

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POSTNATAL FARE OVARYUM DOKULARINDA *Tert***  
**GEN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

Esra Gözde KÖŞEBENT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2019-ANTALYA

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**POSTNATAL FARE OVARYUM DOKULARINDA *Tert***  
**GEN EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ**

Esra Gözde KÖŞEBENT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2017-2762 proje numarası ile desteklenmiştir.


“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”


2019-ANTALYA


**Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;**

Bu alışma j¼rimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Y¼ksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25 Haziran 2019

İmza

Tez Danışmanı :   
Doç. Dr. Sağfet ÖZT¼RK  
Akdeniz ¼niversitesi

¼ye :   
Prof. Dr. G¼khan AKKOYUNLU  
Akdeniz ¼niversitesi

¼ye :   
Dr. Öğr. Üyesi Dilek BAYRAM  
S¼leyman Demirel ¼niversitesi

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. Narin DERİN**

**Enstit¼ M¼d¼r¼**

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.



Öğrenci

Esra Gözde KÖŞEBENT



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

## TEŐEKKÜR

Çalıőmalarımnda beni her zaman destekleyen, bilgi, birikim, tecrübe ve vizyonu ile bana yön veren, gelişimimde en çok katkısı olan değerli hocam Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK'e,

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine, tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yardımları ile yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli personeline,

Her daim bana güç veren ve dağ gibi arkamda duran babam Veysel KÖŞEBENT'e, güzel dilekleriyle beni uğurlayan annem Gülsen KÖŞEBENT'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Telomerler, ökaryotik kromozomların uç kısımlarında bulunan tekrarlı DNA dizileridir. Biyolojik yaşlanmaya bağlı olarak memeli ovaryumlarında yaşlanmakta ve bu süreçte telomerlerin kısaldığı bilinmektedir. Telomerlerdeki bu kısalmının moleküler alt yapısı tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı telomerlerin uzatılmasında ve telomerlerin bütünlüğünün korunmasında görevli genlerin postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryumlarında belirlenmesidir.

**Yöntem:** Farelerde normal ovarial gelişimin erken (1. ve 2. hafta), genç (3. ve 4. hafta), ergin (5. ve 6. hafta), geç ergin (16. ve 18. hafta) ve yaşlı (52., 60. ve 72. hafta) dönem olmak üzere 5 grup (n=3) oluşturuldu. Fare ovaryumlarında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1a* genlerinin mRNA ekspresyonu qRT-PCR ile, protein ekspresyonu ise immünohistokimya ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

**Bulgular:** Analizler sonucunda erken dönem ovarium dokularındaki *Tert* mRNA ekspresyonu genç, ergin, geç ergin ve yaşlı dönemlere göre daha yüksek bulunmuştur. *Terc* mRNA ekspresyon ise erken dönemden yaşlı döneme doğru azaldığı tespit edildi. *Trf1* ekspresyonu gruplar arasında farklılık göstermezken; *Trf2* ekspresyonu genç ve ergin dönemlerden farklı olarak geç ergin dönemde en düşük düzeyde bulundu. Yaşlı dönemdeki *Pot1a* ekspresyonu, geç ergin döneme göre daha yüksek bulunmuştur. Gruplar arasında görece TERT ekspresyonu, erken dönemden yaşlı döneme doğru azalmış, fakat bu azalma anlamlı olarak bulunmamıştır. TRF1 ekspresyonunda istatistiksel olarak bir fark belirlenmemiştir. TRF2 ekspresyonu, erken dönemde yaşlı döneme göre daha düşük bulunmuştur. Erken dönemden geç ergin döneme doğru benzer düzeylerde seyreden POT1 ekspresyonu, geç ergin dönemde azalmakta ve yaşlı dönemde ise yükselmektedir.

**Sonuç:** Ovarial yaşlanmaya bağlı olarak telomerde gözlenen kısaltmada, *Tert*, *Terc*, *Trf2* ve *Pot1a* genlerindeki ekspresyonel değişimlerin etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu genlerdeki değişimin, telomer uzunluğu üzerindeki etkisini belirlemeye yönelik, daha detaylı moleküler biyolojik çalışmaların gerekli olduğu kanısındayız.

**Anahtar Kelimeler:** telomer, telomeraz, ovarium, yaşlanma.

## ABSTRACT

**Objective:** Telomeres are repetitive DNA sequences found at the ends of eukaryotic chromosomes. Due to biological aging mammalian ovaries are getting aged and telomeres shorten during this process. The molecular background of telomeres shortening is not fully understood. The aim of this study was to determine the genes involved in elongating telomeres and maintaining the integrity of telomeres in the mouse ovaries at different ages of postnatal life.

**Method:** Five groups were formed based on the ovarian development terms in mice as follows: early (1- and 2-week old), young (3- and 4-week old), adult (5- and 6-week old), late adult (16- and 18-week old) and aged (52-, 60- and 72-week old). *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* and *Pot1a* mRNA expression has been determined by qRT-PCR and their protein expression was characterized by using immunohistochemistry in the mouse ovaries. The statistical significance was evaluated with one way ANOVA test.

**Results:** *Tert* expression in early group was found to be significantly higher than that of young, adult, late adult and aged groups. The *Terc* expression decreased from early to aged groups. Although *Trf1* expression did not differ among groups, *Trf2* expression was at the lowest levels in the late adult groups when compared to young and adult groups. *Pot1a* expression in the aged group was significantly higher than that of in the late adult groups. The relative TERT expression among the groups decreased from early to aged groups, but this change was not found significant. No statistically significant difference was found in TRF1 expression among groups. TRF2 expression was significantly lower in the early group in comparison to the aged group. The POT1 expression decreased in the late adult groups and increased in the aged group.

**Conclusion:** The expressional changes in *Tert*, *Terc*, *Trf2* and *Pot1a* genes are thought to have an effect on telomere shortening during ovarian aging. We believe that more detailed molecular biological studies are needed to determine the effect of these genes on telomere length.

**Keywords:** telomere, telomerase, ovary, aging.

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	<b>i</b>
<b>ABSTRAT</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>iii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Görevleri</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Memelilerde Oogenez</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Memelilerde Folikülogenez</b>	<b>7</b>
<b>2.4. Telomerlerin Yapısı</b>	<b>10</b>
<b>2.4.1. Telomere Bağlı Proteinler</b>	<b>11</b>
<b>2.5. Telomeraz Enziminin Yapısal Özellikleri</b>	<b>17</b>
<b>2.5.1. TERC (Telomeraz RNA Alt Birimi)</b>	<b>18</b>
<b>2.5.2. TERT (Telomeraz Geri Trankriptaz)</b>	<b>19</b>
<b>2.5.3. Telomerazın Uzatma Mekanizması</b>	<b>20</b>
<b>2.5.4. Telomeraz Aktivitesinin/Ekspresyonunun Düzenlenmesi</b>	<b>21</b>
<b>2.6. Telomerlerin Uzatılma Mekanizması</b>	<b>22</b>
<b>2.7. Memeli Ovaryum Hücrelerinde Telomer Uzunluğu</b>	<b>23</b>
<b>2.8. Memeli Oosit ve Erken Dönem Embriyolarda Telomeraz Aktivitesi</b>	<b>25</b>



2.9. Telomer ve Yaşlanma	26
2.10. Ovaryal Yaşlanma ve Telomer Biyolojisi	27
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>31</b>
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	31
3.2. Postnatal Fare Ovaryumlarında Tert, Terc, Trf1, Trf2 ve Pot1a mRNA'ların Ekspresyonunun qRT-PCR ile Belirlenmesi	31
3.2.1. Postnatal Ovaryumlardan Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu	31
3.2.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması	33
3.2.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	34
3.2.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları	34
3.3. Postnatal Ovaryumlarda TERT, TRF1, TRF2, POT1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimya ile Belirlenmesi	36
3.3.1. Postnatal Fare Ovaryumlarının Rutin Parafin Takibi	37
3.3.2. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerine Hematoksilen-Eozin Boyama	37
3.3.3. Postnatal Fare Ovaryumlarına İmmünohistokimya Uygulaması	38
<b>4. BULGULAR</b>	<b>41</b>
4.1. Postnatal Ovaryumların Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları	41
4.2. Postnatal Ovaryum Dokularında qRT-PCR Sonuçları	43
4.2.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Tert</i> mRNA Ekspresyonu	44
4.2.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Terc</i> mRNA Ekspresyonu	45
4.2.3. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Trf1</i> mRNA Ekspresyonu	47
4.2.4. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Trf2</i> mRNA Ekspresyonu	49
4.2.5. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Pot1a</i> mRNA Ekspresyonu	51
4.3. İmmünohistokimya Boyanma Sonuçları	53

<b>4.3.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî TERT Protein Ekspresyonu</b>	<b>54</b>
<b>4.3.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelî TRF1 Protein Ekspresyonu</b>	<b>58</b>
<b>4.3.3. Postnatal Ovaryumlarda Görelî TRF2 Protein Ekspresyonu</b>	<b>62</b>
<b>4.3.4. Postnatal Ovaryumlarda Görelî POT1 Protein Ekspresyonu</b>	<b>66</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>71</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>79</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>97</b>

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 3.1.</b>	Postnatal fare ovaryum dokularından elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri	<b>32</b>
<b>Tablo 3.2.</b>	Postnatal fare ovaryum dokularından DNaz uygulanarak elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri	<b>33</b>
<b>Tablo 3.3.</b>	qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler	<b>35</b>
<b>Tablo 3.4.</b>	İmmunohistokimya boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları	<b>40</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Ovaryumun histolojik yapısı	4
Şekil 2.2.	Primordial germ hücrelerinin genital kabartıya göçü	6
Şekil 2.3.	Memelilerde oogenezi süreci	7
Şekil 2.4.	Folikülogenez süreci	10
Şekil 2.5.	Metafaz kromozomlarında telomer bölgesi	11
Şekil 2.6.	Telomerlerin yapısı	12
Şekil 2.7.	Telomere bağlı şelilerin ve CST kompleksi proteinleri	17
Şekil 2.8.	Telomeraz enziminin genel yapısı	18
Şekil 2.9.	Telomerazın alt birimi olan TERT ve TERC yapısı	20
Şekil 2.10.	Homolog rekombinasyonla telomerlerin uzatılması	23
Şekil 2.11.	Ortalama telomer uzunluğunun zamana bağlı değişimi	27
Şekil 4.1.	Postnatal fare ovaryum dokularının HE boyama sonuçları	42
Şekil 4.2.	Postnatal fare ovaryumlarında görece <i>Tert</i> mRNA ekspresyonu	44
Şekil 4.3.	Postnatal ovaryum gruplarında görece <i>Tert</i> mRNA ekspresyonu	45
Şekil 4.4.	Postnatal fare ovaryumlarında görece <i>Terc</i> mRNA ekspresyonu	46
Şekil 4.5.	Postnatal ovaryum gruplarında görece <i>Terc</i> mRNA ekspresyonu	47
Şekil 4.6.	Postnatal fare ovaryumlarında görece <i>Trf1</i> mRNA ekspresyonu	48
Şekil 4.7.	Postnatal ovaryum gruplarında görece <i>Trf1</i> mRNA ekspresyonu	49

<b>Şekil 4.8.</b>	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>i Trf2</i> mRNA ekspresyonu	<b>50</b>
<b>Şekil 4.9.</b>	Postnatal ovaryum gruplarında görel <i>i Trf2</i> mRNA ekspresyonu	<b>51</b>
<b>Şekil 4.10.</b>	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>i Pot1a</i> mRNA ekspresyonu	<b>52</b>
<b>Şekil 4.11.</b>	Postnatal ovaryum gruplarında görel <i>i Pot1a</i> mRNA ekspresyonu	<b>53</b>
<b>Şekil 4.12.</b>	Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TERT immun boyanma sonuçları	<b>55</b>
<b>Şekil 4.13.</b>	Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TRF1 immun boyanma sonuçları	<b>59</b>
<b>Şekil 4.14.</b>	Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TRF2 immun boyanma sonuçları	<b>63</b>
<b>Şekil 4.15.</b>	Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında POT1 immun boyanma sonuçları	<b>67</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>ALT</b>	:	Telomerlerin Alternatif Uzatılması
<b>AMH</b>	:	Anti-Müllerian Hormon
<b>ART</b>	:	Yardımcı Üreme Teknikleri
<b>ATR</b>	:	Ataksi Telenjektazi ve RAD3 ile İlişkili
<b>BMP-4/7</b>	:	Kemik Morfogenetik Protein-4/7
<b>BLM</b>	:	Bloom Sendromu Helikazı
<b>BRCA1</b>	:	Göğüs Kanseri Duyarlılık
<b>CR 2/3/6/7/8</b>	:	Korunmuş Bölge 2/3/6/7/8
<b>CTC1</b>	:	Korunmuş Telomer Bileşeni 1
<b>dNTP</b>	:	Deoksinükleotid Trifosfat
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik Asit
<b>GDF 9</b>	:	Büyüme Farklandırıcı Faktör 9
<b>GV</b>	:	Germinal Vezikül
<b>GVBD</b>	:	Germinal Vezikül Yıkımı
<b>FSH</b>	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
<b>FISH</b>	:	Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
<b>hTEP1</b>	:	İnsan Telomeraz İlişkili Protein 1
<b>qRT-PCR</b>	:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>Q-FISH</b>	:	Kantitatif Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
<b>KL</b>	:	Korpus Luteum
<b>KOK</b>	:	Kumulus Oosit Kompleksi
<b>LH</b>	:	Lüteinleştirici Hormon

<b>LIF</b>	:	Lösemi İnhibe Edici Faktör
<b>NOS</b>	:	Nitrik Oksit Sentaz
<b>MAPK</b>	:	Mitojen ile Aktive Edilen Protein Kinaz
<b>MOS</b>	:	Protoonkogen Serin/treonin-Protein Kinaz
<b>MPF</b>	:	Olgunlaşmayı Sağlayan Faktör
<b>PCR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PGH</b>	:	Primordial Germ Hücresi
<b>PCOS</b>	:	Polikistik Over Sendromu
<b>PML</b>	:	Promiyelositik Lösemi
<b>POF</b>	:	Prematür Over Yetmezliği
<b>RAP1</b>	:	Represör Aktivatör Protein 1
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik Asit
<b>ROS</b>	:	Reaktif Oksijen Türleri
<b>RTEL</b>	:	Telomer Uzunluğu Düzenleyici
<b>POT1</b>	:	Telomerleri Koruma Proteini 1
<b>SP1</b>	:	Özgünlük Protein 1
<b>STN1</b>	:	CDC Baskılayıcısı Homolog 13
<b>SRY</b>	:	Y Kromozomunda Cinsiyet Belirleyici Bölge
<b>SV40</b>	:	Maymun Virüsü
<b>TDF</b>	:	Testis Belirleyici Faktör
<b>TEN</b>	:	Telomeraza Özel N-Terminal alanı
<b>TEN1</b>	:	STN1 İlişkili Telomerik Yolaklar 1
<b>TGFβ</b>	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
<b>TRAP</b>	:	Telomerik Tekrar Çoğaltma Protokolü

<b>TRBD</b>	:	Telomeraz RNA-Bağlayıcı Domain
<b>TRF1</b>	:	Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 1
<b>TRF2</b>	:	Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 2
<b>T-SCE</b>	:	Telomerik Kardeş Kromatin Değişimi
<b>TIN2</b>	:	TRF1 Etkileşimli Nükleer Protein 2
<b>TPP1</b>	:	POT1 Bağlanma Partneri 1
<b>YÜT</b>	:	Yardımcı Üreme Teknikleri
<b>WRN</b>	:	Werner Sendromu Helikazı
<b>ZP</b>	:	Zona Pellusida



# 1.GİRİŞ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Vitellus kesesi endoderm hücrelerinden köken alan primordial germ hücreleri, gonadal kabartılara ulaştıklarında oogonyumlara farklılanırlar. Çok sayıda mitotik bölünme geçiren oogonyumlar mayotik bölünmeye girmesi ile birlikte oosit olarak tanımlanmaktadır. Bu oositlerin etrafı stromal hücrelerden köken alan pre-granuloza hücreleri ile çevrelenmektedir. Bu şekilde birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında bekleyen oositi çevreleyen yassı pre-granuloza hücrelerinden oluşan yapıya primordial folikül denir. Primordial folikül etrafındaki granuloza hücreleri oosit gelişimine devam ederken kübikleşir ve çoğalmaya başlar. Bu aşamada folikül primer folikül olarak adlandırılır. Daha sonra oluşan folikül sekonder foliküldür ve granuloza hücreleri arasında antrum oluşumu gözlenir. Antrumlar bu süreçte birleşir ve Graaf folikülünü oluşturur. Doğumla birlikte kadınlarda belirli sayıda primordial folikül havuzu mevcuttur ve yaşlandıkça primordial folikül sayısı azalır.

Telomerler, ökaryotik hücre kromozomlarının uçlarında yer alan, protein kodlamayan tekrarlı DNA dizileridir (Moyzis ve ark., 1988). Telomer yapısında, telomerik tekrar bağlanma faktör 1 (TRF1), telomerik tekrar bağlanma faktör 2 (TRF2), TRF1 etkileşimli nükleer protein 2 (TIN2), telomerleri koruma proteini 1 (POT1), represör aktivatör protein 1 (RAP1) ve POT1 bağlanma partneri 1 (TPP1) ve TRF-ilişkili proteinler yer almaktadır. TRF1, TRF2, POT1, TIN2, RAP1 ve TPP1 proteinlerinin oluşturduğu özel komplekse “şelilerin” veya “telozom” adı verilmektedir. Şelilerin kompleksi, telomerlerin uzunluk ve kararlılık durumlarının kontrollerinde görev almaktadır (De Boeck, Forsyth, Praet, & Hogendoorn, 2009; de Lange, 2005; O'Sullivan & Karlseder, 2010). Telomerlerin temel görevleri arasında kromozomların çekirdek membranına veya çekirdek matriksine tutunması, kromozomal füzyonun ve uygunsuz DNA rekombinasyonun engellenmesi yer almaktadır. Ayrıca, bu özel yapılar mitoz ve mayoz bölünme sürecinde kromozomların çiftleşmesinde, kiazma ile sinaps oluşumu ve kromozom veya kromatidlerin doğru dağılımında etkin bir rol oynamaktadır (Bekaert, Derradji, & Baatout, 2004; O'Sullivan & Karlseder, 2010; Ozturk, Sozen, & Demir, 2013).

Ardışık DNA replikasyonu, oksidatif stres, genotoksik ajanlar ve çeşitli hastalıklara bağlı olarak kısalan telomerler, hücre tipine bağlı olarak telomeraz enzimi veya alternatif telomer uzama (ALT) mekanizmaları ile uzatılabilmektedir. Telomeraz enzimi dişi ve erkek germ hücreleri, erken dönem embriyolar, kök hücreler ve kanser hücreleri gibi sadece belirli hücre çeşitleri tarafından eksprese edilebilmektedir (Kim ve ark., 1994; Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996). Bu enzim, telomeraz geri transkriptaz (TERT) ve telomeraz RNA bileşeni (*TERC*) olarak bilinen iki alt üniteden oluşmaktadır.

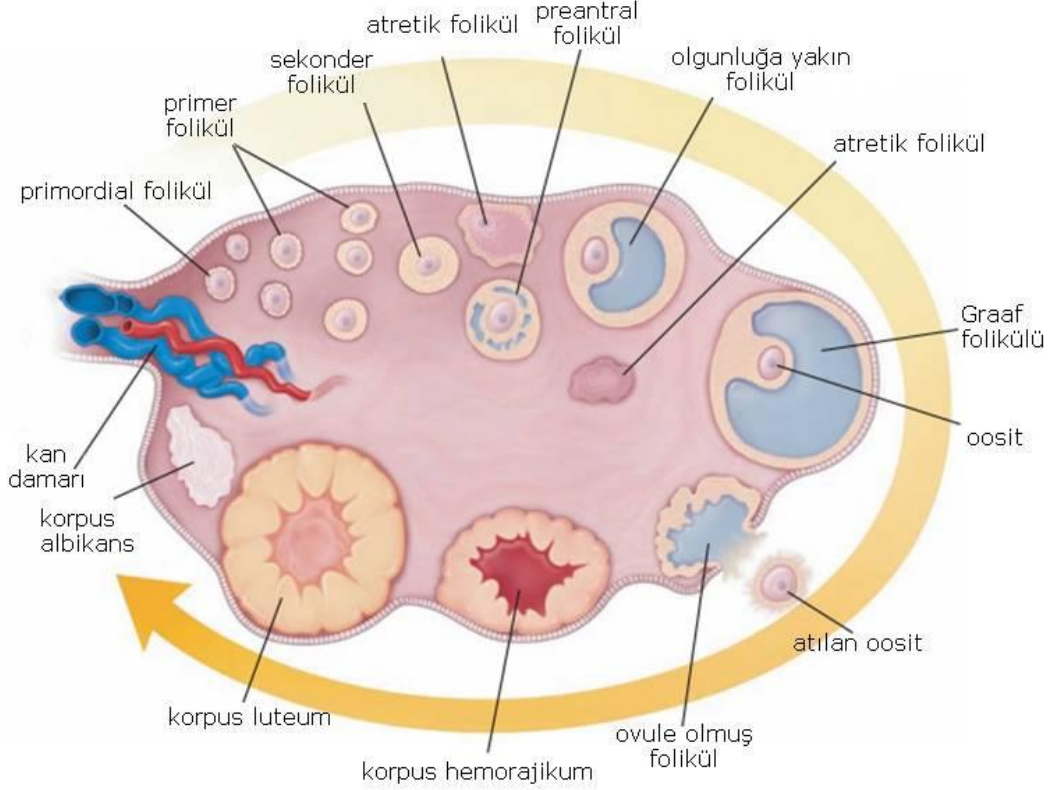
Telomerler, mitotik hücrelerde yaşlanmaya sebep olur ve mayoz sırasında da yaşlanmaya sebep olabilir (Keefe & Liu, 2009). Ayrıca oksidatif stres, bir DNA hasar cevabı veya anormal telomer rekombinasyonundan kaynaklanan telomer fonksiyon kaybı, üreme ile ilişkili mayoz kusurlarına, düşük ve infertiliteye sebep olur (Keefe & Liu, 2009). Çünkü telomerler zengin guanin içeriğinden dolayı oksidasyona karşı hassastır. Bu nedenle oksidatif stresle indüklenen ve bununla birlikte zengin primidin içeriğinden dolayı UV radyasyona bağlı DNA hasarına karşı da oldukça hassastır. Yaşla birlikte oksidatif stresin artışı telomer uzunluğunu etkilemektedir. Kısa telomerler primordial germ hücrelerinin mitotik bölünme kapasitesini sınırlandırabilir ve bu nedenle folikül havuzunun büyüklüğünü etkileyebilir (Keefe, Marquard, & Liu, 2006). Telomerler oosit yaşlanmasında da merkezi bir rol oynarlar (Keefe ve ark., 2006). Yaşla birlikte oosit kalitesini düşüren en önemli faktörler, mayoz sırasında anöploidi ve yanlış kromozom ayrımıdır (Webster & Schuh, 2017). Telomerazın eksik olduğu farelerde telomerler kısalдықça anormal iğ oluşumu, parçalanmış embriyolar, infertilite, azalmış sinaps ve kiazma görülür. Fakat ovaryal yaşlanma ile telomer kısalması ve bunun alt yapısı bilinmemektedir. Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18, 52, 60 ve 72 haftalık fare ovaryum dokularında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* gen ekspresyonları değişim gösterir. Bu hipotezden yola çıkarak, postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryum dokularında telomeraz enziminin katalitik aktivitesinden sorumlu olan *Tert* ile *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* genlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece, ovaryal yaşlanma sürecinde telomer kısalmasının altında yatan moleküler değişimlerin belirlenmesine yönelik önemli bir adım atılması planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Ovaryumun Histolojik Yapısı ve Görevleri

Dişi üreme sistemi internal yerleşimli bir çift ovaryuma sahiptir. Her bir ovaryum, pelvis boşluğunun derinlerine yerleşmiş, yassı, ovalimsi bir yapıdır. Ovaryumun bir kısmı mezovaryum adı verilen periton katlantısı aracılığıyla geniş bağa (broad ligament) diğer kısmı da suspensör ligament aracılığıyla uterus duvarına tutunmuştur. Ovaryum yüzeyi germinal epitel adı verilen, tek katlı yassı veya alçak kübik hücre tabakasıyla döşelidir. Bu tabaka visseral peritonun mezoteli ile devam eder. Germinal epitelin altında tunika albuginea denilen sıkı bağ dokusu vardır. Ovaryumun korteksi tunika albugineanın altına yerleşmiştir. Kortekste kollajen, retüküler lif ve iğ biçimli hücreleri içeren korteks stroması, farklı gelişim aşamasındaki foliküller bulunur. Korteksin derininde ovaryumun bol damar içeren bağ dokusuna zengin medullası vardır. Medulla ise gevşek bağ dokusu yapısındadır. Kan damarlarınca zengindir. Lenf damarları ve sinirler bulunur. Medullada ayrıca embriyonik atıklar (mezonefroz kalıntıları) da görülebilir (Moore, Persaud, & Torchia, 2011).

Ovaryum farklı gelişim aşamalarındaki folikülleri ve korpus luteumu içeren endokrin bir organdır (McGee & Hsueh, 2000). Ovaryum; fertilizasyon için oositin gelişimi, olgunlaşması ve bunun sonucu olarak olgun oositin atılmasından, ayrıca foliküler gelişim için gerekli olan hormonların sentezlenmesi ve salgılanması, östrus siklusunun düzenlenmesi, üreme sisteminin gelişimi, dişi seks karakterlerinin oluşması ve metabolik fonksiyonlardan sorumludur. Ovaryum fonksiyonları sürekli tekrarlayan folikül gelişimi, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve gerilemesi süreçleriyle ilişkilidir (Massin ve ark., 2004; McGee & Hsueh, 2000; Vanderhyden, 2002).



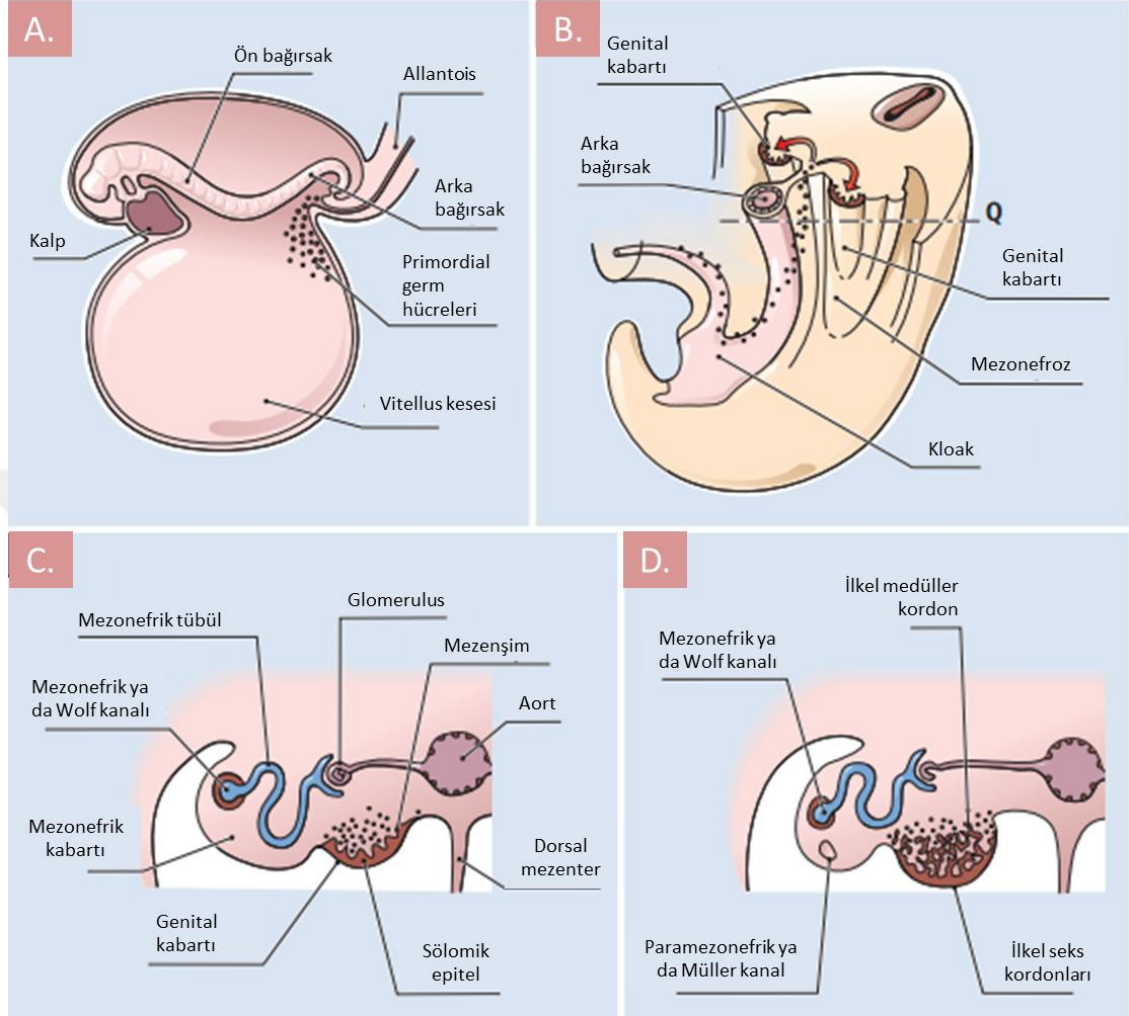
**Şekil 2.1.** Ovaryumun histolojik yapısı (Ross & Pawlina, 2006). Ovaryum en dıştan bir germinal epitel ile çevrilidir. Germinal epitelin altında tunika albuginea denilen sıkı bağ dokusu bulunur. Ovaryumun yapısı dışta korteks ve içte medulladan oluşur.

## 2.2. Memelilerde Oogenez

Gonadlar, karın arka duvarında, retroperitoneal bölgede, mezonefrozun kenarındaki sölomik epitelin kalınlaşması ve altındaki mezenşim hücreleri ile buraya göç eden primordial germ hücrelerinden oluşur (Şekil 2.2). Böylece mezonefrozun dorsali ve mezenter arasındaki orta hattın her iki yanında genital ya da gonadal kabartı olarak ortaya çıkar. İnsan embriyo gelişiminin 7. haftasına kadar dişi ve erkek gonadlar aynıdır ve bu dönem farklılaşmamış gonad olarak bilinir. Erkek fenotipin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için kritiktir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde saptanır. Dişi fenotipin gelişimi için ise iki X kromozomuna gerek vardır. X kromozomunda yer alan bir seri gen bulunmaktadır. Y kromozomu farklılaşmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici faktör (TDF) testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu faktörün etkisi altında primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğunda ise ovaryum gelişir. Mevcut

gonadın tipi, daha sonra dış genitalerde ve genital duktuslarda oluşan seksüel farklılaşmayı belirlemektedir. X kromozomu ovaryum gelişimi için genler taşır. 10. haftaya kadar ovaryumlar ayırt edilemezler. Primer seks kordonları belirgin değildir, medulla içerisine sokulur ve rudimenter bir yapı olan rete ovaryumu oluştururlar. Bu oluşan yapı ve primer seks kordonları (kortikal kordonlar), erken ftal peryotta ovaryumun yüzey epitelinden köken alarak altta bulunan mezenşim içerisine doğru girerler. Bu epityum mezotelden gelişmektedir. Kortikal kordonların boyutları arttığında, primordial germ hücreleri onların içlerine girerler. Dişi ve erkek embriyoların her ikisi de iki çift genital duktusa sahiptir. Mezonefrik duktus (Wolffian duktusu) erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli yer tutarken, paramezonefrik duktus (müllerian duktus) dişi üreme sistemi gelişiminde rol oynamaktadır (Moore ve ark., 2011).

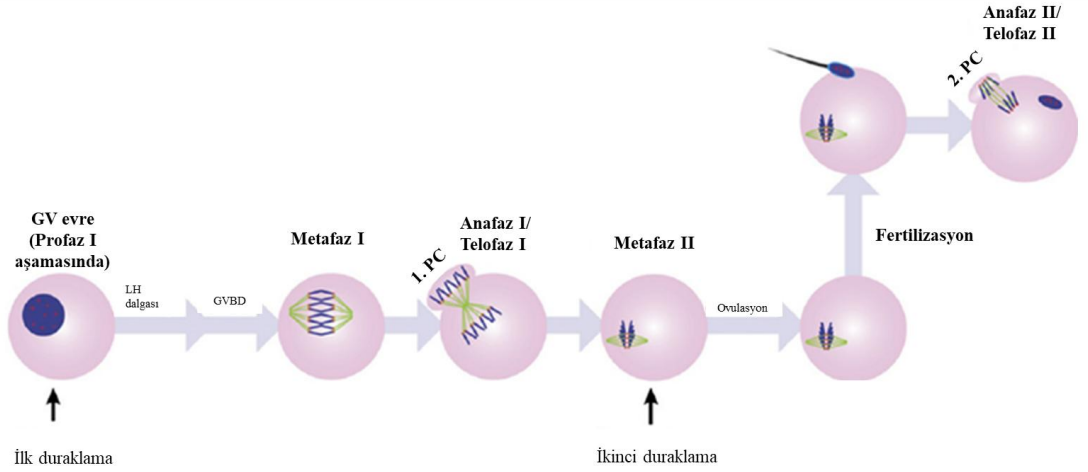
Primordial germ hücreleri (PGH) insanda ilk olarak gebeliğin 3-4. haftasında allantois yakınlarında vitellus kesesinin dorsal duvarının endoderminde yüz kadar hücre olarak ortaya çıkarlar (Şekil 2.2A). Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal kısmı embriyo içine doğru kıvrılır ve bu sırada PGH'ler, ameboid hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca yol alarak genital kabartıya geç ederler (Şekil 2.2B) (Oktem & Oktay, 2008). Embriyonik gelişimin 5-6. haftasında PGH'lerinin mezenşim içine girmesi ve ilkel seks kordonlarıyla birleşmesi gerçekleşir (Şekil 2.2D). Gebeliğin 12. haftasına gelindiğinde ilkel seks kordonları kaybolur. Gonadal farklılaşmayla birlikte kortikal kord gelişir ve primordial germ hücreleri bu kordlar (granuloza hücreleri) tarafından sarılır. Genital kabartının gelişimiyle oluşan gonadlarda embriyonik gelişimin 7. haftasına kadar PGH'lerin kolonizasyonu tamamlanır. PGH'ler gelişmekte olan gonadlara yerleştğinde oogonyumlara farklılırlar.



