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

FETAL GERM HÜCRE GELİŞİMİNDE HÜCRELER ARASI KÖPRÜLERİN ROLÜ

Gül Bikem SOYGÜR

DOKTORA TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİANABİLİM DALI

FETAL GERM HÜCRE GELİŞİMİNDE HÜCRELER ARASI KÖPRÜLERİN ROLÜ

Gül Bikem SOYGÜR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Necdet DEMİR
İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Diana J LAIRD

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1429 proje numarası ile desteklenmiştir.

"Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir"

2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 25/06/2018

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi .....

Üye : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi .....

Üye : Prof. Dr. Münire ERMAN
Akdeniz Üniversitesi .....

Üye : Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi .....

Üye : Doç. Dr. Yasemin SEVAL ÇELİK
İzmir Ekonomi Üniversitesi .....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

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.

Gül Bikem SOYGÜR

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez projemin gerçekleştirilmesinde göstermiş oldukları maddi, manevi ve bilimsel destek için danışman hocalarım Prof. Dr. Necdet DEMİR ve Doç. Dr. Diana J LAIRD'e,

Tez projemin deneysel sürecinde göstermiş oldukları manevi ve bilimsel destek için University of California San Francisco (UCSF)'da bulunan Laird Lab'ın Ripla Arora, Daniel Nguyen ve Rebecca Jaszczak başta olmak üzere tüm çalışanlarına,

Tez projemin üç boyutlu analizlerinin gerçekleştirilmesinde yazdığı komut dizisi ile biyoloji ve matematiği eşsiz bir uyum içerisinde kullanmamı sağlayan UCSF Biyolojik Görüntüleme Geliştirme Merkezi'nden Adam Fries'a

2214-A burs programı ile tez projem kapsamında UCSF'de araştırma yapma şansı tanıyan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'e,

Tez projemdeki deneylerin gerçekleşmesi için maddi destek sağlayan UCSF Breakthrough Biomedical Research Programı'na,

Yurt dışında olduğum süre içerisinde göstermiş oldukları tolerans ve destekleri için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Kısıtlı sürede gerçekleştirdiğimiz elektron mikroskobu analizleri için TEMGA ünitesi çalışanlarına,

Yardımları için Sağlık Bilimleri Enstitü'nün değerli çalışanlarına,

Hayatımda yapmak istediğim her şey için olanak sağlayan, eğitim hayatımın başından itibaren sonsuz anlayış, sabır ve sevgi ile hep arkamda olan anneme ve babama en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç:Hücreler arası köprüler somatik hücrelerde hücre bölünmesinin sitokinez evresinde oluşan geçici yapılardır. Farede farklılaşan germ hücreleri arasında TEX14 proteininin varlığı ile kalıcı yapılara dönüşen hücreler arası köprülerin, diploid dişi germ hücrelerindeki rolü belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızda, germ hücrelerinde hücreler arası köprü içermeyen *Tex14* mutant (*Tex14*$^{-/-}$) fareler kullanılarak, hücreler arası köprülerin mayozun senkronizasyonu ve germ hücre havuzunun kurulmasındaki rolü üç boyutlu (3D) analiz yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

Yöntem: Wholemount immünofloresan yöntemi ile *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücreleri mayoz ve apoptoz belirteçleri ile işaretlendi. Imaris programı ve MATLAB komut dizisi ile ovaryumların 3D haritası oluşturuldu. Ayrıca apoptozun grup/küme analizi gerçekleştirildi. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda kimyasal stres oluşturulduktan sonra hücreler arası köprülerin varlığında ve yokluğunda hücre eliminasyonu değerlendirildi.

Bulgular: Ovaryumda mayozun ilk olarak radyal bir dalga halinde başladığı, anterior-posterior (AP) mayotik dalganın ise E13.5'tan itibaren etkili olduğu izlendi. *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda, radyal mayotik dalganın olmadığı, sadece AP dalganın korunduğu ve *Tex14*$^{-/-}$ germ hücrelerinin *Tex14*$^{+/+}$'e kıyasla mayoza daha erken başladığı dikkat çekti. Germ hücre eliminasyonunun gerçekleştiği dönemde *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre sayısının azaldığı, apoptozun arttığı ve *Tex14*$^{+/+}$'den farklı olarak, *Tex14*$^{-/-}$ germ hücrelerinin ovaryumda rastgele elimine edildiği izlendi. Stres indüklendiğinde ise germ hücre kaybının oransal olarak *Tex14*$^{+/+}$'de *Tex14*$^{-/-}$'e göre artmış olduğu tespit edildi.

Sonuç:Çalışmamızda, ovaryumda hücreler arası köprülerin radyal mayotik dalganın düzenlenmesinde ve apoptoz düzeyinin belirlenmesindeki rolleri literatürde ilk defa ortaya konulmuştur. Fetal germ hücre gelişiminin araştırılması, ovaryan rezervin kurulmasında etkili olan mekanizmaları anlamamızı sağlayarak, infertilite, subfertilite ve oositlerde sıklıkla izlenen anöploidi ile ilgili bilinmeyenlere ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Hücreler arası köprü, TEX14, fetal germ hücresi, mayoz, apoptoz.

ABSTRACT

Objective: Intercellular bridges (ICBs) are transient structures which form during cytokinesis step of somatic cell division. They transform into permanent structures with the presence of TEX14 protein in differentiating mice germ cells. The role of ICBs in mammalian female germ cell development is still unclear. In our study, we analyzed the role of ICBs in the synchronization of meiosis and establishment of germ cell pool by using 3D analyzing method and *Tex14* mutant (*Tex14*$^{-/-}$) mice, which lack ICBs in germ cells.

Method: Wholemount immunofluorescent staining was performed, *Tex14*$^{+/+}$ and *Tex14*$^{-/-}$ germ cells were labelled with meiosis and apoptosis markers. 3D maps of ovaries were created by using Imaris software and MATLAB. Clustering analysis of germ cells was also applied. Germ cell elimination was analyzed in the absence or presence of ICBs in *Tex14*$^{+/+}$ and *Tex14*$^{-/-}$ ovaries which were subjected to chemical stress.

Results: Meiosis first started as a radial meiotic wave and anterior-posterior (AP) meiotic wave was effective in the ovaries earliest at E13.5. The radial wave was absent and pre-mature meiotic entry was observed in *Tex14*$^{-/-}$. Germ cell numbers were decreased and germ cell death were increased in *Tex14*$^{-/-}$ compared to *Tex14*$^{+/+}$ when germ cell elimination occurred through apoptosis. Unlike *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{-/-}$ germ cells were eliminated randomly. When ovaries were subjected to chemical stress, further increase of apoptosis following chemical stress was modest in *Tex14*$^{-/-}$ compared to *Tex14*$^{+/+}$ ovaries.

Conclusion: In our study, the roles of ICBs in the regulation of radial meiotic wave and in calibrating the threshold of apoptosis in germ cells in the developing ovary were revealed for the first time. Studying germ cell development in great detail will allow us to gain deeper understanding in mechanisms which play a role during the establishment of ovarian reserve and will enlighten infertility, subfertility and aneuploidy defects in females.

Key words: Intercellular bridges, TEX14, fetal germ cell, meiosis, apoptosis

İÇİNDEKİLER

ÖZET i

ABSTRACT ii

İÇİNDEKİLER iii

TABLOLAR DİZİNİ v

ŞEKİLLER DİZİNİ vii

SİMGELER ve KISALTMALAR x

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Primordial Germ Hücre Gelişimi 4

2.2. Fetal Dönem Dişi Germ Hücre Gelişimi. 6

2.2.1. Germ Hücreleri Arasındaki Hücreler Arası Köprüler 7

2.2.2. Fetal Ovaryumda Mayoz Bölünme ve Mayozun Senkronizasyonu 13

2.2.3. Dişi Fetal Germ Hücrelerinde Mayotik Profaz I'in Evreleri ve Mayotik Duraklama 15

2.2.4. Dişi Fetal Germ Hücrelerinde Apoptoz 18

2.2.5. Fetal Ovaryumda Germ Hücre Kistlerinin Yıkılması ve Primordial Folikül Oluşumu 20

2.2.6. Germ Hücre Kistlerinin Yıkımı ve Primordial Folikül Oluşumunda Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri 21

2.2.7. Germ Hücre Kistlerinin Yıkımı ve Primordial Folikül Oluşumunda Rol Oynayan Sinyal Yolakları 21

2.3. Hipotez ve Amaç 22

3. GEREÇ ve YÖNTEM 24

3.1. *Tex14* Mutant Hayvan Modeli 24

3.2. Genotipleme İçin Yetişkin Fare ve Embriyolardan DNA İzolasyonu 24

3.3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler 24

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metodu ile Genotipleme 25

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi 28
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler 29
3.7. Embriyonik ve Post-natal Ovaryumların İzolasyonu ve Deneylerde Kullanılması 30
3.8. Ovaryumların İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar 30
3.9. Geçirimli Elektron Mikroskobu Analizi 32
3.10. Elektron Mikroskobu Analizinde Kullanılan Malzemeler 32
3.11. Yabanıl Tip ve *Tex14*$^{-/-}$ Dişi Gebe Farelerde Toksik Stres Oluşturulması 33
3.12. Embriyonik ve Post-natal Ovaryumlarda Wholemount İmmünofloresan 34
3.13. Wholemount İmmünofloresan Deneyinde Kullanılan Malzemeler 34
3.14. 3D Ovaryum Analizi 37
3.15. Germ Hücre Apoptozunun Grup/Küme Analizi 38
3.16. Embriyonik Ovaryumlarda Oosit Yayma 39
3.17. Oosit Yayma Preparatlarının Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler 39
3.18. Oosit Yayma Preparatlarında İmmünofloresan Boyama 41
3.19. Oosit Yayma Preparatlarında İmmünofloresan Boyama İçin Kullanılan Malzemeler 41
3.20. İstatiksel Analizler 42

4. BULGULAR 43
4.1. *Tex14*, GFP ve *XY* (cinsiyet) Genotiplemelerinin Değerlendirilmesi 43
4.2. Tex14 Kolonisinde Embriyo Rezorpsiyonunun Değerlendirilmesi 43
4.3. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumların Elektron Mikroskobik Analizi 45
4.4. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Mayoz Dalgasının Değerlendirilmesi 45
4.5. Embriyonik Ovaryumda Radyal Mayotik Dalganın Oluşmasını Kontrol. Edebilecek Olası Faktörlerin Araştırılması 52
4.6. Mayotik Profaz I (MPI)'in *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Değerlendirilmesi 56
4.7. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Apoptozun Değerlendirilmesi 57
4.8. E11.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Apoptozun 60

Değerlendirilmesi
4.9. PN2 ve PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Ovaryumlarda Apoptozun Değerlendirilmesi 61
4.10. Toksik Stres Oluşturulan *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Ovaryumlarda Germ Hücre Hayatta Kalımı ve Apoptozun Değerlendirilmesi 65

5. TARTIŞMA 68

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 78

KAYNAKLAR 80
ÖZGEÇMİŞ 86

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	Genotipleme için kullanılan yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) primer dizileri	25
Tablo 3.2.	Yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) *Tex14* geni için PCR reaksiyonu	26
Tablo 3.3.	Yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) *Tex14* geni için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları	26
Tablo 3.4.	Genotipleme için kullanılan eGFP primer dizileri	27
Tablo 3.5.	eGFP trangeni için PCR reaksiyonu	27
Tablo 3.6.	eGFP transgeni için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları	27
Tablo 3.7.	Genotipleme için kullanılan XY primer dizileri	28
Tablo 3.8.	XY için PCR reaksiyonu	28
Tablo 3.9.	XY için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları	28
Tablo 3.10.	Wholemount immünofloresan deneyinde kullanılan primer antikorlar	36
Tablo 3.11.	Wholemount immünofloresan deneyinde kullanılan sekonder antikorlar	37
Tablo 3.12.	Oosit yayma immünofloresan deneyinde kullanılan primer antikorlar	42
Tablo 3.13.	Oosit yayma immünofloresan deneyinde kullanılan sekonder antikorlar	42
Tablo 4.1.	Projede *Tex14*$^{+/-}$ gebe farelerden izole edilen embriyo sayıları ve genotipleri	44
Tablo 4.2.	E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri	48
Tablo 4.3.	E13.0 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri	50
Tablo 4.4.	E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri	52

Tablo 4.5. E15.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri 56

Tablo 4.6. E16.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri 56

Tablo 4.7. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri 59

Tablo 4.8. PN2 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri 63

Tablo 4.9. PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri 65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Fertilizasyondan sonra somatik ve germ hücrelerinin gelişimlerini gösteren şematik çizim	3
Şekil 2.2.	Fare embriyonik gelişimi süresince gerçekleşen primordial germ hücre özelleşmesi ve göçün (migrasyon) şematik çizimi	5
Şekil 2.3.	Farede erken dönem dişi germ hücre gelişiminin şematik çizimi	7
Şekil 2.4.	Somatik ve germ hücre sitokinezinin şematik çizimi	8
Şekil 2.5.	*Drosophila* dişi germ hücrelerinde germ hücre kistinin oluşumu	10
Şekil 2.6.	Fare germ hücrelerinde hücreler arası köprüler ve TEX14 proteininin ilişkisini gösteren çizim	12
Şekil 2.7.	Embriyonik ovaryumda anterior'den posterior'e mayotik dalganın yayılmasını gösteren şematik çizim	14
Şekil 2.8.	Farede Profaz I boyunca sinaptonemal kompleks oluşumu ve kromozom yapısını gösteren şematik çizim	17
Şekil 3.1.	Projede heterozigot çaprazlama sonucu elde edilen embriyo/post-natal örneklerin izolasyonu ve genotipleme basamaklarını gösteren çizim	31
Şekil 3.2.	Proje kapsamında analiz edilen farklı deneysel parametleri gösteren şematik çizim	31
Şekil 3.3.	*Tex14*$^{+/-}$ gebe farelere yapılan Busulfan/taşıyıcı grup enjeksiyonları ve zaman tablosunu gösteren çizim	34
Şekil 3.4.	Wholemount immünofloresan yöntemi ile farklı belirteçlerle işaretlenmiş ovaryumların 3D analizi	38
Şekil 4.1.	%2'lik agaroz jelde yürütülen örnek *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$, *Tex14*$^{-/-}$, GFP^{+}, GFP^{-}, XX ve XY PCR ürünlerinin analizi	43
Şekil 4.2.	Tex14 kolonisinde embriyo genotiplerini Mendel kalıtımı ile karşılaştırmalı olarak gösteren grafik	44
Şekil 4.3.	E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan elde edilen elektron mikrograflar	45

Şekil 4.4. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi 47

Şekil 4.5. E13.0 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan mayotik dalganın 3D incelenmesi 49

Şekil 4.6. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi 51

Şekil 4.7. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda FGF9 ve FOXL2 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi 53

Şekil 4.8. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda FMRP ve DAZL mRNA bağlanma proteinlerinin ekspresyonunun değerlendirilmesi 54

Şekil 4.9. E15.5 ve E16.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi 55

Şekil 4.10. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan hazırlanan germ hücre yayma preparatlarında MPI'ın evrelerinin analizi 57

Şekil 4.11. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi 58

Şekil 4.12. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre eliminasyonunun kümelenme analizi 60

Şekil 4.13. E11.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ AGM'de germ hücre popülasyonunun ve hücre ölümünün incelenmesi 61

Şekil 4.14. PN2 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi 62

Şekil 4.15. PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi 64

Şekil 4.16. Toksik stres oluşturulmuş E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre hayatta kalımı ve apoptozun değerlendirilmesi 66

Şekil 4.17. Busulfan enjekte edilmiş E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre eliminasyonunun kümelenme analizi 67

Şekil 5.1. Dişi germ hücrelerinde hücreler arası köprülerin varlığında ve yokluğunda mayoz dalgasının nasıl kontrol edilebileceğini gösteren model 73

SİMGELER ve KISALTMALAR

γH_2AX : Gamma Histone H2A.X

3D : 3 dimensional (boyut)

ADH : Alkol dehidrojenaz

AGM : Aort-Gonad-Mezonefroz

ALDH : Aldehid dehidrojenaz

ALDH1A1 : Aldehid dehidrojenaz 1 aile üyesi A1

ALDH1A2 : Aldehid dehidrojenaz 1 aile üyesi A2

ALDH1A3 : Aldehid dehidrojenaz 1 aile üyesi A3

ALIX : ALG-2 interacting protein X

AP : Anterior-Posterior

BAAB : Benzil alkol/Benzil benzonat

BAX : Bcl-2-like protein 4

BDMA : Benzyldimethylamine

BLC2 : B-cell lymphoma/leukemia-2

BMP4 : Bone Morphogenic Protein 4

BSA : Bovin serum albumin

CEP55 : Centrosomal protein 55 kDa

cPARP : cleaved Poly (ADP-Ribose) Polymerase(s)

DAZL : Deleted in Azoospermia-Like

DDSA : Dodecenyl Succinic Anhydride

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoxyribonucleic Acid

DTT : Dithiothreitol

E : Embriyonik gün

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

eGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein

FGF9 : Fibroblast Growth Factor 9

FIGLA : Factor in the Germline Alpha

FMRP : Fragile X Mental Retardation

Foxl2 : Forkhead box L2

GFP : Green Fluorescent Protein

GPPX3Y : Glycine (G)-proline (P)-proline (P)-X-X-Xtyrosine(Y)

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

KIT : Tyrosine kinase type III receptor

LGR5 : Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 5

LIF : Leukemia inhibitory factor

LIF : Leica Image File

MPI : Mayotik profaz I

mRNA : Messenger Ribonucleic Acid

NaOH : Sodyum hidroksit

NOBOX : Newborn Ovary Homeobox

NR2F2 : Nuclear Receptor Subfamily 2 Group F Member 2

OsO_4 : Ozmiyum Tetroksit

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

PFA : Paraformaldehit

PGCs : Primordial germ hücreleri

PMSF : Phenylmethylsulfonyl fluoride

PN : Post-natal

RA : Retinoik Asit

RAR : Retinoik Asit Reseptör

RARE : Retinoic acid response element

RETALDH : Retinaldehid

ROL : Retinol

RXR : Retinoid X Reseptör

SCF : Stem cell factor

SFT : Sörensen Fosfat Tamponu

Sox9 : Sry (Sex Determining Region Y)-box 9

Sry : Sex-Determining Region Y

Stra8 : Stimulated by retinoic acid gene 8

SYCP1 : Synaptonemal Complex Protein 1

SYCP2 : Synaptonemal Complex Protein 2

SYCP3 : Synaptonemal Complex Protein 3

TBE : Tris-Borik Asit-EDTA

TEM : Transmission Electron Microscope

TEX14 : Testis expressed 14

TRA98 : Germ cell-specific antigen

Tris-HCl : Tris-Hidroklorik asit

TSG101 : Component of endosomal sorting complex required for transport-1

Wnt4 : Wingless-type MMTV integration site family member 4

1. GİRİŞ

Memelilerde erken embriyogenez süresince somatik hücre soyundan ayrılan bir grup hücre gamet öncülü olan primordial germ hücreleri (Primordial germ cells 'PGCs')'ni oluşturur. Primordial germ hücrelerinin farklılaşması o kadar erken gerçekleşir ki, gebelik belirlendiğinde söz konusu embriyodan sonraki jenerasyonu oluşturacak germ hücre öncülleri çoktan seçilmiş ve somatik hücre soyundan ayrılmıştır (Laird, 2013). Primordial germ hücrelerinin gerek fetal gerekse puberteden sonra yetişkin dönemde gelişimlerinin koordineli bir şekilde gerçekleşmesi ile genomik mirasçılar olan oosit ya da sperm meydana gelir. Bu nedenle germ hücre gelişiminin tüm yönleri ile gelişimin erken dönemlerinden itibaren araştırılması ve aydınlatılması, temel üreme biyolojisi başta olmak üzere klinikte belirsizliğini koruyan birçok soru için cevap oluşturabilecek potansiyeldedir.

Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalar üremenin ilk basamağı olan mayoz bölünmenin dişi germ hücrelerinde embriyonik dönemde başladığını göstermektedir. Dişi üreme sisteminde sahip olunabilecek maksimum germ hücre popülasyonu fetal ve perinatal dönemde mayoz bölünme başta olmak üzere gerçekleşen gelişimsel olaylar ile belirlenir. Ovaryumda fetal dönemden sonra germ hücre havuzunu destekleyebilecek ve fonksiyonel oositi oluşturabilecek kök hücre kaynağının olup olmadığı günümüzde hala tartışma konusudur. Ayrıca, dişi üreme sisteminde devamlı olarak germ hücre kaybının olduğu da günümüzde histolojik yöntemler kullanılarak ortaya konulmuştur. Bu anlamda, erken dönem germ hücre gelişiminin koordineli bir şekilde gerçekleşmesi dişilerde reprodüktif kaderi belirlemektedir.

Gelişimin erken dönemlerinden itibaren germ hücre gelişimi incelendiğinde birçok türde (*C. elegans*, *Drosophila*, fare, insan) farklılaşmakta olan germ hücrelerinin kist yapısı içerisinde geliştiği dikkat çekmektedir. Her iki cinsiyette de germ hücre stratejisi olarak tanımlanan kist yapıları germ hücrelerinin arasında kalıcı hücreler arası sitoplazmik köprülerin kurulması ile oluşur (Lu ve ark., 2017). Hücreler arası köprüler, somatik hücrelerde hücre bölünmesi sırasında iki yavru hücre arasında oluşan geçici yapılar olmasına rağmen, germ hücrelerinde TEX14 (Testis expressed 14) proteininin varlığı ile

kalıcı yapılara dönüşerek farklılaşan germ hücrelerinin kist yapısı içerisine gelişmesini sağlar.

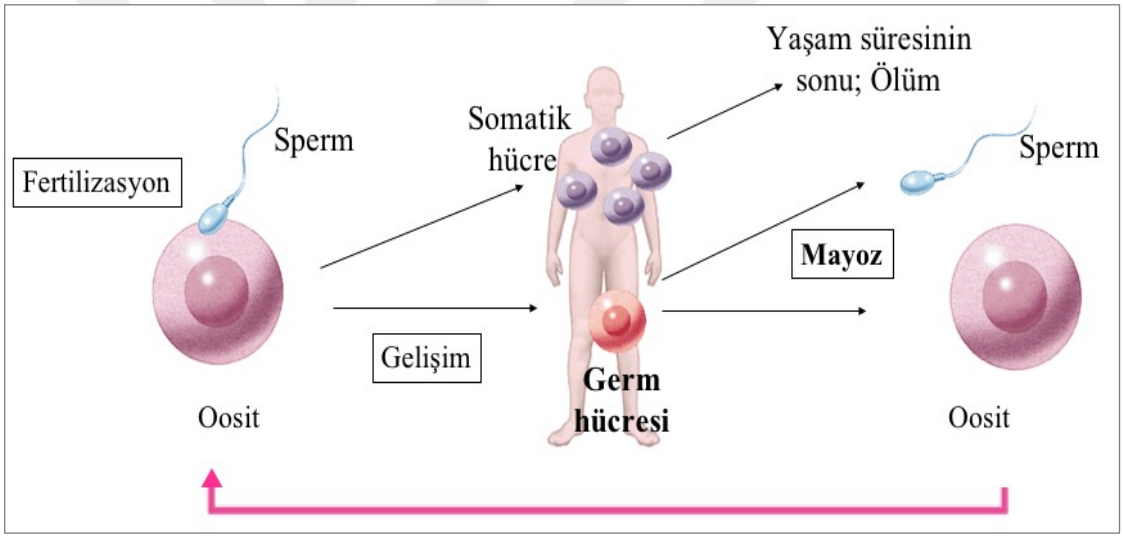
Dişi ve erkek germ hücre gelişiminin farklı dönemlerde (gametogenez ve/veya gelişim süresince) izlenebilen hücreler arası köprülerin fonksiyonu ve görevi literatürde en etkin model olarak çalışılan *Drosophila'*da açık bir şekilde ortaya konulmuştur. *Drosophila*'da dişi germ hücreleri tek bir kurucu (öncü) hücrenin sitoplazmik bölünmelerini tamamlamadan art arda 4 hücre bölünmesi geçirmesi ile klonal olarak gelişir. 16 hücreden oluşan kist yapısında 15 destek hücresi hücre sitoplazmik materyallerini kist içinde bulunan tek bir (gelişimin ilerleyen dönemlerinde oositi oluşturacak) hücreye transfer eder. Böylece destek hücreleri bazı organel ve mRNA'ların germ hücreleri arasındaki bu spesifik bağlantılarından oosite geçmesini sağlayarak oosit gelişimini destekler.

Germ hücrelerine özgü bu sitoplazmik köprülerin memeli germ hücrelerinde de varlığını sürdürmesi evrimsel olarak benzer yapı ve görevler üstelenebilecekleri ihtimalini akıllara getirse de, *Drosophila* ve memeli germ hücre gelişiminin birçok noktada birbirlerinden farklılık gösterdiği bilinmektedir. Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, mayoz bölünmenin başladığı ve dişi germ hücre havuzunun kurulduğu dönem olan fetal germ hücre gelişiminde hücreler arası köprü yapıların görevleri hala belirsizliğini korumaktadır. Bu nedenle çalışmamızda; 'Fetal germ hücrelerinde hücreler arası köprülerle sağlanan iletişim, ovaryumda mayotik dalganın yayılmasına olanak sağlar ve apoptoz düzeyini değiştirir' hipotezini kurduk.

Hipotezimiz doğrultusunda çalışmamızda knock out teknolojisi ile *Tex14* geni çıkartılmış, germ hücreleri arasında hücreler arası köprüler bulunmayan mutant fare (*Tex14*$^{-/-}$) soyları kullanılarak, fare fetal dişi germ hücre gelişiminde, germ hücreleri arasında görülen sitoplazmik köprülerin rollerinin literatürde daha önce kullanılmamış 3 boyutlu (3 dimensional '3D') analiz yöntemi kullanılarak araştırılmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

Tüm eşeyli üreyen canlılar somatik ve germ (üreme) hücreleri olmak üzere iki hücre tipi tarafından oluşur. Somatik hücreler organizmayı canlı tutmak için metabolik işlevler üstlenir. Bu hücreler sınırlı yaşam süresine sahip 'mortal' (ölümlü) hücrelerdir. Diğer hücre tipi olan germ hücreleri ise türün devamlılığı için çok önemli olan genetik materyali bir sonraki nesile aktarmak ile sorumludur **(Şekil 2.1)**. Genetik materyalin aktarılması ile nesiller arası bağlantı sağladığı için germ hücreleri yaşam döngüsünde özel bir yere sahiptir ve fertilizasyon olduğu durumlarda 'immortal' ölümsüz hücreler olarak da tanımlanır (Kunwar ve Lehmann, 2003).



Şekil 2.1. Fertilizasyondan sonra somatik ve germ hücrelerinin gelişimlerini gösteren şematik çizim. (Aona ve ark.)'dan modifiye edilmiştir.

Gamet öncülleri olan primordial germ hücreleri gelişimleri boyunca mayoz bölünme de dahil olmak üzere bir çok önemli gelişimsel süreçten geçerek olgun oosit ya da spermi oluşturur (Magnusdottir ve Surani, 2014). Dişi germ hücre siklusunun son ürünü olan oositler sperm tarafından döllendikleri takdirde embriyoya gelişebilen, diğer bir ifade ile gelişimsel totipotensinin tekrar kazanılmasını sağlayan tek hücre tipidir (Mardanpour ve ark., 2008).

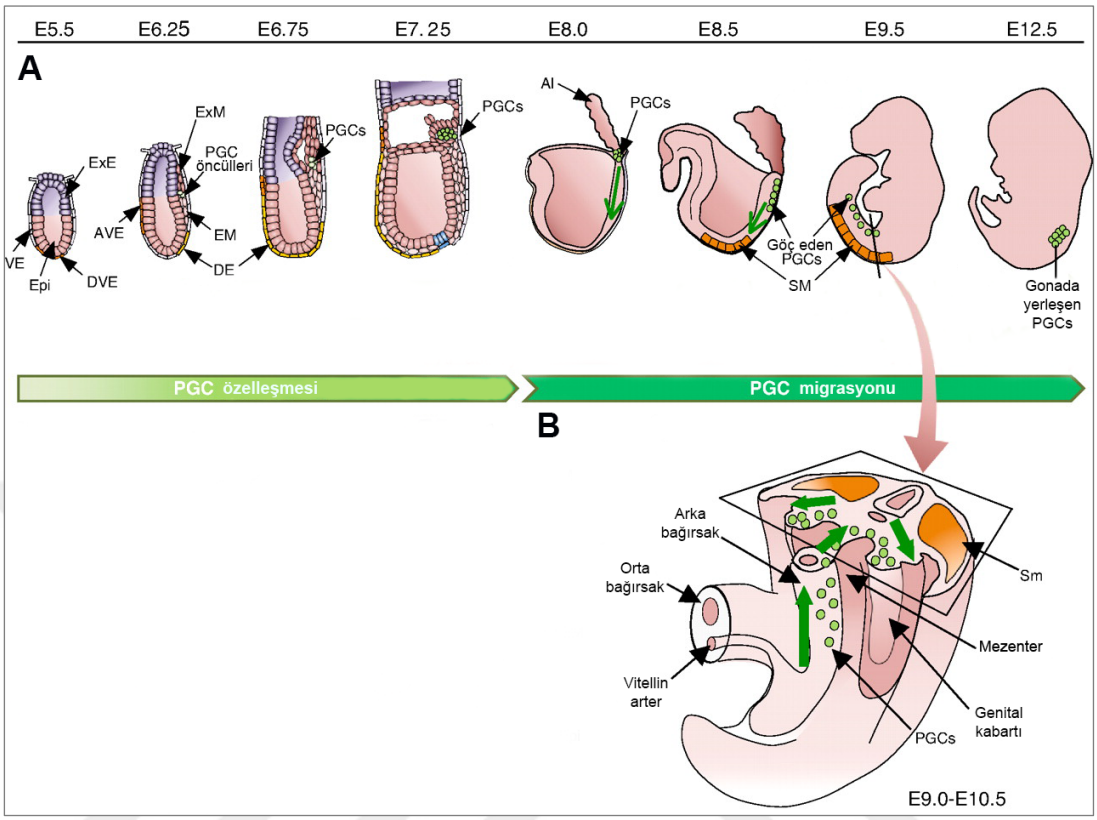
Bu önemli göreve sahip dişi germ hücrelerin büyük bir kısmı gelişimini tamamlayamadan farklı mekanizmalar ile elimine edilir. Yetişkin ovaryumda fonksiyonel dişi germ hücresi

oluşturabilecek kök hücre kaynağının da bulunmadığı göz önünde bulundurulduğunda, primordial germ hücrelerin farklılaşarak ovaryan rezervin kurulduğu embriyonik/fetal ve neonatal (yenidoğan) dönemde dişi germ hücre gelişiminin anlaşılması büyük önem taşımaktadır.

2.1. Primordial Germ Hücre Gelişimi

Memelilerde germ hücrelerinin somatik hücre soyundan ayırımı ilk olarak embriyogenezin gastrulasyon evresinde gerçekleşir (Chen ve ark., 2013). Gamet öncülleri olan primordial germ hücreleri bu süreçte epiblasttan köken alır. Primordial germ hücre öncülleri ise ilk defa fare embriyonik gelişimin 6.25 gününde (E6.25) ekstra-embriyonik ektodermden salınan BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4)'e cevaben germ hücresine spesifik birtakım genleri ifade etmeye başlayarak proksimal epiblasttan farklanır (Gunesdogan ve ark., 2014; Irie ve ark., 2014). E7.25 güne gelindiğinde allantoisin başlangıç yerine yakın vitellus kesesi duvarında yaklaşık 40 tane kurucu (founder) primordial germ hücresi bulunmaktadır (Ginsburg ve ark., 1990; Lawson ve Hage, 1994).

Primordial germ hücreleri gelişimin ilerleyen günlerinde arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ameboid hareketlerle gonad taslakları olan 'genital kabartı'ya doğru göç eder (migrasyon). Genital kabartının gelişimi, prolifere olan sölom epiteli ve altındaki mezenşim hücrelerinin mezonefrozun ventromedial yüzünde yoğun ve yalancı çok katlı bir tabaka oluşturması ile başlar. Eş zamanlı olarak, bazal membran parçalanması (fragmentasyon) meydana gelir. Epitel hücrelerinin oluşturduğu epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar)'ın iç kısımlara doğru göç etmesi ile kalın ve çok tabakalı bir yapı oluşur (Karl ve Capel, 1998). Belirtilen morfolojik değişiklikler ilk önce anteriorde başlar ve kademeli olarak posteriore doğru yayılarak genital kabartılar oluşur (Hu ve ark., 2013). Göçleri sırasında prolifere olan primordial germ hücreleri E8.5 günde yaklaşık 100 adet hücreden oluşur ve bu dönemde sahip oldukları uzun hücresel uzantılar (yaklaşık 40 μm) sayesinde yaygın bir iletişim ağı oluşturur. Göçleri sonucunda E10.5 günde genital kabartıya ulaşan primordial germ hücreleri hücre bölünmelerine devam eder ve E11.5 günde yaklaşık 3000 hücreden oluşur **(Şekil 2.2)**.



Şekil 2.2. Fare embriyonik gelişimi süresince gerçekleşen primordial germ hücre özelleşmesi ve göçün (migrasyon) şematik çizimi. A: E5.5-E12.5 günler arasında primordial germ hücre gelişimini, B: E9.5 günde belirtilen kesit alanının büyütülmüş halini göstermektedir. Al: allantois, AVE: anterior viseral endoderm DE: distal endoderm, DVE: distal viseral endoderm, EM: embriyonik mesoderm, Epi: epiblast, ExE: ekstra-embriyonik ektoderm, ExM: ekstra-embriyonik mesoderm, PGCs: primordial germ hücreleri, SM: somit, VE: viseral endoderm. (Saitou ve ark., 2012)'den modifiye edilmiştir.

Fare germ hücre gelişimin E11.5 gününe kadar olan dönem bipotansiyel dönem olarak tanımlanmaktadır. Diğer bir ifade ile; embriyonun kromozomal cinsiyeti fertilizasyondan itibaren belli olmasına rağmen, erkek ve dişi germ hücrelerinin cinsiyet spesifik gelişimi E11.5 günden itibaren genital kabartıdaki somatik hücreler tarafından kontrol edilen sinyaller aracılığı ile gerçekleşmektedir (Bullejos ve Koopman, 2004). XY embriyolarda, Y kromozomunda bulunan cinsiyet belirleyici bölge (Sex Determining Region Y '*Sry*') ve *Sry* geninin alt hedefi olan Sry-box 9 (*Sox9*) geni varlığında bipotensiyel gonad testis yönünde farklanmaktadır (Koopman, 1992; Sinclair ve ark., 1990). Y kromozomu ve dolaylı olarak *Sry* geninin olmadığı XX embriyolara ise *Wnt4* (Wingless-type MMTV integration site family member 4), *Fst* (Follistatin) ve *Foxl2* (Forkhead box L2) genleri varlığında dişi yönünde farklanma meydana gelerek bipotansiyel gonad ovaryum oluşturmak üzere gelişir (Sarraj ve Drummond, 2012). Bu şekilde genital kabartıya ulaşan

primordial germ hücreleri, E11.5'tan itibaren dişi ya da erkek gametogenezi doğrultusunda olgun germ hücreleri olan oosit ya da spermi oluşturmak üzere farklılaşır (Chen ve ark., 2013; Gomperts ve ark., 1994; Tam ve Snow, 1981).

