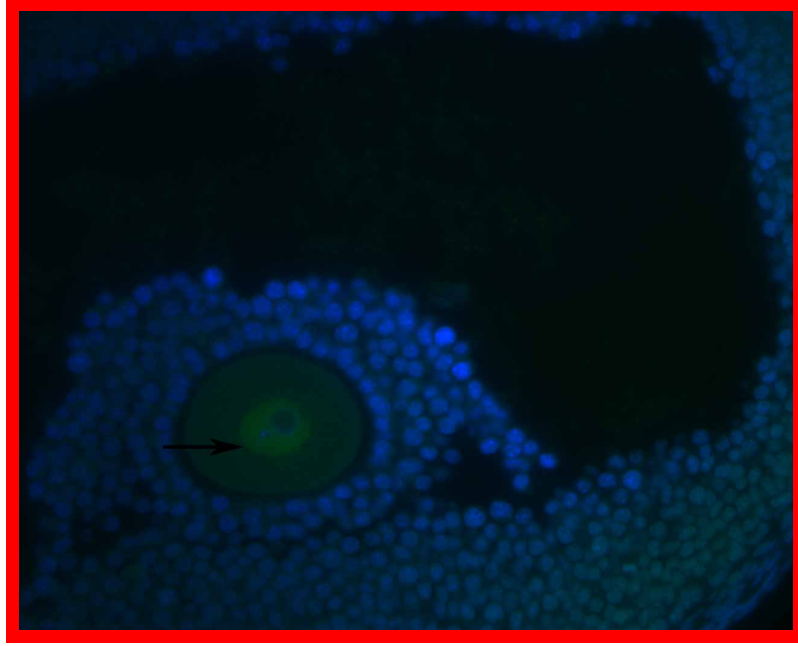
**Resim 11.** 3-4 haftalık gruba ait bu fotoğrafta geç antral döneme ait bir folikül izlenmekte. Çekirdek (siyah ok) parp-1 için pozitif immün reaksiyon göstermekte. Çekirdekçik (kırmızı ok başı) merkezi yerleşimli ve oldukça belirgin (x60).



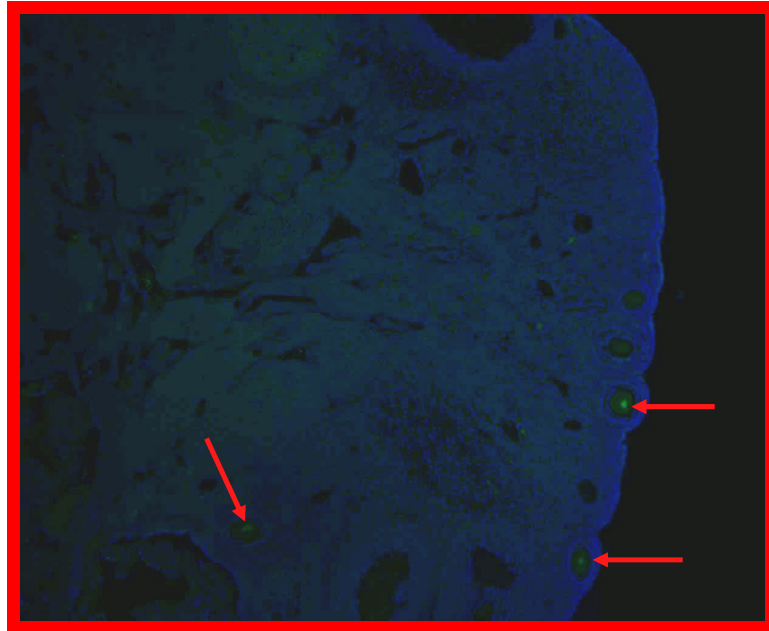
**Resim 12.** 12 aylık gruba ait ovaryumun parafin kesitinde unilaminar (tek tabakalı; kırmızı ok) ve multilaminar (çok tabakalı; siyah ok) primer folikül izlenmekte. Her iki folikülde de oosit çekirdeği parp-1 için zayıf immün reaksiyon göstermekte (x60).



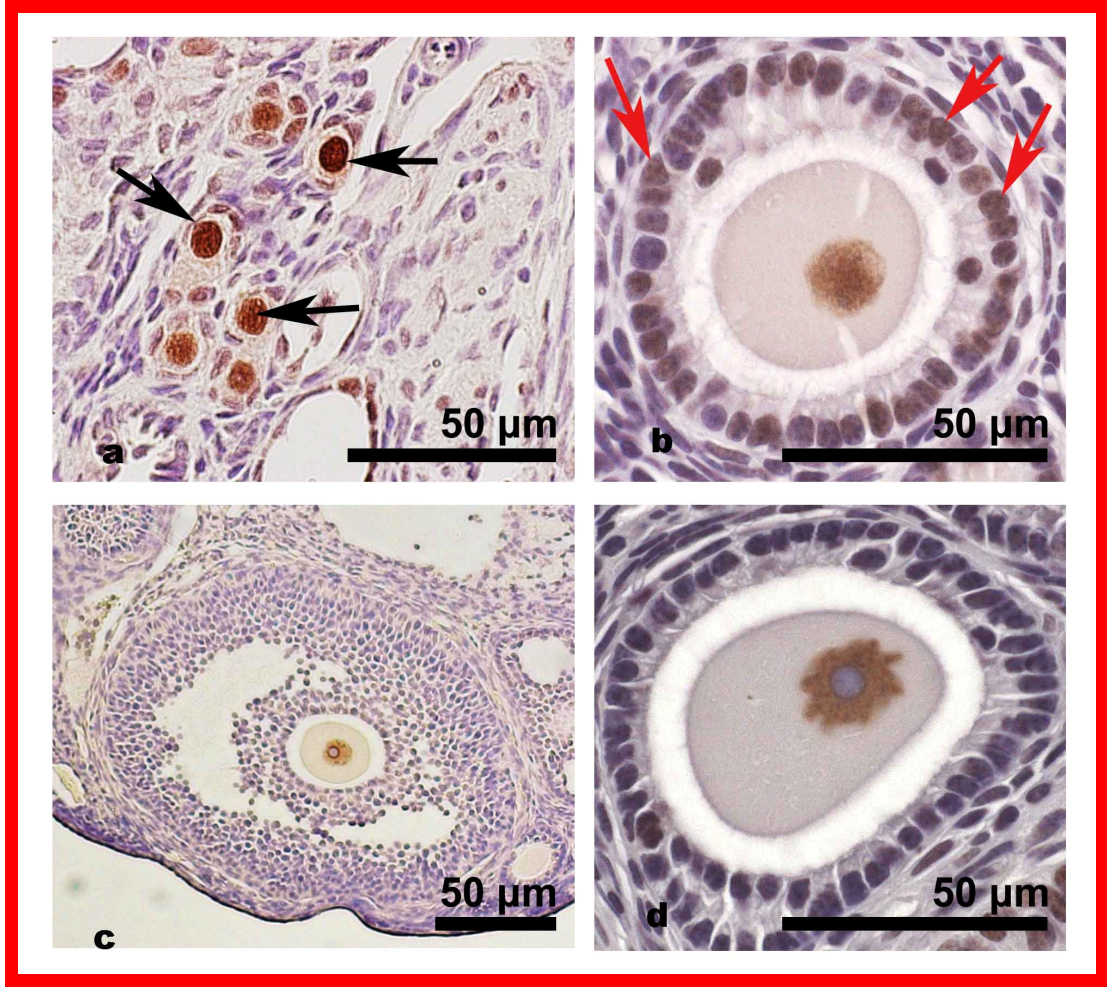
**Resim 13.** Yaşlı gruba ait ovaryumda antral folikül (kırmızı yıldız) görünüyor. Yine oosit çekirdeği genç gruba göre daha zayıf immün reaksiyon gösteriyor (x60).



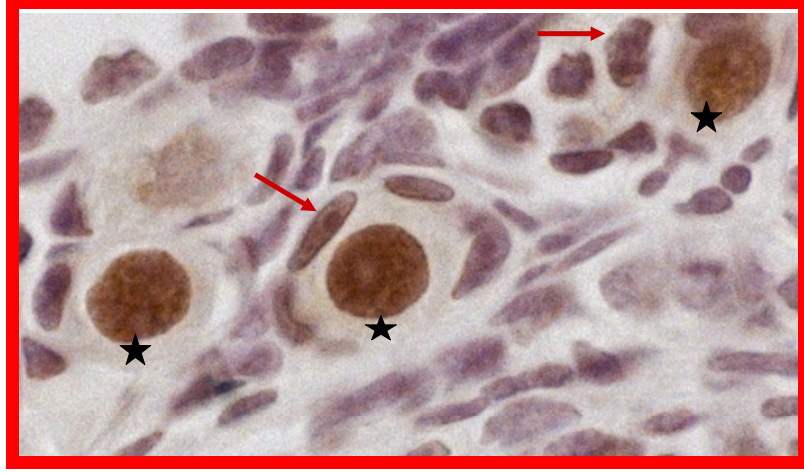
**Resim 14.** 12 aylık fareye ait ovaryum dokusunda graff (olgun) folikül izlenmekte. Genç farelerle karşılaştırıldığında özellikle olgun folikül çekirdeğinde (siyah ok) zayıf immün reaksiyon izlenmekte (x60).