**Şekil 2.2.** Primordial germ hücrelerinin genital kabartıya göçü (Johnson, 2018). Primordial germ hücreleri gebeliğin ilk haftasında vitellus kesesinin endoderminde ortaya çıkarak genital kabartıya göç ederler ve gonad yolundan geçerek genital kabartıya ulaşırlar.

Fetal dönemde oogonyumların gelişimiyle birlikte oogenez süreci başlamaktadır (Şekil 2.3). Oogonyumlar 5. ayın sonunda, ardışık mitotik bölünmeler geçirerek sayılarını 7 milyona ulaştırırlar ve daha sonra büyük bir bölümü apoptoz ile ortadan kaldırılmaya başlarlar. Oogonyumlar olgun oositleri oluşturmak üzere mayoz öncesi DNA sentezine başlarlar ve mayoz giren oogonyumlar artık primer oosit olarak tanımlanırlar (Şekil 2.3). Primer oositler, birinci mayozun profaz I'in diploten aşamasında puberteye kadar durmaktadır. Primer oositin bu aşamada çekirdeğine germinal vezikül (GV) denir (Şekil 2.3) ve oositin etrafı tek katlı yassı foliküler hücreleri (pre-granuloza) ile çevrelenmiştir. Fetal dönemin sonuna gelindiğinde, tüm primer oositler oluşmuştur. Puberteyle birlikte her menstrual siklus döneminde 15-20 primordial folikül gelişmeye başlar fakat

dominant folikül seçimine bağlı olarak insanda sadece bir oosit olgunlaşır. Hipofizden salgılanan lüteinize edici hormonun (LH) uyarımı ile birinci mayoz tamamlanır ve ilk polar cisim atılır (Şekil 2.3). Artık sekonder oosit olarak tanımlanan oosit Mayoz II evresinin metafaz II aşamasında oosit bekler ve ikinci polar cisim fertilizasyon (döllenme) olursa atılmaktadır (Şekil 2.3). Oositin mayotik bölünmesini doğru zaman ve şekilde tamamlayabilmesi için belirli faktörlere ihtiyaç duymaktadır: olgunlaşmayı sağlayan faktör (MPF), bir protoonkogen Serin/treonin-Protein Kinaz (MOS) ve mitojen ile aktive edilmiş kinaz (MAPK). Farelerde MPF aktivitesi, germinal vezikül yıkımını (GVBD) tetikler. Ayrıca nitrik oksit sentaz (NOS/MAPK) yoluyla Metafaz I ve Metafaz II evresinde iğ oluşumunda, DNA replikasyonun baskılanmasında ve MII evresindeki duraklamadan sorumludur (Durlinger ve ark., 1999; McGee & Hsueh, 2000). MOS'ta metafaz II evresinde duraklamadan sorumludur.



**Şekil 2.3.** Memelilerde oogenezi süreci. Bu şekil, (Yesilaltay ve ark., 2014) nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. Primer oosit doğumdan önce başladığı mayoz bölünmede, puberteye kadar germinal vezikül (GV) evresinde beklemektedir (ilk duraklama). Puberteyle birlikte lüteinleştirici hormon (LH) salınır ve germinal vezikül yıkımı (GVBD) gerçekleşir. Mayoz I evresinin sonunda birinci polar cisim atılır. Mayoz II evresinde metafaz II 'ye gelindiğinde oosit ikinci mayotik duraklamayı yapar. Eğer spermle döllenme gerçekleşirse ovulasyon tamamlanır ve ikinci polar cisim atılır.

### 2.3. Memelilerde Folikülogenez

Primer oosit gelişirken etrafı ovaryuma ait stromal hücreler ile sarılır. Yassı epitel hücreleri olarak bilinen pre-granuloza hücreleri, oositin etrafını sararak primordial folikülleri oluşturur (Şekil 2.4). Pubertede ovaryum, sadece primordial foliküllerden oluşan bir folikül havuzuna sahiptir. Olgun oositler üretmek için, foliküller uykuda

bulunan primordial foliküllerin bir kısmı aktive edilir ve primer, sekonder, preantral ve antral folikül aşamaları boyunca gelişir (Şekil 2.4). Primordial folikül aşamasından, antral folikül oluşumuna kadarki süreç folikülogenez olarak bilinmektedir (Şekil 2.4). İnsan ovaryumu doğumdan önce belirli sayıda primer oosit havuzuna sahiptir. Altıncı haftada germ hücre sayısı 10 bin iken, 8. haftada 600 bine ve 20. haftada 6 milyona ulaşmaktadır (Oktem & Urman, 2010). Erken gelişimin 20. haftasından sonra germ hücreleri atreziye uğramaktadır ve doğumda 1 milyon, pubertede ise 300-400 bin kadar primer oosit kalmaktadır (Oktem & Urman, 2010). Bunların ise sadece % 1'i ovule olur ve çoğu atreziye uğramakta ve yaşlanma sürecinde tükenmektedir (Oktem & Urman, 2010).

Folikülogenez belirli aktivatör ve inhibitör faktörlerin dengesindeki değişime bağlı olarak başlatılmaktadır (Oktem & Urman, 2010). Profaz I aşamasında olan primer oositi içeren primordial foliküller, büyümeye başlamasıyla etrafındaki yassı pre-granuloza hücreleri mitozla çoğalır ve kübikleşir. Bu aşamadaki tek katlı kübik granuloza hücreleri ile çevrelenen primer oositi içeren foliküller primer folikül olarak isimlendirilir. Primer foliküldeki oosit, glikoproteinlerden zengin zona pellusida (ZP) adı verilen bir kılıf ile sarılmaya başlanmaktadır. ZP, primer oosit ve etrafındaki granuloza hücreleri tarafından sentezlenmektedir. Ayrıca, bu dönemde granuloza hücrelerinin altında bazal membran oluşmaktadır. Daha sonra ZP kalınlaşması ve granuloza hücrelerinin çoğalmasıyla iki ve daha fazla granuloza hücre takası oluşmaktadır. Granuloza hücreleri arasında herhangi bir boşluk içermeyen bu folikül aşamasına sekonder folikül adı verilir. Bu dönemde, bazal membranın dış kısmında, stromal hücrelerin düzenlenimi ile teka tabakası meydana gelmektedir (Fair, 2003; Motta, Nottola, & Makabe, 1997). Teka tabakası bağ dokusu hücreleri kılıfını oluştururlar. Teka folikülü iki tabakaya ayrılır: Teka interna ve teka eksterna. Teka interna damarca zengindir, granuloza hücreleri ve primer oositin beslenmesi bu damarlardan difüzyonla gerçekleşmektedir. Teka eksterna ise dış bağ dokusu hücreleridir ve düz kas hücreleri, kollajen fiber demetlerini içerir. Granuloza hücreleri arasında küçük boşlukların olduğu ve granuloza hücrelerinin mitotik aktivitelerine devam ettiği bu foliküllere preantral folikül adı verilmektedir (Şekil 2.4). Granuloza hücreleri arasındaki bu boşluklarda hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengin bir sıvı bulunmaktadır. Foliküler gelişimin ilerleyen

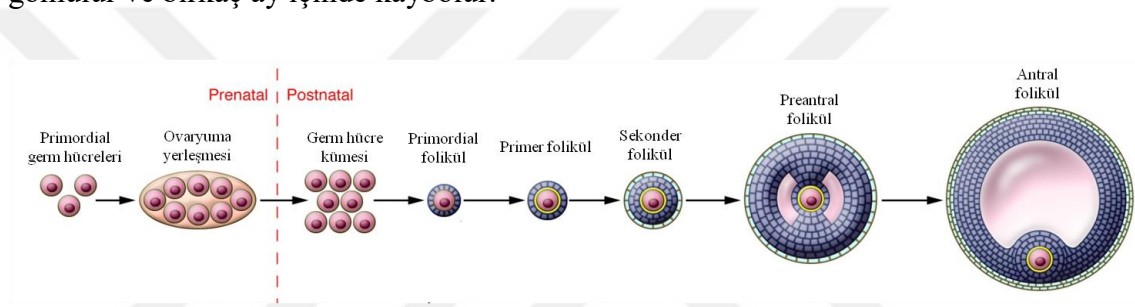


dönemlerinde bu boşluklar birleşerek, tek büyük bir boşluk olan antrumu oluşturur. Folikül içinde eksentrik duruş gösteren oosit ve ZP'ya sıkıca yapışır ve korona radiata denilen tek sıralı granuloza hücreleri ile çevrelenir. Korona radiata dışında, primer oositi çevreleyen diğer granuloza hücrelerine ise kumulus hücreleri denir. Kumulus hücreleri ile oositten oluşan bu yapının tamamına kumulus oosit kompleksi (KOK) denmektedir. Büyük bir antrum ve eksentrik olarak yerleşmiş KOK içeren foliküllere antral ya da Graaf folikülü adı verilir (Şekil 2.4). Antral folikül içindeki antrumu çevreleyen granuloza hücrelerine membrana granuloza tabakası olarak tanımlanmaktadır.

Folikülogenez süreci gonadotropin bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki evreye ayrılır. Bilindiği gibi, FSH ve LH hormonları hipofiz organının anterior lobundan gonadotrop denilen hücrelerden sentezlenip, salınmaktadır. FSH ve LH glikoprotein yapılı hormonlardır. Folikül gelişimi başlangıçta gonadotropinlerden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Primordial foliküllerin gelişimi veya dinlenme evresinden çıkması için çeşitli büyüme faktörlerin ve sinyal mekanizmalarının etkili olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalara göre, BMP-4 (Kemik Morfogenetik Protein-4) ve BMP-7 (Kemik Morfogenetik Protein-7) ve GDF 9 (Büyüme Farklandırıcı Faktör 9) gibi bazı TGF $\beta$  (Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta) süper ailesinin üyeleri bu süreçte kritik rol oynamaktadır. Bununla birlikte kit-ligand ve lösemi inhibe edici faktör (LIF) gibi primer foliküllerin oluşumuna etki eden başka büyüme faktörleri ve sitokinler de vardır. Granuloza hücre yüzeyinde, folikül büyüdükçe FSH reseptörleri sekonder folikül aşamasında ve LH reseptörleri ise preantral folikül aşamasında ortaya çıkmaktadır. Böylece, foliküler gelişim gonadotropinlere bağımlı hale gelir. FSH reseptörü sadece granuloza hücrelerinde bulunurken; LH reseptörü ise granuloza, teka tabakasındaki hücreler ile stromal alandaki hücrelerde bulunmaktadır.

Foliküler gelişimin kontrolünü gerçekleştiren FSH ve LH hormonlarının salınımı, çeşitli faktörler tarafından hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninde kontrol edilir. İnhibin A ve B izoformları, gonadotropinlerin FSH salınımını inhibe ederken; aktivin ise FSH geninin transkripsiyonunu düzenleyerek bu hormonun salınımını kontrol etmektedir. Ayrıca, kandaki östrojen seviyesinin azalması FSH ve LH hormonlarının salınımını artırır. Böylece, östrojen FSH ve LH'ın salgılanımının kontrolünde görev almaktadır. Normal

olarak östrojen, gonadotropin sentezi üzerine negatif geri bildirimle FSH ve LH salınımını azaltırken, ovulasyondan hemen önce pozitif geri bildirim yaparak ani bir LH artışına neden olmaktadır. LH'nın artışıyla birlikte Graaf folikülünden KOK, uterus tüplerine (ovidukt) atılır. Ovulasyondan sonra geride kalan granuloza hücreleri ve teka interna tabakası hücreleri korpus luteum yapısını oluşturmaktadır. Korpus luteum, östrojen ve progesteron üretir. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse, korpus luteum büyüyerek hormon salınmasına devam eder. Fertilizasyon olmaz ise korpus luteum geriler ve korpus albicans yapısı oluşur. Korpus albicans ovaryum korteksinin derinlerine doğru gömülür ve birkaç ay içinde kaybolur.

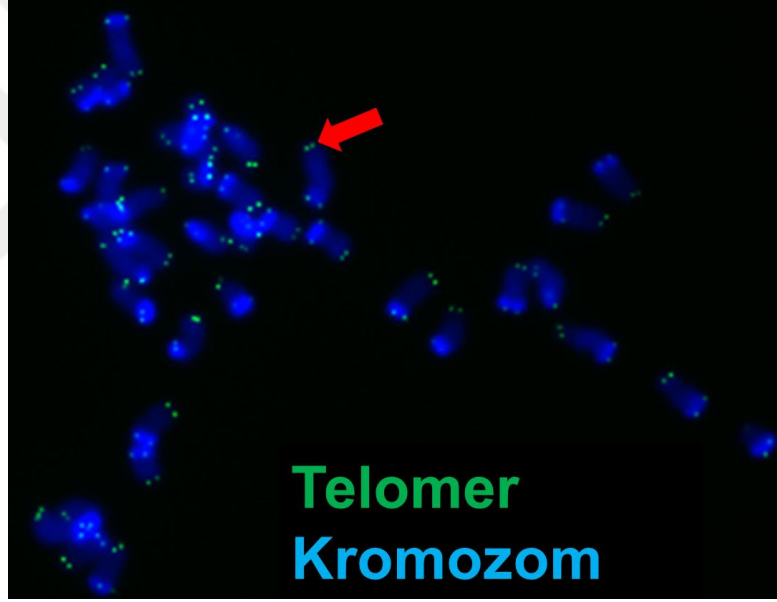


**Şekil 2.4.** Folikülogenez süreci. Bu şekil (Richards & Pangas, 2010) nolu kaynaktan değiştirilerek alınmıştır. Primordial germ hücreleri prenatal dönemde ovaryuma yerleşir ve burada germ hücre kümesini oluştururlar. Puberte döneminde ise belli sayıda primordial folikül gelişerek, sırasıyla sekonder, preantral ve antral folikülleri oluşturmaktadır. Her bir folikül, granuloza hücrelerinin şekli, tabaka sayısına ve granuloza hücreleri arasındaki boşluk durumlarına göre sınıflandırılmaktadır.

## 2.4. Telomerlerin Yapısı

İlk kez 1930'lu yıllarda Muller ve Mc Clintock tarafından *Drosophila*'da yapılan çalışmada, mutajenik X-ray ışınlarına karşı kromozomun uç kısımlarının dayanıklı olduğu bulunmuştur (McClintock & Hill, 1931). *Tetrahymena* (Silliat) ve mayada yapılan daha sonraki çalışmalarda kromozom uçlarının tandem tekrarları oluşturarak, evrimsel ve fonksiyonel olarak korunmayı ön plana çıkardığı gösterilmiştir (Yao, Blackburn, & Gall, 1979). Telomer kelimesi, Yunanca kökenli olup; 'telos' yani 'son' ve 'meros' yani 'kısım' sözcüklerinden meydana gelmektedir. Telomerler, ökaryotik hücrelerin kromozomlarının uç kısımlarında yer alan heterokromatin yapıdaki DNA dizileridir (Şekil 2.5). Telomerler, subtelomerik bölge ve esas telomer DNA'sından oluşmaktadır. Esas telomerik bölge, insanda 10-15 kb uzunluğunda olup (de Lange ve ark., 1990), subtelomerin devamındaki kısmıdır. Esas telomer bölgesi, tekrarlı dizilerden oluşan telomer DNA'sı ve telomere bağlı yapısal proteinlerden oluşur. Telomer DNA'sı,

memeli hücrelerinde TTAGGG tekrarlı çift zincirden ve 3'guanince (G) zengin 50-350 nükleotidlik tek zincirden oluşur. Bu yapı, G-kuyruk veya G-çıkıntı olarak bilinmektedir (Moyzis ve ark., 1988; Wellinger & Sen, 1997). G-kuyruğu, telomer DNA'sını kendi üzerine katlayarak T-ilmek yapısını oluştururken; çift zincirli DNA'ya girerek D-ilmek yapısını oluşturur (Griffith ve ark., 1999). Oluşan bu ilmek yapıları, telomerlerin DNA kırığı olarak algılanmamasını sağlar. Böylece, genom bütünlüğünün korunması, rekombinasyonun baskılanması ve telomeraz bağımlı telomer uzamasının inhibisyonu gerçekleştirilir. Telomerlerin fonksiyon kaybı yaşlanma, apoptoz ve genomik kararsızlığa sebep olmaktadır (Oeseburg, de Boer, van Gilst, & van der Harst, 2010).

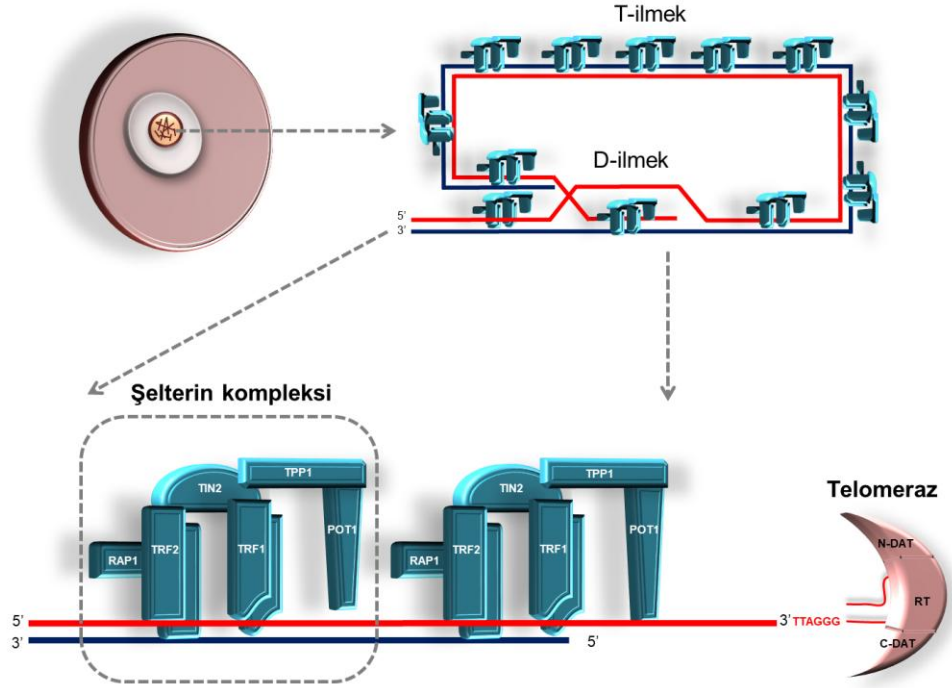


**Şekil 2.5.** Metafaz kromozomlarında telomer bölgeleri (Kalmbach ve ark., 2013). Metafaz kromozomlarında telomer bölgeleri floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Şekildeki mavi renk kromozomları, bir tanesinin kırmızı ok ile işaretlendiği yeşil renk ise telomerleri göstermektedir.

#### 2.4.1. Telomere Bağlı Proteinler

Telomerler telomerik DNA ve telomere bağlı proteinlerden oluşmaktadır. Telomerik tekrar bağlanma faktör 1 (TRF1), telomerik tekrar bağlanma faktör 2 (TRF2), TRF1 etkileşimli nükleer protein 2 (TIN2), telomerleri koruma proteini 1 (POT1), represör aktivatör protein 1 (RAP1) ve POT1 bağlanma partneri 1 (TPP1) proteinlerinin oluşturduğu telomere bağlı proteinler, telozom ya da şelterin kompleksi olarak bilinir (Şekil 2.6) (de Lange, 2005; Kosebent, Uysal, & Ozturk, 2018). Şelterin kompleksi

telomerlerin uzunluğunun korunmasında, kararlılığında, kromozomların çekirdek membranına veya çekirdek matriksine tutunmasında, kromozomal füzyonun ve uygunsuz DNA rekombinasyonun engellenmesinde rol alırlar (de Lange, 2005; O'Sullivan & Karlseder, 2010). Ayrıca, bu özel yapılar mitoz ve mayoz bölünme sürecinde kromozomların çiftleşmesinde, kiazma ile sinaps oluşumu ve kromozom veya kromatidlerin doğru dağılımında görev almaktadır (Bekaert ve ark., 2004; O'Sullivan & Karlseder, 2010).



**Şekil 2.6.** Telomerlerin yapısı (Kosebent ve ark., 2018). Telomerler telomerik DNA ve telomere bağlı proteinlerden (TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 ve RAP1) meydana gelir. Telomerler telomerez enzimi ile uzatılır. TRF1: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktörü 1, TRF2: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktörü 2, POT1: Telomerleri Koruma Proteini 1, TPP1: POT1 Bağlanma Partneri 1, TIN2: TRF1 Etkileşimli Nükleer Protein 2, RAP1: Represör Aktivatör Protein.

### TRF1 (Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 1)

TRF1 çift iplikçiğe bağlanan, 439 aminoasit rezidüsünden oluşan, telomere bağlanan ilk protein olarak bilinir. TRF1, çift zincire bağlanmadan önce TRF1-TRF1 homodimerini oluşturmaktadır (Meng, Hsu, Zhu, Lin, & Tsai, 2011). Aynı zamanda telomere bağlı bir diğer protein olan TIN2 ile etkileşime girerek telozom kompleks oluşumuna katılır. TRF1 yapısındaki herhangi bir bozulma telozom kompleksi proteinlerini doğrudan

etkiler ve telomerik tekrarlar korunamaz. TRF1, telomeraz aktivitesini baskılayarak telomer uzunluğunun negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (van Steensel & de Lange, 1997). TRF1'in, telomerlerle interfaz ve mitoz hücre döngü aşamalarında etkileştiği ortaya konulmuştur (M. Nakamura, Zhou, Kishi, & Lu, 2002) ve aynı zamanda Bloom sendromu (BLM) ve telomer uzunluğu düzenleyici (RTEL) gibi helikazları aktive ederek DNA replikasyonunu destekler (Martinez ve ark., 2009; Sfeir ve ark., 2009). Bununla birlikte telomerlerin mayoz sırasında çekirdek zarına tutunmasında ve telomerlerin füzyondan korunmasında etkin rol oynar (L. Wang ve ark., 2018). TRF1'in yokluğunda replikasyon çatalına bağlı kusurlar ortaya çıkar, bu da kontrolsüz hücre döngüsüne, mutasyonlara ve genomik kararsızlığa sebep olabilmektedir (Cheng & Chen, 2010; Stewart, Chaiken, Wang, & Price, 2012). Bununla birlikte farelerde yapılan çalışmada TRF1'in delesyonu, blastosist safhasında letaliteye yol açtığı gösterilmiştir (Karlseder ve ark., 2003). Ayrıca, TRF1'in aşırı ekspresyonu, telomerlerin kısalmasına neden olmaktadır (Krutilina ve ark., 2001).

Sığırdada GV ve MII oositten, erken dönem embriyolara kadar (zigot, 2, 4, 8 hücreli embriyo, morula ve blastosist evreleri) görece *Trf1* ekspresyonu analiz edilmiş ve istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Gilchrist, Kurjanowicz, Mereilles, King, & LaMarre, 2015).

### **TRF2 (Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 2)**

TRF2, TRF1 gibi telomerik tekrarların çift zincirine bağlanır ve telomer uzunluğunu negatif düzenleyicisi olarak görev alır. TRF2, TRF1 ile yapısal olarak da benzerdir fakat daha fazla bazik aminoasit dizisi içerdiğinden daha iyi korunmuştur ve 542 aminoasit rezidüsüne sahiptir. Hem homodimer (TRF2-TRF2) yapısını hem de RAP1 ile TRF2-RAP1 heterodimer yapısını oluşturabilmektedir. T-ilmek yapısı kromozomların 3' ucunun hasarlı DNA olarak algılanmasını engelleyerek telomerleri korumaya katkıda bulunmaktadır. Bununla birlikte TRF2, DNA hasar sinyallerinin iletilmesinde etkili olan önemli bir algılayıcı olan ATM ile etkileşir. Bu etkileşim telomerlerde DNA hasar cevabının aktivasyonunu engelleyerek, gereksiz onarım sürecinin başlamasını engeller (Amiard ve ark., 2007; Griffith ve ark., 1999). TRF2 ayrıca telomerle ilişkili DNA onarımında rol oynayan diğer faktörlerle de etkileşime girer. Bu faktörlerden birçoğunda

meydana gelen herhangi bir mutasyon erken yaşlanma ve kısa telomerlerle ilişkilendirilir (Kong ve ark., 2018; Si ve ark., 2018). TRF2 kaybı durumunda: DNA uçları hasarlı olacağından, füzyonlar, kısalan telomerler ve hücre ölümü görülebilir (van Steensel, Smogorzewska, & de Lange, 1998). Telomerazın varlığına rağmen TRF2'nin aşırı ifade edilmesi telomerlerin kısalmasına sebep olur ve ATM'ye bağlı DNA hasarına cevap verilemeyeceği için kromozom anomalilerine sebep olabilmektedir (van Steensel ve ark., 1998).

TRF2 fare spermatogenik hücrelerinde ve spermatozoonda akrozom membranında çekirdekte lokalizasyonu görülmüştür (Dolnik, Kuznetsova, Voronin, & Podgornaya, 2003). Sığırdı GV ve MII oositinden, erken dönem embriyolara kadar (1-, 2-, 4-, 8-hücreli embriyo, morula ve blastosist evreleri) görel *Trf2* mRNA ekspresyonu analiz edilmiş (Gilchrist ve ark., 2015). *Trf2* ekspresyonu, GV'den 4-hücreli embriyoya kadar kademeli bir şekilde artmış; 4-hücreli embriyodan sonra blastosist aşamasına kadar kademeli bir şekilde azaldığı görülmüştür (Gilchrist ve ark., 2015).

### **TIN2 (TRF1 Etkileşimli Nükleer Protein 2)**

TIN2 proteini, 451 aminoasit rezidüsünden oluşmaktadır. TIN2, sadece TPP1/POT1'i diğer telozom kompleks bileşenlerine bağlamakla kalmaz; aynı zamanda TRF1 ve TRF2'nin kararlılığında rol oynayan bağlayıcı (adaptör) bir protein olarak görev yapar (Lei, Podell, & Cech, 2004; Ye ve ark., 2004). TIN2, hem mitokondride hem de çekirdekte konumlanmıştır. Mitokondrideki TIN2, ATP üretimini arttırmaktan, reaktif oksijen türlerini (ROS) azaltmaktan sorumludur (L. Y. Chen ve ark., 2012). TIN2'nin yokluğunda, ATP üretimi azalır ve ROS miktarı artmaktadır (L. Y. Chen ve ark., 2012). Böyle bir durumda genomik kararsızlık oluşabilir, telomer bölgesinde TIN2 düzeyi de azalabilmektedir. Son olarak, TIN2'nin kaybı embriyonik letaliteye yol açmış (Chiang, Kim, Tessarollo, Campisi, & Hodes, 2004), TIN2 mutasyonu ise diskeratoz konjenita hastalarında tanımlanmıştır (Frescas & de Lange, 2014).

Daha önce yapılan çalışmalarda TIN2'nin pakiten fazdaki fare oositlerde çekirdek yerleşimli olduğu gösterilmiştir (Roig ve ark., 2004).

### **POT1 (Telomerleri Koruma Proteini 1)**

POT1 634 aminoasit rezidüsüne sahip, telomerin tek zincirine bağlı telozom kompleks proteinidir. POT1, DNA hasar sinyallerine karşı telomerleri korumada etkin rol aldığı bilinmektedir (Denchi & de Lange, 2007). 3' ucunda D-ilmek yapısını oluşturarak DNA kırığı olarak algılanmamasını ve DNA hasar sinyallerinin aktivasyonunu engeller (Denchi & de Lange, 2007). Bununla birlikte, POT1 telomeraz bağımlı telomer uzunluğunun bir düzenleyicisi olarak görev almaktadır (Hockemeyer, Daniels, Takai, & de Lange, 2006). POT1'in yokluğu ise kromozomların yanlış ayrışmasına, füzyonuna ve genomik kararsızlığa sebep olduğu ortaya konulmuştur (Baumann & Cech, 2001).

Fare POT1 geni, POT1a ve POT1b olmak üzere 2 izoform eksprese etmektedir (Hockemeyer ve ark., 2006). POT1a, DNA hasar onarımının ATR (Ataksi Telenjipektazi ve RAD3 ile ilişkili) kinazın inhibe edilmesini sağlar (Hockemeyer ve ark., 2006). POT1a'nın silinmesi, DNA hasar cevabını arttırdığı belirlenmiştir (Hockemeyer ve ark., 2006) ve erken embriyonik dönemde letaliteye sebep olur (He ve ark., 2009). POT1b ise telomerazdan bağımsız bir şekilde telomer uzunluğunu düzenleme yeteneğine sahiptir. POT1b'nin silinmesi durumunda telomer tekrarlarının 2-4 kat artışı meydana gelmektedir (Hockemeyer ve ark., 2006).

### **TPP1 (POT1 Bağlanma Partneri 1)**

TPP1, 544 aminoasit rezidüsünden oluşur. TIN2, TPP1 ve POT1 ile etkileşip telozom yapısının oluşmasında bağlayıcı bir rol alır. Aynı zamanda POT1'in telomere bağlanma afinitesini arttırmaktadır (Xin ve ark., 2007). TPP1 telomerlerde hem DNA hasar cevabının oluşmasını hem de telomeraz aktivitesini sınırlandırabilmektedir (F. Wang ve ark., 2007). POT1'in yetersiz olduğu durumda ise telomerazın TPP1 yoluyla telomere bağlanması sağlanmaktadır (F. Wang ve ark., 2007). TPP1 yapısında meydana gelen yapısal bir değişim telozom yapısını bozmaktadır. Bu durum ATM ile etkileşen TPP1 DNA hasar cevabının oluşmasını sağlar. Sonuçta kromozom kararsızlığına, kansere yol açan mutasyonların birikmesine ve hücrel yaşlılığa sebep olabilmektedir (Tejera ve ark., 2010). TPP1, POT1'in bağlanma afinitesini birkaç kat arttırdığından dolayı TPP1'in silinmesi bağlanmayı azaltır ve şeltrin kompleksinde işlev kaybına sebep olur (F. Wang ve ark., 2007).

### **RAP1 (Represör Aktivatör Protein 1)**

RAP1, 399 aminoasit rezidüsünden oluşur ve telomere bağlanabilmesi için TRF2 ile kompleks oluşturur. RAP1, telomer rekombinasyonunu ve yapısal bozulmasını önleyebilmektedir (Martinez ve ark., 2010). RAP1 eksikliği farenin hayatta kalımını etkilemezken, yetişkinlerde deri hiper pigmentasyonuna ve daha kısa telomerler oluşumuna yol açmaktadır (Martinez ve ark., 2010). Ayrıca RAP1 bazı sirtuin genleriyle etkileşime girer. RAP1'in sirtuin genleriyle yaptığı bu etkileşim RAP1'in transkripsiyonel susturulmada rol alabileceğini de göstermektedir (Moretti, Freeman, Coodly, & Shore, 1994).

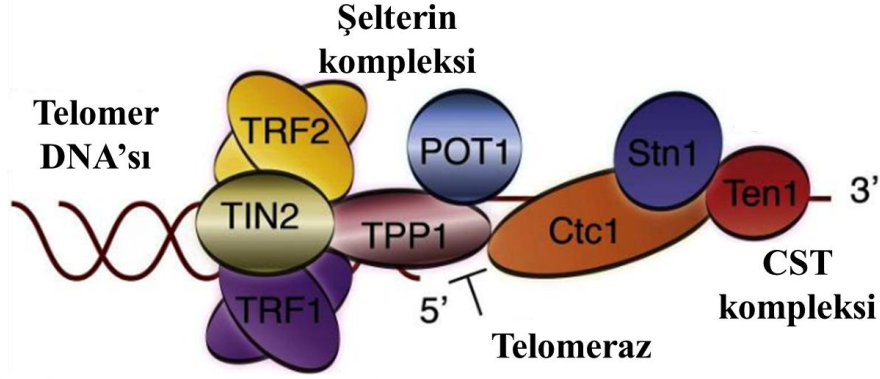
RAP1'in insan primordial foliküllerin oositinde çekirdek yerleşimli olduğu gösterilmiştir (Arraztoa ve ark., 2005).

### **CST Kompleksi (CTC1, STN1, TEN1)**

Kromozomların uç kısımlarının korunması genom bütünlüğünün korunması açısından önemlidir. Telomerler şelterin kompleksi proteinlerine ek olarak CST kompleksi olarak adlandırılan CTC1 (Korunmuş Telomer Bileşeni), STN1 ve TEN1'den oluşan proteinlerle de etkileşir (Şekil 2.7) (Surovtseva ve ark., 2009). CST kompleksinin başta mayalar olmak üzere memelilerde de varlığı kanıtlanmıştır. CST'nin hem telomer uzunluğunun korunması için, hem de DNA replikasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir (Price ve ark., 2010). Bununla birlikte hücre döngüsünü G<sub>2</sub>-M evresinde ve telomerlerin DNA hasar cevabı ile hücrenin degradasyonundan korunmasında etkilidir (Grandin, Damon, & Charbonneau, 2001; Grandin, Reed, & Charbonneau, 1997). Ayrıca, memeli CST kompleksinin sadece telomer bölgelerine özgü olmadığı ve dolayısıyla telomerik olmayan DNA'da fonksiyonu olabileceği düşünülmektedir (Miyake ve ark., 2009; Price ve ark., 2010). Fare embriyonik fibroblastlarında CTC1 ya da STN1 delesyonu, telomer kaybına yol açmış ve daha sonra hücre yaşlanmaya neden olduğu belirlenmiştir (Gu ve ark., 2012).

