

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

ERİŞKİN FARE OVARYUMUNDA OLASI GERMLİNE VE PLURİPOTENT KÖK
HÜCRELERİN ARAŞTIRILMASI

Yashar ESMAELIAN

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Esra ERDEMLİ

Eylül
2015

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Yashar ESMAEILIAN

İmza



ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ DEĞERLENDİRME VE SINAV
TUTANAĞI

BİYOTEKNOLOJİ

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Yashar Esmacilian

NUMARASI: 10420105

ANABİLİM DALI: Temel Biyoteknoloji

DANIŞMANI: Prof. Dr. Esra Erdemli

PROGRAMI: YÜKSEK LİSANS DOKTORA

TEZİN ADI: Erişkin Fare Ovaryumunda Olası Germline ve Pluripotnt Kök Hücrelerin Araştırılması

II. TOPLANTI BİLGİLERİ

İLGİ : Enstitü Yönetim Kurulunun 28/08/2015 tarih ve 17/4-B sayılı toplantısında oluşturulan jüri

TOPLANTI TARİHİ : 17/09/2015

SAATİ : 10:30

TOPLANTI YERİ : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD Konferans Salonu

III. DEĞERLENDİRME VE SONUÇ

- Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunan ve aday tarafından başarıyla savunulan tezin **KABUL EDİLMESİNE**
- Kişisel raporların tartışılması sonucunda tezin **DÜZELTİLDİKTEN** sonra savunulmasına
- Kişisel raporların tartışılması sonucunda savunmaya değer bulunmayan tezin **REDEDİLMESİNE**

OY BİRLİĞİ

OY ÇOKLUĞU ile karar verildi.

Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu
ÜYE

Prof. Dr. Esra Erdemli
BAŞKAN
Esra Erdemli

Yrd. Doç. Dr. Arzu Atalay
ÜYE
Arzu Atalay

Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu
ÜYE
Bizden Sabuncuoğlu

Prof. Dr. Murat Sönmezer
ÜYE
Murat Sönmezer

EK: 1) Kişisel Raporlar
2) Tez savunma sınav duyurusu
3) Katılım Listesi

Detaylı Bilgi için : TEL: Santral: 0(312) 215 90 01-08

WEB: <http://www.biotech.ankara.edu.tr/>

Ens.Sek. 3446; Öğr.İşl. 3449-3459;

e-mail: biotek@ankara.edu.tr

Evrak 3442

Mali İşl. 3458

Görülmüştür.

Prof. Dr. Aykut Özkul
Biyoteknoloji Anabilim Dalı Başkanı

ONAY

Prof. Dr. Esra ERDEMLİ danışmanlığında **Yashar ESMAEILIAN** tarafından hazırlanan bu çalışma 17/09/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Esra ERDEMLİ

İmza:

Üye: Prof. Dr. Sevda MÜFTÜOĞLU

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

İmza:

Üye: Prof. Dr. Bizden SABUNCUOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Murat SÖNMEZER

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Erişkin Fare Ovaryumunda Olası Germline ve Pluripotent Kök Hücrelerin Araştırılması

Yashar Esmaeilian

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Esra Erdemli

Üreme biyolojisinin klasik bilgilerine göre doğum sonrası (post-natal) dişi memelilerin ovaryumunda oosit sayısı sınırlıdır ve eğer oositler herhangi bir hastalık veya hasar nedeniyle kaybedilirse tekrar yenilenme olanağı yoktur. Ancak son 10 yılda erişkin memeli ovaryumunda yeni oosit ve folikül oluşumu ile ilgili çıkan araştırma sonuçları, bu bakış açısını tamamen değiştirmektedir. Buradan yola çıkarak tasarlanan tezde amaç, erişkin fare (8 haftalık BALB/c) ovaryumunda olası germline ve pluripotent kök hücrelerin varlığını tespit etmek ve yeniden oosit oluşması olasılığını araştırmaktır.

Bu çalışmada, immünofloresan boyama sonucu ovaryum doku kesitlerinde farklı folikül aşamalarındaki oosit hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında pluripotent (Oct-4, Nanog ve Sox2) ve germline kök hücre belirteçleri (DAZL ve DDX4/VASA) pozitif olarak tespit edilmiştir. Ovaryum hücre kültüründen elde edilen hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında da yukarıda belirtilen pluripotent ve germline kök hücre proteinlerinin ifadesi gözlenmiştir.

Ovaryum hücre kültüründe oosite farklılaştırma sonucu morfolojik olarak oosite benzer hücrelerin oluştuğu ve bu hücrelerden bazılarında partenogenezin meydana geldiği gözlenmiş, bunun yanı sıra foliküle benzer yapıların oluştuğu da tespit edilmiştir.

qRT-PCR analiz sonucu, Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL genlerinin ifadesi hem ovaryum dokusu hem de farklılaştırma öncesi hücre kültüründen elde edilen hücrelerde tespit edilmiştir. Ancak hücre kültüründe ovaryum dokusuna göre Oct-4, Sox2, DDX4 ve DAZL genlerinin ifadesi kayda değer ölçüde ($p < 0.05$) düşerken Nanog geninin ifadesi yükselmiştir. Farklılaştırma sonucu, oosite farklılaşan hücrelerde oosite özgün genlerin ifade edildiği ve partenogenezin meydana geldiği hücrelerde ise pluripotent kök hücrelere özgün genlerin ifade edildiği RT-PCR analiz yöntemi ile gösterilmiştir.

İmmunoblotlama analizi sonucu Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL proteinlerinin ifadesi hem ovaryum dokusu hem de farklılaştırma öncesi hücre kültüründen elde edilen hücrelerde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada erişkin fare ovaryumunda pluripotent ve germline kök hücre özelliğine sahip hücrelerin varlığı tespit edilmiş, *In vitro* koşullarda bu hücrelerden oosit ve folikül benzeri hücrelerin oluştuğu ve bazı oosit hücrelerinde partenogenezin meydana geldiği gözlenmiştir.

2015, 103 sayfa

Anahtar kelimeler: Oosit, Oogenez, Ovaryum, Pluripotent kök hücre, Germline kök hücre

ABSTRACT

PhD Thesis

Investigation of Putative Germline and Pluripotent Stem Cells in Adult Mouse Ovary

Yashar Esmaeilian

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Esra Erdemli

According to the classical knowledge of biology, in the ovary of female mammals there are a limited number of oocytes and there is no possibility of renewal if the oocytes are lost due to disease or injury. However, in the last 10 years, the results of studies about renewal and formation of oocytes and follicles in the adult mammalian ovary are lead to changing of this view completely.

The aim of this thesis is demonstration of presence of putative germline and pluripotent stem cells and investigates the possibility of neo-oogenesis in the adult mouse (8 week-old BALB/c) ovary.

Immunofluorescence staining of ovarian tissue sections revealed the presence of pluripotent stem cell (Oct-4, Nanog and Sox2) and germline stem cell (DAZL and DDX4/VASA) markers in the cytoplasm and nucleus of oocytes in different follicular stages. Presence of these proteins was also observed in the nucleus and cytoplasm of the cells that harvested from ovarian cell culture by immunofluorescence staining.

In the ovary cell culture, oocyte differentiation process led to formation of morphologically oocyte-like cells and in some of these cells parthenogenesis was occurred. As a result of differentiation process formation of follicle-like structures was also observed.

In the ovarian tissue and non-differentiated cells that harvested from cell culture, expression of the Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 and DAZL genes was demonstrated by qRT-PCR method. Nevertheless, in the harvested cells comparing ovarian tissue, despite the increased expression of Nanog, expression of Oct-4, Sox2, DAZL and DDX4 was decreased significantly ($p < 0.05$). In the cells that differentiated into oocyte, expression of oocyte specific genes and in the parthenogenesis occurred cells, expression of pluripotent specific genes was demonstrated by RT-PCR method.

As a result of western blot analysis, expression of Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 and DAZL proteins was observed in the ovarian tissue and non-differentiated cells that harvested from cell culture.

Based on our study outputs, presence of pluripotent and germline stem cells in the adult mouse ovary was demonstrated. Under *in vitro* circumstances, differentiation potential of these cells into oocyte-like cells, follicle-like structures and in some cases parthenogenesis-like phenomena was observed.

2015, 103 pages

Keywords: Oocyte, Oogenesis, Ovary, Pluripotent stem cell, Germline stem cell

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gsteren ve beni yndendiren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Esra Erdemli'ye,

Tez çalışmasında bana araştırma olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve nderileri ile beni yndendiren, bilgileriyle yol gsteren ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu Atalay'a

Ankara Üniuersitesi Histoloji-Embriyoloji bölümü laboratuvarlarında çalışmama izin veren ve desteğini esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji AD Başkanı Prof. Dr. Alp Can'a

Ankara Üniuersitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Tıp Fakóltesi Histoloji-Embriyoloji AD öğretim üyeleri, asistanları, personeli ve arkadaşlarıma

2215 programı kapsamında doktora eğitimim boyunca sağladığı burs desteğinden dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na

Tez alışmamı 13B4143003 numaralı projeye destekleyen Ankara Üniuersitesi BAP'a

Son olarak, eğitimimin her aşamasında maddi ve manevi desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Yashar Esmailian

Eylül 2015

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	I
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
SİMGELER DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ.....	14
2. KURUMSAL TEMELLER	16
2.1. Ovaryum Histolojisi	16
2.2. Folikül Gelişimi	16
2.3. Oogenez	19
2.4. Kök Hücre	22
2.4.1. Germline kök hücresi.....	24
2.5. Araştırmada Kullanılan Belirteçler	24
2.5.1. Pluripotent kök hücre belirteçleri	24
2.5.1.1. Oct-4	24
2.5.1.2. Nanog	24
2.5.1.3. Sox2	25
2.5.1.4. Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin transkripsiyonel düzenleyici rolleri.....	25
2.5.2. Germline kök hücre belirteçleri	27
2.5.2.1. DDX4.....	27
2.5.2.2. DAZL.....	28
2.5.3. Oosite özgün belirteçler	28
2.5.3.1. ZP2 ve ZP3.....	28
2.5.3.2. NOBOX.....	28
2.6. Doğum Sonrası Ovaryumda Yeniden Oosit ve Folikül Oluşması Olasılığı ile İlgili Sürdürülen Tartışmalar	29
2.7. Doğum Sonrası Ovaryumda Yeni Oosit ve Folikül Oluşumu	30
2.8. Ovaryum Yüzey Epitelinden Kaynaklanan Kök Hücreler	33
2.9. Germline Kök Hücrelerinin Olası Gonad Dışı Kaynağı	38
3. GEREKÇE VE AMAÇ	41
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	43
4.1. Materyal.....	43
4.1.1. Histolojik takip	43
4.1.2. Ovaryum dokusunda immüno Floresan işaretleme.....	44
4.1.2.1. Fiksasyon.....	44

4.1.2.2. İmmünofloresan işaretlenmesi	44
4.1.2.3. Görüntüleme.....	45
4.1.3. Hücre kültürü	45
4.1.3.1. Farklılaştırma öncesi medyumu	45
4.1.3.2. Oosite farklılaştırma medyumu.....	46
4.1.4. Hücrelerde immünofloresan işaretleme	46
4.1.4.1. Hücre pasajlama.....	46
4.1.4.2. Fiksasyon.....	46
4.1.4.3. İmmünofloresan işaretleme.....	47
4.1.4.4. Görüntüleme.....	47
4.1.5. Hücrelerin HE yöntemiyle boyanması	48
4.1.6. Gen ifade analizi.....	48
4.1.6.1. RNA izolasyonu.....	48
4.1.6.2. RNA'ların kalite kontrolü	49
4.1.6.3. cDNA sentezi	49
4.1.6.4. RT-PCR	49
4.1.6.5. qRT-PCR (Kantitatif Real Time-PCR)	50
4.1.7. İmmünoablota (Western Blot)	50
4.1.7.1. Protein izolasyonu	50
4.1.7.2. Protein miktar tayini (Bradford Assay)	50
4.1.7.3. SDS poliakramid jel elektroforezi	50
4.1.7.4. Protein transferi	51
4.1.7.5. Membrandaki proteinlerin immünojenik olarak tespiti	51
4.2. Yöntem.....	53
4.2.1. Farelerden ovaryum alma işlemi.....	53
4.2.2. Dokuların histolojik incelenmesi	54
4.2.2.1. Histolojik takip.....	54
4.2.2.2. Dokuların Hematoksilin Eozin (HE) yöntemiyle boyanması	54
4.2.3. Ovaryum dokusunun immünofloresan işaretlenmesi	55
4.2.4. Ovaryum hücre kültürü	56
4.2.4.1. Farklılaştırma öncesi hücre kültürü	56
4.2.4.2. Hücre kaldırma (pasajlama)	56
4.2.4.3. Oosite farklılaştırma	56
4.2.5. Hücrelerin immünofloresan işaretlenmesi	57
4.2.5.1. Hücrelerin yuvarlak lameller üzerine alınması.....	57
4.2.5.2. Hücrelerin tespit edilmesi.....	57
4.2.5.3. Hücrelerin antikorla işaretlenmesi	57
4.2.6. Hücrelerin HE yöntemiyle boyanması	58
4.2.7. Gen ifade analizi.....	58
4.2.7.1. RNA izolasyonu.....	59
4.2.7.2. RNA'ların kalite kontrolü	60
4.2.7.3. cDNA sentezi	60
4.2.7.4. RT-PCR	61
4.2.7.5. qRT-PCR (Kantitatif Real Time-PCR)	62
4.2.8. İmmünoablota (Western Blot)	63
4.2.8.1. Protein izolasyonu	64
4.2.8.2. Protein miktar tayini (Bradford Assay)	64
4.2.8.3. SDS poliakramid jel elektroforezi	65
4.2.8.4. Protein transferi	65
4.2.8.5. Membrandaki proteinlerin immünojenik olarak tespiti	65
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	67

5.1. Ovaryum Dokusunun Histolojik İncelenmesi	67
5.2. Ovaryum Dokusunda Pluripotent Kök Hücrelerin İmmüno Floresan İşaretlenmesi	68
5.3. Ovaryum Dokusunda Germline Kök Hücrelerin İmmüno Floresan İşaretlenmesi.....	69
5.4. Ovaryum Hücre Kültürü	71
5.4.1. Oosite farklılaştırma öncesi hücre kültürü.....	71
5.4.2. Farklılaştırma sonucu oosite benzer hücrelerin oluşması	73
5.4.3. Farklılaştırma sonucu folikül benzeri yapıların oluşumu	74
5.4.4. Farklılaştırma sonucu partenogenezin meydana gelmesi	75
5.5. Olası Germline ve Pluripotent Kök Hücrelerin İmmüno Floresan İşaretlenmesi.....	75
5.6. Hücrelerin HE Yöntemiyle Boyanması	77
5.7. Oosite Farklılaşan Hücrelerde RT-PCR Analizi	79
5.8. Partenogenezin Meydana Geldiği Hücrelerde RT-PCR Analizi.....	80
5.9. Ovaryum Dokusu ve Hücre Kültüründen Elde Edilen Hücrelerde qRT-PCR Analizi	80
5.10. Ovaryum Dokusu ve Hücre Kültüründen Elde Edilen Hücrelerde İmmüno Blotlama Analizi	82
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	83
6.1. Ovaryum Dokusu ve Farklılaştırma Öncesi Hücre Kültüründe Pluripotent ve Germline Kök Hücrelerin Protein ve mRNA Bazında Değerlendirilmesi	83
6.2. Ovaryum Hücre Kültüründe Farklılaştırma Sonucu Oluşan Hücrelerin mRNA Bazında Değerlendirilmesi	84
6.3. Ovaryum Hücre Kültüründeki Hücrelerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	84
6.4. Sonuç.....	85
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>87</u>
<u>EKLER</u>	<u>100</u>
Ek 1: Etik Kurul Kararı	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 2.1.1. OVARYUM DOKUSU	16
ŞEKİL 2.2.1. FOLİKÜLLERİN GELİŞME AŞAMALARI	17
ŞEKİL 2.3.1. PRIMORDİYAL GERM HÜCRELERİN GONAD KABARTISINA DOĞRU GÖÇÜ	19
ŞEKİL 2.3.2. OOGENEZ VE FOLİKÜL GELİŞİMİ.....	21
ŞEKİL 2.3.3. OOSİT MATÜRASYON AŞAMALARI	21
ŞEKİL 2.4.1. KÖK HÜCRELERİN SİMETRİK VE ASİMETRİK BÖLÜNMESİ.....	22
ŞEKİL 2.4.2. KEMİK İLİĞİNDE BULUNAN KÖK HÜCRELERİN PLASTİSİTE ÖZELLİĞİ.....	23
ŞEKİL 2.5.1.4.1. OCT-4 VE NANOG GENLERİNİN BİRBİRİNİN ÜZERİNDEKİ DÜZENLEYİCİ ETKİLERİ	27
ŞEKİL 4.2.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER	53
ŞEKİL 5.1.1. FARE OVARYUM DOKUSUNDA FARKLI AŞAMALARINDAKİ FOLİKÜLLER	67
ŞEKİL 5.2.1. OVARYUM DOKUSUNDA OCT-4 PROTEİNİN İFADESİ.....	68
ŞEKİL 5.2.2. OVARYUM DOKUSUNDA SOX2 PROTEİNİN İFADESİ	69
ŞEKİL 5.2.3. OVARYUM DOKUSUNDA NANOG PROTEİNİN İFADESİ	69
ŞEKİL 5.3.1. OVARYUM DOKUSUNDA DDX4 PROTEİNİN İFADESİ	70
ŞEKİL 5.3.2. OVARYUM DOKUSUNDA DAZL PROTEİNİN İFADESİ.....	71
ŞEKİL 5.4.1.2. EMBRİYOİD CİSİMCİĞİN OLUŞMA AŞAMASI	72
ŞEKİL 5.4.1.3. MEZENKİMAL BENZERİ HÜCRELER.....	73
ŞEKİL 5.4.1.4. EPİTEL HÜCRELERİ.....	73
ŞEKİL 5.4.2.1. FARKLILAŞTIRMA SONUCU OLUŞAN OOSİTLER.....	74
ŞEKİL 5.4.3.1. FARKLILAŞTIRMA SONUCU FOLİKÜL BENZERİ YAPILARIN OLUŞUMU	74
ŞEKİL 5.4.4.1. BLASTOSİST BENZERİ HÜCREDE ÇEKİRDEK BÖLÜNMESİ.....	75
ŞEKİL 5.4.4.2. BLASTOSİST BENZERİ HÜCRELERİN ZP KILIFLARINDAN AYRILMASI	75
ŞEKİL 5.5.1. FARKLILAŞTIRMA ÖNCESİ HÜCRE KÜLTÜRÜNDE PLURİPOTENT VE GERMLİNE KÖK HÜCRE PROTEİNLERİNİ İFADE EDEN HÜCRELER	76
ŞEKİL 5.5.2. HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OLUŞAN EMBRİYOİD CİSİMCİKLERİN İMMÜNOFLORESAN BOYANMASI	77
ŞEKİL 5.6.1. FARKLILAŞTIRMA ÖNCESİ HÜCRELERİN HE BOYANMASI	78
ŞEKİL 5.6.2. FARKLILAŞTIRMA ÖNCESİ HÜCRELERİN HE BOYANMASI	78
ŞEKİL 5.6.3. EPİTEL HÜCRELERİ	79
ŞEKİL 5.7.1. FARKLILAŞTIRMA SONUCU OLUŞAN OOSİTE BENZER HÜCRELERDE ZP2, ZP3 VE NOBOX GENLERİNİN İFADESİ.....	79
ŞEKİL 5.8.1. FARKLILAŞTIRMA SONUCU OLUŞAN BLASTOSİST BENZERİ HÜCRELERDE OCT-4, SOX2 VE NANOG GENLERİNİN İFADESİ.....	80
ŞEKİL 5.10.1. PLURİPOTENT VE GERMLİNE KÖK HÜCRE PROTEİNLERİNİN OVARYUM DOKUSU VE FARKLILAŞTIRMA ÖNCESİ HÜCRELERDEKİ İFADESİ.....	82