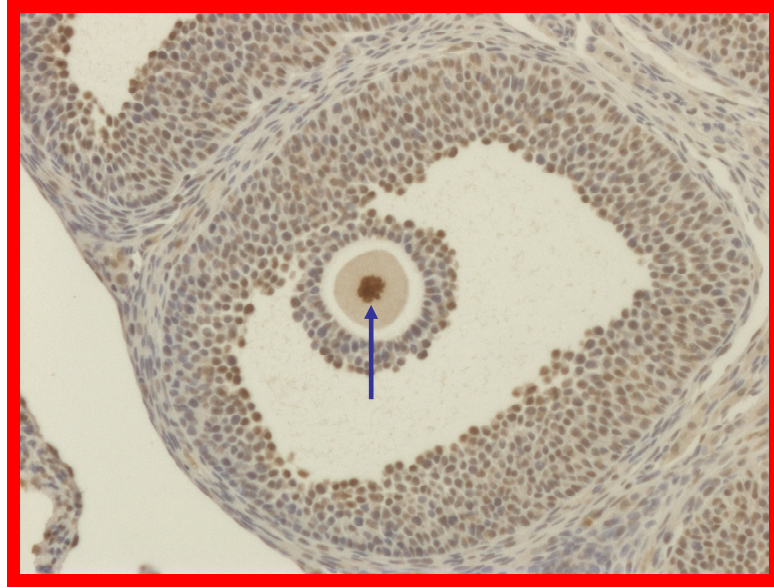
**Resim 15.** 12 aylık fareye ait bu ovaryum dokusunda bir kaç primer folikülde (kırmızı ok) oldukça zayıf immün reaksiyon gözlenmekte (x10).



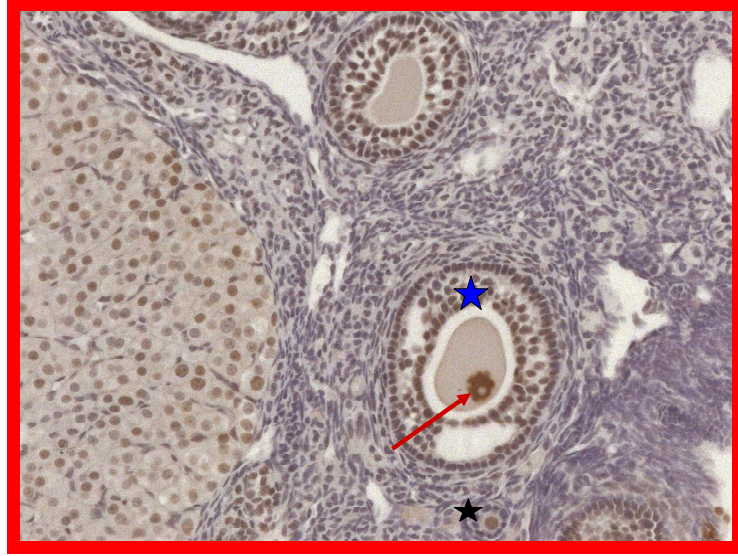
**Resim 16.** Genç (a ve b) ve Yaşlı (c ve d) farelere ait kesitler. **a.** 3-4 haftalık fareye ait ovaryum korteksinin izlendiği fotoğrafta grup halinde bulunan primordiyal foliküller parp-1 için pozitif immün reaksiyon göstermekte (siyah oklar). **b.** Primer folikülde bazı folikül hücrelerinde de immünoreaktivite izlenmekte (kırmızı oklar). **c.** 12 aylık fare ovaryumuna ait olgunlaşmaya doğru giden antral bir folikül görülüyor. Çekirdekte diğer folikül evrelerine göre nispeten daha zayıf bir boyanma olduğu dikkati çekmekte. **d.** Primer folikül çekirdeğinde kuvvetli immün reaksiyon gözleniyor. Çekirdekçik oldukça belirgin.



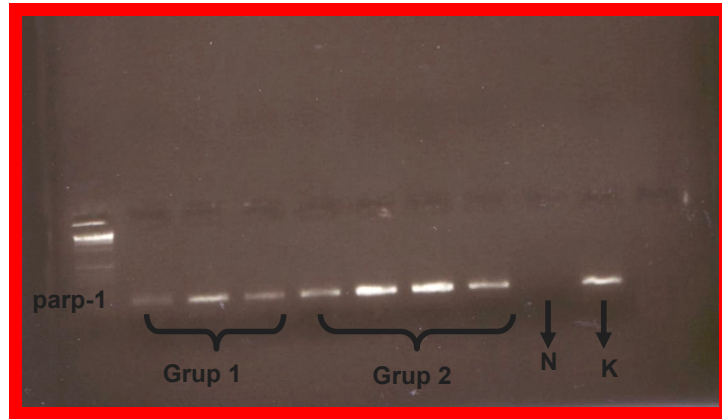
**Resim 17.** 3-4 haftalık genç bir fareye ait ovaryum kesitinde primordiyal foliküllerde bulunan oosit çekirdekleri (yıldız) parp-1 için kuvvetli pozitif reaksiyon göstermekte. Bazı folikül hücrelerinde ise (kırmızı ok) nispeten daha zayıf bir boyanma izlenmekte (x100).



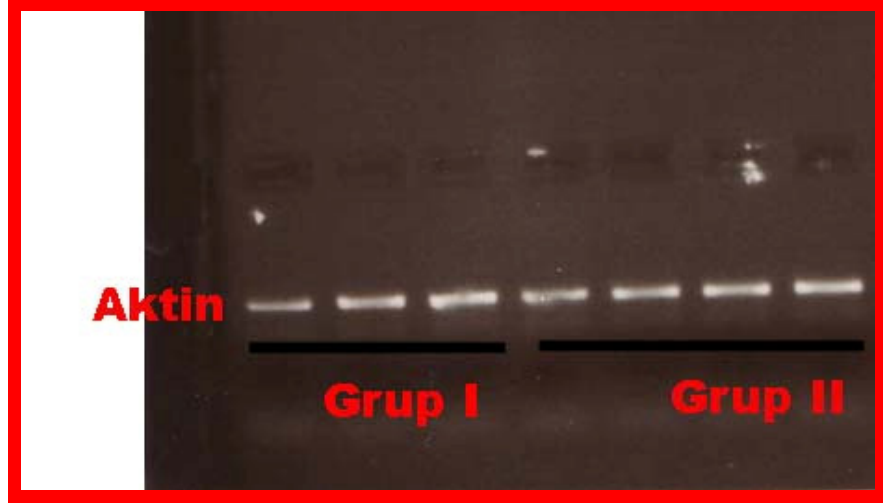
**Resim 18.** 3-4 haftalık farenin graff(olgun) folikülü izleniyor. Bu folikülün oosit çekirdeğinde (mavi ok) kuvvetli immün reaksiyon görülüyor. Bazı granüloza hücreleri parp-1 için pozitif (x20).



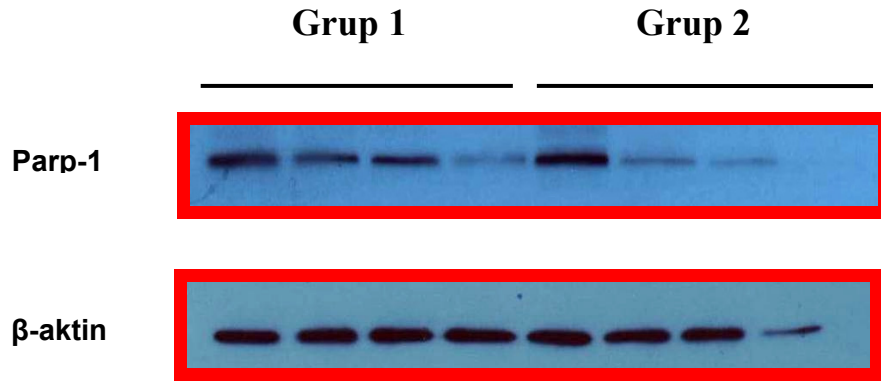
**Resim 19.** 12 aylık fareye ait ovaryum kesiti. Antral folikül (mavi yıldız) ve primer folikül (siyah ok) kuvvetli pozitif immün reaksiyon izlenmekte (x20).



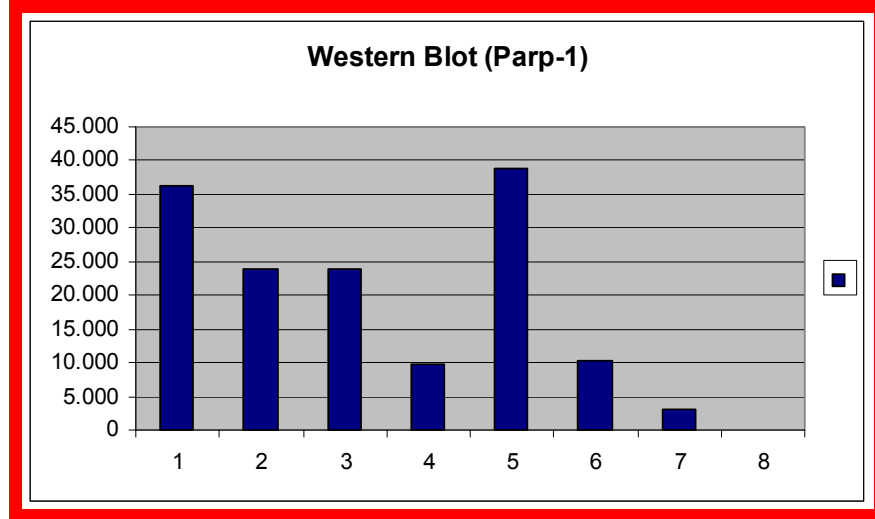
**Resim 20.** Ovaryum dokularından elde ettiğimiz mRNA ları RT-PCR ile değerlendirdiğimizde parp-1'in hem genç farelerde (grup 1) hem de yaşlı farelerde (grup 2) ifade edildiğini gözlemledik. N: herhangi bir yükleme yapılmadığını, K: kontrolü göstermekte.