Sonuç olarak CST kompleksinin fonksiyonu ve düzenlenmesi mekanizması tam olarak tanımlanamamıştır. Şelterin kompleksi başta olmak üzere CST kompleksi de telomerlerin yapı ve bütünlüğünü anlamak adına önemlidir.





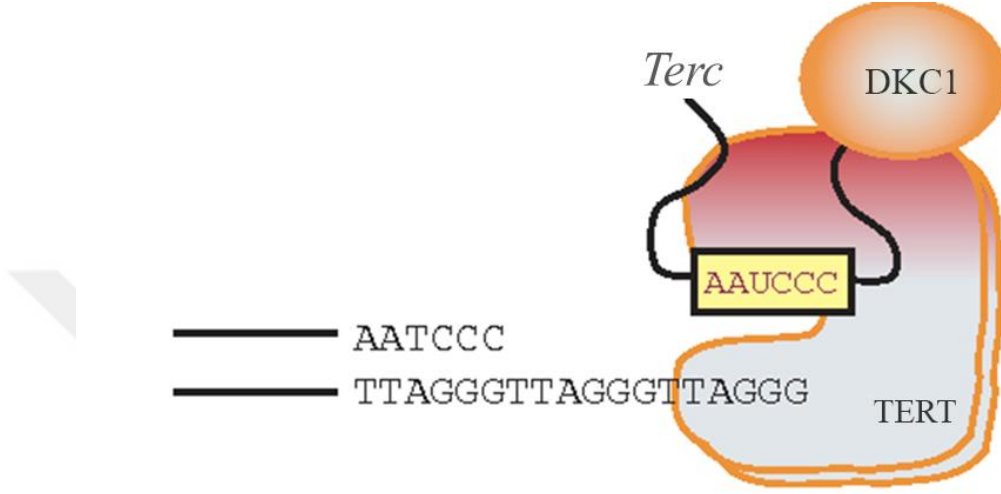
**Şekil 2.7.** Telomere bağlı şelilerin ve CST kompleksi proteinleri (Rice & Skordalakes, 2016). Telomerler şelilerin kompleksi dışında bir de CST kompleksiyle etkileşir. CST kompleksi CTC1, STN1 ve TEN1 proteinlerinden oluşmaktadır. TRF1: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 1, TRF2: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktör 2, TIN2: TRF1 Etkileşimli Nükleer Protein 2, POT1: Telomerleri Koruma Proteini 1, TPP1: POT1 Bağlanma Partneri 1, RAP1: Represör Aktivatör Protein 1, Ctc1: Korunmuş Telomer Bileşeni, Stn1: CDC Baskılayıcısı Homolog 13, Ten1: STN1 İlişkili Telomerik Yolaklar 1.

## 2.5. Telomeraz Enziminin Yapısal Özellikleri

1980'lerin ortasında, Blackburn ve Greider'in *Tetrahymena*'da yaptığı çalışmada, tandem heksanükleotidleri kromozom uçlarına ekleyen enzimatik bir aktivitenin varlığı tanımlanmış ve bu aktiviteden sorumlu enzim ise "telomeraz" olarak isimlendirilmiştir (Carol W Greider & Blackburn, 1985). Telomeraz, heksamerik tekrarları uzatmak için kendi kalıp RNA'sını kullanan telomeraz RNA bileşeni (*TERC*) ve telomeraz geri transkriptazdan (*TERT*) oluşan ribonükleoprotein yapıda bir DNA polimerazdır (Şekil 2.8). Ayrıca, telomeraz *in vivo* olarak telomerazın işlevini sağlayan bir dizi yardımcı bileşen [örneğin; telomeraz ilişkili protein 1 (*TEP1*), hetorejen nükleer ribonükleoprotein (*hnRNPs*), *Est1p*, *Est3p* (Griffith ve ark., 1999)] içermektedir. Bu bileşenlerden bazıları (*Est1p*) hücre döngüsünde telomerlere, telomerazın bağlanması için gerekliyken (Osterhage, Talley, & Friedman, 2006); bazıları (*Est1p* ve *Est3p*) ise telomeraz aktivitesinin düzenlenmesi için gereklidir (Hsu, Yu, Singh, & Lue, 2007).

*TERC* ifadesi birçok ökaryotik hücrede bulunurken; *TERT* ekspresyonu ve telomeraz aktivitesi farklı şekilde düzenlenmesi nedeniyle somatik hücrelerde bulunmadığı gözlenmiştir. Bu durum, telomerlerin kritik uzunluğun altında kılınmasına bağlı olarak telomer füzyonuna ve hücre canlılık kaybına yol açabilmektedir. Bununla birlikte, telomeraz aktivitesi dişi ve erkek germ hücreleri, erken dönem embriyolar, granuloza

hücreleri, kök hücreler ve çoğu kanser hücresi gibi sadece belirli hücrelerde belirlenmiştir (Wright ve ark., 1996).



**Şekil 2.8.** Telomeraz enziminin genel yapısı (Blasco, 2007b). Telomeraz, telomeraz geri transkriptaz birimi (TERT), telomeraz RNA komponenti (*TERC*) ve yardımcı bileşenlerden oluşan ribonükleoprotein yapıda bir DNA polimerazdır. Telomeraz, telomerik tekrarların uzatılmasını sağlamaktadır.

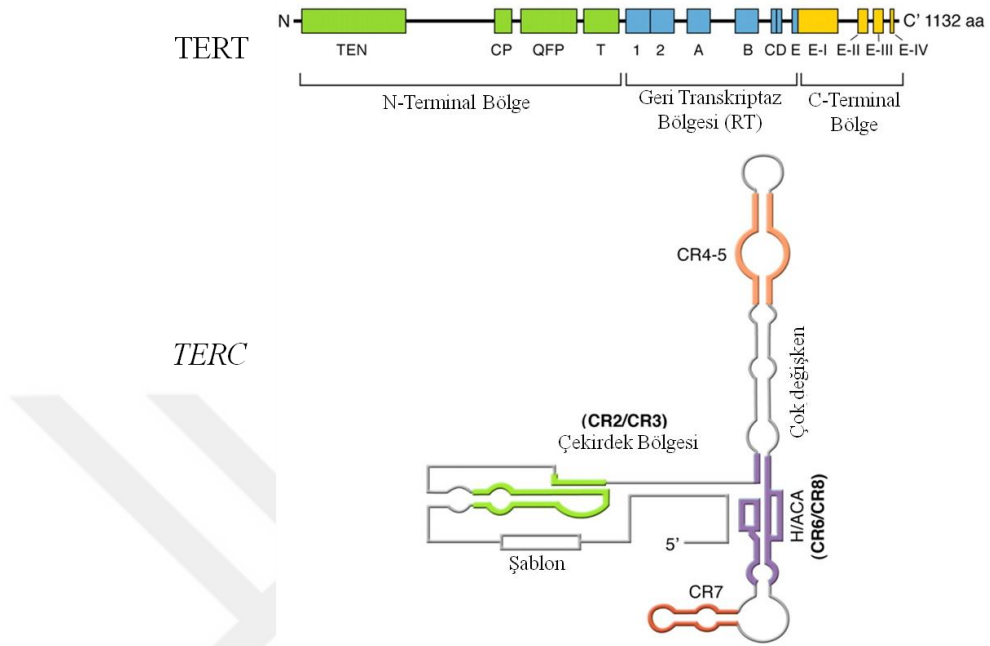
### 2.5.1. *TERC* (Telomeraz RNA Alt Birimi)

*TERC* alt birimi, DNA sentezi için şablon olarak kullanılır ve telomerazın ayrılmaz bileşenidir. Canlı türlerinde farklı uzunluktadır. Örneğin *Tetrahymenathermophila*'da 159 (C. W. Greider & Blackburn, 1989), insanda 451 (R. T. Calado & N. S. Young, 2008), farede 397 (Blasco, Funk, Villeponteau, & Greider, 1995), *S. cerevisiae*'de 1157 (Singer & Gottschling, 1994) ve *S. pombe*'de 1213 (Webb & Zakian, 2008) nükleotid uzunluğundadır. *TERC* yedi korunmuş bölge içerir ama bunlar arasında çekirdek bölge, CR4/CR5 bölgesi ve H/ACA kutu bölgesi bu RNA'nın kararlılığı için gereklidir (Şekil 2.9) (Rodrigo T Calado & Neal S Young, 2008; J. L. Chen, Blasco, & Greider, 2000). Çekirdek bölgesi, telomeraz aktivitesi için gereklidir ve varsayılan TERT bağlanma bölgesini içermektedir (J. L. Chen ve ark., 2000; Theimer & Feigon, 2006). H/ACA kutu bölgesi ise *TERC* RNA'sının kararlılığında, proteinlerin bağlanmasında ve telomeraz aktivitesinde görev yapmaktadır (Theimer & Feigon, 2006). *TERC* bölgeleri, *TERC*-TERT etkileşimi ve nükleotid eklenmesi süreçlerinde etkin bir rol oynamaktadır (Lai, Miller, & Collins, 2003).

*TERC* mutasyonunun telomerlerin kararlılığını bozarak, erken yaşlanma ve hücre yaşlanmasına sebep olduğu gösterilmiştir (Jose ve ark., 2018; Schildhorn ve ark., 2015). Ayrıca *TERC* ekspresyonunun azalmasıyla hematopoetik kök hücre farklılaşmasının bozulduğu, hücre yaşlanma markırlarının ve ROS'un arttığı belirtilmektedir (Jose ve ark., 2018). Son olarak sığırdan GV ve MII oositten, erken dönem embriyolara kadar (1, 2, 4, 8 hücreli embriyo, morula ve blastosist evreleri) görece *TERC* ekspresyonu analiz edilmiş ve fark bulunmamıştır (Gilchrist ve ark., 2015).

### **2.5.2. TERT (Telomeraz Geri Transkriptaz)**

Telomerazın geri transkriptaz alt birimi, üç ana yapısal elemandan oluşur: DNA ve RNA'nın bağlayıcı alanlarını içeren uzun N-terminal bölgesi, katalitik RT alanı ve kısa C-terminal alanı olmak üzere (Şekil 2.9). N terminal bölgesi, telomeraza özel N-terminal domaini (TEN) ve telomeraz bağlanma domainleri (TRBD) olarak adlandırılan iki korunmuş bölgeden oluşur (Autexier & Lue, 2006). Bu iki domain nükleik asit dizilerinin bağlanmasıyla ilişkili protein katlanmalarını temsil eder (Jacobs, Podell, & Cech, 2006). Ayrıca, tek zincirli telomer DNA'sını tanıma ve uzaması için bağlanma afinitesi gösterirler (Jacobs ve ark., 2006). TERT, telomeraz aktivitesi için gereklidirler (Wyatt, Tsang, Lobb, & Beattie, 2009). TERT'in katalitik bölgesi olan RT alanı ise enzimatik aktivite için gerekli olup proteinin en önemli bölgesidir (Lingner ve ark., 1997). RT alanı, parmak ve avuç içine benzetilen iki domaine ayrılır (Lingner ve ark., 1997; T. M. Nakamura ve ark., 1997). RT alanının doğrudan DNA-RNA hibritiyle ve tek zincirli DNA'nın 3' ucuyla temas kurduğu düşünülmektedir (Gillis, Schuller, & Skordalakes, 2008). Bu temasın, primerin kavrama bölgesinin konumlanmasında rol alabileceğini göstermektedir (Wyatt, Lobb, & Beattie, 2007). Enzimin katalitik bölgesi ise DNA-RNA hibrit oluşumuna ve kararlılığına katkı sağlar (Mitchell, Gillis, Futahashi, Fujiwara, & Skordalakes, 2010). TERT'in C-terminal alanı elin başparmağına benzetilir (Gillis ve ark., 2008). Evrimsel olarak zayıf korunma gösterdiğinden türlere özgü farklı fonksiyonlara sahip olabileceği düşünülmektedir.



**Şekil 2.9.** Telomerazın alt birimi olan TERT ve *TERC* yapısı (Rodrigo T Calado & Neal S Young, 2008). TERT alt birimi N-terminal, geri transkriptaz ve C-terminal bölgeden oluşurken; *TERC* alt birimi ise çekirdek bölge, CR4/CR5 bölgesi ve H/ACA kutu bölgesinden oluşur. TEN: Telomeraza Özel N-Terminal domain. CR: Korunmuş Bölge

### 2.5.3. Telomerazın Uzatma Mekanizması

Telomeraz enziminin verimliliği, telomerlerin uçlarındaki telomer tekrarlarının sayısı ile ilişkilidir. Telomer kısalması, telomerazın fonksiyon bozukluğu ya da telomerazın olmaması sonucunda oluşmaktadır. Ayrıca, birçok hastalığın (Diskeratozis konjenita, immün sistem hastalıkları, diyabet ve kanser gibi) ve yaşlanmanın da telomerlerin kısalması nedeni ile olduğu bilinmektedir.

Telomerazın en önemli özelliği, aynı DNA primerine yüzlerce nükleotid ekleme ve reaksiyonu katalizleme yeteneğine sahip olmasıdır. Telomeraz reaksiyon döngüsü, üç temel aşamaya ayrılabilir: i. primerleri tanıma ve bağlama, ii. birinci telomer tekrarının sentezi ve iii. bir sonraki telomer dizi sentezini başlatmak için yeni DNA'da 3' ucunun yer değiştirilmesi ve yeniden hizalanması aşamalarını içermektedir. Telomer uzaması aşamasında RNA şablonu baz eşleşmesi olması için geri yönde kopyalanır. Telomer sentezi, deoksiribonükleotid trifosfatların (dNTP'ler) telomer tek zincir DNA primerinin 3' ucuna ardışık olarak eklenmesiyle devam eder. Telomerin tek zincir DNA'sının

uzatma işlemi için doğal primer olduğu düşünülmektedir. İlk zincirde telomer sentezi gerçekleştikten sonra, yinelenen telomer sentezi için 3' ucu yeniden konumlandırılır (Wyatt, West, & Beattie, 2010).

Bu telomer uzama döngüsünü harekete geçiren mekanizmalar tam olarak anlaşılmamış olsa da bu süreçte telomerazın yapısında meydana gelen biyokimyasal değişikliklerin etken olabileceği düşünülmektedir.

#### **2.5.4. Telomeraz Aktivitesinin/Ekspresyonun Düzenlenmesi**

Telomeraz daha önce de belirtildiği gibi tüm hücrelerde bulunmamaktadır. Buna karşılık embriyonik kök hücrelerde, dişi ve erkek üreme hücrelerinde ve çoğu kanser hücrelerinde [mesane karsinoması (Rachakonda ve ark., 2013), renal pelvik karsinom (K. Wang ve ark., 2014), melanoma (Horn ve ark., 2013), ovaryum kanseri (Huang ve ark., 2015) gibi] eksprese edilmektedir. Telomeraz aktivitesi, TERT ekspresyonel varlığı ve yokluğuna bağlıdır çünkü *TERC*, tüm somatik hücrelerde transkribe edilmektedir. Farelerde *TERC* veya TERT'in kaybı telomer kısalması, genomik kararsızlık, telomer füzyonu ve yaşlanmayla ilişkili çeşitli fenotiplerin orta çıkmasına neden olur (Lee ve ark., 2001). Bunun aksine TERT'in aşırı ekspresyonu ise p53, p16 ve p19 gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunu etkileyerek yaşam süresinin uzatılmasına neden olmaktadır (Tomás-Loba ve ark., 2008). Telomeraz ekspresyonu, birçok faktör tarafından düzenlenebilmektedir: p53'ün insan telomeraz ilişkili protein 1 (hTERT) ile etkileşip, telomeraz aktivitesini inhibe ettiği görülmüştür (Li, Cao, Berndt, Funder, & Liu, 1999; Xu ve ark., 2000). Bununla birlikte hTERT'in promotor bölgesi insan somatik hücrelerinde inaktif, ölümsüz hücrelerde ise aktif olduğu ortaya konulmuştur (Son, Murray, Yanovski, Hodes, & Weng, 2000). Bu bağlamda TERT'in farklı transkripsiyon faktörleriyle düzenlendiği gösterilmiştir. Örneğin TERT'in promotor bölgesi, bir MYC onkoprotein bağlanma bölgesi içerir ve bu onkoprotein telomeraz aktivitesini arttırıcı bir şekilde düzenler (K.-J. Wu ve ark., 1999). Benzer şekilde SV40 (Maymun Virüsü) (Foddis ve ark., 2002), protein kinaz C (Li, Zhao, Yang, Funder, & Liu, 1998), *Bcl-2* (Mandal & Kumar, 1997), *c-Abl* (Kharbanda ve ark., 2000) ve *Akt* (Kang, Kwon, & Do, 1999) gibi onkogenlerin telomeraz aktivitesini arttırdıkları ortaya konulmuştur. Ayrıca, TERT'in promotör bölgesi östrojen reseptör bağlanma bölgesi de

içerir. Bu nedenle, östrojen ve androjenler üreme hücrelerindeki telomeraz aktivitesini düzenlemede rol alır (Bayne & Liu, 2005). Telomerazın her iki alt birimi de (TERT ve *TERC*) ekspresyonel düzeyi, esas olarak özgünlük protein 1 (SP1) tarafından kontrol edilir (L. Liu ve ark., 2009). p53, SP1 ile etkileştiğinde, SP1 proteini hTERT promotörüne bağlanamaz ve transkripsiyonu inhibe edilir (Xu ve ark., 2000). Diğer taraftan, insan CD4 hücrelerinde hTERT'in sitoplazmadan çekirdeğe geçebilmesi için fosforile olması, dolayısıyla telomerazın aktivasyonu için gereklidir (K. Liu, Hodes, & Weng, 2001). ROS mitokondriyal fonksiyon kaybına bağlı olarak yaşlanma ile ilişkilidir (Haendeler ve ark., 2004). *In vitro* ortamda, ROS endotelial hücrelerde hTERT ve telomeraz aktivitesini azaltır (Haendeler ve ark., 2004).

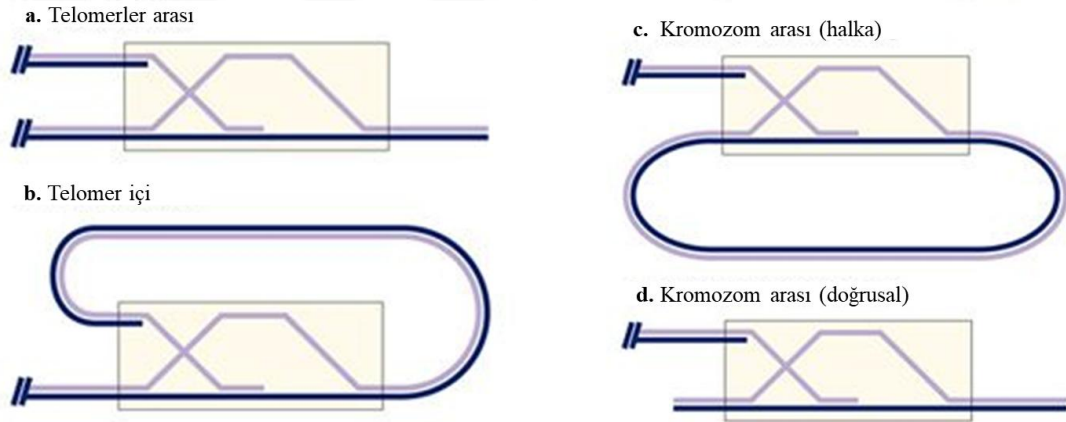
Sonuç olarak tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda telomeraz; büyüme hormonları, östrojen ve androjen reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli uyarılara ve hücre tiplerine göre farklı şekilde cevap verip düzenlendiği görülmektedir.

## **2.6. Telomerlerin Uzatılma Mekanizması**

Bugüne kadar telomerin uzatılmasını sağlayan iki mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan birincisi telomeraz enzimi, diğeri ise alternatif telomer uzatılmasıdır (ALT). Telomeraz aktivitesinin olmadığı durumlarda telomerler kısalma eğilimine girerler. Telomer uzunluğunun kritik bir seviyenin altına düşmesi, işlevsiz telomerlerin oluşumuna yol açar. Bu durum, G<sub>1</sub>-S döngüsü geçiş kontrolünü aktive eder ve sonuçta apoptoz veya replikatif yaşlanma süreci başlatılmaktadır. Telomerlerin uzatılmasını sağlayan ALT mekanizması bazı kanser hücrelerinde görülmektedir (Bryan, Englezou, Gupta, Bacchetti, & Reddel, 1995; Henson & Reddel, 2010). İki telomer uzatma mekanizması kıyaslanacak olursa: insan telomerazı kanser hücrelerini <10 kb'ye kadar uzatılabilmekteyken; ALT'nin bulunduğu kanser hücrelerinde ise telomer uzunluğu ~20 kb olduğu görülmüştür (Bryan ve ark., 1995). ALT'nin moleküler mekanizması detaylı bir şekilde bilinmemekle birlikte; kromozomal ve kromozomlar arası telomerik DNA'nın homolog rekombinasyonuna dayanarak telomer tekrarlarının uzatılması sağlanmaktadır (Şekil 2.10) (Dunham, Neumann, Fasching, & Reddel, 2000; Murnane, Sabatier, Marder, & Morgan, 1994). ALT, telomer DNA'sı, telomere bağlı proteinler ve DNA rekombinasyonunda rol oynayan proteinlerle ilişki içindedir. Bunun yanı sıra

kardeş kromatin değişimi (T-SCE) (Londono-Vallejo, Der-Sarkissian, Cazes, Bacchetti, & Reddel, 2004), heterojen telomer boyutu (Bryan ve ark., 1995; Londono-Vallejo ve ark., 2004), ekstra kromozomal ve doğrusal telomer sayısı (Henson ve ark., 2009) ve APB'lerin [spesifik ALT ilişkili PML (promyelositik lösemi)] (W. Jiang, Zhong, Henson, & Reddel, 2007) ALT ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Aslında telomer DNA rekombinasyonu, esas olarak APB'lerde gerçekleşir (Draskovic ve ark., 2009). APB'ler sadece ALT'lerde bulunan, ölümlü hücrelerde ve telomerazın aktif olduğu hücrelerde bulunmayan PML cisimciğidir (Yeager ve ark., 1999). PML, DNA rekombinasyon proteinleri, DNA replikasyon proteinleri ve DNA onarım proteinlerini içerir: BLM, WRN, RAP1 ve BRCA1 gibi (G. Wu, Jiang, Lee, & Chen, 2003).

Sonuç olarak telomeraz içermeyen kanser hücreleri telomerleri rekombinasyon aracılı bir alternatif uzatma ile koruyabilirler ve ALT aracılı telomer bakımı APB'lerin oluşumuyla yakından ilişkilidir. Bu nedenle, PML proteinleri bu mekanizmanın oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir.



**Şekil 2.10.** Homolog rekombinasyonla telomerlerin uzatılması (Neumann & Reddel, 2002). Homolog rekombinasyonla telomerlerin uzatılması işlemi telomerler arasında, telomerin içinde, halka ve doğrusal kromozomlar arası olabilir.

## 2.7. Memeli Ovaryum Hücrelerinde Telomer Uzunluğu

Granuloza hücreleri, foliküler gelişimle paralel olarak birçok mitotik bölünme geçirmektedir. Mitoz öncesinde, hücrelerin DNA replikasyon sürecine girmesinden dolayı her bölünmede kısalma olmaktadır. Ayrıca, granuloza hücreleri folikül sıvısı içinde biriken hormonlar gibi birçok faktöre maruz kalır ve bu mikroçevrenin granuloza

hücrelerindeki telomer uzunluğunu etkilediği düşünülmektedir. Bugüne kadar memelilerde ovaryum hücrelerinde telomer uzunluğuyla ilgili sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Domuz granuloza hücrelerinde floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği kullanılarak telomer uzunluğu incelendiğinde preantral ve antral foliküllerde telomerlerin erken foliküler aşamadaki foliküllerden daha uzun olduğu görülmüştür (Russo ve ark., 2006). Bununla birlikte, preantral foliküldeki oositler küçük, orta ve büyük foliküldeki oositlere göre daha kısa telomerlere sahip olduğu da belirlenmiştir (Russo ve ark., 2006).

Sığırlarda olgunlaşmamış ve olgun oositlerde kantitatif gerçek zamanlı PCR (Qrt-PCR) tekniği kullanılarak yapılan telomer uzunluk ölçümünde, MII oositlerin, immatür oositlere göre daha uzun telomerlere sahip olduğu görülmüştür (Gilchrist ve ark., 2015). Bu çalışmanın aksine, Meerdo ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise Q-FISH yöntemi kullanılarak ölçülen matür ve immatür oositlerin telomer uzunlukları arasında farklılık görülmemiştir (Meerdo, Reed, & White, 2005). Bu iki çalışmalardan elde sonuçların telomer uzunlukların analiz edilmesinde kullanılan yöntemlerin farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

İnsanda telomer uzunluğuyla ilgili çalışmalar genelde yardımcı üreme teknikleri (YÜT) tedavisi gören çiftlerden bağışlanan fazla oositlerle yapılabilmektedir. Q-FISH yöntemi kullanılarak hastalardan elde edilen GV oositlerde, telomer uzunluğu 11.12 kb olarak ölçülmüştür (Turner, Wong, Rai, & Hartshorne, 2010). Aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada olgun insan oositlerinde (MII oositler) ortalama telomer uzunluğu  $8.79 \pm 0.86$  kb olarak bulunmuştur (Turner & Hartshorne, 2013). Ayrıca, ART tedavisi gören gebe kalmayı başaran kadınlarda Q-FISH yöntemiyle ölçülen oositlerin telomer uzunlukları, gebe kalmayı başaramayan kadınlara göre daha uzun bulunmuştur (Keefe, 2007). Benzer şekilde, IVF hastalarında polar cisim telomerlerinin ( $7.5 \pm 1.17$  kb), IVF hastalarında gebe kalamayan hastalara göre ( $6.2 \pm 1.69$  kb) daha uzun olduğu görülmüştür (Keefe, 2007). Daha önemlisi, 6.32 kb'den daha kısa telomer uzunluğuna sahip hastaların gebe kalamadıkları belirlenmiştir (Keefe, 2007).



## 2.8. Memeli Oosit ve Erken Dönem Embriyolarda Telomeraz Aktivitesi

Telomerik tekrar çoğaltma protokolü (TRAP) ile fare oositi ve erken dönem embriyolardaki telomeraz aktivitesi ölçüldüğünde MII oosit aşamasından morula aşamasına kadar telomeraz aktivitesinin oldukça düştüğü görülmüştür (L. Liu ve ark., 2007). Fakat telomeraz aktivitesi blastosist aşamasında ise belirgin bir düzeyde artmaktadır (L. Liu ve ark., 2007). Benzer olarak, insan olgun oosit ve erken dönem embriyolardaki telomeraz aktivitesi düşük düzeyde bulunurken; bu aktivitenin blastosist aşamasında oldukça yükseldiği gözlenmiştir (Wright ve ark., 1996).

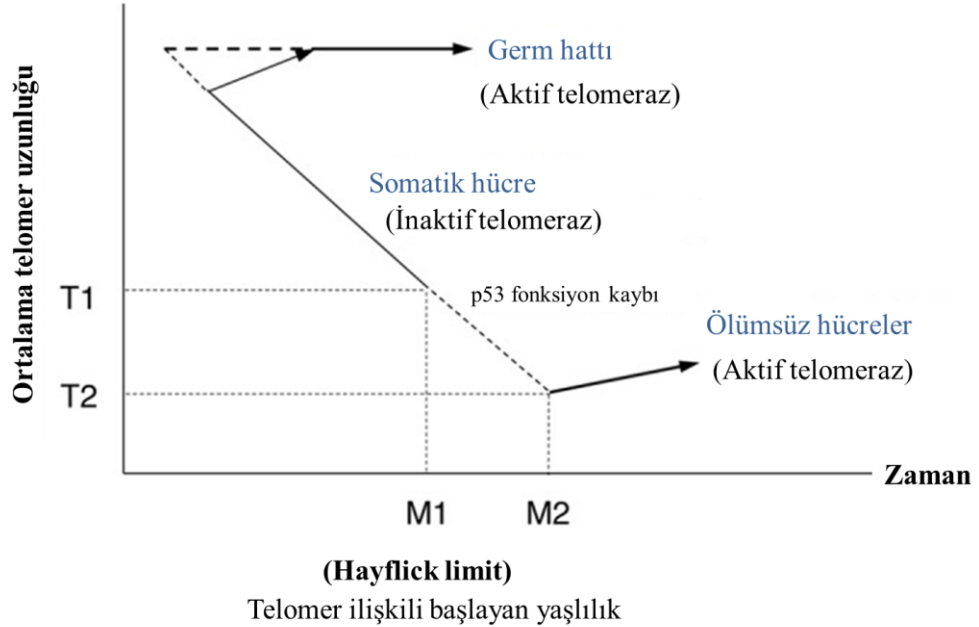
Farklı gelişim aşamalarındaki fare ovaryumlarında telomeraz aktivitesi detaylı olarak analiz edilmemiş olmasına rağmen, domuz, sığır ve insanda bazı araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Telomeraz aktivitesi, domuz ovaryumlarındaki analizi Russo ve arkadaşları tarafından 2006 yılında gerçekleştirilmiştir (Russo ve ark., 2006). Bu çalışma kapsamında granuloza hücreleri ve oositler değerlendirilmiştir. TERT proteini için uygulanan immünohistokimya ile TERT'in primer ve preantral foliküllerin granuloza hücreleri ve oositlerinin nükleuslarında yerleşik olduğu gözlenmiştir. Orta/büyük foliküllerde (4-5 mm çapında) ise TERT protein yerleşiminde mural granuloza hücre tabakaları (antral ve bazal tabaka) ve kumulus hücrelerinde farklılıklar görülmüştür (Russo ve ark., 2006). TERT immünpozitifliği, antral tabakanın mural granuloza hücrelerinde ve kumulus hücrelerinde gözlenmiştir. Folikülün bazal membrana yakın yerleşik olan granuloza hücrelerinde ise TERT ekspresyonu belirlenmemiştir. Antral folikül oositlerinde, TERT erken dönem foliküllerden farklı olarak sitoplazmik yerleşim göstermektedir (Russo ve ark., 2006). Elde edilen MII oositlerde TERT'in yoğun olarak subkortikal bölgede bulunduğu ve polar cisimciğin TERT eksprese etmediği görülmüştür. Preantral ve antral foliküllerin erken dönem foliküllere göre daha uzun telomere sahip olduğu da rapor edilmiştir (Russo ve ark., 2006). Benzer bir çalışmada Tomanek ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Tomanek, Chronowska, Kott, & Czernekova, 2008). Bu çalışmada, küçük antral (1-2 mm) ve büyük antral (5-7 mm) domuz foliküllerinden taze elde edilmiş ve *in vitro* kültüre edilmiş granuloza hücrelerinde telomeraz aktivitesi olduğu gösterilmiştir (Tomanek ve ark., 2008).

Sığır ovaryum foliküllerinde telomeraz aktivitesi ile ilgili de araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların ilkinde preantral folikül (60-100 µm), küçük antral folikül (1 mm) ve granuloza hücrelerinin elde edildiği orta çaplı (3 mm) ile büyük çaplı (6-8 mm) foliküllerde telomeraz aktivitesi değerlendirilmiştir. Telomeraz aktivitesinin preantral aşamadan, büyük antral folikül aşamasına gelişimde yavaş yavaş azaldığı görölmüştür (Lavranos ve ark., 1999). Ayrıca, bu araştırmada *in situ* hibridizasyon uygulaması ile telomeraz RNA'sının (TERC alt ünitesi) gelişim aşamasındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde yerleştiği belirlenmiştir. İlginç olarak, primordial foliküllerde TERC alt ünitesi belirlenmemiştir. Sığır antral foliküllerinde, TERC'in membrana granuloza tabakasının orta ve antral tabakalarında bazal tabakaya göre daha yüksek düzeyde eksprese olduğu izlenmiştir (Lavranos ve ark., 1999). Bu çalışmanın en ilgi çekici sonucu ise sığır ovaryum foliküllerinin oositlerinde TERC boyanmasının görölmemesidir (Lavranos ve ark., 1999). Goto ve arkadaşları ise orta çaplı foliküllerin granuloza hücrelerindeki telomeraz aktivitesinin yaşlanmaya bağlı olarak etkisini değerlendirmişlerdir (Goto ve ark., 2011). Yaşlanma ile ovaryum hücreleri reaktif oksijen türlerine uzun süre maruz kalmaktadır. Bu durum, hücreyel fizyolojiyi bozmakta ve ovaryum folikül sayısında kademeli olarak azalmaya neden olabilmektedir (Goto ve ark., 2011; Kinugawa, Murakami, Okamura, & Yajima, 2000). Bu çalışmada genç (28.1 ay) ve yaşlı (151.3 ay) sığır ovaryumların orta çaplı foliküllerin granuloza hücreleri kullanılmıştır. Genç sığırlardan elde edilen granuloza hücreleri, yaşlı sığır granuloza hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen daha yüksek telomeraz aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Bu durum, telomeraz aktivitesinin yaşla birlikte azaldığını göstermektedir (Goto ve ark., 2011).