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE 2.2.1. İNSAN VE FAREDE OOSİT, FOLİKÜL VE OVARYUM BOYUTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	18
ÇİZELGE 2.8.1. DOĞUM SONRASI OOGENEZİ DESTEKLEYEN VE REDDEDEN ARAŞTIRMALAR	35
ÇİZELGE 2.8.1. (DEVAM)	36
ÇİZELGE 2.8.1. (DEVAM)	37
ÇİZELGE 2.9.1. DOĞUM SONRASI OOGENEZDE, OLASI GONAD DIŞI GERMLİNE KÖK HÜCRELERİNİN ETKİSİNİ ARAŞTIRAN ÇALIŞMALAR	39
ÇİZELGE 2.9.1. (DEVAM)	40
ÇİZELGE 4.2.7.3.1. CDNA REAKSİYONU	60
ÇİZELGE 4.2.7.4.1. RT-PCR REAKSİYONU	61
ÇİZELGE 4.2.7.4.2. RT-PCR'DA KULLANILAN PRİMER ÇİFTLERİ	61
ÇİZELGE 4.2.7.4.3. RT-PCR PROGRAMLARI	62
ÇİZELGE 4.2.7.5.1. QRT-PCR'DA KULLANILAN PRİMER ÇİFTLERİ	62
ÇİZELGE 4.2.7.5.2. QRT-PCR KOŞULLARI	63
ÇİZELGE 4.2.7.5.3. QRT-PCR PROGRAMI	63
ÇİZELGE 4.2.8.2.1. FARKLI KONSANTRASYONLARDA HAZIRLANAN BSA REFERANSLARI	64
ÇİZELGE 5.2.1. OVARYUM DOKUSUNDA OCT-4, SOX2 VE NANOG PROTEİNLERİNİN İFADE PROFİLİ	68
ÇİZELGE 5.3.1. OVARYUM DOKUSUNDA DDX4 VE DAZL PROTEİNLERİNİN İFADE PROFİLİ	70

SİMGELER DİZİNİ

dk.	Dakika
cm ²	Santimetrekare
gr	Gram
M	Molar
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mm ³	Milimetreküp
ng	Nanogram
sn.	Saniye
U	Ünite
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

bç	Baz çift
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	Komplementer DNA
ddH ₂ O	Çift Distile Su
DEPC	Dietilpirokarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotit
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with Ca ⁺⁺ , Mg ⁺⁺
EDTA	Etilendiaminteraasetik Asit

FBS	Fetal Bovine Serum
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GV	Germinal Vezikül
HE	Hematoksin Eozin
IF	İmmüofloresan
KD	Kilo Dalton
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehit
qRT-PCR	Kantitatif Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WB	Western Blot

1. GİRİŞ

Üreme biyolojisinin klasik bilgilerine göre doğum sonrası (post-natal) dişi memelilerin ovaryumunda oosit sınırlı sayıda bulunmaktadır ve eğer oositler hastalık veya hasar nedeniyle kaybedilirse tekrar yenilenme olanağı yoktur (1, 2). Buna karşın yeni çalışmalar bu bakış açısını değiştirmeye başlamış, erişkin memeli ovaryumunda olası germline kök hücrelerinin varlığı, oosite farklılaştırılması ve buna mikroçevrenin etkisi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Erişkin fare ovaryumundan elde edilen germline kök hücrelerin *in vitro* koşullarda oosite dönüştüğü ve *in vivo* ortamda fertilize yeteneği olan yumurta hücreleri oluşturduğu gözlenmiştir (3-7).

Bütün oogonyumların (dişi germline kök hücreleri) embriyonal dönemde oosite farklılaştığı ve doğum sonrası ovaryumda bu hücrelerin bulunmadığı genel olarak birçok bilim insanı tarafından kabul edilmektedir ancak, erişkin memeli ovaryumunda yeniden oogenezin (neo-oogenesis) olabileceği ile ilgili tartışmalar da yaklaşık 150 yıldır devam etmektedir. Erişkin memeliler ve kuşlarda yeniden oosit oluşma olanağının bulunmadığı ve oositlerin embriyonal dönemde ovaryum yüzey epitelinden (germinal epitel) kaynaklandığı ilk olarak 1870 yılında Waldeyer-Hartz tarafından iddia edilmiş (8), ancak 1917’de, Kingery, fetal dönemde oositlerin dejenere olduğunu buna karşın, erişkin ovaryumunda yeni oositlerin germinal epitelten tekrar oluştuğunu bildirmiştir (9). Allen 1937 ‘de oositlerin mitoz bölünme sonucu germinal epitelten kaynaklandığını bildirerek bu hipotezi desteklemiştir. (10). Diğer taraftan, 1921’de, doğum sonrası primer oosit sayısında yükselme olanağının olmadığı da ortaya konulmuştur (11).

Erişkin memeli ovaryumunda yeni oositlerin oluşumu ile ilgili bu tartışmalar sürerken, Zuckerman tarafından üreme biyolojisi konusunda yeni bir doktrin ortaya atılmıştır. Buna göre, erişkin memelilerde oositler sadece fetal dönemde ve belirli sayıda oluşur; bunlar folikülleri oluşturmak üzere somatik hücreler tarafından çevrilir (1, 12). Bütün tartışmalara rağmen (13-15), 1951’de Zuckerman’ın memeli ovaryumunda oositlerin sayısı kısıtlıdır ve yaşam boyunca primer oositlerin sayısında hiçbir artış olamaz iddiası yeniden oosit oluşma olanağı ile ilgili tartışmalara son noktayı koymuştur (1). Bu teoriye paralel olarak, fare ovaryumunda oosit oluşumu sadece doğum öncesi gerçekleşir ve oositler mayoz öncesi S fazında duraklayıp uzun yıllar bekler (16), oosit sayısı apoptoza uğrayarak giderek düşer (17-21). İnsanlarda ise oosit havuzunun tükenmesi 50 yaşa kadar sürüp menopoza neden

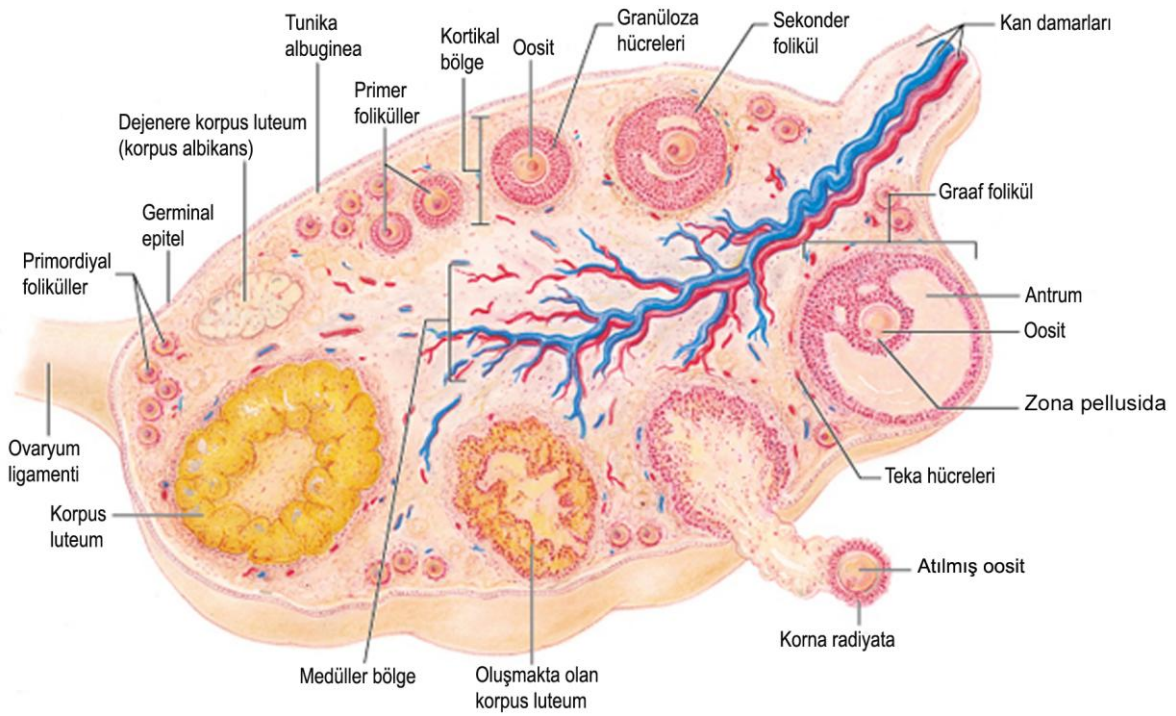
olur (22). Sonuç olarak sözü edilen araştırmalara göre; dişi memeliler kısıtlı, yenilenme olasılığı olmayan ve mayoz I'de duraklamış germ hücreler ile doğarlar (1, 23-27) .

Günümüzde de kabul gören, erişkin memeli ovaryumunda yeniden oosit oluşması olanağının bulunmaması ile ilgili görüşler devam ederken (28) son 10 yıl içerisinde yapılan araştırmalar (3, 29-31) bu bakış açısını tartışmaya açarak memeli üreme biyolojisinin yeniden gözden geçirilmesi gereğini ortaya koymuştur. Buradan yola çıkarak, çalışmamızda, erişkin fare ovaryumunda germline ve pluripotent kök hücrelerin varlığı ve bu hücrelerden yeniden oosit oluşma olasılığının araştırılması planlanmıştır.

2. KURUMSAL TEMELLER

2.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumun yüzey kısmı, epitel hücreleri (germinal epitel) ile kaplıdır ve altında düzensiz sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea bulunmaktadır. Tunika albugineanın altında foliküllerin bol olduğu kortikal bölge yer alır. Kortikal bölgenin stromal bağ dokusu foliküller ve fibroblastları içerir. Ovaryumun iç kısmı ise medüller bölge olarak adlandırılır ve gevşek bağ dokusu ile damarlardan oluşur (Şekil 2.1.1.).

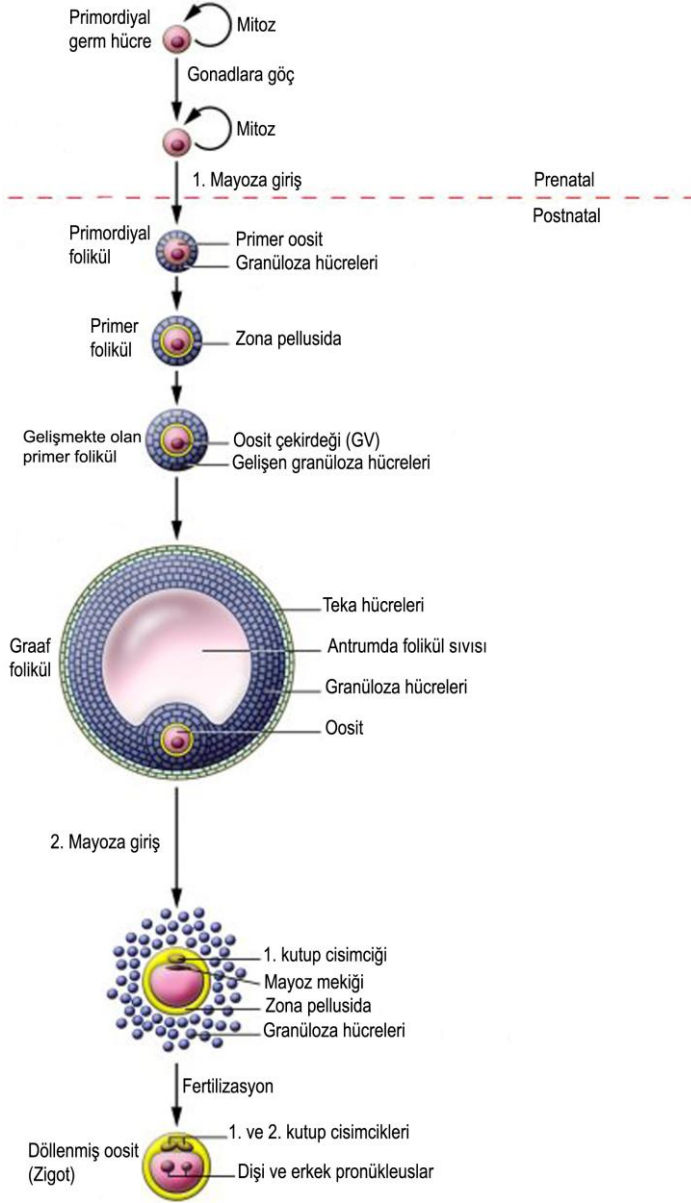


Şekil 2.1.1. Ovaryum dokusu

2.2. Folikül Gelişimi

Foliküller, bir oositin bir ya da daha fazla folikül hücreleri katlarıyla çevrilmesi sonucu oluşur. Fetal dönemde primordiyal foliküller, primer oositlerin tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrilmesi sonucu meydana gelir. Primordiyal foliküller kortikal bölgenin en dış kısmında yer alır. Bu foliküllerde bulunan oositler mayozun profaz I diploten aşamasında bekler (32).

Ergenlik döneminin başlaması ile bazı primordiyal foliküller büyüme aşamasına girer. Foliküllerin büyümesinde hipofizden salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) gereklidir. Foliküllerin büyümesi sonucunda oositin çapı maksimuma ulaşır, nükleus büyür, mitokondriyonların sayısı artar, endoplazma retikulumu genişler ve Golgi kompleksleri hücre membranına doğru göç eder. Folikül hücreleri önce kübik sonra prizmatik sonra da çok katlı olarak değişikliğe gider ve primer folikül oluşur (Şekil 2.2.1.).



Şekil 2.2.1. Foliküllerin gelişme aşamaları

Primer foliküllerin içinde bulunan oositler zona pellusida adı verilen glikoprotein kılıfı ile çevrilidir. Zona pellusida, oositi granüloza hücrelerinden ayırır ve oositin sperm ile birleşmesi aşamasında kritik role sahiptir. Granüloza hücrelerinin çoğalması sonucu çok

katlı primer foliküller oluşur. Çok katlı primer foliküllerin çevresinde bulunan stroma hücreleri birkaç katlı, teka folikülünü oluşturur.. Bu tabaka daha sonra teka intera ve teka ekstera olarak iki tabakaya farklılaşır. Teka intera tarafından sentezlenen androstenedion, granüloza hücrelerine geçerek buradaki aromataz enzimiyle östrojene dönüşür. Bu Östrojen tekrar teka internaya geçerek buradaki kılcal damarlar aracılığıyla kana verilir. Teka ekstera, teka interayı çevreleyen çoğunlukla stromal hücreler, daha büyük damarlar ve kas hücrelerinden oluşur (33).