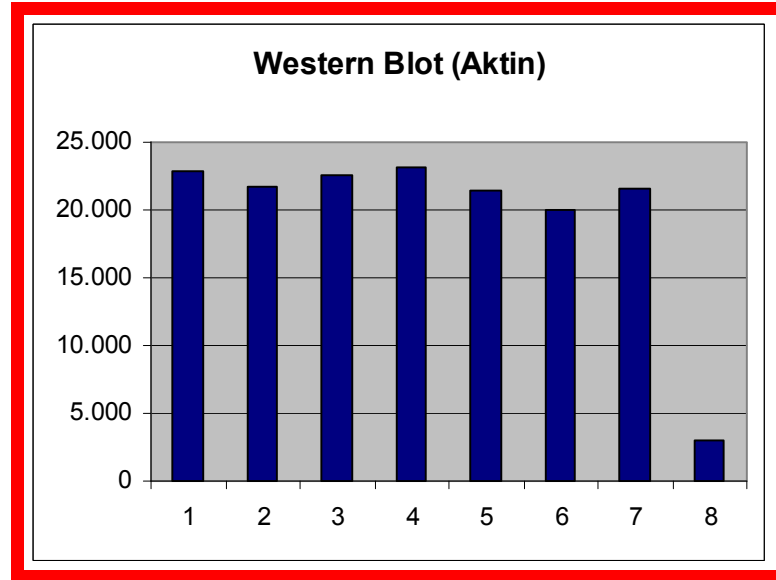
**Resim 21.** Kontrol amacıyla yaptığımız aktin yüklemesinde gruplar içindeki bireylerin hemen hemen eşit miktarda RNA içerdiğini söyleyebiliriz.



**Resim 22.** Parp-1'i ovaryum dokusunda saptamak amacıyla yapılmış Western blotlama yönteminde hem yaşlı farelerde (grup 2) hem de genç farelerde (grup 1) bulunduğu izlenmekte. Gruplar arasında farklılıktan daha çok bireyler arasındaki farklılık gözlenmekte. Eşit miktarda protein yüklenip yüklenmediğini kontrol etmek amacıyla β-aktin uygulaması sonucunda sadece yaşlı hayvan grubundaki 4. hayvanın protein miktarı diğerlerine oranla az yüklendiği görülmekte.

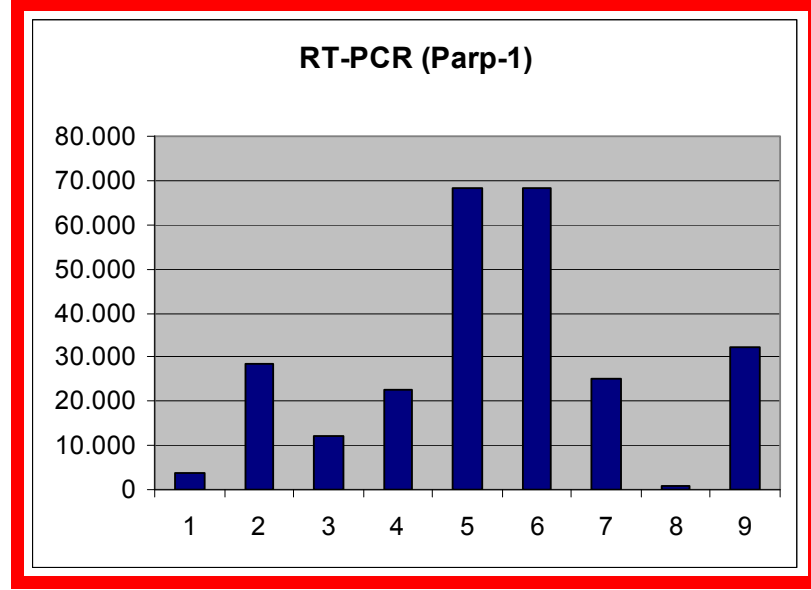


**Şekil 20.** Parp-1 proteinin varlığını tespit etmek amacıyla uyguladığımız Western Blot yöntemindeki sonucun imageJ programıyla değerlendirilmesi. Genç (1, 2, 3 ve 4 nolu hayvanlar) ve Yaşlı (5, 6, 7 ve 8 nolu hayvanlar) hayvan grupları karşılaştırıldığında, en kuvvetli parp-1 ifadesinin yaşlı grubun 1.hayvanında (no:5) olduğu gözleniyor. Yine en zayıf ifade yaşlı grubun 4. hayvanında (no:8) gözleniyor. Genç grubun ovaryumlarında bulunan protein miktarlarının birbirine yakın olduğu izleniyor.

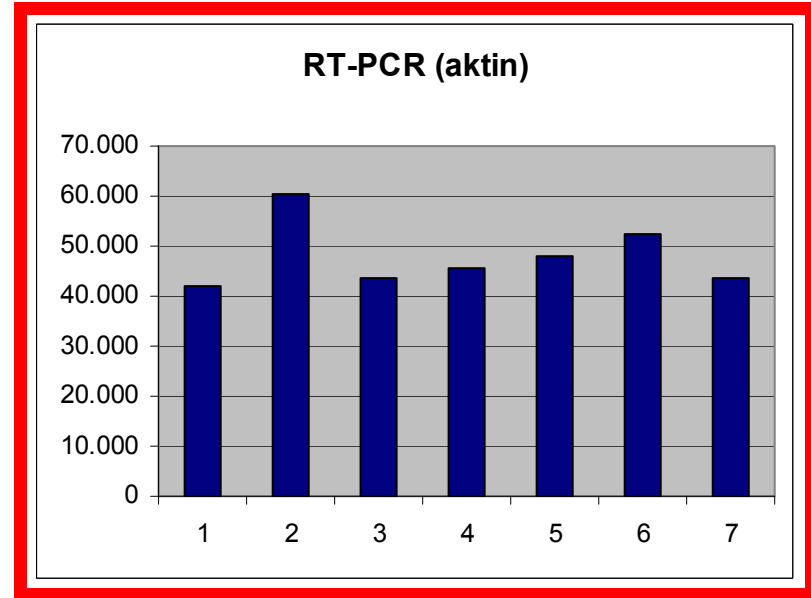


**Şekil 21.** İlk 4 hayvan grup I (3-4 haftalık grup)'i, sonraki 4 hayvan grup II (12 aylık grup)'yi göstermekte. Eşit miktarda protein yükleyip yükleyemediğimizi görmek amacıyla yaptığımız aktin uygulaması sonunda sadece 8 nolu hayvan grup II'nin 4. hayvanının da büyük bir fark olduğunu görmekteyiz. Parp-1 için çıkan sonuçlarda da aynı hayvanın protein ekspresyonu gözüküyordu. Bu da bu hayvan için yeterli protein yükleyemediğimizi gösteriyor. Ancak diğer hayvanların sonuçları görüldüğü üzere, birbirine oldukça yakın.





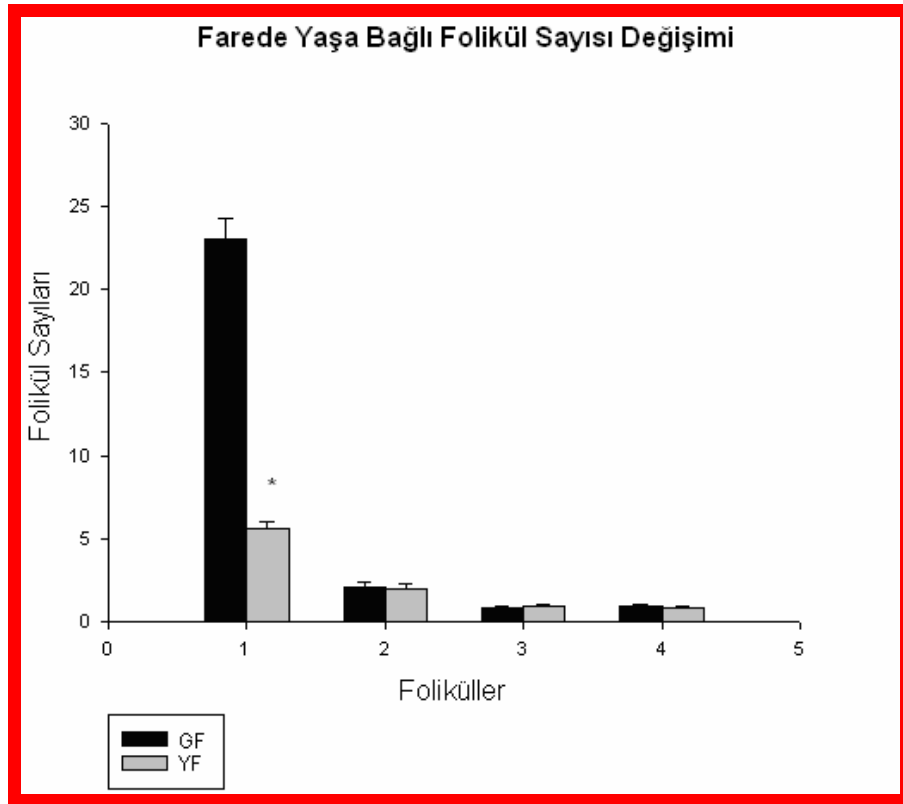
**Şekil 22.** İmagej ile değerlendirilmiş mRNA sonuçları. İlk 3 hayvan genç grubu, sonraki 4 hayvan yaşlı grubu ifade etmekte. 8 numara hiç bir yüklemenin yapılmadığı, 9 numarada kontrol yüklemesini göstermekte. Yaşlı gruptaki 2. ve 3. hayvanlar parp-1 için en fazla mRNA ifadesi gösteren hayvanlar olarak görünmekte.