## **2.9. Telomer ve Yaşlanma**

DNA'nın yarı-korunumlu (semi-konservatif) replikasyonu nedeniyle telomerler kısalmaktadır. Yani kesikli zincir sentezinden sonra primerin uzaklaştırılmasıyla birlikte boşluk oluşur ve telomerler her DNA replikasyonunda 50-200 b kadar kısalır. Standart DNA polimerazlar, ortaya çıkan bu boşluğu dolduramazlar. Somatik hücrelerde bu kısalma her mitotik bölünme için 50-100 b'dir. Telomer uzunluğu Hayflick limiti olarak adlandırılan kritik bir uzunluğu altına düştüğünde apoptoz mekanizması devreye girer ve yaşlanma süreci başlar. Yaşlanma, M1 ve M2 olmak üzere iki evrede gerçekleşir

(Yamada & Kawauchi, 2013). M1 evresinde telomerin tek zincirinde meydana gelen belirgin kısalma nedeniyle hücre bölünmesi durur ve hücre yaşlanma süreci başlamaktadır. Bazı hücreler M1 evresini aşabilir. M1 evresini aşp M2 evresine geçebilmesi için M1 evresinde bekleyen p53 gibi bazı proteinlerin fonksiyonel kaybı gerçekleşir. Böylece proteinler G1 evresinde görev yapamaz ve G2 evresinden S evresine geçilip, bölünmesine devam eder. Bu evre M2 evresi olarak tanımlanır. Fakat bu durumda somatik hücrelerde telomer boyu oldukça kısılır ve birçok hücrenin ölümü gerçekleşir. Eğer telomer uzunluğu, M2 evresinde sabit kalırsa hücre M2 evresini geçer ve ölümsüzlük kazanır (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** Ortalama telomer uzunluğunun zamana bağlı değişimi ve Hayflick limiti (Yamada & Kawauchi, 2013). Üreme hücrelerinde telomeraz aktiftir, somatik hücrelerde ise aktivitesi tamamen bastırılır. Telomerler hücre bölünmesine bir durma sinyali veren bir uzunluğa ulaşıncaya kadar kısılır (M1 evresi). Mutasyona uğramış bazı hücreler, M2 evresinde telomer uzunluklarını sabit tutan aktif telomeraza sahiptir.

## 2.10. Ovaryal Yaşlanma ve Telomer Biyolojisi

Ovaryal yaşlanma primordial folikül havuzunun ve oosit kalitesinin kademeli bir biçimde azalması olarak bilinmektedir. Folikül sayısının azalmasıyla, adet düzensizliği başlar ve menapozla sonlanır. Sonuçta dişi üreme fonksiyonlarında belirgin azalma görülmektedir. Yaşlanmaya bağlı olarak primordial foliküllerin azalması, FSH'a duyarlı antral folikül azalmasına paralellik göstermektedir. İnhibin B ve AMH'nin kaynağı olan

preantral ve antral folikül sayısının düşmesiyle birlikte bu hormonların salınımında azalma görülürken, FSH üretiminde artış gözlenir (Broekmans, Soules, & Fauser, 2009). Yaşlanmanın moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da genomik kararsızlık, epigenetik faktörler, protein homeostazı, besin yetersizliği, mitokondri fonksiyon bozukluğu, kök hücre tükenmesi ve telomerlerin aşınmasının yaşlanmaya sebep olan faktörler olarak tanımlanır (Lopez-Otin, Blasco, Partridge, Serrano, & Kroemer, 2013).

Telomerler çeşitli faktörlerden dolayı zaman içinde kısalır. Telomerlerin kısalması, farklı hücre tiplerinde hücresel yaşlanmaya sebep olmaktadır (Forsyth, Wright, & Shay, 2002). Ayrıca oksidatif stres, DNA hasar cevabı veya anormal telomer rekombinasyonundan kaynaklanan telomer fonksiyon kaybı üreme ile ilişkili mayoz kusurlarına, düşüklere ve infertiliteye sebep olabilmektedir (Keefe & Liu, 2009). Telomer uzunluğu bireyler arasında çeşitlilik gösterir ve ovaryal yaşlanmada gözlenen değişimlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kısa telomerler fetal gelişim sırasında primordial germ hücrelerinin mitotik bölünme kapasitesini sınırlandırabilir ve bu nedenle folikül havuzunun büyüklüğünü etkileyebilir (Keefe ve ark., 2006). Telomerler oosit yaşlanmasında da merkezi bir rol oynarlar (Keefe ve ark., 2006). Telomerazın eksik olduğu farelerde telomerler kısaldıka anormal iğ oluşumu, parçalanmış embriyolar, infertilite, azalmış sinaps ve kiazma görülür. Yaşla birlikte oosit kalitesini düşüren en önemli faktörler, mayoz sırasında anöploidi ve yanlış kromozom ayrımıdır (Webster & Schuh, 2017). Bununla birlikte, oogenez hem insanda hem de farede haftalar hatta aylarca süren bir süreçtir. Bu süre zarfında oositte ve oositin geliştiği mikroçevrede birçok değişim meydana gelir ve gamet kalitesini etkileyebilmektedir (Dorland, van Kooij, & te Velde, 1998).

Bu çalışmamızda, postnatal gelişimin farklı yaşlarındaki farelerden (1., 2., 3., 4., 5., 6., 16., 18., 52., 60. ve 72. haftalar) alınacak ovaryumların kullanımı planlanmaktadır. Bilindiği gibi, fare ovaryumunda, yenidoğandan yaşlanma dönemine kadar oosit büyümesi, folikül gelişimi, stromal alanın şekillenmesi gibi önemli fizyolojik değişimler meydana gelmektedir. Yenidoğan bir fare ovaryumu, tamamen germ hücreleri ve stromadan oluşan yoğun bir organdır.

Postnatal ovarial gelişimin ilk haftasındaki fare ovaryumunda önemli morfolojik değişimler göze çarpmaktadır. Ovaryumun korteks bölgesindeki oositlerin hücre sınırları belirgin bir hale gelmekte ve birbirlerinden etraflarında bulunan folikül hücreleri ile ayrılmaya başlamaktadır. Bu dönemde bütün oositlerin nükleusları, mayotik profazın diploten aşamasına ulaşmışlardır. Ayrıca, birinci haftanın sonunda oositlerin büyümesi, foliküler gelişim, bazal membran oluşumu ve teka tabakasının gelişimi gibi fizyolojik süreçler başlamaktadır. Bu dönemde toplam oositlerin yaklaşık %5'i germline kistlerin parçalanması sonucunda bir ya da iki sıra folikül hücre tabakası ile çevrelenmiş genç foliküller oluşmaktadır (Ben-Or, 1963; Peters, 1969). İkinci haftada, ovaryumda folikül gelişimi devam etmektedir. Ovaryumdaki çoğu folikül, 2-3 folikül hücre sırası içermektedir. Bu dönemde birinci haftada başlayan folikül etrafında bazal membran oluşumu tamamlanmaktadır. Ayrıca, folikülleri çevreleyen birkaç teka hücre sırası da görülmektedir (Ben-Or, 1963; Peters, 1969).

Üçüncü ve dördüncü hafta [juvenil (genç) dönem] ovaryum korteks bölgesinde gelişen farklı boyutlarda, fazla sayıda folikül bulunmaktadır. Folikül gelişimi destekleyen hormonların foliküller için yetersiz kalması nedeniyle bazı foliküller atreziye uğramaktadır. Bu dönemde, ovaryumun medulla bölgesi, çok sayıda kan ve lenf damarları ile sınırları içeren gevşek bir hale dönüşmektedir (Ben-Or, 1963; Peters, 1969). Eşeyssel olgunluğa erişmiş olan beş ve altı haftalık fare ovaryumlarında, hipofizden salgılanan FSH ve LH hormonlarının etkinliğinde çok sayıda folikül gelişmektedir. Foliküllerin içinde bulunan profaz I aşamasında bekleyen oositler de sitoplazmik olarak büyümekte ve gerekli olan maternal mRNA'ları sentezlemektedir. Gelişen foliküllerin bazıları bu dönemde de hormonal yetersizlik nedeniyle atreziye uğramaktadır. Kalan foliküller ise foliküler gelişimlerine devam ederek, olgun metafaz II aşamasındaki oositlerin üretimini gerçekleştirirler. Eşeyssel olgunluğun devam ettiği 16. ve 18. haftalarda da foliküler gelişim devam ederek, sitoplazmik ve nüklear olarak olgun oositler üretilmektedir (Peters, 1969).

Yaşlı fare ovaryumunda da (52., 60., ve 72. haftalık) fizyolojik ve morfolojik önemli bazı değişimler olmaktadır. Ovaryumdaki folikül sayısı azalmakta ve atreziye uğrayan folikül sayısı ise artmaktadır. Bu nedenle, yaşlı farelerden elde edilen kaliteli oosit sayısı

azalmaktadır. Atreziye uğrayan folikül sayısındaki artışın en önemli nedenlerinden birisi ise oosit nükleusunda sayısal ve/veya yapısal kromozomal bozuklukların artmasıdır. Ayrıca, yaşlı fare ovaryumunda reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak oksidatif hasar artmaktadır. Yaşlanma döneminde ovaryumda gözlenen bu tip abnormaliteler infertiliteye neden olabilmektedir (Danilovich & Ram Sairam, 2006; Lim & Luderer, 2011).

Bu bilgiler ışığında çalışma kapsamında postnatal fare ovaryumlarında yaşlanmayla birlikte telomeraz (*Tert*, *Terc*) ve telomere bağlı şeltrin kompleksi proteinlerinin (*Trf1*, *Trf2* ve *Pot1*) genlerinin ekspresyonal değişimlerini inceledik. Postnatal fare ovaryumlarında folikül ve oosit gelişimi ile stromal alandaki değişimler gibi önemli fizyolojik ve morfolojik işlemlerin erken dönem (1. ve 2. hafta), genç dönem (4. ve 5. hafta), ergin dönem (5. ve 6. hafta), geç ergin dönem (16. ve 18. hafta) ve yaşlı dönem (52., 60., ve 72. hafta) olması nedeniyle, çalışmada bu yaşlardaki farelerin kullanılması planlandı. Öncelikle oluşturulan gruplardan alınan ovaryumların histolojik yapısının incelenmesi için hematoksileneozin boyama yapıldı. Daha sonra *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* genlerinin mRNA ekspresyonun belirlenmesi için qRT-PCR, protein ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için ise immünohistokimya yöntemi kullanıldı. Elde edilen sonuçlar, oneway ANOVA parametrik testi ile değerlendirildi.

### **Çalışmanın Hipotezi**

Mevcut literatür bilgileri ışığında bu çalışmanın hipotezi: Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryum dokularında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* gen ekspresyonu farklılık gösterir. Bu hipotezden yola çıkarak, postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryum dokularında telomeraz enziminin katalitik aktivitesinden sorumlu olan *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1a* genlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar IVF uygulamalarında ileri yaşla birlikte gözlenen fertilitte kaybı üzerinde telomeraz ekspresyonu ve telomer ilişkili genlerin ekspresyonel değişimlerinin bir etkisi olup olmadığı konusunda bilgi verici olabileceği düşüncesindeyiz.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından sağlanan ve standart laboratuvar koşullarında beslenen 39 adet Balb/C ırkı dişi fare kullanıldı. Deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

1. Erken dönem (1. ve 2. Haftalar; n=6)
2. Genç dönem (3. ve 4. Haftalar; n=6)
3. Ergin dönem (5. ve 6. Haftalar; n=6)
4. Geç ergin dönem (16. ve 18. Haftalar; n=6)
5. Yaşlı dönem (52., 60. ve 72. Haftalar; n=9)

Bu proje çalışması kapsamında;

Postnatal fare ovaryumlarında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* mRNA'ların ekspresyonu Qrt-PCR ile; TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 proteinlerin ekspresyonları ise immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir.

#### 3.2. Postnatal Fare Ovaryumlarında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* mRNA'ların Ekspresyonunun qRT-PCR ile Belirlenmesi

Postnatal fare ovaryumlarında, telomeraz alt üniteleri olan *Tert* ve *Terc*'in, aynı zamanda telozom kompleks protein genlerinden *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1*'nin mRNA ekspresyonu sırasıyla total RNA izolasyonu, DNaz uygulaması ve cDNA eldesini takiben qRT-PCR ile belirlendi.

##### 3.2.1. Postnatal Ovaryumlardan Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu

1. Postnatal ovaryumlar, steril 1.5 ml'lik tüplere alındı ve üzerlerine birer ml Trizol reaktifi konuldu. Daha sonra tüplere seramik boncuklar eklenip, MagNA layzır cihazında 6500 rpm'de 45 saniye çevrildi. Böylece, dokuların iyice parçalanması sağlandı.

2. Tüpler, oda ısısında beş dakika inkübe edildikten sonra, üzerlerine 200 µl kloroform eklendi; iyice karıştırıldıktan sonra 3 dakika oda ısısında bekletildi.
3. Süre sonunda tüpler, 15 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA’nın bulunduğu şeffaf kısım, mikropipetle ile steril 1.5 ml’lik yeni tüplere alındı.
5. Tüplere 500 µl izopropanol eklenip, yavaşça çalkalandı ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
6. Süre sonunda, tüpler 10 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatantları atılıp, geriye kalan pelet üzerine %70’lik etanolden 1 ml konuldu.
8. Tüpler 10 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi ve süpernantları mikropipet yardımıyla atıldı.
9. Oda ısısında yaklaşık 20 dakika bekletilen tüplere, 25 µl steril distile su eklenerek RNA’ların çözülmesi sağlandı.
10. Çözülen RNA’ları içeren tüpler, -80°C’de saklandı.

İzole edilen RNA’lar, nanodrop (Epoch) ile ölçülerek RNA miktarları ve saflık oranları belirlendi (Tablo 3.1).

**Tablo 3.1.** Postnatal fare ovaryum dokularından elde edilen RNA’ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Postnatal yaş	Konsantrasyon (µg/µl)	Saflık (OD260/OD280)
1. hafta	0.114	1.887
2. hafta	0.279	1.921
3. hafta	0.530	1.922
4. hafta	0.350	1.907
5. hafta	0.803	1.960
6. hafta	0.327	1.759
16. hafta	2.474	1.885
18. hafta	2.072	1.939
52. hafta	1.119	1.815
60. hafta	0.398	1.892
72. hafta	0.535	1.889



### 3.2.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması

1. Genomik DNA'nın ortamdaki uzaklaştırılması için DNaz uygulaması gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA	10 µg miktardaki hacimde
DNaz I enzimi	1 µl
10X DNaz I tamponu	1.1 µl
Distile su	12 µl'ye tamamlandı

0.2 ml'lik PCR tüpüne konulan içerikler, 37 °C'de, 45 dakika inkübe edildi.

2. Süre sonunda tüplere 1.2 µl DNaz I inaktivasyon solüsyonundan konulup; tüpler iyice karıştırıldı ve oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.

3. Tüpler, 13200 rpm'de, +4 °C'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar yeni steril tüplere alındı. RNA ölçümleri yapıldı ve saflık değerleri belirlendi (Tablo 3.2).

**Tablo 3.2.** Postnatal fare ovaryum dokularından DNaz uygulanarak elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri

Postnatal yaş	Konsantrasyon (µg/µl)	Saflık (OD260/OD280)
1. hafta	0.027	1.779
2. hafta	0.069	1.895
3. hafta	0.126	1.933
4. hafta	0.084	1.910
5. hafta	0.138	1.958
6. hafta	0.076	1.782
16. hafta	0.186	1.995
18. hafta	0.151	1.972
52. hafta	0.147	1.896
60. hafta	0.139	1.927
72. hafta	0.197	1.945

### 3.2.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

DNaz uygulaması yapılmış olan postnatal fare ovaryumlardan izole edilen total RNA'lar, cDNA'ya çevrildi.

1. Her bir tüpe homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Ana karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu.

İçerik	Hacim (µl)	Son konsantrasyon (20 µl'de)
10X tampon RT	2	1x
dNTP (2.5 mM)	4	0.5 mM
RNaz inhibitör (10 unit/µl)	1	10 ünite
MMLV-geri transkriptaz	1	100 ünite
<b>Toplam</b>	<b>8</b>	

2. 0.2 µl'lik reaksiyon tüplerine izole edilmiş olan RNA'lardan 2 µg'lık hacimde konularak üzerlerine, ikişer µl randomdekamer (son konsantrasyon 5 µM olacak şekilde) eklendi. RNA ve randomdekamer karışımı 85 °C'de 3 dakika inkübe edilerek, sekonder RNA kıvrımlarının açılması sağlandı.

3. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklendi ve 44 °C'de, 60 dakika inkübe edildi.

4. Son olarak tüplerin, 92 °C'de 10 dakika inkübasyonu sonucunda elde edilen cDNA'lar, -20 °C'de saklandı.

### 3.2.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları

Görelî ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan qRT-PCR, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir tekniktir. Çalışmada, her hücrede eşit miktarda eksprese olduğu kabul edilen beta aktin gen ekspresyonu temel alınarak postnatal ovaryumlarda *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1a* mRNA ekspresyonları kantitatif düzeyde belirlendi. Postnatal ovaryumlardan elde edilen cDNA'lar bu aşamada kullanıldı.

1. Aşağıdaki belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

İçerik	Miktar (µl)
2X Sybr Green süper karışım	12.5
Primerİ (10 µM)	0.5
PrimerG (10 µM)	0.5
Nükleaz içermeyen su	10.5
cDNA	1

Tablo 3.3. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler

Gen Adı	Marka	İlerive GeriPrimer Dizileri (5'→3')	PCR Ürün Boyutu (bç)
<i>Beta Aktin</i>	Invitrogen	P <sub>i</sub> : TGCCTGACATCAAAGAGAAG	244
		P <sub>G</sub> : CGGATGTCAACGTCACACTT	
<i>Tert</i>	ThermoFisher CustomPrimer	P <sub>i</sub> : CTCTCTGCTGCGCAGCCGATAC	287
		P <sub>G</sub> : CCTCGTTAAGCAGCTCAAAG	
<i>Terc</i>	Sentegen	P <sub>i</sub> : CATTAGCTGTGGGTCTGGTCT	134
		P <sub>G</sub> : TCCTGCGCTGACGTTTGTTT	
<i>Trf1</i>	Sentegen	P <sub>i</sub> : TCTAAGGATAGGCCAGATGCCA	185
		P <sub>G</sub> : CTGAAATCTGATGGAGCACGTC	
<i>Trf2</i>	Sentegen	P <sub>i</sub> : TCAGCTGCTTCAAGTACAATGAG	91
		P <sub>G</sub> : GGTTCTGAGGCTGTCTGCTT	
<i>Pot1a</i>	Sentegen	P <sub>i</sub> : TCTTCGGTTGTGGAAAGCCT	170
		P <sub>G</sub> : TGTTTGATGAAAAATCCTCTCACAG	

*Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2*, *Pot1a* ve *Beta Aktin* için qRT-PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. Amplifikasyon, 40 döngüde gerçekleştirildi. Ayrıca,

meltingcurve analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen Tm değerleri karşılaştırılıp, PCR ürünlerinin özgülüğü değerlendirildi.

qRT-PCR programı

Başlangıç denatürasyonu (1x): 95 °C’de 3 dakika

10 döngü (touch-down uygulandı) (-1 °C/döngü): 92 °C→ 20 saniye; 65 °C→ 20 saniye; 72°C→ 30 saniye

30 döngü: 92 °C→ 20 saniye; 55 °C→ 20 saniye; 72°C→ 30 saniye

Meltingcurve

1 döngü: 95 °C→ 1 dakika; 55 °C→ 1 dakika

80 döngü (her döngüde 0.5 °C artmakta): 55 °C→ 10 saniye

qRT-PCR cihazının vermiş olduğu Ct (eşik döngü değeri) değerlerine göre *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* gen ekspresyonunun görelî değışimi,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülü ile hesaplandı.

$\Delta Ct = \text{Tert geni Ct değeri} - \text{Beta Aktin Ct değeri}$  formülü ile normalize değerler bulundu. Diğer hedef genler içinde ayrı ayrı bu formül kullanıldı.  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (farklı bir postnatal gün)- $\Delta Ct$  en büyük değeri. Bu yolla hesaplanan  $\Delta\Delta Ct$  değeri,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formülünde yerine konularak; görelî *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1a* mRNA ekspresyonları belirlendi. Böylece, her bir postnatal ovaryum gününde bu genlerin görelî ekspresyonları ortaya konuldu. Elde edilen bu görelî değerler için istatistiksel analizler uygulanarak, postnatal ovaryal gelişim farklı dönemindeki *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1a* mRNA’larının görelî kantitatif değışimleri belirlendi.

### **3.3. Postnatal Ovaryumlarda TERT, TRF1, TRF2, POT1 Protein Ekspresyonunun İmmünohistokimya ile Belirlenmesi**

Postnatal ovaryumlarda TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 proteinlerinin görelî ekspresyon düzeyi ve hücrel yerleşimleri immünohistokimya yöntemi ile belirlendi.

### **3.3.1. Postnatal Fare Ovaryumlarının Rutin Parafin Takibi**

Postnatal farelerden alınan ovaryumların rutin parafin takipleri gerçekleştirildi. Bu parafin bloklarından alınan kesitler, hematoksilin-eozin boyama ve immünohistokimya uygulamalarında kullanıldı.

Postnatal fare ovaryum dokularının rutin parafin takibi aşağıda anlatıldığı şekilde yapıldı.

1. Postnatal farelerden alınan ovaryumlar, %4'lük paraformaldehit içinde gece boyu (yaklaşık 12 saat) +4 °C'de fikse edildi.
2. Dokular, dehidratasyon için artan etanol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100'lük) geçirildi. %70, %80 ve %90'lık etanolde birer gün bekletilen ovaryum dokuları, %100'lük etanolde ise 3 saat tutuldu.
3. Dehidratasyon işleminden sonra, ksilol uygulaması ile dokuların şeffaflaştırılması gerçekleştirildi. Şeffaflaştırma, ksilol I'de 3 dakika, ksilol II'de 3 dakika ve ksilol III'de ise 3 dakika sürelerde gerçekleştirildi.
4. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi yapıldı. Parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat 60°C'lik etüvde tutulan ovaryum dokuları temiz parafin içinde uygun oryantasyonda gömüldü.
5. Ovaryum örneklerinden, rotari mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında alınan kesitler pozitif yüklü adeziv lamlara alındı.

### **3.3.2. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerine Hematoksilin-Eozin (HE) Boyama**

Postnatal ovaryum örneklerine HE boyaması aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Postnatal ovaryumlardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preparatlar ksilol I ve ksilol III'de 10'ar dakika bekletildi.
3. Preparatların, rehidratasyonu azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) beşer dakika tutulması ile gerçekleştirildi.

4. Süre sonunda preparatlar, çeşme suyunda 2x10 dakika yıkandı.
5. Süzölmüş hematoksilen boyasında 2 dakika bekletilen preparatlar, çeşme suyunda yıkandı. Süre sonunda eozin boyasında 15 saniye tutulan preparatlar, çeşme suyunda yıkandı.
6. Preparatlar %70, %80, %90 ve %100'lük etanol serilerinde birer dakika tutularak dehidratasyonları yapıldı.
7. Ksilol I ve II'de 10'ar dakika tutulan preparatlar, entellan ile lamel kullanılarak kapatıldı.
8. HE boyanmış postnatal ovaryum preparatları, ışık mikroskobunda (Zeiss) analiz edilerek; histolojik yapıları değerlendirildi.

### **3.3.3. Postnatal Fare Ovaryumlarına İmmünohistokimya Uygulaması**

Postnatal ovaryumlardan alınan parafin kesitlere, TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 proteinleri için immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Böylece, postnatal ovaryumlarda TERT proteininin hücreyel yerleşimi ve kalitatif ekspresyonları değerlendirildi.

İmmünohistokimya uygulaması, aşağıda belirtilen basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Preparatlar, 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletilerek kesitteki dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.
2. Daha sonra, preparatlar 10'ar dakika ksilol I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
3. Preparatlar, azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70 etanolde) 1x5 dakika bekletildi. Son olarak preparatlar, 5 dakika distile suda tutuldu.
4. Antijenik bölgelerin açılması için, preparatlar 0.01 M sitrik asit içinde 665 watt'a ayarlı mikro dalgada 2x5 dakika kaynatıldı.
5. Preparatlar, soğuması için sitrik asit içinde 25 dakika oda ısısında bekletildi.
6. Süre sonunda, preparattaki kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizilip, distile suya alındı ve 2x10 dakika bekletildi.
7. Daha sonra preparatlar, metanol içinde hazırlanan %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> içinde 25 dakika oda

ısısında bekletilerek, endojen peroksidaz aktivitesi bloklandı.

8. Bloklama sonrasında preparatlar, 1XPBS içinde 2x5 dakika yıkandı.
9. Yıkama sonrası, preparatlar sekonder antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek için UV bloklama solüsyonunda, 5 dakika inkübe edildi.
10. Bloklama sonrasında preparatlar, yıkama yapılmadan üzerlerindeki UV bloklama solüsyonu dökülüp, TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 primer antikorları mikropipetle kesitlerin üzerine damlatıldı. Primer antikorlar, Tablo 3.4.'de sunulan seyreltme oranlarında antikor diluent solüsyonu içinde hazırlandı. Kullanılan primer antikorlar, tavşandan üretilmiştir. Primer antikor damlatılan preparatlar, geceboyu +4 °C inkübe edildi. Her immünohistokimya boyamasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanıldı. Bu nedenle, primer antikor yerine izotip immünooglobulin G antikor (Cell Signaling, katalog no: 3900S) damlatıldı.
11. Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları dökülüp, 1XPBS'de 2x10 dakika yıkandı.
12. Daha sonra kesitlerin üzerine sekonder antikordan, üretici firmanın önerdiği 1:500 seyreltme oranında 1XPBS'te hazırlanıp damlatıldı ve preparatlar oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. Keçide üretilmiş, tavşana karşı ve biotin ile işaretli bir sekonder antikor kullanılmıştır.
13. Preparatlar, sekonder antikor aşamasından sonra 1XPBS içinde 2x15 dakika yıkandı.
14. Yıkama sonrasında preparatlar peroksidaz enzimi ile işaretli streptavidinde 30 dk inkübe edildi ve sonrasında 1XPBS içinde 3x5 dakika yıkandı.
15. Yıkama sonrasında kesitlerin üzerine DAB damlatılıp ve reaksiyon gelişimi ışık mikroskopunda kontrol edildi. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar 1XPBS içine alınarak reaksiyon durduruldu.

**Tablo 3.4.** İmmunohistokimya boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları

<b>Primer Antikor</b>	<b>Marka/Katalog Numarası</b>	<b>Seyreltme Oranları</b>	<b>Sekonder Antikor</b>	<b>Marka/Katalog Numarası</b>	<b>Seyreltme Oranları</b>
<b>TERT</b>	Bioss bs-0233R	1:125	Biotinli keçi anti-tavşan IgG antikoru	Vector BA-100	1:500
<b>TRF1</b>	Bioss bs-1151R	1:300	Biotinli keçi anti-tavşan IgG antikoru	Vector BA-100	1:500
<b>TRF2</b>	NovusBio NB110-57130	1:200	Biotinli keçi anti-tavşan IgG antikoru	Vector BA-100	1:500
<b>POT1</b>	Proteintech 10581-1-AP	1:100	Biotinli keçi anti-tavşan IgG antikoru	Vector BA-100	1:500

Son olarak preparatlar, artan alkol serilerinde dehidrate edildi ve ksilolden geçirildikten sonra Entellanla lamel kullanılarak kapatıldı. Kapatılan preparatlar ışık mikroskopunda analiz edilerek TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 proteinlerinin postnatal ovaryum dokularındaki ve farklı foliküllerdeki hücresel yerleşimleri ve ekspresyon düzeyleri belirlendi. Göreli ekspresyon durumları, ImageJ programı kullanılarak analiz edildi.

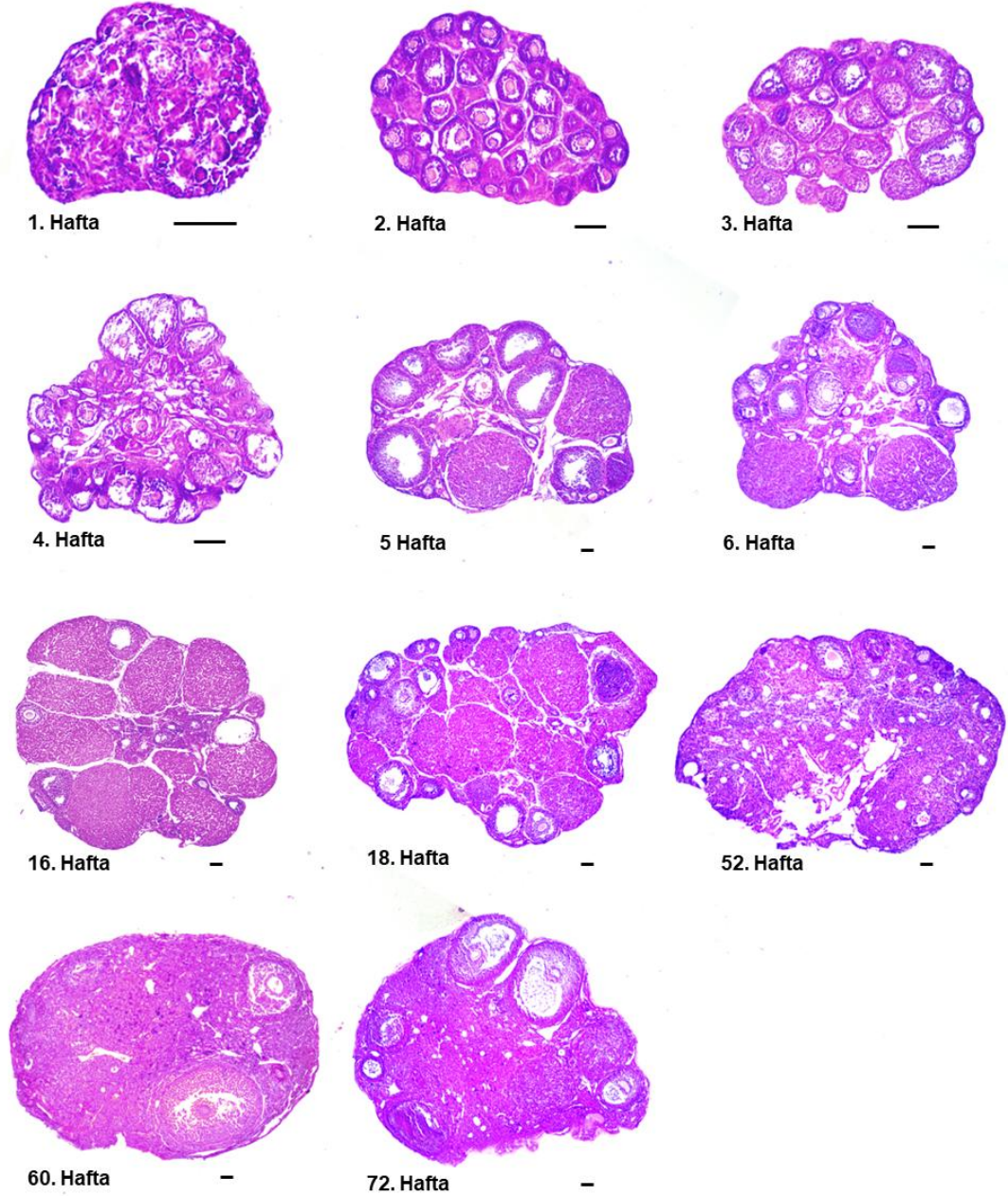


## 4. BULGULAR

Bu çalışmada postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryum dokularının öncelikle histolojik yapıları hematoxilen-eozin boyama ile değerlendirildi. Daha sonra *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* genlerinin mRNA ekspresyonları qRT-PCR ile protein ekspresyon seviyesi ise immünohistokimya ile analiz edildi.

### 4.1. Postnatal Ovaryumların Hematoxilen-Eozin Boyama Sonuçları

Bu çalışmada gelişimin farklı dönemlerindeki 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18, 52, 60 ve 72 haftalık postnatal fare ovaryum dokuları hematoxilen-eozin yöntemiyle boyandı. Ovaryumların histolojik yapısı ve morfofileri değerlendirildi. Böylece, yaşa bağlı değişimler gözlemlendi.



**Şekil 4.1.** Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryum dokularının HE boyama sonuçları. Gelişim erken döneminden yaşlı döneme doğru ovaryumların histolojik yapılarında özellikle folikül sayı ve tipleri ile stromal alanlarda histolojik değişimler olduğu gözlenmiştir. Birinci hafta ovaryum mikrosafı 200X; 2., 3. ve 4. hafta ovaryum mikrosafı 100X; geriye kalanlar ise 40X orjinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu = 50µm

Postnatal fare ovaryum dokularına uygulanan HE boyaması sonucunda, erken dönemler olan 1., 2., 3. ve 4. hafta ovaryumlarda çok sayıda farklı gelişim aşamasında foliküller görülmüştür (Şekil 4.1). Primordiyal ve primer foliküllerin bu dönemlerde çok sayıda

olması dikkati çekmektedir. Ayrıca, stromal alanda hücrel ve ekstraselüler matriks yeniden modellenmeleri de bu dönemlerde gerçekleşmiştir (Şekil 4.1). Postnatal hayatın 5., 6., 16. ve 18. haftalarında ise primer ve sekonder foliküllere ek olarak antral foliküller de izlenmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca, erken dönemlerden farklı olarak, bu dönemlerde korpus luteum yapıları da göze çarpmaktadır. Postnatal hayatın son dönemlerindeki ovaryumlarda ise (52., 60. ve 72. haftalarda) folikül ve korpus luteum sayıları erken dönemlere göre oldukça azalmış olup; stromal alanların da geniş yer kapladığı görülmektedir. Bu dönemdeki folikül çeşitliliğine bakıldığında az sayıda antral folikül olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1). Sonuç olarak, postnatal ovaryumların genel histolojik yapıları göz önünde bulundurulduğunda, farklı gelişim dönemlerinde stromal içerik ile folikül sayı ve çeşitliliğinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Postnatal ovaryum dokuları yaşları ve histolojik yapısal özellikleri temel alınarak beş alt gruba ayrılmıştır. Böylece, elde edilen sonuçlar bu alt gruplara bağlı olarak değerlendirilmiştir.