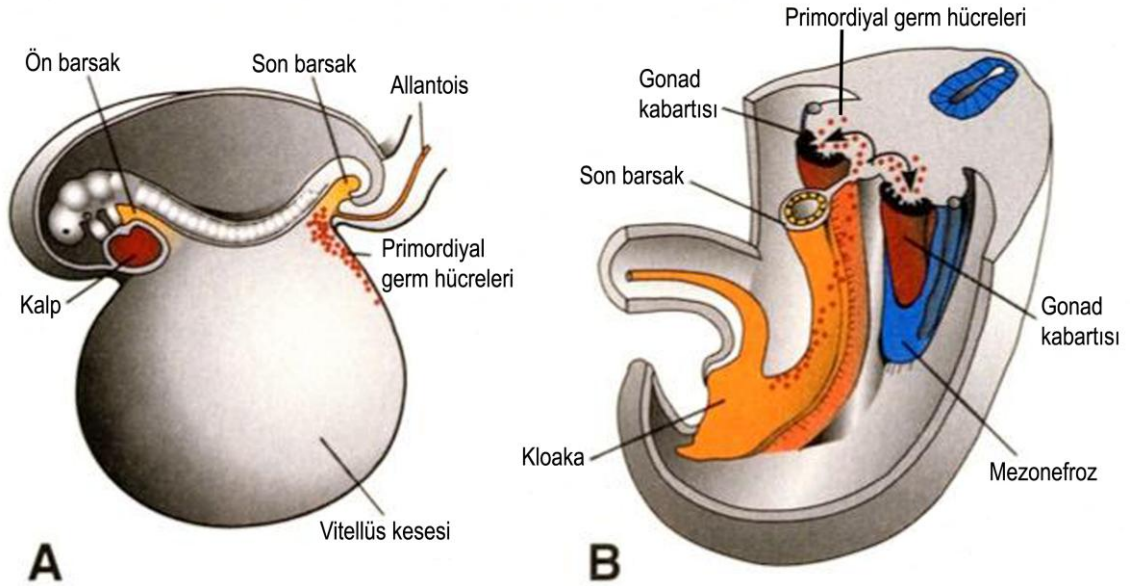
Bu sırada foliküller büyürken granüloza hücreleri boyut ve sayı olarak çoğalır, Folikül hücreleri arasında sıvı toplanmaya başlar ve boşluklar oluşur. Zamanla bu boşluklar birleşerek antrum adı verilen daha büyük boşluğu oluşturur. Bu aşamadaki foliküllere antral folikül (sekonder folikül) adı verilir. Antrum oluştuktan ve gittikçe büyüdüktan sonra oositi çevreleyen bir sıra folikül hücrelerine korona radyata hücreleri, bu bölgedeki granüloza hücrelerine kumulus granüloza hücreleri, oositin antruma doğru yaptığı tepeciğe de kumulus ooforus (oosit tepeciği) denir. Bu granüloza hücreleri ovulasyon sırasında ovaryumu terk eden oositle birlikte tuba uterinaya atılır. Büyük bir antrum boşluğuna sahip, kumulus ooforus ve korona radyata içeren foliküllere graaf folikül (tersiyer folikül) adı verilir. Bu en büyük folikül olarak graaf folikülü ovaryumun kortikal bölgesinin dış kısmında (ovaryum epitelinin hemen altında) yer alır. (33). Çizelge 2.2.1.'de insan ve fare ovaryumu, oosit ve folikül boyutları karşılaştırılmıştır (34, 35).

Çizelge 2.2.1. İnsan ve farede oosit, folikül ve ovaryum boyutlarının karşılaştırılması

	İnsan	Fare
Primordiyal Oosit	20-30 µm	10-15 µm
Primer Oosit	40-50 µm	20-30 µm
Sekonder Oosit	60-90 µm	50-60 µm
Antral Oosit	90-110 µm	60-70 µm
Graaf Oosit	100-120 µm	70-90 µm
Primordiyal Folikül	25-45 µm	10-15 µm
Primer Folikül	60-80 µm	20-50 µm
Sekonder Folikül	100-300 µm	100-200 µm
Antral Folikül	200-900 µm	100-300µm
Graaf Folikül	15-20 mm	0.4-0.5 mm
Ovaryum	25-65 mm ³	1.5-3 mm ³

2.3. Oogenez

İnsan primordiyal germ hücreleri fertilizasyondan 24 gün sonra vitellüs kesesinin endodermal hücreleri arasında görülür. Bu hücreler epiblast kaynaklı ekstraembriyonik mezodermden köken alır. Embriyonun 4. haftasında primordiyal germ hücreleri (germline kök hücreler) vitellüs kesesinin allantoise yakın bölgesindeki endodermal hücreler arasından gonad kabartısına doğru göç eder (Şekil 2.3.1.). Vitellüs kesesini terk ederken sayısı yaklaşık 100 olan bu hücreler gonad kabartısına vardığında mitoz bölünmeler sonucu sayısı 1000-4000'e ulaşır. Gonadlarda bu hücreler mitoz bölünme sonucu oogonyumlara (dişi germline kök hücreleri) dönüşür.

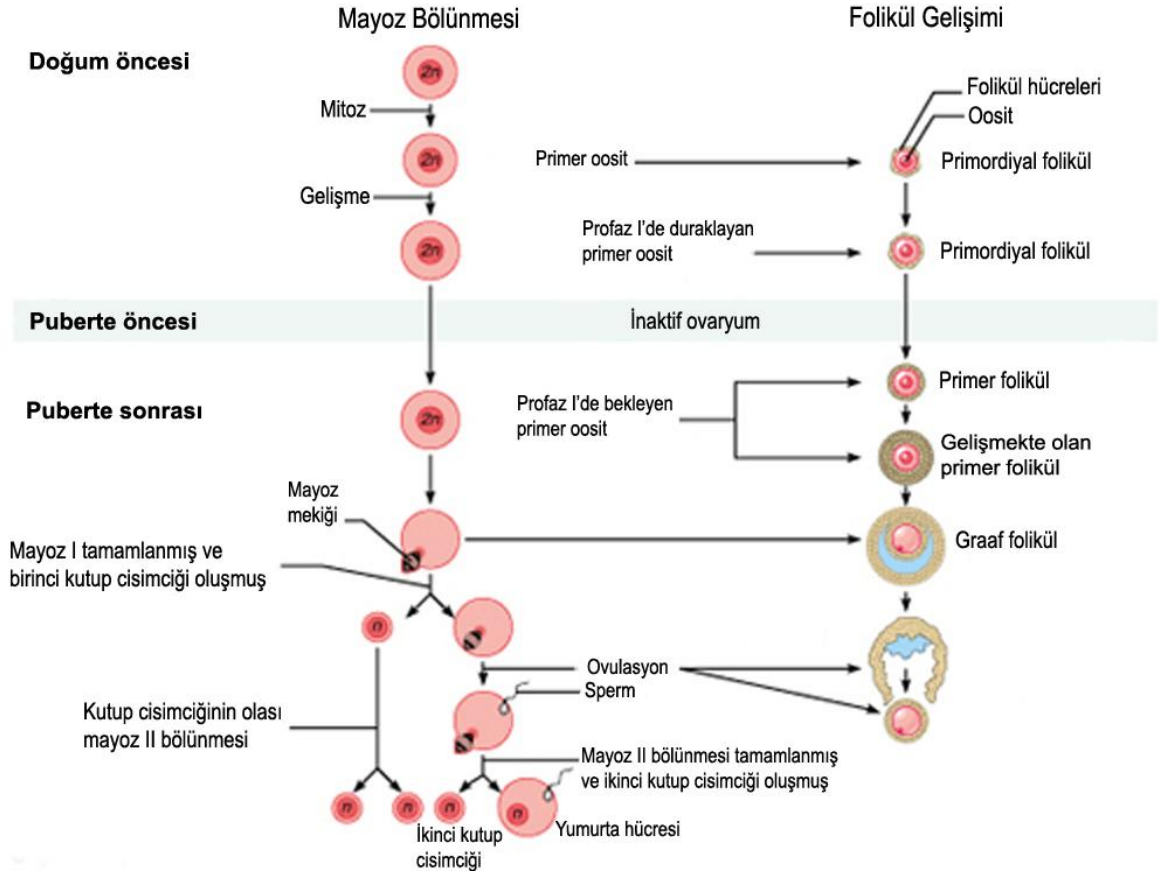


Şekil 2.3.1. (A) Yaklaşık 3 haftalık insan embriyosunda primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesi duvarında allantois kesesi yakınında bulunur (B) Primordiyal germ hücrelerin gonad kabartısına doğru göçü (36)

Hızlı bölünmeler sonucu embriyonun yaklaşık ikinci ayında 600 bin ve beşinci ayında ise 7 milyon civarı oogonyum oluşur. Başlangıçta sayısı aynı olan dişi ve erkek primordiyal germ hücreleri, DAZL proteini etkisiyle mayoz bölünmeye hazır duruma geçer. Bu aşamada erkek ve dişi gonadlarındaki farklı mikroçevre, primordiyal germ hücrelerinin kaderini belirler. Dişi gonadında bulunan retinoik asit, STRA8 proteini (mayoz öncesi DNA replikasyonu için gereklidir) ile birlikte primordiyal germ hücrelerin mayoz girişini tetikler (36, 37)

Üçüncü aydan itibaren oogonyumlar mayozun profaz I evresine girip diploten aşamasında duraklayıp ergenlik dönemine kadar bu evrede bekler. Oluşan bu hücrelere primer oosit adı verilir ve granüloza hücreleri tarafından çevrilip primordiyal folikülleri oluştururlar. Yedinci ayda oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür fakat, primer oositlerin çoğu atreziye uğrayarak dejenere olurlar ve ergenlik döneminde yaklaşık 300 bin oosit kalır (34, 38, 39). Atrezi kadının üreme çağı boyunca devam eder ve 40 yaşlarında yaklaşık 8 bin oosit kalır. Ortalama her 28 gün de bir tek bir oosit atıldığından ve kadının 30-40 yıllık doğurganlık çağı yaklaşık boyunca, sadece 450 adet oosit atılmış olur ve kalan oositler atreziye uğrayarak ortadan kaldırılırlar.

Doğum sonrası ve erişkinlik dönemine kadar profaz I'de duraklayan oosit, birinci mayoz bölünmesini ovulasyondan hemen önce tamamlar. Birinci mayozun tamamlanmasıyla sekonder oosit ve birinci kutup cisimciği oluşur. Kutup cisimciği çekirdek ile az miktarda sitoplazma içeren küçük bir hücredir. Sekonder oosit hemen mayoz II aşamasına geçip metafaz II aşamasında tekrar duraklar. Ovulasyonda, zona pellusidayla çevrili oosit ve birinci kutup cisimciği, korna radyatası ve bir miktar folikül sıvısıyla birlikte tuba uterinaya atılır. Fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit haploid duruma ulaşmak için ikinci mayozu tamamlar ve ikinci kutup cisimciği oluşur (Şekil 2.2.1. ve 2.3.2.). İlk 24 saat içerisinde fertilizasyon gerçekleşmezse oosit bozulur ve ortadan kaldırılır.



Şekil 2.3.2. Oogenez ve folikül gelişimi

Kutup cisimcikleri oositin mayozun hangi aşamasında olduğunu gösterir. Mayoz I aşamasında olan ve çekirdek zarının çözülmediği, germinal vezikül (GV) evresindeki oositler olgun olmayan (immatür) oositler olarak sınıflandırılır. Mayoz II aşamasında olan oositler birinci kutup cisimciğine sahiptir ve fertilizasyona hazır olgun (matür) oosit olarak sınıflandırılır. GV ve kutup cisimciğine sahip olmayan oosit, mayoz I aşamasında olduğundan, GV oositlerden daha olgun olarak kabul edilir (Şekil 2.3.3.).

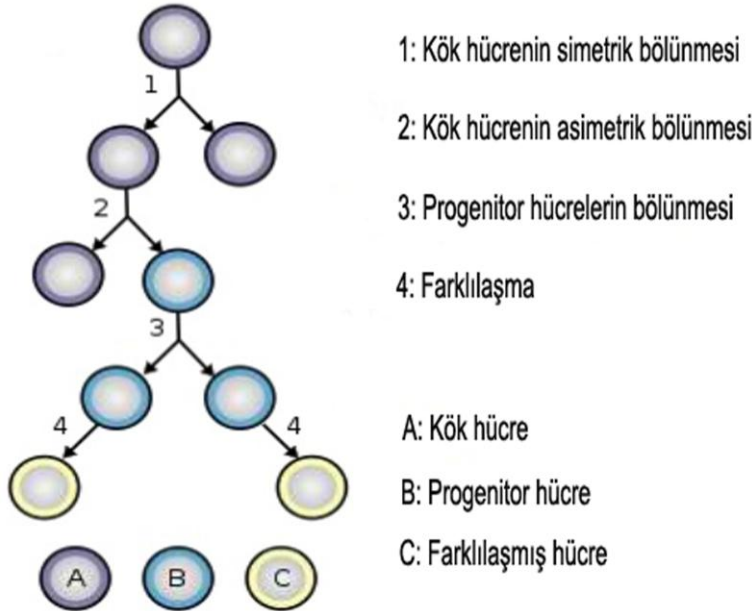


Şekil 2.3.3. Oosit matürasyon aşamaları (A) GV oosit (B) MI oosit (C) MII oosit

2.4. Kök Hücre

Kök hücre, çok uzun süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve germ hücreleri de dahil olmak üzere vücudun somatik hücrelerine farklılaşabilen hücredir. Hücresel düzeyde, bir kök hücre, hem kendisiyle özdeş bir hücre, hem de daha sonra farklılaşacak bir yavru hücre üretme yeteneğine sahip hücre olarak tanımlanır (40).

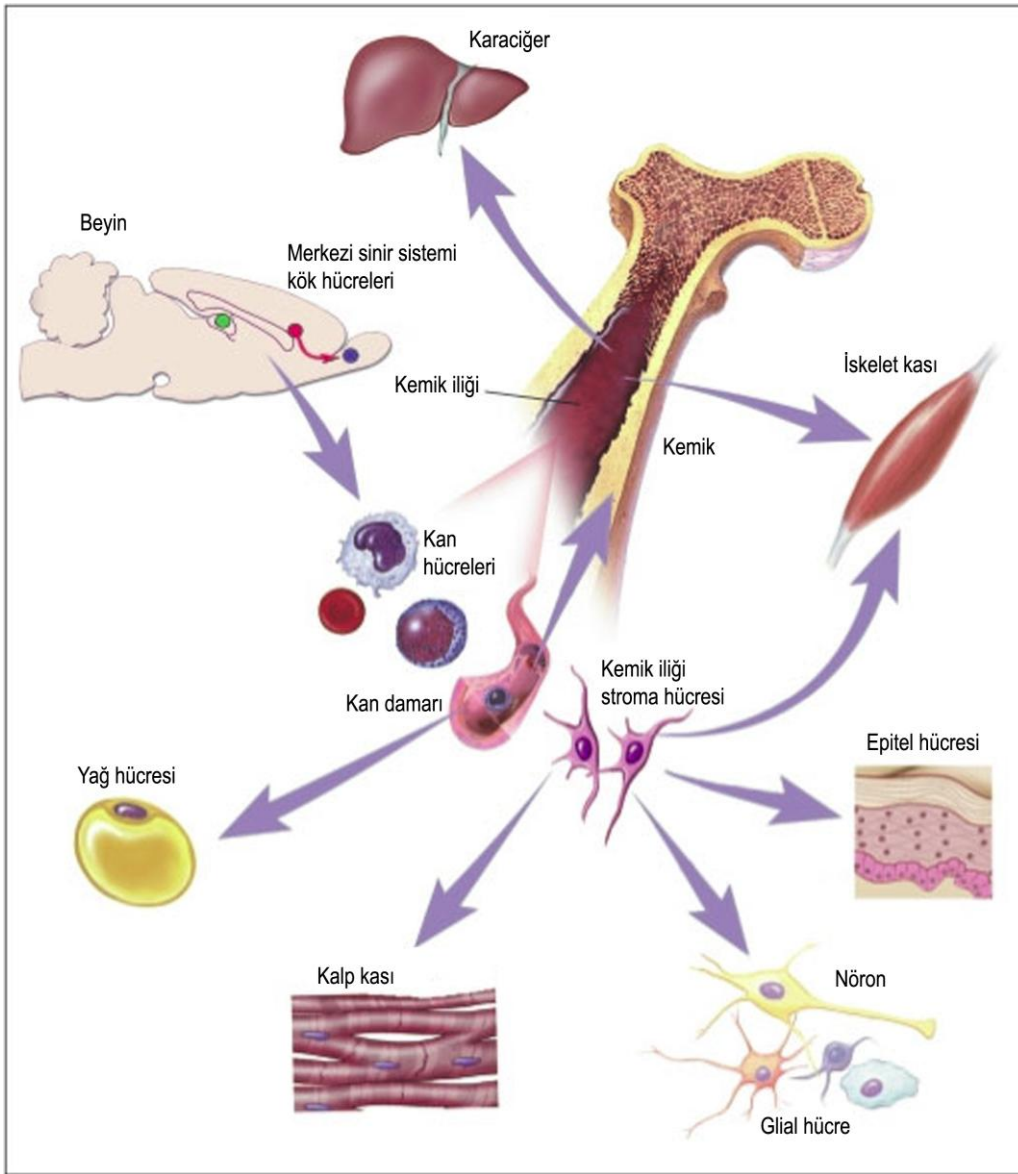
Kök hücreler kendini yenileme özelliklerini sağlamak için iki tip hücre bölünmesi geçirirler. Simetrik bölünmede, kök hücre özeliğini taşıyan özdeş iki yavru hücre, asimetrik bölünmede ise, bir kök hücre ve bir öncü hücre (progenitor hücre) oluştururlar (Şekil 2.4.1.). Öncü hücre daha kısıtlı kendini yenileme özelliğine sahiptir ve birkaç bölünmeye uğrayarak farklılaşmış olgun hücreye dönüşür (41).