2.2. Fetal Dönem Dişi Germ Hücre Gelişimi

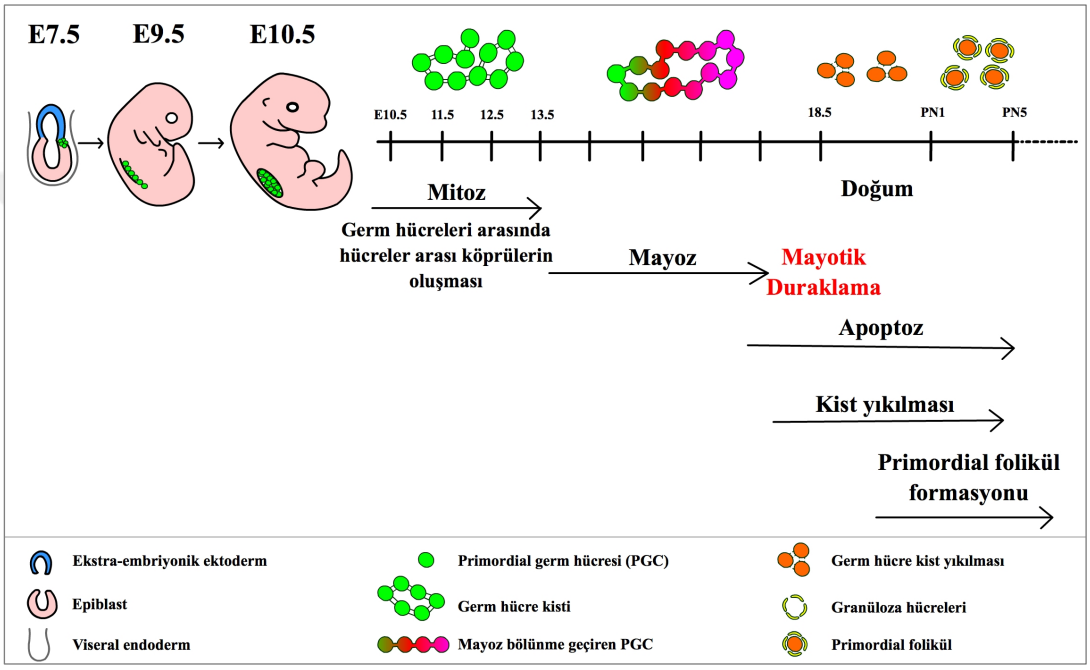
Genital kabartıya ulaşan XX seks kromozomuna sahip primordial germ hücrelerinin fetal ovaryumda gelişimleri süresince 3 temel olay gerçekleşir.

(*i*) E10.5 ve E13.5 günler arasında mitotik bölünmeler geçiren primordial germ hücreleri sayılarını arttırır ve oogonium olarak adlandırılır. Bu dönemde meydana gelen mitoz bölünmelerin sitokinez evresinde, yavru hücreler arasında bulunan hücreler arası köprüler yıkılmaz ve kalıcı yapılara dönüşür. Mitoz bölünme ile sayılarını arttıran ve hücreler arası köprüler ile birbirleri ile bağlantı kuran germ hücreleri embriyonik ovaryumda her biri ortalama 30 germ hücresi içeren 'germ hücre kist'lerini oluşturur (Grive ve Freiman, 2015) **(Şekil 2.3)**.

(*ii*) Mitoz bölünmelerin ardından germ hücre kist yapısında bulunan germ hücreleri (oogonia) E13.5 günde mayoz bölünmeye girer ve mayozun başlamasıyla oosit olarak adlandırılır (Pepling, 2012). Embriyonik ovaryumda germ hücreleri mayoz bölünmeye başladıktan sonra gelişimin ilerleyen evrelerinde bir daha germ hücre proliferasyonu gerçekleşmez. Mayoz I'in profazında, leptoten, zigoten, pakiten evrelerini tamamlayan germ hücrelerinde (oosit) diploten evresine gelindiğinde, yaklaşık E17.5-E18.5 günde, homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında parça değişiminin (crossing-over) tamamlanmasından sonra mayotik duraklama (arrest) gerçekleşir (Hartshorne ve ark., 2009) **(Şekil 2.3)**.

(*iii*) Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, (E17.5'tan başlayarak) gelişmekte olan ovaryumda germ hücre kistlerinin yıkımı gerçekleşir ve eş zamanlı olarak perinatal dönemde oosit sayısında dramatik bir azalma meydana gelir (Pepling ve Spradling, 2001). Hayatta kalan ve gelişimine devam eden oositler, çevresini saran somatik hücreler (pre-granüloza hücreleri) ile farede primordial folikül havuzunu oluşturur. Bu dönemde programlı hücre ölümü mekanizmaları ile oositlerin büyük bir kısmı ortadan kaldırılırken ortalama oositlerin %20'si hayatta kalır. Başlangıçta bir germ hücre kistini oluşturan 30 germ

hücresinden kist başına ortalama 6.4 germ hücresi gelişimine devam eder ve post-natal 5. günde (PN5) primordial folikül formasyonunu tamamlanır. Böylece ovaryumda üreme hayatı boyunca sahip olunabilecek maksimum oosit sayısı belirlenerek ovaryan rezerv kurulmuş olur (Grive ve Freiman, 2015; Lei ve Spradling, 2013; Pepling ve Spradling, 1998; Pepling ve ark., 2007) **(Şekil 2.3)**.



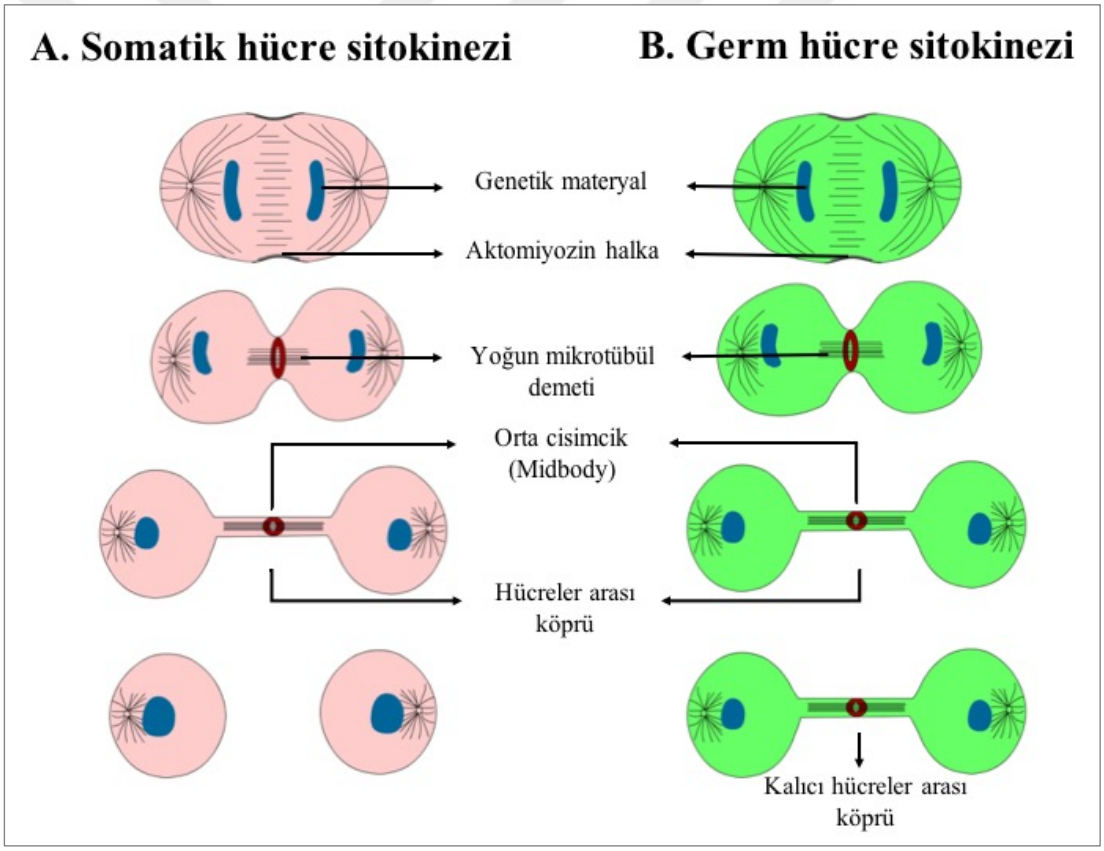
Şekil 2.3. Farede erken dönem dişi germ hücre gelişiminin şematik çizimi.

Gelişimin erken dönemlerden itibaren fetal ovaryumda belirtilen mekanizmalar ile dişi germ hücre gelişiminin koordineli bir şekilde gerçekleşmesi, gerek fetal dönemde germ hücre havuzunun kurulması, gerekse klinikte kaliteli olgun oosit eldesi için oldukça kritiktir. Klinikte olgun oositlerde oosit kalitesinin değerlendirilmesi için bazı kriterler belirlenmiş olmasına rağmen, fetal dönemde oosit seçim mekanizması ile ilgili literatürde kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Günümüzde fetal dönemde meydana gelen gelişimsel olayların koordineli bir şekilde gerçekleşmesinin oosit kalitesi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Hartshorne ve ark., 2009).

2.2.1. Germ Hücreleri Arasındaki Hücreler Arası Köprüler

Hücreler arası köprüler fizyolojik süreçte tüm somatik hücrelerde, hücre bölünmesinin son evresi olan sitokinez aşamasında ortaya çıkan geçici yapılardır (Greenbaum ve ark.,

2007). Birçok basamaktan oluşan sitokinezin ilk basamağında, aktin/miyozin bağımlı kasılma halkası, ekvatoryal düzlemde kasılarak, plazma membranında invajinasyonun nerede gerçekleşeceğini belirler. Daha sonra invajinasyon bölgesinde bölünme çizgisi belirir ve bu çizgi, dar bir hücreler arası köprü ya da diğer adı ile orta cisimcik (midbody) oluşturuncaya kadar hücrenin periferinden merkeze doğru ilerler. Oluşan bu orta cisimcik, hücre bölünmesinin önceki basamaklarından geriye kalan mikrotübülleri içerir ve iki yavru hücreyi birbirine bağlar. Sitokinezin son basamağında, orta cisimciğin ortadan kaldırılması ile hücre bölünmesi tamamlanır ve oluşan yavru hücreler birbirinden ayrılır (Low ve ark., 2003) **(Şekil 2.4A)**.

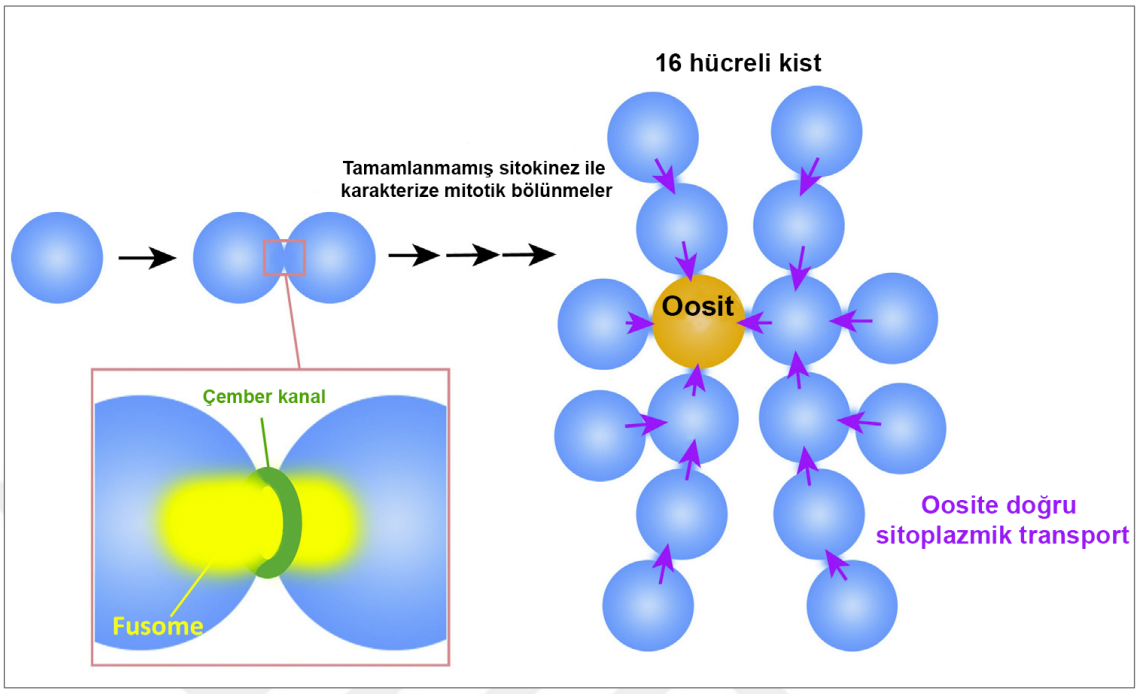


Şekil 2.4. Somatik ve germ hücre sitokinezinin şematik çizimi. A:Somatik hücrelerde mitoz bölünme sonucunda oluşan yavru hücreleri birbirlerine bağlayan hücreler arası köprüler sitoplazma bölünmesinin son basamağında ortadan kaldırılır. B:Gelişmekte olan germ hücrelerinde ise sitokinez evresinde hücreler arası köprüler yıkılmaz, kalıcı yapılara dönüşür.

Somatik hücre sitokinezinde görev alan moleküller hakkında günümüzde ayrıntılı bilgiye sahip olmamıza rağmen, germ hücrelerinde meydana gelen sitokinez ve hücreler arası köprüler hakkındaki bilgilerimiz kısıtlıdır (Greenbaum ve ark., 2006). Farklılaşmakta olan

germ hücrelerinde somatik hücrelerde izlenen orta cisimcik yapısal ve moleküler değişiklikler geçirerek, kalıcı yapılar olan hücreler arası köprülere dönüşür. Germ hücrelerinde aslında sitokinezin tamamlanmaması sonucu oluşan bu yapılar, gelişmekte olan germ hücreleri arasında geniş (0.3-5 μm), sitoplazmik köprüler kurulmasını sağlar, böylece germ hücre kist yapısı oluşur (Fawcett ve ark., 1959; Iwamori ve ark., 2010; Mishima ve ark., 2002) **(Şekil 2.4B)**. Birbirine bağlı germ hücrelerinin oluşturduğu kistler ilk olarak 19. yüzyılda Sertoli (1877) ve von Ebner (1878) tarafından tanımlanmıştır (Greenbaum ve ark., 2011). Dişi ve erkek gametogenezi sırasında germ hücreleri arasında izlenen bu hücreler arası sitoplazmik köprüler, farklı türlerde (*Drosophila*'dan fare ve insana) evrimsel süreçte korunmuştur (Greenbaum ve ark., 2011). Bu konu hakkında literatürde *Drosophila* ile yapılan çalışmalar, germ hücrelerindeki hücreler arası köprülerin yapı ve fonksiyonları ile ilgili temel bilgiler sunmaktadır.

Drosophila'da dişi germ hücreleri tek bir kurucu (founder) hücreden klonal olarak gelişir. Kurucu hücre, sitokinezini tamamlamadan arka arkaya 4 hücre bölünmesi geçirerek 16 hücreden oluşan kist yapısını oluşturur. Kistte bulunan hücreler birbirleri ile çapları 0.5μm ile 10μm arasında değişen sitoplazmik köprüler ile bağlıdır ve bu köprüler *Drosophila*'da çember kanal olarak adlandırılır. Gelişimin ilerleyen basamaklarında kistin içinden tek bir hücre, oosit oluşturmak üzere farklanırken, diğer 15 hücre ise destek hücrelerini (nurse cell) oluşturur. Kistteki 15 destek hücre bazı organeller (mitokondri, Golgi, endoplazmik retikulum, sentrozom) ve spesifik mRNA'larını çember kanal vasıtası ile oosite aktararak oositi destekler (de Cuevas ve ark., 1997) (**Şekil 2.5**).

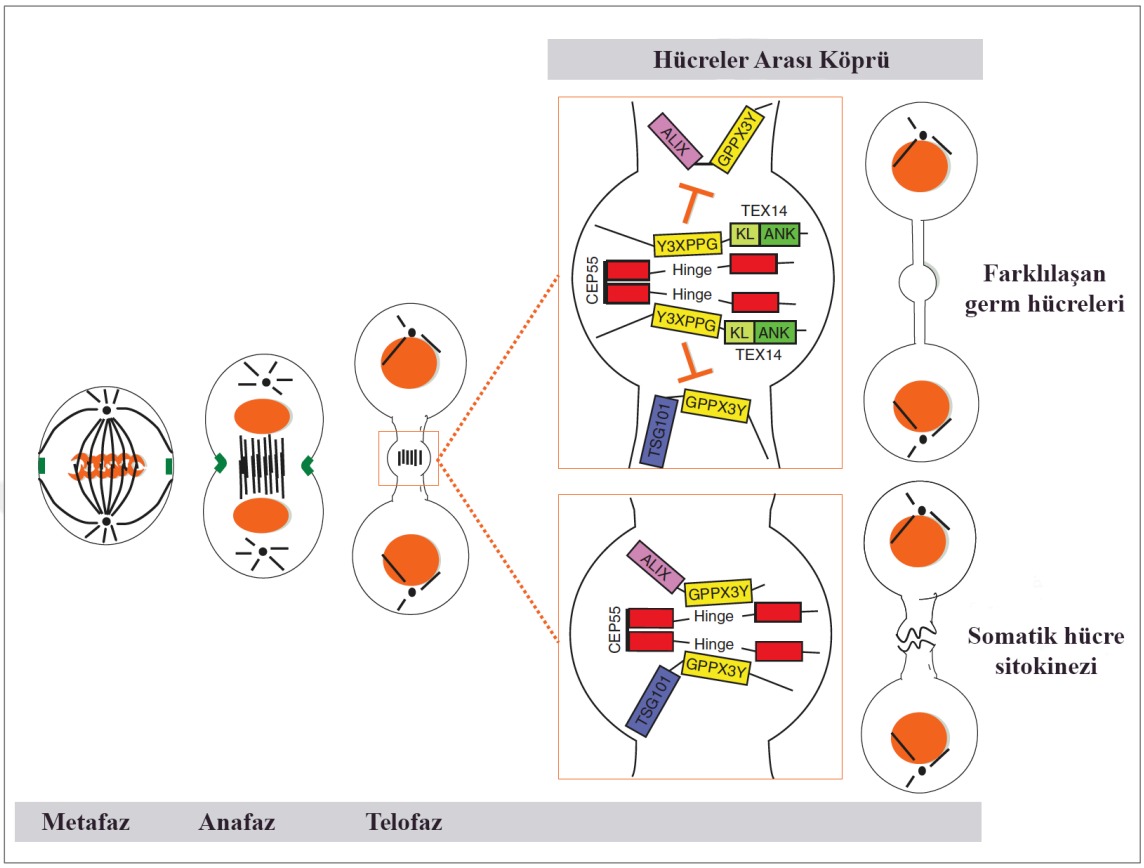


Şekil 2.5. *Drosophila* dişi germ hücrelerinde germ hücre kistinin oluşumu (Lu ve ark., 2017).

Drosophila'da fonksiyonları kapsamlı bir şekilde açıklanan, kisti oluşturan sitoplazmik köprüler, evrimsel olarak korunarak fare ve insan germ hücrelerinde varlığını sürdürmektedir. Türler arasında evrimsel olarak korunmaları hücreler arası köprülerin benzer yapı ve görevler üstelenecekleri ihtimalini akıllara getirse de bu iki türde dişi germ hücre gelişimi birçok açıdan farklılık gösterir. Bunlardan ilki *Drosophila*'dan farklı olarak memeli dişi germ hücrelerinin daha fazla ve değişken sayıda bölünmeler geçirerek kist yapısını oluşturmasıdır (Pepling ve Spradling, 1998). Ayrıca *Drosophila*'nın aksine farede germ hücre kist yapılarını oluşturan germ hücrelerinin sadece %33'ü gelişimin ilerleyen basamaklarına ilerleyerek primordial folikül yapısını oluştururken, geri kalan hücreler elimine edilir (Pepling ve Spradling, 2001). Bu farklar göz önünde bulundurulduğunda, günümüzde memeli fetal ovaryumlarda gelişmekte olan diploid germ hücreleri arasında izlenen hücreler arası köprü yapılarının görevleri belirsizliğini korumaktadır.

Memeli germ hücre gelişiminde kalıcı yapılar olarak izlenen hücreler arası köprülerin moleküler yapılarını açıklamak için yapılan çalışmalarla, bu köprü yapılarının genel sitokinez komponentlerini içermekle birlikte, TEX14 (Testis-expressed protein 14) adı verilen germ hücrelerine özel ilave proteinler de içerdiği belirlenmiştir (Greenbaum ve ark., 2006). Genetik olarak 'knock out' teknolojisi ile *Tex14* genin çıkartılması sonucunda

oluşturulan fare soylarında (*Tex14*$^{-/-}$) farklılaşmakta olan germ hücreleri arasında hücreler arası köprülerin fetal ve yetişkin dönemde oluşmadığı belirtilmiştir (Greenbaum ve ark., 2009; Greenbaum ve ark., 2006). TEX14 her iki cinsiyette de germ hücrelerinde kalıcı olan hücreler arası köprülerin sürdürülebilmesi için gerekli inaktif bir kinazdır (Greenbaum ve ark., 2011). TEX14, somatik hücrelerde de sitokinez esnasında görev alan CEP55 (Centrosomal protein 55 kDa) ile etkileşime girerek, germ hücrelerinde kalıcı hücreler arası köprülerin oluşumuna katılır. Fizyolojik süreçte, CEP55 somatik hücrelerde sitokinez esnasında orta cisimcikte lokalize olarak alt hedefindeki ALIX (ALG-2 interacting protein X) ve TSG101 (Component of endosomal sorting complex required for transport-1) ile GPPX3Y (Glycine (G)-proline (P)-proline (P)-X-X-Xtyrosine(Y)) motifleri aracılığı ile bağlanır **(Şekil 2.6)**. Bu bağlantının sağlanması, somatik hücrelerde sitokinezin tamamlanmasını, hücreler arası köprülerin ortadan kalkmasını ve oluşan iki yavru hücrenin birbirinden ayrılmasını sağlar. Farklılaşan germ hücrelerinde bulunan TEX14 proteini ise, içerdiği GPPX3Y motifi sayesinde CEP55 ile etkileşerek, CEP55'in ALIX ve TSG101 ile etkileşime girmesini bloklar. ALIX ve TSG101 proteinlerinin CEP55 ile bağlantı kuramaması nedeniyle sitoplazmik köprüler ortadan kaldırılamaz, sitokinezin tamamlanması engellenir ve sonuç olarak dişi ve erkek germ hücreleri arasında kalıcı hücreler arası köprüler kurulur (Iwamori ve ark., 2010).



Şekil 2.6. Fare germ hücrelerinde hücreler arası köprüler ve TEX14 proteininin ilişkisini gösteren çizim (Greenbaum ve ark., 2011).

Tex14$^{-/-}$ farelerin oluşturulduğu ve söz konusu mutant farelerin hücreler arası köprü yapılarını içermediğinin rapor edildiği ilk çalışmada, *Tex14*$^{-/-}$ erkek farelerin normal çiftleşme davranışı göstermesine ve testosteron seviyelerine sahip olmasına rağmen steril olduğu belirtilmiştir. Yapılan histolojik analizlerin sonucunda, *Tex14*$^{-/-}$ yetişkin testislerin *Tex14*$^{+/-}$ (heterozigot) ya da yabanıl tip testislerden daha küçük olduğu, seminifer tübüllerde daha az sayıda geç mayotik (pakiten ve diploten spermatosit) germ hücresi içerdiği belirtilmiştir. Aynı zamanda yetişkin testiste bulunan germ hücrelerinde artan vakuolizasyon dikkat çekmiştir. Spermatogenezde izlenen bu bozulmanın nedenini belirlemek için gelişimin erken dönemlerinde testis incelendiğinde, PN21 gün testislerde şiddetli dejenerasyon, spermatosit sayısında azalma ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon izlenmiştir. *Tex14*$^{+/-}$ testislerin seminifer epitelinde yuvarlak spermatidlerin yaygın olarak izlenmesine rağmen, *Tex14*$^{-/-}$ testislerde spermatid gözlenmemiş, ağırlıklı olarak preleptoten-leptoten spermatositler ile az sayıda zigoten spermatosit olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, testiste TEX14 proteini ve farklılaşan germ hücreleri arasında köprü yapılarının olmadığı durumda, erken dönem spermatogenezde mayoz bölünmenin tamamlanamadığı ve apoptoz düzeyinin arttığı bildirilmiştir. Gelişimin ilerleyen dönemlerde ise belirtilen fenotipin daha şiddetli olduğu ve sterilite ile sonuçlandığı rapor edilmiştir (Greenbaum ve ark., 2006).

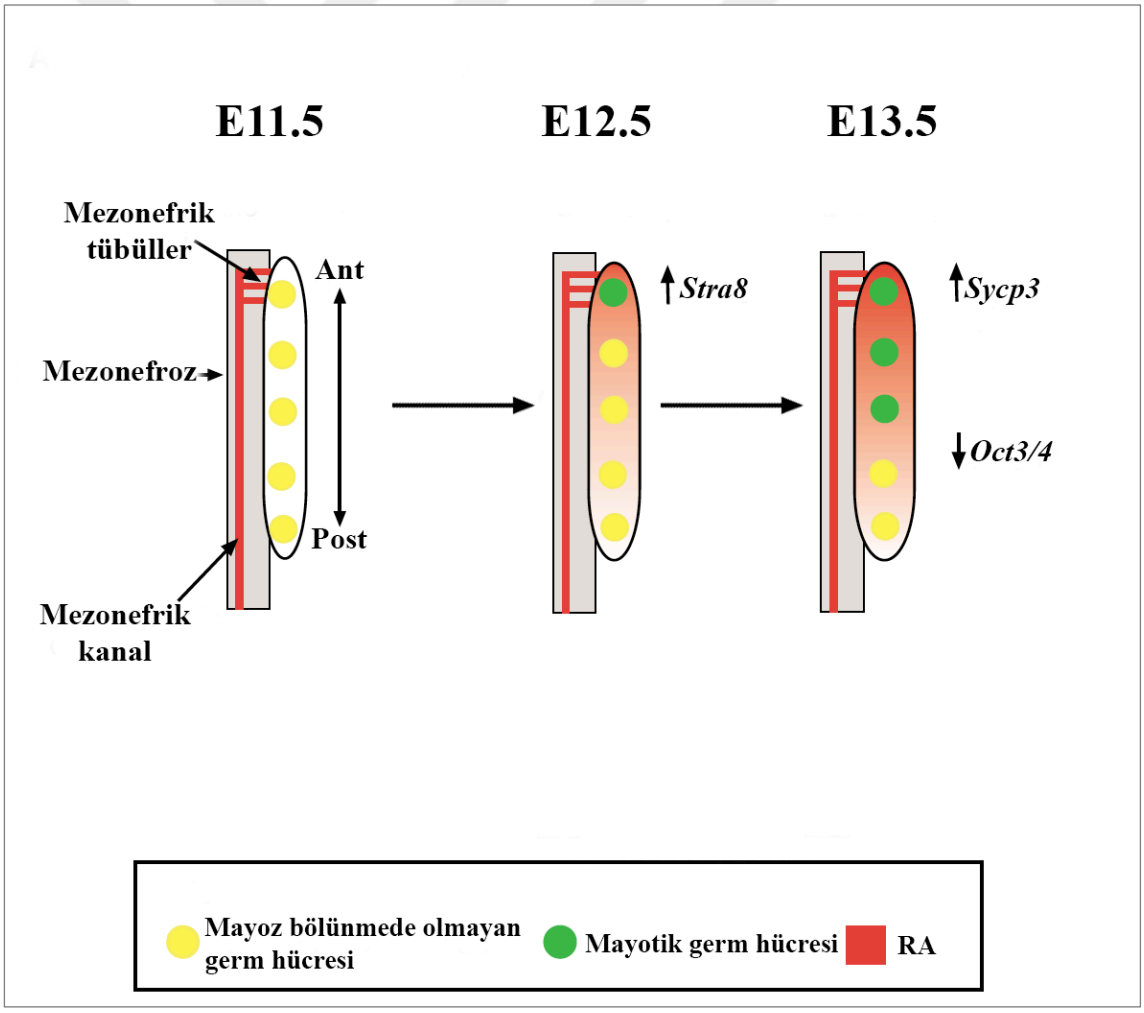
Literatürde takip eden yıllarda aynı grup tarafından yapılan başka çalışma ile, *Tex14*$^{-/-}$ dişi germ hücreleri arasında da hücreler arası köprü yapılarının bulunmadığı ve *Tex14*$^{-/-}$ neonatal ovaryumlarda yabanıl tipe kıyasla daha az sayıda oositin bulunduğu belirtilmiştir. Söz konusu çalışmada, *Tex14*$^{-/-}$ ve yabanıl tip embriyolarda E11.5 (germ hücreleri göçünü tamamlayıp, genital kabartıya yerleştiğinde) ve E18.5 (germ hücre kistlerinin yıkımından hemen önce)'ta germ hücre sayısında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. İlginç olarak, dişi farelerin fertil olduğu ancak her bir doğumda elde edilen yavru sayısının *Tex14*$^{+/-}$ ve yabanıl tip ovaryumlara kıyasla daha az olduğu ortaya konulmuştur (Greenbaum ve ark., 2009). *Tex14*$^{-/-}$ dişi germ hücrelerinde hücreler arası sitoplazmik köprülerin yokluğunda görülen sub-fertilitenin germ hücre gelişimi süresince hangi mekanizmaların aksaması nedeni ile ortaya çıktığı ise günümüzde belirsizliğini korumaktadır.

2.2.2. Fetal Ovaryumda Mayoz Bölünme ve Mayozun Senkronizasyonu

Fetal ovaryumda bulunan germ hücrelerinin mayoz bölünmeye başlamasında, Retinoik Asit'in (RA) kritik bir faktör olduğu bilinmektedir. RA, embriyonun Anterior-Posterior (AP) ekseni boyunca embriyoyu oluşturacak yapıların yerlerinin tanımlanmasında önemli rol oynar. Ürogenital sistem gelişimi sürecince RA ağırlıklı olarak ovaryumda değil, ovaryuma komşu olan mezonefroz tarafından üretilir. Mezonefrik kanal ve tübüllerden üretilen RA küçük bir molekül olduğu için difüzyon ile ovaryumdaki hücreler üzerinde etki gösterebilir. Genellikle parakrin etki gösteren RA'in depolanması ve retinol (ROL) oksidasyonu bir hücre tipinde gerçekleşirken, ikinci hücre tipi RA'in etkisini göstereceği hedef (germ) hücresidir.

ROL'ün RA'e dönüştürülmesi için öncelikle alkol dehidrojenazlar (ADH) aracılığı ile ROL'den retinaldehid (RETALDH) üretilir. Ardından, aldehid dehidrojenaz (ALDH, özellikle ALDH1A2 ve ALDH1A3) enzimi ile RETALDH'den RA üretilir. Fetal

ovaryuma komşu olan mezonefrozda üretilen RA, ovaryumun anterior'ünden (mezonefrik tübüllere komşu ovaryum bölgesi) posterior'üne (AP) doğru dalga şeklinde yayılır ve hedef germ hücrelerinin nükleusunda Retinoik Asit Reseptör (RAR)'ü ve Retinoid X Reseptör (RXR)'üne bağlanır. Oluşan RA:RAR/RXR kompleksi RA yanıt elementine (Retinoic Acid Response Element-RARE) bağlanarak dişi germ hücrelerinde pre-mayotik DNA replikasyonundan sorumlu ve mayotik profazın I (MPI)'in erken evrelerinde görev alan *Stra8* (Stimulated by retinoic acid gene 8)'in ifade edilmesini sağlar (Bowles ve Koopman, 2007; Bullejos ve Koopman, 2004; Duester, 2008; Menke ve ark., 2003). Böylece RA dişi fetal germ hücrelerinde mayozun anterior'den posterior'e (AP) doğru dalga halinde yayılmasını sağlar **(Şekil 2.7)**.



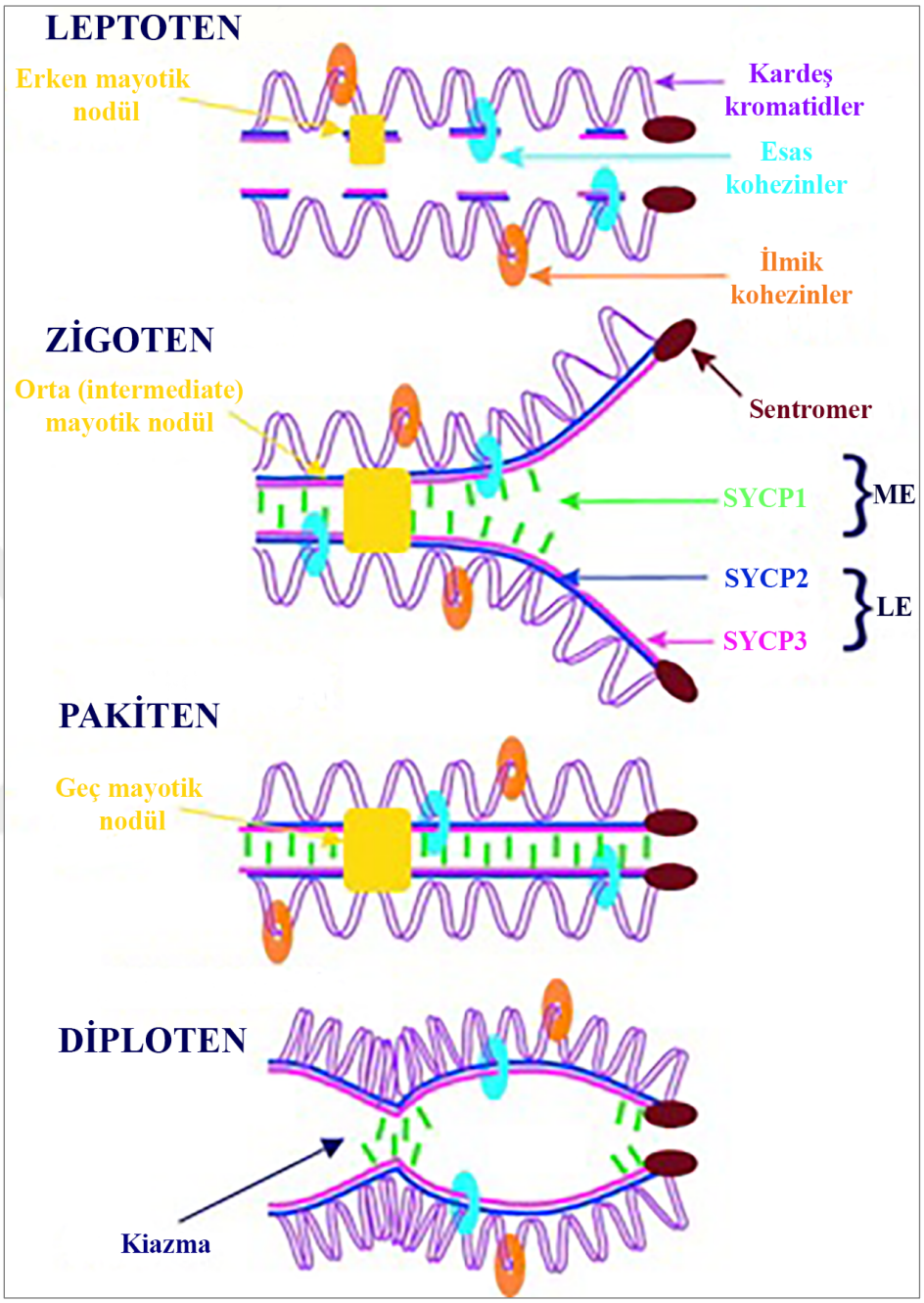
Şekil 2.7. Embriyonik ovaryumda anterior'den posterior'e mayotik dalganın yayılmasını gösteren şematik çizim. (Bowles ve Koopman, 2007)'den modifiye edilmiştir.