**Şekil 23.** İmageJ programı ile değerlendirilmiş aktin için mRNA ifadesi. İlk 3 hayvan genç grubu, sonraki 4 hayvan yaşlı grubu göstermekte. Aktin için yüklemelerin birbirine çok yakın yapıldığı izlenmekte

## 4.2. Yaşa Bağlı Olarak Poli (ADP-ribozil)asyondaki Değişimler

Fare ovariumunda yaşa bağlı olarak poli (ADP-ribozil)asyondaki değişimleri saptamak amacıyla genç ve yaşlı farelerin ovarium dokusundaki folikül sayılarını belirledikten sonra genç ve yaşlı farelerin parp-1 için pozitif yüzdelerini saptamayı amaçladık (Şekil 25). Yapılan sayımlarda genç ve yaşlı hayvan gruplarının sadece primordiyal folikül sayılarında anlamlı bir değişiklik gözlemlendi (Şekil 24).



**Şekil 24.** Farelerdeki folikül sayılarının yaşa bağlı değişimini gösteren tabloda 3-4 haftalık grup ile 12 aylık grup arasında sadece primordiyal folikül sayısı arasında anlamlı bir fark gözlemlendi.

1. Primordiyal Folikül

GF: Genç Fare Grubu

2. Primer Folikül

YF: Yaşlı Fare Grubu

3. Preantral Folikül

4. Antral Folikül

\*  $P < 0.005$ , genç fare grubuna karşı yaşlı fare grubu.

**Tablo 1.** Genç ve Yaşlı Grubun primordiyal folikül sayılarının değerlendirilmesi.

Sütun	Sayı	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalamanın G.A
G. Primordiyal	50	23,080	9,021	1,276	2,564
Y. Primordiyal	50	5,660	2,318	0,328	0,659

**Tablo 2.** Genç ve Yaşlı Grubun primer folikül sayılarının değerlendirilmesi.

Sütun	Sayı	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalamanın G.A.
G. Primer	50	2,120	1,848	0,261	0,525
Y. Primer	50	2,020	1,732	0,245	0,492

**Tablo 3.** Genç ve Yaşlı Grubun preantral folikül sayılarının değerlendirilmesi.

Sütun	Sayı	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalamanın G.A.
G. Preantral	50	0,840	0,912	0,129	0,259
Y. Preantral	50	0,900	0,839	0,119	0,238

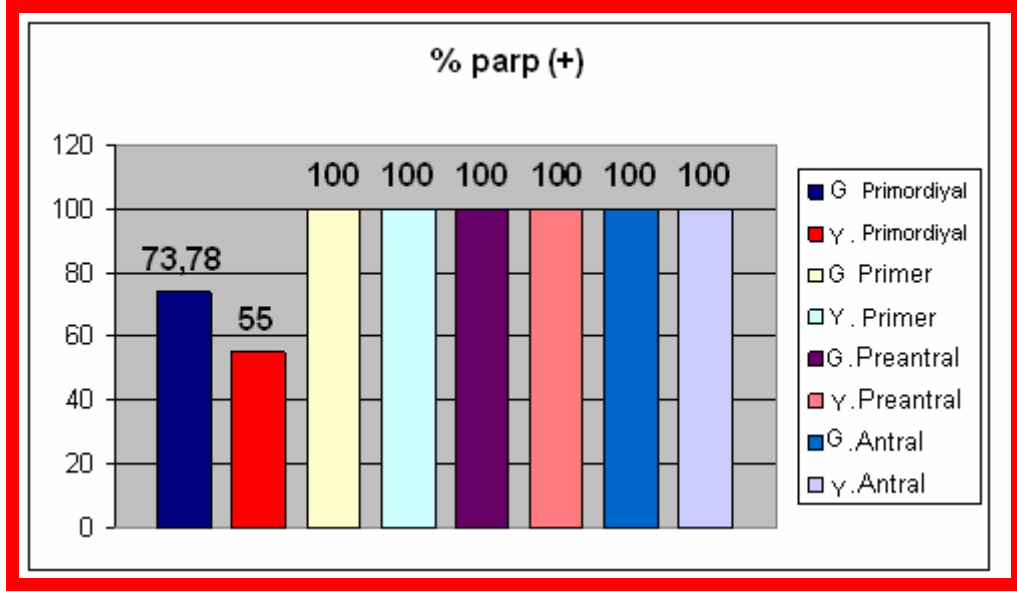
**Tablo 4.** Genç ve Yaşlı Grubun antral folikül sayılarının değerlendirilmesi.

Sütun	Sayı	Ortalama	Std sapma	Std hata	Ortalamanın G.A.
G. Antral	50	0,960	0,989	0,140	0,281
Y. Antral	50	0,840	0,912	0,129	0,259

Tabloya ilişkin istatistiki veriler;

G; genç (3-4 haftalık) grup

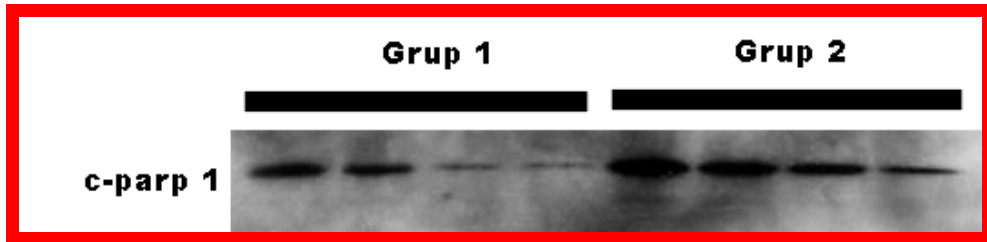
Y; yaşlı (12 aylık) grup



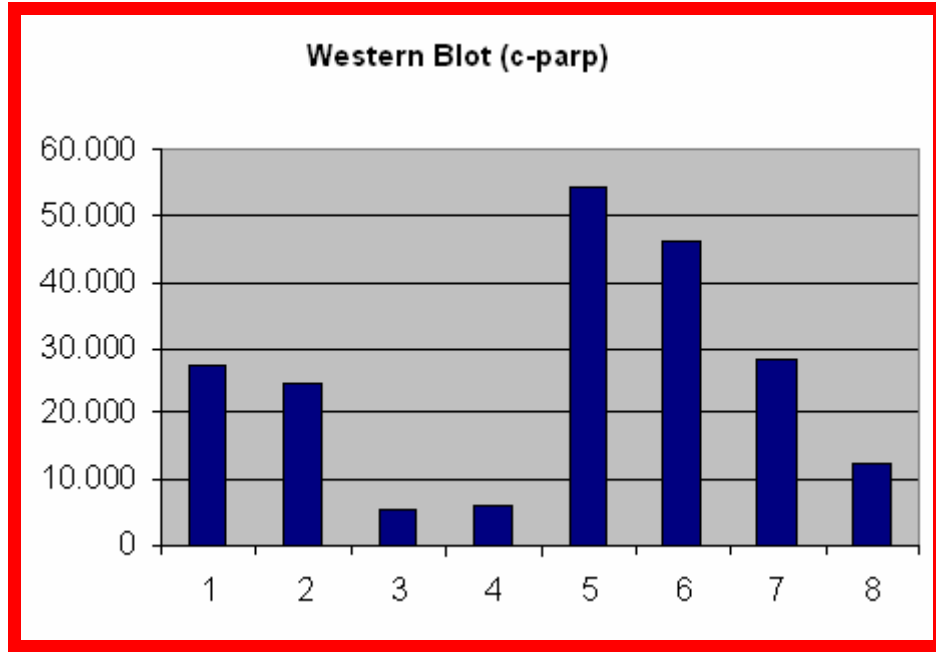
**Şekil 25.** Genç ve yaşlı farelerin foliküllerinin parp-1 için boyanma yüzdesi. G: genç grubu, Y: yaşlı grubu ifade etmekte. İlginç olarak primordiyal folikül aşamasından sonraki tüm foliküler evredeki oositler parp-1 için pozitif. Yaşlı bireylerin primordiyal foliküllerinde parp(+) yüzdesi hemen hemen yarı yarıya azalmıştı.

### 4.3. Apoptozisde Poli (ADPribozil)asyonun Rolü

Poli (ADP-ribozil)asyonun apoptozis sürecinde önemli bir rol oynadığını ve cleavage (parçalanmış) parp'ın (c-parp) güçlü bir apoptozis belirleyicisi olduğunu düşünmekteydik. Aldığımız ovaryum dokularında, yaşlı ve genç farelerin c-parp ifadesini western blotlama yöntemiyle araştırdık. Çıkan sonuçları yine imageJ programıyla değerlendirdik (Şekil 26).



**Şekil 26.** c-parp'ın genç ve yaşlı bireylerde ifadesi. Grup 1 genç hayvanları, grup 2 yaşlı bireyleri temsil etmekte. Yaşlı bireylerde c-parp'ın daha fazla eksprese edildiği gözlenmektedir.



**Şekil 27.** c-parp için western blot sonuçlarının İmagej programı ile değerlendirilmesi. Yaşlı grup (5, 6, 7 ve 8) genç gruba (1, 2, 3 ve 4) göre daha fazla c-parp proteini ihtiva etmekte. Sadece yaşlı grubun 4. hayvanında (no:8) genç hayvanlara oranla daha az ekspresyon gözleniyor.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Poli-ADP-ribozun protein ve kromozomal yapıda olmayan, bipolar içcik birleşmesi ve kromozom ayrışmasında gerekli olduğu son çalışmalarda rapor edilmiştir (95). Doğru kromozom ayrışması içcik olarak bilinen hareketli ve karmaşık mikrotübül kökenli yapı tarafından gerçekleştirilir ve ileri hücre yenilenmesinin devamlılığı için gereklidir. Mikrotübüllerin simetrik bipolar içciklere organizasyonu temel olarak fosforilasyon ile transkripsiyonel modifikasyonlar aracılığıyla düzenlenen mikrotübüler proteinler aracılığıyla yürütülür (96,97). Chang ve arkadaşları (95); poly-ADP riboz ve PARG'nin özellikle mitoz esnasında hücrelerde içciklerde yerleşik olduğunu kanıtlamışlardır. Poli-ADP-ribozun içcik kutuplarında, sentromer / kinetokorlarda ve içcik gövdesi boyunca bulunduğunu göstermişlerdir. PARG kurbağa ekstraktlarına aşırı eklendiğinde, poli-ADP-riboz seviyesinin düşürülmesi içcik kutup organizasyonunu değiştirmemiş fakat bipolar içciklerin yapı ve formasyonunu yarım-içciklerin arasındaki bağlantıyı engelleme yoluyla baskılamıştır. Bu gözlemler gösteriyor ki, poli-ADP-ribozun şu an ki yapısı belki merkez içcikteki antiparalel mikrotübül interaksiyonlarını stabilize etme aracılığıyla in vivo içcik bipolaritesinin oluşması ve devamlılığı için çok önemli olabileceği belirtilmiştir.