Şekil 2.4.1. Kök hücrelerin simetrik ve asimetrik bölünmesi

Kök hücreler farklılaşma potansiyeli bakımından 3 gruba ayrılır: 1) Totipotent kök hücreler: Ekstraembriyonik hücreler dahil olmak üzere vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan embriyonal kök hücrelerdir. Bu hücreler sperm ve yumurta hücresinin birleşmesinden oluşur ve insan embriyosunun yaklaşık üçüncü gününe kadar elde edilebilir. Totipotent kök hücreler eksiksiz ve yaşayabilir bir canlı oluşturma kapasitesine sahiptir (42). 2) Pluripotent kök hücreler: Bu hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve üç embriyonik tabakadan köken alan, yaklaşık 250 hücre tipine kaynaklık edebilmektedirler. Pluripotent hücreler ekstraembriyonik dokuları oluşturma

yeteneğine sahip olmadıkları için mükemmel bir canlı yaratamazlar. Fetüs gonadından kaynaklanan embriyonik germ hücreler ve farklılaşmamış embriyonel karsinom hücreleri de bu grupta yer almaktadır (42). 3) Multipotent kök hücreler: Birçok farklı hücre tipini oluşturabilirler. Bu grupta, erişkin ve fetal kök hücreler bulunmaktadır. Pluripotent erişkin kök hücreler çok ender bulunur ve sayısı çok azdır örneğin, göbek kordonu mezanşim dokusunda bu özelliğe sahip hücreler bulunmaktadır. Kök hücrelerin kendi kaynaklandığı germ tabakası veya başka germ tabakaları hücrelerine farklılaşmaları plastisite olarak adlandırılmaktadır (43). Örneğin, kan kök hücreleri (mezoderm kaynaklı) iskelet kas hücrelerine (mezoderm kaynaklı) veya nöron hücrelerine (ektoderm kaynaklı) dönüşebilirler (Şekil 2.4.2.).



Şekil 2.4.2. Kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin plastisite özelliği

2.4.1. Germline kök hücresi

Germ hücresi, eşeyli üreyen bir organizmanın gamet oluşturmaya olanak veren hücredir. Çoğu hayvanda, germ hücreleri arka barsağın dorsal mezenteriy boyuna gonad taslaklarına göç ederler ve gonadal kabartı içinde ya oosit ya da sperm olarak gelişerek hücre farklılaşması ardından mitoz ve mayoz olmak üzere iki tür hücre bölünmesi geçirirler. İnsanda, embriyonun yaklaşık birinci ayında primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinin allantoise yakın bölgesinden primordiyal gonad kabartısına göç eder (Şekil 2.3.1.) ve orada mitoz bölünmelerle sayılarını arttırarak oogonyumlara (dişi germline kök hücreleri) farklılaşır (36, 44).

2.5. Araştırmada Kullanılan Belirteçler

2.5.1. Pluripotent kök hücre belirteçleri

2.5.1.1. Oct-4

Oct-4 proteini embriyonik kök hücrelerin pluripotansiyel yeteneğini korumada ana rol oynar ve bu nedenle, bu hücrelerin teşhisinde en önemli belirteçtir. Bu faktörün ifade seviyesi çok kritiktir, eksik veya fazla ifade olması embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasını etkiler. Fare embriyosunda Oct-4 geninin eksik ifadelenmesi iç hücre kitlesinin oluşmamasına, bu hücrelerin pluripotansiyel kapasitelerinin kaybına ve sonuç olarak trofoektoderme dönüşmelerine neden olur. Oct-4 geni farenin oositinden de ifade edilir ve zigotun ilk yarıklanmasında kaybolup tekrar embriyonun dört hücreli aşamasında görülür. Bu gen gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz (45).

2.5.1.2. Nanog

Nanog geninin mRNA'sı insan ve farenin pluripotent hücrelerinde bulunur ama olgunlaşmış hücrelerde yoktur. Nanog aslında hücrenin farklılaşmasına neden olan genlerin ifadesini susturan bir transkripsiyon susturucusu olarak önerilmiştir (46, 47). Bu

genin ifade olmaması, embriyonik kök hücrelerin pluripotansiyel özelliklerinin kaybını ve bu hücrelerin ekstraembriyonik hücrelere dönüşmelerini indükler. Nanog geni insan ve farenin embriyonik kök hücrelerinde, embriyonik germ hücrelerinde, olgunlaşmamış teratomlarda ve merkezi sinir sisteminde ifade olur. Son zamanlarda, bu gen, testiküler karsinoma ve germ hücre tümörlerinin teşhisinde kullanılmaktadır (47). Primordiyal germ hücrelerinin göçünün tamamlanabilmesi için Nanog geni gerekmektedir ve eğer bu hücrelerde Nanog ifadesi yoksa genital kabartıya varmalarında da sorun yaşanır (48).

2.5.1.3. Sox2

Sox2 bir intronsuz gen olarak embriyonik hücrelerin gelişmesi ve kaderlerinin belirlenmesinde önemli rol oynar (49). Sox2 geni embriyonik kök hücrelerinin pluripotansiyel özelliğinin korunması için vazgeçilmez bir gendir (50). Adachi ve arkadaşlarına göre (2010) trofoektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek embriyonik kök hücrelerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde Sox2 gen ifadesi gereklidir (51).

2.5.1.4. Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin transkripsiyonel düzenleyici rolleri

Oct-4, Nanog ve Sox2 genleri bir transkripsiyonel düzenleyici hiyerarşisinin merkezinde yer alarak kök hücrelerin kimliğini belirlemektedir (46, 47, 52). Oct-4, Sox2 ve Nanog genleri, kendilerini ve sinyal yolağının anahtar bileşenlerini kodlayan genleri aktive ederek ve gelişim sürecinin genlerini susturarak kök hücrelerin pluripotansiyel ve kendini yenileme özelliğini sağlamaktadır (52). Sox2 proteini Oct3/4 ile *in vitro* koşullarda karşılıklı etkileşim yaratarak Oct-Sox arttırıcısını aktive etmektedir ve bunun sonucunda Oct3/4, Nanog ve kendisinin ifadesini düzenlemektedir (50). İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerinde kromatin immünopresipitasyon yöntemi kullanılarak Oct-4 ve Sox2 proteinlerinin Nanog promotörüne bağlandığı gösterilmiştir (53).

Nanog geninin ifade seviyesi embriyonik kök hücrelerde dalgalı seyrederek. Geçici olarak Nanog miktarı düşük olan hücreler farklılaşmaya eğilim göstermektedir fakat bu hücreler farklılaşmamaktadır. Bazı sonuçlar Nanog geninden yoksun embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme potansiyelinin korunması ve farklılaşmalarını göstermektedir Nanog^{-/-}

embriyonik kök hücreler klonojenik özellik ve farklılaşmamış morfolojilerini koruyarak farklılaşmama belirteçlerini ifade edip pluripotent olmaya devam ederler (48).

İnsan embriyonik kök hücrelerinde Nanog geninin düşük ifadesi, Oct-4 geninin düşük ifadesine neden olurken Sox2 geninin ifadesinde etkisi bulunmamaktadır (54). İnsan ve fare embriyonik kök hücrelerinde Nanog geninin yüksek ifadesi bu hücrelerin farklılaşmasına neden olmazken, besleyici hücre tabakası ve LIF'in (lösemi baskılayıcı faktör) yokluğunda bu hücrelerin farklılaşmaksızın kendilerini yenileme kapasitelerini yükseltmektedir (46, 47, 55). Fare embriyonik kök hücrelerinde Nanog geninin ifadesinin susturulması bu hücrelerin ilkel endoderm hücrelerine farklılaşmalarına neden olmaktadır (46, 47). İnsan embriyonik kök hücrelerinde Nanog geninin bastırılması bu hücrelerin hem endoderm hem de ektoderm hücrelerine farklılaşmalarını sağlamaktadır (54, 56).

Morula hücreleri ve onların öncü hücrelerinin çekirdeğinde hem Oct-4 hem de Sox2 genleri ifade olurken Nanog geninin negatif olması, Oct-4 ve Sox2 genlerinin uygun hücreyel yerleşiminin yanı sıra başka moleküler sinyallerinde Nanog geninin ifadesi için gerekli olduğunu düşündürmektedir (53). Bazı araştırmalar Oct-4 ve Sox2 genlerinin Nanog geninin ifade olması için gerekli olduğunu ve ayrıca Oct-4 proteini yokken Sox2 proteininin Nanog promotörüne etkili bir şekilde bağlanamadığını göstermektedir (53, 57). Her ne kadar Nanog ve Oct-4 proteinleri embriyonik kök hücrelerinin kendisini yenilemekte birbirinden farklı işlevler gösterse de Oct-4 proteini yokken Nanog proteini fonksiyon gösterememektedir, bu yüzden bu iki proteinin birbirine bağlı ve paralel olarak işlev yapabildikleri düşünülmektedir (46, 58).

Embriyonik kök hücrelerde, Oct-4 konsantrasyonu eğer sabit ifade miktarının altındaysa Nanog promotörünü aktive eder, sabit ifade miktarında veya daha yüksekse o zaman Nanog geni ifadesinde engelleyici etkisi olur (Şekil 2.5.1.4.1.). Bu mekanizma kök hücrelerin pluripotansiyel özelliğinin Oct-4 miktarına bağlı olarak düzenlendiğini göstermektedir (45). Oct-4 geni düşük ifade olursa Sox2 ve Nanog genlerinin de düşük ifadesine neden olur (56, 59). Embriyonik kök hücrelerinin pluripotansiyel özelliğinin korunması için Oct-4 geninin ifade miktarı çok kritiktir. Örneğin bu gen fazla ifade olursa embriyonik kök hücrelerin endoderm veya mezoderm hücre hattına (45, 60) düşük ifade olursa trofoektodermal hücrelere farklılaşmasını tetikler (45, 56, 59, 61).



Şekil 2.5.1.4.1. Oct-4 ve Nanog genlerinin birbirinin üzerindeki düzenleyici etkileri

Embriyonik kök hücrelerde RNAi (RNA interference) ile Sox2 geninin susturulması sonucu bu hücreler trofoektoderm dahil olmak üzere çoklu hücre hattına farklılaşmaktadır (62). Embriyonik kök hücrelerde Sox2 proteininin küçük artışı (iki kat veya daha az) çeşitli farklılaşmış hücre tiplerindeki (endoderm hariç, nöroektoderm, mezoderm ve trofoektoderm) belirteçleri sergilemektedir (63). İnsan embriyonik kök hücrelerde Sox2 proteininin düşük ifadesi trofoektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı tetiklemektedir (51). Sox2 geninin yüksek ifadesi hem kendisi hem de Sox2-Oct3/4 kompleksinin hedef genlerinin (Oct3/4, Nanog, Fgf-4 ve Utf1) düşük ifadelerine neden olup aynı zamanda CDX2 proteininin eşliğinde trofoektodermal farklılaşmayı tetikler (51, 63). Özet olarak Sox2 geninin düşük veya fazla ifade edilmesi insan embriyonik kök hücrelerinin trofoblast hücre hattına farklılaşmasını sağlar. Sonuç olarak embriyonik kök hücrelerin kendilerini yenileme özelliklerinin korunması için hem Sox2 hem de Oct-4 genlerinin ifadesi bir ince çizgi üstünde olmalıdır. Embriyonik kök hücrelerde Sox2 geninin ifadesi hem kendisi ve hem Oct-4 geni tarafından, Oct-4 geninin ifadesi ise hem kendisi hem de Sox2 geni tarafından düzenlenmektedir (64).

2.5.2. Germline kök hücre belirteçleri

2.5.2.1. DDX4

DDX4 (DEAD box polypeptide 4) veya MVH (Mouse Vasa Homologue) geni sadece omurgalı ve omurgasız türlerin germ hücrelerinde ifade olur ve bir adenosine triphosphate-dependent RNA helicase olarak DEAD ailesi proteinlerinin bir üyesidir. DDX4 geni, ilk olarak sirke sineğinde ve daha sonra omurgalı ve omurgasızlarda, germ hücrelerinin gelişimi için gerekli olan bir gen olarak tanımlandı. Dişi ve erkeklerde, DDX4 proteini primordiyal germ hücrelerinin embriyonik gonadlarda yerleşmesinden itibaren germ

hücrelerinin gametogenezi süresince ifade olur. DDX4 geni primordiyal germ hücrelerinin totipotensi özelliğini korumak için bu hücrelerin somatik yönde farklılaşmalarını tetikleyen genlerin ifadesini susturur (65-70). İnsanın fetal ve erişkinlik döneminde, DDX4 proteininin sadece ovaryum ve testiste ifade olduğu iddia edilmiştir. DDX4 bir sitoplazmik protein olarak primordiyal germ hücrelerinde, oositte ve spermatozoidlerde yüksek miktarda ifade olur ve somatik hücrelerde bu proteine rastlanmamıştır (71).

2.5.2.2. DAZL

DAZL (deleted in azoospermia-like), RNA'ya bağlanan protein olarak Y kromozomu üzerinde bulunan DAZL geni tarafından kodlanır. Bu gen, DAZ genleri ailesinin bir üyesi olarak memeliler dahil çeşitli canlıların germ hücrelerinde ifade olur ve bu hücrelerin gelişimi, gametogenez ve mayoz bölünmesi için gereklidir. DAZL geninin baskılanması dişi ve erkek cinsinin germ hücrelerinin kaybına neden olur (72-75). DAZL proteini pluripotent kök hücrelerin sitoplazmasında, fetal germ hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında, ve oosit sitoplazmasında yer alır. Germ hücrelerin farklılaşma evresinde Nanog geninin ifadesi DAZL geni tarafında baskılanır (76).

2.5.3. Oosite özgün belirteçler

2.5.3.1. ZP2 ve ZP3

Zona pellucida (ZP) glikoprotein yapıda amorf bir yapı olarak yumurta hücrelerini çevreler. Özellikle ZP3 proteini (zona pellucida sperm-binding protein, zona pellucida glycoprotein) bir sperm reseptörü olarak spermin yumurtaya bağlanması ve fertilizasyon başlangıcında başlıca rol oynamaktadır (77, 78).

2.5.3.2. NOBOX

NOBOX proteini (newborn ovary homebox protein veya homebox protein NOBOX) memelilerin oositinde NOBOX geni tarafından ifade edilmekte, folikogenez ve oosite

özgün genlerin düzenlenmesi için gerekmektedir (79, 80). NOBOX geninde mutasyon prematür ovaryum bozukluğu ile sonuçlanır (81).

2.6. Doğum Sonrası Ovaryumda Yeniden Oosit ve Folikül Oluşması Olasılığı ile İlgili Sürdürülen Tartışmalar

Son yıllarda, doğum sonrası, yeniden oosit oluşma olanağının olamamasına karşın, ovaryum kök hücresi, yeniden oogenez kavramı ve oosit rezervinin olası yenilenebilmesi iddiaları ortaya konularak üreme biyolojisinde yeni tartışmalara yol açılmıştır. Araştırmalarda, fare embriyonik kök hücre kültüründe *ex vivo* oogenez (82), erişkin prosimiyen primatlar (83) ve farelerde (3) mitotik olarak aktif germ hücrelerin varlığı rapor edilmiştir. Erişkin insan ovaryumunun tunika albugina bölgesinde yüzey epiteli ve yeni foliküllere farklılaşan mezenkimal hücrelerin varlığı gösterilmiştir (84, 85). Bu çalışma sonuçları erişkin memeli ovaryumlarında yeniden oogenez ve folikül oluşması olasılığı üzerine tartışmaları yoğunlaştırmıştır (86-90).

2004 yılında, Johnson ve meslektaşlarının, doğum sonrası fare ovaryumunda, germline kök hücrelerinin varlığı ve çoğalması ile ilgili yaptıkları tespit, doğum sonrası oogenez ile ilgili son yıllardaki yapılan tartışmaların dönüm noktası haline gelmiştir (3). Fare modeli üzerine yapılan başka bir araştırmada, doğum sonrası ovaryumunda 7 ve 100'üncü günler arasında primordiyal foliküllerin sayısında kayda değer düşüklük izlenmemiş ve sonuç olarak, erişkin fare ovaryumunda, olası germ hücrelerin uygun koşullarda kendiliğinden yeni oositlere dönüştüğü tahmin edilmiştir (91). Bu araştırmalara karşın, erişkin insan ovaryumunda (23-58 yaş arası), erken mayoza veya oogeneze özgün mRNA'ların (SPO11, PRDM9, SCP1 ve TERT) tespit edilemediği ve proliferatif germ hücre markerlerinin (SCP3, Oct4/3 ve c-KIT) çok düşük ifadesi, doğum sonrası ovaryumlarda yeniden oogenezin mümkün olmadığını göstermek üzere öne sürülmüştür (2). Ayrıca, istatistiksel analizler ve matematiksel modellemeler sonucu, dişi memelilerde doğum öncesi kısıtlı sayıda oosit üretildiği ve doğum sonrası bu üretimin devam etmediği iddia edilmiştir (92-94). Bu araştırmalara paralel olarak, erişkin sıçan ovaryumu yüzey epitelinde, VASA/DDX4 genini ifade eden germ hücreler ve mayoza özgün belirteçler, mRNA (SCP1, SCP3 ve SPO11) ve protein (DMC1, STRA8 ve SCP3) seviyesinde tespit

edilememiştir (95, 96). Diğer bir araştırmada, doğum sonrası insan ovaryumunda immünofloresan boyama sonucu germline kök hücre markerleri (SSEA4, Oct-4, Nanog ve MAGE-A4) ve morfolojik olarak oogonia hücreleri gözlenememiştir (97). Başka raporlarda da, erişkin fare ovaryumunda gama radyasyonu ve kimyasal (doksorubisin) kullanılarak primer folikül ve oositler yok edilmiş, daha sonra bu ovaryumlarda germline kök hücrelerin varlığı, yeni oosit ve folikül oluşumu tespit edilememiştir (98, 99). Son olarak, erişkin fare ve maymun ovaryumunda proliferatif germline kök hücrelere ait genlerin (Sox2, LIN28, VASA, DAZL) bulunmadığı rapor edilmiştir. Fakat beklenmedik bir şekilde bu ovaryumlarda somatik kök hücre özelliği taşıyan hücrelerin varlığı tespit edilmiştir (100).