RA ve fetal ovaryumda mayoz bölünmelerin başlatılması arasındaki ilişki literatürde yapılan çalışmalar ile ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasına rağmen, Kumar ve ark. (2011)'nın yaptıkları çalışma fetal ovaryumda mayozun başlatılması ve RA ilişkisi hakkında farklı mekanizmaların olabileceğini akıllara getirmiştir. Söz konusu çalışmada, mezonefrozda gerçekleşen RA sentezinden sorumlu olan ALDH1A2 ve/veya ALDH1A3 enzimlerini üretmeyen mutant fareler oluşturulmuş (*Aldh1a2*$^{-/-}$ ve *Aldh1a3*$^{-/-}$) ve söz konusu modelde embriyolarda mezonefrozda RA sentezininin olmadığı teyid edilmiştir. *Aldh1a2*$^{-/-}$ ve *Aldh1a3*$^{-/-}$ embriyolarda mezonefrozdan ovaryuma doğru RA gradiyenti olmamasına rağmen, mutant farelerde ovaryumdaki germ hücrelerinin mayoz bölünmeye girdiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda mezonefrozda ALDH1A2 ve ALDH1A3 enzimleri tarafından üretilmeyen, fakat ovaryuma difüz olan şimdiye kadar tanımlanmamış farklı aday molekül ya da moleküllerin mayozun senkronizasyonunda rol oynayabileceği belirtilmiştir (Kumar ve ark., 2011). Son yıllarda Bowles ve ark. (2016) tarafından yapılan bir çalışmada ise ALDH1A2 ve ALDH1A3'den farklı olarak, RA sentezinde görev alan yeni bir enzim, ALDH1A1, tanımlanmış ve bu enzimin mezonefrozda değil, ovaryumda üretildiği gösterilmiştir. ALDH1A1'in ALDH1A2 ve ALDH1A3 yokluğunda RA üretiminden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Bowles ve ark., 2016). Tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda söz konusu RA ve mayoz bölünmenin dişi germ hücrelerinde başlatılması arasındaki ilişki literatürde uzun yıllardır kabul görmesine rağmen, RA'in mayoz bölünmenin senkronizasyonunun tek düzenleyicisi olup olmadığı hakkında yapılan çalışmalar ise devam etmektedir (Bowles ve Koopman, 2007).

2.2.3. Dişi Fetal Germ Hücrelerinde Mayotik Profaz I'in Evreleri ve Mayotik Duraklama

Dişi germ hücreleri genital kabartıya ulaştıktan kısa süre sonra başlayan mayoz bölünmenin leptoten evresinde öncelikle homolog kromozomlar arasında sinaptonemal kompleksin lateral elementleri olan SYCP3 (Synaptonemal Complex Protein 3) ve SYCP2 (Synaptonemal Complex Protein 2) lokalize olur (Cohen ve Holloway, 2010). Bu evrede (yaklaşık E14.0) germ hücrelerinde DNA çift zincir kırıkları oluşur (Cohen ve ark.,

2006; Elkouby ve Mullins, 2017; Keeney ve ark., 1999). Leptoten evresinin ardından zigoten evresinde sinaptonemal kompleksin merkezi (central) elementi SYCP1 (Synaptonemal Complex Protein 1) homolog kromozomlar arasında lokalize olmaya başlar ve pakiten evresinde SYCP1 kesintisiz bir şekilde homolog kromozomlar arasında bulunur. E15 ve E16 günlerden başlayarak zigoten ve pakiten evresinde DNA çift zincir kırıklarına sahip homolog kromozomlarda sinaps meydana gelir. Diploten evresinde, merkezi element SYCP1'in yıkımı başlar, kardeş olmayan kromatidler arasında parça değişimi (crossing-over) olur. Yaklaşık E18.5 günde parça değişimi sonlandıktan sonra desinaps meydana gelir ve mayoz I'in diploteninde mayotik duraklama (arrest) gerçekleşir (Cohen ve Holloway, 2010; Cohen ve ark., 2006) (**Şekil 2.8**).



Şekil 2.8. Farede Profaz I boyunca sinaptonemal kompleks oluşumu ve kromozom yapısını gösteren şematik çizim. ME: merkezi element, LE:lateral element (Morelli ve Cohen, 2005).

Germ hücrelerinde mayozun AP dalga halinde başlaması (leptoten evresine giriş)'in ardından, mayoz bölünmenin ilerlemesi (zigoten, pakiten ve diploten evrelerinin gerçeklemesi)'nin AP'e doğru yayılan dalga şeklinde olup olmadığı bilinmemektedir. DNA çift zincir kırıklarının leptoten evresinde oluştuğu ve DNA çift zincir kırıklarının hücreleri DNA hasarı başta olmak üzere çevresel hasara daha duyarlı yaptığı göz önünde

bulundurulduğunda (Marangos ve Carroll, 2012), leptoten evresine önce giren germ hücrelerinin diploten evresine de önce ulaşması ve mayotik duraklamaya önce girmesi oldukça önemlidir. Ayrıca dişi germ hücrelerinde diploten evresinde meydana gelen mayotik duraklamanın da ovulasyondan önce hormonal artış ile ortadan kalktığı ve fertilizasyona kadar diğer bir duraklamanın meydana geldiği düşünüldüğünde dişi germ hücrelerinde mayoz bölünme farede aylar ve insanda ise yıllar sonra tamamlanır (Whitaker, 1996). Mayoz bölünmenin uzun ve karmaşık bir süreç olması dişi germ hücrelerini hata yapmaya açık hale getirmektedir (Jones ve Lane, 2013).

Literatürde yapılan bir çalışma ile kontrol fare fetal ovaryumunda, germ hücrelerinin yaklaşık %17'si E18.5'de DNA çift sarmal kırıkları ve eşleşmemiş mayotik kromatine sahipken, %8'inde de tamamlanmamış homolog kromozom sinapsı belirlenmiştir. Ayrıca E18.5 günde germ hücrelerinin yaklaşık %18'inde eşleşmeyen kromatinlerde mayotik suskunluk belirlenmiştir. Germ hücrelerinde doğru zamanda oluşması gereken bu kromozom kırıkları mayotik rekombinasyon ve sonrasında gerçekleşen homolog kromozomların ayrılması için gereklidir. Diğer yandan DNA hasarının en zararlı formu olarak bilinen DNA çift sarmal kırıklarının (Ciccia ve Elledge, 2010), gelişim boyunca olmaması gereken dönemde hala varlığını koruması (örneğin E18.5) fetal germ hücre gelişiminde anormal kromozom yapıları ve defektif oositlerin oluşmasına neden olabilmektedir (Voelkel-Meiman ve ark., 2015).

2.2.4. Dişi Fetal Germ Hücrelerinde Apoptoz

Ovaryumda programlı hücre ölümü aracılığı ile germ hücre eliminasyonu oogenezin tüm evrelerinde gerçekleşmektedir. Programlı hücre ölümü ile ovaryumda meydana gelen dramatik germ hücre kaybının nedeni ve muhtemel mekanizması günümüzde hala belirsizliğini korumaktadır. Post-natal ovaryumda oosit eliminasyonu foliküler atrezi şeklinde ovulasyon siklusunda görülmekle birlikte, germ hücrelerinin kontrollü olarak apoptoz ile ortadan kaldırılmasının fetal dönemde ağırlıklı olarak gerçekleştiği belirtilmiştir (Aitken ve ark., 2011).

Fetal dönemde germ hücre apoptozu temel olarak iki dalga halinde gerçekleşir. İlk dalganın germ hücrelerinin mayoz bölünmeye başladığı E13.5-E15.5'de etkili olduğu bilinmektedir. Bu dönemde, apoptoz özellikle MPI'in pakiten evresindeki germ

hücrelerinde gerçekleşir. İkinci dalga ise yaklaşık E17.5 ya da E18.5 günde başlayarak doğumun gerçekleştiği günler arasında, yani kist yapılarının yıkıldığı dönemde izlenir (Coucouvanis ve ark., 1993; Ratts ve ark., 1995). Kist yapılarının yıkıldığı dönemde gerçekleşen oosit ölümünü yöneten mekanizmalar detaylı olarak aydınlatılmamasına rağmen, apoptoz aracılı programlı hücre ölümünün bu süreçte rolü olabileceği düşünülmektedir.

Gelişim boyunca germ hücre kaybının muhtemel nedenini açıklamak için literatürde üç farklı hipotez bulunmaktadır. İlk hipotez, kısıtlı trofik faktörler nedeni ile germ hücrelerinin apoptoz ile ortadan kaldırıldığı yönündedir. Birçok hücre tipinde olduğu gibi germ hücrelerinin gelişimi ve hayatta kalımı da büyüme faktörlerine bağlıdır. Germ hücre gelişiminde trofik faktörlerin (LIF; Leukemia inhibitory factor, KIT; tyrosine kinase type III receptor ve SCF; Stem cell factor) kısıtlı temini oositlerin apoptoz ile ortadan kaldırılıp kaldırılmayacağını belirleyebilir (De Felici ve Dolci, 1991; Huang ve ark., 1990; Zsebo ve ark., 1990). Bir diğer hipotez, apoptoz ile genetik ya da mayotik eşleşme hatalarına sahip germ hücrelerinin elenerek oosit kalitesinin garanti edildiği bir seçim mekanizmasının olduğudur (Tilly, 2001). Böylece oosit kaynaklı genetik hataların diğer nesillere aktarılması engellenir. Son olarak, literatürdeki üçüncü hipotezde ölen germ hücrelerinin hayatta kalacak oosite besin ve enerji sağlayarak destek (nurse) hücreler gibi işlev gördüğünü ve ardından ortadan kaldırıldığını savunmaktadır (Pepling ve Spradling, 2001). Son yıllarda Lei L. ve ark (2016) tarafından yapılan bir çalışma ile germ hücre kistini oluşturan bazı hücrelerin organel ve sitoplazmalarının bir kısmını kist içindeki belirli oositlere aktardığı gösterilmiştir (Lei ve Spradling, 2016). Söz konusu hipotezlerin hiçbiri tek başına etkili bir şekilde oosit kaybını açıklayamamaktadır. Bu hipotezlerin birlikte kombinasyonlarının ovaryumda gözlenen dramatik germ hücre kaybında rol oynaması muhtemeldir (Sun ve ark., 2017).

Ovaryumda BCL2 ailesine ait birçok üyenin fetal ve neonatal germ hücrelerinin sağ kalımının düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Apoptozu düzenleyen B-hücresi lenfoma/lösemi-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2 ‘BLC2’) ailesi üyeleri pro-apoptotik (BAX, BAK ve BAD) ve anti-apoptotik (BCL2, BCLX ve MCL1) olmak üzere iki grupta incelenir (Kim ve Tilly, 2004). *Bcl2* mutant (*Bcl2*$^{-/-}$) yetişkin ovaryumlarda yabanıl tip

ovaryumlardan daha az sayıda oosit bulunması BCL2'nin oosit hayatta kalımı için önemli olduğunu işaret etse dahi, söz konusu mutant ovaryumlarda oosit kaybının ne zaman olduğu bilinmemektedir. Anti-apoptotik faktör olan BCL2'nin germ hücrelerinde normalden fazla ifade edilmesi (overekspresyon) transgenik PN8 ovaryumda yabanıl tipe kıyasla normalden daha çok germ hücresi bulunmasına neden olmakla birlikte, PN60'da transgenik ovaryum ve yabanıl tip ovaryumda benzer sayıda oosit bulunduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, BCL2'nin germ hücrelerinde normalden fazla ifadesi doğumda primordial folikül sayısında artışa neden olmuş fakat bu oositler post-natal hayatta korunamamıştır. Söz konusu bulgular ovaryumda programlı hücre ölümü ile germ hücre eliminasyonunun düşünüldüğünden daha kompleks olduğunu göstermektedir. Bir başka çalışmada, pro-apoptotik faktör olan BAX (Bcl-2-like protein 4)'ün bulunmadığı mutant neonatal ovaryumlarda yabanıl tipe oranla daha fazla oositin bulunduğu, ayrıca germ hücrelerinin hala kist yapısı içerisinde bulunduğu ortaya konulmuştur. Bu bilgiler apoptoz ve kist yıkılmasının arasında ilişki olduğuna işaret etmektedir. Kist yıkılması ve primordial folikül formasyonunun uyum içinde gerçekleştiği göz önünde bulundurulduğunda, fetal ovaryumda meydana gelen apoptozun primordial folikül havuzunun oluşumunu etkilemesi kaçınılmazdır.

2.2.5. Fetal Ovaryumda Germ Hücre Kistlerinin Yıkılması ve Primordial Folikül Oluşumu

Fare ovaryumlarında perinatal dönemde meydana gelen ikinci apoptotik dalga ile germ hücre kist yıkımı ve primordial folikül oluşumunun ovaryum gelişiminde dar bir zaman çerçevesinde benzer dönemlerde meydana gelmesi söz konusu süreçlerin ilişkili olduğu ve gelişimsel olarak düzenlendiğini ihtimalini akıllara getirmektedir (Pepling, 2006). Kist yıkımı boyunca, kisti oluşturan bazı hücreler programlı hücre ölümü ile ortadan kaldırılırken, germ hücrelerinin yalnızca üçte biri gelişimine devam ederek primordial folikülleri oluşturur. Literatürde bu konu hakkında belirtilen bir modele göre ovaryumda bulunan büyük bir germ hücre kistinde bir hücrenin ölmesi ile daha az sayıda germ hücresi içeren iki ayrı kist oluşur. Kistte meydana gelen bu küçülme birkaç tane bağımsız oosit kalana kadar devam eder, pre-granüloza hücrelerinin oositlerin etrafını sarması ile primordial foliküller oluşur. Diğer bir model ise kisti oluşturan bazı germ hücrelerinin

ileride oositi oluşturacak germ hücresini gelişimsel süreçte destekleyerek kist yıkımında apoptoz ile ortadan kaldırıldığıdır (Lei ve Spradling, 2016; Pepling, 2012).

Söz konusu kist yıkımı ve primordial foliküllerin oluşması fetal/neonatal ovaryumda bölgesel olarak farklılık gösterir. Kist yıkılması ve primordial folikül formasyonu ovaryumun medullar kısmında yaklaşık E17.5 günde (doğumdan önce) başlarken, kortikal bölgede kist yıkımı doğumdan sonra gerçekleşir (Pepling ve ark., 2010). Literatürde bugüne kadar yapılan çalışmalar ile ovaryumda kist yıkımı ve primordial folikül formasyonun çeşitli transkripsiyon faktörleri ve sinyal yolakları ile sıkı bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir (Grive ve Freiman, 2015).

2.2.6. Germ Hücre Kistlerinin Yıkımı ve Primordial Folikül Oluşumunda Rol Oynayan Transkripsiyon Faktörleri

Literatürde kist yıkım sürecinde rol oynayan bazı transkripsiyon faktörleri mutant fare çalışmaları ile tanımlanmıştır. Temel sarmal-ilmik-sarmal (helix-loop-helix) transkripsiyon faktörlerinden FIGLA (Factor in the Germline Alpha) içermeyen *Figla* mutant (*Figla*$^{-/-}$) dişi farelerde germ hücre gelişimi embriyogenezin ilk dönemlerinde normal olmasına rağmen, *Figla*$^{-/-}$ neonatal ovaryumda primordial foliküllerin oluşmadığı ve *Figla*$^{-/-}$ dişi yetişkin farelerin steril olduğu rapor edilmiştir (Soyal ve ark., 2000). İnsan da ise *FIGLA*'nın kaybı permatür ovaryan yetmezlik ile ilişkilidir (Tosh ve ark., 2015; Zhao ve ark., 2008). Ovaryum gelişiminde etkili olan bir diğer transkripsiyon faktörü olan NOBOX (Newborn Ovary Homeobox)'u içermeyen ovaryumlarda da kist yıkımı sürecinde oosit ve somatik hücreler arasındaki anormal sinyalleşme nedeni ile somatik hücrelerin germ hücre kistine invaze edemediği gösterilmiştir. Bu nedenle, *Nobox*$^{-/-}$ ovaryumlarda primordial foliküllerden ziyade sinsisyal folikülllerin olduğu rapor edilmiştir (Lechowska ve ark., 2011). Söz konusu çalışmalar gen ekspresyonun düzenlenmesinin birçok gelişimsel süreçte olduğu gibi kist yıkımı ve primordial folikül formasyonu için de kritik olduğunu işaret etmektedir.

2.2.7. Germ Hücre Kistlerinin Yıkımı ve Primordial Folikül Oluşumunda Rol Oynayan Sinyal Yolakları

Transkripsiyon faktörlerine benzer olarak, sinyal yolaklarının karşılıklı etkileşimi kist yıkımı ve primordial folikül oluşumu için oldukça önemlidir. Gelişim sırasında önemli rol

oynayan sinyal yolaklarından Notch sinyal yolağının ovaryumda germ hücre kist yıkımı ve primordial folikül formasyonunda görev aldığı son yıllarda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Fetal ve neonatal ovaryumların gamma sekretaz inhibitörleri ile kültüre edilmesi primordial folikül formasyonunu dramatik şekilde azaltarak, MPI'in gecikmeli olarak ilerlemesine neden olur (Chen ve ark., 2014; Feng ve ark., 2014). Bununla birlikte, ovaryumda Notch sinyal yolağının inhibe edilmesi *Figla* ve *Nobox* gibi ovaryum gelişimi için kritik transkripsiyon faktörlerinin azalmasına neden olarak, sinyal yolakları ve transkripsiyonal düzenlenmenin karşılıklı olarak gerçekleştiğini de işaret etmektedir (Chen ve ark., 2014). Germ hücre gelişiminde kritik role sahip KIT sinyalinin fare primordial folikül formasyonunda da düzenleyici rolü olduğu Jones ve Pepling (2013)'in yaptığı çalışma ile gösterilmiştir. KIT ligand (SCF) oosit membranında yüksek düzeyde ifade edilmektedir. Ovaryum kültüründe KIT'in peptid inhibisyonu primordial folikül formasyonunda azalamaya neden olurken, KIT ligand'ın kültür ortamına eklenmesi primordial folikül formasyonunu pozitif yönde etkilemektedir (Jones ve Pepling, 2013).

Dişi üreme sistemi fonksiyonel anlamda olgun germ hücresi oluşturabilecek kapasitede kök hücre kaynağından yoksundur. Bu nedenle oositlerin arasındaki hücreler arası köprülerin yıkımı ve kistin dağılmasından sonra hayatta kalan ve primordial folikülleri oluşturan oositler dişi üreme hayatında sahip olunan tüm ovaryan rezervi temsil etmektedir. Bu nedenle gelişimin en erken dönemlerinden itibaren dişi germ hücre gelişiminin koordinasyonu ve kaliteli gelişiminde etkili olan mekanizmaların açıklanması dişi üreme sistemi için oldukça kritiktir.

2.3. Hipotez ve Amaç

Fare primordial germ hücreleri fetal ovaryuma ulaştıktan hemen sonra oluşmaya başlayan ve primordial folikül havuzunun oluşumundan önce ortadan kaldırılan germ hücre kistindeki hücreler arası sitoplazmik köprülerin, dişi diploid fetal germ hücre gelişimindeki rolü hakkında literatürde kesin bir bilgi bulunmamaktadır.

Dişi fetal germ hücre gelişiminde hücreler arası köprülerin rolünün aydınlatılması için; 'Fetal germ hücrelerinde hücreler arası köprülerle sağlanan iletişim, ovaryumda mayotik dalganın yayılmasına olanak sağlar ve apoptoz düzeyini değiştirir' hipotezini kurduk.

Hipotezimiz doğrultusunda amacımız; fare fetal dişi germ hücre gelişiminde, germ hücreleri arasında görülen sitoplazmik köprülerin, mayozun senkronizasyonu ve oosit gelişimini nasıl etkilediği sorusuna cevap aramaktır. Çalışmamızda, fetal ovaryumda diploid germ hücreleri arası izlenen bu hücreler arası köprülerin fonksiyonlarını açıklayabilmek için; yabanıl tip ve knock out teknolojisi ile *Tex14* geni çıkartılmış (germ hücreleri arasında hücreler arası köprüler bulunmayan) mutant fare soyları kullanılarak fetal ovaryumda dişi germ hücre gelişimi farklı açılardan değerlendirildi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *Tex14* Mutant Hayvan Modeli

Germ hücreleri arasında hücreler arası köprü içermeyen, literatürde daha önce Greenbaum ve ark. tarafından etkinliği kanıtlanmış *Tex14*$^{-/-}$ fare modeli kullanıldı (Greenbaum ve ark., 2006) . *Tex14*$^{-/-}$ erkek fareler steril olduğu için *Tex14*$^{+/-}$ erkek ve *Tex14*$^{+/-}$ dişi fareler çiftleştirilerek (heterozigot çaprazlama) Tex14 fare kolonisi oluşturuldu. Tex14 fare kolonisinde germ hücrelerine özgül, kalıcı olarak geliştirilmiş yeşil floresan protein (enhanced Green Fluorescent Protein-eGFP) ifade eden fare soyların oluşturulması için *Tex14*$^{+/-}$ erkek fareler *Oct4-ΔPE-eGFP (Oct4-GFP)* homozigot transgenik dişi fareler ile çiftleştirildi. Elde edilen soylar *Oct4-GFP*$^{+}$*; Tex14*$^{+/-}$ fareler elde edilene kadar çiftleştirilerek germ hücrelerine özgül, kalıcı olarak eGFP ifade eden fare soyları oluşturuldu. Tez projesinde deney hayvanlarının kullanımı ile ilgili izin California Üniversitesi San Francisco (UCSF), Kurumsal Hayvan Bakım ve Kullanım Kurumu (Institutional Animal Care and Use Committee-IACUC)'den alındı (protokol no: AN169770-01D).

3.2. Genotipleme İçin Yetişkin Fare ve Embriyolardan DNA izolasyonu

Tex14 fare kolonisinin devamlılığını sağlamak amacı ile üretimde kullanılacak yetişkin farelerin kulak kepçesinden klips yardımı ile yaklaşık 2 mm çapında deri örnekleri alınarak 0.2 ml'lik PCR tüplerine (#3412A, Molecular Bio Products) aktarıldı. Deneye dahil edilecek embriyo ve yavruların ise kuyruklarından yaklaşık 0.2 cm doku parçaları 0.2 ml'lik PCR tüplerine (#490004-430, VWR) aktarılarak aşağıda belirtilen solüsyonlar ile DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.3. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Malzemeler

- **10N NaOH:** 400 g NaOH (#BP359-500, Fisher Scientific) 800 ml distile suda çözülerek hazırlandı.

- **0.5M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid):** 93.05 g EDTA (#161-0729, BioRad) 200 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü.

Solüsyona NaOH eklenerek pH=8.0 olacak şekilde ayarlandı. Hacim 500 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

- **Alkalin lizis solüsyonu**: 125 µl 10N NaOH ve 20 µl 0.5M EDTA 50 ml'lik Falcon tüpünün içerisinde karıştırıldı. Total hacim 50 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

- **Nötralizasyon Tampon Solüsyonu:** 325 mg Tris-HCl (#BP153-1, Fisher Scientific) 50 ml distile suyun içerisinde çözüldü.

Deri ya da kuyruk örneği içeren her PCR tüpüne 75 µl Alkalin lizis solüsyonu eklenerek 95˚C'de örnekler 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler +4˚C'ye kadar soğutuldu ve 75 µl Nötralizasyon Tampon Solüsyonu eklendi, vorteksleme yapılarak örneğin homojen şekilde PCR tüpü içerisinde dağılması sağlandı. Elde edilen DNA örnekleri +4˚C'de muhafaza edildi.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Metodu ile Genotipleme

Heterozigot çaprazlama sonucu elde edilen fareler yabanıl tip (1/4 ihtimalle), heterozigot (1/2 ihtimalle) ve mutant (1/4 ihtimalle) olabileceği için, izole edilen DNA örnekleri kullanılarak *Tex14* genine spesifik genotipleme yapıldı. *Tex14* yabanıl tip ve mutant gen bölgesine spesifik primer dizileri (**Tablo 3.1**) kullanılarak PCR reaksiyonu **Tablo 3.2**'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.1. Genotipleme için kullanılan yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) primer dizileri.

Tex14$^{+/+}$ İleri (Forward)	5'-GAC GGT ACT CCT GCTCTT GG-3'
Tex14$^{+/+}$ Geri (Reverse)	5'-GAC AGC CAG GGG TTA CAG AG-3'
Tex14$^{-/-}$ İleri (Forward)	5'-GTA CCT TCT GAG GCG GAA AG-3'
Tex14$^{-/-}$ Geri (Reverse)	5'-GGG TGG TTC AGA GCC ATC TA-3'

Tablo 3.2. Yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) *Tex14* geni için PCR reaksiyonu.

10X TopTaq Tamponu (#200205, Qiagen)	1.5 µl
2mM dNTPs (#201901, Qiagen)	0.3 µl
10µM İleri Primer Mix (5µM Yabanıl tip ve 5µM Mutant)	0.5 µl
10µM Geri Primer Mix (5µM Yabanıl tip ve 5µM Mutant)	0.5 µl
TopTaq DNA Polimeraz enzimi (#200205, Qiagen, 5 units/µl)	0.1 µl
Distile su	11.1 µl
Genomik DNA	1 µl
Toplam	**15µl**

Her bir PCR reaksiyonunda daha önce *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ olduğu genotipleme ile kanıtlanmış DNA örnekleri pozitif kontrol olarak, DNA örneği yerine sadece distile suyun eklendiği reaksiyon tüpleri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Eppendorf Mastercycler ep gradient S ısı döngüleyici (Thermal cycler) cihazında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) **Tablo 3.3**'te belirtildiği gibi kuruldu.

Tablo 3.3. Yabanıl tip (*Tex14*$^{+/+}$) ve mutant (*Tex14*$^{-/-}$) *Tex14* geni için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları.

Derece	**Süre**	**Döngü**
95˚C	2 dakika	X1
94˚C	20 saniye	X35
62.5˚C	20 saniye	
72˚C	1 dakika	
72˚C	3 dakika	X1

Germ hücrelerine özgül Oct4 promoterı kontrolü altında GFP transgeni içeren ovaryumların belirlenmesi için eGFP genotiplemesi yapıldı. Bu amaçla, eGFP' ye spesifik olarak tasarlanmış primer dizisi kullanılarak (**Tablo 3.4**) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kuruldu (**Tablo 3.5**).

Tablo 3.4. Genotipleme için kullanılan eGFP primer dizileri.

eGFP İleri (Forward)	5'-GCA CGA CTT CTT CAA GTC CGC CAT GCC-3'
eGFP Geri (Reverse)	5'-GCG GAT CTT GAA GTT CAC CTT GAT GCC-3'

Tablo 3.5. eGFP transgeni için PCR reaksiyonu.

10X TopTaq Tamponu (#200205, Qiagen)	2 µl
2mM dNTPs (#201901, Qiagen)	2 µl
10µM Primer Mix (5µM İleri ve 5µM Geri)	1 µl
TopTaq DNA Polimeraz enzimi (#200205, Qiagen, 5 units/µl)	0.1 µl
Distile su	13.9 µl
Genomik DNA	1 µl
Toplam	**20 µl**

Her bir PCR reaksiyonunda daha önce GFP^+ ve GFP^- olduğu genotipleme ile kanıtlanmış DNA örnekleri pozitif kontrol olarak, DNA örneği yerine sadece distile suyun eklendiği reaksiyon tüpleri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Eppendorf Mastercycler ep gradient S ısı döngüleyici cihazında PCR **Tablo 3.6**'da belirtildiği gibi kuruldu.

Tablo 3.6. eGFP transgeni için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları.

Derece	**Süre**	**Döngü**
93˚C	1 dakika	X1
93˚C	20 saniye	X30
68˚C	3 dakika	
72˚C	10 dakika	X1

E11.5'de diseke edilen embriyolarda dişi ve erkek gonadlar morfolojik olarak ayırt edilemediği için E11.5'e ait örneklerde ayrıca XY genotiplemesi yapıldı. Bu amaçla spesifik olarak tasarlanmış primer dizisi kullanılarak (**Tablo 3.7**) PCR kuruldu (**Tablo 3.8**).

Tablo 3.7. Genotipleme için kullanılan XY primer dizileri.

XY İleri (Forward)	5'-TGA AGC TTT TGG CTT TGA G-3'
XY Geri (Reverse)	5'-CCG CTG CCA AAT TCT TTG G-3'

Tablo 3.8. XY için PCR reaksiyonu.

10X TopTaq Tamponu (#200205, Qiagen)	2 µl
2mM dNTPs (#201901, Qiagen)	2 µl
10µM Primer Mix (5µM İleri ve 5µM Geri)	1 µl
TopTaq DNA Polimeraz enzimi (#200205, Qiagen, 5 units/µl)	0.1 µl
Distile su	14.4 µl
Genomik DNA	0.5 µl
Toplam	**20 µl**

Her bir PCR reaksiyonunda daha önce dişi ya da erkek olduğu genotipleme ile kanıtlanmış DNA örnekleri pozitif kontrol olarak, DNA örneği yerine sadece distile suyun eklendiği reaksiyon tüpleri ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Eppendorf Mastercycler ep gradient S ısı döngüleyici cihazında PCR **Tablo 3.9**'da belirtildiği gibi kuruldu.

Tablo 3.9. XY için PCR reaksiyonu ısı ve döngü sayıları.

Derece	**Süre**	**Döngü**
94˚C	2 dakika	X1
94˚C	15 saniye	X35
57˚C	30 saniye	
72˚C	30 saniye	
72˚C	5 dakika	X1

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde elektroforez yöntemi ile yürütülerek deneyde kullanılan yetişkin, yavru ve embriyoların genotipleri belirlendi.

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Malzemeler

- **0.5M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid):** 93.05 g EDTA (#161-0729, BioRad) 200 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. Solüsyona NaOH eklenerek pH=8.0 olacak şekilde ayarlandı. Hacim 500 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

- **10X TBE (Tris-Borik Asit-EDTA) Tamponu:** 108 g Tris (#1.08387.2500, Merck) ve 55 g Borik asit (#BP168-1, Fisher Scientific) 800 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcı yardımı ile çözüldü. 40 ml 0.5mM EDTA eklendi ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı.

- **%2 Agaroz Jel:** 2.4 g agaroz (#A9539-250G, Sigma) 120 ml 1XTBE Tamponu (Tris-Borik asit-EDTA) ile karıştırıldı. Mikrodalga fırında kaynatılan agaroz ve TBE karışımı şeffaf hal aldığında 5 µl etidyum bromid (#E3050, Teknova) eklendi. Sıvı halde olan agaroz ve TBE karışımı elektroforez tankına döküldükten sonra kuyucukları oluşturmak için tank içerisine taraklar yerleştirildi. Oda ısısında jel polimerize olduktan sonra taraklar çıkarıldı.

- **Orange G Yükleme Boyası (Loading Dye):** 1 g Ficoll (#F-4375, Sigma) 10 ml distile su içerisine eklendi. Ficoll çözülünceye kadar solüsyon 37˚C su banyosunda bekletildi ve aralıklarla vortekslendi. Solüsyon homojen hale gelince Orange G (#O7252-25G, Sigma) solüsyon içerisine eklendi. Filtreden geçirilen solüsyon +4˚C'de muhafaza edildi.

PCR reaksiyonu sonucu elde edilen ürünlere 2 µl Orange G yükleme boyası eklendi, tüpün içindeki PCR ürünleri ve yükleme boyası homojen hale gelinceye kadar pipetleme yapıldı. Her bir tüpten 10 µl örnek %2'lik agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi. 130V, 500mA'de elektroforez yöntemi ile yürütüldü. Jelin UV ışığı altında görüntülenmesi ile *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$, *Tex14*$^{-/-}$, Oct4-GFP^{+};*Tex14*$^{+/+}$, Oct4-GFP^{+};*Tex14*$^{+/-}$, Oct4-GFP^{+};*Tex14*$^{-/-}$ yetişkin, embriyonik ve yavru soylar belirlendi.

3.7. Embriyonik ve Post-natal Ovaryumların İzolasyonu ve Deneylerde Kullanılması

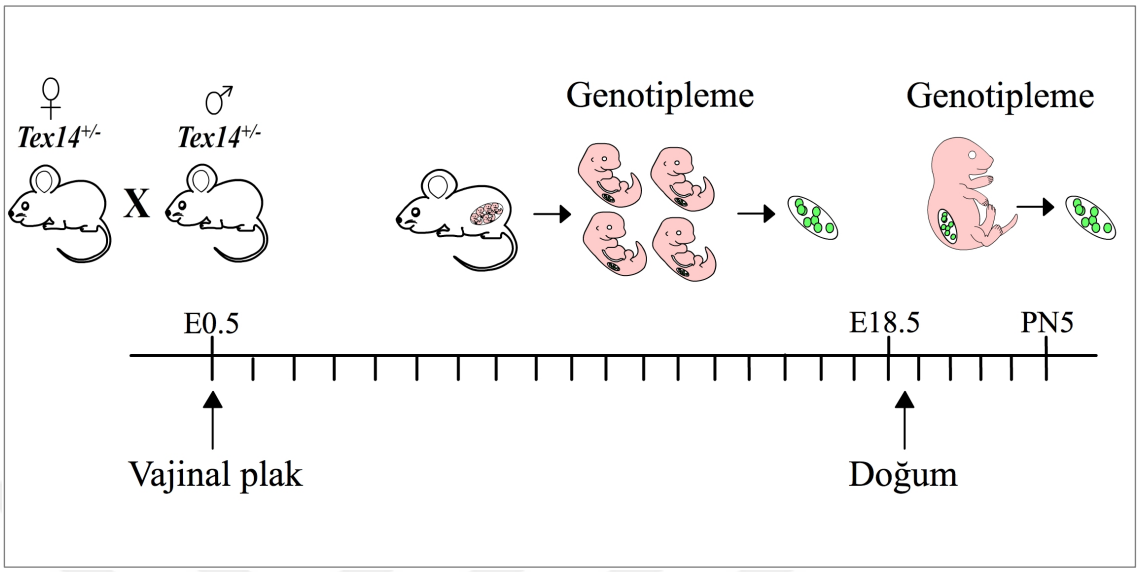
Tex14$^{+/-}$ dişi ve *Tex14*$^{+/-}$ erkek fareler 12 saatlik periyodlarla aydınlık/karanlık sikluslarında muhafaza edildi, çiftleşme sabahında vajinal plağın görüldüğü gün E0.5 olarak belirlendi. Embriyonik gelişimin farklı dönemlerde (E11.5, E12.5, E13.0, E13.5, E15.5, E16.5, E18.5) ovaryumlar izole edildi. Bu amaçla, CO_2 inhalasyonundan sonra *Tex14*$^{+/-}$ gebe fareler servikal dislokasyon ile öldürüldü. Post-natal (PN) yavru diseksiyonları için yavruların doğduğu gün PN0 olarak belirlendi, PN2 ve PN5 gün yavrular CO_2 inhalasyonundan sonra dekapitasyon ile öldürüldü.

3.8. Ovaryumların İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar:

- **Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (Phosphate Buffered Saline-PBS):** PBS tableti (#T900, Takara) 100 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon otoklavlandıktan sonra oda ısısında muhafaza edildi.