Erken dönem (ED; 1. ve 2. haftalar; n=6)

Genç dönem (GD; 3. ve 4. haftalar; n=6)

Ergin dönem (ErD; 5. ve 6. haftalar; n=6)

Geç ergin dönem (GED; 16. ve 18. haftalar; n=6)

Yaşlı dönem (YD; 52., 60. ve 72. haftalar; n=9)

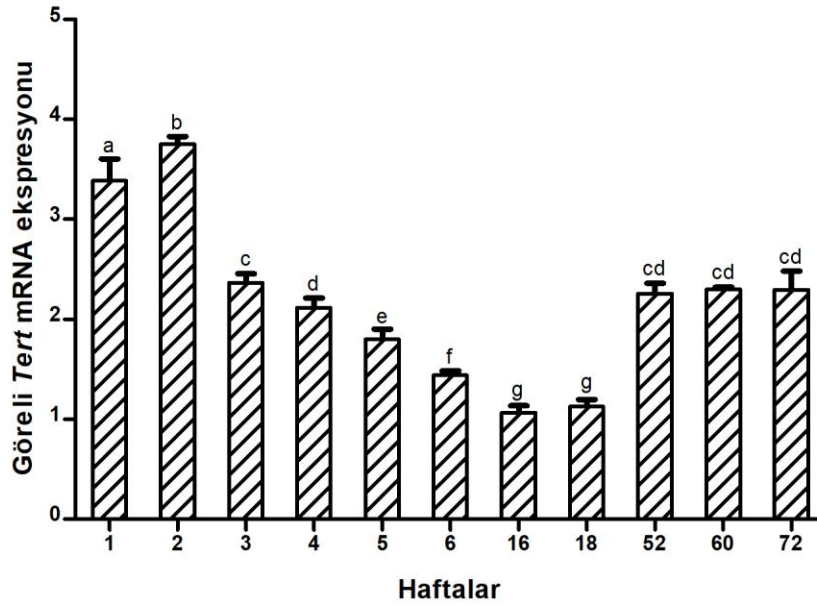
#### **4.2. Postnatal Ovaryum Dokularında qRT-PCR Sonuçları**

Postnatal gelişimin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18, 52, 60 ve 72 haftalık dönemindeki fare ovaryumlarında *Tert*, *Terc*, *Trf1*, *Trf2* ve *Pot1* genlerinin kantitatif gerçek zamanlı PCR analizleri yapılarak görel ekspresyon seviyeleri belirlendi. Elde edilen veriler one way ANOVA testi ve Dunn's post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Ayrıca, ovaryal gelişimin 1. ve 2. haftası erken dönem, 3. ve 4. haftası genç dönem, 5. ve 6. haftası ergin dönem, 16. ve 18. haftası geç ergin dönem, 52., 60. ve 72. haftası yaşlı dönem olmak üzere gruplara ayrıldı. Oluşturulan gruplar arasında, belirtilen genlerin

görel mRNA ekspresyon seviyeleri one way ANOVA testi ve Dunn's post hoc testi ile istatistiksel açıdan analiz edildi.

#### 4.2.1. Postnatal Ovaryumlarda Görel *Tert* mRNA Ekspresyonu

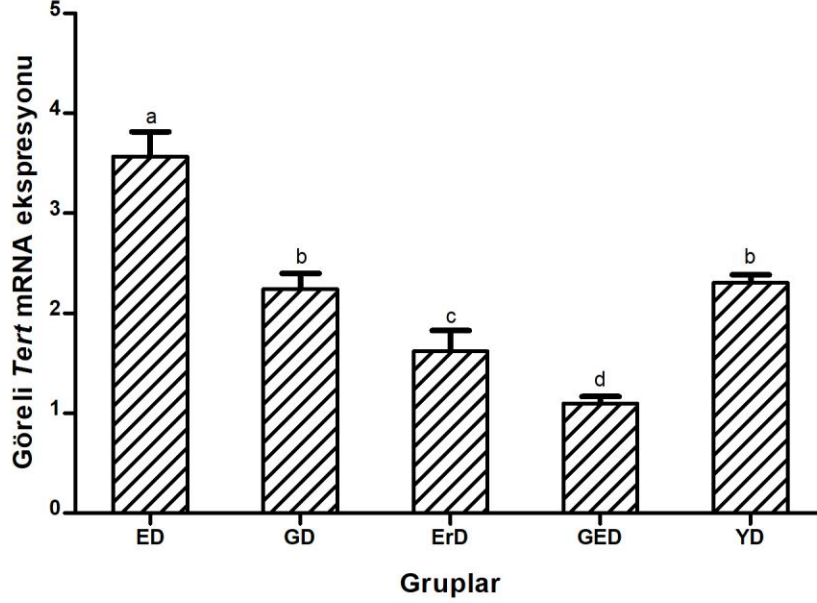
qRT-PCR analiz sonucuna göre, tüm haftalarda *Tert* mRNA ekspresyonun olduğu belirlendi (Şekil 4.2). *Tert* mRNA ekspresyonu, 2 haftalık fare ovaryumunda en yüksek seviyede; en düşük ise 16 haftalık fare ovaryumunda görüldü (Şekil 4.2). Birinci haftadan 2. haftaya doğru *Tert* mRNA ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmıştır (Şekil 4.2,  $P < 0.05$ ). *Tert* mRNA ekspresyonunda 2. haftadan 18. haftaya doğru kademeli olarak bir azalma görülmüştür (Şekil 4.2,  $P < 0.05$ ). On sekizinci haftadan itibaren 52., 60. ve 72 haftalık ovaryumlarda *Tert* ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.2,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.2.** Postnatal fare ovaryum dokularında *Tert* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Tukey's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. Postnatal hayatın farklı gelişim yaşlarındaki (1-72. haftalar) fare ovaryumlarında, *Tert* mRNA'sının görel ekspresyonu dalgalanmalar göstermektedir.

qRT-PCR analiz sonucuna göre görel *Tert* mRNA ekspresyonu, oluşturulan gruplar arasında da değerlendirildi. Elde edilen istatistik sonuçlarına göre *Tert* ekspresyon

seviyesi en yüksek erken dönemde, en düşük geç ergin dönemde görülmüştür (Şekil 4.3). Erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli ve istatistiksel olarak anlamlı bir *Tert* ekspresyon azalışı görüldü (Şekil 4.3,  $P<0.05$ ). Yaşlı dönemde, geç ergin dönem ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.3,  $P<0.05$ ).

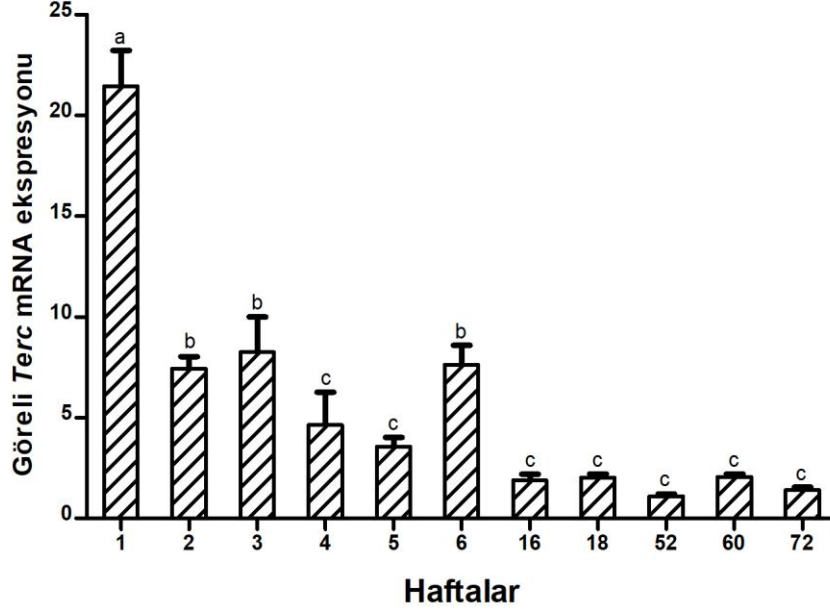


**Şekil 4.3.** Postnatal ovaryum gruplarında görelü *Tert* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Student–Newman–Keuls* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.  $P<0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. Erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli ve istatistiksel olarak anlamlı bir *Tert* ekspresyon azalma, yaşlı dönemde ise artış görüldü. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığını göstermektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem.

#### 4.2.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelü *Terc* mRNA Ekspresyonu

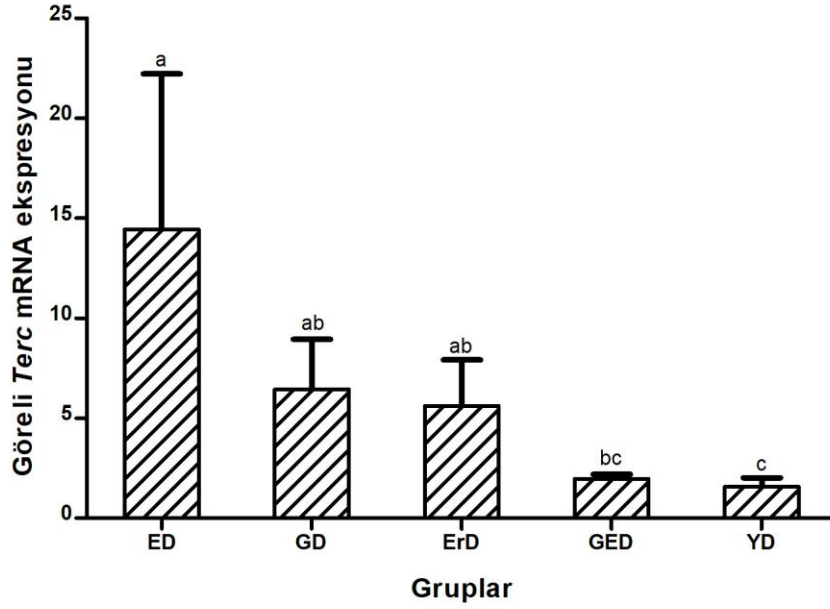
qRT-PCR analiz sonucuna göre tüm haftalarda *Terc* mRNA ekspresyonu olduğu belirlendi (Şekil 4.4). Elde edilen istatistiksel analiz sonuçlarına göre, *Terc* ekspresyon seviyesi en yüksek 1. haftada, en düşük ise 52. haftada bulundu (Şekil 4.4,  $P<0.05$ ). *Terc* ekspresyonu, 1. haftadan, 5. haftaya doğru göreceli olarak azalmıştır (Şekil 4.4). Altıncı hafta belirgin bir şekilde artan *Terc* ekspresyonu, 16. haftadan 72. haftaya kadar düşük düzeylerde seyretmiştir (Şekil 4.4). Yaptığımız istatistiksel analizler sonucunda, 1 haftalık fare ovaryumu diğer haftalardan anlamlı düzeyde daha yüksek *Terc* mRNA düzeyine sahiptir (Şekil 4.4,  $P<0.05$ ). İki, 3 ve 6 haftalık ovaryumlar da 4, 5, 16, 18, 52,

60 ve 72 haftalık ovaryumlardan anlamlı düzeyde daha yüksek *Terc* ekspresyon düzeyine sahip olduğunu gözlemledik (Şekil 4.4,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.4.** Postnatal ovaryumlarda görelî *Terc* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Terc* ekspresyonunun dalgalanma gösterse de, yaşlanmayla birlikte azalmaktadır.

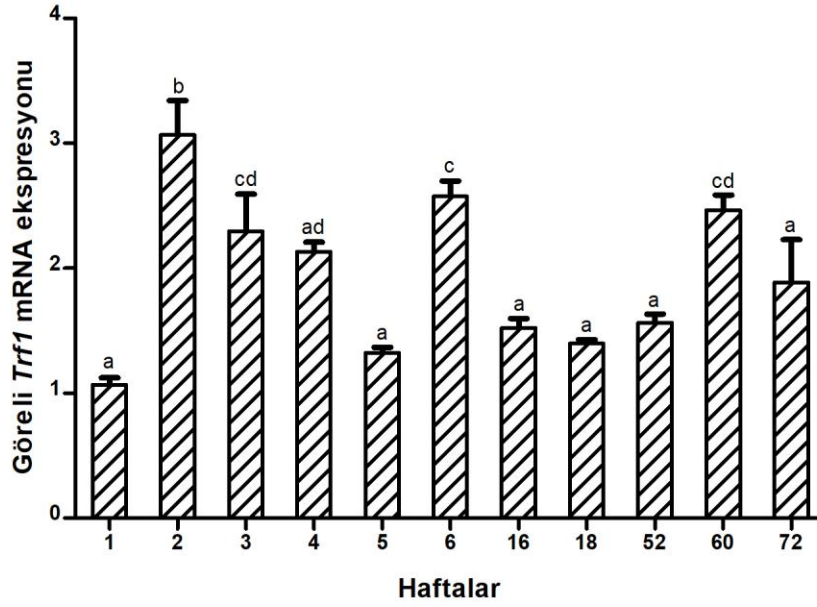
qRT-PCR analiz sonucuna göre görelî *Terc* mRNA ekspresyonu oluşturulan gruplar arasında da değerlendirildi. Elde edilen istatistik sonuçlarına göre ekspresyon seviyesi en yüksek erken dönemde, en düşük ise yaşlı dönemde bulunmuştur (Şekil 4.5  $P < 0.05$ ). Erken dönemde yaşlı döneme doğru gelindiğinde kademeli olarak *Terc* ekspresyonunun düştüğü gözlenmektedir (Şekil 4.5). Erken, genç ve ergin dönem gruplarının, geç ergin ve yaşlı dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek *Terc* mRNA düzeyine sahip olduklarını tespit ettik (Şekil 4.5  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.5.** Postnatal ovaryum gruplarında görelİ *Terc* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Terc* ekspresyonu erken dönemden yaşlı döneme doğru kademeli olarak azalmaktadır. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem.

#### 4.2.3. Postnatal Ovaryumlarda Görelİ *Trf1* mRNA Ekspresyonu

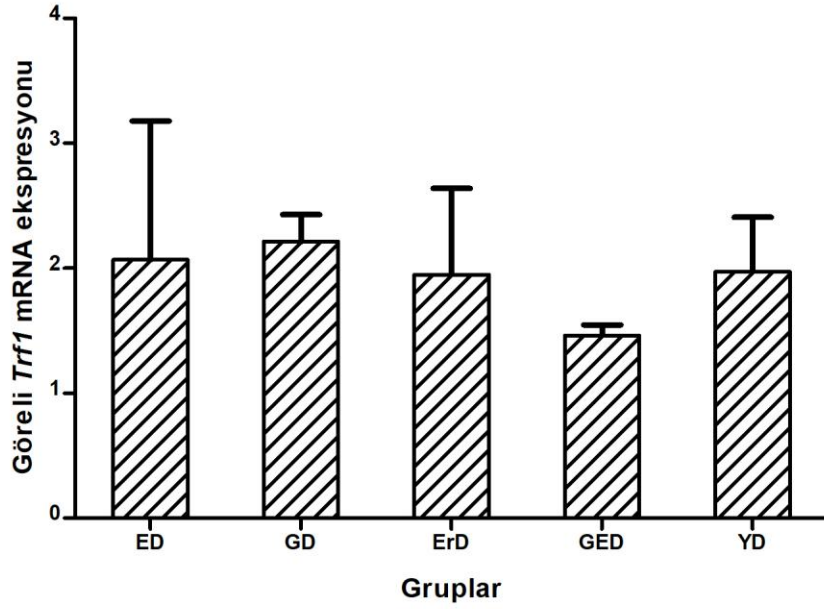
Yaptığımız qRT-PCR uygulamasının sonuçlarını analiz ettiğimize tüm haftalarda *Trf1* mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.6). *Trf1* ekspresyonu, birinci haftadan 72. haftaya doğru dalgalanmalar göstermiştir (Şekil 4.6). Elde edilen istatistik sonuçlarına göre, *Trf1* ekspresyon seviyesi en yüksek 2 haftalık, en düşük ise 1 haftalık fare ovaryumunda görüldü (Şekil 4.6). Birinci haftadaki düşük ekspresyon ikinci haftada yükselmiş olup, 5. haftaya doğru ekspresyon seviyesinde azalma ve daha sonra 6. haftada anlamlı bir artış meydana gelmiştir (Şekil 4.6,  $P < 0.05$ ). 16., 18., ve 52. haftalarda düşük düzeylerde seyreden *Trf1* ekspresyon seviyesi 60. haftaya gelindiğinde tekrar artış göstermiş ve 72. haftada anlamlı düzeyde düşmektedir (Şekil 4.6,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.6.** Postnatal ovaryumlarda görelî *Trf1* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Trf1* ekspresyonu dalgalanmalar göstermektedir.

qRT-PCR analiz sonucuna göre görelî *Trf1* mRNA ekspresyonu oluşturulan gruplar arasında da değerlendirildi. En yüksek ekspresyon seviyesi genç dönemde, en düşük ise geç ergin dönemdedir. Gruplar arasında dalgalanmalar gösteren *Trf1* ekspresyon seviyesi, gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemiştir (Şekil 4.7).

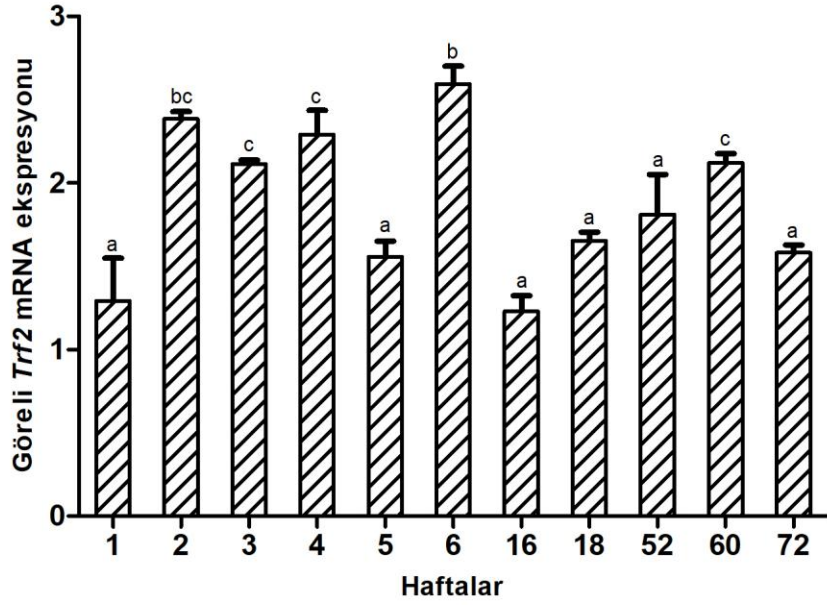




**Şekil 4.7.** Postnatal ovaryum gruplarında görelî *Trf1* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Trf1* ekspresyonu gruplar arasında farklılık göstermemektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem.

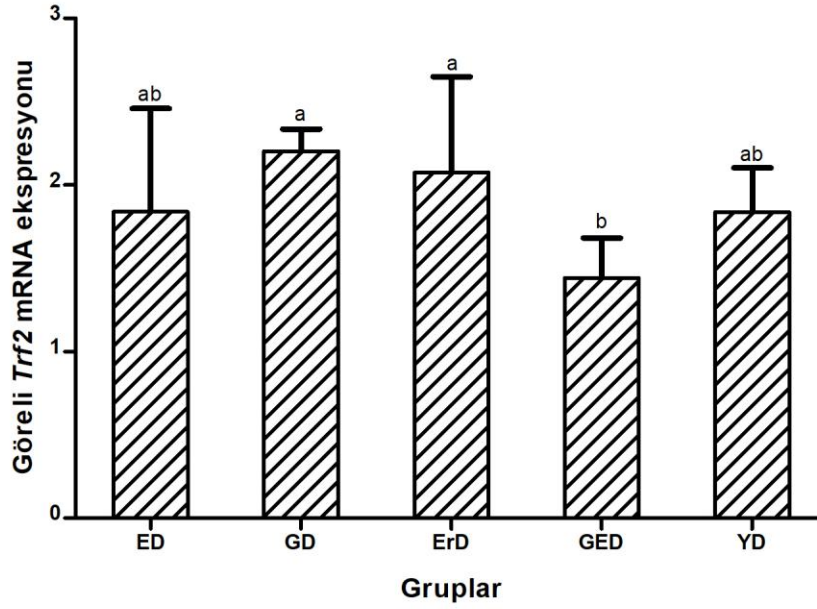
#### 4.2.4. Postnatal Ovaryumlarda Görelî *Trf2* mRNA Ekspresyonu

Tüm haftalarda *Trf2* mRNA ekspresyonu olduğu qRT-PCR uygulaması ile ortaya konulmuştur (Şekil 4.8). En yüksek *Trf2* ekspresyon seviyesi 6 haftalık fare ovaryumunda, en düşük ekspresyon ise 16. haftada görüldü (Şekil 4.8). 2., 6., ve 60. haftalarda önceki haftalara göre anlamlı bir artış bulundu (Şekil 4.8  $P < 0.05$ ). Bir haftalık ovaryumda düşük düzeyde olan *Trf2* ekspresyonu 2 haftalık ovaryumda belirgin düzeyde yükselmiştir (Şekil 4.8,  $P < 0.05$ ). Üçüncü ve 4. haftalarda anlamlı şekilde azalan *Trf2* mRNA düzeyi, 5. haftada daha da azalmıştır (Şekil 4.8,  $P < 0.05$ ). Altıncı haftada göze çarpan şekilde yükselen *Trf2* ekspresyonu, 16 ve 52. haftalarda belirgin azalmıştır (Şekil 4.8,  $P < 0.05$ ). Atmışıncı haftada anlamlı olarak yükselen *Trf2* transkript düzeyi, 72. haftada ise belirgin düzeyde azalmıştır (Şekil 4.8,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.8.** Postnatal ovaryumlarda görelili *Trf2* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Trf2* ekspresyonu haftalar arasında değişim göstermektedir.

qRT-PCR analiz sonucuna göre görelili *Trf2* mRNA ekspresyonu oluşturulan gruplar arasında da değerlendirildi. Elde edilen istatistik sonuçlarına göre ekspresyon seviyeleri en yüksek ergin dönemde ve en düşük geç ergin dönemde olduğu görüldü ( $P < 0,05$ ).

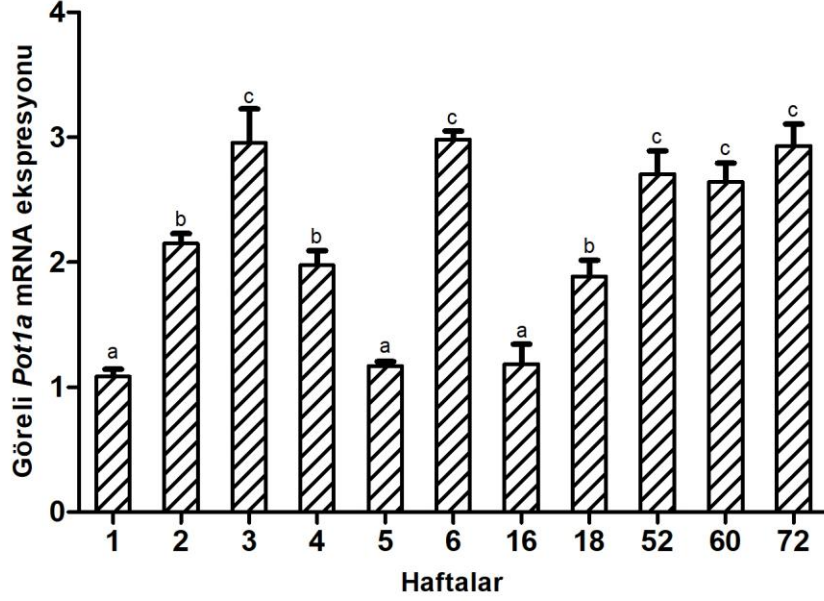


**Şekil 4.9.** Postnatal ovaryum gruplarında görelili *Trf2* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Trf2* ekspresyonu genç dönemden, geç ergin döneme doğru azalmaktayken, yaşlı dönemde artış göstermiştir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem.

#### 4.2.5. Postnatal Ovaryumlarda Görelili *Pot1a* mRNA Ekspresyonu

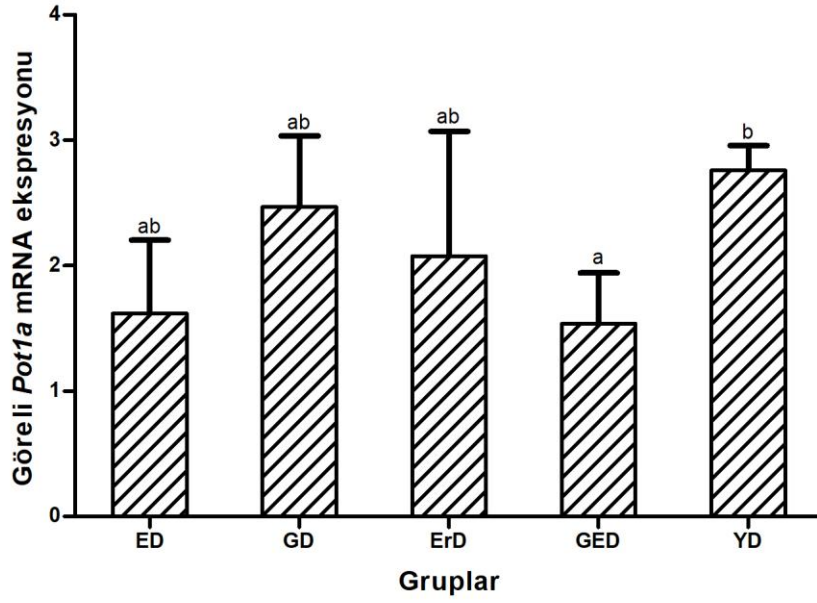
qRT-PCR analiz sonuçlarımıza göre tüm haftalar, *Pot1a* mRNA'sını eksprese etmektedir (Şekil 4.10). *Pot1a* ekspresyonu 6 haftalık fare ovaryumunda en yüksek seviyede; en düşük ise 1 haftalık ovaryumda görüldü (Şekil 4.10). *Pot1a* ekspresyonu, 1. haftadan 3. haftaya doğru kademeli olarak yükselmiştir (Şekil 4.10). Üçüncü haftadan 5. haftaya doğru ise *Pot1a* transkript düzeyi kademeli olarak azalmıştır (Şekil 4.10). Altıncı haftada belirgin düzeye yükselen *Pot1a*, 16. haftada oldukça düşmüştü ve 52. haftaya doğru ise kademeli bir şekilde yükselmiştir (Şekil 4.10). Altmış ve 72. haftalardaki *Pot1a* ekspresyonu, yüksek düzeyde seyretmiştir (Şekil 4.10). Yaptığımız istatistiksel değerlendirmelere göre: bir, 5 ve 16 haftalık ovaryumlar, kalan haftalara göre anlamlı düzeyde daha düşük *Pot1a* mRNA düzeyine sahiptir (Şekil 4.10,  $P < 0.05$ ). İki, 4 ve 18 haftalık ovaryumların *Pot1a* transkript düzeyi 1, 5 ve 16 haftalık ovaryumlarla karşılaştırıldığında belirgin olarak daha yüksek *Pot1a* seviyene sahip olduğu tespit edildi (Şekil 4.10,  $P < 0.05$ ). Üç, 6, 52, 60, 72 haftalık ovaryumların ise kalan haftalıkların

tamamından belirgin olarak daha yüksek *Pot1a* mRNA düzeyine sahip olduğunu gözlemledik (Şekil 4.10,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.10.** Postnatal ovaryum gruplarında görelî *Pot1a* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Pot1a* ekspresyonu haftalar arasında artıp azalmaktadır.

En düşük *Pot1a* ekspresyon seviyesi geç ergin dönemde görülürken, en yüksek ekspresyon ise yaşlı dönemde bulunmuştur (Şekil 4.11). Erken dönemde düşük düzeyde olan *Pot1a* mRNA düzeyi, genç dönemde biraz yükselmiş ve geç ergin döneme doğru ise kademeli olarak azalmıştır (Şekil 4.11). Geç ergin dönemde azalmış olan *Pot1a* düzeyli yaşlı dönemde yükselmiştir (Şekil 4.11). Yaptığımız istatistiksel analiz sonuçlarına göre yaşlı dönem ovaryumlar, geç ergin döneme göre anlamlı düzeyde daha yüksek *Pot1a* ekspresyon düzeyine sahip olduğunu belirledik (Şekil 4.11,  $P < 0.05$ ).



**Şekil 4.11.** Postnatal ovaryumlarda görelü *Pot1a* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, one way ANOVA testi ve *Dunn's* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.  $P < 0.05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir. *Pot1a* ekspresyonu gruplarda arasında değişim göstermektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem.

### 4.3. İmmünohistokimya Boyanma Sonuçları

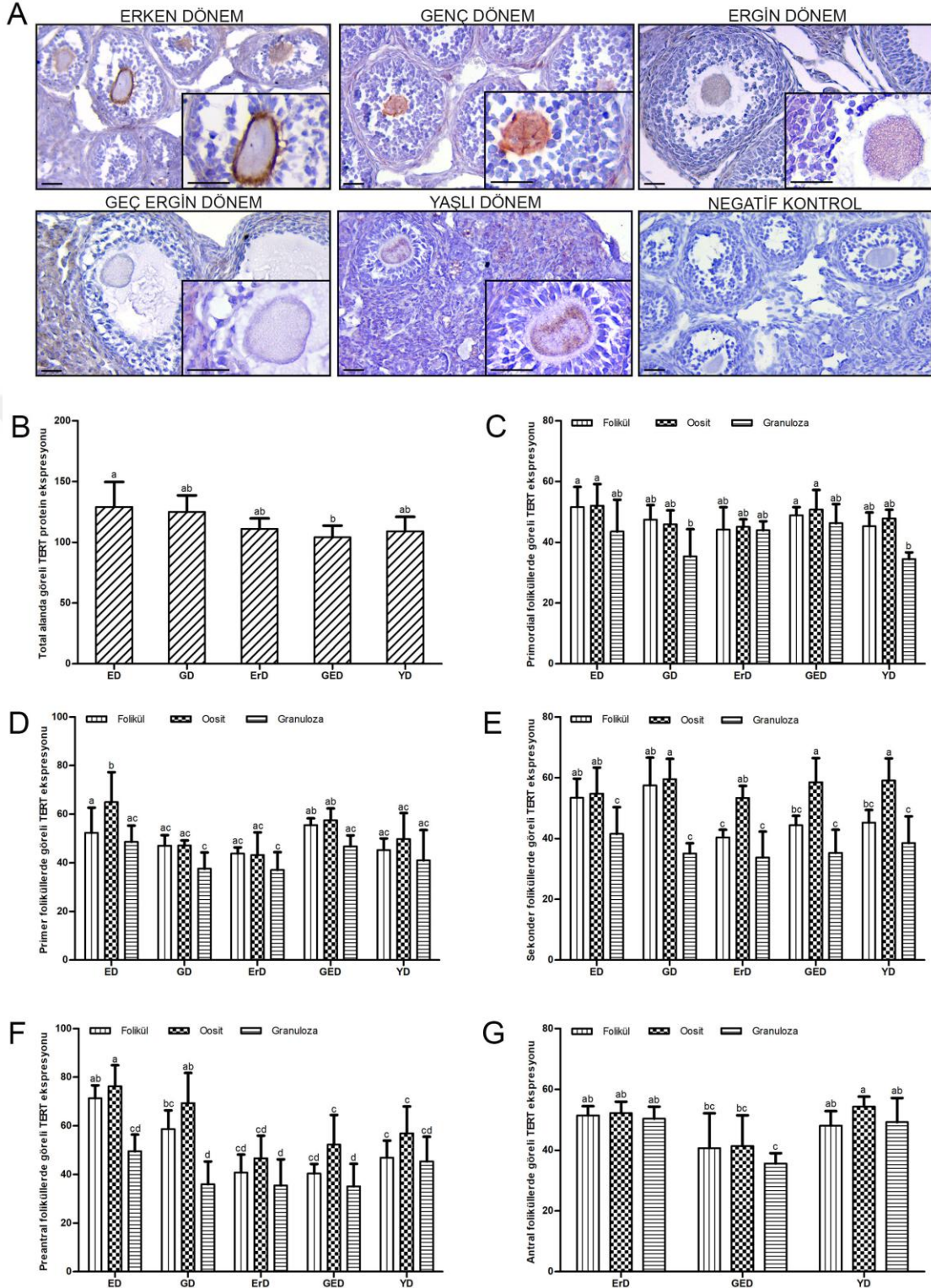
TERT, TRF1, TRF2 ve POT1 proteinlerinin immünohistokimyasal boyanması, postnatal gelişimin farklı yaşlarındaki fare varyum dokularında ve oluşturulmuş olan gruplarda analizi yapılarak görelü ekspresyon seviyeleri belirlendi. Elde edilen veriler one way ANOVA testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

Ayrıca ovaryal gelişimin farklı evrelerine göre oluşturulan gruplarda, farklı foliküler aşamadaki (primordial, primer, sekonder, preantral ve antral foliküller) foliküller ve her bir foliküldeki oosit ve granuloza hücrelerinin ekspresyon seviyeleri de ayrı ayrı analiz edilmiştir. Oluşturulan gruplar arasında belirtilen proteinlerin görelü ekspresyon seviyeleri one way ANOVA testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

#### **4.3.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî TERT Protein Ekspresyonu**

TERT proteininin ovaryumda tüm haftalarda ekspresse edildiği görüldü (Şekil 4.12). Ekspresyon dağılımı kortekste farklı gelişim evlerindeki foliküllerin hem oosit hem de granuloza hücrelerinde ve stromal alandaki belirli hücrelerde reaksiyon tespit edildi (Şekil 4.12A). Farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin granuloza hücreleri ve oositlerinde ise hem sitoplazma hem de çekirdekte TERT protein ekspresyonu gözlenmiştir (Şekil 4.12A).





**Şekil 4.12.** A. Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TERT immün boyanma sonuçları. B. Total alanda TERT immün analizi. C. Primordial foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde TERT immün analizi. D. Primer foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerindeki TERT immün analizi. E. Sekonder foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde TERT immün analizi. F. Preantral foliküllerde, oositte ve granuloza

hücrelerinde TERT immün analizi. **G.** Antral foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde TERT immün analizi. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı ( $P < 0.05$ ) göstermektedir. Elde edilen veriler, total alanda, primordial, primer, sekonder ve preantral foliküllerde one way ANOVA *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile antral foliküllerde ise *Holm Sidak*, post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler, istatistiksel anlamlılığı ( $P < 0.05$ ) göstermektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem. Küçük resimler 200X orjinal büyütmede, sağ alt köşedeki büyük resimler 400X orjinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu: 50  $\mu\text{m}$ .