Poli-ADP-riboz ile ilişkili olduğu bilinen, aralarında sentromer proteinleri CENP-A, CENP-B, Bub3 ve NuMA'nın bulunduğu birçok aday poli-ADP-riboz düzenleyici içcik proteinleri bulunmaktadır (98-100). Çok kısa yarı ömürleri olan içcik proteinlerinin aksine, poly-ADP-ribozun içcikte neredeyse hiç dinamik değişim gözlenmemiştir. Bu içcikte düşük oranda iş görme kapasitesi ile tutarlıdır. Bu gözlemler gösteriyor ki, poly-ADP-riboz mitotik içcikte bir düzenleyiciden daha çok yapısal olarak işlev görmektedir. Örneğin, poli-ADP ribozun içcik içinde güç jenerasyonuna yardımcı mikrotübül olmayan bir matriks ya da kafes görevi gördüğü farz edilmektedir (95).

Yapılan *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalar oldukça ilginç olmasına rağmen, fizyolojik ilişki ve moleküler mekanizmaların dikkatlice incelenmesi gerekir. Hücre bağımlı ya da yapısal poli-ADP ribozilasyon sentromer ve içcik kutup proteinlerine nasıl etki etmektedir? Hangi PARP üyesi *in vivo* içcik-bağımlı poli-ADP-ribozilasyondan sorumludur? İlgili knockout fare modellerinin yaşamlarını devam ettirmeleriyle, ne PARP-1, PARP-2, PARP-4 ne de PARP-6/tankiraz-2'nin birebir alakası vardır. Çünkü Parp3 ve Parp5/tankiraz-1 genleri knockout olmamış fare modellerinin oluşturulmadığını düşünürsek, hangi PARP ailesi üyelerinin içcik-ilişkili poli-ADP riboz sentezine katıldıkları ile ilgili tam bir tahmin yapmak olanaksızdır(17,71,101-105).

Diğer taraftan, siRNA kullanılarak PARP-5/tankiraz1 ile yapılan birçok knockout çalışmaları PARP5/tankiraz1'in insan hücrelerinde mitozda gerekli bir faktör olduğunu tanımlamıştır. Ölümsüzleştirilmiş hücrelerin Parp5/tankiraz-1'e karşı siRNA ile tedavisi, anormal kromozom yapılıması ve içcik yapıları ile mitotik tutulmayla sonuçlanmıştır. Kardeş kromatidler telomerlerden ayrılamamıştır (98,106,107). siRNA-sağlıklı hücrelerin, enzimatik olarak ölü mutant olmayan siRNA dirençli wild-type cDNA ile birleştirilmesi, bu fenotipi kurtaramamış, PARP-5/tankiraz-1 katalize oligo-ADP-ribozilasyon ürünlerinin mitotik ilerleme ve kardeş telomer rezolüsyonu için gerekli olduğunu düşündürmüştür(107). Ek olarak, birçok PARP'lerin hücre döngüsü-bağımlı karakterde sentromerlerde yerleştiği gösterilmiştir. PARP-1 kromozomlara ve sentromerlere hücre bölünmesi ve interfaz aşamasında yerleşmektedir (108). PARP-2'nin prometafaz ve metafazda sentromerlerde toplandığı, anafazda ayrıldığı ve telofazda sentromerde ortadan kaybolduğu rapor edilmiştir (99,100). PARP-5/tankiraz1 telomer ve mitotik sentromerlerin de dahil olduğu bir çok hücre altı bölgelerde lokalize olmuştur. Mitozda, PARP-5/tankiraz-1'in mitotik sentrozomların perisentriolar matriks etrafında yeniden yerleşmiştir (98,109). Gözlenen bu etkilerin PARP-1, PARP-2, PARP-3 ya da PARP-5/tankiraz1'in bölgesel ve hücre tipine özel hareketlerinin kombinasyonu aracılığıyla gerçekleşmiş olması muhtemeldir.

Poli-ADP-ribozilasyonunun mitozdaki muhtemel rollerine ek olarak, nükleer mono ve poly-ADP-ribozilasyon reaksiyonlarının hücre çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı tahmin edilmektedir. Buna rağmen, sadece plazma membran-ilişkili sitozolik ve ekto-ADP-ribozilasyon reaksiyonları (mono-ADP-ribozilasyon olayları ve ADP-riboz-siklaz olayları) günümüze kadar işlevsel olarak analiz edilebilmiştir (110-1115). Nükleer ADP-ribozilasyon reaksiyonlarının bu olaylardaki görevleri (mono ve poly-ADP ribozilasyonu) hala araştırılmaktadır.

Mono ve poli-ADP ribozilasyonun farklılaşma ve proliferasyon olayındaki rolü hakkında yapılan tüm çalışmalarda mono ve poly-ADP ribozilasyon reaksiyonlarını hedef alan spesifik olmayan PARP baskılayıcıları kullanılmıştır (116,117). Yapılan birçok çalışmada yüksek oranda mono ve poli-ADP ribozilasyon aktivitesinin proliferasyon ve farklılaşma için gerekli olabileceği düşünülse de, bazı çalışmalarda hücre tipi, gelişme şartları, inhibitör ve kullanılan inhibitör konsantrasyonlarına bağlı olarak zıt etkiler görülmüştür (118-123). Bu çelişkiler deneysel sistemlerdeki özgünlük eksikliğini yansıtmaktadır. Alternatif olarak sonuçlar, zıt görevleri olan farklı substratları düzenleyen ya da zıt aktiviteleri olan farklı tipte poli-ADP-riboz yapılarını düzenleyen farklı MARTve PARP'lerin katılımını gösterebilmektedir. Poli-ADP-riboz seviyeleri direkt olarak *ex vivo* ölçüldüğünde, yüksek oranda poli-ADP-ribozilasyon aktivitesi ve proliferasyonu arasında bir korelasyon gözlenmiştir (124-128). Örneğin, nükleer poli-ADP ribozilasyon aktivitesinin, aktif olmayan 3T3 hücreleri yada T ve B lenfositlerinin çoğalması için uyarıldığında arttığı gösterilmiştir (124,127,128).

Poli (ADP-ribozil)asyonun diğer bir rolü de bilindiği üzere apoptozis sürecindedir. Kaspaz bağımlı apoptozis sürecinde PARP-1, 24 kDa ve 89 kDa (p24 ve p89)'luk 2 ayrı fragmente parçalanır. Bu parçalanma kaspaz 3 ve 7 tarafından gerçekleştirilir. 89kDa'luk fragment katalitik bölge ve otomodifikasyon alt birimlerini içermektedir. 24 kDa'luk fragment ise çinko parmakçıklarında bulunduğu DNA bağlayıcı alt birimi içermektedir. PARP-1'in, apoptozisin farklı bir belirleyicisi olduğu düşünülmektedir (12). Bunun



temel bir sonucu olarak PARP-1 inaktivasyonu apoptozisin başarılabilmesi için gerekli olan hücre içi ATP miktarının korunmasına bağlı olabilir, çünkü bu işlev enerjiye ihtiyaç duymaktadır. PARP-1'in parçalanması belki de daha çok hücrenin ölmemesi için DNA tamir mekanizmasının, özgün gen transkripsiyonunun ve diğer hücresel işlevlerin baskılanmasında önemli bir oyanayabilir. Bu da bizim bulduğumuz sonuçları destekler niteliktedir. Özellikle yaşlı hayvan grubunda c-parp ifadesinin daha fazla olması, ilerleyen yaşla beraber PARP-1 enzim aktivitesinin azalması (dolayısıyla artan cleavage formu) düşüncemizi destekler niteliktedir.

İnsanlarda, dişi üremesi artan yaş ile sonlanır. Oosit yeterliliğinin yaşa bağlı olarak azalması dişi üremesinde yaşın çok önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (129). Farelerde üreme yaşı insanlara oranla daha önemsizdir. Bununla beraber fare oositlerinde çok sayıda, yaşa bağlı gen ifadesinde değişiklikler (130) ve kromozomal anormallikler (131,132) bulunduğu gösterilmiştir. Nitekim çalışmalarımızın sonucunda primordiyal foliküllerde PARP-1 ifadesinin yaşlılarda azaldığını görmekteyiz.

Poli (ADP-ribozil)asyonun engellenmesi kromozomal anomolilere sebebiyet vermektedir (133). Buna ek olarak, PARP-1 çeşitli sentromer-organize edici (Bub3, CenpA ve CenpB) proteinleri bağlar ve değişikliğe uğratar (98). Ancak anaploidi gibi bazı kromozomal anomalilerinde poli (ADP-ribozil)asyonun rol oynayıp oynamadığı net olarak açıklanamamıştır.