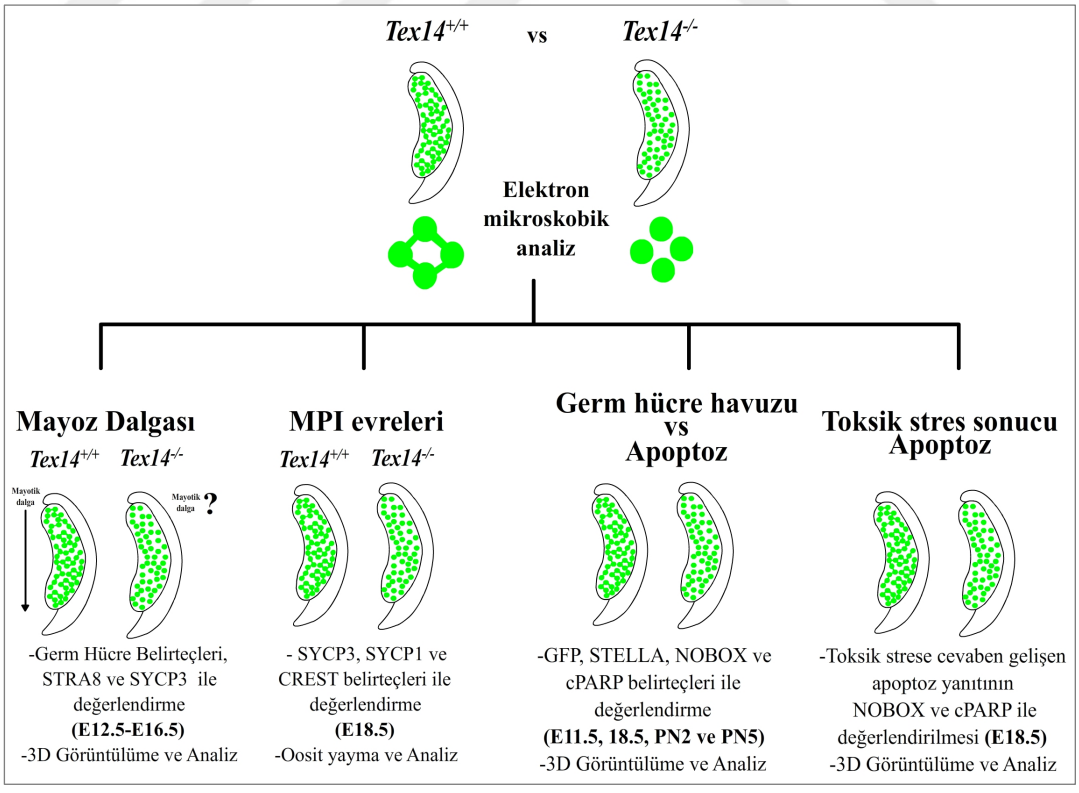
- **%0.4 Bovin serum albumin (BSA):** 200 mg BSA (#0332-100G, Amresco) 50 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon filtreden geçirildikten sonra +4°C'de muhafaza edildi.

Total ovaryumlar diseksiyon mikroskobu altında, PBS içerisinde %0.4 BSA içeren solüsyonda embriyodan izole edildi, etrafındaki seröz zarlardan oluşan keseden (bursa) ayrıldı. Eş zamanlı olarak embriyo/yavrulardan kuyruk örnekleri alınarak yukarıda belirtildiği gibi *Tex14* geni ve GFP transgenine özgü genotiplemeler yapıldı (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1. Projede heterozigot çaprazlama sonucu elde edilen embriyo/post-natal örneklerin izolasyonu ve genotipleme basamaklarını gösteren çizim.

Elde edilen ovaryumlar her grupta en az 4 ovaryum olacak şekilde proje kapsamında belirtilen analizlerde kullanılmak üzere ayrıldı (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. Proje kapsamında analiz edilen farklı deneysel parametleri gösteren şematik çizim.

3.9. Geçirimli Elektron Mikroskobu Analizi

Tex14$^{-/-}$ embriyoların farklanmakta olan dişi germ hücrelerinde hücreler arası köprülerin olmadığını teyit etmek amacı ile E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların ince (ultrastrüktür) yapısı geçirimli elektron mikroskobu (Transmission Electron Microscope; TEM) ile incelendi.

3.10. Elektron Mikroskobu Analizi'nde Kullanılan Malzemeler:

- **0.2 M Sörensen Fosfat Tamponu (SFT):** 13,6 g Kalium Dihidrojen Fosfat (#1.04873.1000, Merck) 500 ml bidistile su içerisinde çözüldü (A solüsyonu). 14,2 g Disodyum Hidrojen Fosfat (#7558-79-3, A.D.R.) 500 ml bisdistile su içerisinde çözüldü (B solüsyonu). 1L'lik balon jojede A ve B solüsyonları karıştırıldı, pH 7,3 olacak şekilde ayarlandı.

- **0.1 M Sörensen Fosfat Tamponu (SFT):** 0,2 M SFT stok solüsyonu 1:1 oranında bidistile su ile dilüe edilerek hazırlandı.

- **%4'lük Gluteraldehit:** %25'lik stok Gluteraldehit (#1640, Electron Microscopy Sciences)'den 16 ml alınıp, 84 ml 0,1 M SFT eklenerek hazırlandı.

- **Ozmiyum Tetroksit (OsO_4):** (#O004/1, 10X100 mg, TAAB)

- **Uranil Asetat:**1 g Uranil Asetat (#2216688, Merck), 100 ml %75'lik etil alkol içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Propilen Oksit:** (#P021, TAAB)

- **Araldit Ana Karışım:** 91 ml Araldit CY 212 (#E006, TAAB) 84 ml DDSA (Dodecenyl Succinic Anhydride, #D025, TAAB) ile karıştırılarak hazırlandı.

- **1. Araldit:** 50 ml Araldit Ana Karışımı 1 ml BDMA (Benzyldimethylamine, #11400, EMS) ile karıştırılarak hazırlandı.

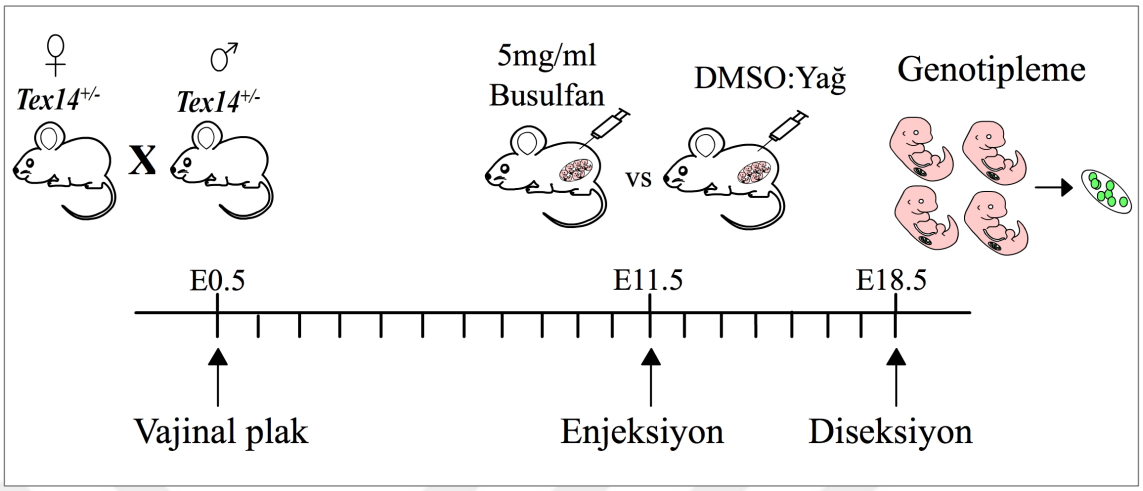
- **%1'lik Toluidin Mavisi:** 1 g Toluidin Mavisi (#5281607, Merck) ve 1 g Boraks (#749K4449803, Merck) karıştırılarak hazırlandı.

- **Ultramikrotom:** UCT125 Leica Ultramicrotome.

E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlar %4'lük Gluteraldehit ile +4°C'de, 2 saat fikse edildi, ardından 0.1 M SFT ile 3 defa 10'ar dakika yıkanarak fazla fiksatif uzaklaştırıldı. %1'lik OsO_4 ile 2 saat oda ısısında rotatorda fikse edilen örnekler 0.1 M SFT ile 3 defa 10'ar dakika yıkandıktan sonra +4°C'de sırası ile %30, %50 ve %70'lik alkolde 3 defa 10'ar dakika bekletildi. %1'lik Uranil asetat ile +4°C'de 1 saat inkübe edilen örnekler %80, %90 ve %100'lük alkol ile +4°C'de 3 defa 10'ar dakika inkübe edilerek dehidratasyon basamağı gerçekleştirildi. Propilen Oksit ile +4°C'de 2 defa 10'ar dakika inkübe edildikten sonra Araldit-Propilen Oksit karışımında (1:1) oda ısısında 8 saat, ardından Araldit içerisinde gece boyu rotatorda inkübe edildi. Son olarak örnekler kapsüller içerisine Araldit ile gömüldü, 60°C'de 48 saat polimerize olması sağlanan örneklerden ultramikrotomda 300nm kalınlığında kalın kesitler alındı. Toluidin mavisi ile boyanan kesitler ışık mikroskobu ile incelenerek ince kesitlerin alınacağı alan belirlendi. 70 nm kalınlığındaki ince kesitler alındıktan sonra kontrastlama yapılarak Zeiss Leo-906E geçirimli elektron mikroskopta değerlendirildi.

3.11. Yabanıl Tip ve *Tex14*$^{-/-}$ Dişi Gebe Farelerde Toksik Stres Oluşturulması

Fetal ovaryumda kimyasal stres oluşturmak için alkilleyici ajan olan busulfan kullanıldı. Busulfan proliferatif hücrelerin DNA'sı üzerinde çapraz bağlar oluşturarak proliferasyonu durdurmakla birlikte kromozomal anormallikte artışa ve hücre ölümüne neden olur. Heterozigot çaprazlama sonrasında vajinal plağın görüldüğü gün öğlen E0.5 olarak değerlendirildi ve E11.5 günde gebe farelere intraperitonal olarak 50 µl 5mg /ml busulfan (#B2635-10G, Sigma) 1:1 oranında hazırlanmış dimetil sülfoksit (DMSO) (#472301-500ml, Sigma) ve ayçiçek çekirdeği yağı (#S5007-250ML, Sigma) içerisinde çözülerek enjekte edildi. Böylece fetal ovaryumda kısmi olarak germ hücre kaybının indüklenmesi sağlandı. Busulfan enjeksiyonunun yanı sıra, busulfan'ın içerisinde çözüldüğü çözücünün olası etkilerini değerlendirmek için 50 µl DMSO/ayçiçek çekirdeği yağı (1:1) karışımı E11.5 günde gebe farelere intraperitonal olarak enjekte edildi. *Tex14*$^{+/-}$ gebe fareler E18.5 günde CO_2 inhalasyonundan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Embriyolardan ovaryumlar izole edildi. Genotipleme sonrasında *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlar wholemount immunofloresan yöntemi kullanılarak analiz edildi (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.3. *Tex14*$^{+/-}$ gebe farelere yapılan Busulfan/taşıyıcı grup enjeksiyonları ve zaman tablosunu gösteren çizim.

3.12. Embriyonik ve Post-natal Ovaryumlarda Wholemount İmmünofloresan

Wholemount immünofloresan yöntemi ile ovaryumların total yapısı hedef antikorlar kullanılarak kesit alınmaksızın eş zamanlı ve etkin bir şekilde incelendi.

3.13. Wholemount İmmünofloresan Deneyinde Kullanılan Malzemeler:

- **%4 lük paraformaldehit solüsyonu (PFA):** 4 g paraformaldehit (#416780010, Acros Organics) 80 ml PBS içerisine eklenerek karışım 60˚C'de manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Aralıklarla 1M NaOH eklenerek, yaklaşık 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra PFA'nin tamamen çözülmesi sağlandı. HCl ile pH=7.2-7.4 olacak şekilde ayarlandı, filtreden geçirilen solüsyon -80˚C'de muhafaza edildi.

- **%0.2 Bovin serum albumin (BSA):** 100 mg BSA (#0332-100G, Amresco) 50 ml distile su içerisinde çözüldü. Solüsyon filtreden geçirildikten sonra +4˚C'de muhafaza edildi.

- **%0.1 Triton X-100 içeren PBS:** 29.970 µl distile suya 30 µl Triton X-100 (#X100-500ml, Millipore Sigma) eklenerek hazırlandı.

- **%2 BSA, %0,1 Triton X-100 içeren PBS:** 1 g BSA 50ml %0.1 Triton X-100 içeren PBS içerisinde çözüldü. Solüsyon filtreden geçirildikten sonra +4˚C'de muhafaza edildi.

- **%0.2 BSA, %0,1 Triton X-100 içeren PBS:** 100 mg BSA 50 ml %0.1 Triton X-100 içeren PBS içerisinde çözüldü. Solüsyon filtreden geçirildikten sonra +4˚C'de muhafaza edildi.

- **%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:** 900 µl Methanol (#A412-4, Fisher Chemical)'e 100 µl %30'luk H_2O_2 (#H1009-100ml, Sigma) eklenerek hazırlandı.

- **Benzil alkol/Benzil benzonat (BAAB) Solüsyonu:** Benzil alkol (#402834-100ml, Sigma-Aldrich) ve Benzil benzonat (#B9550-500ml, Sigma-Aldrich) 2:1 oranında karıştırıldı. Solüsyon oda ısısında muhafaza edildi.

Gelişimin farklı evrelerindeki embriyonik/post-natal ovaryumlar %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile +4˚C'de, 2 saat fikse edildi, ardından %0.2 BSA içeren yıkama solüsyonu ile 3 defa 10'ar dakika yıkanarak fazla fiksatif uzaklaştırıldı. Wholemount immünofloresan protokolü kapsamında tüm inkübasyonlar rotator üzerinde gerçekleştirildi. %2 BSA ve %0,1 Triton X-100 içeren solüsyon ile oda ısısında 3 saat bloklanan ovaryumlar ardından iki gece boyunca +4˚C'de primer antikor (**Tablo 3.10**) ile inkübe edildi. %0.1 Triton X-100 içeren PBS ile 4 defa 15'er dakika oda ısısında yıkanan örnekler, primer antikorlara uygun floresan işaretli sekonder antikor (**Tablo 3.11**) ile +4˚C'de gece boyunca inkübe edildi. %0.2 BSA ve %0.1 Triton X-100 içeren PBS solüsyonu ile 3 defa 30'ar dakika oda ısısında yıkanan örnekler, 10'ar dakika artan metanol serilerden (%25, %50, %75) geçirildikten sonra iki kez %100 metanol ile 10'ar dakika inkübe edierek dehidrasyon basamağı gerçekleştirildi. Gece boyunca +4˚C'de, %3 H_2O_2 solüsyonu ile inkübe edilen örnekler lamel üzerine sabitlenen 10 mm çapında-10 mm yüksekliğinde silindirler (Ace Glass, 3865-10) ile oluşturulmuş havuzcuklara transfer edildi. Fazla metonulün uzaklaştırılmasından sonra 300 µl Benzil alkol/Benzil benzonat (2:1) örnekleri içeren havuzcuklara eklendi. Gece boyu +4˚C'de şeffaflaştırma basamağının ardından örnekler Leica TCS SP8 inverted konfokal mikroskop kullanılarak her bir Z-stack aralığı 1 µm olacak şekilde 10X objektif ile görüntülendi.

Tablo 3.10. Wholemount immünofloresan deneyinde kullanılan primer antikorlar.

Protein	Katalog no, Firma	Belirteç	Dilüsyon
GFP	#1020, Aves	Germ hücre belirteci	1:200
TRA98	#ab82527, Abcam	Germ hücre belirteci	1:200
STRA8	#ab49602, Abcam	Pre-mayotik DNA replikasyonu belirteci	1:200
SYCP3	#ab97672, Abcam	Mayozda sinaptonemal kompleks belirteci	1:200
FGF9	#ABN41, Millipore	Testis farklanmasında mayoz inhibisyonun belirteci	1:200
FOXL2	#NB100-1277, Novus Biologicals	Somatik hücre belirteci	1:200
DAZL	#ab34139, Abcam	RNA bağlanma proteini belirteci	1:200
FMRP	#ab191411, Abcam	RNA bağlanma proteini belirteci	1:200
cPARP	#558710, BD Pharmingen	Apoptoz belirteci	1:50
STELLA	#ab19878, Abcam	Erken dönem germ hücre (E13.5'e kadar) belirteci	1:200
NOBOX	Gift from A. Rajkovic	Geç dönem germ hücre (E15.5'den sonra) belirteci	1:400

Tablo 3.11. Wholemount immünofloresan deneyinde kullanılan sekonder antikorlar.

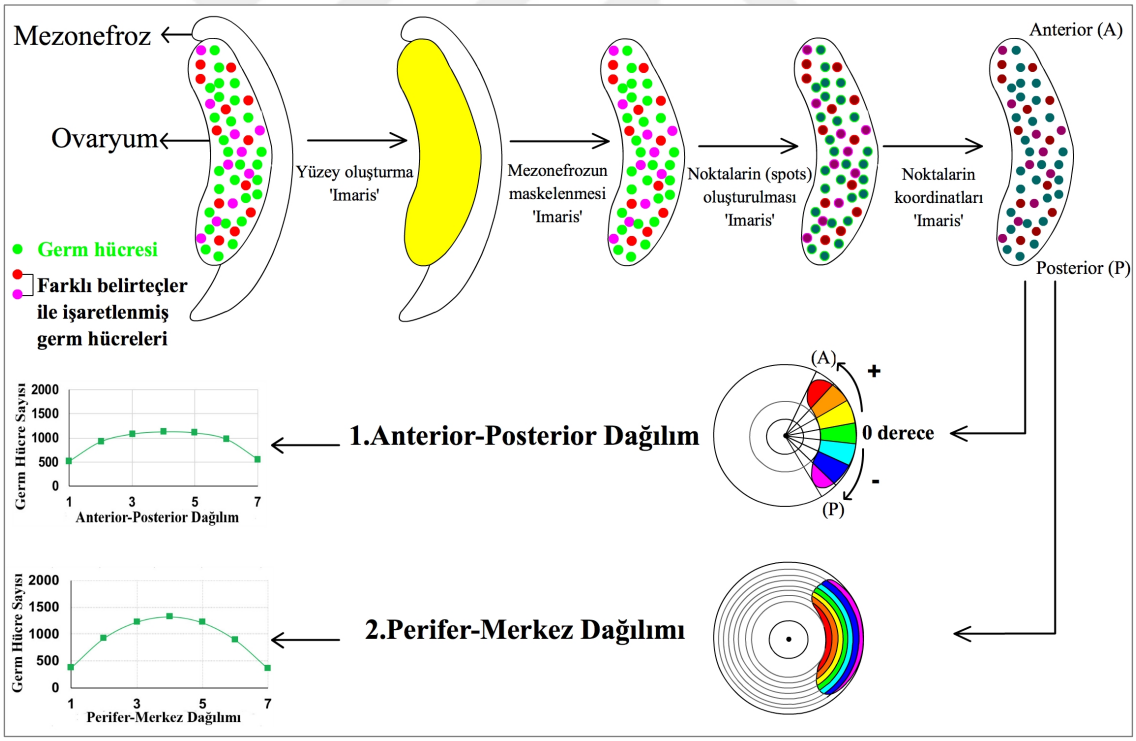
Florofor	Katalog no, Firma	Dilüsyon
Alexa Fluor 488 donkey anti-chicken IgY (IgG) (H+L)	# 703-545-155, Jackson Immuno Research Laboratories	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	# R37114, Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	#A31572, Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-rat IgG (H+L)	#A21208, Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse IgG (H+L)	#A31571, Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 555 donkey anti-goat IgG (H+L)	#A21432, Invitrogen	1:200

3.14. 3D Ovaryum Analizi

Floresan belirteçlerle işaretlenmiş bütün halindeki ovaryumların konfokal mikroskop ile görüntülenmesi sonucunda elde edilen LIF (Leica Image File) dosyaları ImarisX64.8.3.0 programına aktarıldı. Ovaryumun oryantasyonu Anterior-Posterior (AP) komşuluğundaki mezonefroz yardımı ile belirlendi. Daha sonra mezonefroz Imaris'in yüzey (surface) modülü kullanılarak maskelendi ve analizin sonraki basamaklarında mezonefrozdan ayrılmış halde sadece ovaryum kullanıldı. Yüzey modülü kullanılarak ovaryumun sınırları çizildi, ovaryumun tamamını temsil eden bir yüzey oluşturuldu ve ovaryum anterior ve posterior koordinatları kaydedildi. Programın nokta (spot) modülü kullanılarak immünofloresan olarak işaretlenmiş her bir germ hücresini temsilen noktalar (spots) oluşturuldu. Her bir nokta floresan işaretlenmiş bir germ hücresinin koordinatlarına temsil ettiği için bu sayede ovaryumun 3D haritası oluşturuldu.

Imaris programı ile elde edilen ovaryumun yüzey koordinatları ve her bir germ hücresinin spesifik koordinatı Imaris programı içerisine entegre olmuş MATLAB programı ile değerlendirildi.

Embriyonik ovaryum doğrusal bir morfolojiye sahip olmadığı için kutupsal taslak (polar plot) üzerine yerleştirilen ovaryumun anterior-posterior koordinatları ve kutupsal taslağın merkez noktası kullanılarak ovaryumun eğrilik yarıçapı hesaplandı ve tüm noktaların koordinatları eğrilik yarıçapı kadar kaydırıldı. Koordinatlar polar koordinatlar halinde analiz edildi. Özetle, her bir germ hücresinin ovaryumun anterior ve posterior'üne uzaklığının analiz edilebilmesi için ovaryum anteriorden posteriore 7 eşit parçaya bölündü ve her parçadaki germ hücre sayısı belirlendi. Benzer şekilde germ hücrelerinin ovaryumun merkez ve periferine uzaklığının belirlenebilmesi için ovaryum perifer-merkez-perifer doğrultusunda 7 parçaya bölündü ve her parçadaki germ hücre sayısı belirlendi. Elde edilen veriler Microsoft® Office 2016 Excel (Microsoft; Redmond, Washington)'e aktarılarak germ hücrelerinin Anterior-Posterior Dağılım ve Perifer-Merkez Dağılımı grafikleri oluşturuldu (**Şekil 3.4**).



Şekil 3.4. Wholemount immünofloresan yöntemi ile farklı belirteçlerle işaretlenmiş ovaryumların 3D analizi.

3.15. Germ Hücre Apoptozunun Grup/Küme Analizi

Tex14$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ E18.5 ovaryumlarda germ hücre apoptozunun grup/kümeler halinde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için literatürde daha önce Hansson ve ark

(2013) tarafından yayınlanmış olan RipleyGUI yazılımı kullanıldı (Hansson ve ark., 2013). RipleyGUI MATLAB tabanlı bir program olup hücrelerin 3D dağılım modellerini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır. Program 3D koordinatları bilinen bir hücrenin merkezinden başlayarak en yakın komşuluğundaki hücrenin merkezine kadar olan uzaklığı belirleyerek, hücrelerin birbirleri ile yakın lokalizasyonlarının rastlantısallık ya da grup/küme oluşturma eğilimi nedeni ile olup olmadığını belirlemektedir.

Embriyonik ovaryumda apoptozun grup/küme analizi için öncelikle Imaris programı vasıtası ile *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda sırası ile tüm germ hücrelerin ve sadece apoptotik germ hücrelerinin koordinatları ayrı ayrı kaydedildi. Germ hücre koordinatları programa yüklenerek *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda total germ hücre dağılımının grup/kümelenme açısından benzer olup olmadığı test edildi. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda germ hücrelerinin grup/kümelenme açısından benzer dağılım gösterdiği belirlendikten sonra sadece *Tex14*$^{+/+}$ total germ hücre dağılımı grup/küme analizinde grup/kümelenme göstermeyen dağılımı temsilen kullanıldı. Son olarak, *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda apoptotik germ (cPARP^{+}) hücrelerinin koordinatları programa yüklenerek mutant ve yabanıl tip ovaryumlarda germ hücre apoptozunun grup/kümelenme gösterip göstermediği belirlendi.

3.16. Embriyonik Ovaryumlarda Oosit Yayma

Tex14$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik profaz I'in ayrıntılı bir şekilde incelenebilmesi için E18.5 germ hücrelerinde nükleer yayma preparatları hazırlandı.

3.17. Oosit Yayma Preparatlarının Hazırlanması İçin Kullanılan Malzemeler:

- **0.15M NaCl:** 438 mg NaCl **(**#1.06404.1000; Merck) 50 ml distile suyun içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **10mg/ml DNAse I:** 10 mg DNAse I 1 ml 0.15M NaCl içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Ovaryum Disasosiyasyon Tamponu:** 25 mg Kollajenaz (#C0130, Sigma) 9.8 ml DMEM medyumu (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Thermo Fisher Scientific) içerisinde çözüldü. Ardından 100 µl %2.5 Tripsin (#15090046, Thermo Fisher Scientific) ve 100 µl DNAse I (10 mg/ml, #DN25-10 mg, Sigma) eklendi.

- **1M Tris pH=8.2**: 6.07 g Tris (#1.08387.2500, Merck) 50 ml distile su içerisinde çözüldü. pH=8.2'ye ayarlandı.

- **1M Sükroz**: 17.115 g Sükroz (#S1888-500G, Sigma) 50 ml distile su içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **1M DTT (Dithiothreitol)**: 154.25 mg DTT (#R0861, Thermo Scientific) 1 ml distile su içerisinde çözüldü.

- **100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride):** 174.19 mg PMSF (#36978, Thermo Fisher Scientific) 10 ml isopropanol (#A451-4, Thermo Fisher Scientific) içerisinde çözüldü.

- **Hipotonik Tampon:** 300 µl 1M Tris pH=8.2, 500 µl 1M sükroz, 500 µl 0.5M EDTA 15 ml'lik Ependorf tüpüne aktarıldı, 8 ml'ye kadar distile eklendi ve 50 mg sodyum sitrat (#0754, Mollinckrodt AR) homojen hale gelinceye kadar vortekslendi. pH=8.2'ye ayarlandıktan sonar solüsyon filtre edildi. Son olarak 5 µl 1M DTT ve 50 µl 100mM PMSF solüsyona eklendi, distile su ile total hacim 10 ml'ye tamamlandı ve solüsyon 2 saat içerisinde kullanıldı.

- **0.1M Borik asit:** 61.83 g Borik asit 10 ml distile su içerisinde çözüldü.

- **100mM Sükroz:** 1 ml 1M sükroz, 750 µl Borik asit ve 7 ml distile su 15 ml'lik Ependorf tüpüne eklendi. pH=8.2'ye ayarlandıktan sonra solüsyon filtre edildi. Total hacim 10 ml oluncaya kadar distile su eklendi.

- **Fiksatif Solüsyonu:** 3 ml %16'lık PFA (#15710S, Electron Microscopy Sciences), 3.5 ml 0.1M Borik asit ve 40 ml distile su 50 ml'lik Ependorf tüpüne eklendi. pH=9.2'ye ayarlandıktan sonra solüsyon filtre edildi. 72 µl Triton X-100 ve 144 ml 1M DTT eklendikten sonra, hacim 48 ml oluncaya kadar distile su ilave edildi.

- **%0.4'lük Photoflo:** 96 ml distile suya 4 ml Photoflo (#146 4510, Kodak Professional) eklenerek hazırlandı.

Tex14$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ E18.5 ovaryumlar 200 µl ovaryum disasosiyasyon tamponu içerisinde 37˚C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında her 10 dakikada bir pipetlenerek ovaryumun disasosiyasyonu sağlandı. 30 dakika sonunda 200 µl FBS (#10437036, Thermo Fisher Scientific) eklenerek tripsin reaksiyonu durduruldu. 400 µl hipotonik solüsyon eklenen ovaryumlar oda ısısında 30 dakika inkübe edildikten sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet 80 µl 100mM sükroz ile yeniden süspanse edildi. Superfrost lamlar üzerine hidrofobik kalem ile çizilmiş alana 10 µl fiksatif solüsyonu ve 20 µl hücre süspansiyonu pipetlendikten sonra lamlar oda ısısında kurumaya bırakıldı. %0.4'lük Photoflo solüsyonu ile 2 defa 2'şer dakika inkübe edilen yayma preparatları tamamen kuruduktan sonra oosit yayma örneklerinde immünofloresan boyama protokolü uygulandı.

3.18. Oosit Yayma Preparatlarında İmmünofloresan Boyama

Tex14$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ E18.5 ovaryumlardan hazırlanan oosit yayma preparatlarında MPI evrelerinin analiz edilebilmesi için sinaptonemal kompleks proteinlerine özgül belirteçler kullanılarak immünofloresan boyama tekniği uygulandı.

3.19. Oosit Yayma Preparatlarında İmmünofloresan Boyama İçin Kullanılan Malzemeler:

- **%0.1 Triton X-100 içeren PBS:** 29.970 µl distile suya 30 µl Triton X-100 (#X100-500ml, Millipore Sigma) eklenerek hazırlandı.

- **%5 BSA içeren PBS:** 0.5 g BSA 10 ml PBS içerisinde çözüldü. Solüsyon filtreden geçirildikten sonra +4˚C'de muhafaza edildi.

Yayma preparatları %0.1 Triton X-100 içeren PBS solüsyonunda oda ısısında 10 dakika inkübe edildikten sonra PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandı. %5'lik BSA ile 1 saat bloklanan yayma preparatları primer antikorlar (**Tablo 3.12**) ile gece boyu +4˚C'de inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama basamağının ardından primer antikorlara uygun floresan işaretli sekonder antikor (**Tablo 3.13**) ile +4˚C'de gece boyunca inkübe edilen preparatlar PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkandıktan sonra kapatma medyumu (#H-1000,

Vector Laboratories) ile kapatıldı. Leica TCS SP5 konfokal mikroskop ile 63X objektif ile görüntülendi.

Tablo 3.12. Oosit yayma immünofloresan deneyinde kullanılan primer antikorlar.

Protein	Katalog no, Firma	Belirteç	Dilüsyon
SYCP3	#ab97672, Abcam	Mayozda sinaptonemal kompleks belirteci	1:200
SYCP1	#ab15090, Abcam	Mayotik Profaz I, Pakiten evresi belirteci	1:200
CREST	#15-234-0001, Antibodies Incorporated	Sentromer belirteci	1:50

Tablo 3.13. Oosit yayma immünofloresan deneyinde kullanılan sekonder antikorlar.

Florofor	Katalog no, Firma	Dilüsyon
Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	#ab97672, Abcam	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L)	#A31572, Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 488 donkey anti-human IgG (H+L)	# 709-605-149, Jackson Immuno Research Laboratories	1:200

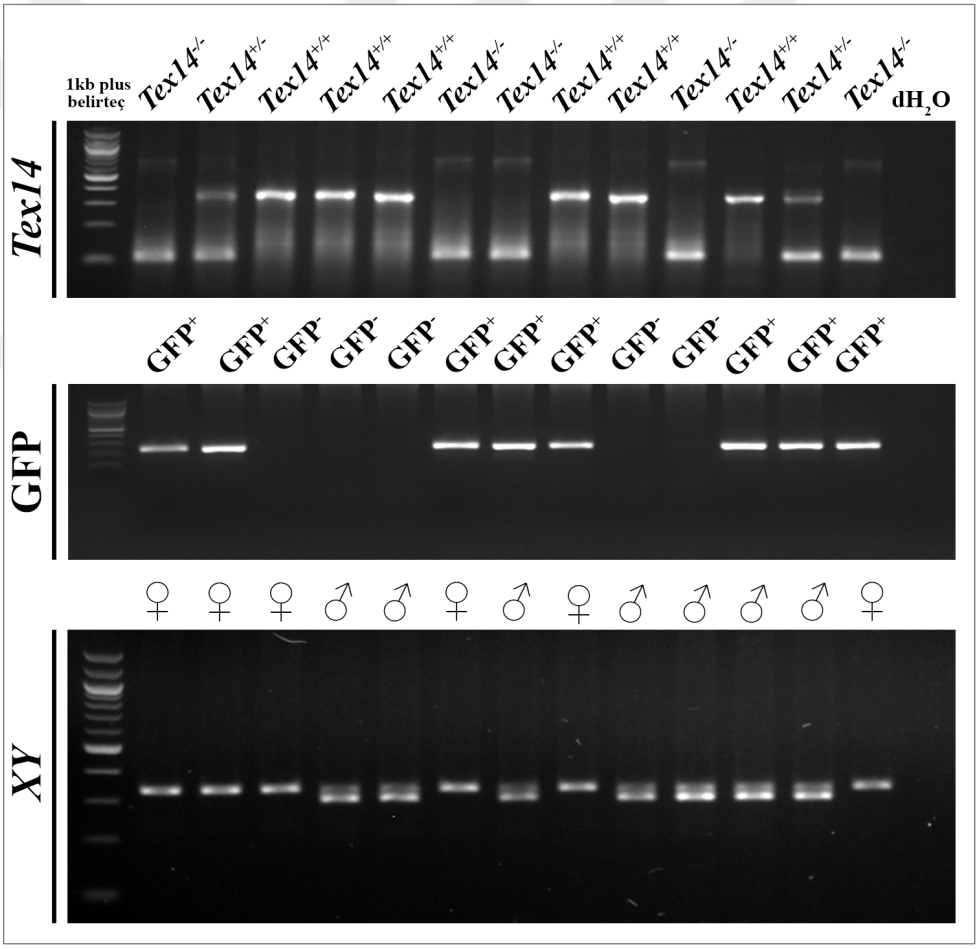
3.20. İstatiksel Analizler

Elde edilen veriler Microsoft ® Office 2016 Excel'e aktarıldıktan sonra *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda 3D mayoz ve apoptozun istatistiksel analizi Excel'in T.Test (Student's t-Test) fonksiyonu kullanılarak gerçekleştirildi. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ total ve apoptotik germ hücre sayılarının istatistiksel analizi Prism 6.0 programında karşılaştırmalı (t-test ya da ANOVA) testler kullanılarak yapıldı. Germ hücrelerinin grup/kümelenme analizi RipleyGUI programı içine entegre edilmiş istatistik modülü ile gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *Tex14*, GFP ve *XY* (cinsiyet) Genotiplemelerinin Değerlendirilmesi

Spesifik primerler kullanılarak yapılan genotiplemelerden elde edilen ürünler görüntülenerek *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$, *Tex14*$^{-/-}$, GFP^{+} ve GFP^{-} yetişkin fare, embriyo ve post-natal yavrular belirlendi. E11.5 gün embriyolarda morfolojik olarak cinsiyet ayrımı yapılamadığı için, cinsiyetin belirlenmesi için ekstra genotipleme yapılarak dişi embriyolar deneye dahil edildi (**Şekil 4.1**).



Şekil 4.1. %2'lik agaroz jelde yürütülen örnek *Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$, *Tex14*$^{-/-}$, GFP^{+}, GFP^{-}, XX ve XY PCR ürünlerinin analizi.