2.7. Doğum Sonrası Ovaryumda Yeni Oosit ve Folikül Oluşumu

2004 yılında, doğum sonrası fare ovaryumunda yeniden oosit ve folikül oluşumu ile ilgili iddia Johnson ve meslektaşları tarafından Nature dergisinde yayınlandı. Buna göre, genç ve erişkin fare ovaryumlarında oosit atrezisi ve ortadan kalkmasına bağlı olarak folikül havuzunun yenilenmesi için mitotik olarak aktif germ hücrelerine gerek oluğu bir hipotez olarak ortaya konulmuştur. Yapılan araştırmada, prepubertal dişi fareler, busulfana – mitotik aktif germ hücrelerini atreziiyi uyarmadan ortadan kaldırır – maruz bırakılarak primordiyal foliküllerin kaynağı yok edilmiştir. Busulfana maruz bırakılan ovaryumlarda daha sonra mayozu giriş markeri olan SCP3'ün ifadesi tespit edilmiştir. Bu sonuç, proliferatif germ hücrelerinin doğum sonrası ovaryumlarda bulunmalarının yanı sıra bu hücrelerin folikül kaynağının yenilenmesi için de gerekli olduğunu desteklemiştir. Diğer taraftan, ovaryumunun yarısı alınmış GFP (yeşil flöresan proteini) ifade eden transgen fareye normal farenin ovaryumundan doku parçaları nakledilmiş. 3-4 hafta sonra normal farenin ovaryum parçalarının GFP-pozitif farenin ovaryumuna geçtiği ve orada normal fareden geçen somatik granüloza hücrelerinin, GFP-pozitif farenin oosit hücrelerini çevreleyerek folikül oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca, GFP-pozitif oositleri çevreleyen granüloza hücrelerinin GFP-negatif olduğu tespit edilip buda transgenik germ hücrelerinin daha önce nakledilmiş dokuya geçtiklerinin ve oradaki normal somatik hücrelerle yeni folikül oluşturduklarının işareti olarak kabul edilmiştir. Bu araştırma, doğum sonrası

memeli ovaryumunda proliferatif germ hücrelerinin yeni oosit ve folikül oluşturmaları ile ilgili kayda değer veriler sunmuştur (3).

Erişkin memeli ovaryumunda yeniden oogenezi destekleyen araştırmaların devamında, germ hücre belirteçleri (Oct3/4, VASA, SCF-R, ve SSEA1) ve mayoza özgün belirteçler (AMC1 ve SCP3) erişkin fare ovaryumunda tespit edilmiştir (101). Pacchiarotti ve meslektaşları, Oct-4 promotörü kontrolü altında GFP ifade eden transgenik fareler kullanarak doğum sonrası fare ovaryumlarında germline kök hücreleri izole ve karakterize etmişler, bu ovaryumlarda, dağılım ve boyuta bağlı olarak iki grup GFP/Oct-4-pozitif hücre tespit etmişlerdir. Bunlar; ovaryumun yüzey epitelinde bulunan küçük hücreler (10-15 µm) ve folikül hücreleri ile çevrelenmiş büyük oosit benzeri hücrelerdir (50-60 µm). Ovaryum germline kök hücreleri, 1 yıl sürecince yapılan pasajlamalar sonucu kök hücre özelliğini, telomeraz enzimi aktivitesini ve normal karyotipini korumuştur. Bu süreç içinde germline kök hücreleri her üç germ tabakasından hücrelere kaynaklık edebilen embriyoid cisimcikleri oluşturmuşlardır (102). Başka bir araştırmada, erişkin fare ovaryumu stromal hücrelerinden embriyoid cisimcik ve teratom oluşturma özelliği olan pluripotent kök hücreler elde edilmiştir. Bu ovaryumlarda immüno Floresan boyama ve RT-PCR analiz sonucu pluripotent kök hücre belirteçleri (Oct-4 ve Nanog) protein ve mRNA bazında tespit edilmiştir (103). Song ve grubu, yeni doğmuş domuz ovaryumunda Oct3/4, Sox2 ve Nanog genlerini ifade eden ovaryum kök hücreleri tespit etmişler, bu hücrelerin *in vitro* koşullarda oosit benzeri hücrelere farklılaştığı ve bu hücrelerin oosite özgün genleri (VASA, DAZL ve ZPC) ifade ettiğini bildirmişlerdir (104). Araştırmaların devamında, yeni doğmuş ve erişkin fare ovaryumunda embriyonik kök hücre markeri (Oct-4, Klf4, c-Myc, Nanog, Sox2, SSEA1, SSEA2, AP (alkalin fosfataz), CD49f, CD133), germline kök hücre markeri (VASA) ifade eden ve kompakt yuvarlak koloni oluşturma özelliğine sahip germline kök hücreler tespit edilmiştir. Bu hücrelerin *in vitro* koşullarda domuz folikül sıvısı etkisiyle oosite benzer hücrelere farklılaştığı ve her üç germ tabakasına ait markerleri ifade eden embriyoid cisimciği oluşturma potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir (105). Çok ses getiren başka bir araştırmada, çok az sayıda mitotik olarak aktif oogonyum kök hücreleri, DDX4 belirteci kullanılarak FACS (fluorescence-activated cell sorting) yöntemiyle erişkin fare ve insan ovaryumunun korteks bölgesinden izole edilebilmiştir. FACS yöntemiyle izole edilen oogonyum kök hücreleri, aylarca fare embriyonik fibroblast besleyici (MEF) hücreleri üzerinde kültür edilmiş ve morfoloji, gen ifadesi (DDX4, KIT, NOBOX, LHX8, GDF9, ZP1, ZP2, ZP3) ve haploid durumu bakımından oosit benzeri

hücrelere kendiliğinden dönüşmüştür. İnsan ovaryumu korteks biyopsilerine oogonyum kök hücrelerinin enjekte edilmesi ve daha sonra bu biyopsilerin bağışıklık sistemi baskılanmış dişi fareye nakil edilmesi sonucu oosit içeren foliküller oluşmuştur. Ayrıca, kültür edilmiş oogonyum kök hücrelerinin kendi germline gen ifade profillerini (Blimp1, Stella, Fragilis, DDX4 ve DAZL) korumalarının yanı sıra pluripotent kök hücre (Oct-4, Nanog ve Sox2) ve mayozaya spesifik (STRA8) genlerini de ifade etme özelliğini kazandığı gösterilmiştir (7). 2012 yılında yayınlanan araştırmamızda, erişkinlik öncesi (2 haftalık) ve erişkin (8 haftalık) fare ovaryumunda pluripotent kök hücre belirteçleri (Oct-4, Sox2, Nanog), mRNA ve protein seviyesinde tespit edilmiştir (106). Lu ve grubu, erişkin insan ovaryumundan MACS (magnetic-activated cell sorting) yöntemi kullanarak Fragilis, MVH, PRDM1 ve TERT pozitif germline kök hücreler izole ettiklerini rapor etmişler, sonra insan kordon bağı mezenkimal kök hücrelerini besleyici katman olarak kullanarak bu germline kök hücreleri çoğaltıp oosit ve foliküle farklılaştırmışlardır (107). Erişkin insan ovaryumudaki yüzey epitel hücrelerinin kültüre edilmesi sonucu Oct-4, Nanog ve DDX4 markerlerini ifade eden germline kök hücreler gözlenmiştir. Bu hücrelerin daha sonra kendiliğinden DAZL, Stella, ZPC, SCP ve GDF9 markerlerini ifade eden oositlere dönüştüğü edilmiş, Bazı oositlerin ZP oluşturduğu ve az sayıda partogenezle blastosist benzeri yapıların da oluştuğu gözlenmiştir. Yapılan hücre kültürünün devamında üç germ tabakası hücrelerine dönüşebilen koloniler oluşmuştur (108). Son zamanlarda yapılan bir araştırmada, doğum sonrası fare ovaryumu germline kök hücrelerinin çoğalması, gelişimi ve yaşlanması ile ilgili hippo sinyal yolağının kritik rolü olduğu tespit edilmiştir (109).

Günümüzde yapılan araştırmalar sonucu, doğum sonrası ovaryumlarda, germline kök hücrelerin yanı sıra pluripotent/multipotent potansiyeli olan somatik kök hücrelerin de varlığı iddia edilmiş, 2007'de yapılan bir araştırmada, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklılaşma ve kendini yenileme potansiyeli olan teka kök hücrelerinin doğum sonrası fare ovaryumunda izole edilmiştir. Fibroblast morfolojisine sahip bu hücrelerin uygun hormon ve büyüme faktörlerinin etkisiyle androstendion salgılayan hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir (110). Başka bir araştırmada, erişkin domuz ovaryumu foliküllerinin teka tabakasında izole edilen multipotent teka kök hücreleri, *in vitro* koşullarda başarıyla osteosit, adiposit ve oosit benzeri hücrelere farklılaştırılmıştır. Teka kök hücrelerinin, mezenkimal/stromal kök hücre (CD29, CD44 ve CD90) ve pluripotent kök hücre (AP ve Sox2) belirteçlerini ifade ettiği gözlenmiştir. Bu hücrelerden farklılaşan oosit benzeri hücrelerin ise, pluripotent kök hücre (Oct-4, Nanog, Sox2), oosite özgün (ZPC, SCP3,

Stella, DAZL, VASA, GDF9B ve C-MOS) ve folikülogenez (FSH-reseptörü) belirteçlerini ifade ettikleri rapor edilmiştir (111). Diğer yandan, infertil insan ovaryumundan multipotent özelliği olan granüloza hücreleri izole edilmiş, bu hücrelerin uzun süre kültür edilmesi sonucu, mezenkimal kök hücre (CD29, CD44, CD90, CD105, CD117 ve CD166) ve pluripotent kök hücre (Oct-4) belirteçlerini ifade ettiği ve nöron, kondrosit ve osteoblast hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir. Granüloza kök hücreleri bağışıklık sistemi baskılanmış farelere enjekte edildikten sonra bu hücrelerin yaşamına devam ettiği ve mezenkimal hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir (112). Son olarak, Stimpfel ve grubu, erişkin insan ovaryumu korteks bölgesinden, pluripotent kök hücre (Oct-4, Sox2, Nanog, Stella, SSEA4, AP ve LIN28), germline kök hücre (DDX4) ve multipotent kök hücre (MCAM/CD146, Thy-1/CD90 ve STRO-1) markerlerini ifade eden hücreler izole etmişlerdir. Bu grup ayrıca, *in vitro* koşullarda her üç germ tabakası hücresine farklılaşabilen (nöron benzeri (ektoderm), adiposit ve osteoblast (mezoderm) ve pankreas benzeri (endoderm) hücreler), yüksek plastisitesi olan, küçük yuvarlak (4 µm) SSEA4-pozitif kök hücreler izole etmişlerdir (113).

2.8. Ovaryum Yüzey Epitelinden Kaynaklanan Kök Hücreler

Genç ve erişkin fare ovaryumunun histolojik analizi sonucu, ovaryum yüzey epitelinde fetal fare ovaryumundaki germ hücrelere benzerlik gösteren, büyük oval hücreler tespit edilmiştir (114, 115). Ayrıca, ovaryumun korteks bölgesi, germ hücrelerin, primitif granüloza hücrelerinin ve bunlardan oluşan primordiyal foliküllerin kaynağı olarak düşünülmüştür (85). 2005 yılında, erişkin insan ovaryumu yüzey epiteli hücre kültüründe, yeniden oosit ve granüloza hücrelerinin oluşma olanağı üzerine bir deney tasarlanmış, ovaryum yüzey epitel hücrelerinin östrojenik uyarıcı içermeyen besiyer ortamında kültüre edilmesi sonucu bu hücrelerin granüloza, nöron, epitel ve mezenkimal benzeri hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir. Bu hücreler östrojenik uyarıcı içeren medyumda kültüre edildiklerinde oosit benzeri hücrelere farklılaştıkları tespit edilip oluşan oosit benzeri hücrelerde GV ve kutup cisimciği gözlenmiştir (116). Zou ve meslektaşları, yeni doğmuş fare ovaryumu yüzey epitelinde MVH-pozitif hücrelerin (germline kök hücreler) varlığını rapor etmiş; yeni doğmuş fareden izole edilen germline kök hücreler 15 ay sürecince ve erişkin fareden izole edilen germline kök hücreler ise 6 ay sürecince kültür edilmiş ve bu süreç içinde hücreler normal karyotip ve telomeraz enzimi aktivitesini korumuşlardır. Daha

sonra bu hücreler GFP proteini ile transfekte edilip folikül bakımından steril (busulfan ile muamele edilmiş) olan fare ovariumuna nakledilmişlerdir. GFP-pozitif germline kök hücrelerin nakledildikleri ovariumda oogeneze aşamasına girdikleri ve yeşil floresan proteini ifade eden transgen yavruların doğduğu tespit edilmiştir (6). Başka bir araştırmada, erişkin fare ovariumu yüzey epitelinde yüksek miktarda STRA8 ve DAZL genini ifade eden az sayıda mayoz öncesi germline kök hücrelerin varlığı tespit edilmiştir. Bu hücreler transgen fareye aktarıldıktan sonra Oct4-GFP, c-KIT, MVH ve SSEA1 pozitif oositlere dönüştükleri gözlenmiştir (117). Öne çıkan diğer bir araştırmada, folikül oluşturma yeteneği olmayan erişkin insan ovariumu yüzey epitelinden kendiliğinden oosite farklılaşan ve *in vitro* koşullarda partenogeneze uğrayarak implantasyon öncesi blastosist benzeri hücrelere dönüşme kapasitesi olan olası germline kök hücreler izole edilmiştir (5, 118). Ovaryum yüzey epitelinden elde edilen kök hücrelerin hem kültür öncesi hem de kültür sürecince pluripotent kök hücre markerlerini (Oct-4, Sox2, Nanog, SSEA4, KLF4 ve MYC) ifade ettikleri gözlenmiştir. Ayrıca, adenokarsinoma hastalarının ovarium yüzey epitelinden SSEA4, Sox2, VASA ve ZP2 genlerini ifade eden primitif oosit benzeri yuvarlak (10-15 µm) hücreler izole edilmiştir (119). Bu grubun başka araştırmalarında, erişkin insan ovariumu yüzey epitelinden FACS ve MACS yöntemiyle SSEA4-pozitif hücreler izole edilmiştir (120, 121). Bu hücrelerin ayrıca primordiyal germ hücresi (PRDM1, PRDM14 ve DPPA3) ve pluripotent kök hücresi (Oct-4A, Sox2, SSEA4, SALL4, CDH1 ve LEFTY1) belirteçlerini ifade ettikleri gözlenmiştir. Bu hücrelerin folikül sıvısı etkisiyle *in vitro* koşullarda ZP3, SCP3 ve c-KIT faktörlerini ifade eden oosit benzeri hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir (120, 122). Parte ve grubu tarafından, erişkin tavşan, koyun, maymun ve menopoz insan ovariumu yüzey epitelinde pluripotent kök hücre belirteçleri (Oct-4, Oct-4A, Nanog, Sox2, TERT ve Stat-3) genlerini ifade eden çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin (VSELs) varlığı rapor edilmiştir. Bu hücrelerin 3 hafta içerisinde, c-KIT, DAZL, VASA ve ZP4 genlerini ifade eden oosit benzeri hücrelere dönüştüğü gözlenmiştir (123). FSH'nın kök hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması sonucu, bu hormonun germline ve çok küçük pluripotent kök hücrelerin oosite farklılaşmalarında uyarıcı rolü olduğu tespit edilmiştir. Erişkin insan ovariumu yüzey epitelinde de görüldüğü gibi, FSH'nın çok küçük pluripotent kök hücrelerinin (Oct-4A ve Nanog genlerinin yüksek regülasyonu sonucu) ve germline kök hücrelerinin (Oct-4 geni ve PCNA proteininin yüksek ifadesi sonucu) çoğalmasını ve bu hücrelerin oosit ve primordiyal foliküllere dönüşmelerini (Oct-4, MVH, Stella ve Fragilis genlerinin yüksek regülasyonu sonucu) uyardığı tespit edilmiştir (124-126). Başka bir araştırmada, insan ve

koyun ovaryumu yüzey epitelinde çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin, primordiyal germ hücrelerin ve progenitor olarak adlandırdıkları germ kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin çekirdeğinde Oct-4, SSEA4, CD133 proteinleri, progenitor germ hücrelerin sitoplazmasında Oct-4 proteini ve primordiyal germ hücrelerinde Fragilis, Stella ve VASA proteinleri ifade edilmiştir. Daha sonra, *in vitro* koşullarda bu hücreler kendiliğinden, Balbiani cisimciği ve mitokodriyal bulutu olan, DAZL, GDF-9 ve SCP3 belirteçlerini ifade eden büyük oosit benzeri hücrelere dönüşmüşlerdir. Bunların yanı sıra, ovaryum yüzey epitelinde MACS yöntemi kullanarak SSEA4-pozitif hücreler izole edilmiş, bu hücrelerde ayrıca Oct-4, Nanog, SSEA4, CD133, Stella proteinleri ve Oct-4A, total Oct-4 mRNA'ları tespit edilmiştir (127). 2015 yılında yapılan araştırmada, erişkin fare ovaryumu yüzey epitelinden Oct-4, Nanog, SSEA1 ve SCA1 proteinlerini çekirdeğinde ifade eden çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler ve Oct-4, SSEA1 proteinini sitoplazmasında ifade eden ve biraz daha büyük olan progenitor germ kök hücreler izole edilmiştir. Bu hücrelerin, FSH etkisiyle, MVH ve GDF-9 pozitif oosit benzeri hücrelere dönüştüğü tespit edilmiştir (128). Çizelge 2.8.1.'de olası doğum sonrası oogenezi üzerine yapılan araştırmalar özetlenmiştir.