Bu çalışmada, poli(ADP-ribozil)asyonun memelilerdeki oogeneze ve folikülo genez olaylarında doğrudan yer aldığına ilişkin makul bulgular elde ettik. Giderek artan sayıda çalışma, poli(ADP-ribozil)asyonu üremeye ilişkilendirmektedir. PARP-1, progesteron reseptörünün (PR) DNA bağlayan kısmı ile ilişkilidir (134) ve steroid reseptörlerinin transkripsiyon etkinliğini düzenler (135).

Progesteron, transkripsiyonel seviyede PARP ekspresyonunu ve DNA tamiriyle ilgili poli(ADP-ribozil)asyonu ovulasyon sonrasında over yüzey epitel hücrelerinde reseptör aracılı yol üzerinden uyarır (136). Morin ve

arkadaşları(137), poli(ADP-ribozil)asyonun anne kaynaklı histonları dölleme sonrasında proteolizden koruduğunu da bulmuşlardır. Yakın geçmişteki bir çalışma, poli(ADP-ribozil)asyonun faredeki implantasyon öncesi gelişim esnasında da mevcut olduğunu ve işlev gördüğünü rapor etmiştir. PAR metabolizmasının çalışmaması, fare embriyosunda ölüme yol açmaktadır (88). Poli(ADP-ribozil)asyonun sıçanlardaki spermiyogenez esnasındaki kromatinin yeniden modellenmesi sürecinde de yer aldığı bildirilmiştir (127).

Fare overindeki immün boyama yöntemlerimiz, PARP-1'in kendine özgü temporal ve uzaysal ifadesinin olduğunu göstermiştir. Poli(ADP-ribozil)asyonun oogenez ve folikülogenez için önemli olup olmadığını belirlemek için yapılan bazı çalışmalarda, 5-AIQ kullanılarak fare overlerindeki poli(ADP-ribozil)asyonu *in vivo* ve *in vitro* olarak engellemişlerdir (138). Yenidoğan overleri primordiyal folikül yönünden zengindir ve bu durum, bazı foliküllerin *in vitro* ortamda gelişmesine imkan sağlar (139,140). *In vitro* ortamdaki olgunlaşmanın ilk aşaması, oosit-granüloza hücre komplekslerini sağlamak için yenidoğan overlerinin 10 güne kadar kültürlenmesini içermektedir. Poli(ADP-ribozil)asyon reaksiyonlarının baskılanması sonucunda DNA tamirine mani oldukça oosit gelişiminin de sekteye uğrayacağı beklenmişti. Şaşırtıcı şekilde, kültürlenmiş overlerdeki poli(ADP-ribozil)asyon sentezi birinci aşama esnasında tamamen engellenmesine rağmen, yenidoğan overlerinin ebatça büyüdüklerini ve kontrollere göre daha gelişkin folikül içerdikleri gözlemlenmiştir. 5 – AIQ'nun folikül gelişimi esnasındaki uyarıcı etkisi de *in vivo* ortamda değerlendirilmiş ve elde edilen sonuçlar, poli(ADP-ribozil)asyonun 5-AIQ tarafından engellenmesinin olgun oositlerin sayısında belirgin bir artışı uyardığına ilişkin olarak *in vitro* ortamda elde edilen benzeri bir sonucu doğrulamıştır.

PARP – 1 DNA hasarı sonrasında otomatik değişime uğrayarak, histon H1 ve H2B gibi kromatin yapısında gevşemeye yol açan ve çekirdekte yar alan bazı kabul edici (akseptör) proteinlerin poli(ADP-ribozil)asyonu işlemini katalizlediği bilinmektedir (81). Dolayısıyla, X – ışını çapraz bütünleyici (kompleman) proteini – 1 (XRCC1) gibi bazı enzimler, DNA

tamirinin yürütülmesinde görev yapar. El Khamisy ve arkadaşları (141) oksidatif DNA hasarlanması sonrasında XRCC1'in çekirdekdeki odaklarının bütünlüğü ve kararlılığı için PARP-1'in gerekli olduğunu ve bu odakların oluşumunun, poli(ADP-riboz) ile etkileşim aracılığıyla yönetildiğini göstermişler ve PARP-1'in DNA kırıklarının olduğu yerlerde hızlı şekilde etkinleştirilmesinin, XRCC1'i harekete geçirme yoluyla DNA tamirini kolaylaştırdığına ilişkin bir model öne sürmüştür. Genomdaki kararsızlık, DNA tamiri için olmadığı durumlarda hücreler ve canlı organizmalar için oldukça önemli bir sorun teşkil eder. DNA tamiri, gametlerin genom bütünlüklerinin korunmasında olduğu kadar başka hiçbir yerde daha fazla bir önem arz etmemektedir. Dolayısıyla, memelilerdeki oogenez ve folikülogenez olaylarının yürütülebilmesi için, etkin DNA tamir sistem(ler)inin varlığı kaçınılmazdır.

PARP – 1, aynı zamanda daha önceleri tanımlanmayan ve transkripsiyonel yönden baskılanmış olan sıkı kromatin yapılarının oluşumuna katkıda bulunan nükleozom bağlama özelliği gibi bazı daha karmaşık olaylarda da yer aldığına ilişkin olarak (14) ve özgün nörojenik gen programları için gereken promotöre özgü düzenlenmiş değişim unsuru olduğuna yönelik giderek artan şekilde sorumlu tutulmaktadır. Dolayısıyla DNA tamir aracılığındaki klasik rolüne ek olarak, PARP – 1 kromatinin yapısal bileşeni ve kromatin yapısında içsel (intrensek) enzim etkinliğine bağlı ayarlayıcı (modülatör) işlevlerine de sahiptir. PARP – 1'in yukarıda sayılan çoğul amaçlı özellikleri, PARP sınıfı enzimlerin çekirdekdeki geniş dağılımının, daha fazla kabul gören DNA tamir aracılığı rollerinin yanı sıra, bunların gen etkinleşmesinde ve transkripsiyonunda da işlev görmelerini sağladığı öngörüsüne yol açmıştır.

Oogenez ve folikülogenez için oldukça karmaşık bir gen düzenleniminin gerekmesi ve DNA bütünlüğünün korunmasına olan ihtiyaç, poli(ADP-ribozil)asyon işleminin ve PARP – 1'in bu süreçte oldukça önemli olduğunu düşündürmüştü. Tüm bilgiler poli(ADP-ribozil)asyonun folikül gelişimi boyunca meydana geldiğine ve bu olayın, memelilerdeki oogenez ve

folikülogenezde görülen gen ekspresyonunun ana düzenleyicisi olduğunu göstermekteydi.

Sonuç olarak çalışmamızda değişik yaş gruplarında folikül gelişiminin her aşamasında oosit çekirdeğinde PARP-1 ifadesini tespit ettik. Zaten Poli (ADP-ribozil)asyonun klasik olarak DNA tamir mekanizmalarında, apoptozisde ve birçok hücrel işlevde rol aldığını biliyorduk. Klasikleşen bu rollerin dışında yaptığımız çalışmada Poli (ADP-ribozil)asyon ve PARP-1'in oogenezis ve folikülogenezisde anahtar bir rol oynayabileceğini gösterdik.

## ÖZET

### Fare ovaryumunda Poli (ADP-ribozil)asyon Yolu

Poli(ADP-ribozilasyon işlemi, poli(ADP-riboz) polimerazlar (kısaca PARP) olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından yürütülen transkripsiyon sonrası protein değişimidir. Bu enzimler, bir dizi mono(ADP-ribozil) molekülünün “akseptör” proteinlere taşınımını gerçekleştirir. PARP enzimlerinin çekirdekdeki geniş dağılımının, bunların daha fazla kabul edilen DNA tamir aracısı olma rollerinin yanı sıra, gen ekspresyonunu yönlendirmesine de yol açabileceği öne sürülmüştür. Poli (ADP-riboz) sadece hücrenin yaşamsal ve programlı ölüm olaylarını düzenlemekle kalmaz aynı zamanda yeni PARP üyelerinin bulunmasına bağlı olarak artan sayıda diğer biyolojik işlevleri de düzenler. Bu işlevler transkripsiyonel düzenlenimi, hücre bölünmesi esnasında mitotik iğ şekillenmesi ve telomer kohezyonu, hücre içi beslenme ve enerji metabolizmasını içerir.

Elde ettiğimiz sonuçlar, poli(ADP-ribozil)asyonun ve özellikle de PARP-1 enziminin oogenez ve folikülogenezde anahtar bir rol oynadığını ve gen ifadesini düzenlemede, DNA tamirinde ve apoptozisde ayırıcı bir role sahip olduklarını göstermektedir. Poli(ADP-ribozil)asyonun oogenez ve folikülogenezdeki yeni (keşfedilen) işlevi, DNA tamir araçlarının hücre gelişim ve farklılaşmada oynadıkları (düşünülen) alternatif role ışık tutmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Poli (ADP-riboz);NAD<sup>+</sup>; Poli (ADP) polimeraz; Parp-1;DNA

## SUMMARY

### Poly (ADP-ribosyl)ation Pathway in Mice Ovary

Poly (ADP-ribosyl)ation is a post-translational protein modification carried out by a family of enzymes referred to as poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs). They catalyze successive transfer of several mono (ADP-ribosyl) molecules onto “acceptor” proteins. It has been proposed that the broad nuclear distribution of PARPs may allow them to modulate gene expression in addition to their more accepted role as DNA repair mediators. Poly (ADP-ribose) regulates not only cell survival and cell-death programmes, but also an increasing number of other biological functions with which novel members of the PARP family have been associated. These functions include transcriptional regulation, telomere cohesion and mitotic spindle formation during cell division, intracellular trafficking and energy metabolism.