4.2. Tex14 Kolonisinde Embriyo Rezorpsiyonunun Değerlendirilmesi

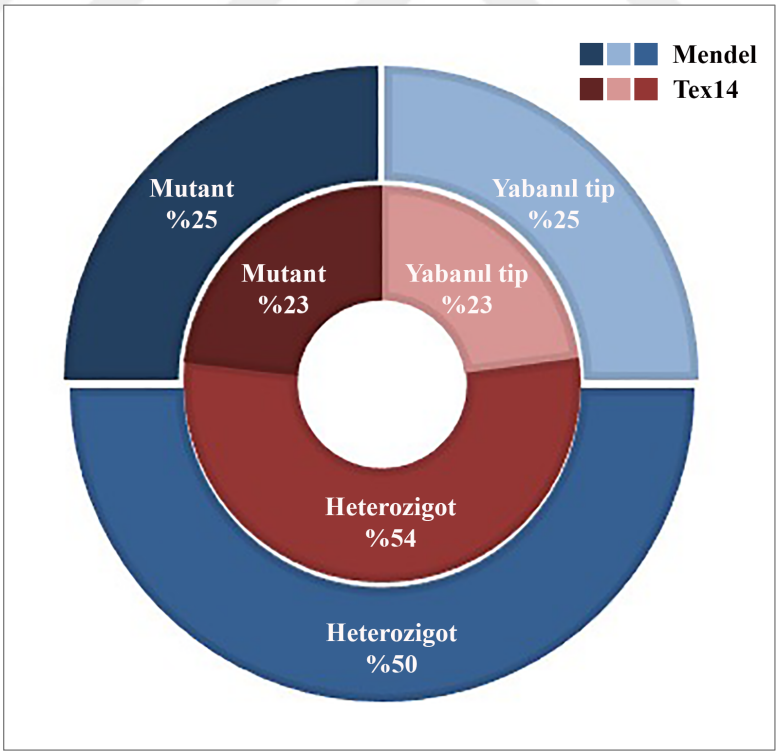
Tex14 heterozigot çaprazlama ile elde edilen *Tex14*$^{+/-}$ gebe farelerin diseksiyonu sonrasında izole edilen embriyo sayıları (**Tablo 4.1**) değerlendirildi. Tex14 kolonisinde

rezorpsiyon oranı (Rezorpsiyon/Normal implante olan embriyo oranı)'nın %28.8 olduğu belirlendi.

Tablo 4.1. Projede *Tex14*$^{+/-}$ gebe farelerden izole edilen embriyo sayıları ve genotipleri.

Total Embriyo Sayısı	**Rezorpsiyon**	**Normal implante olan embriyo sayısı**	***Tex14*$^{+/+}$**	***Tex14*$^{+/-}$**	***Tex14*$^{-/-}$**
1074	240	834	191	450	193

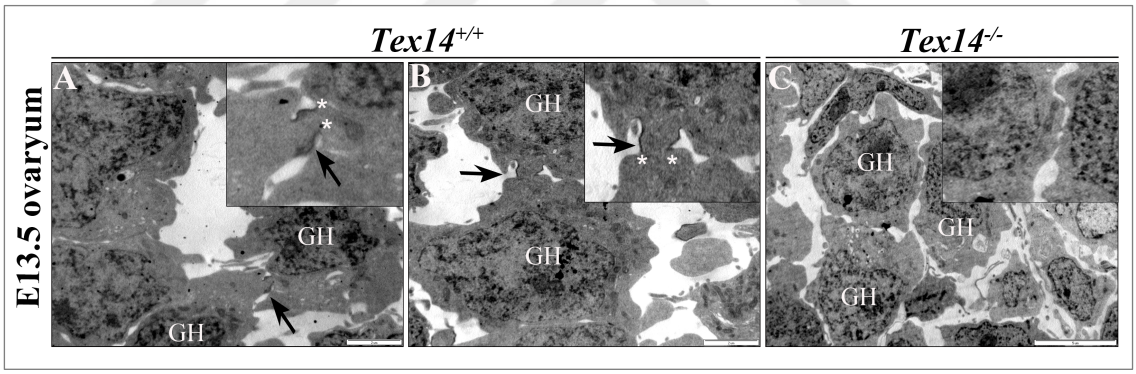
Literatürde belirtilene göre artmış rezorpsiyon oranının spesifik bir genotipte meydana gelen sub-letalite nedeni ile olup olmadığını belirlemek için embriyo genotip (*Tex14*$^{+/+}$, *Tex14*$^{+/-}$ ya da *Tex14*$^{-/-}$)'lerinin yüzde değerleri belirlendi (**Şekil 4.2**). Heterozigot çaprazlama sonucunda Tex14 kolonisinde Mendel kalıtımına (bağımsız ayrışım prensibi) kıyasla mutant ve yabanıl tip embriyoların %2 azaldığı ve heterozigot embriyoların da %4 arttığı belirlendi.



Şekil 4.2. Tex14 kolonisinde embriyo genotiplerini Mendel kalıtımı ile karşılaştırmalı olarak gösteren grafik.

4.3. *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumların Elektron Mikroskobik Analizi

Greeanbaum ve ark. tarafından yapılan çalışmalar ile *Tex14*$^{-/-}$ gonadlarda (yetişkin ve neonatal) germ hücreleri arasında hücreler arası köprülerin olmadığı daha önce ortaya konulmuş olmasına rağmen (Greenbaum ve ark., 2009; Greenbaum ve ark., 2006), embriyonik dönemde *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda söz konusu hücreler arası köprü yapılarının var olup olmadığı daha önce doğrulanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın başında, geçirimli elektron mikroskop yöntemi kullanılarak *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ E13.5 embriyonik ovaryumlarda hücreler arası köprü yapıları analiz edildi. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ embriyonik ovaryumlarda, hücreler arası köprülerin germ hücreleri arasında var olduğu teyit edildi (**Şekil 4.3 A, B**). E13.5 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ise germ hücreleri birbirileri ile yakın şekilde konumlansa dahi hücreler arası köprü yapılarına rastlanmadı (**Şekil 4.3 C**). Böylece *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların embriyonik dönemden itibaren hücreler arası köprülerden yoksun olduğu ortaya konuldu.



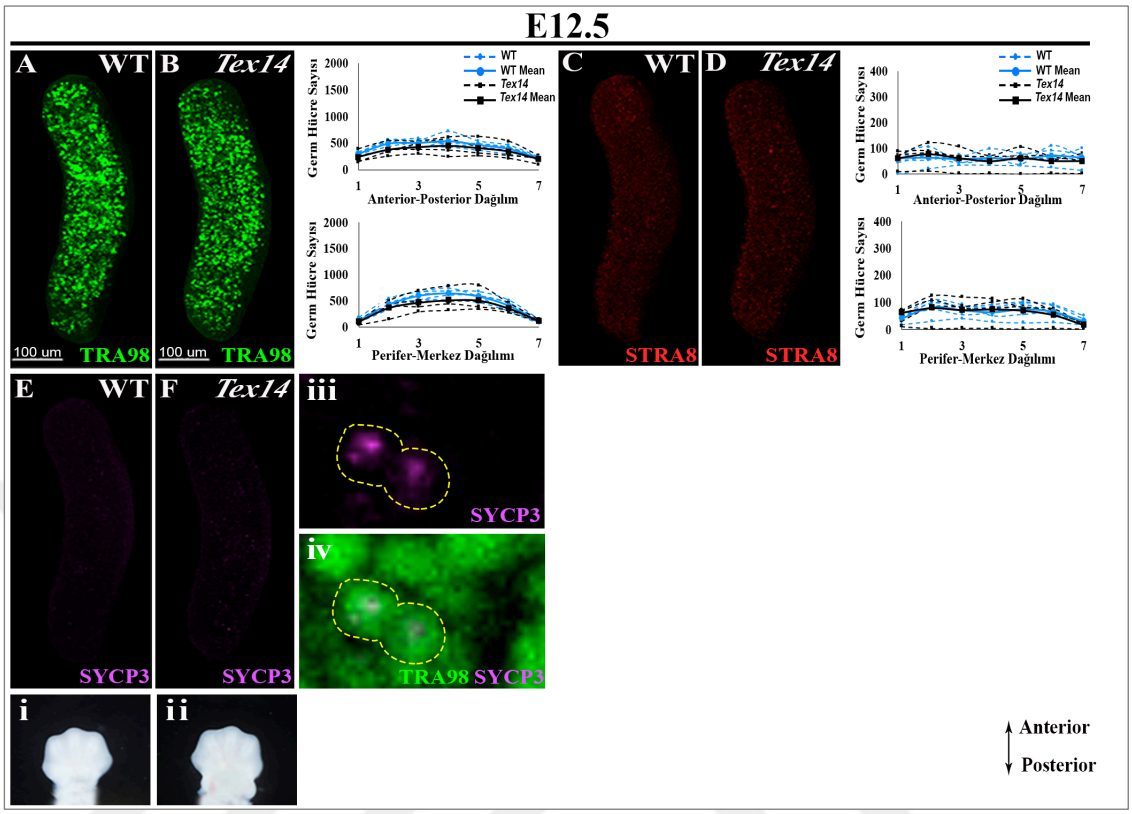
Şekil 4.3. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan elde edilen elektron mikrograflar. A, B: *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda hücreler arası köprülerin üst ve alt sınırları elektron yoğun alanlar (*) olarak gözlenmektedir. C: *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücreleri birbirlerine yakın şekilde konumlansa dahi hücreler arası köprü yapıları bulunmamaktadır. Inset: yüksek büyütme, GH: germ hücresi, oklar hücreler arası köprüleri, yıldızlar ise elektron yoğun alanları göstermektedir.

4.4.*Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Mayoz Dalgasının Değerlendirilmesi

Tex14$^{+/-}$ gebe fareler vajinal plak tarihleri esas alınarak sırası ile E12.5, E13.0, E13.5, E15.5 ve E16.5 günlerde diseke edildi. Tex14 fare kolonisi karma soylardan oluştuğu ve özellikle karma soylardan gelen embriyolarda farklı genotipler arasında gelişimsel hız farklılığı olabileceği için vajinal plak tarihine ek olarak, embriyoların evrelendirilmesi için ön ayaklarının morfolojisi fotoğraflanarak ayrıca değerlendirildi (Kaufman, 1992).

Evrelendirme aşamasından sonra, germ hücrelerinin ovaryumun genelinde homojen şekilde lokalize olup olmadığı TRA98 (Germ Cell Specific Antigen) ya da Oct4-GFP transgeni taşıyan soylarda GFP antikoru ile teyit edildi. Mayoz dalgasının belirlenmesi için ise pre-mayotik DNA replikasyonundan sorumlu olan STRA8 ve mayoz bölünmede homolog kromozomlar arasında oluşan sinaptonemal kompleksin lateral elementi olan SYCP3'ün lokalizasyonu ile analiz edildi. STRA8 mayozun erken belirteci olarak, SYCP3 ise aktif olarak mayoz bölünmede olan hücreleri incelemek amacı ile kullanıldı.

E12.5 gün ovaryumlarda TRA98 antikoru ile işaretlenen germ hücrelerinin *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda homojen dağılım gösterdiği teyit edildi (**Şekil 4.4 A ve B**). Pre-mayotik DNA replikasyonunun belirteci olan STRA8 pozitif (STRA8^{+}) germ hücrelerinin ovaryumda E12.5'den itibaren bulunduğu, fakat STRA8 ifade eden bu germ hücrelerinin ovaryumdaki dağılımlarının anterior-posterior (AP) ya da perifer-merkez (PM) açısından farklılık göstermediği belirlendi (**Şekil 4.4 C ve D**) (**Tablo 4.2**). Aktif olarak mayoz bölünmedeki hücreleri belirten SYCP3^{+} germ hücrelerinin ise E12.5'ta bazı ovaryumlarda bulunmadığı, bazı ovaryumlarda ise bir ya da iki tane SYCP3^{+} germ hücresinin bulunduğu görüldü (**Şekil 4.4 E, F, iii ve iv**). Söz konusu bir ya da iki SYCP3^{+} germ hücresi 3D analiz için yeterli olmadığı için, E12.5 ovaryumlarda SYCP3^{+} hücrelerin lokalizasyonu için 3D analiz gerçekleştirilmedi.

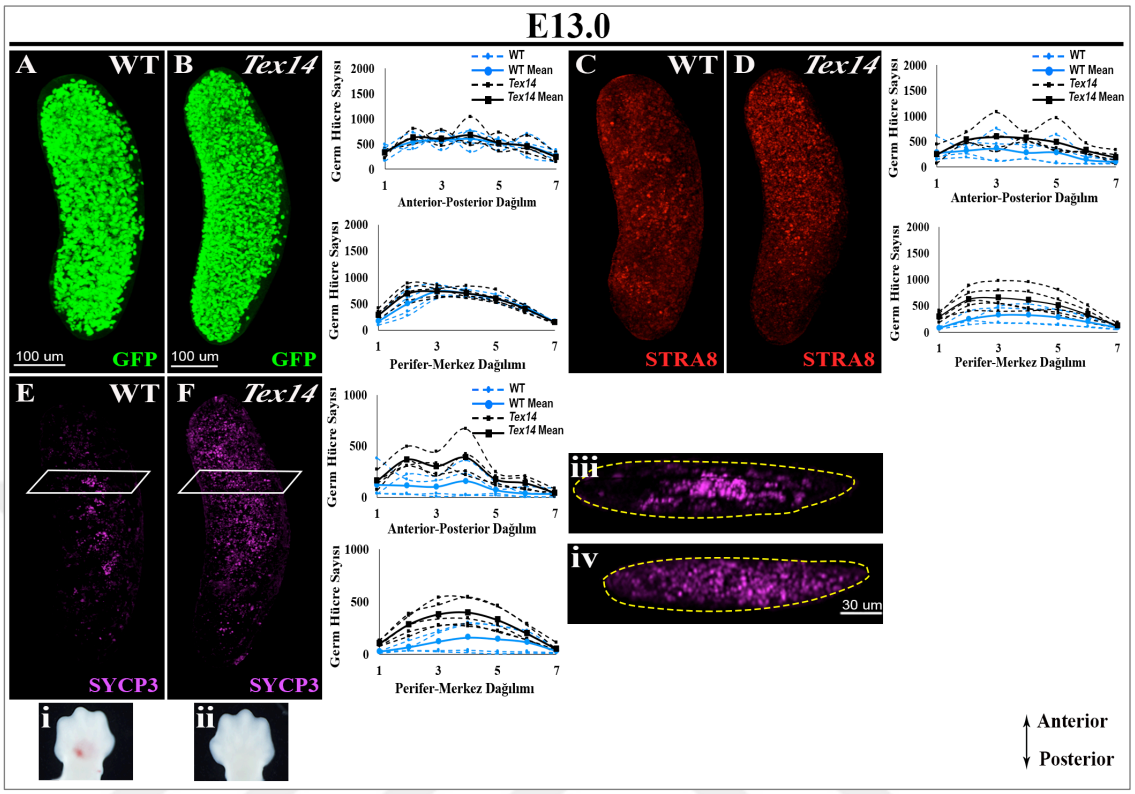


Şekil 4.4. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi. A, B: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda TRA98 ile işaretlenen germ hücrelerinin homojen şekilde dağıldığı izlenmektedir. C, D: Mayoz bölünmeden önce gerçekeşen pre-mayotik DNA replikasyonunun belirteci olan STRA8^{+} germ hücrelerinin ovaryumdaki dağılımlarında AP ya da PM açısından herhangi bir fark bulunmamaktadır. E, F: Bazı germ hücrelerinin en erken E12.5'de aktif olarak sinaptonemal kompleksin oluştuğu izlenmektedir. i ve ii: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ embriyoların ön ayaklarının morfolojisi her iki embriyonunda gelişimsel olarak aynı evrede olduğunu göstermektedir. iii ve iv: yüksek büyütmede SYCP3^{+} iki germ hücresinin sınırları sarı kesikli oklarla belirtilmiştir. TRA98 ve STRA8 immünofloresan boyanma görüntülerinin sağ tarafında o antikora ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ (WT) ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ (*Tex14*) ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir.

Tablo 4.2. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım		**Perifer-Merkez Dağılımı**	
	WT vs *Tex14*		WT vs *Tex14*	
	TRA98	STRA8	TRA98	STRA8
1	0.279	0.949	0.481	0.798
2	0.141	0.610	0.426	0.947
3	0.257	0.748	0.176	0.963
4	0.411	0.502	0.234	0.669
5	0.492	0.891	0.467	0.878
6	0.503	0.368	0.435	0.572
7	0.569	0.535	0.580	0.110

Mayoz dalgası 12 saat sonra, E13.0 günde, değerlendirildiğinde her iki grupta da germ hücrelerinin ovaryumun genelinde homojen şekilde yayıldığı görüldü (**Şekil 4.5 A ve B**). STRA8^{+} ve SYCP3^{+} germ hücre sayılarının her iki grupta da E12.5'e göre arttığı fakat bu artışın *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{+/+}$ 'e nazaran daha fazla olduğu belirlendi (**Şekil 4.5 C-F**). STRA8^{+} germ hücrelerinin çok belirgin olmamakla birlikte ovaryumun anterior'ünde posterior'ürüne göre daha fazla bulunduğu dikkat çekti. STRA8^{+} germ hücrelerinin ovaryumun perifer-merkez'ine göre lokalizasyonları değerlendirildiğinde ise herhangi bir farka rastlanmadı (**Şekil 4.5 C ve D**). Bu evrede en çok dikkat çeken bulgu *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda, SYCP3^{+} germ hücrelerinin ovaryumun tepe anterior noktasında değil, daha çok ovaryumun merkezinde fakat yine de ovaryumun üst ½'lik kısmında ağırlıklı olarak konumlanması oldu (**Şekil 4.5 E ve iii**). Bununla birlikte SYCP3^{+} germ hücrelerinin E13.0 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda kümeler halinde bulunduğu fakat bu kümelerin ardışık bir şekilde ovaryumda lokalize olmadığı belirlendi (**Şekil 4.5 E**). Aynı dönemde *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ise SYCP3^{+} germ hücrelerinin sayısının *Tex14*$^{+/+}$'e kıyasla daha fazla olduğu yani daha fazla germ hücresinin aktif olarak mayoz bölünmede olduğu ve *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda izlenen merkezi lokalizasyon paterninin *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda bulunmadığı belirlendi (**Şekil 4.5 F ve iv**) (**Tablo 4.3**). Bunun yanı sıra *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda SYCP3^{+} germ hücrelerinin daha ağırlıklı olarak anterior'de konumlandığı yani literatürde yabanıl tip ovaryumlarda belirtilen AP mayotik dalgaya daha yakın bir pattern gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.5 F**).

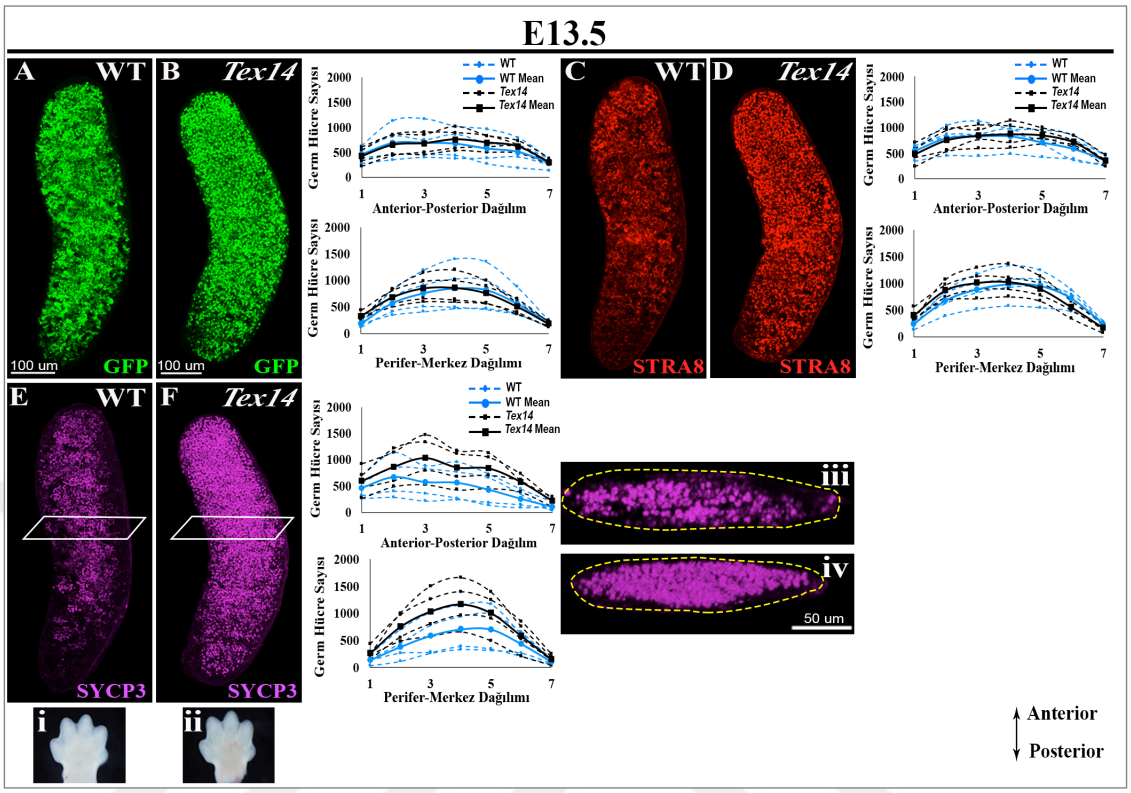


Şekil 4.5. E13.0 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan mayotik dalganın 3D incelenmesi. A, B: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda GFP ile işaretlenen germ hücrelerinin homojen şekilde dağıldığı izlenmektedir. C, D: STRA8^{+} germ hücrelerinin E12.5'a nazaran ovaryumun anterior'ünde konumlandığı, perifer-merkez dağılımında ise bir fark görülmediği belirlendi. E: SYCP3^{+} germ hücrelerinin *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda ağırlıklı olarak ovaryumun anterior-merkez kısmında konumlandığı izlenmekedir. F: *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda ise SYCP3^{+} hücrelerinin sayısı fazla olmakla birlikte sadece anterior-posterior dağılım korunmaktadır. i ve ii: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ embriyoların ön ayaklarının morfolojisi her iki embriyonunda gelişimsel olarak aynı evrede olduğunu göstermektedir. iii ve iv: sırası ile *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda E ve F'de belirtilen düzlemlerden elde edilen enine kesiti göstermektedir. Her bir antikorun immünofloresan boyanma görüntüsünün sağ tarafında o antikora ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir.

Tablo 4.3. E13.0 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	GFP	STRA8	SYCP3	GFP	STRA8	SYCP3
1	0.764	0.857	0.707	0.104	0.002	0.001
2	0.443	0.037	0.009	0.197	0.010	0.004
3	0.785	0.348	0.035	0.987	0.050	0.012
4	0.681	0.014	0.133	0.972	0.101	0.044
5	0.942	0.357	0.054	0.953	0.107	0.084
6	0.935	0.034	0.052	0.512	0.141	0.232
7	0.737	0.252	0.820	0.168	0.241	0.368

E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlar değerlendirildiğinde, germ hücreleri homojen konumlanmakla birlikte (**Şekil 4.6 A ve B**), bu evrede her iki grupta da germ hücrelerinin neredeyse tamamının STRA8 ifade ettiği belirlendi (**Şekil 4.6 C ve D**). Aynı dönemde, her iki grupta da SYCP3^{+} germ hücrelerinin ovaryumda sayıca arttığı (**Şekil 4.6 E ve F**), *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda hala ağırlıklı olarak ovaryumun merkezinde konumlandığı, E13.0'e kıyasla bu merkez paterninin ovaryumun periferine doğru yayılmaya başladığı (radyal mayotik dalga) görüldü (**Şekil 4.6 E ve iii**). Ayrıca anterior-posterior dağılım incelendiğinde SYCP3^{+} germ hücrelerinin ovaryumun anterior'ünde posterior'üne göre daha fazla bulunduğu belirledi. E13.5 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ise merkez-perifer ekspresyon farkının (radyal mayotik dalga) bulunmadığı fakat SYCP3^{+} germ hücrelerinin hala ovaryumda AP dalga oluşturacak şekilde konumlandığı görüldü (**Şekil 4.6 F ve iv**). E13.0 ovaryumlarda izlenen paterne benzer olarak mutant ovaryumda kontrol ovaryuma göre daha çok germ hücresini aktif olarak mayoz bölünmede olduğu SYCP3 ekspresyonu ile ortaya konuldu (**Şekil 4.6 F**) (**Tablo 4.4**).



Şekil 4.6. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi. A, B: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda GFP ile işaretlenen germ hücrelerinin homojen şekilde dağıldığı izlenmektedir. C, D: STRA8'in her iki grupta da neredeyse tüm germ hücrelerinin ifade edildiği görülmektedir. E: *Tex14*$^{+/+}$ovaryumlarda anterior-merkez mayoz dalgasının posterior-perifere doğru ilerlediği izlendi. F: *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ise radyal mayoz dalgasının bulunmadığı, germ hücrelerinin mayoza anterior-posterior yönüde girdiği ve mayozun *Tex14*$^{+/+}$ovaryumlardan daha ileride olduğu belirlendi. i ve ii: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ embriyoların ön ayaklarının morfolojisi her iki embriyonunda gelişimsel olarak aynı evrede olduğunu göstermektedir. iii ve iv: sırası ile *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda E ve F'de belirtilen düzlemlerden elde edilen enine kesiti göstermektedir. Her bir antikorun immünofloresan boyanma görüntüsünün sağ tarafında o antikora ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir.

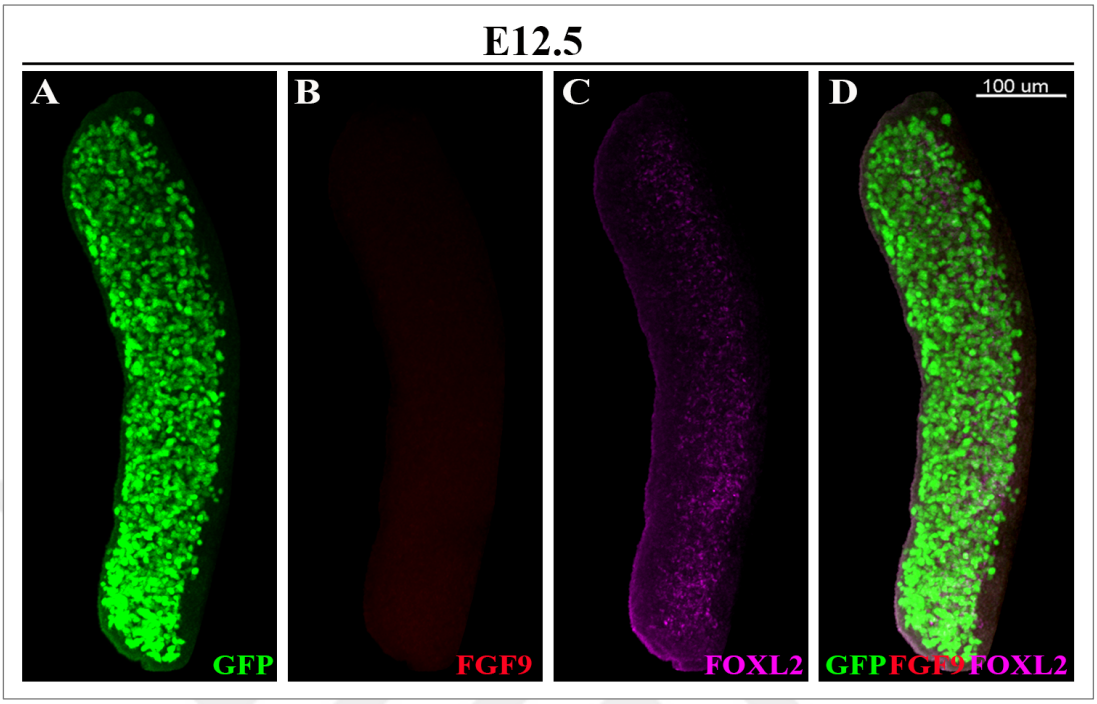
Tablo 4.4. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	GFP	STRA8	SYCP3	GFP	STRA8	SYCP3
1	0.788	0.629	0.491	0.016	0.063	0.136
2	0.854	0.845	0.502	0.461	0.224	0.090
3	0.949	0.922	0.151	0.690	0.543	0.159
4	0.682	0.804	0.294	0.969	0.830	0.175
5	0.522	0.323	0.115	0.810	0.763	0.344
6	0.467	0.352	0.026	0.721	0.225	0.445
7	0.794	0.887	0.071	0.914	0.187	0.411

4.5. Embriyonik Ovaryumda Radyal Mayotik Dalganın Oluşmasını Kontrol Edebilecek Olası Faktörlerin Araştırılması

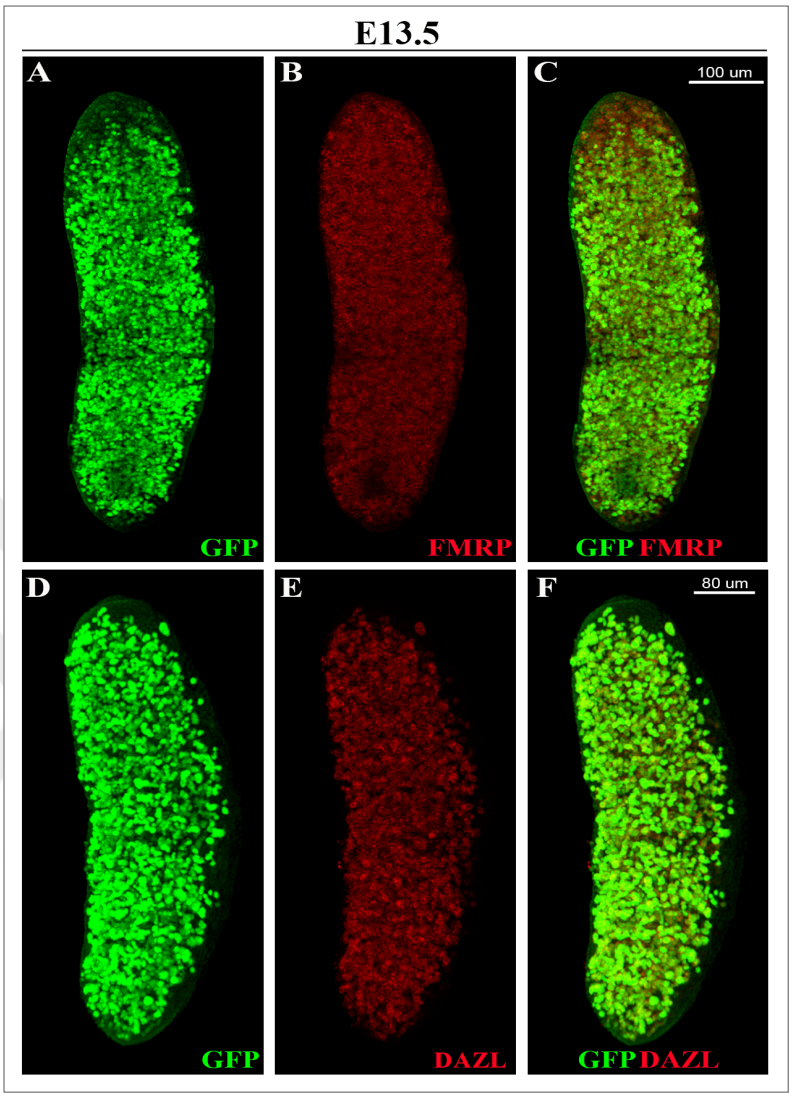
Tex14$^{+/+}$ embriyolarda ovaryumun periferindeki germ hücrelerinin merkezdekilere oranla daha sonra mayoz bölünmeye girmesine ve hücreler arası köprü içermeyen *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda bu dalganın görülmemesine neden olan olası faktörlerin aydınlatılması için, *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda mayozun koordine edilmesinden sorumlu olabilecek aday moleküller analiz edildi. Bu amaçla öncelikle, literatürde daha önce embriyonik dönem testiste mayozun başlatılmasını inhibe ettiği belirtilen FGF9 (Fibroblast Growth Factor 9) (Bowles ve ark., 2010)'un ekspresyonu değerlendirildi ve E12.5 ovaryumlarda FGF9 ve ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu görüldü (**Şekil 4.7 B**).

Ovaryumda bulunan perifer-merkez mayoz paterninin bu bölgelerde bulunan somatik hücrelerin farklılığından kaynaklanabileceği ihtimali ile, ovaryumlar somatik hücre belirteci olan FOXL2 ile analiz edildi. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda FOXL2 proteininin öncelikli olarak mezonefroza komşu olan ve merkez somatik hücrelerde önce ifade edildiği, mezonefroza uzak olan, ovaryumun perifer kısmında bulunan somatik hücrelerinin ise gelişimin ilerleyen dönemlerinde FOXL2 ifade ettiği belirlendi (**Şekil 4.7 C**).



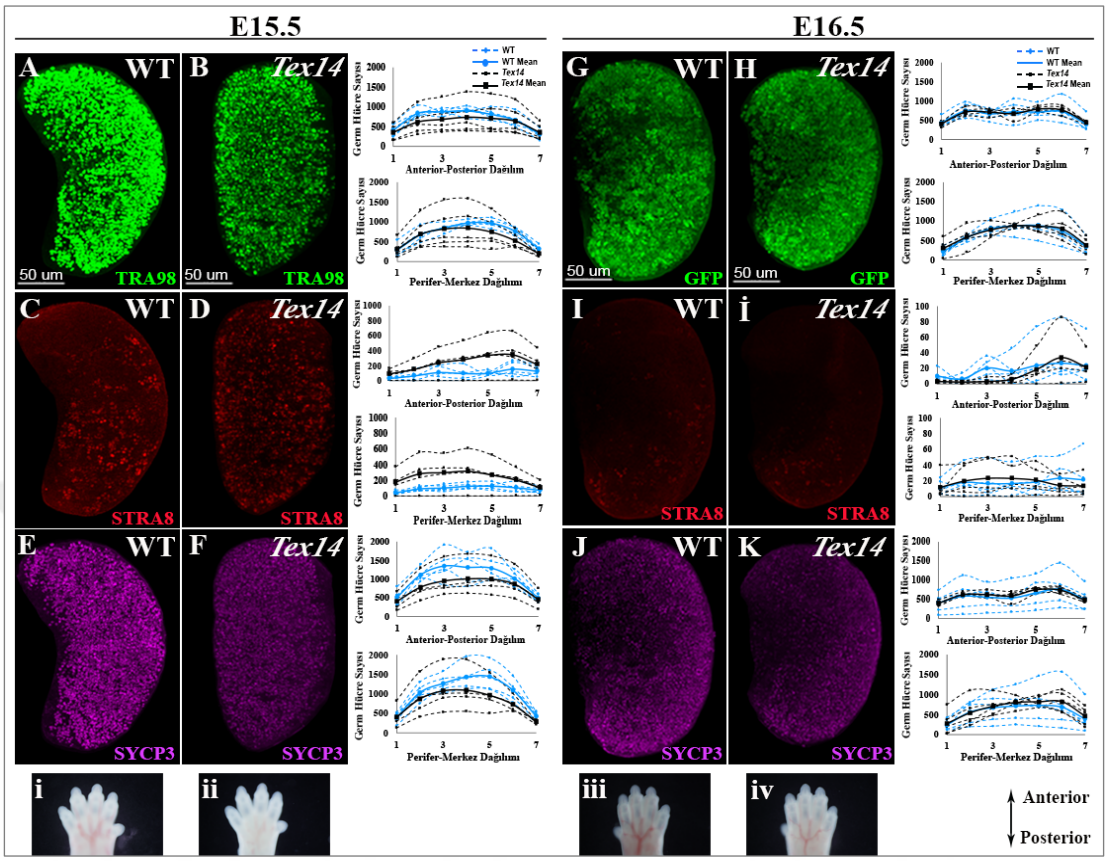
Şekil 4.7. E12.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda FGF9 ve FOXL2 protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi. A: GFP ile işaretlenmiş germ hücrelerini, B: FGF9 ekspresyonunu, C: FOXL2 ile işaretlenmiş somatik hücreleri ve D: tüm belirteçlerin bir arada ekspresyonlarını göstermektedir.