İmmün boyanmalar ImageJ programıyla analiz edilip total alanda gruplar arasında one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Erken dönemden yaşlı döneme doğru gidildiğinde TERT ekspresyon seviyesi kademeli bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.12B). En yüksek TERT immün boyanması erken dönemde görülürken, en düşük ise geç ergin dönemde belirlendi (Şekil 4.12B). Erken dönem ovaryumlar, geç ergin döneme göre anlamlı düzeyde daha yüksek TERT protein ekspresyonuna sahiptir (Şekil 4.12B,  $P < 0.05$ ).

TERT immün boyanmaları primordial folikülden antral foliküle kadar gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin, oositlerin ve granuloza hücrelerinin görelî ekspresyon seviyeleri de ayrı ayrı değerlendirildi. Elde edilen veriler one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Erken dönemden yaşlı döneme kadar tüm gruplarda oosit ve foliküllerde TERT ekspresyon değişimler gösterse de anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. (Şekil 4.12C,  $P > 0.05$ ). Tüm gruplarda genel olarak oositlerde, granuloza hücrelerine göre daha yüksek TERT ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.12C). Erken dönem oositlerinde, granuloza hücrelerine göre anlamlı olarak daha yüksek immün boyanmalar görülmektedir.

Primer foliküllerde TERT ekspresyonu one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Gruplar arasında belirgin farklılıklar göstermezken; en yüksek ekspresyon geç ergin dönemde, en düşük ise ergin dönemde görülmüştür (Şekil 4.12D). Erken dönem ovaryumların oosit ve granuloza hücreleri en yüksek TERT ekspresyonuna sahip olduğu gözlenirken, en düşük ekspresyon ise ergin dönem oosit ve granuloza hücrelerinde belirlendi (Şekil 4.12D). Bu foliküllerde oositlerde granuloza hücrelerine kıyasla daha yüksek ekspresyon belirlenmiştir (Şekil 4.12D). Primordial foliküllere benzer şekilde erken dönemde anlamlı bir şekilde oositteki TERT ekspresyonu granuloza hücrelerine göre daha yüksektir.



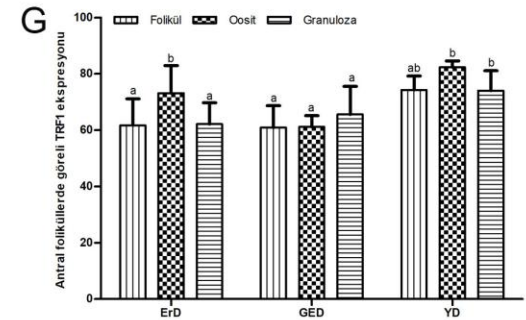
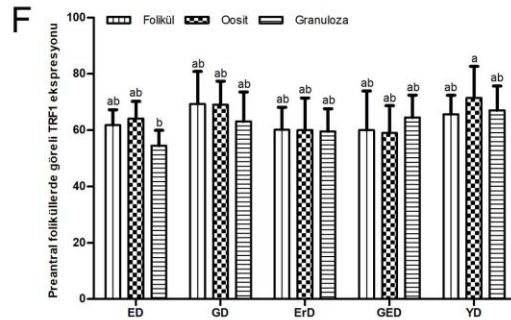
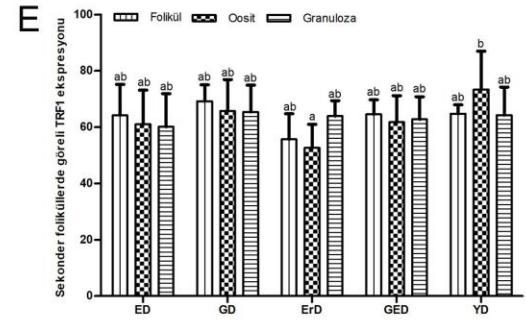
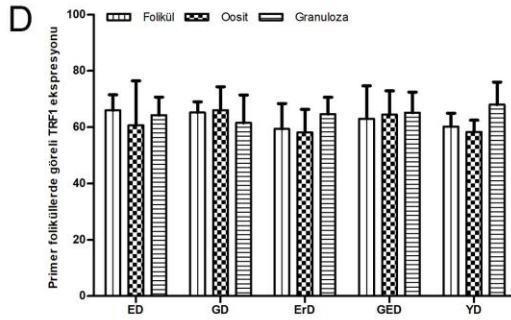
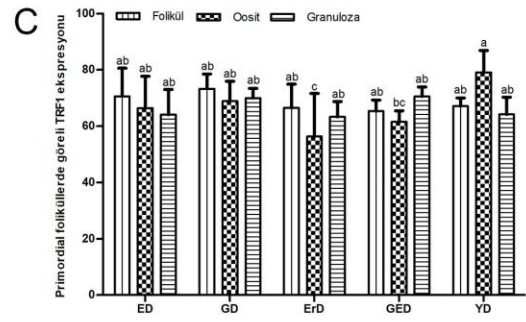
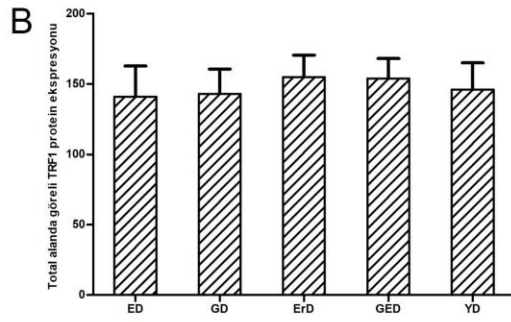
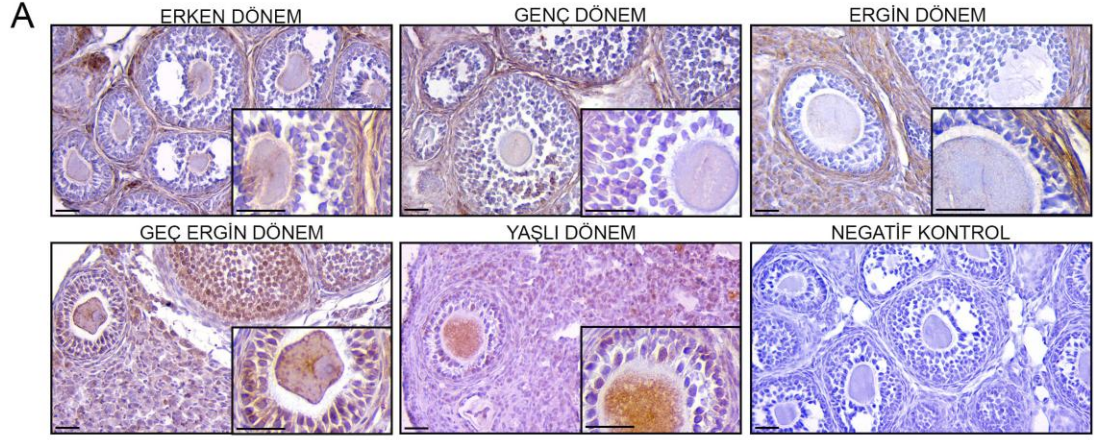
Sekonder foliküllerde TERT ekspresyon analizi one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde yüksek TERT ekspresyonu, genç dönemdeki foliküllerde gözlenirken, en düşük ekspresyon ise ergin dönemde tespit edildi (Şekil 4.12E). Ergin dönemden yaşlı döneme doğru gidildiğinde ise anlamlı olmasa da bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.12E). İlginç olarak, en yüksek TERT ekspresyonu genç dönemdeki oositlerde bulunurken, en düşük ergin dönemde görülmektedir ve gruplar arasında farklılık yoktur. Granuloza hücrelerinde ise en yüksek erken dönemde, en düşük ergin dönemde görülmesine rağmen farklılık bulunmamaktadır. (Şekil 4.12E). Bununla birlikte tüm gruplarda oositteki TERT ekspresyonu granuloza hücrelerine göre daha yüksek görülmüştür (Şekil 4.12E  $P < 0.05$ ). Preantral foliküllerde TERT ekspresyonu erken dönemden yaşlı döneme doğru kademeli bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.12F). Elde edilen veriler one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. En yüksek TERT ekspresyonu erken dönemde görülürken, en düşük ekspresyon ise geç ergin dönemde gözlenmiştir (Şekil 4.12F). Ayrıca, erken dönem fare ovaryumları ergin, geç ergin ve yaşlı dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek miktarda TERT ekspresyonu etmiştir (Şekil 4.12F,  $P > 0.05$ ). Buna ek olarak, genç dönem ovaryumları, erken dönemden daha düşük, fakat diğer dönemlerden daha yüksek TERT ekspresyonuna sahiptir (Şekil 4.12F,  $P < 0.05$ ). Oositte en yüksek TERT ekspresyonu, erken dönem ovaryumlarında gözlenirken; en düşük ekspresyon ergin dönem ovaryumlarında bulunmuştur. Erken dönem ve genç dönem arasında oositlerde ekspresyon farklı bulunmazken, diğer gruplara göre daha yüksek boyanmalar gözlenmiştir. Granuloza hücrelerinde ise en yüksek erken dönem, en düşük geç ergin dönem foliküllerin granuloza hücrelerinde belirlendi (Şekil 4.12F). Granuloza hücrelerinde erken dönemden sonra geç ergin döneme kadar TERT ekspresyonu anlamlı olarak düşmüş ve yaşlı dönemde tekrar artmaktadır. Erken, genç ve yaşlı dönemde oositteki ekspresyon anlamlı olarak granuloza hücrelerine göre daha yüksektir.

Antral foliküllerde TERT ekspresyonu istatistiksel analizi, one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi ile gerçekleştirildi. Analizler sonucunda gruplar arasında en yüksek ekspresyon ergin dönemde, en düşük ise geç ergin dönem foliküllerde görülmektedir fakat ekspresyon düzeyleri arasında bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.12G,  $P > 0.05$ ).

Diğer foliküllere benzer şekilde oositlerde granuloza hücrelerine göre daha fazla TERT ekspresyonu tespit edildi (Şekil 4.12G). Bununla birlikte oositte en yüksek TERT ekspresyonu yaşlı dönemde görülürken, en düşük geç ergin dönemde bulunmuştur (Şekil 4.12G). Yaşlı dönem oositlerinde geç ergin döneme göre anlamlı olarak daha yüksek TERT ekspresyonu görülmektedir. Benzer şekilde granuloza hücrelerinde de en yüksek TERT ekspresyonu yaşlı dönemde görülürken, en düşük geç ergin dönemde bulunmuştur (Şekil 4.12G). Geç ergin dönemde diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha düşüktür.

#### **4.3.2. Postnatal Ovaryumlarda Göreli TRF1 Protein Ekspresyonu**

TRF1 proteini tüm haftalarda ekspresse edildiği belirlendi. TRF1, farklı gelişim aşamasındaki foliküllerde ve stromal alandaki hücrelerde ekspresse edilmiştir (Şekil 4.13A). TRF1, farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin hem oosit hem de granuloza hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde yerleşim göstermiştir (Şekil 4.13A).



**Şekil 4.13.** A. Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TRF1 immün boyanma sonuçları. B. Total alanda TRF1 immün analizi. C. Primordial foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görelli TRF1 immün analizi. D. Primer foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görelli TRF1 immün analizi. E. Sekonder foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görelli TRF1 immün analizi. F. Preantral foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görelli TRF1 immün analizi. G. Antral foliküllerde, oositte ve

granuloza hücrelerinde görelî TRF1 immün analiz sonucu. Elde edilen veriler total alanda, primordial, primer, preantral ve antral foliküllerde one way ANOVA *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile, sekonder foliküllerde ise *Holm Sidak* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ( $P < 0.05$ ) göstermektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem. Küçük resimler 200X orijinal büyütmede, sağ alt köşedeki büyük resimler 400X orijinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu: 50  $\mu\text{m}$ .

TRF1 boyanmaları tüm gruplarda total alanda one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Erken dönemden yaşlı döneme doğru TRF1 ekspresyonu küçük dalgalanmalar gösterse de, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.13B;  $P > 0.05$ ).

Primordial foliküllerdeki TRF1 protein ekspresyonu, one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi istatistiksel olarak değerlendirildi. TRF1 immün boyanması en yüksek genç dönem, en düşük ise geç ergin dönemde tespit edildi (Şekil 4.13C). Gruplar arasında kısmi farklılık olmasına rağmen bu değişimler anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.13C). Oositlerde en yüksek TRF1 immün boyanması yaşlı dönemde, en düşük görelî ekspresyon ise ergin dönemde belirlendi (Şekil 4.13C). Yaşlı dönemde, ergin ve geç ergin döneme oranla istatistiksel olarak daha fazla immün boyanmalar görüldü (Şekil 4.13C;  $P < 0.05$ ). Ayrıca, ergin dönem oositler, erken dönem, genç dönem ve yaşlı dönemlere göre anlamlı düzeyde daha düşük TRF1 ekspresyonuna sahiptir (Şekil 4.13C;  $P < 0.05$ ). Granuloza hücrelerinde gruplar arasında ekspresyon seviyesinde dalgalanmalar olsa da istatistiksel olarak farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.13C).

Primer foliküllerde TRF1 protein ekspresyonu için de one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Farklı gruplara ait primer foliküller arasında TRF1 protein ekspresyonunda dalgalanmalar olsa da bir farklılık bulunmadı (Şekil 4.13D;  $P > 0.05$ ). Primer foliküldeki ekspresyona paralel biçimde oosit ve granuloza hücrelerinde de anlamlı farklılık görülmezken, oositlerdeki en yüksek TRF1 ekspresyonu genç dönemde, en yüksek granuloza ekspresyonu ise yaşlı dönem olarak analiz edildi (Şekil 4.13D). En düşük TRF1 ekspresyonu ise ergin dönemdeki oositlerde ve en düşük ekspresyon ise genç dönemde granuloza hücrelerinde görüldü (Şekil 4.13D).

Sekonder foliküllerde TRF1 ekspresyonu one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi ile değerlendirildi. Primer foliküllere benzer biçimde, sekonder foliküllerde ve granuloza hücrelerinde immün boyanmalarda dalgalanmalar olmasına rağmen, gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.13E,  $P >0.05$ ). En yüksek TRF1 ekspresyonu, yaşlı dönem sekonder folikül oositlerinde, en düşük ise ergin dönemde tespit edildi (Şekil 4.13E). Ayrıca, yaptığımız istatistiksel değerlendirme sonucunda, TRF1 ekspresyonu yaşlı dönem sekonder folikül oositlerinin ergin döneminden belirgin olarak daha yüksek olduğu görüldü (Şekil 4.13E,  $P <0.05$ ).

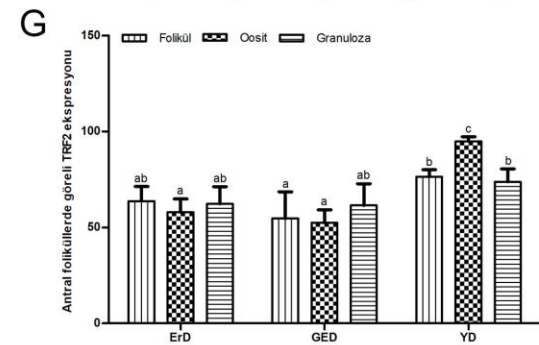
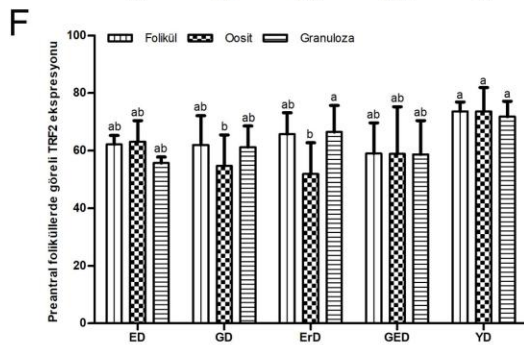
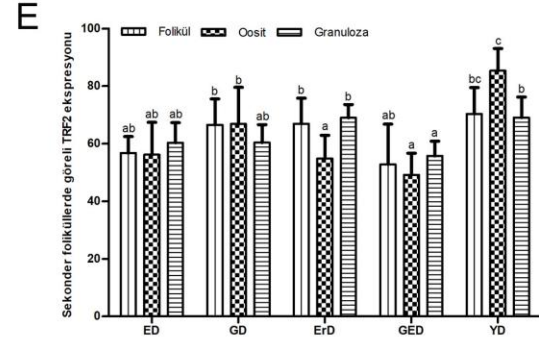
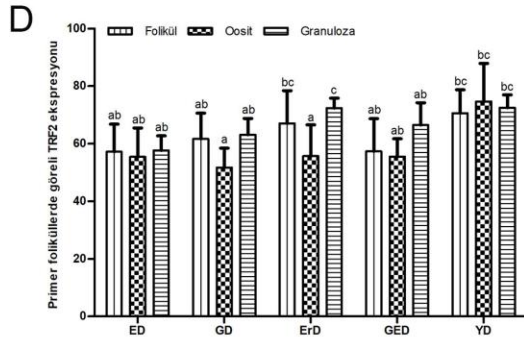
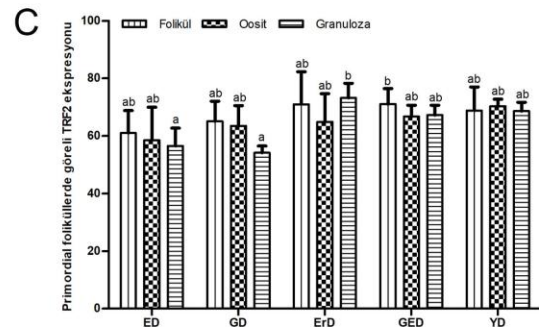
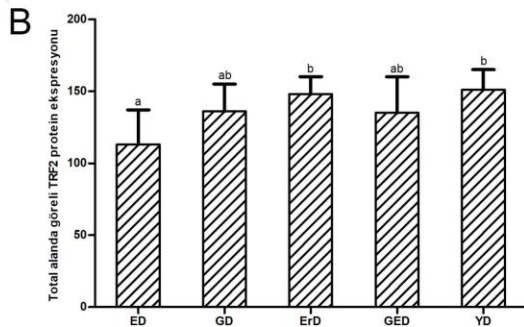
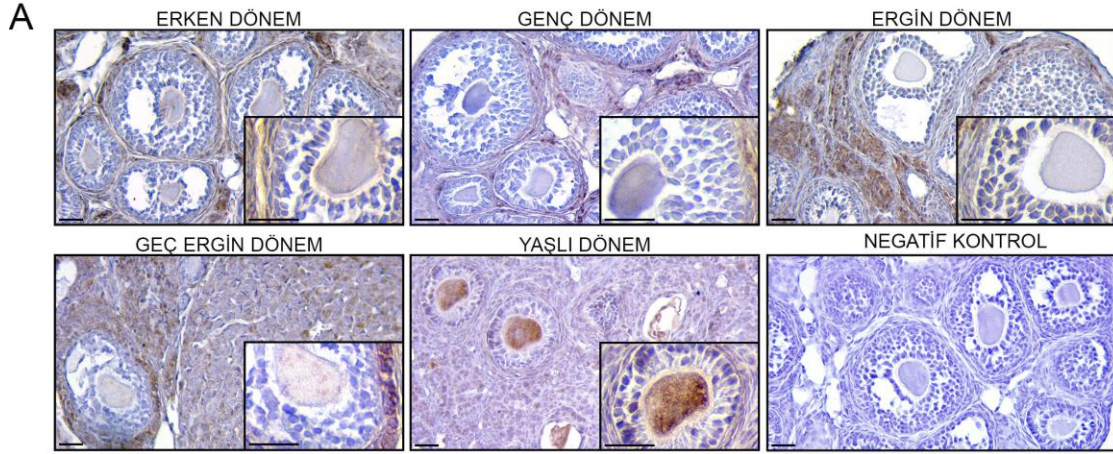
Preantral foliküllerde TRF1 ekspresyonu için one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanıldı. En yüksek TRF1 ekspresyonu genç dönemdeki preantral foliküllerde, en düşük ise ergin ve geç ergin dönemlerde belirlendi (Şekil 4.13F). Oosit ve granuloza hücrelerinde en yüksek TRF1 immün boyanması yaşlı dönemde, en düşük ise ergin ve geç ergin dönem oositlerde ve erken dönem granuloza hücrelerinde gözlenmiştir (Şekil 4.13F). Preantral foliküllerde, oosit ve granuloza hücrelerinde gruplar arasında ekspresyon seviyesi bakımından bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.13F,  $P >0.05$ ). Ancak, yaşlı dönem oositlerin, erken dönem granuloza hücrelerine göre belirgin daha yüksek TRF1 eksprese ettiği ortaya konulmuştur (Şekil 4.13F,  $P <0.05$ ).

Son olarak antral foliküllerde TRF1 ekspresyonu için one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanıldı. Yaşlı döneme doğru TRF1 ekspresyonu yükselmesine rağmen gruplar arasında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.13G). En yüksek TRF1 ekspresyonu yaşlı dönemin preantral folikülü, oositi ve granuloza hücrelerinde belirlenirken; en düşük düzey ise ergin ve geç ergin dönem preantral foliküllerde, geç ergin dönem oositlerde ve erken dönem granuloza hücrelerinde bulunmuştur (Şekil 4.13G). Geç ergin dönem oositi, diğer grupların oositlerine göre anlamlı düzeyde daha düşük TRF1 eksprese etmiştir (Şekil 4.13G,  $P <0.05$ ). Yaşlı dönem granuloza hücreleri ise ergin ve geç ergin dönem granuloza hücrelerine göre belirgin olarak daha yüksek TRF1 eksprese etmiştir (Şekil 4.13G,  $P <0.05$ ).

### 4.3.3. Postnatal Ovaryumlarda Görelî TRF2 Protein Ekspresyonu

TRF2 proteini, tüm haftalarda ekspresse edilmektedir (Şekil 4.14A). TRF2 ekspresyon dağılımı TRF1'e benzer şekilde, farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin oosit ve granuloza hücrelerinde ve stromal alanlarda görülmüştür (Şekil 4.14A). TRF2, oositte ile granuloza hücrelerinde hem sitoplazma hem de çekirdekte yerleşim göstermiştir (Şekil 4.14A).





**Şekil 4.14.** A. Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında TRF2 immün boyanma sonuçları. B. Total alanda TRF2 immün analizi. C. Primordial foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel TRF2 immün analizi. D. Primer foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel TRF2 immün analizi. E. Sekonder foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel TRF2 immün analizi. F. Preantral foliküllerde, oositte ve

granuloza hücrelerinde görelî TRF2 immün analizi. **G.** Antral foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görelî TRF2 immün analizi. Elde edilen veriler total alanda, preantral ve antral foliküllerde one way ANOVA *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile, primordial foliküllerde *Dunn's* post hoc testi ile, primer ve sekonder foliküllerde ise *Holm-Sidak* post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ( $P < 0.05$ ) göstermektedir. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem. Küçük resimler 200X orijinal büyütmede, sağ alt köşedeki büyük resimler 400X orijinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu: 50  $\mu\text{m}$ .

TRF2 ekspresyonu total alanda one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanılarak belirlendi. TRF2 ekspresyonu, erken dönemden ergin döneme doğru kademeli bir şekilde artmıştır (Şekil 4.14B). Bununla birlikte en yüksek immün boyanma yaşlı dönemde gözlemlendi (Şekil 4.14B). En düşük TRF2 ekspresyon seviyesi ise erken dönemde görülmüştür (Şekil 4.14B). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde erken dönem grubu, ergin ve yaşlı dönemlere göre anlamlı düzeyde daha düşük TRF2 eksprese ettiği bulunmuştur (Şekil 4.14B,  $P < 0.05$ ).

İmmünohistokimyasal TRF2 boyama durumları, her bir folikülde de analiz edilmiştir. Primordial foliküllerde TRF2 ekspresyonu one way ANOVA, *Dunn's* post hoc testi kullanılarak değerlendirilmiştir. Total alana benzer şekilde erken dönemden, ergin döneme doğru immün boyanmalarda artış görülmüştür (Şekil 4.14C). Fakat, gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır (Şekil 4.14C,  $P > 0.05$ ). Oositlerde de erken dönemden yaşlı döneme doğru gidildikçe ekspresyon seviyesi artsa da, bu değişimler gruplar arasında anlamlı değildi (Şekil 4.14C,  $P > 0.05$ ). Granuloza hücrelerinde en düşük ekspresyon seviyesi genç dönemde gözlenirken, en yüksek ekspresyon ise ergin dönemde belirlendi (Şekil 4.14C). Ergin dönem granuloza hücreleri, erken ve genç dönem granuloza hücrelerine göre anlamlı düzeyde daha yüksek TRF2 eksprese ettiği tespit edilmiştir (Şekil 4.14C,  $P < 0.05$ ).

Primer foliküllerde TRF2 ekspresyonu one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi ile analiz edildi. Primer foliküllerde en yüksek TRF2 immün boyanması yaşlı dönemde, en düşük ise geç ergin dönemde görüldü (Şekil 4.14D). Erken dönemden ergin döneme doğru kademeli bir şekilde artan TRF2 ekspresyonu, geç ergin dönemde biraz düşmüş ve yaşlı dönemde ise bir miktar artmıştır (Şekil 4.14D). Fakat, bu değişimler gruplar arasında anlamlı bulunmadı ( $P > 0.05$ ). Primer folikül oositlerinde en yüksek TRF2 ekspresyonu yaşlı dönemde, en düşük ise genç dönemde gözlenmiştir. Granuloza



hücrelerindeki TRF2 ekspresyonu erken dönemden ergin döneme doğru kademeli olarak artmış ve geç ergin dönemde biraz düşen ekspresyon yaşlı dönemde kısmen yükselmiştir (Şekil 4.14D). En yüksek ekspresyon seviyesi ergin dönemde, en düşük ise erken dönemde tespit edilmiştir (Şekil 4.14D). Ayrıca, ergin dönem granuloza hücreleri de erken, genç ve geç ergin dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek TRF2 ekspresyonu göstermiştir (Şekil 4.14D,  $P < 0.05$ ).

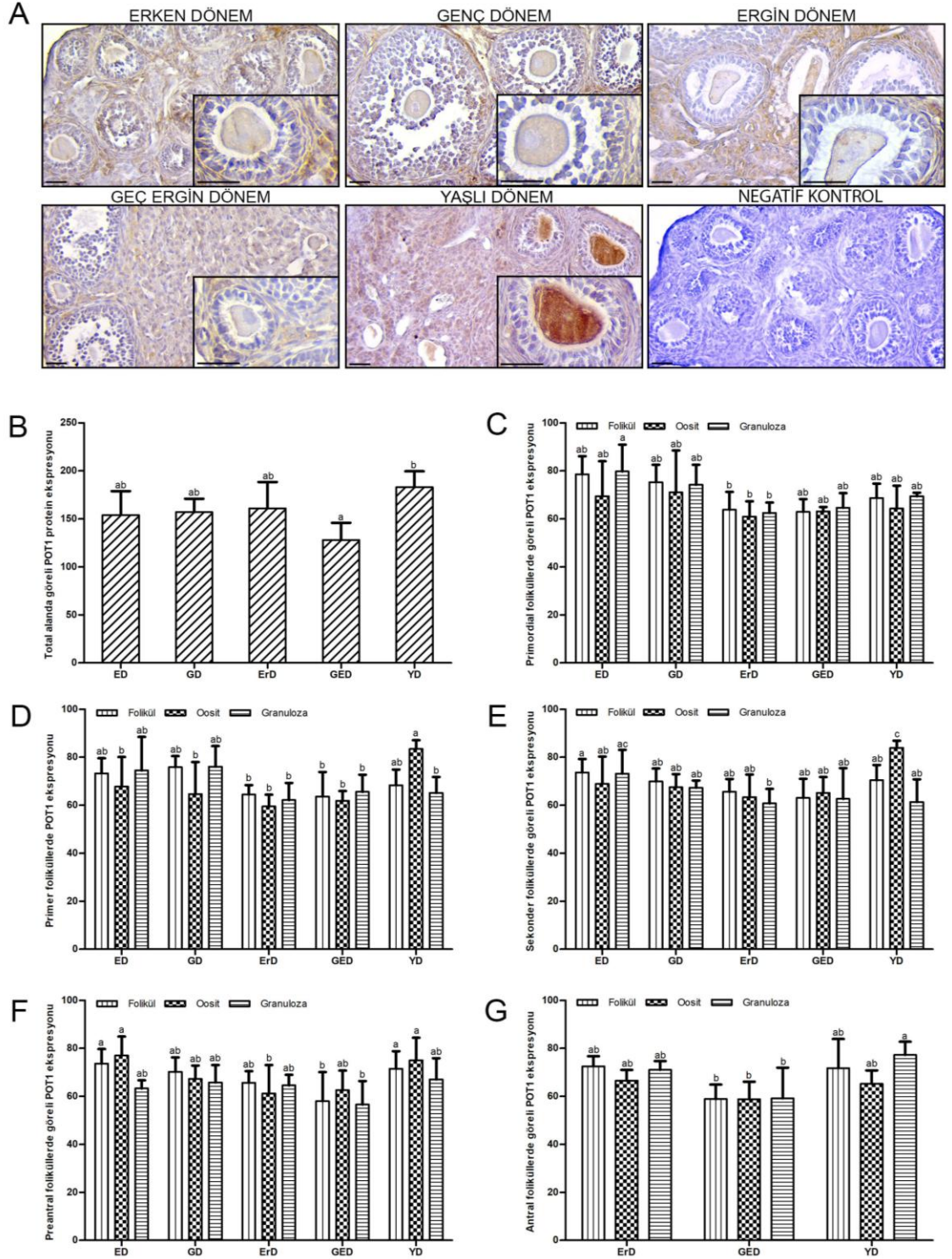
Sekonder foliküllerde TRF2 ekspresyonu one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi ile analiz edildi. En yüksek TRF2 ekspresyonu yaşlı dönemde, en düşük ise geç ergin dönemde bulundu (Şekil 4.14E). Sekonder foliküllerdeki, TRF2 ekspresyonu erken dönemden yaşlı döneme doğru dalgalanmalar göstermiş, fakat bu değişimler anlamlı değildir (Şekil 4.14E,  $P < 0.05$ ). Oositlerde TRF2 ekspresyonuna bakıldığında en yüksek yaşlı dönemde, en düşük ise geç ergin dönemde olduğu görüldü (Şekil 4.12E). Yaşlı dönem oositlerdeki TRF2 ekspresyonu genç, ergin ve geç ergin dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksektir (Şekil 4.14E,  $P < 0.05$ ).

Preantral foliküllerde TRF2 ekspresyonu one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile değerlendirildi. En yüksek TRF2 ekspresyonu yaşlı dönemde gözlenirken, en düşük ekspresyon ise geç ergin dönemde belirlendi (Şekil 4.14F). Erken dönemden ergin döneme doğru kademeli olarak artan TRF2 ekspresyonu, geç ergin dönemde kısmen azalmakta ve yaşlı dönemde ise az miktarda yükselmiştir (Şekil 4.14F). TRF2 ekspresyon düzeyindeki bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.14F,  $P > 0.05$ ). Preantral folikül oositlerinde yapılan analizler sonucunda erken dönemden ergin döneme doğru kademeli olarak azalan TRF2 ekspresyonu, yaşlı döneme doğru kademeli bir artış göstermiştir (Şekil 4.14F,  $P > 0.05$ ). Yaşlı dönem ovaryumlardan elde edilen oositlerde, genç ve ergin döneme göre anlamlı düzeyde daha yüksek TRF2 immün boyanması gözlemlendi (Şekil 4.14F,  $P < 0.05$ ). En yüksek TRF2 ekspresyonu yaşlı dönemdeki granuloza hücrelerinde, en düşük ise erken dönem gruplarında gözlemlendi (Şekil 4.14F). Erken dönemden ergin döneme doğru granuloza hücrelerindeki TRF2 ekspresyonu kademeli olarak artmış, geç ergin dönemde kısmen azalmış ve yaşlı dönemde tekrar yükselmiştir (Şekil 4.14F). Gruplar arasındaki bu değişimler anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.14F,  $P < 0.05$ ).

Antral foliküllerde TRF2 ekspresyonu one way ANOVA, Student-Newman-Keuls post hoc testi ile değerlendirildi. Farklı gruplar kıyaslandığında, en yüksek TRF2 ekspresyonu, yaşlı dönemdeki antral foliküllerde en yüksek, en düşük ise geç ergin dönem antral foliküllerde gözlenmiştir (Şekil 4.14G). Ayrıca, yaşlı dönem antral foliküllerdeki TRF2 ekspresyonu geç ergin dönemlerdekine göre anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.14G;  $P < 0.05$ ). Antral foliküllerdeki oositler değerlendirildiğinde, ergin dönemdeki TRF2 protein ekspresyonu geç ergin dönemde kısmen düşmekte ve yaşlı dönemde anlamlı düzeyde yükselmiştir (Şekil 4.14G;  $P < 0.05$ ). Ergin ve geç ergin dönem gruplarda benzer düzeylerde seyreden TRF2 ekspresyonu, yaşlı dönemde belirgin düzeyde artmıştır (Şekil 4.14G;  $P < 0.05$ ).

#### **4.3.4. Postnatal Ovaryumlarda Görelî POT1 Protein Ekspresyonu**

POT1 protein ekspresyonu ovaryumda tüm haftalarda olduğu görüldü. Ayrıca ekspresyon dağılımı foliküllerde ve stromal alanlarda bulunmuştur (Şekil 4.15A). Oositte ve granuloza hücreleri ile stromal hücrelerde sitoplazmada ve çekirdekte yerleşik olduğu görüldü (Şekil 4.15A).