Our results demonstrate that poly(ADP-ribosyl)ation, and in particular PARP-1, are key players in oogenesis and folliculogenesis and that they have a differential role in regulating gene expression, DNA repair and apoptosis. The novel function of poly(ADP-ribosyl)ation in oogenesis and folliculogenesis sheds light on the alternative role that DNA repair mediators may play in cellular development and differentiation.

**Key words:** Poly (ADP-ribose);NAD<sup>+</sup>; Poly (ADP) polymerases; Parp-1; DNA

## KAYNAKLAR

1. Hassa, H. In Vivo ve In Vitro Koşullarda Oosit Maturasyonu. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları 087, 229-240 (2003).
2. Gürer, F. In Vivo ve In Vitro Koşullarda Oosit Maturasyonu. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları 087, 229-240 (2003).
3. Jamnongjit, M. & Hammes, S. R. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med* 23, 234-41 (2005).
4. Kimmins, S. & Sassone-Corsi, P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 434, 583-9 (2005).
5. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-73 (2002).
6. Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W. & DePinho, R. A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301, 215-8 (2003).
7. Dong, J. et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383, 531-5 (1996).
8. Galloway, S. M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 25, 279-83 (2000).
9. Zheng, P. & Dean, J. Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development. *Semin Reprod Med* 25, 243-51 (2007).
10. Matzuk, M. M., Burns, K. H., Viveiros, M. M. & Eppig, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* 296, 2178-80 (2002).
11. Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N. & Matzuk, M. M. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305, 1157-9 (2004).
12. Burkle, A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD<sup>+</sup>. *Febs J* 272, 4576-89 (2005).
13. Beneke, S. & Burkle, A. Poly(ADP-ribosyl)ation, PARP, and aging. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004, re9 (2004).
14. Kim, M. Y., Mauro, S., Gevry, N., Lis, J. T. & Kraus, W. L. NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell* 119, 803-14 (2004).
15. Tulin, A. & Spradling, A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci. *Science* 299, 560-2 (2003).
16. Sallmann, F. R., Vodenicharov, M. D., Wang, Z. Q. & Poirier, G. G. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *J Biol Chem* 275, 15504-11 (2000).
17. Menissier de Murcia, J. et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* 22, 2255-63 (2003).

18. Moore KL, Persaud TVN, *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*, Nobel Tıp Kitapevleri, 6. Baskıdan Çeviri, 2002; 323–329.
19. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G. İnsan Embriyolojisi. 7. Baskı, Alfa Basım Yayım Dağıtım, İstanbul, (1992).
20. Larsen WJ. Human Embryology. Second Ed., Churchill Livingstone Inc., new York, (1997).
21. Picton HM. Activation of follicle Development: The Primordial Follicle. *Theriogenology*; 55: 1193-1210, (2001).
22. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Seventh Ed., Palme Yayıncılık, Ankara, (1996).
23. Tekelioğlu M. İnsanın Üreme ve Gelişmesi (Hekimlik Embriyolojisi). 1. Baskı, Dumat Ofset Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti., Ankara, (1995).
24. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 1. Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Şti., Ankara, (1995).
25. Dere F. Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. 5. Baskı, Cilt:2. Adana Nobel Tıp Kitabevi, Adana, (1999)
26. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 2<sup>nd</sup> Ed., W.B. Saunders comp., Philadelphia, (2001).
27. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.
28. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Wallingford, UK: CAB International, 1994.
29. <http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg> 10.06.2007.
30. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular And Molecular Mechanisms Regulating Oocyte Quality And The Relevance For Farm Animal Reproductive Efficiency, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 2005, 24 (1), 413-423.
31. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction* 2005; 130 147–156.
32. Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. McGraw&Hill 10. Ed. 2003; 449-465
33. Miyano T. In Vitro Growth Of Mammalian Oocytes. *J Reprod Dev*. 2005 Apr;51(2):169-76.
34. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular And Molecular Mechanisms Regulating Oocyte Quality And The Relevance For Farm Animal Reproductive Efficiency, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz*, 2005, 24 (1), 413-423.
35. Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990; 33: 77-87
36. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, 398, Ankara, 2006;531-588



37. Mehlmann LM. Stops And Starts In Mammalian Oocytes: Recent Advances In Understanding The Regulation Of Meiotic Arrest And Oocyte Maturation. *Reproduction*. 2005 Dec;130(6):791-9.
38. Mayes M. The meiotic arrest of bovine oocytes. Département des sciences animales Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Université Laval Québec PhD thés. De l'Université Laval, Québec Canada. 2002; 4-110.
39. Magni, G. et al. Enzymology of NAD<sup>+</sup> homeostasis in man. *Cell Mol Life Sci* 61, 19-34 (2004).
40. Rongvaux, A., Andris, F., Van Gool, F. & Leo, O. Reconstructing eukaryotic NAD metabolism. *Bioessays* 25, 683-90 (2003).
41. Ziegler, M. New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *Eur J Biochem* 267, 1550-64 (2000).
42. Berger, F., Ramirez-Hernandez, M. H. & Ziegler, M. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem Sci* 29, 111-8 (2004).
43. Schuber, F. & Lund, F. E. Structure and enzymology of ADP-ribosyl cyclases: conserved enzymes that produce multiple calcium mobilizing metabolites. *Curr Mol Med* 4, 249-61 (2004).
44. Zatman, L. J., Kaplan, N. O. & Colowick, S. P. Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleotidase by nicotinamide, an exchange reaction. *J Biol Chem* 200, 197-212 (1953).
45. Yang, X. J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. *Oncogene* 24, 1653-62 (2005).
46. Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N. & Ruggieri, S. Enzymology of NAD<sup>+</sup> synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73, 135-82, xi (1999).
47. Bieganowski, P. & Brenner, C. Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD<sup>+</sup> in fungi and humans. *Cell* 117, 495-502 (2004).
48. Berger, F., Lau, C., Dahlmann, M. & Ziegler, M. Subcellular compartmentation and differential catalytic properties of the three human nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase isoforms. *J Biol Chem* 280, 36334-41 (2005).
49. Ziegler, M. The adenine nucleotide translocase--a carrier protein potentially required for mitochondrial generation of NAD. *Biochemistry (Mosc)* 70, 173-7 (2005).
50. Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. & de Murcia, G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 517-28 (2006).
51. (<http://betelgeuse.ustrasbg.fr>)
52. Chambon, P., Weill, J. D. & Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 11, 39-43 (1963).
53. Chambon, P., Weil, J. D., Doly, J., Strosser, M. T., and Mandel, P. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 25, 638-643 (1966).

54. Dolly, J. and Petek, F. Étude de la structure d'un composé "poly(ADP-ribose)" synthétisé par des extraits nucléaires de foie de poulet. *CR. Hebd. Seanc. Acad. Sci. Ser. D Sci. Nat.* 263, 1341-1344 (1966).
55. Fujimura, S., Sugimura, T., Okabe, K., and Yoshida, T. NMN-activated poly(A) polymerase in nuclei from rat liver and hepatoma cells (in Japanese). *Proc. Ann. Meeting of Jpn. Biochem. Soc.* 38, 691 (1965).
56. Reeder, R. H., Ueda, K., Honjo, T., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O. Studies on the polymer of adenosine phosphate ribose. II. Characterization of the polymer. *J. Biol. Chem.* 242, 3172-3179 (1967).
57. Hasegawa, S., Fujimura, S., Shimizu, Y., Okuyama, H., and Sugimura, T. Venom phosphodiesterase hydrolysis product of ADPR polymer synthesized enzymatically from NAD<sup>+</sup> (in Japanese). *Proc. Ann. Meeting of Jpn. Biochem. Soc.* 39, 194 (1967).
58. Fujimura, S., Hasegawa, S., and Sugimura, T. Nicotinamide mononucleotide-dependant incorporation of ATP into acid-insoluble material in rat liver nuclei preparation. *Biochim. Biophys. Acta* 134, 496-499 (1967).
59. Fujimura, S., Hasegawa, S., Shimizu, Y., and Sugimura, T. Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate-ribose moiety of nicotinamide-adenine dinucleotide by nuclear enzyme. I. Enzymatic reactions. *Biochim. Biophys. Acta* 145, 247-159 (1967).
60. Alvarez-Gonzalez, R. and Jacobson, M. K. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo. *Biochemistry* 26, 3218-3224 (1987).
61. Hayashi, K., Tanaka, M., Shimada, T., Miwa, M., and Sugimura, T. Size and shape of poly(ADP-ribose): examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 102-107 (1983).
62. <http://parplink.u-strasbg.fr/protocols/tools/southwestern>
63. Ueda, K. and Hayaishi, O. ADP-ribosylation, *Annu. Rev. Biochem.* 54,73, (1985).
64. Kumari, S. R., Mendoza - Alvarez, H. & Alvarez - Gonzalez, R. Functional interactions of p53 with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) during apoptosis following DNA damage: covalent poly(ADP-ribosyl)ation of p53 by exogenous PARP and noncovalent binding of p53 to the M(r) 85,000 proteolytic fragment. *Cancer Res* 58, 5075-8 (1998).
65. Simbulan, C. M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase stimulates DNA polymerase alpha by physical association. *J Biol Chem* 268, 93-9 (1993).
66. Cell Death Kitap part 9 page 183-207.
67. Ame, J. C., Spelnhauer, C. & de Murcia, G. The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-93 (2004).
68. Wang, Z. Q. et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 9, 509-20 (1995).
69. Wang, Z. Q. et al. PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes Dev* 11, 2347-58 (1997).