Somatik hücrelerden farklı olarak, germ hücrelerinde intrinsik olarak bulunan faktörlerin radyal mayotik dalganın oluşumunda rolünün olup olmadığını araştırmak için E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda germ hücrelerine spesifik RNA bağlanma proteinlerinin dağılımı da analiz edildi. Bu amaçla, gelişim süresince embriyonik ovaryumda gelişiminde rolü olan FMRP (Fragile X Mental Retardation) ve DAZL (Deleted in Azoospermia-Like) proteinlerinin ovaryumda dağılımı incelendiğinde her iki proteinin de ovaryumdaki lokalizasyonunda herhangi bir fark gözlenmedi (**Şekil 4.8 B ve E**). Böylece embriyonik ovaryumda radyal mayotik dalganın oluşmasında; somatik hücrelerden salınan mayotik inhibitör proteinin (FGF9), somatik hücre farklanmasının (FOXL2) ya da RNA bağlanma proteinlerinin (FMRP ve DAZL) majör rolünün olmadığı belirlendi.



Şekil 4.8. E13.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda FMRP ve DAZL mRNA bağlanma proteinlerinin ekspresyonunun değerlendirilmesi. A ve D: GFP ile işaretlenmiş germ hücrelerini, B: FMRP ekspresyonunu, E: DAZL ekspresyonunu, C ve F: tüm belirteçlerin bir arada ekspresyonlarını göstermektedir.

Mayotik dalganın analizi için seçilen son evrelerde, E15.5 ve E16.5, her iki grupta da STRA8 ekspresyonun anterior'den posterior'e dalga şeklinde germ hücrelerinden kalktığı belirlendi (**Şekil 4.9 C, D, I ve İ**). E15.5'tan itibaren neredeyse bütün germ hücrelerinin artık SYCP3 ekspre ettiği ve germ hücre lokalizasyonu herhangi bir eğilim (sapma) göstermediği için SYCP3 ekspresyonunun da ovaryumda homojen şekilde yayıldığı belirlendi (**Şekil 4.9 E, F, J ve K**) (**Tablo 4.5 ve 4.6**).



Şekil 4.9. E15.5 ve E16.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda mayotik dalganın 3D incelenmesi. A ve B: E15.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda TRA98 ifade eden germ hücrelerini, C ve D: STRA8^{+} germ hücrelerini, E ve F: SYCP3^{+} germ hücrelerini göstermektedir. G ve H: E16.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda GFP ifade eden germ hücrelerini, I ve İ: STRA8^{+} germ hücrelerini, J ve K: SYCP3^{+} germ hücrelerini göstermektedir. Her iki dönemde, her iki grupta da STRA8 ekspresyonun azaldığı ve neredeyse tüm germ hücrelerinin SYCP3 ifade etmeye başladığı izlendi. i, ii, iii ve iv: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ön ayaklarının morfolojisi embriyoların gelişimsel olarak aynı evrede olduğunu göstermektedir. Her bir antikorun immünofloresan boyanma görüntüsünün sağ tarafında o antikora ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir.

Tablo 4.5. E15.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	TRA98	STRA8	SYCP3	TRA98	STRA8	SYCP3
1	0.610	0.095	0.477	0.921	0.088	0.905
2	0.188	0.210	0.115	0.970	0.105	0.542
3	0.283	0.198	0.201	0.910	0.097	0.521
4	0.414	0.121	0.329	0.585	0.129	0.296
5	0.608	0.076	0.307	0.271	0.184	0.108
6	0.885	0.173	0.484	0.052	0.206	0.064
7	0.700	0.331	0.730	0.029	0.429	0.082

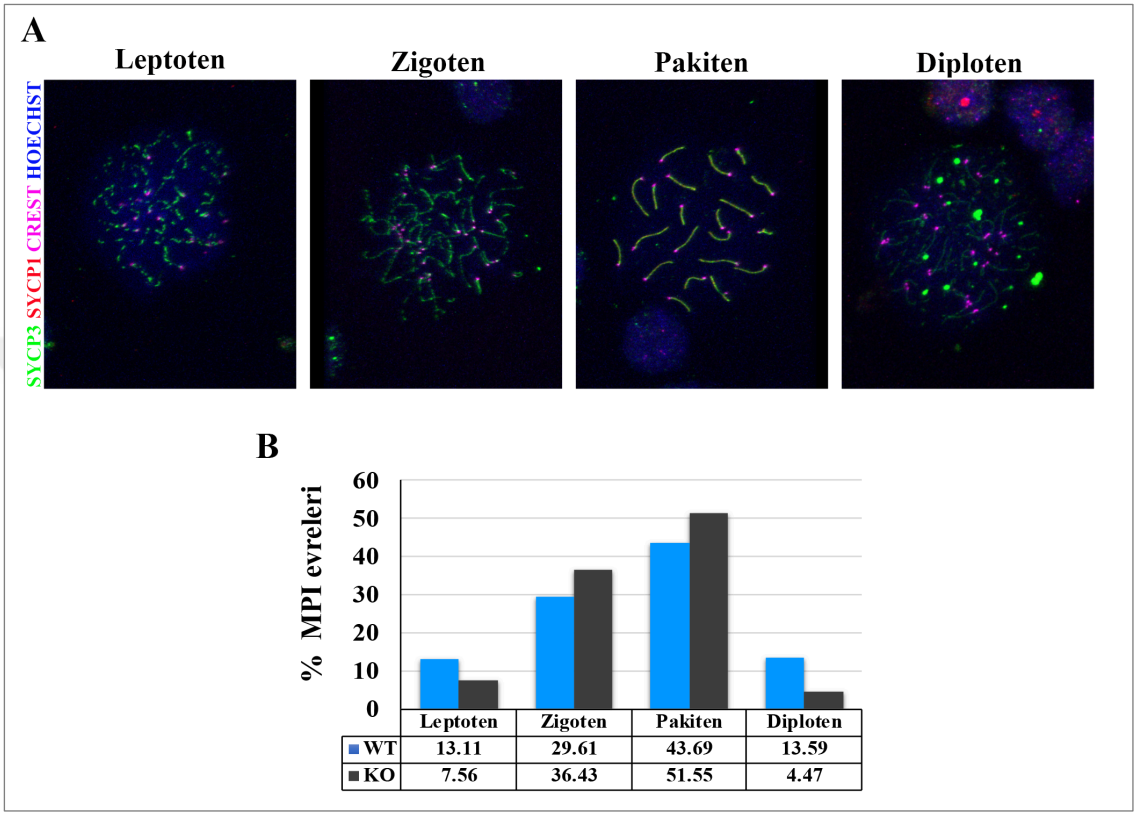
Tablo 4.6. E16.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	GFP	STRA8	SYCP3	GFP	STRA8	SYCP3
1	0.813	0.134	0.900	0.471	0.981	0.839
2	0.719	0.170	0.863	0.911	0.906	0.915
3	0.643	0.033	0.708	0.781	0.642	0.874
4	0.734	0.282	0.786	0.969	0.618	0.657
5	0.474	0.781	0.697	0.915	0.856	0.714
6	0.828	0.763	0.905	0.776	0.395	0.621
7	0.668	0.911	0.882	0.761	0.569	0.729

4.6. Mayotik Profaz I (MPI)'in *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Değerlendirilmesi

E15.5 ve E16.5 günden itibaren *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda sinaptonemal kompleksin tüm germ hücrelerinde oluştuğu SYCP3 ekspresyonu ve 3D analiz ile belirlendikten sonra, bu germ hücrelerinde mayotik profaz I (MPI)'in evreleri analiz edildi. Bunun için SYCP3, SYCP1 ve CREST belirteçleri ile immünofloresan boyama tekniği ile boyanmış E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ germ hücre yayma preparatları değerlendirildi. E18.5 germ hücrelerinden hazırlanan yayma preparatlarında *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{+/+}$ 'e kıyasla daha az sayıda leptoten, daha çok sayıda zigoten ve pakiten evresindeki germ hücrelerinin bulunması, mutant ovaryumda MPI'ın daha erken ilerlediğini işaret etmektedir. MPI'ın son evresi olan diploten evresinde germ hücreleri

incelendiğinde *Tex14*$^{+/+}$'e oranla *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda daha az sayıda germ hücresinin diploten evresinde olduğu izlenmiştir (**Şekil 4.10**).



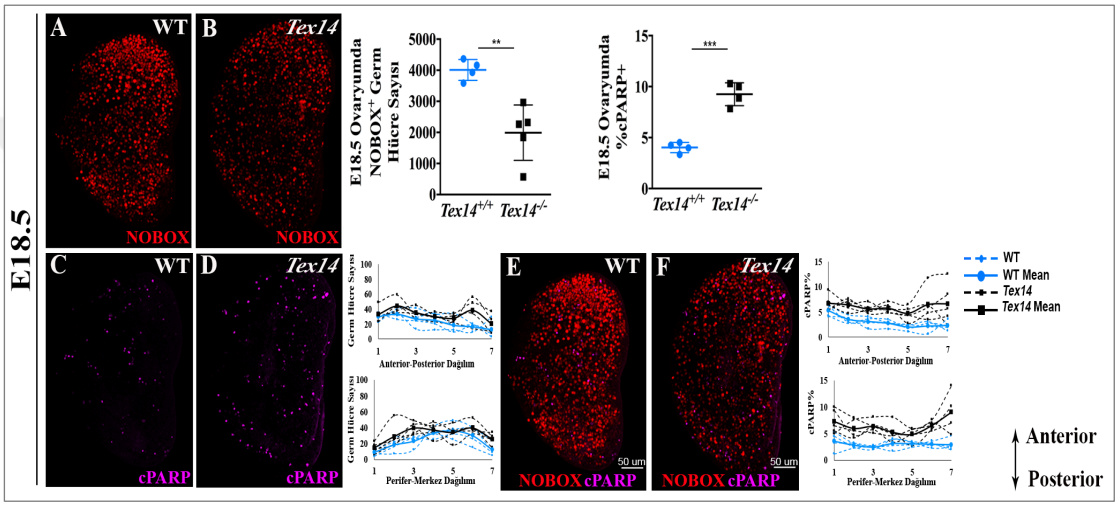
Şekil 4.10. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlardan hazırlanan germ hücre yayma preparatlarında MPI'ın evrelerinin analizi. A: Leptoten, zigoten, pakiten ve diploten evrelerinde germ hücrelerini, B: Analiz sonucunda MPI evrelerinin *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumda yüzdelerini gösteren grafik. WT: *Tex14*$^{+/+}$, KO: *Tex14*$^{-/-}$.

4.7. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Apoptozun Değerlendirilmesi

Tex14$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücrelerinin mayoz bölünmeye *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlara kıyasla erken başlaması ve MPI'in son evresi olan diploten'de azalan *Tex14*$^{-/-}$ germ hücre sayılarının apoptoz ile olası bir ilişkisi olup olmadığını belirlemek için E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D analizi cPARP apoptoz belirteci kullanılarak gerçekleştirildi. Bu dönemde germ hücre havuzu NOBOX antikoru kullanılarak analiz edildi.

Tex14$^{-/-}$ ovaryumlarda total germ hücre popülasyonun dramatik şekilde azaldığı (p=0.0038), bununla birlikte, apoptozun da *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlara oranla arttığı belirlendi

(p=0.0001) (**Şekil 4.11 A-F**). Konumsal olarak *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumların anterior'ünde posterior'üne oranla daha çok cPARP^{+} germ hücresinin olduğu dikkat çekti. Perifer-merkez cPARP^{+} hücrelerin dağılımı açısından *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda herhangi bir fark gözlenmedi. *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ise anterior-posterior cPARP^{+} germ hücre dağılımı açısından bir farklılık gözlenmezken, perifer-merkez dağılımı açısından *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumların tam tersi bir dağılım görüldü (**Şekil 4.11 F**) (**Tablo 4.7**).

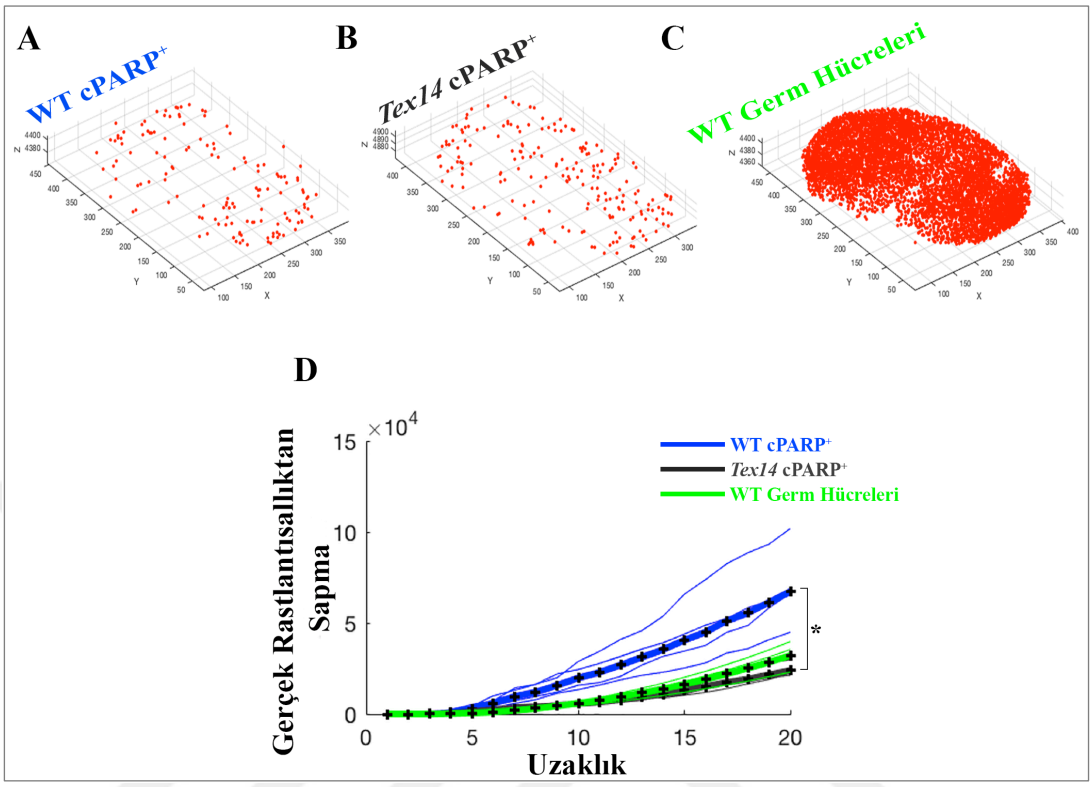


Şekil 4.11. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi. A ve B: E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ifade eden germ hücrelerini, C ve D: cPARP^{+} germ hücrelerini göstermektedir. E ve F: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ve cPARP'ın bir arada ekspresyonunu göstermektedir. cPARP immünofloresan boyanma görüntüsünün sağ tarafında cPARP antikoruna ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. NOBOX ve cPARP'ın bir arada gösterildiği E ve F'nin yanındaki grafikler cPARP^{+} germ hücrelerin ovaryumda dağılımının genel germ hücre belirteci olan NOBOX^{+} germ hücre dağılımına oranlanmış halini (cPARP%) göstermektedir. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir. **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$.

Tablo 4.7. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım		**Perifer-Merkez Dağılımı**	
	WT vs *Tex14*		WT vs *Tex14*	
	cPARP	cPARP%	cPARP	cPARP%
1	0.679	0.183	0.214	0.033
2	0.099	0.004	0.267	0.009
3	0.306	0.006	0.014	0.0003
4	0.308	0.001	0.488	0.069
5	0.280	0.009	0.778	0.035
6	0.077	0.037	0.180	0.0002
7	0.528	0.076	0.036	0.013

E18.5 ovaryumlarda germ hücre eliminasyonunun grup/kümeler halinde gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek için germ hücrelerinin koordinatları kullanılarak kümelenme (clustering) analizi gerçekleştirildi (**Şekil 4.12**). *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda tüm germ hücrelerinin koordinatları normal dağılım olarak kullanılarak (**Şekil 4.12 C ve D**) öncelikle *Tex14*$^{+/+}$cPARP^{+} germ hücrelerinin koordinatlar kümelenme açısından analiz edildi. *Tex14*$^{+/+}$ovaryumda cPARP^{+} germ hücrelerinin grup/kümeler halinde bulunduğu tespit edildi (**Şekil 4.12 A ve D**) (p=0.01). Germ hücreleri arasında hücreler arası köprü bulundurmayan ovaryumlarda ise cPARP ifadesinin germ hücre grupları ile ilişkili olmadığı, cPARP^{+} germ hücrelerinin neredeyse yabanıl tip total germ hücre dağılımına yakın (neredeyse daha az) bir dağılım gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.12 B ve D**) (p=0.88).

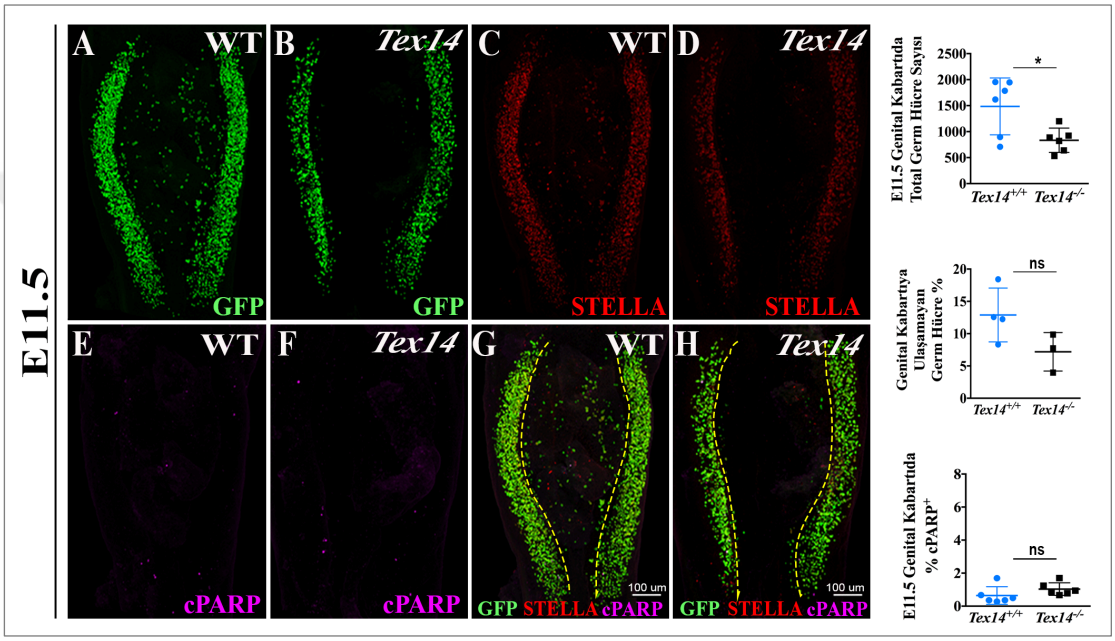


Şekil 4.12. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre eliminasyonun kümelenme analizi. A: *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda cPARP^{+} germ hücrelerinin dağılımını, B: *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda cPARP^{+} germ hücrelerinin dağılımını, C: *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda tüm germ hücrelerinin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta ovaryumda bulunan germ hücrelerini temsil etmektedir. D: Her üç dağılım arasındaki ilişkiyi belirten grafikte ince çizgiler analiz edilen her bir ovaryumu (n), kalın çizgiler ise istatistiksel analiz sonucunda her bir grup için ortalama veriyi işaret etmektedir.

4.8. E11.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Embriyonik Ovaryumlarda Apoptozun Değerlendirilmesi

Tex14$^{-/-}$ ovaryumlarda E18.5 günde izlenen azalan germ hücre popülasyonu ve artan apoptozun *Tex14*$^{-/-}$ germ hücrelerindeki bozulan mayoz dalgasının haricinde, gelişimin erken dönemlerinde germ hücrelerinin genital kabartıya göçündeki başarısızlık nedeni ile olup olmadığını araştırmak için E11.5 günde aort-gonad-mezonefroz (Aorta-Gonad-Mesonephros 'AGM')'de total germ hücre popülasyonu ve apoptoz değerlendirildi. Söz konusu dönemde total germ hücre popülasyonunu işaretlemek için GFP ve STELLA belirteçleri kullanıldı. *Tex14*$^{-/-}$ genital kabartıda, *Tex14*$^{+/+}$'e kıyasla azalan germ hücre sayısı belirlendi (**Şekil 4.13 A-D**) (p=0.0230). Apoptoz analiz edildiğinde ise her iki grup arasında cPARP^{+} germ hücre sayılarının benzer olduğu izlendi (**Şekil 4.13 E-F**) (p=0.1746). *Tex14*$^{+/+}$ embriyolarda genital kabartıya göç etmekte olan daha fazla germ hücresi olduğu dikkat çekti. *Tex14*$^{-/-}$ embriyolarda ise gelişmekte olan genital kabartılar

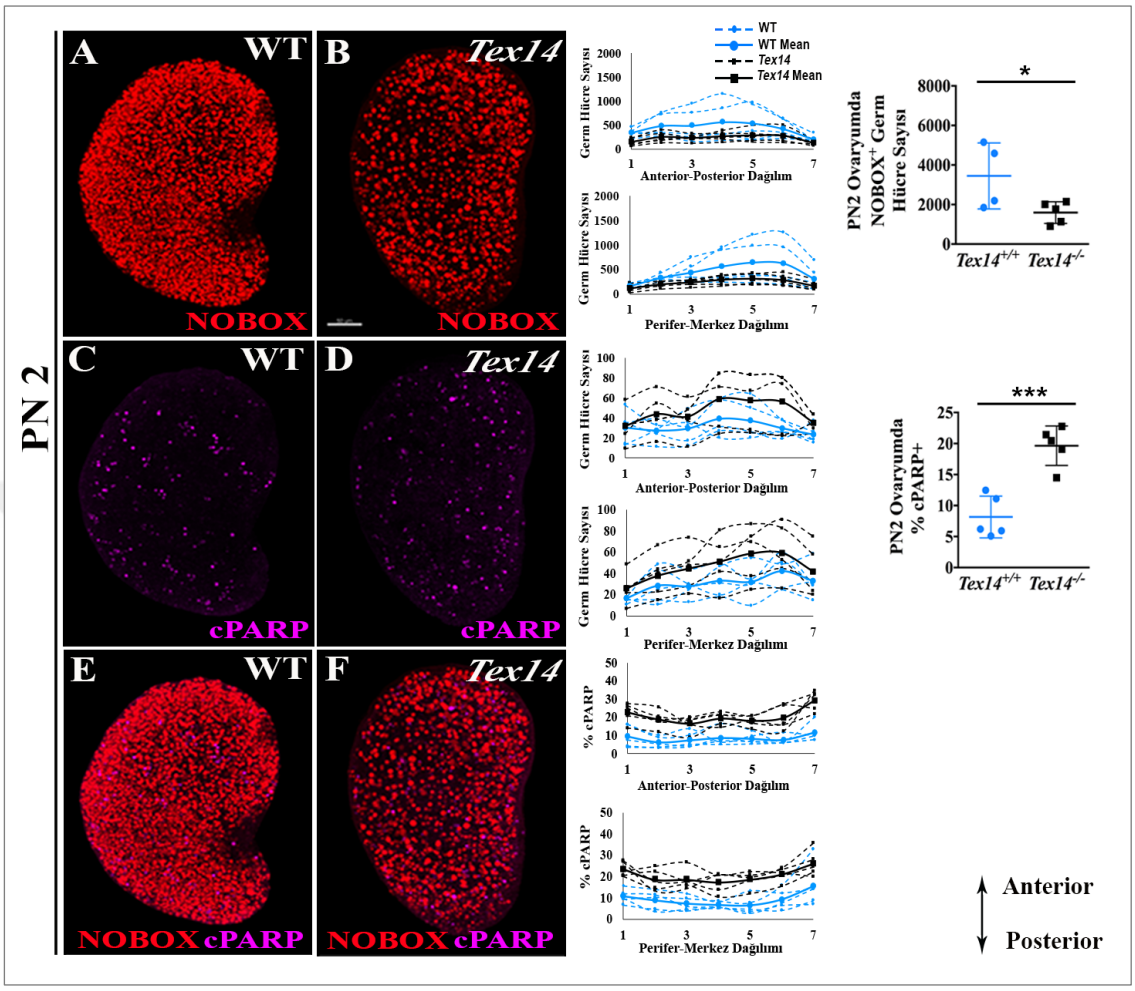
arasında daha az germ hücresinin hala göç etmekte olduğu görüldü (**Şekil 4.13 A-D, G ve H**). Yapılan analizler sonucunda iki grup arasında istatistiksel farka rastlanılmadı (p=0.1019). Bu bulgular doğrultusunda, *Tex14*$^{-/-}$ genital kabartıda belirlenen az sayıda germ hücresinin germ hücre ölümünden ziyade, germ hücre göçündeki gecikmeden kaynaklanabileceği belirlendi.



Şekil 4.13. E11.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ AGM'de germ hücre popülasyonunun ve hücre ölümünün incelenmesi. A ve B: E11.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda GFP ifade eden germ hücrelerini, C ve D: STELLA^{+} germ hücrelerini, E ve F: cPARP^{+} germ hücrelerini, G ve H: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ AGM'de tüm belirteçlerin bir arada ekspresyonunu göstermektedir. Sarı kesikli ok ile karşılıklı bulunan genital kabartıların sınırı belirtilmiştir. G: *Tex14*$^{+/+}$ AGM'de H: *Tex14*$^{-/-}$ AGM'e kıyasla daha fazla germ hücresinin migrasyon halinde olduğu kesikli oklar ile sınırlandırılmış alanda görülmektedir. ns: p>0.05, *: p≤0.05.

4.9. PN2 ve PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Ovaryumlarda Apoptozun Değerlendirilmesi

Hücreler arası köprü içeremeyen E18.5 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda izlenen artmış germ hücre ölümünün gelişimin ilerleyen dönemlerinde primordial folikül havuzunun kurulması üzerindeki olası etkilerini araştırmak için PN2 ve PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre popülasyonu ve cPARP^{+} hücrelerin 3D analizi gerçekleştirildi. PN2 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{+/+}$'e oranla germ hücre sayısının azaldığı (p=0.04) ve bununla birlikte apoptozun da dramatik bir şekilde arttığı görüldü (**Şekil 4.14 A-F**) (p=0.0005). Her iki grupta da cPARP^{+} germ hücrelerinin ovaryumdaki lokalizasyonlarının benzer olduğu görüldü (**Tablo 4.8**).

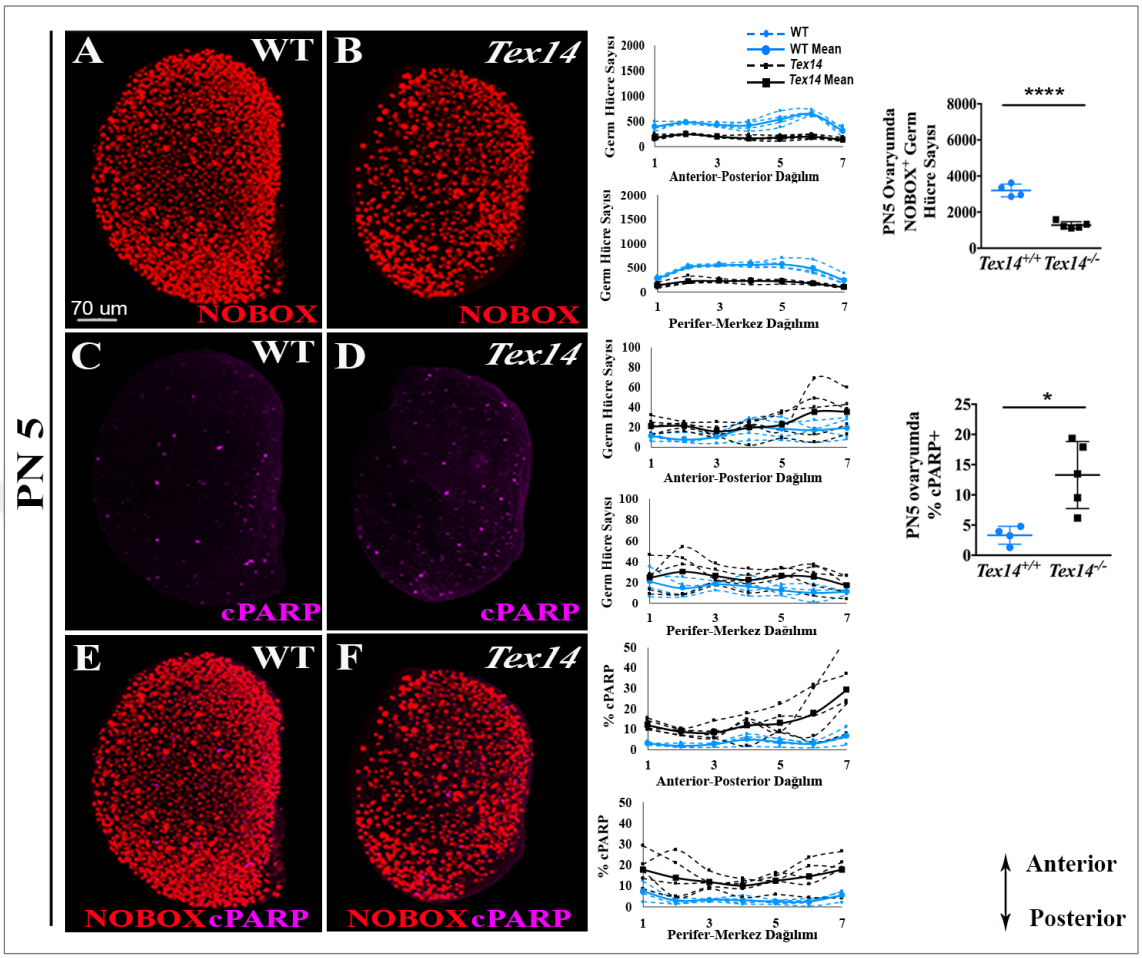


Şekil 4.14. PN2 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi. A ve B: PN2 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ifade eden germ hücrelerini, C ve D: cPARP^{+} germ hücrelerini göstermektedir. E ve F: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ve cPARP'ın bir arada ekspresyonunu göstermektedir. NOBOX ve cPARP immünofloresan boyanma görüntülerinin sağ tarafında belirtilen antikorlara ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. NOBOX ve cPARP'ın bir arada gösterildiği E ve F'nin yanındaki grafikler cPARP^{+} germ hücrelerin ovaryumda dağılımının genel germ hücre belirteci olan NOBOX^{+} germ hücre dağılımına oranlanmış halini (cPARP%)göstermektedir. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumları, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir. *: $p \leq 0.05$, ***: $p \leq 0.001$.

Tablo 4.8. PN2 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	NOBOX	cPARP	cPARP%	NOBOX	cPARP	cPARP%
1	0.007	0.901	0.007	0.178	0.232	0.000
2	0.078	0.151	0.001	0.013	0.448	0.011
3	0.137	0.295	0.011	0.072	0.150	0.003
4	0.155	0.234	0.003	0.126	0.189	0.002
5	0.198	0.227	0.001	0.137	0.087	0.002
6	0.214	0.099	0.005	0.151	0.249	0.002
7	0.104	0.060	0.001	0.261	0.501	0.081

PN5 ovaryumlar incelendiğinde ise PN2'ye benzer olarak *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre sayısının azaldığı (p<0.0001), germ hücre apoptozunun da arttığı görüldü (**Şekil 4.15 A-D**) (p=0.0106) (**Tablo 4.9**). *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumdaki cPARP^{+} germ hücrelerinin anterior-posterior ya da perifer-merkez dağılımı açısından bir farklılık gözlenmezken, *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların posterior'ünde daha fazla cPARP^{+} germ hücresinin bulunduğu dikkat çekti (**Şekil 4.15 E-F**).



Şekil 4.15. PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda apoptozun 3D incelenmesi. A ve B: PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ifade eden germ hücrelerini, C ve D: cPARP^{+} germ hücrelerini göstermektedir. E ve F: *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ve cPARP'ın bir arada ekspresyonunu göstermektedir. NOBOX ve cPARP immünofloresan boyanma görüntülerinin sağ tarafında belirtilen antikorlara ait Anterior-Posterior Dağılım (üstte) ve Perifer-Merkez Dağılımı (altta) grafikleri bulunmaktadır. NOBOX ve cPARP'ın bir arada gösterildiği E ve F'nin yanındaki grafikler cPARP^{+} germ hücrelerin ovaryumda dağılımının genel germ hücre belirteci olan NOBOX^{+} germ hücre dağılımına oranlanmış halini (cPARP%)göstermektedir. Grafiklerde mavi renk *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlar, siyah renk *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumları temsil etmektedir. Grafiklerde kesikli çizgiler her bir embriyodan alınan ovaryum örneğini (n), devamlı-kalın çizgi ise söz konusu ovaryumların ortalama değerlerini belirtmektedir. *: $p \leq 0.05$, ****: $p \leq 0.0001$.

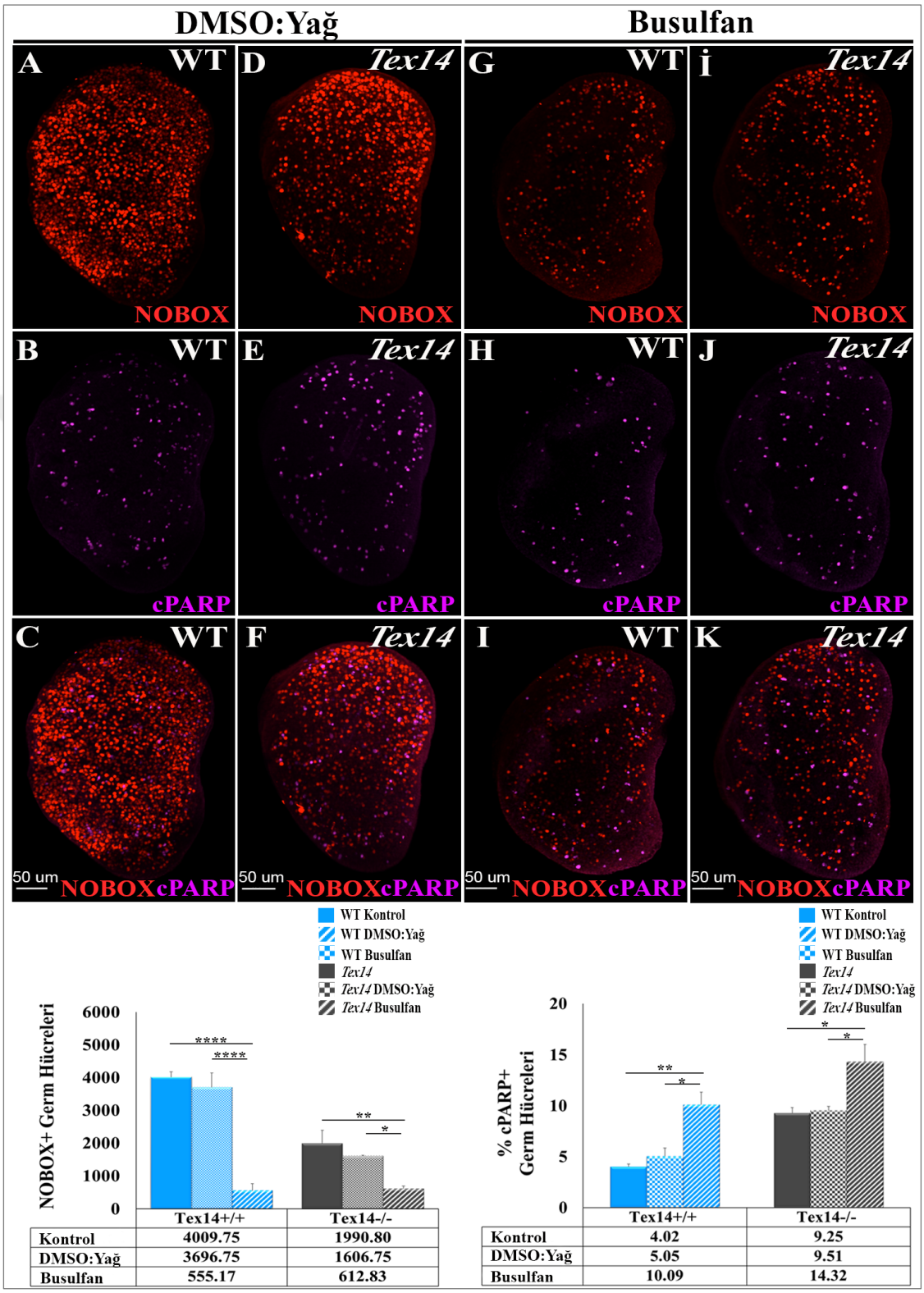
Tablo 4.9. PN5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumların istatistiksel analizleri sonucunda elde edilen *p* değerleri.