**Şekil 4.15.** A. Postnatal gelişimin farklı dönemlerinde fare ovaryum doku gruplarında POT1 immün boyanma sonuçları. B. Total alanda POT1 immün analizi. C. Primordial foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel POT1 immün analizi. D. Primer foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel POT1 immün analizi. E. Sekonder foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel POT1 immün analizi. F. Preantral foliküllerde, oositte ve

granuloza hücrelerinde görel POT1 immün analizi. **G.** Antral foliküllerde, oositte ve granuloza hücrelerinde görel POT1 immün analizi. Elde edilen veriler, total alanda, primordial ve primer foliküllerde one way ANOVA *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile, sekonder, preantral ve antral foliküllerde *Holm Sidak*, post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ( $P < 0.05$ ) göstermektedir. Küçük resimler 200X orjinal büyütmede, sağ alt köşedeki büyük resimler 400X orjinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu: 50 µm. ED, erken dönem; GD, genç dönem; ErD, ergin dönem; GED, geç ergin dönem; YD, yaşlı dönem. Küçük resimler 200X orjinal büyütmede, sağ alt köşedeki büyük resimler 400X orjinal büyütmede çekilmiştir. Ölçüm çubuğu: 50 µm.

POT1 immün boyanmaları, ImageJ programıyla total alanda analiz edilip one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. En düşük POT1 boyanması geç ergin dönemde görülürken, en yüksek ise yaşlı dönemde bulunmuştur (Şekil 4.15B;  $P < 0.05$ ). Erken dönemden geç ergin döneme doğru benzer düzeylerde seyreden POT1 ekspresyonu, geç ergin dönemde azalmakta ve yaşlı dönemde ise yükselmiştir (Şekil 4.15B). Yaşlı dönem, geç ergin döneme göre anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 ekspresyonuna sahiptir (Şekil 4.15B;  $P < 0.05$ ).

Primordial foliküllerde POT1 ekspresyonunun istatistiksel analizi için one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanıldı. En yüksek POT1 immün boyanmaları erken dönemdeki primordial foliküllerde bulunurken, en düşük ise geç ergin dönemde belirlenmiştir (Şekil 4.15C). Primordial foliküllerdeki POT1 ekspresyonu, erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli olarak azalmakta ve yaşlı dönemde ise belirli bir düzeyde artmaktadır (Şekil 4.15C). Bu değişimler anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.15C,  $P > 0.05$ ). Grupların oositlerindeki görel POT1 ekspresyonları analiz edildiğinde dalgalanmalar görülmüş; en düşük ekspresyon ergin dönemde ve en yüksek ekspresyon ise genç dönemde izlenmiştir (Şekil 4.15C). Granuloza hücrelerine bakıldığında erken dönemden ergin döneme doğru azalan POT1 ekspresyonu yaşlı döneme doğru ise tekrar yükselmiştir (Şekil 4.15C). En yüksek ekspresyon seviyesi erken dönemde en düşük ise ergin dönemde belirlenmiştir (Şekil 4.15C). Erken dönemdeki granuloza hücreleri, ergin dönemdekilere göre anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 eksprese etmiştir (Şekil 4.15C,  $P < 0.05$ ).

Primer foliküllerde POT1 ekspresyon analizi için one way ANOVA, *Student-Newman-Keuls* post hoc testi kullanıldı. En düşük POT1 ekspresyon seviyesi geç ergin dönem primer foliküllerde bulunurken, en yüksek düzey ise genç dönemde belirlendi (Şekil

4.15D). Dalgalanmalar gösteren POT1 ekspresyonu primer foliküllerin oositlerinde en yüksek yaşlı dönemde en düşük ise ergin dönemde görülmüştür (Şekil 4.15D). Ayrıca, yaşlı dönem oositleri diğer dönemlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 eksprese etmektedir (Şekil 4.15D,  $P < 0.05$ ). Primer folikül granuloza hücrelerinde ise en yüksek POT1 ekspresyonu genç dönemde görülürken, en düşük ise ergin dönemde ortaya konulmuştur (Şekil 4.15D).

Sekonder foliküllerde POT1 ekspresyonu one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi kullanılarak analiz edildi. Sekonder foliküllerdeki POT1 ekspresyonu, erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli olarak azalırken, yaşlı dönemde kısmen yükselmiştir (Şekil 4.15E). Sekonder foliküllerde en düşük POT1 ekspresyonu, erken dönemde en yüksek ise geç ergin dönemde belirlendi (Şekil 4.15E). Sekonder foliküllerin oositlerindeki POT1 ekspresyonu, erken dönemden ergin döneme doğru kademeli olarak azalırken, yaşlı döneme doğru da yükselmiştir (Şekil 4.15E). Yaşlı dönemdeki sekonder folikül oositleri diğer dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 eksprese etmiştir (Şekil 4.15E,  $P < 0.05$ ). Sekonder foliküllerin granuloza hücrelerinde en yüksek POT1 ekspresyonu erken dönemde, en düşük ise yaşlı dönemde gözlenmiştir (Şekil 4.15E). Fakat gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.15E,  $P > 0.05$ ).

Preantral foliküllerde POT1 ekspresyonu istatistiksel analiz için one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi kullanıldı. Erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli olarak azalan preantral foliküllerdeki POT1 protein seviyesi, yaşlı dönemde artmıştır (Şekil 4.15F). En yüksek POT1 ekspresyonu erken dönem preantral foliküllerde gözlenirken, en düşük ise geç ergin dönemde belirlenmiştir (Şekil 4.14F). Ayrıca, yaşlı dönem preantral foliküller, geç ergin dönemdekilere göre anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 eksprese etmiştir (Şekil 4.15F,  $P < 0.05$ ). Farklı grupların preantral foliküllerin oositlerindeki POT1 ekspresyonu da erken dönemden ergin döneme doğru kademeli olarak azalıp, yaşlı döneme doğru kademeli olarak yükselmiştir (Şekil 4.15F). Ayrıca, erken ve yaşlı dönemlerin oositleri, ergin ve geç ergin dönemdekilere göre anlamlı olarak daha yüksektir (Şekil 4.15F,  $P < 0.05$ ). Farklı grupların preantral foliküllerin granuloza hücrelerindeki POT1 ekspresyonu dalgalanmalar göstermekle birlikte en

düşük ekspresyon geç ergin dönemde, en yüksek ise yaşlı dönemde görülmüştür (Şekil 4.15F).

Son olarak antral foliküllerde POT1 immün boyanması istatistiksel analizi için one way ANOVA, *Holm-Sidak* post hoc testi kullanıldı. Antral foliküllerde en yüksek ekspresyon seviyesi ergin ve yaşlı dönemlerde, en düşük ekspresyon seviyesi ise geç ergin dönemde bulundu (Şekil 4.15G). Fakat gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık görülmemiştir ( $P < 0.05$ ). Antral foliküllerin oositlerin de ergin dönemden geç ergin döneme doğru azalan POT1 ekspresyonu, yaşlı dönemde tekrar yükselmiştir (Şekil 4.15G,  $P > 0.05$ ). Farklı gruplardaki antral foliküllerin granuloza hücrelerinde en yüksek POT1 ekspresyonu yaşlı dönemde en düşük ise geç ergin dönemde görülmüştür (Şekil 4.15G,  $P > 0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda postnatal gelişimin farklı dönemlerine ait 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18, 52, 60 ve 72 haftalık fare ovaryumları kullanıldı. Alınan ovaryumlar erken dönemden yaşlı döneme kadar tüm gelişim dönemlerini kapsayacak şekilde gruplar oluşturuldu. Ovaryumda, erken dönemden yaşlı döneme kadar birçok fizyolojik (üreme hormonları gibi) ve histolojik (folikül sayı ve tip ile stromal alandaki hücresel çeşitlilik gibi) değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimler temel alınarak, 1. ve 2. hafta erken dönem, 3. ve 4. hafta genç dönem, 5. ve 6. hafta ergin dönem, 16. ve 18. hafta geç ergin dönem, 52., 60. ve 72. haftalar ise yaşlı dönem olmak üzere 5 farklı grup oluşturuldu.

Daha önce yapılan çalışmalarda şeltrin kompleksi proteinlerinin ve telomerazın doku homeostazında ve yaşlanmada rol oynadığı bilinmektedir (Hartmann ve ark., 2009). Telomeraz, germ hücrelerinde, granuloza hücrelerinde, embriyonik kök hücrelerde, bazı kök hücre ve kanser hücrelerinde eksprese edilir (Kim ve ark., 1994; Wright ve ark., 1996). Birçok dokuda yaşla birlikte telomerler kısalmaktadır (Blasco, 2007a). Yapılan bu çalışma ile postnatal gelişimin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 16, 18, 52, 60 ve 72 haftalık fare ovaryumlarında TERT, *Terc*, TRF1, TRF2 ve POT1'in ekspresyon seviyeleri ilk defa değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler total alanda, foliküllerde, farklı folikül gelişim evrelerindeki oosit ve granuloza hücrelerinde ayrı ayrı ve detaylı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada *Tert* mRNA ekspresyonu, erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Yaşlı dönemde ise kısmi bir artış görülmüştür. Gruplar arasında ise *Tert* ekspresyonu, yaşlı dönemde ilginç olarak artış göstermektedir. TERT protein ekspresyonu da mRNA ekspresyonuna benzer şekilde erken dönemden geç ergin döneme doğru azalmış, yaşlı dönemde ise anlamlı olmasa da geç ergin döneme göre artış görülmüştür. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde *Tert* mRNA'sındaki ekspresyonal azalmanın, TERT protein düzeyindeki azalmaya yansımış olduğu görülmektedir. *Tert* gen ekspresyonunun yaşlı dönemde kısmi bir artış göstermesinin bu dönemde oldukça kısalan telomerin tekrar uzatılabilmesi amacı ile gerçekleştirilmiş hücresel bir refleks olabileceği düşünülmektedir. *Tert* mRNA ve protein düzeyinin

gelişimin ilerleyen dönemlerindeki azalmasının temelinde, üreme hormonlarının ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzeylerinin değişimlerine bağlı olabilir. Bilindiği gibi, östrojen hormonu, telomerazın düzenlenmesinde kilit bir moleküldür. Östrojen eksikliği foliküler atreziye ve ovaryumun yaşlanmasına, ayrıca telomerazın inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir (Britt ve ark., 2002). Genel olarak, TERT ekspresyonunun gelişimin ilerleyen dönemlerinde azalması östrojenden kaynaklı olabilir. Çünkü hTERT'in (insan TERT) ekspresyonel düzenlenmesinde östrojenin ve östrojen bağlanma reseptörlerinin rolü olabileceğine yönelik bir çalışma mevcuttur (Misiti ve ark., 2000). Östrojenin varlığı hTERT promotor aktivitesini belirgin şekilde arttırmıştır, yokluğunda ise telomeraz aktivitesi saptanmamıştır (Misiti ve ark., 2000). Bir diğer çalışmada östrojenin olmadığı farelerde TERT ekspresyonunun oldukça azalmış, östrojen replasman tedavisi yapıldıktan sonra TERT ekspresyonunun tekrar arttığı gözlenmiştir (Bayne ve ark., 2011). Ayrıca, östrojenin menopoz sonrası dönemde azaldığı bilinmektedir (Greenblatt, Oettinger, & Bohler, 1976). Total alanda, primer ve preantral foliküllerde oositte erken dönemde yüksek ve daha sonra azalan TERT ifadesi östrojenin yaşa bağlı azalması ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

*Tert* ekspresyonel farklılığın oluşmasını sağlayan bir diğer faktör ise telomerlerin nükleotid yapısından kaynaklı olabilir. Çünkü telomer DNA'sı zengin guanin üçlüleri içerdiği için oksidasyona karşı hassas ve oksidatif stresle indüklenen DNA hasarına daha duyarlıdır (Henle ve ark., 1999). Telomerler gelişimin ilerleyen döneminde kısalması, çok sayıda gerçekleşmiş olan DNA replikasyonu ve artan oksidatif stres ile ilişkilendirilmektedir (Ko, Seo, & Jung, 2018; Sitte, Saretzki, & von Zglinicki, 1998). Böylece, yaşla birlikte çok sayıda mitotik bölünme olduğu için telomerler yaşla orantılı bir şekilde kısalır. Bununla birlikte, telomerler normal genomdan yedi kat daha fazla primidin (Timin) içeriğine sahiptir ve zengin primidin içeriğinden dolayı DNA hasarına karşı duyarlıdır (Rochette & Brash, 2010). Yapılan çalışmalar hTERT'in oksidatif strese yanıtta rol alabileceği de gösterilmiştir (Green, Sharma, & Santos, 2019). Oksidatif stresin ( $H_2O_2$  ile) indüklenmesiyle, insan fibroblastlarındaki mitokondrideki hTERT düzeyini azalttığı ve hücreyi otofajiya yönlendirdiği görülmüştür (Green ve ark., 2019). Mitokondrideki oksidatif stresle artan DNA hasarı, TERT yanıtının azalması ve telomeraz aktivitesinin kaybına neden olabilmektedir (Green ve ark., 2019). Jiang ve



arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu çalışmada ise prematür over yetmezlik (POF) hastalarında ROS miktarının arttığı ve TERT ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (H. L. Jiang, Cao, & Chen, 2018). Bir diğer bulgu ise POF hastalarında yaşa bağlı olarak TERT ekspresyonunun azaldığı ve folikül tükenmesinden kaynaklı POF olan hastalarda düşük TERT ekspresyonu gözlenmiştir (Kinugawa ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda erken dönemden, geç ergin döneme kadar yaşlanmayla azalan *Tert* mRNA ve protein seviyeleri görülmektedir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde azalan TERT ekspresyonu oksidatif strese bağlı olarak azalmış olabileceği düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada genç (6-8 hafta) ve yaşlı farelerden (42-48 hafta) süperovulasyonla elde edilmiş MII oositlerde ve postovulatuvar yaşlanmaya uğramış MII oositlerde TERT ekspresyonu analiz edilmiştir (Yamada-Fukunaga ve ark., 2013). Hem postovulatuvar yaşlanma sırasında ve hem de biyolojik yaşlanmaya bağlı olarak hem *Tert* ekspresyonu (Q-PCR yöntemi ile) ve hem de telomeraz aktivitesinin [TRAP (Telomerik Tekrar Çoğaltma Protokolü) yöntemi ile] azaldığı görülmüştür (Yamada-Fukunaga ve ark., 2013). Bilindiği gibi telomeraz aktivitesinin olmadığı farelerde nesiller boyunca azalan telomer uzunluğu görülmektedir. Bu da metafaz kromozomlarında anormal iğ oluşumu ve yanlış hizalanmaya sebep olmaktadır (Blasco ve ark., 1997) ve dolayısıyla yaşlanma sürecinde oositlerde anöploid oluşumuna neden olabilmektedir. Bununla birlikte aynı çalışmada yaşla birlikte artan ROS seviyeleri de değerlendirilmiş ve yaşlanmayla birlikte arttığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde erken dönemden, geç ergin döneme kadar yaşlanmayla azalan *Tert* mRNA ve protein seviyeleri görülmüştür. Bizim çalışmamızdaki 6 ve 52 haftalık ovaryumların *Tert* mRNA sonuçlarıyla kıyaslandığında mRNA ekspresyonunun 52 haftada arttığı görülmektedir. Ayrıca protein sonuçlarına bakıldığında total alanda ergin dönem (6 haftalık ovaryumları da içermektedir) ve yaşlı dönem (52 haftalık ovaryumları da içermektedir) ovaryumlarda TERT ekspresyonu yaşlı dönemde kısmi bir azalma görülmektedir. Yaşla birlikte TERT ekspresyonundaki azalma, oksidatif stres ve diğer hormonal değişimlerden kaynaklanmış olabilir.

Prasad ve arkadaşlarının 2017 yılında yapmış olduğu bir çalışmada, sıçanda ovulasyon sonrası metafaz II oositlerin ampullada 7 saate kadar bekletilerek *in vivo* yaşlandırılması

durumunda, TERT ekspresyonunun arttığı görülmüştür (Prasad & Chaube, 2017). MII oositlerin yaşlandırılması, MII duraklamasından kendiliğinden çıkışını ve apoptozu indükleyerek oosit kalitesinin düşmesine sebep olabilmektedir (Prasad & Chaube, 2017). TERT ekspresyonundaki artış, oosit yaşlanmasının yanı sıra MII duraklamasından kendiliğinden çıkması ve mayotik bölünmenin tekrar başlamasıyla ilişkilendirilmektedir (Cui ve ark., 2012; Eisenhauer, Gerstein, Chiu, Conti, & Hsueh, 1997). Daha önce yapılan çalışmalar, MII duraklamasından çıkışla birlikte MAPK ve MPF ekspresyon seviyelerinin azaldığı (Cui ve ark., 2012), TERT ekspresyonunun arttığı ve daha sonra mayotik bölünmenin devam ettiği gösterilmiştir (Prasad & Chaube, 2017). Bu çalışma ile direkt benzerlik göstermemesine rağmen, bizim çalışmamıza benzer şekilde geç ergin dönemden sonra yaşlı dönemde artan TERT ekspresyonu kısmı bir benzerlik olduğunu göstermektedir.

Domuzda foliküler gelişim sırasında TERT ekspresyon seviyelerinin incelenmesi ve TERT ekspresyonunun telomer uzunluğuna etkisinin analizi amaçlanan bir çalışmada, primer ve preantral foliküllerde hem oositte, hem de granuloza hücrelerinde çekirdek yerleşimli TERT odakları görülmüş (Russo ve ark., 2006). Bizim çalışmamızda TERT odakları hem oosit hem de granuloza hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik yerleşimli görüldü. Bununla birlikte, aynı çalışmada TERT ekspresyonuyla telomer uzunluğu da paralellik gösterdiği ortaya konulmuştur (Russo ve ark., 2006).

*Nothobranchius furzeri* balıklarında yapılan araştırmada yaş arttıkça *Tert* ekspresyonunun ve telomeraz aktivitesinin arttığı gösterilmiş. İlginç olarak, artan telomeraz aktivitesine rağmen azalan telomer uzunluğu ölçülmüştür (Hartmann ve ark., 2009). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde geç ergin dönemden sonra yaşlı dönemde *Tert* gen ekspresyonu hem mRNA hem protein düzeyinde kısmi bir artış gösterdi. Bu durum, telomerazın telomerlerin uzatılmasında etkili olduğu rolüne ek, farklı görevler alabileceğini düşündürmektedir. Bu düşünce ile uyumlu olarak, hTERT ekspresyonu ve telomeraz aktivitesinin insan hücre hattına ait mitokondrilerde olduğu gösterilmiştir (Santos, Meyer, Skorvaga, Annab, & Van Houten, 2004). hTERT'in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaynaklı DNA hasarına yol açıp açmadığını incelemek için mitokondride hTERT bulunan ve bulunmayan hücreler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye (15 ve 60 dk. boyunca) maruz bırakılmış. hTERT bulunan

insan hücre hattı mitokondri DNA'sının, bulunmayan hücelere kıyasla mitokondri DNA hasarının indüklendiği görülmüş ve bu sonuçlar hTERT'in apoptozun düzenlenmesinde rol aldığını düşündürmektedir (Santos ve ark., 2004). Apoptozun sıçan karaciğerinde yaşla birlikte azaldığı belirlenmiştir (Suh, 2002). TERT, anti-apoptotik yolla doku bütünlüğünü korumak için yaşla birlikte artış gösteriyor olabilir. Ayrıca *Tert*'in birçok DNA hasar proteiniyle (Ku, BLM / WRN gibi) ilişkili olduğu da bilinmektedir (de Lange, 2005). Bu nedenle TERT, apoptotik yola girişi baskılayarak doku bütünlüğünü korumak için artış gösteriyor olabilir. Son araştırmalar ise telomerazın DNA hasar tepkilerinde de rol alabileceğini göstermektedir (Masutomi ve ark., 2003). hTERT ekspresyonunun fibroblastlarda S fazında geçici olarak ekspresse edildiğini, fakat telomerlerin uzunluğunu koruyamamasına rağmen kromozom uçlarını kapatarak kararlılığı sağladığı gösterilmiştir (Masutomi ve ark., 2003). Ek olarak, hTERT'in DNA replikasyon proteini olan primaz ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Ray, Karamysheva, Wang, Shippen, & Price, 2002). DNA replikasyonu ile ilgili proteinler genellikle DNA onarımı için gerekli olduğundan, telomerazın DNA onarım fonksiyonlarında olası bir rolünü gösterebilir. Sonuç olarak *Tert*'in ekspresyon seviyelerinin anlamlı olmasa da yaşlı dönemde artışı *Tert*'in apoptoz, DNA hasar tamiri ya da gen ekspresyon düzenlenmesi gibi telomer dışında görevleriyle ilgili olabilir.

Çalışmamızda, telomerazın RNA bileşeni olan *Terc*'in ekspresyon seviyesi, haftalar arasında değerlendirildiğinde 1. haftada en yüksek düzeyde görülmüştür. Ekspresyon seviyesinde dalgalanmalar meydana gelse de, 72. haftaya doğru gidildiğinde ekspresyonunda azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca, gruplar arasında da *Terc* ekspresyonunun yaşla birlikte azaldığını belirledik. Daha önceki çalışmalarda *Terc* eksikliğinin farelerde kıl grileşmesi, kalp ve böbrek fonksiyon bozukluğu, kemik iliği bozukluğu, sinir kök hücrelerinin çoğalmasında bozukluklar, erken yaşlanmayla ilgili olduğu gösterilmiştir (Blasco, 2005; Herrera ve ark., 1999; Yao ve ark., 1979). Bizim bulgularımızda ovaryumda yaşla azalan *Terc* ekspresyonu, infertiliteyle ilişkili olabilir. Ayrıca yaşla birlikte artan ROS seviyeleri telomeraz aktivitesini düşürmektedir (Yamada-Fukunaga ve ark., 2013). *Terc* ekspresyonunun, azalan TERT ile birlikte telomeraz aktivitesinin düşmesine neden olduğunu ve dolayısıyla ovarial yaşlanmada

önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir. Fakat *Terc*'in ovaryal yaşlanma sürecindeki rollerine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

TRF1, telomerin yapısal bütünlüğünün korunmasında görevli olan şeltein kompleksinin esas proteinlerindedir. TRF1, DNA replikasyonu sırasında replikasyon çatallının oluşumunda, bölünme esnasında telomerlerin çekirdek zarına tutunmasında ve telomerlerin füzyondan korunmasında etkilidir (L. Wang ve ark., 2018). TRF1'in ekspresyon seviyesinin korunması, telomerler uzunluğunun korunmasında önemlidir (L. Wang ve ark., 2018). *Trf1* ekspresyonu en düşük 1. haftada, en yüksek 2. haftada belirlenmiş ve 72. haftaya kadar dalgalanmalar göstermiştir. *Trf1* ekspresyonu gruplar arasında incelendiğinde anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. TRF1 protein ekspresyonunda da gruplar arasında mRNA sonucuyla uyumlu olarak farklılık belirlenmedi. Primordial, primer, sekonder, preantral ve antral foliküller de dahil olmak üzere tüm incelenen folikül tiplerinde gruplar arasında farklılık bulunmazken, genel olarak oositte ilginç olarak en yüksek ekspresyon yaşlı dönemde belirlenmiş ve granuloza hücrelerinde ise fark bulunmamıştır. Zebra balığında yapılan çalışmada ise *Trf1* ekspresyon seviyeleri qRT-PCR yöntemi kullanılarak genç ve yetişkin dokularda incelenmiş: beyin, solungaç, bağırsak, kuyruk ve ovaryumda yetişkin dokularda azaldığı; kalp, karaciğer ve kasta ise değişmediği görülmüştür (Wagner ve ark., 2017). Aynı çalışmada farede *Trf1* ekspresyon seviyesi qRT-PCR yöntemi kullanılarak embriyonik dönemde ve postnatal dönemde çeşitli dokularda (beyin, kalp, böbrek ve karaciğer) incelenmiştir (Wagner ve ark., 2017). Karaciğerde ekspresyon seviyesi yaşla birlikte artarken; beyin, kalp ve böbrekte yaşla birlikte ekspresyon farklılığı bulunmamıştır (Wagner ve ark., 2017). Derevyanko ve arkadaşlarının 2017 yılında fare ve insan epidermisinde yapmış olduğu çalışmada *Trf1* ekspresyonunun yaşla birlikte azaldığını bulmuşlardır (Derevyanko ve ark., 2017). Çalışmalarda bazı dokularda bizim sonuçlarımıza benzer olarak *Trf1* ekspresyonunun değişmediği dikkati çekmektedir. *Trf1*'in ekspresyon seviyesinin korunması telomer uzunluğunu korunmasına bağlı olabilir. Ekspresyon seviyesinin bazı dokularda değişiyor olması dokuya özgü farklı rolleri ve farklı mekanizmalar ile ekspresyonel kontrolünün olabileceğini düşündürmektedir.

*Trf2* mRNA ekspresyonu, postnatal fare ovaryum gelişiminin farklı haftalarında dalgalanmalar göstermektedir. Bununla birlikte, en yüksek 6. haftada, en düşük ise 16. haftada belirlenen *Trf2* ekspresyonu, gruplar arası incelendiğinde en düşük geç ergin, en yüksek ergin dönemde görülmüştür. TRF2 immün boyanmaları incelendiğinde ise geç ergin dönemde önceki döneme göre azalma meydana gelse de, yaşlanmayla birlikte ekspresyon seviyelerinde artış görüldü. Antral foliküllerde yaşla birlikte TRF2 artışı bulundu, fakat diğer foliküllerde gruplar arasında farklılık bulunmamıştır. Oositte ise yaşlı dönemde artan TRF2 ekspresyon seviyeleri dikkati çekmektedir. Yine granuloza hücrelerinde dalgalanmalar olsa da yaşla birlikte TRF2 ekspresyonunun arttığı görüldü. Fare beyinde yaşla birlikte TRF2 ekspresyon seviyesinde artış görülürken, kalp, karaciğer ve böbrekte değişim görülmemiştir (Wagner ve ark., 2017). TRF2'nin ekspresyonunun azalması yaşlanmayla, aşırı ekspresyonu ise telomerlerin kısalması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (van Steensel ve ark., 1998). Bu nedenle, telomer uzunluğunun korunmasında TRF2 ekspresyonunun belirli seviyede kalması önemlidir.

Son olarak incelenen *Pot1a* ekspresyon seviyesi, genç dönemden geç ergin döneme doğru kademeli bir şekilde azalmış ve yaşlı dönemde ise artış göstermiştir. POT1 ekspresyon seviyesine total alanda bakıldığında geç ergin dönemde en düşük, yaşlı dönemde ise en yüksek olarak belirlendi. Primordial, primer, sekonder ve antral foliküllerde POT1 ekspresyon farklılığı bulunmazken; preantral foliküllerde geç ergin döneme kadar kademeli bir şekilde azaldığı ve yaşlı dönemde kısmi bir artış dikkati çekmektedir. Bununla birlikte primer ve sekonder foliküllerdeki oositlerde immün boyanmaların arttığı görüldü. *Pot1a* ekspresyon seviyeleri qRT-PCR ile farklı fare dokularında incelenmiş ve beyin, kalp, bağırsak, karaciğer, kuyruk ve ovaryumda yaşla birlikte azaldığı belirlenmiştir (Wagner ve ark., 2017). Daha önce yapılan başka bir çalışmada insanda periferik kanında ve iskelet kasında fizyolojik stresin şeltrin kompleksi üzerine etkileri incelenmiş (Laye ve ark., 2012). İlginç şekilde şeltrin kompleksi proteinlerinden TRF1, TRF2 ve POT1'nin hem mRNA hem de protein seviyelerinin arttığı görülmüştür (Laye ve ark., 2012). Bununla birlikte telomer uzunluğunun değişmediği bulunmuştur (Laye ve ark., 2012). Bu durum, telomerlerin korunmasında şeltrin proteinlerinin ekspresyonlarındaki artışının önemli olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Daha öncede belirtildiği gibi yaşla birlikte oksidatif stres

artmaktadır. Bizim çalışmamıza benzer şekilde yaşlı dönemde artan TRF2 ve POT1 mRNA ve protein seviyeleri gözlemlendi. Daha önce yapılan çalışmalarda telomerlerin yaşlı dönemde kısaldığı bilinmektedir ve bu proteinlerdeki artışı telomerik kısalmanın önlenmesine yönelik olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, verilerimiz üreme biyolojisine yönelik ve ovaryal yaşlanma sırasında telomeraz bileşenleri ve telomer ilişkili proteinlerinin olası rollerinin belirlenmesine ışık tutabilecek ilk çalışmadır. Şeltrin proteinleri ve telomeraz bileşenlerinin ekspresyon seviyeleri ve hücre içi yerleşimleri yaşla değişen telomer ilişkili mekanizmaların anlaşılması için alt yapı oluşturmaktadır. Ovaryal yaşlanma sürecinde, yeni teknolojik gelişmelerin ışığında, telomeraz bileşenleri ve telomer ilişkili proteinlerin ekspresyonel seviyelerinin korunmasına yönelik uygulamaların üremenin ileriki yaşlarda korunmasına katkıları sağlayabilecektir. Yapılacak olan yeni çalışmalarda bu genlerin ekspresyonlarının zamansal ve uzamsal olarak kontrol eden mekanizmaların bulunmasıyla özellikle ovaryal yaşlanma, prematür over yetmezliği, polikistik over sendromu ve infertilite nedenlerinin belirlenmesine olanak sağlanabileceği kanısındayız. Ayrıca, çalışmamız ve bu konudaki farklı çalışma sonuçları *Tert*, *Terc* ve şeltrin proteinlerinin ekspresyon seviye değerlendirilmesinin, yaşlanmanın bir biyobelirteci olarak kullanılabilmesine yönelik önemli veriler ortaya koymaktadır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızda postnatal ovaryum dokularında telomere bağlı proteinler (TRF1, TRF2, POT1) ve telomeraz bileşenlerinin (TERT, *Terc*) mRNA ve protein ekspresyon seviyeleri detaylı bir şekilde incelenerek, genlerin ekspresyon değişimleri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Postnatal ovaryumların hematokilen-eozin (HE) ile boyanması yapılarak genel histolojik yapıları değerlendirildiğinde, farklı gelişim dönemlerinde stromal içerik ile folikül sayı ve çeşitliliğinde farklılıklar olduğu belirlenmiştir.
2. *Tert* ekspresyonu 2. haftadan 18. haftaya kadar kademeli bir şekilde azaldığı; 52., 60. ve 72. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Gruplar arasında ise erken dönemden, geç ergin döneme doğru ekspresyon seviyesi anlamlı bir şekilde azalırken, yaşlı dönemde kısmi bir artış gözlenmiştir.
3. TERT proteini tüm gruplarda ekspresyona edilmektedir. Ekspresyon dağılımı kortekste farklı gelişim evlerindeki foliküllerin hem oosit hem de granuloza hücrelerinde ve stromal alandaki belirli hücrelerde sitoplazmik ve nükleer reaksiyon tespit edilmiştir. Foliküllere genel olarak bakıldığında oositlerdeki ekspresyon yoğunluğunun; granuloza hücrelerine göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. TERT proteininin, ovaryum hücrelerindeki fonksiyonel önemi ile sitoplazmik ve nükleer olası diğer görevlerinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
4. Total ovaryum analizinde, erken dönemden yaşlı döneme doğru gidildiğinde TERT ekspresyon seviyesi kademeli bir şekilde azalmaktadır. Primordial foliküllerde erken dönemden yaşlı döneme kadar tüm gruplarda oosit ve folikül hücrelerinde TERT ekspresyonu değişimler gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Primer foliküllerde gruplar arasında belirgin farklılıklar görülmezken, oositte anlamlı olarak en yüksek ekspresyon erken dönemde görülmüştür. Sekonder foliküllerde ergin dönemden yaşlı döneme doğru gidildiğinde ise anlamlı olmasa da bir artış belirlenmiştir. Erken dönem fare ovaryumlarının preantral folikülleri, ergin, geç ergin ve yaşlı dönemlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek miktarda TERT ekspresyona etmiştir. Antral

foliküllerde ise ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır.

5. *Terc* ekspresyonu en yüksek 1. haftada görülmüştür. Dalgalanmalar meydana gelse de yaşla birlikte azaldığı dikkati çekmektedir. Gruplar arasında ise en yüksek *Terc* ekspresyonunun erken dönemde olduğu ve yaşlı döneme kadar gittikçe azaldığı belirlenmiştir.
6. *Trf1* ekspresyon seviyesinin farklı postnatal yaş grupları arasında dalgalanmalar göstermiş ve gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.
7. TRF1 ekspresyonu tüm gruplarda ekspresse edildiği tespit edildi. Farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin hem oosit hem de granuloza hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde yerleşim göstermiştir. Ayrıca, TRF1 proteininin sitoplazma ve çekirdekte etkileşimde olduğu proteinlerin belirlenmesinin, TRF1'in telomerik ve telomer dışındaki fonksiyonlarının belirlenmesine katkılar sağlayabileceği kanısındayız.
8. Total ovaryum değerlendirmelerinde, TRF1 immün boyanmaları için istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmadı. Foliküllerde gruplar arasında kısmi farklılıklar olsa da anlamlılık görülmemiştir. Bununla birlikte primordial ve sekonder foliküllerde yaşlı dönem oosit boyanmalarının, ergin döneme göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksektir.
9. *Trf2* ekspresyonu yaşlanmaya bağlı olarak dalgalanma göstermiştir. Gruplar arasında genç dönemden geç ergin döneme doğru kademeli bir şekilde ve anlamlı olarak düştüğü görülmüştür.
10. TRF2 ekspresyon dağılımı, farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin oosit ve granuloza hücrelerinde ve stromal alanlarda görülmüştür. TRF2, oosit ile granuloza hücrelerinde hem sitoplazma hem de çekirdekte yerleşim göstermiştir. TRF2 ekspresyonunun ovaryumun farklı bölgelerdeki dağılımlarıyla ilgili farklı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmaların yapılması, TRF2'nin olası fonksiyonlarının ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasına katkılar sağlayabilecektir.
11. Total ovaryumda erken dönemdeki TRF2 ekspresyonu, yaşlı ve ergin döneme göre istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur. Primordial, primer, sekonder ve



preantral foliküllerde gruplar arasında farklılık bulunmazken; yaşlı dönem antral foliküllerde, geç ergin döneme kıyasla istatistiksel anlamlı olarak artan boyanmalar belirlenmiştir.