70. Shieh, W. M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 273, 30069-72 (1998).
71. Ame, J. C. et al. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274, 17860-8 (1999).
72. Johansson, M. A human poly(ADP-ribose) polymerase gene family (ADPRTL): cDNA cloning of two novel poly(ADP-ribose) polymerase homologues. *Genomics* 57, 442-5 (1999).
73. Kaminker, P. G. et al. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 276, 35891-9 (2001).
74. Kickhoefer, V. A. et al. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 146, 917-28 (1999).
75. Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A. & de Lange, T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-7 (1998).
76. Hassa, P. O., Haenni, S. S., Elser, M. & Hottiger, M. O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going? *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 789-829 (2006).
77. Sallmann, F. R., Vodenicharov, M. D., Wang, Z. Q. & Poirier, G. G. Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. *J Biol Chem* 275, 15504-11 (2000).
78. Hassa, P. O. & Hottiger, M. O. The functional role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 59, 1534-53 (2002).
79. Augustin, A. et al. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 116, 1551-62 (2003).
80. de Murcia, G. & Menissier de Murcia, J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19, 172-6 (1994).
81. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I. & Poirier, G. G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 342 ( Pt 2), 249-68 (1999).
82. de Murcia, J. M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7303-7 (1997).
83. Masutani, M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2301-4 (1999).
84. Oliver, A. W. et al. Crystal structure of the catalytic fragment of murine poly(ADP-ribose) polymerase-2. *Nucleic Acids Res* 32, 456-64 (2004).
85. Aravind, L. & Koonin, E. V. SAP - a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci* 25, 112-4 (2000).
86. Dantzer, F. et al. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 24, 1595-607 (2004).

87. Meyer-Ficca, M. L., Meyer, R. G., Coyle, D. L., Jacobson, E. L. & Jacobson, M. K. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res* 297, 521-32 (2004).
88. Koh, D. W. et al. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17699-704 (2004).
89. Hanai, S. et al. Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 82-6 (2004).
90. Cortes, U. et al. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice. *Mol Cell Biol* 24, 7163-78 (2004).
91. Koh, D. W., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Poly(ADP-ribosylation) regulation of life and death in the nervous system. *Cell Mol Life Sci* 62, 760-8 (2005).
92. Yu, S. W. et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-63 (2002).
93. Oka, S., Kato, J. & Moss, J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *J Biol Chem* 281, 705-13 (2006).
94. Counting Ovarian Follicles Protocols. Vincent Center for Reproductive Biology Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School 2004.
95. Chang, P., Jacobson, M. K. & Mitchison, T. J. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure. *Nature* 432, 645-9 (2004).
96. Compton, D. A. Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem* 69, 95-114 (2000).
97. Chang, W., Dynek, J. N. & Smith, S. NuMA is a major acceptor of poly(ADP-ribosylation) by tankyrase 1 in mitosis. *Biochem J* 391, 177-84 (2005).
98. Saxena, A., Saffery, R., Wong, L. H., Kalitsis, P. & Choo, K. H. Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosylated). *J Biol Chem* 277, 26921-6 (2002).
99. Saxena, A. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* 11, 2319-29 (2002).
100. Chiang, Y. J. et al. Generation and characterization of telomere length maintenance in tankyrase 2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 26, 2037-43 (2006).
101. de Murcia, J. M. et al. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7303-7 (1997).
102. Hsiao, S. J., Poitras, M. F., Cook, B. D., Liu, Y. & Smith, S. Tankyrase 2 poly(ADP-ribose) polymerase domain-deleted mice exhibit growth defects but have normal telomere length and capping. *Mol Cell Biol* 26, 2044-54 (2006).

103. Liu, Y. et al. Vault poly(ADP-ribose) polymerase is associated with mammalian telomerase and is dispensable for telomerase function and vault structure in vivo. *Mol Cell Biol* 24, 5314-23 (2004).
104. Masutani, M. et al. Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice. *Mol Cell Biochem* 193, 149-52 (1999).
105. Chang, P., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nat Cell Biol* 7, 1133-9 (2005).
106. Dynek, J. N. & Smith, S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* 304, 97-100 (2004).
107. Kanai, M. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase localizes to the centrosomes and chromosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 278, 385-9 (2000).
108. Smith, S. & de Lange, T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Sci* 112 ( Pt 21), 3649-56 (1999).
109. Haag, F. et al. T cells of different developmental stages differ in sensitivity to apoptosis induced by extracellular NAD. *Dev Immunol* 9, 197-202 (2002).
110. Kharadia, S. V., Huiatt, T. W., Huang, H. Y., Peterson, J. E. & Graves, D. J. Effect of an arginine-specific ADP-ribosyltransferase inhibitor on differentiation of embryonic chick skeletal muscle cells in culture. *Exp Cell Res* 201, 33-42 (1992).
111. Munshi, C. B., Graeff, R. & Lee, H. C. Evidence for a causal role of CD38 expression in granulocytic differentiation of human HL-60 cells. *J Biol Chem* 277, 49453-8 (2002).
112. Ohlrogge, W. et al. Generation and characterization of ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.1/ART2.2-deficient mice. *Mol Cell Biol* 22, 7535-42 (2002).
113. Tangye, S. G., Avery, D. T., Deenick, E. K. & Hodgkin, P. D. Intrinsic differences in the proliferation of naive and memory human B cells as a mechanism for enhanced secondary immune responses. *J Immunol* 170, 686-94 (2003).
114. Jorgensen, R. et al. Exotoxin A-eEF2 complex structure indicates ADP ribosylation by ribosome mimicry. *Nature* 436, 979-84 (2005).
115. Yates, S. P. et al. Structure-function analysis of water-soluble inhibitors of the catalytic domain of exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 385, 667-75 (2005).
116. Brac, T. & Ebisuzaki, K. PolyADP ribosylation and Friend erythroleukemic-cell differentiation: action of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Differentiation* 34, 139-43 (1987).
117. Colon-Otero, G. et al. Inhibition of hemopoietic growth factor-induced proliferation by adenosine diphosphate-ribosylation inhibitors. *Blood* 70, 686-93 (1987).
118. De Blasio, A. et al. Differentiative pathway activated by 3-aminobenzamide, an inhibitor of PARP, in human osteosarcoma MG-63 cells. *FEBS Lett* 579, 615-20 (2005).

119. Francis, G. E. et al. Role of ADP-ribosyl transferase in differentiation of human granulocyte-macrophage progenitors to the macrophage lineage. *Blood* 62, 1055-62 (1983).
120. Kuo, M. L., Chau, Y. P., Wang, J. H. & Shiah, S. G. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase block nitric oxide-induced apoptosis but not differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 219, 502-8 (1996).
121. Terada, M., Fujiki, H., Marks, P. A. & Sugimura, T. Induction of erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells by nicotinamide and related compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 6411-4 (1979).
122. Butt, T. R. & Sreevalsan, T. Interferon and sodium butyrate inhibit the stimulation of poly(ADP-ribose) synthetase in mouse cells stimulated to divide. *Exp Cell Res* 148, 449-59 (1983).
123. Chabert, M. G., Kopp, P. C., Bischoff, P. L. & Mandel, P. Cell culture of tumors alters endogenous poly(ADPR)polymerase expression and activity. *Int J Cancer* 53, 837-42 (1993).
124. Chabert, M. G., Niedergang, C. P., Hog, F., Partisani, M. & Mandel, P. Poly(ADPR)polymerase expression and activity during proliferation and differentiation of rat astrocyte and neuronal cultures. *Biochim Biophys Acta* 1136, 196-202 (1992).
125. Marini, M. et al. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation does not prevent lymphocyte entry into the cell cycle. *FEBS Lett* 253, 146-50 (1989).
126. Rochette, L., Didier, J. P., Moreau, D. & Bralet, J. Effect of substrate on release of myocardial norepinephrine and ventricular arrhythmias following reperfusion of the ischemic isolated working rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 2, 267-79 (1980).
127. Meyer-Ficca, M. L., Scherthan, H., Burkle, A. & Meyer, R. G. Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 114, 67-74 (2005).
128. Shall, S. & Sugimura, T. What is new about ADP-ribosylation? *Bioessays* 28, 97-9 (2006).
129. Spradling, A. C. Stem cells: more like a man. *Nature* 428, 133-4 (2004).
130. Hamatani, T. et al. Age-associated alteration of gene expression patterns in mouse oocytes. *Hum Mol Genet* 13, 2263-78 (2004).
131. Henderson, S. A. & Edwards, R. G. Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218, 22-8 (1968).
132. Polani, P. E. & Jagiello, G. M. Chiasmata, meiotic univalents, and age in relation to aneuploid imbalance in mice. *Cytogenet Cell Genet* 16, 505-29 (1976).
133. Kanai, M. et al. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* 23, 2451-62 (2003).
134. Sartorius, C. A., Takimoto, G. S., Richer, J. K., Tung, L. & Horwitz, K. B. Association of the Ku autoantigen/DNA-dependent protein kinase holoenzyme and poly(ADP-ribose) polymerase with the DNA binding domain of progesterone receptors. *J Mol Endocrinol* 24, 165-82 (2000).

135. Miyamoto, T., Kakizawa, T. & Hashizume, K. Inhibition of nuclear receptor signalling by poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biol* 19, 2644-9 (1999).
136. Murdoch, W. J. Perturbation of sheep ovarian surface epithelial cells by ovulation: evidence for roles of progesterone and poly(ADP-ribose) polymerase in the restoration of DNA integrity. *J Endocrinol* 156, 503-8 (1998).
137. Morin, V. et al. Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Biochem J* 343 Pt 1, 95-8 (1999).
138. Wayman, N., McDonald, M. C., Thompson, A. S., Threadgill, M. D. & Thiemermann, C. 5-aminoisoquinolinone, a potent inhibitor of poly (adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size. *Eur J Pharmacol* 430, 93-100 (2001).
139. Eppig, J. J. & O'Brien, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 54, 197-207 (1996).
140. O'Brien, M. J., Pendola, J. K. & Eppig, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 68, 1682-6 (2003).
141. El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H. & Caldecott, K. W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 31, 5526-33 (2003).