	Anterior-Posterior Dağılım			**Perifer-Merkez Dağılımı**		
	WT vs *Tex14*			WT vs *Tex14*		
	NOBOX	cPARP	cPARP%	NOBOX	cPARP	cPARP%
1	0.001	0.069	0.0003	0.002	0.706	0.047
2	0.0000004	0.002	0.0001	0.0001	0.203	0.070
3	0.00001	0.191	0.017	0.000001	0.136	0.002
4	0.001	0.989	0.076	0.00001	0.340	0.010
5	0.001	0.589	0.027	0.0001	0.026	0.002
6	0.000003	0.232	0.059	0.001	0.079	0.016
7	0.008	0.168	0.043	0.016	0.279	0.026

4.10. Toksik Stres Oluşturulan *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ Ovaryumlarda Germ Hücre Hayatta Kalımı ve Apoptozun Değerlendirilmesi

Germ hücrelerinin total eliminasyonuna neden olmayacak dozda kimyasal ajan enjekte edilerek toksik stres oluşturulan E18.5 ovaryumlarda germ hücre sayısı ve apoptoz oranları ovaryumda hücreler arası köprülerin varlığında ve yokluğunda değerlendirildi. *Tex14*$^{+/+}$ E18.5 ovaryumlarda Busulfan enjeksiyonu ile toksik stres oluşturulduktan sonra germ hücrelerinin %13.84'ünün hayatta kaldığı, aynı doz Busulfan'a maruz kalmış *Tex14*$^{-/-}$ embriyoların ovaryumunda ise germ hücre hayatta kalımının daha fazla, %30.78, olduğu belirlendi. Busulfan enjeksiyonu sonrasında germ sayısında görülen azalmanın, germ hücreleri arasında köprü içeren *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda daha dramatik olduğu dikkat çekti (**Şekil 4.16 G ve İ**). Busulfan'ın çözgeni olan DMSO/Yağ enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarla (**Şekil 4.16 A-D**), hiç enjeksiyonun gerçekleştirilmediği *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda (**Şekil 4.11 A-B**) germ hücre sayısı bakımından istatistiksel bir fark bulunmadı (p>0.05).

E18.5 ovaryumlarda toksik stres sonrasında *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ arasında apoptoz değerlendirildiğinde ise her iki grupta da Busulfan enjeksiyonu sonrasında cPARP^{+} germ hücre yüzdesinin arttığı, fakat belirlenen artışın *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{-/-}$'e kıyasla daha fazla olduğu görüldü (**Şekil 4.16 H ve J**). DMSO/Yağ enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda (**Şekil 4.16 B ve E**), hiç enjeksiyonun gerçekleştirilmediği *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlara (**Şekil 4.11 C-D**) kıyasla cPARP^{+} açısından istatistiksel bir fark bulunmadı (p>0.05).



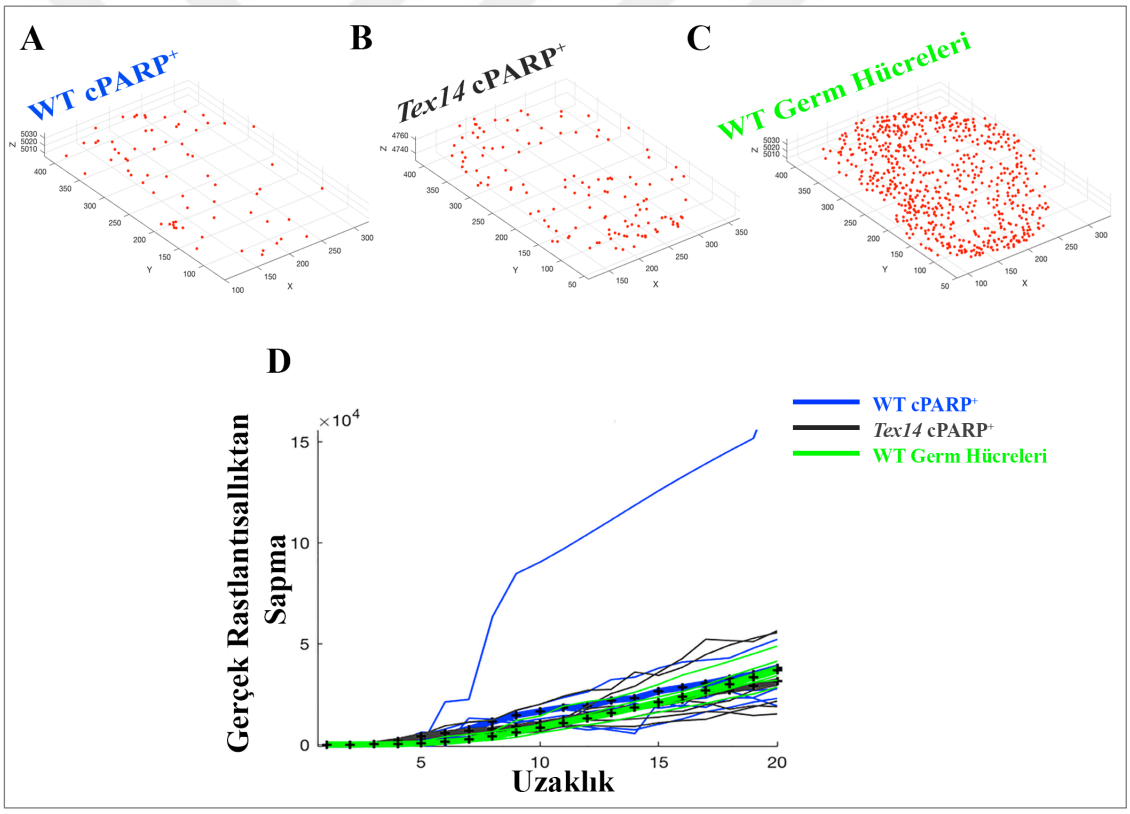
	Tex14+/+	Tex14-/-
Kontrol	4009.75	1990.80
DMSO:Yağ	3696.75	1606.75
Busulfan	555.17	612.83

	Tex14+/+	Tex14-/-
Kontrol	4.02	9.25
DMSO:Yağ	5.05	9.51
Busulfan	10.09	14.32

Şekil 4.16. Toksik stres oluşturulmuş E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre hayatta kalımı ve apoptozun değerlendirilmesi. A ve D: DMSO/Yağ enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda NOBOX ifade eden germ hücrelerini, B ve E: DMSO/Yağ enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda cPARP^{+} germ hücrelerini, G ve İ: Busulfan enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda

NOBOX ifade eden germ hücrelerini, H ve J: Busulfan enjekte edilmiş *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda cPARP^{+} germ hücrelerini, C, F, I ve K: Belirtilen gruplarda NOBOX ve cPARP'ın bir arada ekspresyonunu göstermektedir. Kontrol: enjeksiyonun gerçekleştirilmediği, DMSO/Yağ: 50 µl taşıyıcı enjekte edilmiş ve Busulfan: 50 µl 5mg/ml enjekte edilmiş ovaryumları belirtmektedir. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, ****: $p \leq 0.0001$.

Toksik stres uygulaması sonrasında E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre ölümünün kümeler halinde gerçekleşip gerçekleşmediği de analiz edildi. E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda tüm germ hücrelerinin koordinatları normal dağılım olarak kullanıldığında E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda cPARP^{+} germ hücrelerinin de normal dağılım gösterdiği belirlendi ($p>0.05$). Sonuç olarak, her iki grupta da hücre ölümünün grup/kümeler halinde gerçekleşmediği görüldü (**Şekil 4.17**).



Şekil 4.17. Busulfan enjekte edilmiş E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücre eliminasyonun kümelenme analizi. A: *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda cPARP^{+} germ hücrelerinin dağılımını, B: *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda cPARP^{+} germ hücrelerinin dağılımını, C: *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda tüm germ hücrelerinin dağılımını göstermektedir. Her bir kırmızı nokta ovaryumda bulunan germ hücrelerini temsil etmektedir. D: Her üç dağılım arasındaki ilişkiyi belirten grafikte ince çizgiler analiz edilen her bir ovaryumu (n), kalın çizgiler ise istatistiksel analiz sonucunda her bir grup için ortalama veriyi işaret etmektedir.

5.TARTIŞMA

Embriyonik dönemden, menapoza kadar ovaryum gelişimi zamansal ve konumsal olarak farklılık gösteren birçok gelişimsel sürece ev sahipliği yapar. Ovaryum gelişimi süresince izlenen bu heterojen mekanizmaların gelişiminin ilk günlerinden itibaren kapsamlı bir şekilde aydınlatılması, fonksiyonel reprodüktif yaşam ömrü için oldukça önemlidir. Reprodüktif yaşam ömrü dişilerde ovaryumdaki germ hücre rezervi ile doğru orantılıdır. Bu rezerv embriyonik ve neonatal dönemde ovaryumda germ hücre gelişimi üzerinde etkili olan mekanizmaların senkron halinde gerçekleşmesi ile belirlenir. Folikül rezervinin belirlendiği bu kritik dönemde etkili olan moleküler ve genetik etkenleri aydınlatmak üzere yapılan araştırmaların son yıllarda literatürde arttığı dikkat çekmektedir.

Dişi üreme sisteminin devamlılığı için oldukça önemli olan germ hücre havuzunun kapasitesini belirlemek için literatürde kullanılan tek bir belirteç (örneğin serum belirteçleri) ne yazık ki bulunmamaktadır. Günümüzde deney hayvanları kullanılarak yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan yöntem histolojik örnekleme yöntemidir. Bu yöntem tüm ovaryumdan art arda belirli kalınlıkta kesitler alındıktan sonra, aritmetik olarak her 5 ya da 10 kesitte bir kesitin analiz edilmesi ve sadece nükleusu kesit düzleminde görülen germ hücrelerinin sayılması temeline dayanır (Tilly, 2003). Literatürde yaygın olarak kullanılan bu teknik, örnekleme yöntemi kullanılarak elde edilen verilerin farklı laboratuvarlar tarafından tutarlılık göstermemesi, yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği ve elde edilen sonuçların birçok teknik (örneğin kesit kalınlığı, analiz edilen kesit sayısı gibi) değişkene bağlı olması nedeni ile hala tartışma konusudur (Canning ve ark., 2003; Hirshfield ve Midgley, 1978; Tilly, 2003). Teknik basamakların optimizasyonu sağlansa dahi söz konusu teknik ovaryumun iki boyutlu incelenmesine olanak sağlamaktadır.

Literatürde iki boyutlu histolojik kesitlerin dijital olarak 3D yeniden düzenlendiği çalışmalar olmasına rağmen, söz konusu çalışmalarda dokular ilk olarak yine histolojik örnekleme yöntemi ile hazırlanır. Elde edilen kesitlerden bilgisayar ortamında 3D görüntüler elde edilir (de Bakker ve ark., 2016). 3D yapının oluşturulması için kullanılan kesitler farklı histolojik takip basamaklarına maruz kaldığı için dijital olarak oluşturulan

3D yapıların fizyolojik olarak ovaryumu ne kadar yansıttığı hala belirsizliğini korumaktadır.

Konfokal mikroskopi ve bilgisayar programcılığının gelişmesi ile farklı organ ve sistemlerin kesit alınmaksızın, 3D olarak analiz edilmesi biyolojik sistemlerde şimdiye kadar saklı kalmış bilgilerin ortaya çıkmasına olanak sağlar. Günümüzde farklı gelişim dönemlerinde ovaryumlarda bulunan germ hücre havuzunu farklı bilgisayar yazılımları kullanılarak, 3D kantitatif olarak analiz eden çalışmalar olmasına rağmen, söz konusu çalışmalarda kullanılan belirteçler kısıtlıdır (Cordeiro ve ark., 2015; Faire ve ark., 2015). Germ hücre havuzunun kurulmasında rol oynayan mekanizmalar (mayoz, apoptoz ve kist yıkımı ile primordial folikül formasyonu)'ın aydınlatılabilmesi için birçok farklı belirtecin aynı anda kullanılmasına olanak sağlayacak ortak bir protokol ve güçlü analiz sistemine ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda farklı belirteçlerin aynı anda kullanılasına olanak sağlayan wholemount immünofloresan boyama protokolü uygulanarak işaretlediğimiz germ hücrelerinde literatürde daha önce kullanılmamış 3D analiz yöntemi gerçekleştirdik. Imaris programı ve ona entegre edilen MATLAB komut dizisi kullanarak geliştirdiğimiz 3D analiz yöntemi şimdiye kadar histolojik metodlarla belirlenememiş en erken mayotik germ ($STRA8^+$ ve $SYCP3^+$) hücrelerinin fare embriyonik ovaryumlarda E12.5-E13.0'ten itibaren bulunduğunu göstermemize olanak sağlayarak, mayoz bölünmenin dişi germ hücrelerinde daha erken başladığını ortaya koymuştur. Önceki çalışmalarda belirtilen (E13.5) 'dan daha erken dönemde embriyonik ovaryumlarda mayotik germ hücrelerinin varlığını tespit etmemiz, geliştirdiğimiz 3D analiz metodunun ne kadar hassas ve tutarlı olduğunun göstergesidir.

Fare embriyonik ovaryumlarında mayoz bölünmenin germ hücrelerinde zamansal ve konumsal olarak farklılık göstererek anterior'den posterior'e yayılan bir dalga modeli ile senkron bir şekilde başladığı literatürde ilk kez Page ve ark (2003) tarafından gösterilmiştir. Bu çalışmada, wholemount *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak RNA düzeyinde *Stra8*'nin ilk olarak E12.5'ta XX gonadların anterior kısmında ifade edildiği belirlenmiştir. Buna paralel olarak pluripotensi belirteci olan *Oct4*'ün de germ hücrelerinde *Stra8* ifadesi başladığında ovaryumun anterior'ünden posterior'üne doğru

durdurulduğu ortaya konulmuştur. Embriyonik gelişimin ilerleyen dönemlerinde *Stra8* ifadesinin ovaryumun posterior'üne doğru dalga şeklinde yayıldığı ve E15.5 ve E16.5'ta anterior kısımında bulunan germ hücrelerinin ilk olarak *Stra8* ifadesini durduğu gösterilmiştir (Menke ve ark., 2003). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile mayotik makine (meiotic machinery)'nin anterior'de bulunan germ hücrelerinde, posterior'de bulunan germ hücrelerinden daha önce aktive edildiği protein düzeyinde STRA8'e özgü antikor kullanılarak ta gösterilmiştir (Cordeiro ve ark., 2015). Söz konusu çalışmada embriyonik ovaryumlardan histolojik örnekleme yöntemi ile hazırlanmış kesitlerde, STRA8 protein ekspresyonunun ilk defa E13.5'ta (RNA ifadesinden 1 gün sonra) ovaryumun anterior'ünde tespit edilebildiği vurgulanmıştır. Çalışmamızda literatürde belirtilenden farklı olarak, STRA8'i ifade eden germ hücrelerinin ilk olarak E12.5 ovaryumda varlığını göstermekle birlikte, bu hücrelerin E12.5'ta ağırlıklı olarak ovaryumun anterior'ünde lokalize olmadığını, ovaryumun genelinde yayılmış olarak bulunduğunu gösterdik. Bu bulgular E12.5'ta ovaryumun anterior'ünde ağrılıklı olarak bulunan *Stra8*'i RNA düzeyinde ifade eden germ hücrelerinde transkripsiyonel düzenlenmenin translasyonal düzenlemeden farklı olduğunu göstermektedir. Yani RNA düzeyinde *Stra8* içeren germ hücrelerinin STRA8 proteini anterior'den posterior'e doğru yayılan bir dalga şeklinde ifade etmediğini ortaya koymaktadır. RA gradiyentinden farklı olarak, STRA8 proteinini ifade eden ilk germ hücre topluluğunun ovaryumun geneline yayılmış olması, E12.5'ta pre-mayotik DNA replikasyonun germ hücrelerinde RA gradiyentinden bağımsız olarak, intrinsik bir mekanizma ile başlatıldığını işaret edilebilir. Embriyonik ovaryumda intrinsik mekanizmalar sayesinde germ hücrelerinde mayotik makinenin başlatılabileceği literatürde daha önce farklı araştırmacılar tarafından ortaya atılmıştır (McLaren, 2003; McLaren ve Southee, 1997; Ohkubo ve ark., 1996) (Donovan ve ark., 1986). Bununla birlikte, çalışmamızda yarım gün sonra (E13.0'de) ovaryumlarda izlenen, literatürde belirtilene kıyasla zayıf anterior-posterior dalga modeli intrinsik mekanizmalar ile pre-mayotik DNA replikasyonu başlatıldıktan sonra RA gradiyentinin bu süreci indükleyebileceği ihtimalini akıllara getirmektedir.

Bullejos ve Koopman (2004)'ın wholemount *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanarak yaptığı çalışma ile pluripotensi belirteçlerinin ovaryumda öncelikle anterior'de bulunan germ hücrelerinde ifadelerinin durdurulduğu ve eş zamanlı olarak anterior'de bulunan

germ hücrelerinin ilk olarak mayoz belirteçlerini (örneğin *Sycp3*) ifade ettiği gösterilmiştir (Bullejos ve Koopman, 2004). Bu çalışmada, *Sycp3*'ün germ hücrelerinde ilk olarak E13.5'ta ovaryumun anterior kısmında bulunan birkaç germ hücresi tarafından ifade edildiği gösterilmiştir. Çalışmamızda SYCP3 ifade eden germ hücrelerinin ağırlıklı olarak ovaryumun anterior uç kısmında değil, E13.0'ta ovaryumun özellikle merkezinde ve gruplar halinde bulunduğunu gösterdik. E13.5'te ise germ hücrelerindeki SYCP3 ifadesinin ovaryumun anterior'ünde baskın olmakla birlikte, perifere doğru yayılan radyal bir dalga halinde olduğunu belirledik. Söz konusu radyal mayotik dalga literatürde daha önce belirtilen, insan fetal ovaryumlarında izlenen modele oldukça benzerlik göstermektedir. İnsan fetal germ hücrelerinde mayotik dalga faredeki AP dalgadan farklı olarak ovaryumun merkez kısmına yakın bölgede başlar ve ovaryumun periferine doğru ilerler (Anderson ve ark., 2007; Frydman ve ark., 2017; Heeren ve ark., 2016). Bulgularımız fare ovaryumunda da radyal dalganın var olduğunu göstererek, fare ve insan ovaryumlarında mayozun başlangıç modelinin oldukça benzer olduğunu ortaya koymuştur. Fare embriyonik ovaryumlarında radyal dalganın şimdiye kadar klasik histolojik yöntemler kullanılarak belirlenememiş olması, sadece iki boyutun değerlendirildiği histolojik kesitlerle analizin gerçek fizyolojik süreci ne kadar örnekleyebildiğinin bir göstergesidir.

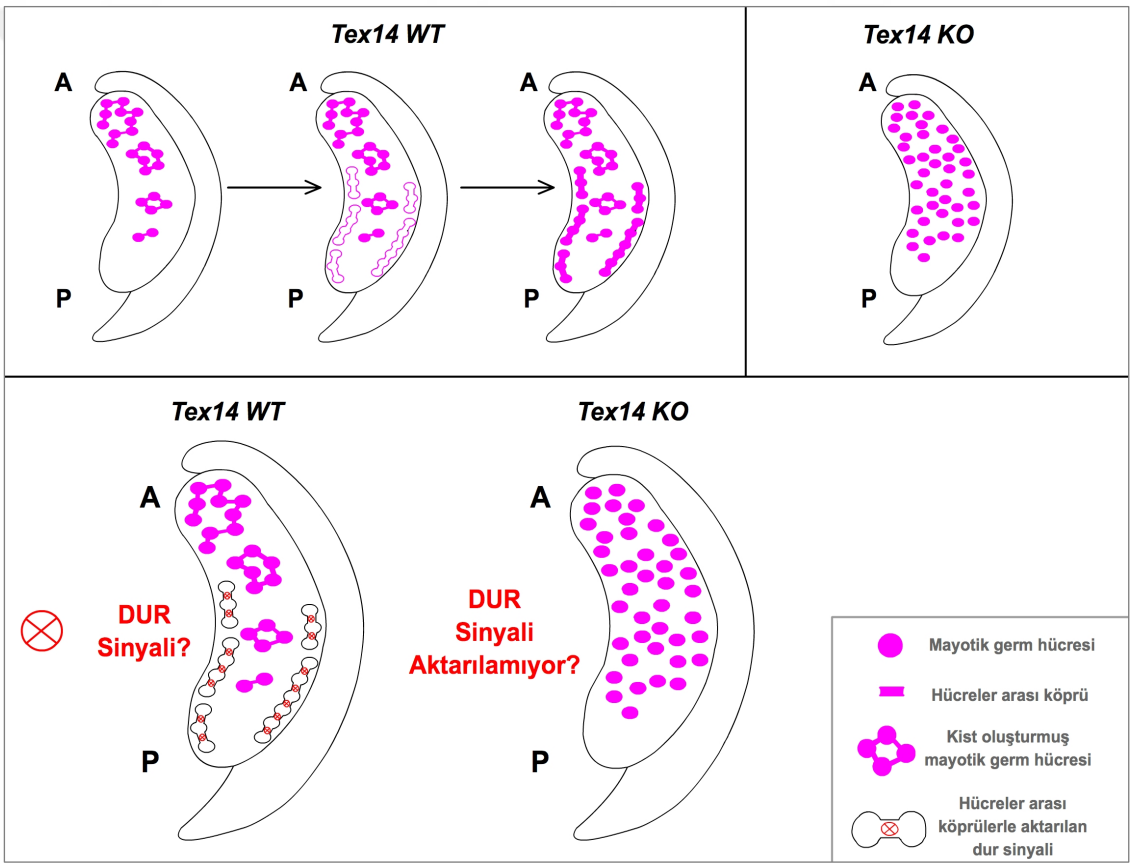
Mayoz dalgasını analiz etmek için kullanılan STRA8 ve SYCP3'ün mayotik makinenin başlatıldığı dönemde anterior-posterior ve perifer-merkez dağılım modelleri açısından birbirinden farklı olması çalışmamızda elde ettiğimiz dikkat çeken bulgulardan bir diğeridir. Literatürde STRA8'in mayoz bölünme öncesinde gerçekleşen DNA replikasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Baltus ve ark., 2006). Söz konusu çalışmada STRA8 mutant E15.5 germ hücrelerinde sinaptonemal kompleks oluşumunda da aksaklıklar rapor edilse dahi, aynı grup tarafından sonraki yıllarda yapılan bir çalışmada RA'nin aktive ettiği, fakat STRA8'den bağımsız yolakların mitoz-mayoz geçişi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Koubova ve ark., 2014). Sonuç olarak literatürde her gün yenilen bilgiler ile STRA8'nin aslında pre-mayotik DNA replikasyonundan sorumlu olduğu ve bu basamaktaki tek efektör molekül olmadığı da gösterilmiştir. Ayrıca STRA8 ifade eden, DNA miktarını arttıran her germ hücresinin kesin olarak aktif mayoz bölünmeye (MPI'de sinaptonemal kompleks oluşumu) başlayıp başlamadığı konusunda

literatürde kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sinaptonemal komplekste lokalize olan SYCP3 proteini mayoz bölünmenin aktif belirteci olarak kullanılmıştır. Literatürde daha önce belirlenememiş radyal mayoz dalgasının gerçekliği, sadece SYCP3'e özgü bir model olup olmadığı, benzer dönemde germ hücrelerinde ifade edilen farklı belirteçler kullanılarak da test edilmiştir. SYCP3'e benzer dönemde mayotik germ hücrelerinde ifade edilen faklı bir belirteç olan γH_2AX (Gamma Histone H2A.X)'nin de ekspresyonunun embriyonik ovaryumda merkezde bulunan germ hücrelerinde öncelikle başlaması, elde edilen bulguların radyal mayoz dalgasının SYCP3'e özel olmadığını, aynı evreyi temsil eden farklı belirteçler kullanıldığında da benzer sonuç alındığını göstererek elde ettiğimiz bulguların özgüllüğünü arttırmıştır.

Neden ovaryumun merkezindeki germ hücrelerinin mayoz belirteçlerini ilk olarak ifade ettiği, germ hücre farklanmasının periferdeki germ hücrelerinden daha önce olduğu hala belirsizliğini korumaktadır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalar fare ve insan ovaryumlarında primordial folikül formasyonunun medullaya yakın korteks bölgesinde ilk olarak başladığını gösterse de Cordeiro ve ark. (2015) son yıllarda yaptığı çalışma bu bilgileri bir adım öne taşımıştır (Cordeiro ve ark., 2015). Bu çalışmada, farede primordial folikül formasyonunun ovaryumun özellikle anterior'üne yakın medulla bölgesinde ilk olarak başladığı rapor edilmiştir. Literatürde mayoz bölünmeye ilk başlayan germ hücrelerin folikül oluşumunu da öncelikli olarak tamamlayıp tamamlamadıklarını kanıtlayacak bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat bugün sahip olduğumuz bilgiler ışığında, primordial folikül formasyonu ile mayoza ilk giren germ hücrelerinin lokalizasyonunun bu denli benzer olması ovaryum gelişiminin erken gelişim dönemlerinden itibaren sıkı bir düzen içerisinde gerçekleştiğini gösterebilir. Daha da dikkat çekici olarak literatürde gonad gelişimi süresince XY gonadlarda cinsiyet belirleyici faktörlerin başında gelen SRY'nin ilk olarak gonadın merkezinde ifade edilmesi (Bullejos ve Koopman, 2001) evrimsel olarak iki cinsiyette de gonad gelişiminin merkezde başladığını ihtimalini akıllara getirmektedir.

Germ hücreleri arasında köprü içermeyen *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda E13.0 ve E13.5'ta sadece RA gradiyentinin oluşturduğu AP dalganın bulunduğunu, radyal dalganın izlenmediğini belirledik. Elde ettiğimiz bulgular embriyonik ovaryumlarda radyal mayotik dalganın

oluşmasını kontrol eden olası faktörlerin hücreler arası köprüler tarafından kisti içeren hücreler arasında aktarıldığını işaret etmektedir. Yabanıl tip embriyonik ovaryumda merkezde bulunan germ hücreleri mayoz bölünmeye başlarken, periferdeki germ hücrelerinde, hücreler arası köprüler ile iletilen (durdurucu) faktörler bu hücrelerin mayoz bölünmeye girmesini geciktirerek radyal mayoz dalgasının oluşmasını sağlayabilir (**Şekil 5.1**). Elde ettiğimiz veriler RA'nın mayozun başlatılmasında ve düzenlenmesinde tek aracı faktör olmadığını, hücreler arası köprüler ile sağlanan iletişimin germ hücrelerinde mayozun düzenlenmesi için kritik olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 5.1. Dişi germ hücrelerinde hücreler arası köprülerin varlığında ve yokluğunda mayoz dalgasının nasıl kontrol edilebileceğini gösteren model. Söz konusu modelde yabanıl tip ovaryumun periferindeki germ hücreleri mayoz bölünmeye merkezdekilerden daha sonra başladığı için bu hücrelerde durdurucu sinyaller hücreler arası köprüler ile germ hücreleri arasında paylaşılıyor olabilir. Mutant ovaryumlarda hücreler arası köprüler olmadığı için, bu sinyaller aktarılamıyor ve mayoza giriş sadece RA'nin etkisi ile AP dalga şeklinde gerçekleşiyor.

Literatürde son yıllarda yapılan bir çalışma ile FGF9'un insan fetal ovaryumda varlığı gösterilerek *STRA8* ifadesini baskıladığı rapor edilmiştir (Frydman ve ark., 2017). Radyal mayotik dalganın düzenlenmesinde ovaryumun periferinde artmış FGF9'un rolünün olup olmadığını belirlemek için yaptığımız analizlerde, embriyonik fare ovaryumlarında FGF9 ekspresyonunun olmadığını ve bu nedenle düzenleyici faktör olama ihtimalinin düşük olduğunu belirledik. Ardından, embriyonik ovaryumda bulunan somatik hücrelerde görülen (soy) farklılığının germ hücre gelişimini sinyaller aracılığı ile etkileyip, radyal mayotik dalganın oluşabileceğini düşünerek embriyonik ovaryumda somatik hücre belirteci olan FOXL2 ifadesini değerlendirdik. Rastetter ve ark. (2014) embriyonik fare ovaryumunda üç farklı, $FOXL2^{+}$, $LGR5^{+}$ ve $NR2F2^{+}$, somatik hücre tipi olduğunu belirtmiştir (Rastetter ve ark., 2014). LGR5 ifade eden germ hücrelerinde FOXL2 ifadesinin olmaması LGR5 ve FOXL2'in farklı tipteki somatik hücrelerde ekspre olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada $Lgr5^{-/-}$ embriyonik ovaryumlarda ki germ hücrelerinin mayoz bölünmeye yabanıl tip ovaryumlardan daha geç girdiği gösterilmiştir. Bu noktadan hareketle, $FOXL2^{+}$ hücrelerin en erken mayoza giren germ hücreleri ile ovaryumda lokalizasyon açısından benzerlik gösterip göstermediklerini araştırdık. FOXL2'in ovaryumun mezonefroza komşu olan bölgesindeki somatik hücrelerde ilk olarak ifade edilmeye başlaması ve mezonefroza zıt perifer bölgesinde FOXL2 ifadesinin en son olarak gerçekleşmesi $FOXL2^{+}$ hücrelerin en erken mayotik germ hücreleri ile ilişkisinin oldukça düşük olduğunu belirtmektedir.

Embriyonik dönemden itibaren somatik hücrelerden üretilen faktörlerin germ hücre gelişimi üzerinde etkili olabilme ihtimali oldukça yüksek olsa dahi, hücreler arası köprü içermeyen ovaryumlarda radyal mayotik dalganın olmayışı somatik hücrelerdeki farklılıktan kaynaklanamayabilir. $Tex14^{-/-}$ ovaryumlarda germ hücreleri arasında köprü olmamasına rağmen, bu germ hücreleri hala somatik hücreler ile komşuluklarını korumaktadır. Bu nedenle germ hücrelerinde intrinsik bulunan ve hücreler arası köprüler ile iletilen sinyal/moleküllerin radyal mayotik dalganın oluşmasında rol oynamasının daha muhtemel olduğunu düşündük. Buradan yola çıkarak, embriyonik dönemde germ hücrelerinde bulunan intrinsik molekülleri araştırmayı hedefledik.

Daha önce literatürde yapılan çalışmalar ile mayoz bölünmeye başlamakta olan dişi germ hücrelerinin transkripsiyonel olarak sessiz olduğu bilinmektedir. Bu dönemde germ hücre homeostazı ve gelişimi daha önce transkribe edilmiş mRNA'ların RNA-bağlanma proteinlerinin kontrolü altında translasyonuna bağlıdır (Clarke, 2012; Radford ve ark., 2008; Seydoux ve Braun, 2006). RNA-bağlanma proteinlerinin oogenez boyunca yaygın olarak ifade edildiği ve germ hücre gelişiminin her evresinde post-transkripsiyonel kontrol için gerekli olduğu açıkça ortaya konulmuştur (Ruggiu ve ark., 1997; Tay ve Richter, 2001; VanGompel ve Xu, 2010). RNA-bağlanma proteinlerinden olan FMRP ve DAZL'in insan fetal germ hücrelerinde farklanma ve kendini yenileme (self-renewal)'yi dengelediği son yıllarda literatüre kazandırılan çarpıcı bulgulardandır. Bununla birlikte, *Fmr1*$^{-/-}$ farelerde erken foliküler aktivasyon olduğu rapor edilmiştir (Ascano ve ark., 2012). FMRP granüllerinin fetal insan ovaryumunda bulunan germ hücrelerinde mayoza girişten hemen önce izlenmesi mitoz-mayoz geçişinde sessiz hale gelmesi gereken mRNA'ları baskıladığını düşündürmektedir (Rosario ve ark., 2017; Rosario ve ark., 2016). FMRP ile benzer şekilde DAZL proteinin de insan fetal ovaryumlarında germ hücrelerinde mayoza girişten hemen önce dramatik olarak artması pre-mayotik ve mayotik germ hücre geçişinde rolünün olabileceğini düşündürmektedir (Anderson ve ark., 2007; He ve ark., 2013). Literatürdeki bu bilgiler ışığında mitoz-mayoz geçişinin olduğu dönemde FMRP ve DAZL protein ekspresyonları 3D olarak değerlendirdiğimizde her iki proteinin de fare embriyonik ovaryumlarında bulunan germ hücrelerinde ifadesinin konumsal olarak farklılık göstermediğini izledik. Çalışmamızda radyal mayotik dalganın düzenlenmesi için hücreler arası köprüler ile paylaşılan, literatürde daha önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre aday olabileceğini düşündüğümüz sinyal/moleküllerin hiçbirinin radyal mayotik dalganın oluşumundan sorumlu olamayacağını belirledik. Söz konusu mayotik modelin oluşmasında etkili olan hedef moleküllerin ortaya çıkarılması için yaptığımız literatür taraması yeterli olmadığı için günümüzde yaygın olarak kullanılan hücre sekanslama (sequencing)'nın bu konu detaylı bilgiler verebileceği düşüncesindeyiz.

Tex14$^{-/-}$ germ hücrelerinde izlenen pre-matür mayozun MPI'in diploten evresine kadar etkili olması, fakat diploten evresine gelindiğinde *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{+/+}$'e oranla daha az sayıda germ hücresinin bulunması, pre-matür mayozun gelişimin ilerleyen

dönemlerinde germ hücre eliminasyonuna neden olabileceği ihtimalini akıllara getirmiştir. Çalışmamızda diploten evresindeki germ hücrelerinin özellikle elimine edildiğini net olarak göstermesek de bu dönemde (E18.5) *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{+/+}$'e oranla artan hücre eliminasyonu dikkat çekicidir. Literatürde Tex14$^{-/-}$ ovaryumlar kullanılarak yapılan çalışmada E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ve *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda total germ hücre sayılarının benzer olduğu belirtilmiştir (Greenbaum ve ark., 2009). Söz konusu çalışmada histolojik kesit alma yöntemi ile germ hücre sayımı gerçekleştirildiği için *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda azalan germ hücre sayısı teknik kısıtlamalar nedeni ile belirlenememiş olabilir. Çalışmamızda total ovaryum kesit alınmaksızın bütünü ile analiz edildiği için, elde ettiğimiz verilerin teknik kısıtlama içermeksizin *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda azalan germ hücre popülasyonunu sadece E18.5'ta değil, PN2 ve PN5'de dahil olmak üzere daha etkin bir şekilde ortaya koyduğunu düşünmekteyiz.