Çizelge 2.8.1. Doğum sonrası oogenezi destekleyen ve reddeden araştırmalar

Doğum sonrası oogenezi destekleyen araştırmalar	
Referanslar	Öne çıkan başlıklar
Johnson vd., 2004 (3)	Genç ve erişkin fare ovaryumunda aktif germline kök hücre bulunmuş Normal ovaryum dokusunun GFP-pozitif transgenik fareye nakli sonucu kimerik foliküller oluşmuş
Bukovsky vd., 2005 (116)	Erişkin insan ovaryumu yüzey epitelinden kaynaklanan hücreler oosit, granuloza ve nöron hücrelerine farklılaşmış
Kerr vd., 2006 (91)	Erişkin ovaryumda bulunan olası germ hücreleri uygun koşullarda kendiliğinden oosite dönüşebilir
Lee vd., 2007 (129)	Erişkin fare ovaryumunda CABLES1 geni oositlerin yenilenmesinde etkilidir
Zhang vd., 2008 (101)	Erişkin fare ovaryumunda bazı hücreler germ ve mayoz belirteçlerini ifade etmiş
Szotek vd., 2008 (130)	Erişkin transgenik fare ovaryumu yüzey epitelinde bazı hücreler kök hücre/progenitor hücre karakterini göstermiş

Çizelge 2.8.1. (Devam)

Virant-Klun vd., 2008, 2009 ve 2013 (5, 118, 122, 131)	<p><i>In vitro</i> koşullarda, olası germ hücreler oosit benzeri hücrelere dönüşür ve bazıları pratenogeneze uğrayarak implantasyom öncesi blastosistler oluşturmuş</p> <p>Folikül oluşturma kapasitesi olmayan erişkin insan ovaryumu yüzey epitelinden pluripotent kök hücre markerleri ifade eden hücreler izole edilmiş</p> <p>Erişkin insan ovaryumu yüzey epitelinden MACS ve FACS yöntemleri kullanılarak SSEA4-pozitif hücreler izole edilmiş</p>
Zou vd., 2009 (6)	<p>Yeni doğmuş ve erişkin fare ovaryumundan proliferatif MVH-pozitif germline kök hücreler izole edilmiş</p> <p>Germline kök hücrelerin, busulfan ile steril olmuş fare ovaryumuna nakli sonucu kimerik foliküller oluşmuş ve daha sonra oositlerin fertilize edilmesi sonucu yaşayan yavrular doğmuş</p>
Niikura vd., 2009 (117)	<p>Erişkin fare ovaryumu yüzey epitelinden yüksek miktarda STRA8 ve DAZL genlerini ifade eden az sayıda mayoz öncesi germ hücreler izole edilmiş</p> <p>Germline kök hücrelerin transgenik farelere nakli sonucu GFP-pozitif oositler oluşmuş</p>
Pacchiarotti vd., 2010 (102)	<p>Doğum sonrası fare ovaryumlarında dağılım ve boyutlarına bağlı olarak iki grup GFP/Oct-4-pozitif hücre tespit edilmiş; ovaryumum yüzey epitelinde bulunan küçük hücreler (10-15 µm) ve folikül hücreleri ile çevrelenmiş büyük oosit benzeri hücreler (50-60 µm)</p> <p>Germline kök hücreler, her üç germ tabakadan hücrelere kaynaklık edebilen embrioid cisimcikleri oluşmuş</p>
Gong vd., 2010 (103)	<p>Erişkin fare ovaryumu stromal hücrelerinden izole edilen pluripotent kök hücreler embrioid cisimcikler ve teratoma oluşturmuş</p>
Parte vd., 2011 ve 2013 (123, 125)	<p>Erişkin tavşan, koyun, maymun ve menopoz insan ovaryumu yüzey epitelinde pluripotent kök hücre belirteçlerini ifade eden ve <i>in vitro</i> koşullarda oosit benzeri hücrelere farklılaşan çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler izole edilmiş</p> <p>Ovaryum yüzey epitelinde bulunan kök hücreler FSH ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) etkisiyle primordiyal foliküllerin gelişimini başlatır</p> <p>Dondurularak muhafaza edilmiş ovaryum korteks bölgesi kendiliğinden oosit benzeri hücrelere dönüşen kök hücrelerin kaynağı sayılır</p>
White vd., 2012 (7)	<p>Erişkin fare ve insan ovaryumu korteks bölgesinden izole edilen mitotik olarak aktif oogonyium kök hücreleri mayoz bölünmesine uğrayarak oosit oluşturmuş</p> <p>İnsan ovaryumu korteks biyopsilerine oogonyium kök hücrelerinin enjekte edilmesi ve daha sonra bu biyopsilerin bağışıklık sistemi baskılanmış dişi fareye nakil edilmesi sonucu oosit içeren foliküller oluşmuş</p>
Esmailian vd., 2012 (106)	<p>Doğum sonrası ve erişkin fare ovaryumunda Oct-4, Nanog ve Sox2 belirteçlerini mRNA ve protein düzeyinde ifade eden hücreler tespit edilmiş</p>

Çizelge 2.8.1. (Devam)

Bahrtya vd., 2012 (124)	Erişin insan ovaryumu yüzey epitelinde de görüldüğü gibi, FSH, çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerin ve germline kök hücrelerin çoğalmasını ve bu hücrelerin oosit ve primordiyal foliküllere dönüşmesini tetiklemiş
Patel vd., 2013 (126)	FSH, ovaryum kök hücrelerinin kendini yenilemesi ve oosite farklılaşmasını uyarır
Stimpfel vd., 2013 (113)	Erişkin insan ovaryumu korteks bölgesinden, pluripotent kök hücre, germline kök hücre ve multipotent kök hücre markerlerini ifade eden hücreler izole edilmiş <i>In vitro</i> koşullarda her üç germ tabakası hücrelerine farklılaşabilen ve yüksek plastisitesi olan, yuvarlak SSEA4-pozitif kök hücreler izole edilmiş
Parte vd., 2014 (127)	Erişkin insan ve koyun ovaryum yüzey epitelinden SSEA4-pozitif hücreler izole edilmiş
Sriraman vd., 2015 (128)	Erişkin fare ovaryumu yüzey epitelinden FSH etkisiyle oosit benzeri hücrelere dönüşen çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler ve biraz daha büyük olan progenitor germ kök hücreler izole edilmiş
Lu vd., 2015 (107)	Erişkin insan ovaryumunda MACS yöntemi kullanarak, oosit ve foliküle farklılaşan germline kök hücreler izole edilmiş
Lai vd., 2015 (108)	Erişkin insan ovaryumudaki epitel hücrelerin kültür edilmesi sonucu oosite dönüşebilen germline kök hücreler gözlenmiş
Li vd., 2015 (109)	Doğum sonrası fare ovaryumu germline kök hücrelerinin çoğalması, gelişimi ve yaşlanması ile ilgili hippo sinyal yolağının kritik rolü olduğu düşünülmüş
Doğum sonrası oogenezi reddeden araştırmalar	
Referanslar	Öne çıkan başlıklar
Bristol-Gould vd., 2006 (92)	İstatistiksel analizler ve matematiksel modellemeler sonucu, dişi memelilerde doğum öncesi kısıtlı sayıda oosit üretildiği ve doğum sonrası bu üretimin devam etmediği iddia edilmiş
Liu vd., 2007 (2)	Erişkin insan ovaryumunda, erken mayoza veya oogeneze özgün mRNA'ların tespit edilememesi ve proliferatif germ hücre markerlerinin çok düşük ifadesi doğum sonrası ovaryumlarda yeniden oogenezin mümkün olmadığını göstermiş
Zhang vd., 2010 ve 2012 (95, 96)	Erişkin sıçan ovaryumu yüzey epitelinde, DDX4 genini ifade eden germ hücreler ve mayoza özgün belirteçler, mRNA ve protein seviyesinde tespit edilememiş
Byskov vd., 2011 (97)	Doğum sonrası insan ovaryumunda immün boyama sonucu germline kök hücre markerleri ve morfoloji olarak oogonyum hücreleri gözlenememiş
Kerr vd., 2012 (98)	Radyasyon ve kimyasal kullanılarak steril edilmiş erişkin fare ovaryumunda tekrar germline kök hücre, yeni oosit ve folikül oluşumu tespit edilememiş
Yuan vd., 2013 (100)	Erişkin fare ve maymun ovaryumunda proliferatif germline kök hücre ve germ hücrelerin yenilenmesi ile ilgili bir kanıt bulunamamış
Lei vd., 2013 (99)	Erişkin fare ovaryumunda aktif germline kök hücre ve <i>in vitro</i> koşullarda yeni oosit oluşmamış

2.9. Germline Kök Hücrelerinin Olası Gonad Dışı Kaynağı

Johnson ve meslektaşları, kimyasal kullanarak oositleri ortadan kaldırmış fare ovaryumlarında, kemik iliği naklinin yeni oositlerin oluşumunda etkili olduğunu öne sürmüştür (132). Bu araştırmacılar, gen ifade analizi ve kemoterapi ile steril olmuş ovaryumlarda kemik iliği nakli yöntemlerini kullanarak, kemik iliğinde bulunan germline kök hücrelerin erişkin fare ovaryumunda yeni oositlerin oluşmasını desteklediğini iddia etmişler, ayrıca, dişi farelerde periferik kanın germline kök hücrelerin diğer bir kaynağı olduğunu iddia etmişlerdir. Periferik kandan toplanan GFP-pozitif germline kök hücrelerin, kemoterapi ile steril edilmiş fare ovaryumlarına transfüzyonu sonucu, GFP-pozitif oositlerin oluştuğu gösterilmiştir. Bu araştırmaların sonucunda, kemik iliğinde olası germ hücrelerin (progenitor hücreler) kan dolaşımına verildiği ve daha sonra bu hücrelerin ovaryuma göç ettiği düşünülmüştür (133). Periferik kan dolaşımındaki hücrelerin ovaryuma geçişi ve yeni oosit oluşumundaki etkiyi araştırmak için, Eggen ve grubu dişi erişkin farelerde parabiyoz (cerrahi yoluyla iki canlıda kan dolaşımı sisteminin birbirine bağlanması) yöntemini kullandılar. Kan dolaşımındaki hücrelerin ovaryuma geçiş potansiyeline sahip olması ve sadece ovulasyon aşamasında etkili olmasına rağmen, bu hücrelerin yeni niş ortamında kendi hematopoetik karakterlerini korudukları ve yeni oosit oluşumunda etkili olmadıkları tespit edilmiştir (134). Başka bir araştırmada, kan dolaşımındaki olası germ öncü hücrelerin ovaryumda yerleşip yeni foliküller oluşturma olanağını araştırmak için GFP-negatif ovaryumlar GFP-pozitif transgen alıcıya nakledilmiş sonuç olarak, erişkin ovaryumlarda gonad dışı germ öncü hücrelerinin yeni oosit oluşumunu desteklemesi ile ilgili bir kanıt bulunamamıştır (135). Çıkan bu sonuçlara karşın, sitotoksik kemoterapi ile steril edilmiş erişkin fare ovaryumlarında kemik iliği nakli sonucu yeni foliküllerin oluştuğu gözlenmiştir. Bu araştırmada, kemik iliğinde bulunan germline kök hücrelerin kemik iliği nakli yapılan farede yeniden oogenezi tetikleyerek yeni oosit oluşumuna neden olduğu iddia edilmiştir (136). Bukovsky ve grubu, ovaryum yüzey epiteline sahip olan ve olmayan erişkin sıçan ovaryumlarında, kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin (monosit ve T hücreleri) olası germ hücrelerin oluşumuna katkıda bulduklarını iddia etmişler, ovaryum yüzey epiteli olmayan farelerde, medüller bölgede bulunan kök hücrelerin yeni primordiyal foliküllerin oluşumunda rolü olduğunu iddia etmişlerdir (137-140). Ayrıca, vasküler perisitler ve kemik iliğinden kaynaklanan monositlerin folikül oluşumu, gelişimi ve ovulasyon öncesi matürasyonda rolleri olduğu düşünülmüştür (4, 85, 141). Yapılan araştırmaların devamında, yaşlı farelerde kemik

iliğinden kaynaklanan hücrelerin ovaryuma geçişi sonucu üreme kapasitesinin uzun süre devam ettiği gözlenmiştir. Kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin, alıcı fare ovaryum nişinde yerleşerek buradaki germline hücrelerinin olgun oosite dönüşümünde etkili olduğu düşünülmüştür (142). Sonuç olarak, kök hücre kapasitesini destekleyen somatik hücre nişinin zamanla bozulması sonucu yaşa bağlı üreme yetmezliği meydana gelebilir. İlginç olarak, genç ve erişkin fare kanındaki rejeneratif sinyallerin yaşlı fare ovaryumunda folikül gelişimini etkilediği iddia edilmiştir. Erkek fare kanındaki STRA8 faktörü –ovaryumda, germ hücrelere özgün mayoz genlerin ifadesini tetikler (143)– oogenezi arttırmak yoluyla ovaryum folikül rezervini önemli ölçüde çoğaltır (144). Kemik iliğinden kaynaklanan doğum sonrası olası germline kök hücreler ile ilgili yapılan araştırmada, kemik iliği kök hücreleri damar yoluyla follitropin reseptörü baskılanmış (FORKO) farelere enjekte edildikten sonra ovaryuma geçtikleri gözlenmiştir. Bu hücreler FORKO farelerin ovaryumunda, FSH reseptörü geninin ifadesini, FSH reseptörü sentezini, östrojen hormonu sentezini ve folikülogenezi tetikler (145). Diğer bir araştırmada, toksik kimyasal ile muamele edilmiş fare ovaryumunda, kemik iliği naklinin yeni oosit oluşmasına neden olduğu ile ilgili kanıt bulunamamıştır. Ancak, kemik iliği hücrelerinin ovaryuma geçişi, farelerin üremesinde iyileştirici rolü olduğu düşünülmüştür (146). Çizelge 2.9.1.'de doğum sonrası oogenezde gonad dışı germline kök hücrelerin etkisi üzerine yapılan araştırmalar özetlenmiştir.

Çizelge 2.9.1. Doğum sonrası oogenezde, olası gonad dışı germline kök hücrelerinin etkisini araştıran çalışmalar

Kemik iliğinden kaynaklanan olası germline kök hücrelerin doğum sonrası oogenez ile ilgili rolünü destekleyen araştırmalar	
Referanslar	Öne çıkan başlıklar
Johnson vd., 2005 (132)	Erişkin farede, kemik iliği ve periferik kanda bulunan olası germline kök hücre öncüleri yeniden oogenezi destekleyebilir
Lee vd., 2007 (136)	Kemik iliğinde bulunan olası germline kök hücreler, kemik iliği nakli sonucu yeniden oogenezi tetikler
Bukovsky vd., 2007, 2009, 2011 ve 2012 (137-140)	Ovaryum yüzey epiteline sahip olan ve olmayan erişkin sıçan ovaryumlarında, kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin olası germ hücrelerin oluşumuna katkıda bulunur
Selesniemi vd., 2009 (142)	Yaşlı farelerde, kemik iliğinden kaynaklanan hücreler ovaryuma geçerek üreme kapasitesi uzun süre devam ettirir

Çizelge 2.9.1. (Devam)

Ghadami vd., 2012 (145)	FORKO farelere enjekte edilen kemik iliği kök hücreleri ovaryuma geçerek FSH reseptörü geninin ifadesini, FSH reseptörü sentezini, östrojen hormonu sentezini ve folikülogenezi tetikler
Kemik iliğinden kaynaklanan olası germline kök hücrelerin doğum sonrası oogenez ile ilgili rolünü reddeden araştırmalar	
Referanslar	Öne çıkan başlıklar
Eggan vd., 2006 (134)	Kan dolaşımındaki hücreler ovaryuma geçer ve yeni niş ortamında kendi hematopoetik karakterini koruyup yeni oosit oluşumunda etkisi bulunmaz
Begum vd., 2008 (135)	Erişkin ovaryumlarda gonad dışı germ öncü hücrelerinin yeni oosit oluşumunda destekleyici rolü yoktur
Santiquet vd., 2012 (146)	Toksik kimyasal ile muamele edilmiş fare ovaryumunda, kemik iliği naklinin yeni oosit oluşumunda etkisi bulunmaz

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Yaklaşık 10 yıldır erişkin memeli ovaryumunda yeni oositlerin oluşumu ve ovaryum somatik kök hücreleri ile ilgili çıkan araştırma sonuçları tartışma konusu olmuştur (89, 147, 148). Bu tartışmalar göz önüne alındığında doğum sonrası memeli ovaryumundaki pluripotent ve germline kök hücrelerin varlığını tespit edip bu hücreleri farklılaştırabilmek dışı üreme biyolojisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Daha önceki Yüksek Lisans Tezi çalışmamızda, BALB/c türü iki haftalık (erişkinlik öncesi) ve sekiz haftalık (erişkin) farelerin ovaryumunda olası kök hücreleri tespit etmek için Oct-4, Nanog ve Sox-2 belirteçleri (pluripotent kök hücre belirteçleri) immünohistokimyasal boyama ve Real Time-PCR yöntemleri ile incelenerek önemli bulgular elde edilmiştir. İki farklı yaştaki örneklerin ovaryum dokusunda Oct-4, Nanog ve Sox-2 genlerinin mRNA seviyeleri incelenmiş ve Oct-4 ve Nanog genlerinin ifade seviyesi 2 ve 8 haftalık yaş grupları arasında anlamlı olarak değişirken, Sox-2 geninin ifade düzeyinde değişiklik gözlenmemiştir. İmmünohistokimyasal boyama yönteminin sonuçlarına göre ise iki farklı yaş grubuna ait ovaryumların farklı bölgelerinde ve farklı düzeyde Oct-4, Sox-2 proteinlerinin varlığı tespit edilmiştir (106).

Daha önceki çalışmalarımızın devamında yeni araştırmamızda amacımız, erişkin fare ovaryumundaki germline ve pluripotent kök hücreleri tespit edip daha sonra yeni oosit ve folikül hücrelerine farklılaştırarak kök hücresi olduklarını kesin olarak göstermek ve farklılaşan bu hücrelerin protein ve mRNA bazında analiz etmektir.