- 12.** *Pot1a* ekspresyonu, 1. haftadan 3. haftaya doğru kademeli olarak yükselmiştir. Üçüncü haftadan 5. haftaya doğru ise *Pot1a* transkript düzeyi kademeli olarak azalmıştır. Altıncı haftada belirgin düzeye yükselen *Pot1a*, 16. haftada oldukça düşmüştü ve 52. haftaya doğru ise kademeli bir şekilde yükselmiştir. Gruplar arasında erken dönemde düşük düzeyde olan *Pot1a* mRNA düzeyi, genç dönemde biraz yükselmiş ve geç ergin döneme doğru ise kademeli olarak azalmıştır. Geç ergin dönemde azalmış olan *Pot1a* düzeyi yaşlı dönemde yükselmiştir.
- 13.** POT1 ekspresyon dağılımı, foliküllerde ve stromal alanlarda gözlenmiştir. Oositte ve granuloza hücreleri ile stromal hücrelerde sitoplazmada ve çekirdekte yerleşik olduğu görülmüştür. POT1'in ovaryumda ekspresyon dağılımlarına yönelik, fonksiyonel çalışmalar bulunmamaktadır. Sitoplazmik ve çekirdek ekspresyon seviyelerinin dağılım oranı ve bu proteinin telomer dışındaki olası fonksiyonlarının araştırılmasına yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.
- 14.** Total ovaryum analizinde yaşlı dönemde, geç ergin döneme göre anlamlı düzeyde daha yüksek POT1 ekspresyonuna sahip olduğu tespit edildi. Primordial foliküllerde POT1 ekspresyonu değişim gösterse de istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır. Primer ve sekonder foliküllerde gruplar arasında farklılık bulunmazken; yaşlı dönemdeki oositte POT1 ekspresyonu diğer dönemlerdeki oositlere göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Preantral foliküllerde erken dönemden geç ergin döneme doğru kademeli olarak azalan preantral foliküllerdeki POT1 protein seviyesi, yaşlı dönemde istatistiksel anlamlı düzeyde artmıştır. Antral foliküllerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir farklılık bulunmadı.

## KAYNAKLAR

Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Giraud-Panis, M. J. (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol*, 14(2), 147-154. doi: 10.1038/nsmb1192

Arraztoa, J. A., Zhou, J., Marcu, D., Cheng, C., Bonner, R., Chen, M., Bondy, C. (2005). Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. *Hum Reprod*, 20(2), 476-483. doi: 10.1093/humrep/deh498

Autexier, C., & Lue, N. F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annu Rev Biochem*, 75, 493-517. doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412

Baumann, P., & Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science*, 292(5519), 1171-1175. doi: 10.1126/science.1060036

Bayne, S., Li, H., Jones, M. E., Pinto, A. R., van Sinderen, M., Drummond, A., Liu, J. P. (2011). Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Protein Cell*, 2(4), 333-346. doi: 10.1007/s13238-011-1033-2

Bayne, S., & Liu, J. P. (2005). Hormones and growth factors regulate telomerase activity in ageing and cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 240(1-2), 11-22. doi: 10.1016/j.mce.2005.05.009

Bekaert, S., Derradji, H., & Baatout, S. (2004). Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Dev Biol*, 274(1), 15-30. doi: 10.1016/j.ydbio.2004.06.023S0012-1606(04)00440-3 [pii]

Ben-Or, S. (1963). Morphological and functional development of the ovary of the mouse. I. Morphology and histochemistry of the developing ovary in normal conditions and after FSH treatment. *J Embryol Exp Morphol*, 11, 1-11.

Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet*, 6(8), 611-622. doi: 10.1038/nrg1656

Blasco, M. A. (2007a). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet*, 8(4), 299-309. doi: 10.1038/nrg2047

Blasco, M. A. (2007b). Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol*, 3(10), 640-649. doi: 10.1038/nchembio.2007.38

Blasco, M. A., Funk, W., Villeponteau, B., & Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science*, 269(5228), 1267-1270.

Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., & Greider, C. W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell*, 91(1), 25-34.

Britt, K. L., Kerr, J., O'Donnell, L., Jones, M. E., Drummond, A. E., Davis, S. R., Findlay, J. K. (2002). Estrogen regulates development of the somatic cell phenotype in the eutherian ovary. *FASEB J*, 16(11), 1389-1397. doi: 10.1096/fj.01-0992com

Broekmans, F. J., Soules, M. R., & Fauser, B. C. (2009). Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. [Review]. *Endocr Rev*, 30(5), 465-493. doi: 10.1210/er.2009-0006

Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., & Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*, 14(17), 4240-4248.

Calado, R. T., & Young, N. S. (2008). Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*, 111(9), 4446-4455.

Calado, R. T., & Young, N. S. (2008). Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*, 111(9), 4446-4455. doi: 10.1182/blood-2007-08-019729

Chen, J. L., Blasco, M. A., & Greider, C. W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell*, 100(5), 503-514.

Chen, L. Y., Zhang, Y., Zhang, Q., Li, H., Luo, Z., Fang, H., Songyang, Z. (2012). Mitochondrial localization of telomeric protein TIN2 links telomere regulation to metabolic control. *Mol Cell*, 47(6), 839-850. doi: 10.1016/j.molcel.2012.07.002

Cheng, Q., & Chen, J. (2010). Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage. *Cell Cycle*, 9(3), 472-478. doi: 10.4161/cc.9.3.10556

Chiang, Y. J., Kim, S. H., Tessarollo, L., Campisi, J., & Hodes, R. J. (2004). Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Mol Cell Biol*, 24(15), 6631-6634. doi: 10.1128/MCB.24.15.6631-6634.2004

Cui, W., Zhang, J., Lian, H. Y., Wang, H. L., Miao, D. Q., Zhang, C. X., Tan, J. H. (2012). Roles of MAPK and spindle assembly checkpoint in spontaneous activation and MII arrest of rat oocytes. *PLoS One*, 7(2), e32044. doi: 10.1371/journal.pone.0032044

Danilovich, N., & Ram Sairam, M. (2006). Recent female mouse models displaying advanced reproductive aging. *Exp Gerontol*, 41(2), 117-122. doi: S0531-5565(05)00258-5 [pii]10.1016/j.exger.2005.10.010

De Boeck, G., Forsyth, R. G., Praet, M., & Hogendoorn, P. C. (2009). Telomere-associated proteins: cross-talk between telomere maintenance and telomere-lengthening mechanisms. *J Pathol*, 217(3), 327-344. doi: 10.1002/path.2500

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19(18), 2100-2110. doi: 10.1101/gad.1346005

de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., & Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*, 10(2), 518-527.

Denchi, E. L., & de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, 448(7157), 1068-1071. doi: 10.1038/nature06065

Derevyanko, A., Whittemore, K., Schneider, R. P., Jimenez, V., Bosch, F., & Blasco, M. A. (2017). Gene therapy with the TRF1 telomere gene rescues decreased TRF1 levels with aging and prolongs mouse health span. *Aging Cell*, 16(6), 1353-1368. doi: 10.1111/acel.12677

Dolnik, A. V., Kuznetsova, I. S., Voronin, A. P., & Podgornaya, O. I. (2003). Telomere-binding TRF2/MTBP localization during mouse spermatogenesis and cell cycle of the mouse cells L929. *J Anti Aging Med*, 6(2), 107-121. doi: 10.1089/109454503769684784

Dorland, M., van Kooij, R. J., & te Velde, E. R. (1998). General ageing and ovarian ageing. *Maturitas*, 30(2), 113-118.

Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., Lomonte, P., & Londono-Vallejo, A. (2009). Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(37), 15726-15731. doi: 10.1073/pnas.0907689106

Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., & Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet*, *26*(4), 447-450. doi: 10.1038/82586

Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, *140*(12), 5789-5796. doi: 10.1210/endo.140.12.7204

Eisenhauer, K. M., Gerstein, R. M., Chiu, C. P., Conti, M., & Hsueh, A. J. (1997). Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod*, *56*(5), 1120-1125.

Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, *78*(3-4), 203-216.

Foddìs, R., De Rienzo, A., Broccoli, D., Bocchetta, M., Stekala, E., Rizzo, P., Pass, H. I. (2002). SV40 infection induces telomerase activity in human mesothelial cells. *Oncogene*, *21*(9), 1434.

Forsyth, N. R., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*, *69*(4-5), 188-197. doi: 10.1046/j.1432-0436.2002.690412.x

Frescas, D., & de Lange, T. (2014). A TIN2 dyskeratosis congenita mutation causes telomerase-independent telomere shortening in mice. *Genes Dev*, *28*(2), 153-166. doi: 10.1101/gad.233395.113

Gilchrist, G. C., Kurjanowicz, P., Mereilles, F. V., King, W. A., & LaMarre, J. (2015). Telomere length and telomerase activity in bovine pre-implantation embryos in vitro. *Reprod Domest Anim*, *50*(1), 58-67. doi: 10.1111/rda.12449

Gillis, A. J., Schuller, A. P., & Skordalakes, E. (2008). Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature*, *455*(7213), 633-637. doi: 10.1038/nature07283

Goto, H., Iwata, H., Takeo, S., Nisinonso, K., Murakami, S., Monji, Y., & Kuwayama, T. (2011). Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote, Epub ahead of print*. doi: S0967199411000499 [pii]10.1017/S0967199411000499

Grandin, N., Damon, C., & Charbonneau, M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *EMBO J*, 20(5), 1173-1183. doi: 10.1093/emboj/20.5.1173

Grandin, N., Reed, S. I., & Charbonneau, M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes Dev*, 11(4), 512-527.

Green, P. D., Sharma, N. K., & Santos, J. H. (2019). Telomerase Impinges on the Cellular Response to Oxidative Stress Through Mitochondrial ROS-Mediated Regulation of Autophagy. *Int J Mol Sci*, 20(6). doi: 10.3390/ijms20061509

Greenblatt, R. B., Oettinger, M., & Bohler, C. S. (1976). Estrogen-androgen levels in aging men and women: therapeutic considerations. *J Am Geriatr Soc*, 24(4), 173-178.

Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *cell*, 43(2), 405-413.

Greider, C. W., & Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), 331-337. doi: 10.1038/337331a0

Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503-514.

Gu, P., Min, J. N., Wang, Y., Huang, C., Peng, T., Chai, W., & Chang, S. (2012). CTC1 deletion results in defective telomere replication, leading to catastrophic telomere loss and stem cell exhaustion. *EMBO J*, 31(10), 2309-2321. doi: 10.1038/emboj.2012.96

Haendeler, J., Hoffmann, J. r., Diehl, J. F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circulation research*, 94(6), 768-775.

Hartmann, N., Reichwald, K., Lechel, A., Graf, M., Kirschner, J., Dorn, A., Englert, C. (2009). Telomeres shorten while Tert expression increases during ageing of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Mech Ageing Dev*, 130(5), 290-296. doi: 10.1016/j.mad.2009.01.003

He, H., Wang, Y., Guo, X., Ramchandani, S., Ma, J., Shen, M. F., Chang, S. (2009). Pot1b deletion and telomerase haploinsufficiency in mice initiate an ATR-dependent DNA damage response and elicit phenotypes resembling dyskeratosis congenita. *Mol Cell Biol*, 29(1), 229-240. doi: 10.1128/MCB.01400-08

Henle, E. S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., & Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated fenton reactions has possible biological implications. [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *J Biol Chem*, 274(2), 962-971.

Henson, J. D., Cao, Y., Huschtscha, L. I., Chang, A. C., Au, A. Y., Pickett, H. A., & Reddel, R. R. (2009). DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol*, 27(12), 1181-1185. doi: 10.1038/nbt.1587

Henson, J. D., & Reddel, R. R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett*, 584(17), 3800-3811. doi: 10.1016/j.febslet.2010.06.009

Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Lee, H. W., & Blasco, M. A. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres. *EMBO J*, 18(11), 2950-2960. doi: 10.1093/emboj/18.11.2950

Hockemeyer, D., Daniels, J. P., Takai, H., & de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell*, 126(1), 63-77. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.044

Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kumar, R. (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Science*, 339(6122), 959-961. doi: 10.1126/science.1230062

Hsu, M., Yu, E. Y., Singh, S. M., & Lue, N. F. (2007). Mutual dependence of *Candida albicans* Est1p and Est3p in telomerase assembly and activation. *Eukaryot Cell*, 6(8), 1330-1338. doi: 10.1128/EC.00069-07

Huang, D. S., Wang, Z., He, X. J., Diplas, B. H., Yang, R., Killela, P. J., Tao, H. Q. (2015). Recurrent TERT promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumour types are associated with increased TERT expression and telomerase activation. [Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Eur J Cancer*, 51(8), 969-976. doi: 10.1016/j.ejca.2015.03.010

Jacobs, S. A., Podell, E. R., & Cech, T. R. (2006). Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol*, 13(3), 218-225. doi: 10.1038/nsmb1054

Jiang, H. L., Cao, L. Q., & Chen, H. Y. (2018). Protective effects ROS up-regulation on premature ovarian failure by suppressing ROS-TERT signal pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22(19), 6198-6204. doi: 10.26355/eurrev\_201810\_16025

Jiang, W., Zhong, Z., Henson, J., & Reddel, R. (2007). Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene*, 26(32), 4635.

Johnson, M. H. (2018). *Essential reproduction*: John Wiley & Sons.

Jose, S. S., Tidu, F., Burilova, P., Kepak, T., Bendickova, K., & Fric, J. (2018). The Telomerase Complex Directly Controls Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Senescence in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Telomeropathy. *Front Genet*, 9, 345. doi: 10.3389/fgene.2018.00345

Kalmbach, K. H., Fontes Antunes, D. M., Dracxler, R. C., Knier, T. W., Seth-Smith, M. L., Wang, F., Keefe, D. L. (2013). Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril*, 99(1), 23-29. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.039

Kang, S. S., Kwon, T., & Do, S. I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13085-13090.

Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., & de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol*, 23(18), 6533-6541.

Keefe, D. L. (2007). Telomeres and meiosis in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 64(2), 115-116. doi: 10.1007/s00018-006-6462-3



Keefe, D. L., & Liu, L. (2009). Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev*, 21(1), 10-14.

Keefe, D. L., Marquard, K., & Liu, L. (2006). The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 18(3), 280-285. doi: 10.1097/01.gco.0000193019.05686.49

Kharbanda, S., Kumar, V., Dhar, S., Pandey, P., Chen, C., Majumder, P., Pandita, T. K. (2000). Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Current Biology*, 10(10), 568-575.

Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 266(5193), 2011-2015.

Kinugawa, C., Murakami, T., Okamura, K., & Yajima, A. (2000). Telomerase activity in normal ovaries and premature ovarian failure. *Tohoku J Exp Med*, 190(3), 231-238.

Ko, E., Seo, H. W., & Jung, G. (2018). Telomere length and reactive oxygen species levels are positively associated with a high risk of mortality and recurrence in hepatocellular carcinoma. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Hepatology*, 67(4), 1378-1391. doi: 10.1002/hep.29604

Kong, X., Cruz, G. M. S., Trinh, S. L., Zhu, X. D., Berns, M. W., & Yokomori, K. (2018). Biphasic recruitment of TRF2 to DNA damage sites promotes non-sister chromatid homologous recombination repair. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.219311

Kosebent, E. G., Uysal, F., & Ozturk, S. (2018). Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *J Reprod Dev*. doi: 10.1262/jrd.2018-076

Krutilina, R. I., Oei, S., Buchlow, G., Yau, P. M., Zalensky, A. O., Zalenskaya, I. A., Tomilin, N. V. (2001). A negative regulator of telomere-length protein trf1 is associated with interstitial (TTAGGG)<sub>n</sub> blocks in immortal Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(2), 471-475. doi: 10.1006/bbrc.2000.4143

Lai, C. K., Miller, M. C., & Collins, K. (2003). Roles for RNA in telomerase nucleotide and repeat addition processivity. *Mol Cell*, 11(6), 1673-1683.

Lavranos, T. C., Mathis, J. M., Latham, S. E., Kalionis, B., Shay, J. W., & Rodgers, R. J. (1999). Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biol Reprod*, *61*(2), 358-366.

Laye, M. J., Solomon, T. P., Karstoft, K., Pedersen, K. K., Nielsen, S. D., & Pedersen, B. K. (2012). Increased shelterin mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells and skeletal muscle following an ultra-long-distance running event. *J Appl Physiol* (1985), *112*(5), 773-781. doi: 10.1152/jappphysiol.00997.2011

Lee, K. H., Rudolph, K. L., Ju, Y. J., Greenberg, R. A., Cannizzaro, L., Chin, L., DePinho, R. A. (2001). Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(6), 3381-3386. doi: 10.1073/pnas.051629198

Lei, M., Podell, E. R., & Cech, T. R. (2004). Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol*, *11*(12), 1223-1229. doi: 10.1038/nsmb867

Li, H., Cao, Y., Berndt, M. C., Funder, J. W., & Liu, J.-P. (1999). Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*, *18*(48), 6785.

Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J. W., & Liu, J.-P. (1998). Telomerase is controlled by protein kinase C $\alpha$  in human breast cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(50), 33436-33442.

Lim, J., & Luderer, U. (2011). Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod*, *84*(4), 775-782. doi: biolreprod.110.088583 [pii] 10.1095/biolreprod.110.088583

Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., & Cech, T. R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, *276*(5312), 561-567.

Liu, K., Hodes, R. J., & Weng, N. (2001). Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. *J Immunol*, *166*(8), 4826-4830.

Liu, L., Bailey, S. M., Okuka, M., Munoz, P., Li, C., Zhou, L., Keefe, D. L. (2007). Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol*, 9(12), 1436-1441. doi: ncb1664 [pii] 10.1038/ncb1664

Liu, L., Ishihara, K., Ichimura, T., Fujita, N., Hino, S., Tomita, S., Nakao, M. (2009). MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity. *J Biol Chem*, 284(8), 5165-5174. doi: 10.1074/jbc.M807098200

Londono-Vallejo, J. A., Der-Sarkissian, H., Cazes, L., Bacchetti, S., & Reddel, R. R. (2004). Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*, 64(7), 2324-2327.

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039

Mandal, M., & Kumar, R. (1997). Bcl-2 modulates telomerase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14183-14187.

Martinez, P., Thanasoula, M., Carlos, A. R., Gomez-Lopez, G., Tejera, A. M., Schoeftner, S., Blasco, M. A. (2010). Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat Cell Biol*, 12(8), 768-780. doi: 10.1038/ncb2081

Martinez, P., Thanasoula, M., Munoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNeese, C., Blasco, M. A. (2009). Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev*, 23(17), 2060-2075. doi: 10.1101/gad.543509

Massin, N., Gougeon, A., Meduri, G., Thibaud, E., Laborde, K., Matuchansky, C., Touraine, P. (2004). Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Hum Reprod*, 19(11), 2555-2560. doi: 10.1093/humrep/deh461

Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., . . . Hahn, W. C. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell*, 114(2), 241-253.

McClintock, B., & Hill, H. E. (1931). The Cytological Identification of the Chromosome Associated with the R-G Linkage Group in ZEA MAYS. *Genetics*, 16(2), 175-190.

McGee, E. A., & Hsueh, A. J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 21(2), 200-214. doi: 10.1210/edrv.21.2.0394

Meerdo, L. N., Reed, W. A., & White, K. L. (2005). Telomere-to-centromere ratio of bovine clones, embryos, gametes, fetal cells, and adult cells. *Cloning Stem Cells*, 7(1), 62-73. doi: 10.1089/clo.2005.7.62

Meng, L., Hsu, J. K., Zhu, Q., Lin, T., & Tsai, R. Y. (2011). Nucleostemin inhibits TRF1 dimerization and shortens its dynamic association with the telomere. *J Cell Sci*, 124(Pt 21), 3706-3714. doi: 10.1242/jcs.089672

Misiti, S., Nanni, S., Fontemaggi, G., Cong, Y. S., Wen, J., Hirte, H. W., Farsetti, A. (2000). Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol*, 20(11), 3764-3771.

Mitchell, M., Gillis, A., Futahashi, M., Fujiwara, H., & Skordalakes, E. (2010). Structural basis for telomerase catalytic subunit TERT binding to RNA template and telomeric DNA. *Nat Struct Mol Biol*, 17(4), 513-518. doi: 10.1038/nsmb.1777

Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Ishikawa, F. (2009). RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol Cell*, 36(2), 193-206. doi: 10.1016/j.molcel.2009.08.009

Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2011). *The Developing Human E-Book: Clinically Oriented Embryology With STUDENT CONSULT Online Access*: Elsevier Health Sciences.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., & Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev*, 8(19), 2257-2269.

Motta, P. M., Nottola, S. A., & Makabe, S. (1997). Natural history of the female germ cell from its origin to full maturation through prenatal ovarian development. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 75(1), 5-10.

Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(18), 6622-6626.

Murnane, J. P., Sabatier, L., Marder, B. A., & Morgan, W. F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J*, *13*(20), 4953-4962.

Nakamura, M., Zhou, X. Z., Kishi, S., & Lu, K. P. (2002). Involvement of the telomeric protein Pin2/TRF1 in the regulation of the mitotic spindle. *FEBS Lett*, *514*(2-3), 193-198.

Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, *277*(5328), 955-959.

Neumann, A. A., & Reddel, R. R. (2002). Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase. *Nat Rev Cancer*, *2*(11), 879-884. doi: 10.1038/nrc929

O'Sullivan, R. J., & Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *11*(3), 171-181. doi: 10.1038/nrm2848

Oeseburg, H., de Boer, R. A., van Gilst, W. H., & van der Harst, P. (2010). Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch*, *459*(2), 259-268. doi: 10.1007/s00424-009-0728-1

Oktem, O., & Oktay, K. (2008). The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*, *1127*, 1-9. doi: 10.1196/annals.1434.009

Oktem, O., & Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod*, *25*(12), 2944-2954. doi: 10.1093/humrep/deq275

Osterhage, J. L., Talley, J. M., & Friedman, K. L. (2006). Proteasome-dependent degradation of Est1p regulates the cell cycle-restricted assembly of telomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Struct Mol Biol*, *13*(8), 720-728. doi: 10.1038/nsmb1125

Ozturk, S., Sozen, B., & Demir, N. (2013). Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod*. doi: gat055 [pii] 10.1093/molehr/gat055

Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta Endocrinol (Copenh)*, *62*(1), 98-116.

Prasad, S., & Chaube, S. K. (2017). Increased Telomerase Reverse Transcriptase Expression Associates with Spontaneous Exit from M-II Arrest in Rat Eggs. *Cell Reprogram*, 19(1), 27-34. doi: 10.1089/cell.2016.0036

Price, C. M., Boltz, K. A., Chaiken, M. F., Stewart, J. A., Beilstein, M. A., & Shippen, D. E. (2010). Evolution of CST function in telomere maintenance. *Cell Cycle*, 9(16), 3157-3165. doi: 10.4161/cc.9.16.12547

Rachakonda, P. S., Hosen, I., de Verdier, P. J., Fallah, M., Heidenreich, B., Ryk, C., Kumar, R. (2013). TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(43), 17426-17431. doi: 10.1073/pnas.1310522110

Ray, S., Karamysheva, Z., Wang, L., Shippen, D. E., & Price, C. M. (2002). Interactions between telomerase and primase physically link the telomere and chromosome replication machinery. *Mol Cell Biol*, 22(16), 5859-5868.

Rice, C., & Skordalakes, E. (2016). Structure and function of the telomeric CST complex. *Comput Struct Biotechnol J*, 14, 161-167. doi: 10.1016/j.csbj.2016.04.002

Richards, J. S., & Pangas, S. A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*, 120(4), 963-972. doi: 10.1172/JCI41350

Rochette, P. J., & Brash, D. E. (2010). Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. [Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *PLoS Genet*, 6(4), e1000926. doi: 10.1371/journal.pgen.1000926

Roig, I., Liebe, B., Egozcue, J., Cabero, L., Garcia, M., & Scherthan, H. (2004). Female-specific features of recombinational double-stranded DNA repair in relation to synapsis and telomere dynamics in human oocytes. *Chromosoma*, 113(1), 22-33. doi: 10.1007/s00412-004-0290-8

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins.

Russo, V., Berardinelli, P., Martelli, A., Di Giacinto, O., Nardinocchi, D., Fantasia, D., & Barboni, B. (2006). Expression of telomerase reverse transcriptase subunit (TERT) and telomere sizing in pig ovarian follicles. *J Histochem Cytochem*, *54*(4), 443-455. doi: 10.1369/jhc.4A6603.2006

Santos, J. H., Meyer, J. N., Skorvaga, M., Annab, L. A., & Van Houten, B. (2004). Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell*, *3*(6), 399-411. doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00124.x

Schildhorn, C., Jacobi, C., Weissbrodt, A., Hermstedt, C., Westhoff, J. H., Homme, M., Melk, A. (2015). Renal phenotype of young and old telomerase-deficient mice. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Mech Ageing Dev*, *150*, 65-73. doi: 10.1016/j.mad.2015.08.004

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S. T., Hockemeyer, D., MacRae, S. L., Karlseder, J., Schildkraut, C. L., & de Lange, T. (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell*, *138*(1), 90-103. doi: 10.1016/j.cell.2009.06.021

Si, X., Shao, C., Li, J., Jia, S., Tang, W., Zhang, J., Luo, Y. (2018). Loss of p21 promoted tumorigenesis in the background of telomere dysfunctions induced by TRF2 and Wrn deficiency. *Int J Biol Sci*, *14*(2), 165-177. doi: 10.7150/ijbs.23477

Singer, M. S., & Gottschling, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science*, *266*(5184), 404-409.

Sitte, N., Saretzki, G., & von Zglinicki, T. (1998). Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Free Radic Biol Med*, *24*(6), 885-893.

Son, N. H., Murray, S., Yanovski, J., Hodes, R. J., & Weng, N. (2000). Lineage-specific telomere shortening and unaltered capacity for telomerase expression in human T and B lymphocytes with age. *J Immunol*, *165*(3), 1191-1196.

Stewart, J. A., Chaiken, M. F., Wang, F., & Price, C. M. (2012). Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res*, *730*(1-2), 12-19. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.08.011

Suh, Y. (2002). Cell signaling in aging and apoptosis. *Mech Ageing Dev*, *123*(8), 881-890.

Surovtseva, Y. V., Churikov, D., Boltz, K. A., Song, X., Lamb, J. C., Warrington, R., Shippen, D. E. (2009). Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. *Mol Cell*, *36*(2), 207-218. doi: 10.1016/j.molcel.2009.09.017

Tejera, A. M., Stagno d'Alcontres, M., Thanasoula, M., Marion, R. M., Martinez, P., Liao, C., Blasco, M. A. (2010). TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. *Dev Cell*, *18*(5), 775-789. doi: 10.1016/j.devcel.2010.03.011

Theimer, C. A., & Feigon, J. (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol*, *16*(3), 307-318. doi: 10.1016/j.sbi.2006.05.005

Tomanek, M., Chronowska, E., Kott, T., & Czernekova, V. (2008). Telomerase activity in pig granulosa cells proliferating and differentiating in vitro. *Anim Reprod Sci*, *104*(2-4), 284-298. doi: S0378-4320(07)00064-4 [pii]

10.1016/j.anireprosci.2007.02.003

Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Flores, J. M. (2008). Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell*, *135*(4), 609-622.

Turner, S., & Hartshorne, G. M. (2013). Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod*, *19*(8), 510-518. doi: 10.1093/molehr/gat021

Turner, S., Wong, H. P., Rai, J., & Hartshorne, G. M. (2010). Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod*, *16*(9), 685-694. doi: 10.1093/molehr/gaq048

van Steensel, B., & de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, *385*(6618), 740-743. doi: 10.1038/385740a0

van Steensel, B., Smogorzewska, A., & de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, *92*(3), 401-413.

Vanderhyden, B. (2002). Molecular basis of ovarian development and function. *Front Biosci*, *7*, d2006-2022.



Wagner, K. D., Ying, Y., Leong, W., Jiang, J., Hu, X., Chen, Y., Ye, J. (2017). The differential spatiotemporal expression pattern of shelterin genes throughout lifespan. *Aging (Albany NY)*, 9(4), 1219-1232. doi: 10.18632/aging.101223

Wang, F., Podell, E. R., Zaug, A. J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T. R., & Lei, M. (2007). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, 445(7127), 506-510. doi: 10.1038/nature05454

Wang, K., Liu, T., Liu, L., Liu, J., Liu, C., Wang, C., Xu, D. (2014). TERT promoter mutations in renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Oncotarget*, 5(7), 1829-1836. doi: 10.18632/oncotarget.1829

Wang, L., Tu, Z., Liu, C., Liu, H., Kaldis, P., Chen, Z., & Li, W. (2018). Dual roles of TRF1 in tethering telomeres to the nuclear envelope and protecting them from fusion during meiosis. *Cell Death Differ*, 25(6), 1174-1188. doi: 10.1038/s41418-017-0037-8

Webb, C. J., & Zakian, V. A. (2008). Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA. *Nat Struct Mol Biol*, 15(1), 34-42. doi: 10.1038/nsmb1354

Webster, A., & Schuh, M. (2017). Mechanisms of Aneuploidy in Human Eggs. *Trends Cell Biol*, 27(1), 55-68. doi: 10.1016/j.tcb.2016.09.002

Wellinger, R. J., & Sen, D. (1997). The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes. *Eur J Cancer*, 33(5), 735-749. doi: S0959-8049(97)00067-1 [pii] 10.1016/S0959-8049(97)00067-1

Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Dev Genet*, 18(2), 173-179. doi: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3

Wu, G., Jiang, X., Lee, W. H., & Chen, P. L. (2003). Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res*, 63(10), 2589-2595.

Wu, K.-J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., & Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature genetics*, 21(2), 220.

Wyatt, H. D., Lobb, D. A., & Beattie, T. L. (2007). Characterization of physical and functional anchor site interactions in human telomerase. *Mol Cell Biol*, 27(8), 3226-3240. doi: 10.1128/MCB.02368-06

Wyatt, H. D., Tsang, A. R., Lobb, D. A., & Beattie, T. L. (2009). Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) Q169 is essential for telomerase function in vitro and in vivo. *PLoS One*, 4(9), e7176. doi: 10.1371/journal.pone.0007176

Wyatt, H. D., West, S. C., & Beattie, T. L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. [Research Support, Non-U.S. Gov't

Review]. *Nucleic Acids Res*, 38(17), 5609-5622. doi: 10.1093/nar/gkq370

Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, 445(7127), 559-562. doi: 10.1038/nature05469

Xu, D., Wang, Q., Gruber, A., Björkholm, M., Chen, Z., Zaid, A., Pisa, P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene*, 19(45), 5123.

Yamada-Fukunaga, T., Yamada, M., Hamatani, T., Chikazawa, N., Ogawa, S., Akutsu, H., Yoshimura, Y. (2013). Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*, 11, 108. doi: 10.1186/1477-7827-11-108

Yamada, O., & Kawauchi, K. (2013). The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies. *JAKSTAT*, 2(4), e25256. doi: 10.4161/jkst.25256

Yao, M. C., Blackburn, E., & Gall, J. G. (1979). Amplification of the rRNA genes in *Tetrahymena*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 43 Pt 2, 1293-1296.

Ye, J. Z., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., de Lange, T. (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem*, 279(45), 47264-47271. doi: 10.1074/jbc.M409047200

Yeager, T. R., Neumann, A. A., Englezou, A., Huschtscha, L. I., Noble, J. R., & Reddel, R. R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*, 59(17), 4175-4179.

Yesilaltay, A., Dokshin, G. A., Busso, D., Wang, L., Galiani, D., Chavarria, T., Krieger, M. (2014). Excess cholesterol induces mouse egg activation and may cause female infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(46), E4972-4980. doi: 10.1073/pnas.1418954111

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	<b>Esra Gözde</b>	<b>Uyruğu</b>	<b>Türkiye Cumhuriyeti</b>
<b>Soyadı</b>	<b>Köşebent</b>	<b>Tel no</b>	<b>05524470725</b>
<b>Doğum tarihi</b>	<b>18.05.1992</b>	<b>e-posta</b>	<b>gozde.ksbnt@gmail.com</b>

### Eğitim Bilgileri

<b>Mezun olduğu kurum</b>		<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	Erzurum Anadolu Lisesi	2010
<b>Lisans</b>	Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2015
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı	2019

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
<b>İngilizce</b>	<b>YÖKDİL</b>	<b>73,74</b>

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Fare oosit ve erken dönem preimplantasyon embriyolarında ePABP ilişkili mRNA'ların belirlenmesi	TÜBİTAK	2015-2018
DNA metiltransferaz genlerinin postnatal fare ovaryum dokularındaki ekspresyonlarının belirlenmesi	BAP	2017-2019
Gelişimin farklı yaşlarındaki insan ve fare ovaryum dokularında ve izole edilen foliküllerde telomeraz ekspresyonu ve telomer uzunluğunun belirlenmesi	TÜBİTAK-1001	2017-Devam Ediyor
Embriyonik poli(A)-bağlanma proteini tarafından kontrol edilen proteinlerin belirlenmesi	TÜBA	2017-Devam Ediyor

## **Yayınlar ve Bildiriler:**

### **Yayınlar:**

1. Kosebent E.G., Uysal F., Öztürk S., "Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals", JOURNAL OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT, vol.64, pp.477-484, 2018

### **Ulusal Kongre Bildirileri:**

1. Esra Gözde Köşebent, Fatma Uysal, Saffet Öztürk. Postnatal fare ovaryum dokularında telomeraz, Trf1 ve Trf2 genlerinin mRNA ve protein ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi. Sözlü bildiri. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
2. Esra Gözde Köşebent, Fatma Uysal, Saffet Öztürk. Postnatal fare ovaryum dokularında telomeraz, TRF1, TRF2, POT1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi. Sözlü bildiri. 15. Uluslararası Üreme Sağlığı ve İnfertilite Kongresi (TSRM). 8-11 Kasım 2018, Antalya.