Geliştirdiğimiz 3D analiz yöntemi ile germ hücre ölümünün *Tex14*$^{+/+}$'de ovaryumun anterior'ünde posterior'e kıyasla daha fazla gerçekleşmesi fakat *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda ovaryumun geneline yayılması germ hücre ölümünün düzenlenmesinde hücreler arası köprülerin rolünün olduğunu gösterebilir. Bu noktadan hareketle, E18.5 *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumda germ hücre ölümünün grup/kümler halinde meydana gelirken, *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda rastgele gerçekleşmesi hücreler arası köprülerin embriyonik dönemde germ hücre eliminasyonunda da rolünün olduğu ihtimalini kuvvetlendirmektedir.

Hücreler arası köprü yapılarının olası bir stres altında germ hücre eliminasyonunu nasıl etkilediği sorusuna cevap bulmak için Busulfan enjekte edip, kimyasal stres oluşturduğumuzda, hayatta kalım oranının *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda *Tex14*$^{-/-}$ 'e kıyasla daha düşük olduğunu gösterdik. Elde ettiğimiz bulgular şaşırtıcı olsa dahi literatürde Lu ve Yamashita (2017) tarafından yapılan çalışma ile bazı noktalarda benzer olduğunu gördük. Söz konusu çalışmada, *Drosophila*'da testislerindeki germ hücre bağlantılarının germ hücrelerini DNA hasarına daha duyarlı hale getirdiği rapor edilmiştir. Germ hücre ölümünü indükleyici sinyallerin kisti oluşturan germ hücrelerinde paylaşılabileceği ve bu durumda kistteki tüm hücrelerin ölümü ile sonuçlanabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur (Lu ve Yamashita, 2017). Çalışmamızda E18.5 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda total germ hücre ölümünün *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlara kıyasla fazla olması fare embriyonik

ovaryumlarında hücreler arası köprülerin hücre ölümünü indükleyici sinyaller paylaşarak tüm kistin ölümüne neden olmadığını açıkça göstermektedir. Bununla birlikte, kimyasal stres oluşturulduğu durumda E18.5 *Tex14*$^{-/-}$ ovaryumlarda hayatta kalım oranın *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlara kıyasla fazla olması germ hücre popülasyonun heterojen olduğunu gösterebilir. Söz konusu durum embriyonik ovaryumda farklı dayanıklılık ya da gelişimsel potansiyele (yüksek, orta, düşük) sahip germ hücrelerinin olduğunu ve hücreler arası köprüler ile orta derece gelişimsel potansiyele sahip germ hücrelerine destek moleküllerin aktarılarak hayatta kalımlarının sağlandığını düşündürebilir. Lei ve Spradling (2016)'da yaptığı çalışma ile embriyonik ovaryumda bulunan bazı germ hücrelerinin sitoplazmik içerik ve organellerini kist içindeki bazı spesifik germ hücrelerine aktarıldığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, sitoplazma ve belirli organellerini aktaran bu germ hücrelerinin daha sonra apoptoz ile ortadan kaldırıldığı gösterilmiştir (Lei ve Spradling, 2016). Bu noktadan hareketle, hücreler arası köprü bulunmayan germ hücrelerinde gelişim süresince hayatta kalan germ hücrelerinin gelişimsel potensiyeli yüksek germ hücreleri olduğu, orta ve düşük gelişimsel potensiyele sahip germ hücrelerinin ortadan kaldırıldığı düşünülebilir. Kimyasal stresin uygulandığı *Tex14*$^{+/+}$ ovaryumlarda ise, germ hücreleri arasında oluşan hücreler arası köprülerin sayısı dolaylı olarak azaldığı için, hayatta kalım oranının hiç enjeksiyon yapılmayan ovaryumlar ile arasında oransal olarak daha büyük fark olması beklenebilir. Elde ettiğimiz bu veriler, embriyonik ovaryumda bulunan hücreler arası köprülerin germ hücre hayatta kalımını etkilediğini işaret etmektedir.

Çalışmamız, ovaryumun 3D haritalanmasını sağlayarak, dişi erken germ hücre gelişiminde hücreler arası köprülerin; ovaryumda radyal mayotik dalganın düzenlenmesi ve apoptoz düzeyinin belirlenmesindeki rollerini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Erken dönem germ hücre gelişiminin kapsamlı olarak aydınlatılması, infertilite, subfertilite, germ hücre tümörleri, oositlerde sıkça izlenen anöploidi ve diğer doğum defektleri ile ilgili bilinmeyenlere ışık tutacak potansiyeldedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tezde, farklılaşan dişi germ hücrelerinde izlenen hücreler arası köprü yapılarının, ovaryumda germ hücre rezervi kurulmadan önce meydana gelen gelişimsel süreçlerdeki rolleri 3D analiz sistemi kullanılarak araştırılmış ve aşağıda belirtilen sonuçlar elde edilmiştir.

1. Ovaryumun daha hızlı ve etkin bir şekilde analiz edilmesini sağlayan, literatürde ilk defa geliştirilen bir metodoloji ile 3D analiz sistemi geliştirilmiştir.

2. Söz konusu 3D analiz sistemi ile fare embriyonik ovaryumlarında bulunan germ hücrelerinde mayoz bölünmelerinin literatürde belirtilenden daha önce başladığı gösterilmiştir.

3. Fare embriyonik ovaryumlarında ilk olarak mayoz bölünmeye giren germ hücrelerinin ovaryumun merkezinde bulunduğunu ve mayozun AP dalga oluşumundan önce radyal bir dalga şeklinde yayıldığını gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.

4. Hücreler arası köprü içermeyen germ hücrelerinde mayozun yabanıl tip ovaryumlardan daha önce, pre-matür olarak, başlatıldığı ve radyal mayotik dalganın oluşmadığı, sadece RA'in oluşturduğu AP dalganın bulunduğu ortaya konulmuştur.

5. Radyal mayotik dalganın oluşmasında etkili olabilecek ve hücreler arası köprüler ile aktarılan sinyallerin literatürde daha önce mayozu inhibe ettiği belirtilen FGF9 ya da germ hücrelerinde mitoz-mayoz geçişini düzenleyen RNA bağlanma proteinlerden FMRP ve DAZL'nin olmadığı tespit edilmiştir.

6. Embriyonik ovaryumda E18.5'ta gerçekleşen germ hücre eliminasyonunun ovaryumun anterior'ünde posterior'ünden daha fazla meydana geldiği fakat hücreler arası köprü içermeyen ovaryumlarda germ hücre ölümünün bu şekilde bir lokalizasyon farklılığı göstermediği belirlenmiştir. Bu noktadan hareketle,

hücreler arası köprü yapılarının germ hücrelerinde apoptozu koordine ettiği ortaya konulmuştur.

7. E18.5 embriyonik ovaryumda germ hücre ölümün hücreler arası köprülerin varlığında gruplar ya da kümeler halinde meydana geldiği, hücreler arası köprü içermeyen germ hücrelerinde ise rastgele olduğu gösterilmiştir.

8. Primordial folikül formasyonundan önce germ hücreleri arasında bulunan köprüler postnatal ovaryumda ortadan kaldırılmasına rağmen, embriyonik dönemdeki etkilerinin ovaryan rezervin kurulduğu dönemde bile (PN2 ve PN5) germ hücre havuzunda azalmaya neden olduğu ortaya konulmuştur.

9. Hücreler arası köprüler aracılığı ile germ hücreleri arasında germ hücre ölümünü indükleyici sinyallerin aktarılmadığı fakat hücreler arası köprülerin varlığının germ hücrelerini kimyasal strese daha duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamız, fetal dönem diploid dişi germ hücrelerindeki hücreler arası köprülerin rollerini kapsamlı bir şekilde analiz ederek, bu konudaki literatür eksikliğine yeni bir fikir ve kavramsal çerçeve getirmiştir.

KAYNAKLAR

Aitken, R J, Findlay, J K, Hutt, K J, Kerr, J B. Apoptosis in the germ line. Reproduction 2011 141:139-150.

Anderson, R A, Fulton, N, Cowan, G, Coutts, S, Saunders, P T. Conserved and divergent patterns of expression of DAZL, VASA and OCT4 in the germ cells of the human fetal ovary and testis. BMC Dev Biol 2007 7:136.

Aona, Y, Asashima, M, Ishiura, S, Ide, T, Irimura, T, Kodama, T, Komazaki, S, Sasagawa, N, Shibasaki, Y, Shimada, M, Fukuda, H, Masaki, H, Yanagimoto, S, Yonemoto, S, Watanabe, Y, Germ Cells, in: Tokyo C T U o (Ed.), Introduction to Life Scince.

Ascano, M, Jr., Mukherjee, N, Bandaru, P, Miller, J B, Nusbaum, J D, Corcoran, D L, Langlois, C, Munschauer, M, Dewell, S, Hafner, M, Williams, Z, Ohler, U, Tuschl, T. FMRP targets distinct mRNA sequence elements to regulate protein expression. Nature 2012 492:382-386.

Baltus, A E, Menke, D B, Hu, Y C, Goodheart, M L, Carpenter, A E, de Rooij, D G, Page, D C. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. Nat Genet 2006 38:1430-1434.

Bowles, J, Feng, C W, Miles, K, Ineson, J, Spiller, C, Koopman, P. ALDH1A1 provides a source of meiosis-inducing retinoic acid in mouse fetal ovaries. Nat Commun 2016 7:10845.

Bowles, J, Feng, C W, Spiller, C, Davidson, T L, Jackson, A, Koopman, P. FGF9 suppresses meiosis and promotes male germ cell fate in mice. Dev Cell 2010 19:440-449.

Bowles, J, Koopman, P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. Development 2007 134:3401-3411.

Bullejos, M, Koopman, P. Spatially dynamic expression of Sry in mouse genital ridges. Dev Dyn 2001 221:201-205.

Bullejos, M, Koopman, P. Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. Mol Reprod Dev 2004 68:422-428.

Canning, J, Takai, Y, Tilly, J L. Evidence for genetic modifiers of ovarian follicular endowment and development from studies of five inbred mouse strains. Endocrinology 2003 144:9-12.

Chen, C L, Fu, X F, Wang, L Q, Wang, J J, Ma, H G, Cheng, S F, Hou, Z M, Ma, J M, Quan, G B, Shen, W, Li, L. Primordial follicle assembly was regulated by Notch signaling pathway in the mice. Mol Biol Rep 2014 41:1891-1899.

Chen, L, Faire, M, Kissner, M D, Laird, D J. Primordial germ cells and gastrointestinal stromal tumors respond distinctly to a cKit overactivating allele. Hum Mol Genet 2013 22:313-327.

Ciccia, A, Elledge, S J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. Molecular cell 2010 40:179-204.

Clarke, H J. Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. Results Probl Cell Differ 2012 55:1-21.

Cohen, P E, Holloway, J K. Predicting gene networks in human oocyte meiosis. Biol Reprod 2010 82:469-472.

Cohen, P E, Pollack, S E, Pollard, J W. Genetic analysis of chromosome pairing, recombination, and cell cycle control during first meiotic prophase in mammals. Endocrine reviews 2006 27:398-426.

Cordeiro, M H, Kim, S Y, Ebbert, K, Duncan, F E, Ramalho-Santos, J, Woodruff, T K. Geography of follicle formation in the embryonic mouse ovary impacts activation pattern during the first wave of folliculogenesis. Biol Reprod 2015 93:88.

Coucouvanis, E C, Sherwood, S W, Carswell-Crumpton, C, Spack, E G, Jones, P P. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. Exp Cell Res 1993 209:238-247.

de Bakker, B S, de Jong, K H, Hagoort, J, de Bree, K, Besselink, C T, de Kanter, F E, Veldhuis, T, Bais, B, Schildmeijer, R, Ruijter, J M, Oostra, R J, Christoffels, V M, Moorman, A F. An interactive three-dimensional digital atlas and quantitative database of human development. Science 2016 354.

de Cuevas, M, Lilly, M A, Spradling, A C. Germline cyst formation in Drosophila. Annu Rev Genet 1997 31:405-428.

De Felici, M, Dolci, S. Leukemia inhibitory factor sustains the survival of mouse primordial germ cells cultured on TM4 feeder layers. Dev Biol 1991 147:281-284.

Donovan, P J, Stott, D, Cairns, L A, Heasman, J, Wylie, C C. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. Cell 1986 44:831-838.

Duester, G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. Cell 2008 134:921-931.

Elkouby, Y M, Mullins, M C. Coordination of cellular differentiation, polarity, mitosis and meiosis - New findings from early vertebrate oogenesis. Dev Biol 2017 430:275-287.

Faire, M, Skillern, A, Arora, R, Nguyen, D H, Wang, J, Chamberlain, C, German, M S, Fung, J C, Laird, D J. Follicle dynamics and global organization in the intact mouse ovary. Dev Biol 2015 403:69-79.

Fawcett, D W, Ito, S, Slautterback, D. The occurrence of intercellular bridges in groups of cells exhibiting synchronous differentiation. J Biophys Biochem Cytol 1959 5:453-460.

Feng, Y M, Liang, G J, Pan, B, Qin, X S, Zhang, X F, Chen, C L, Li, L, Cheng, S F, De Felici, M, Shen, W. Notch pathway regulates female germ cell meiosis progression and early oogenesis events in fetal mouse. Cell Cycle 2014 13:782-791.

Frydman, N, Poulain, M, Arkoun, B, Duquenne, C, Tourpin, S, Messiaen, S, Habert, R, Rouiller-Fabre, V, Benachi, A, Livera, G. Human foetal ovary shares meiotic preventing factors with the developing testis. Hum Reprod 2017 32:631-642.

Ginsburg, M, Snow, M H, McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. Development 1990 110:521-528.

Gomperts, M, Garcia-Castro, M, Wylie, C, Heasman, J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. Development 1994 120:135-141.

Greenbaum, M P, Iwamori, N, Agno, J E, Matzuk, M M. Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility. Biology of reproduction 2009 80:449-457.

Greenbaum, M P, Iwamori, T, Buchold, G M, Matzuk, M M. Germ cell intercellular bridges. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011 3:a005850.

Greenbaum, M P, Ma, L, Matzuk, M M. Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. Dev Biol 2007 305:389-396.

Greenbaum, M P, Yan, W, Wu, M H, Lin, Y N, Agno, J E, Sharma, M, Braun, R E, Rajkovic, A, Matzuk, M M. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006 103:4982-4987.

Grive, K J, Freiman, R N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. Development 2015 142:2554-2563.

Gunesdogan, U, Magnusdottir, E, Surani, M A. Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event [corrected]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2014 369.

Hansson, K, Jafari-Mamaghani, M, Krieger, P. RipleyGUI: software for analyzing spatial patterns in 3D cell distributions. Front Neuroinform 2013 7:5.

Hartshorne, G M, Lyrakou, S, Hamoda, H, Oloto, E, Ghafari, F. Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection? Mol Hum Reprod 2009 15:805-819.

He, J, Stewart, K, Kinnell, H L, Anderson, R A, Childs, A J. A developmental stage-specific switch from DAZL to BOLL occurs during fetal oogenesis in humans, but not mice. PLoS One 2013 8:e73996.

Heeren, A M, He, N, de Souza, A F, Goercharn-Ramlal, A, van Iperen, L, Roost, M S, Gomes Fernandes, M M, van der Westerlaken, L A, Chuva de Sousa Lopes, S M. On the development of extragonadal and gonadal human germ cells. Biol Open 2016 5:185-194.

Hirshfield, A N, Midgley, A R, Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol Reprod 1978 19:597-605.

Hu, Y C, Okumura, L M, Page, D C. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. PLoS Genet 2013 9:e1003629.

Huang, E, Nocka, K, Beier, D R, Chu, T Y, Buck, J, Lahm, H W, Wellner, D, Leder, P, Besmer, P. The hematopoietic growth factor KL is encoded by the Sl locus and is the ligand of the c-kit receptor, the gene product of the W locus. Cell 1990 63:225-233.

Irie, N, Tang, W W, Azim Surani, M. Germ cell specification and pluripotency in mammals: a perspective from early embryogenesis. Reprod Med Biol 2014 13:203-215.

Iwamori, T, Iwamori, N, Ma, L, Edson, M A, Greenbaum, M P, Matzuk, M M. TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission. Mol Cell Biol 2010 30:2280-2292.

Jones, K T, Lane, S I. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. Development 2013 140:3719-3730.

Jones, R L, Pepling, M E. KIT signaling regulates primordial follicle formation in the neonatal mouse ovary. Dev Biol 2013 382:186-197.

Karl, J, Capel, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Dev Biol 1998 203:323-333.

Kaufman, M H, 1992. The Atlas of Mouse Development. Academic Press.

Keeney, S, Baudat, F, Angeles, M, Zhou, Z H, Copeland, N G, Jenkins, N A, Manova, K, Jasin, M. A mouse homolog of the Saccharomyces cerevisiae meiotic recombination DNA transesterase Spo11p. Genomics 1999 61:170-182.

Kim, M R, Tilly, J L. Current concepts in Bcl-2 family member regulation of female germ cell development and survival. Biochim Biophys Acta 2004 1644:205-210.

Koopman, P. Mammalian sex-determining genes. Curr Opin Biotechnol 1992 3:603-606.

Koubova, J, Hu, Y C, Bhattacharyya, T, Soh, Y Q, Gill, M E, Goodheart, M L, Hogarth, C A, Griswold, M D, Page, D C. Retinoic acid activates two pathways required for meiosis in mice. PLoS Genet 2014 10:e1004541.

Kumar, S, Chatzi, C, Brade, T, Cunningham, T J, Zhao, X, Duester, G. Sex-specific timing of meiotic initiation is regulated by Cyp26b1 independent of retinoic acid signalling. Nat Commun 2011 2:151.

Kunwar, P S, Lehmann, R. Developmental biology: Germ-cell attraction. Nature 2003 421:226-227.

Laird, D J. Humans put their eggs in more than one basket. Nat Cell Biol 2013 15:13-15.

Lawson, K A, Hage, W J. Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. Ciba Found Symp 1994 182:68-84; discussion 84-91.

Lechowska, A, Bilinski, S, Choi, Y, Shin, Y, Kloc, M, Rajkovic, A. Premature ovarian failure in nobox-deficient mice is caused by defects in somatic cell invasion and germ cell cyst breakdown. J Assist Reprod Genet 2011 28:583-589.

Lei, L, Spradling, A C. Mouse primordial germ cells produce cysts that partially fragment prior to meiosis. Development 2013 140:2075-2081.

Lei, L, Spradling, A C. Mouse oocytes differentiate through organelle enrichment from sister cyst germ cells. Science 2016 352:95-99.

Low, S H, Li, X, Miura, M, Kudo, N, Quinones, B, Weimbs, T. Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. Dev Cell 2003 4:753-759.

Lu, K, Jensen, L, Lei, L, Yamashita, Y M. Stay Connected: A Germ Cell Strategy. Trends Genet 2017 33:971-978.

Lu, K L, Yamashita, Y M. Germ cell connectivity enhances cell death in response to DNA damage in the Drosophila testis. Elife 2017 6.

Magnusdottir, E, Surani, M A. How to make a primordial germ cell. Development 2014 141:245-252.

Marangos, P, Carroll, J. Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage. Current biology : CB 2012 22:989-994.

Mardanpour, P, Guan, K, Nolte, J, Lee, J H, Hasenfuss, G, Engel, W, Nayernia, K. Potency of germ cells and its relevance for regenerative medicine. J Anat 2008 213:26-29.

McLaren, A. Primordial germ cells in the mouse. Dev Biol 2003 262:1-15.

McLaren, A, Southee, D. Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. Dev Biol 1997 187:107-113.

Menke, D B, Koubova, J, Page, D C. Sexual differentiation of germ cells in XX mouse gonads occurs in an anterior-to-posterior wave. Dev Biol 2003 262:303-312.

Mishima, M, Kaitna, S, Glotzer, M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. Dev Cell 2002 2:41-54.

Morelli, M A, Cohen, P E. Not all germ cells are created equal: aspects of sexual dimorphism in mammalian meiosis. Reproduction 2005 130:761-781.

Ohkubo, Y, Shirayoshi, Y, Nakatsuji, N. Autonomous regulation of proliferation and growth arrest in mouse primordial germ cells studied by mixed and clonal cultures. Exp Cell Res 1996 222:291-297.

Pepling, M E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. Genesis 2006 44:622-632.

Pepling, M E. Follicular assembly: mechanisms of action. Reproduction 2012 143:139-149.

Pepling, M E, Spradling, A C. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. Development 1998 125:3323-3328.

Pepling, M E, Spradling, A C. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. Dev Biol 2001 234:339-351.

Pepling, M E, Sundman, E A, Patterson, N L, Gephardt, G W, Medico, L, Jr., Wilson, K I. Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains. Reproduction 2010 139:349-357.

Pepling, M E, Wilhelm, J E, O'Hara, A L, Gephardt, G W, Spradling, A C. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2007 104:187-192.

Radford, H E, Meijer, H A, de Moor, C H. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in Xenopus oocytes. Biochim Biophys Acta 2008 1779:217-229.

Rastetter, R H, Bernard, P, Palmer, J S, Chassot, A A, Chen, H, Western, P S, Ramsay, R G, Chaboissier, M C, Wilhelm, D. Marker genes identify three somatic cell types in the fetal mouse ovary. Dev Biol 2014 394:242-252.

Ratts, V S, Flaws, J A, Kolp, R, Sorenson, C M, Tilly, J L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology 1995 136:3665-3668.

Rosario, R, Childs, A J, Anderson, R A. RNA-binding proteins in human oogenesis: Balancing differentiation and self-renewal in the female fetal germline. Stem Cell Res 2017 21:193-201.

Rosario, R, Filis, P, Tessyman, V, Kinnell, H, Childs, A J, Gray, N K, Anderson, R A. FMRP Associates with Cytoplasmic Granules at the Onset of Meiosis in the Human Oocyte. PLoS One 2016 11:e0163987.

Ruggiu, M, Speed, R, Taggart, M, McKay, S J, Kilanowski, F, Saunders, P, Dorin, J, Cooke, H J. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. Nature 1997 389:73-77.

Saitou, M, Kagiwada, S, Kurimoto, K. Epigenetic reprogramming in mouse pre-implantation development and primordial germ cells. Development 2012 139:15-31.

Sarraj, M A, Drummond, A E. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. Reproduction 2012 143:151-163.

Seydoux, G, Braun, R E. Pathway to totipotency: lessons from germ cells. Cell 2006 127:891-904.

Sinclair, A H, Berta, P, Palmer, M S, Hawkins, J R, Griffiths, B L, Smith, M J, Foster, J W, Frischauf, A M, Lovell-Badge, R, Goodfellow, P N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. Nature 1990 346:240-244.

Soyal, S M, Amleh, A, Dean, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. Development 2000 127:4645-4654.

Sun, Y C, Sun, X F, Dyce, P W, Shen, W, Chen, H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: a review of current advances. Int J Biol Sci 2017 13:449-457.

Tam, P P, Snow, M H. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. J Embryol Exp Morphol 1981 64:133-147.

Tay, J, Richter, J D. Germ cell differentiation and synaptonemal complex formation are disrupted in CPEB knockout mice. Dev Cell 2001 1:201-213.

Tilly, J L. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. Nat Rev Mol Cell Biol 2001 2:838-848.

Tilly, J L. Ovarian follicle counts--not as simple as 1, 2, 3. Reprod Biol Endocrinol 2003 1:11.

Tosh, D, Rani, H S, Murty, U S, Deenadayal, A, Grover, P. Mutational analysis of the FIGLA gene in women with idiopathic premature ovarian failure. Menopause 2015 22:520-526.

VanGompel, M J, Xu, E Y. A novel requirement in mammalian spermatid differentiation for the DAZ-family protein Boule. Hum Mol Genet 2010 19:2360-2369.

Voelkel-Meiman, K, Johnston, C, Thappeta, Y, Subramanian, V V, Hochwagen, A, MacQueen, A J. Separable Crossover-Promoting and Crossover-Constraining Aspects of Zip1 Activity during Budding Yeast Meiosis. PLoS genetics 2015 11:e1005335.

Whitaker, M. Control of meiotic arrest. Rev Reprod 1996 1:127-135.

Zhao, H, Chen, Z J, Qin, Y, Shi, Y, Wang, S, Choi, Y, Simpson, J L, Rajkovic, A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. Am J Hum Genet 2008 82:1342-1348.

Zsebo, K M, Williams, D A, Geissler, E N, Broudy, V C, Martin, F H, Atkins, H L, Hsu, R Y, Birkett, N C, Okino, K H, Murdock, D C, et al. Stem cell factor is encoded at the Sl locus of the mouse and is the ligand for the c-kit tyrosine kinase receptor. Cell 1990 63:213-224.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gül Bikem	**Uyruğu**	T.C.
Soyadı	SOYGÜR	**Tel no**	05365406262
Doğum tarihi	04.01.1988	**e-posta**	bikemsoygur@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		**Mezuniyet yılı**
Lise	Antalya Lisesi	2004
Lisans	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi	2009
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2010
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2018

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (yıl-yıl)**
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2012-2018

Yabancı Dilleri	**Sınav türü**	**Puanı**
İngilizce	IELTS	7.0

Proje Deneyimi

Proje Adı	**Destekleyen kurum**	**Süre (Yıl-Yıl)**
Boris geninin spermatogenez ve fetal gelişimdeki rolü.	TÜBİTAK 1001 Projesi, Proje no:110S383	2010-2013
Normal ve Diyabetik İnsan Plasentalarında Syncytin Proteininin Dağılımı ve Muhtemel Görevleri	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: 2011.02.0122.009	2011-2013
Boris gen ekspresyonu ile serebral vasküler anomaliler	TÜBİTAK 3001 Projesi, Proje no:213S109	2013-2015
İnsan Endojen Retrovirus, Syncytin 1 (HERW),'in İnsan Pre-implantasyon Embriyoları, Embriyonik Kök Hücreleri ve *In Vitro* Farkalnma İle Elde Edilen Trofoblast Hücrelerinde Ekspresyonu	Centre for Stem Cell Biology, The University of Sheffield, UK	2013

Eritrosit Sperm Ayırma Medyumu, TESEparate™ uygulamasının kriyoprezervasyon işleminden önce ve sonra spermin morfogenetik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: 2013.01.0103.011	2013-2016
Fetal Germ Hücre Gelişiminde Hücreler Arası Köprülerin Rolü	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP), Proje No: TDK-2016-1429	2016-2019

Burslar-Ödüller:

1. **Bikem Soygür,** Ripla Arora, Adam Fries, Necdet Demir, Diana J Laird. Sözlü Bildiri Birincilik Ödülü, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
2. Ziyaretçi Doktora Öğrencisi Bursu, UCSF Program for Breakthrough Biomedical Research, Temmuz 2017.
3. 2214-A TÜBİTAK-BİDEB Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu, Şubat 2016.
4. Sati G, **Soygur B**, Sahin P, Celik-Ozenci C, Demir R. Y.W. Loke Genç Araştırmacı Seyahat Ödülü, IFPA (International Federation of Placenta Associations) EPG Toplantısı, Paris, Fransa, Eylül 2014.
5. Avrupa Komisyonu Eğitim ve Staj (European Comission Education & Training) hareketliliği, ERASMUS (European Community Action Scheme for the Mobility of University Students) bursu, Şubat 2013.

Yayınlar ve Bildiriler:

Yayınlar:

1- **Soygur B,** Soner C, Celik-Ozenci C, Sati L. Effect of erythrocyte-sperm separation medim on nuclear, acrosomal and membrane maturity parameters in human sperm. *J Assist Reprod Genet. 2017 Nov 18. doi:10.1007/s10815-017-1085-1.*

2- **Soygur B** and Sati L. The Role of Syncytins in Human Reproduction and Reproductive Organ Cancers. *Reproduction, 2016 Nov;152(5):R167-78. doi:10.1530/REP-16-0031.*

3- **Soygur B** and Moore H. Expression of Syncytin 1 (HERV-W), in the pre-implantation human blastocyst, embryonic stem cells and trophoblast cells derived *in vitro*. *Human Reproduction, 2016 Jul;31(7):1455-61. doi:10.1093/humrep/dew097.*

4- **Soygur B,** Sati L, Demir R. Altered Expressions of Human Endogenous Retroviruses Syncytin-1, Syncytin-2 and Their Receptors in Human Normal and Gestational Diabetic Placenta*. Histol and Histopathol. 2016 Feb 15:11735.*

5- Sati L, **Soygur B,** Celik-Ozenci, C. Expression of mTOR and downstream target components in normal and gestational diabetic human term placenta. *Reprod Sci. 2016 Mar;23(3):324-32. doi: 10.1177/1933719115602765.*

6- **Bikem Soygur,** Ciler Celik-Ozenci. A step closer to producing germ cells outside the body. (Article in Turkish) *Stem Cell Bulletin, 2015; 7: 1-2.*

Bildiriler:

1- Leyla Satı, **Bikem Soygür**, Gizem Gamze Taş, Hakan Er, Piraye Yargıçoğlu Akkiraz. Akut ve kronik dönem 900 MHz elektromanyetik radyasyon uygulamasının rat testisi üzerindeki etkisi. *14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye.*

2- **Bikem Soygur,** Ripla Arora, Adam Fries, Necdet Demir, Diana J Laird. Dişi Embriyonik Germ Hücre Gelişiminde Hücreler Arası Köprülerin Rolü. *14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye.*

3- Leyla Sati, Gizem Gamze Tas, **Bikem Soygur.** Endogenous retroviral protein syncytin 2 receptor, MFSD2, is present in human sperm. *ESHRE (European Society of Human Reproduction and Reproductive Endocrinology) Campus, Current approaches in genetics and reproductio). 26-28 Nisan 2018, Sofya/Bulgaristan.*

4- Leyla Sati, Nilay Kuscu, Gizem Gamze Tas, **Bikem Soygur,** Ciler Celik-Ozenci. Comparison of the expression and localization of FoxO3 in normal term and gestational diabetic placentas. *13th Multinational Congress on Microscopy, 24-29 September 2017, Rovinj, Croatia.*

5- **Bikem Soygur,** Ripla Arora, Adam Fries, Necdet Demir, Diana J Laird. 3D Mapping of Meiosis in the Fetal Mammalian Ovary. *2017 Center for Reproductive Sciences*

(CRS) Retreat, University of California San Francisco (UCSF), 12 May 2017, San Francisco, CA, USA.

6- Ripla Arora, Joao Pedro Sousa Martins, **Bikem Soygur,** Marco Conti, Diana J Laird. Uncoupling of transcription and translation in sex differentiating germ cells. *2017 Center for Reproductive Sciences (CRS) Retreat, University of California San Francisco (UCSF), 12 May 2017, San Francisco, CA, USA.*

7- Leyla Sati, Gizem Gamze Tas, **Bikem Soygur,** Ozlem Babacan. Expression of endogenous retroviral protein Syncytin 2 in spermatozoa from normozoospermic and oligozoospermic men. *II. International Expermed Congress, Expert Meeting on Personalized Reproductive Medicine.27-30 April 2017, Kyrenia, Cyprus.*

8- Leyla Sati, **Bikem Soygur,** Ciler Celik-Ozenci. Expression and localization of FoxO4 in normal term and gestational diabetic placentas. *24. EBCOG (European Congress of Obstetrics and Gynecology) Meeting. 19-21 May 2016, Turin, Italy.*

9- **B. Soygur,** N. Demir, L. Sati. The Presence of Endogenous Retroviral Protein, Syncytin 2, in Human Sperm. *22nd National (Electron) Microscopy Congress, 2-4 September 2015, Istanbul, Turkey.*

10- L. Sati, **B. Soygur,** C. Zeiss and J. McGrath. Expression of vascular markers in tetracycline-induced *Ctcfl* transgenic mice. *22nd National (Electron) Microscopy Congress, 2-4 September 2015, Istanbul, Turkey.*

11- **Bikem Soygur,** Leyla Sati, Ramazan Demir. Altered Expressions of Human Endogenous Retroviruses Syncytin 1 and Syncytin 2 and Their Receptors in Human Normal and Gestational Diabetic Placenta. *International Federation of Placenta Associations (IFPA) EPG Congress, 9-12 September 2014, Paris, France.*

12- Leyla Sati, **Bikem Soygur,** Pinar Sahin, Ciler Celik-Ozenci, Ramazan Demir. Expression of mTOR and Downstream Target Components in Normal and Gestational Diabetic Human Term Placenta. *International Federation of Placenta Associations (IFPA) EPG Congress, 9-12 September 2014, Paris, France.*

13- **Bikem Soygur,** Sayra Dilmac, Gamze Tanrıover, Nuray Erin, Necdet Demir, Leyla Sati. Meme Kanseri Metastazında BORIS Ekspresyonu. *XII. National Histology and Embryology Congress 27-30 May 2014, Ankara University/Ankara (P200).*

14- Leyla Sati, **Bikem Soygur,** İbrahim Bassorgun, Ethem Goksu, Ramazan Demir, James McGrath. The Relationship Between BORIS Expression and Arteriovenous Malformation. *XII. National Histology and Embryology Congress, 27-30 May 2014, Ankara, Turkey.*

15- **Bikem Soygur** and Harry Moore. Expression of the Human Endogenous Retrovirus, Syncytin 1 (HERV-W) in Human Pre-Implantation Embryos, Embryonic Stem Cells and Following Differentiation to Trophoblast *In Vitro. Future Investigators of Regenerative Medicine (FIRM) Symposium, 30th September-3rd October 2013, Girona, Spain.*

16- Bahadır Murat Demirel, **Bikem Soygür,** Güler Leyla Satı, Arzu Hizay, Gamze Tanrıöver, Umut Özsoy, Saffet Öztürk, Levent Sarıkcıoğlu, Necdet Demir, Nurettin Oğuz. Siyatik Sinirin Yarı Kesi Modelinde VEGF ekspresyonunun değerlendirilmesi. *15. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-8 Eylul 2-1013, Samsun, Turkey.*

17- L. Sati, C. Zeiss, **B. Soygur,** I. Bassorgun, E. Goksu, R. Demir, and J. McGrath. Expression of boris, a testis-cancer gene, related to vascular malformations and hemorrhage in mice and humans. *29th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 7-10 July 2013, London, United Kingdom.*

18- **Soygur B,** Sati L, Demir R. Evaluation of ultrastructural differences and Syncytin 1 and Syncytin 2 expressions between Normal and Gestational Diabetic Placenta. *XXI. National Congress of Turkish Society for Electron Microscopy, 28-31 May, 2013, Mersin, Turkey.*

19- **Soygur B,** Sati L, Demir R. Existence of Syncytin 1 and Syncytin 2 proteins in the Normal and Diabetic Human Term Placenta. *XI. National Congress of Turkish Histology and Embryology Association, 16-19 May, 2012, Denizli, Turkey.*

20- Sati L, **Soygur B,** Demir R. The Expression of Surfactant A (SP-A) protein in normal and pathological Human Term Placenta. *XX. National Congress of Turkish Society for Electron Microscopy, 25-28 October, 2011, Kemer, Antalya, Turkey.*

21- **Soygur B,** Sati L, Demir R. The distribution of Surfactant D (SP-D) protein in normal and pathological Human Term Placenta. *2nd International Congress of Turkish*

Society of Clinical Embryology Meeting, 23-25 September, 2011, Dalaman, Mugla, Turkey.