Bu tez sırasında oluşacak deneyim sayesinde:

- **Germline ve pluripotent kök hücre hattı üretmek için ön bilgi ve temel oluşturulacaktır:** Araştırma sonunda elde edilen bilgiler ışığında erişkin memeli ovaryumunda germline ve pluripotent kök hücrelerin varlığı, hangi gen veya proteinleri kullanarak bu hücrelerin izole edilebileceği, izolasyonun ne zaman ve hangi pasajda yapılması gerektiği ve oosite farklılaşmasında önemli olan faktörler tanımlanacaktır.
- **Ovaryumla ilgili infertilitenin otolog tedavisi için temel oluşturulacaktır:** Erişkin ovaryumunda germline kök hücre varlığı ve bu hücrelerin oosite

farklılaştırılması gelecekte ovaryum infertilitesinin otolog tedavisi için önemli veriler sunacaktır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Tüm deney aşamaları için 40 adet BALB/c türü 8 haftalık dişi fare (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarı)¹ kullanıldı.

4.1.1. Histolojik takip

1. Bouin solüsyonu:

- 300 ml Suda doyurulmuş Pikrik asit (Merck)
- 100 ml Formalin %40 (Merck)
- 20 ml Glasiyal asetik asit (Sigma, 27225)

2. Dehidratasyon alkolları

- %50 Alkol
- %70 Alkol + 3 damla doymuş LiCO₃ (Sigma, 62470) çözeltisi
- %80 Alkol
- %95 Alkol
- %100 Alkol

3. Ksilen (Sigma, 16446)

4. Parafin

5. Hematoksilin boyası (Sigma, H9627)

6. Eozin boyası (Sigma, E6003)

7. Etüv (Shellab, 1545-2E)

8. Mikrotom (Leica, RM2125)

9. Sıcak su banyosu (Shandon)

10. Entellan (Merck, 107961)

11. Lam (Citoglass)

12. Lamel (Citoglass)

13. Işık mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

¹ Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 18/01/2012 tarihli ve 2012-1-3 sayılı izniyle gerçekleştirilmiştir (Ek-1: Etik Kurul Kararı)

4.1.2. Ovaryum dokusunda immünofloresan işaretleme

4.1.2.1. Fiksasyon

1. Paraformaldehit (Sigma, 158127)
2. Sükröz (Sigma, P8920)
3. PBS (Sigma, P4417)
4. Poli-L-Lizin (Sigma, P8920)
5. Kriyomatriks (Shandon, 6769006)
6. Lam (Citoglass)
7. Kriyomikrotom (Shandon, Cryotome SME)

4.1.2.2. İmmünofloresan işaretleme

1. PAP-Pen (Sigma, Z377821)
2. Yıkama çözeltisi:
 - PBS (Sigma, P4417)
 - %0.2 PBST (Triton X-100 (Sigma, X-100), PBS (Sigma, P4417) 0.2:100)
3. Geçirgenlik çözeltisi
 - %0.5 PBST (Triton X-100 (Sigma, X-100), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100)
4. Bloklama çözeltisi (BSA-PBST)
 - 1:1 PBS (Sigma, P4417)
 - %1 BSA (Sigma, A2153)
 - %0.25 Triton X-100 (Sigma, X100)
 - %2 Goat Serum (Sigma, G9023)
5. Primer antikorlar:
 - Poliklonal anti-Oct-4 tavşan IgG (abcam, ab137427), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
 - Poliklonal anti-Sox2 tavşan IgG (abcam, ab97959), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
 - Poliklonal anti-Nanog tavşan IgG (abcam, ab80892), PBS (Sigma, P4417) 1:100 seyreltme

- Poliklonal anti-DDX4/VASA tavşan IgG (abcam, ab13840), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
 - Poliklonal anti-DAZL tavşan IgG (abcam, ab34139), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
6. Sekonder antikor: Alexa Fluor[®] 488 keçi anti-tavşan IgG (Invitrogen, A11034), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme

4.1.2.3. Görüntüleme

1. Kapatma medyumunu: ProLong[®] Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, P36931)
2. Lam (Citoglass)
3. Lamel (Citoglass)
4. Floresan mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

4.1.3. Hücre kültürü

1. Laminar akım kabini (Holten Laminair, Model 1.2)
2. İnkübatör (Sanyo, MCO-20AIC)
3. Isıtma plakalı invert mikroskop (Olympus, IX71)
4. Stereomikroskop (Nikon, SMZ745T)
5. Çalkalamalı su banyosu (Memmert, WB22)
6. pH metre (Jenco, 6173)
7. 25 ve 75 cm² flask (Sarstedt)
8. 6 ve 12 kuyucuklu hücre kültür kapları (Corning)
9. Jelatin (Sigma, G1890)

4.1.3.1. Farklılaştırma öncesi medyumunu

1. DMEM Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) (Sigma, D8437)
2. FBS (Hyclone, SH30071.03HI)

3. Penisilin-Streptomisin-Amfotrisin B (Lonza, 17-745E-20)

4.1.3.2. Oosite farklılaştırma medyumu

1. DMEM/F12 (Sigma, D8437)
2. FBS (Hyclone, SH30071.03HI)
3. Penisilin-Streptomisin-Amfotrisin B (Lonza, 17-745E-20)
4. FSH (Sigma, F4021)
5. β -Estradiol (Sigma, E2758)
6. Glutamin (Sigma, G7513)
7. Sodyum pirüvat (Sigma, P5220)

4.1.4. Hücrelerde immünofloresan işaretleme

4.1.4.1. Hücre pasajlama

1. PBS (Lonza, 17-516F)
2. Tripsin EDTA (Hyclone, SV30037.01)
3. DMEM Ham's F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) (Sigma, D8437)
4. Santrifüj (Hettich)
5. Jelatin (Sigma, G1890)
6. Saf su (Lonza, BE51200)
7. 12 mm çaplı yuvarlak lamel (Electron Microscopy Sciences, 72195-12)
8. 24 kuyucuklu plate (Corning)

4.1.4.2. Fiksasyon

1. D-PBS (Sigma, D8662)
2. PFA (Sigma, 158127)
3. PBS (Sigma, P4417)
4. %2 NaN₃ (Azid) (Sigma, S2002)

4.1.4.3. İmmünofloresan işaretleme

1. Yıkama çözeltisi:

- PBS (Sigma, P4417)
- %0.1 PBST (Triton X-100 (Sigma, X-100), PBS (Sigma, P4417) 0.1:100)

2. Geçirgenlik çözeltisi

- %0.3 PBST (Triton X-100 (Sigma, X-100), PBS (Sigma, P4417) 0.3:100)

3. Bloklama çözeltisi (BSA-PBST)

- 1:1 PBS (Sigma, P4417)
- %1 BSA (Bovine serum Albumin) (Sigma, A2153)
- %0.25 Triton X-100 (Sigma, X100)
- %2 Goat Serum (Sigma, G9023)

4. Primer antikorlar:

- Poliklonal anti-Oct-4 tavşan IgG (abcam, ab137427), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
- Poliklonal anti-Sox2 tavşan IgG (abcam, ab97959), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
- Poliklonal anti-Nanog tavşan IgG (abcam, ab80892), PBS (Sigma, P4417) 1:100 seyreltme
- Poliklonal anti-DDX4/VASA tavşan IgG (abcam, ab13840), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme
- Poliklonal anti-DAZL tavşan IgG (abcam, ab34139), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme

5. Sekonder antikor: Alexa Fluor® 488 keçi anti-tavşan IgG (Invitrogen, A11034), PBS (Sigma, P4417) 0.5:100 seyreltme

6. İnkübatör (Shellab, 2123)

4.1.4.4. Görüntüleme

1. Kapatma medyumu: ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, P36931)

2. Lam (Citoglass)

3. Floresan mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

4.1.5. Hücrelerin HE yöntemiyle boyanması

1. Fiksasyon

- D-PBS (Sigma, D8662)
- %4 PFA (Sigma, 158127)
- PBS (Sigma, D8662)
- %2 NaN₃ (Sigma, S2002)

2. Boyama

- %100 alkol
- %96 alkol
- %75 alkol
- Hematoksilin boyası (Sigma, H9627)
- PBS (Sigma, P4417)
- Eozin boyası (Sigma, E6003)
- Entellan (Merck, 107961)
- Lam (Citoglass)
- Lamel (Citoglass)
- Işık mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 451485)

4.1.6. Gen ifade analizi

4.1.6.1. RNA izolasyonu

1. Doku öğütücü (1 ml Tissue Grinders, Tenbroeck, Wheaton, 357421)
2. TRIzol (Invitrogen, 15596-026)
3. Kloroform (Sigma, C2432)
4. Soğutmalı santrifüj (Thermo IEC, Microlite RF)
5. İsopropanol (Sigma, I9516)
6. Glikojen (Roche, 10901393001)
7. Steril su (Lonza, BE51200) ile %70 olarak seyreltilmiş saf etanol (Sigma, 32221)
8. % 0.1 DEPC (Sigma, D5758)
9. 1.5 ml RNase/DNase free falkon tüpleri (Axygen, MCT-150-C)

4.1.6.2. RNA'ların kalite kontrolü

1. Nanodrop[®] ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA)
2. Agaroz (Sigma, A9539)
3. Stok (5x) TBE (Trizma Base EDTA) tamponu
 - 54 gr trizma base (Sigma, T1503)
 - 27.5 gr borik asit (Sigma, B6768)
 - 0.5 M EDTA 20 ml (Sigma, E5134)
 - 1 Litre çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
4. Etidyum bromür
5. Jel yükleme boyası (Biolab, B7021)
6. DNA ladder 100 bp (Biolab, N3231)
7. Elektroforez güç kaynağı (ATTO, myPower 300, AE8130)
8. Elektroforez tankı (Thermo, Minicell Primo Horizontal Gel System, EC320)
9. Görüntüleme (Gene Genius Bioimaging System, SYDR2-1352)

4.1.6.3. cDNA sentezi

1. 1 µg total RNA
2. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 4897030001)
3. Steril su (Lonza, BE51200)
4. Thermal Gradient Cyclers (Bio-Rad, ALS1296)
5. 0.2 ml PCR tüpleri (Sarstedt, 72.737.002)

4.1.6.4. RT-PCR

1. cDNA
2. Primer (Integrated DNA Technologies)
3. Taq DNA Polymerase, dNTPack (Roche, 4728874)
4. Thermal Gradient Cyclers (Bio-Rad, ALS1296)
5. 0.2 ml PCR tüpleri (Sarstedt, 72.737.002)

4.1.6.5. qRT-PCR (Kantitatif Real Time-PCR)

1. cDNA
2. Primer (Integrated DNA Technologies)
3. LightCycler® 480 SYBR Green I Master 2x (Roche, 4707516001)
4. LightCycler® 480 Multiwell plate 384 (Roche, 4729749)
5. Soğutmalı santrifüj (Beckman Coulter, Allegra X-15R, 392934)
6. Real Time-PCR cihazı (LightCycler® 480/384, Roche, İsviçre)

4.1.7. İmmünooblama (Western Blot)

4.1.7.1. Protein izolasyonu

1. Doku öğütücü (1 ml Tissue Grinders, Tenbroeck, Wheaton, 357421)
2. Complete Lysis-M (Roche, 04719956001)
3. Ultrasonik cihazı (Sonics & Materials, Vibra Cell, V 130)
4. Soğutmalı santrifüj (Thermo, MicroCL 17R)

4.1.7.2. Protein miktar tayini (Bradford Assey)

1. Bradford boyası (BioRad, 500-0205)
2. BSA (Sigma, A2153)
3. Orbital çalkalayıcı (FinePCR, SH30)
4. Spektrofotometri cihazı (BioRad, SmartSpec 3000)

4.1.7.3. SDS poliakriamid jel elektroforezi

1. Stok (10x) TBS (Tris-Buffered Saline) tamponu (PH 7.6)
 - 24.23 gr trizma base (Sigma, T1503)
 - 80.06 gr NaCl (Amresco, 0241)
 - 1 Litre çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
2. TBS-T (1x)

- 100 ml TBS (10x)
 - 2 ml (% 0.2) Tween-20 (Sigma, P9416)
 - 900 ml çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
3. Hücre ve doku örneklerinden izole edilen total protein
 4. Yükleme tamponu
 - Novex® Tris-Glycine SDS Sample Buffer (2x) (Invitrogen, LC2676)
 - DTT (Dithiothreitol) 1M
 5. Protein ladder 10-230 KD (BioLabs, P7711)
 6. Kuru blok ısıtıcı (Major Science, MD-02N)
 7. Soğutmalı santrifüj (Thermo, MicroCL 17R)
 8. Yürütme tamponu
 - 50 ml Novex® Tris-Glycine SDS Running Buffer (10x) (Invitrogen, LC2675)
 - 450 ml çift distile su (Millipore, ZMQS5V001)
 9. SDS poliakriamid elektroforez jeli (Novex® 4-20% Tris-Glycine Mini Protein Gels, 1.0 mm, 10 well, Invitrogen, EC6025BOX)
 10. Elektroforez tankı (XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System)
 11. Elektroforez güç kaynağı (ATTO, myPower 300, AE8130)

4.1.7.4. Protein transferi

1. iBlot® Transfer Stack, PVDF, regular size (Invitrogen, IB401001)
 - iBlot® Anode Stack
 - iBlot® Filter Paper
 - iBlot® Cathode Stack
 - iBlot® Disposable Sponge
2. iBlot Dry Blotting System (Invitrogen)

4.1.7.5. Membrandaki proteinlerin immünolojik olarak tespiti

1. Bloklama çözeltisi (BSA-TBS-T)
 - 5 gr (%5) BAS (Sigma, A2153)
 - 100 ml TBS-T

2. Orbital çalkalayıcı (FinePCR, SH30)

3. Primer antikolar

- Poliklonal anti-Oct-4 tavşan IgG (abcam, ab137427), BSA-TBS-T, 1:500 seyreltme
- Poliklonal anti-Sox2 tavşan IgG (abcam, ab97959), BSA-TBS-T, 3 µg/ml
- Poliklonal anti-Nanog tavşan IgG (abcam, ab80892), BSA-TBS-T, 1:250 seyreltme
- Poliklonal anti-DDX4/VASA tavşan IgG (abcam, ab13840), BSA-TBS-T, 2 µg/ml
- Poliklonal anti-DAZL tavşan IgG (abcam, ab34139), BSA-TBS-T, 2 µg/ml

4. TBS-T

5. Sekonder antikor: Keçi anti-tavşan IgG-HRP konjuge (BioRad, 1706515), BSA-TBS-T, 1:10000 seyreltme

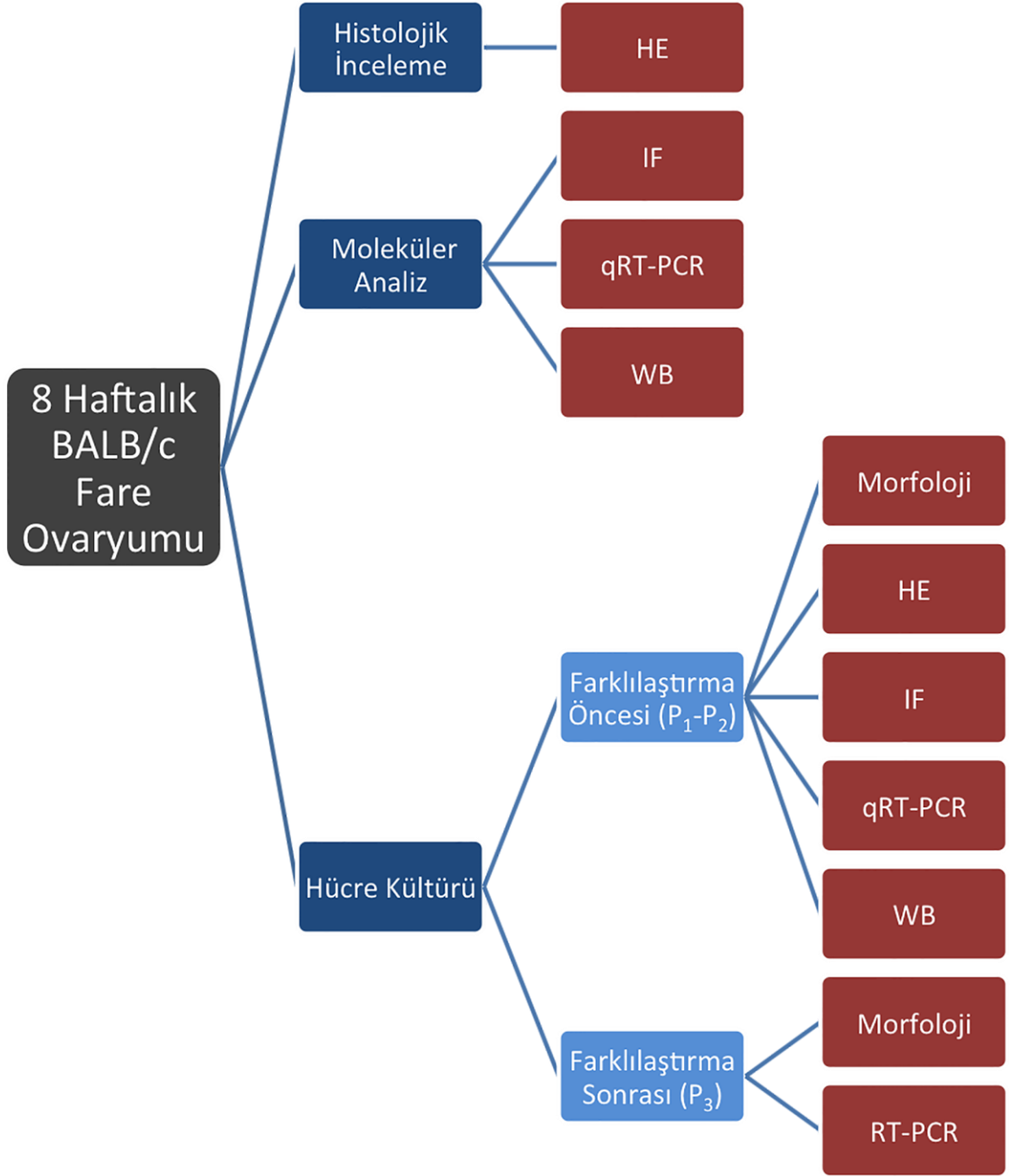
6. ECL veya Enhanced Chemiluminescence (LumiGLO[®] Reagent and Peroxide 20X, CellSignaling, 7003)

7. Referans kontrol: Anti-beta aktin-HRP konjuge (abcam, ab49900), BSA-TBS-T, 1:50000 seyreltme

8. Görüntüleme cihazı (Kodak Image Station, 4000MM)

4.2. Yöntem

Çalışmada kullanılan yöntemler toplu olarak Şekil 4.2.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 4.2.1. Çalışmada kullanılan yöntemler

4.2.1. Farelerden ovaryum alma işlemi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvan Laboratuvarında servikal dislokasyon (boyun kırma) yöntemi ile farelere ötenazi uygulanarak ovaryumları çıkarıldı.

4.2.2. Dokuların histolojik incelenmesi

4.2.2.1. Histolojik takip

1. Dokuların tespit edilmesi: Ovaryumlar fareden alındıktan sonra 24 saat Bouin solüsyonunda tespit edildi.
2. Dehidratasyon
 - a) 30 dk. %50 alkol
 - b) 1 saat %70 alkol + 3 damla doymuş lityum karbonat çözeltisi
 - c) 1 saat %80 alkol
 - d) 24 saat %95 alkol
 - e) 1 saat %100 alkol
3. Şeffaflandırma: Ksilen, 15 dk.
4. İnfiltrasyon (Emdirme)
 - a) Ksilen + parafin: 30 dk. 60°C
 - b) Parafin: 2 saat, 60°C
5. Gömme: Ovaryumlar parafine gömüldü

4.2.2.2. Dokuların Hematoksilin Eozin (HE) yöntemiyle boyanması

1. Mikrotomla parafin bloklarına gömülü ovaryum dokusundan 3 µm kalınlığında kesitler alındı ve lam üzerine aktarıldı.
2. Doku kesitlerinin HE yöntemi ile boyanması
 - a) Lamlar 1 saat 60°C'de bekletildi.
 - b) Ksilen, 2 saat
 - c) %100 alkol
 - d) %96 alkol

- e) %75 alkol
- f) Su
- g) Hematoksilin, 2dk.
- h) Su
- i) Eozin, 2dk.
- j) Su
- k) %96 alkol
- l) %100 alkol
- m) Ksilen, 20dk.
- n) Kesitlerin üzeri entellan ve lamel ile kapatılıp görüntülendi.

4.2.3. Ovaryum dokusunun immünofloresan işaretlenmesi

1. Fiksasyon

- a) Ovaryum dokuları 24 saat %4 PFA'da fikse edildi.
- b) 1.2 M sükorz solüsyonunda 4°C'de 6 saat bekletildi.
- c) PBS ile yıkandı.

2. Dokulardan kesit alınma ve antikor ile işaretlenmesi.

- a) Dokular kriyomatriks içine gömüldü ve metal yüzey üzerinde -30°C'de donduruldu.
- b) Kriyomikrotomun çalışma sıcaklığı -20°C'ye ayarlandı ve poli-L-lizin kaplı lamalar üzerine 7µm kalınlığında doku kesitleri alındı.
- c) Kesitler 20 dk. oda ısısında bekletildi.
- d) Kesitler 10 dakika PBS'de bekletildi ve kriyomatriks uzaklaştırıldı.
- e) 10 dk. oda ısısında bekletildi.
- f) Kesitlerin çevresi PAP-Pen ile işaretlendi.
- g) Kesitler 20 dk. %0.5 PBST çözeltisinde bekletildi.
- h) Kesitler BSA-PBST çözeltisinde 30 dk. bekletildi.
- i) Kesitler 1.5 saat 37°C'de veya 4°C'de 24 saat primer antikor ile nemli ortamda inkübe edildi.
- j) Kesitler %0.2 PBST ile 3 x 5 dk. yıkandı.
- k) Kesitler oda ısısında 1 saat sekonder antikor ile nemli ortamda inkübe edildi.
- l) Kesitler %0.2 PBST ile 3 x 5 dk. yıkandı.

m) Kesitlerin üzerine 7 µl kapatma medyumunu damlatılıp lamel ile kapatıldıktan sonra tırnak cilası ile sabitlenip 24 saat sonra görüntü alındı.

4.2.4. Ovaryum hücre kültürü

4.2.4.1. Farklılaştırma öncesi hücre kültürü

1. Ovaryum farelerden alındıktan sonra PBS içine alındı ve stereomikroskop altında çevre dokulardan arındırıldı.
2. Ovaryumlar bistüri ile parçalandı.
3. Doku parçaları DMEM/F12, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin-amfotrisin B içeren kültür ortamına alınıp 37°C, %5 CO₂'de kültüre edildi.
4. Kültür ortamı her 2 günde bir değiştirildi.
5. Maternal oositler kültür kabına yapışmayarak yüzen hücreler halinde, medyumun değiştirilmesi ve pasajlama sonucu tamamen kültür ortamından uzaklaştırıldı.

4.2.4.2. Hücre kaldırma (pasajlama)

1. Kültür ortamı aspire edildi ve hücreler PBS ile yıkandı.
2. Hücrelerin üzerine tripsin-EDTA eklendi ve 3 dk. 37°C'de inkübe edildi.
3. Tripsin-EDTA FBS içeren medyumla inhibe edildi ve hücreler kalktıktan sonra falkona alınıp 500 g'de 5 dk. santrifüj edildi.
4. Supernatan (üst faz) aspire edildi ve oluşan hücre peleti (çökelti) üzerine kültür ortamı eklenip peletin iyice çözülmesine kadar pipetaj edildi.
5. Hücreler kültür ortamıyla birlikte yeni petri veya flasklara aktarılarak tekrar 37°C ve %5 CO₂'de kültüre edildi.

4.2.4.3. Oosite farklılaştırma

P₃ aşamasındaki hücreler 3 hafta süresince oosite farklılaştırma ortamına tabi tutuldu. Ovaryumdaki olası germline kök hücreleri oosit hücresine farklılaştırmak için kültür ortamına (DMEM/F12), %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin-amfotrisin B, 0.05 IU/ml

FSH, 50 ng/ml β -estradiol, 0.23 mM sodyum pirüvat ve 2 mM glutamin ilave edildi. Kültür ortamı 2 günde bir değiştirildi.

4.2.5. Hücrelerin immüno Floresan İşaretlenmesi

4.2.5.1. Hücrelerin Yuvarlak Lameller Üzerine Alınması

1. 24 kuyucuklu petri kaplarına yuvarlak lameller yerleştirildi.
2. Lameller PBS ile yıkandı ve %0.5 jelatin ile kaplandı.
3. Hücreler kaldırıldı (yöntem 4.2.4.2.) ve her kuyucuğa 0.5 ml medyumla birlikte ilave edilip 37°C ve %5 CO₂'de 5-10 gün kültür edildikten sonra tespit edildi.

4.2.5.2. Hücrelerin Tespit Edilmesi

1. Kültür ortamı aspire edilip hücreler D-PBS ile yıkandı.
2. Her kuyucuğa 0.5 ml %4 PFA eklenip 30 dk. oda ısısında bekletildi.
3. Hücreler PBS ile yıkandı ve her kuyucuğa 1 ml %0.02 PBS-Azid eklenip boyama aşamasına kadar 4°C'de saklandı.

4.2.5.3. Hücrelerin Antikorla İşaretlenmesi

1. Yuvarlak lamel kuyucuktan alınıp PBS ile yıkandı.
2. Hücreler 20 dk. %0.3 PBST çözeltisinde bekletildi.
3. Hücreler BSA-PBST çözeltisinde 30 dk. bekletildi.
4. Lameller 20 μ l primer antikorla nemli ortamda 37°C'de 1.5 saat inkübe edildi. Kontrol grubu olarak primer antikor yerine PBS kullanıldı.
5. Lameller %0.1 PBST ile yıkandı ve 20 μ l sekonder antikorla nemli ve karanlık ortamda 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
6. Lameller %0.1 PBST ile yıkandı ve lama damlatılan 7 μ l kapatama medyumunu üzerine kapatıldıktan sonra tırnak cilası ile sabitlenip 24 saat sonra görüntü alındı.

4.2.6. Hücrelerin HE yöntemiyle boyanması

1. Hücrelerin tespit edilmesi

- a) Kültür ortamı aspire edilip hücreler D-PBS ile yıkandı.
- b) Her kuyucuğa 0.5 ml %4 PFA eklenip 30 dk. oda ısısında bekletildi.
- c) Hücreler PBS ile yıkandı ve her kuyucuğa 1 ml %0.02 PBS-Azid eklenip boyama aşamasına kadar 4°C'de saklandı.

2. Hücrelerin boyanması

Hücrelerin boyama işlemi kuyucuk içinde yapıldı ve her aşamada alttaki çözeltilerden 0.5 ml kullanıldı.

- a) PBS, 2x10 sn.
- b) %100 alkol, 10 sn.
- c) %96 alkol, 10 sn.
- d) %75 alkol, 10 sn.
- e) PBS, 20 sn.
- f) Hematoksinin, 30 sn.
- g) PBS, 3x5 sn.
- h) Eozin, 1 dk.
- i) PBS, 3x5 sn.
- j) Entellan ile kapatma
- k) Görüntüleme

4.2.7. Gen ifade analizi

Gen ifade analizi için RT-PCR ve qRT-PCR yöntemleri kullanılmıştır. RT-PCR analiz yöntemi, hücre kültüründe farklılaştırma sonucu oluşan oosit ve blastosist benzeri hücrelerde 3 biyolojik tekrar kullanılarak gerçekleştirildi. qRT-PCR yöntemi ise, ovaryum dokusu ve farklılaştırma öncesi hücre kültüründe (P₁) olası germline ve pluripotent kök hücrelerdeki belirli genlerin ifadesini analiz etmek için kullanıldı. qRT-PCR analiz yöntemi her iki grupta (ovaryum dokusu ve hücre kültürü) 6 biyolojik tekrar ve 3 teknik tekrarla gerçekleştirildi.

Ovaryum dokusu farelerden alındıktan sonra soğuk PBS içine alındı ve stereomikroskop altında çevre dokulardan arındırıldı. Her farenin iki ovaryumu falkon tüpe alınarak üzerine 1 ml TRIzol eklendi ve sıvı azot içinde hızlı şekilde dondurularak analiz aşamasına kadar -80°C'de saklandı. Hücre kültüründen elde edilen hücreler ise 1 ml TRIzol ile kaldırılıp falkon tüpüne alındılar ve sıvı azot içinde hızlı şekilde dondurularak analiz aşamasına kadar -80°C'de saklandı.

4.2.7.1. RNA izolasyonu

1. 1 ml TRIzol'de, ovaryum dokusu doku öğütücü ile parçalanıp birkaç kere enjektörden geçirilerek homojenize edildi ve hücre kültüründen elde edilen hücreler ise pipetaj ve enjektör kullanarak homojenize edildi. Hücreler ve dokular TRIzol içinde homojenize edildikten sonra oda ısısında 5 dk. bekletildi.
2. TRIzol üzerine 200 µl soğuk kloroform eklenip çalkalandı ve 5 dk. oda ısısında bekletildi.
3. 12000 g'de 20 dk. 4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası en üst fazda oluşan RNA (şeffaf tabaka) 1 ml pipet ile toplanıp yeni tüpe (1.5 ml falkon tüp) aktarıldı.
5. Toplanan RNA tabakası üzerine 500 µl izopropanol ve 2 µl glikojen eklenip çalkalandı ve 10 dk. oda ısısında bekletildi.
6. 12000 g'de 15 dk. 4°C'de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası supernatan dikkatli bir şekilde döküldü. Çökelti üzerine 1 ml %0.1 DEPC içeren %70 etanol eklenip vorteks yapıldı.
8. RNA'nın degrade olmasını önlemek için düşük hızda (7500 g) 10 dk. 4°C'de santrifüj edildi.
9. Santrifüj sonrası %70 etanol döküldü ve tüplerin kapakları açık bırakılarak RNA çökeltisi biraz kurutuldu.
10. Çökelti miktarına bağlı olarak 20-50 µl RNaz içermeyen su (%0.1 DEPC'li su) eklendi.
11. İzole edilen total RNA kantitatif olarak (ng/µl) Nanodrop cihazı ile ölçüldü.
12. RNA'lar -80°C'de saklandı.

4.2.7.2. RNA'ların kalite kontrolü

İzole edilen RNA'lar kalite açısından (28s, 18s ve 5s bantları) değerlendirilmek üzere %1.2 agaroz jel elektroforezinde, 90 V'ta 30 dk. yürütüldü.

4.2.7.3. cDNA sentezi

cDNA sentezi için, Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit kullanıldı. Kalıp olarak 1 µg RNA kullanıldı ve 50 pmol/µl Anchored-oligo[dT]₁₈ primerinden 1 µl alınarak çift distile su ile 13 µl'ye tamamlanarak 65°C'de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak, ayrı bir tüpte hazırlanan 7 µl revers transkripsiyon karışımı tüplere eklenerek son hacim 20 µl'ye tamamlandı (Çizelge 4.2.7.3.1.).

Çizelge 4.2.7.3.1. cDNA reaksiyonu

Madde	Miktar	Konsantrasyon
cDNA sentezi (1 reaksiyon için)		
Kalıp-primer karışımı	13 µl	
Revers transkripsiyon karışımı		
Trankriptör revers transkriptaz tamponu (5x)	4 µl	1 x 8 mM MgCl ₂
Koruyucu RNaz inhibitörü (40U/µl)	0.5 µl	20 U
dNTP karışımı (her biri için 10 mM)	2 µl	1 mM (her biri)
Revers transkriptaz	0.5 µl	10 U
Son hacim	20 µl	

cDNA sentezi aşağıdaki koşullarda PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. cDNA örnekleri daha verimli kullanılması amacıyla 100 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA + 80 µl çift distile su = 100 µl) ve -20°C'de saklandı.

- 55°C'de 30 dk.
- 85°C'de 5 dk.

4.2.7.4. RT-PCR

Elde edilen cDNA'lardan, Taq DNA Polymerase dNTPack kitinin protokolünü (Çizelge 4.2.7.4.1.) takip ederek RT-PCR yapıldı. RT-PCR'da kullanılan primerlerin dizileri ve ürün boyutları Çizelge 4.2.7.4.2'de verilmiştir

Çizelge 4.2.7.4.1. RT-PCR reaksiyonu

Madde	Miktar	Konsantrasyon
PCR suyu	4.6 µl	
PCR reaksiyon tamponu (10x)	1 µl	1 x 1.5mM MgCl ₂
Primer (10 pmol/µl)	2 µl	2 µM
cDNA	2 µl	20 ng
dNTP	0.2 µl	200 µM (her dNTP)
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.2 µl	500 U/reaksiyon
Toplam	10 µl	

Çizelge 4.2.7.4.2. RT-PCR'da kullanılan primer çiftleri

Gen ismi [mus musculus]	Primer dizisi	bç	Ürün bç
NCBI Ref Seq			
NOBOX oogenesis homeobox (Nobox)	F: GAATCATGGTGTGGTTTCAG	20	146
NM_130869.3	R: AGGCATAGGGTCTAGGAG	18	
Zona pellucida glycoprotein 2 (ZP2)	F: TCCTACAAACATACCCAGACC	21	222
NM_011775.6	R: GTTCATATTCACAGCCATCCA	21	
Zona pellucida glycoprotein 3 (ZP3)	F: CACCTTCCTACTCCACGAC	19	208
NM_011776.1	R: CACCTTCCTACTCCACGAC	21	
POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1, Oct-4), NM_013633.3	F: AGAAGGATGTGGTTCGAGTATGGT	24	204
	R: AAGGGACTGAGTAGAGTGTGGTG	23	
SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2), NM_011443.3	F: AGTGGTACGTTAGGCGCTTC	20	206
	R: CCCAGCAAGAACCCTTTCCT	20	
Nanog homeobox (Nanog), NM_028016.3	F: TGAGCTATAAGCAGGTTAAGAC	22	139
	R: CAATGGATGCTGGGATACTC	20	

Revers transkripsiyon Çizelge 4.2.7.4.3'teki koşullarda PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Oluşan RT-PCR ürünleri değerlendirilmek üzere %2 agaroz jel elektroforezinde, 90 V'ta 30 dk. yürütüldü.

Çizelge 4.2.7.4.3. RT-PCR programları

	NOBOX, ZP3	Oct-4, Nanog, Sox2, ZP2
İlk denatürasyon	94°C'de 2 dk.	94°C'de 2 dk.
Denatürasyon	94°C'de 30 sn.	94°C'de 30 sn.
Amplifikasyon	58°C 'de 30 sn.	60°C 'de 30 sn.
35 döngü	72°C'de 45 sn.	72°C'de 45 sn.
Son uzama	72°C'de 5 dk.	72°C'de 5 dk.

4.2.7.5. qRT-PCR (Kantitatif Real Time-PCR)

Ovaryum dokusu ve hücre kültüründen elde edilen hücrelerde SYBR green tekniği kullanılarak, qRT-PCR yöntemi ile gen ifade analizi yapıldı. Deneysel hataları ve farkları azaltmaktır amacıyla deneylerde tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Normalizasyon amacıyla, seçilen zaman noktalarında ifade olan housekeeping gen (HPRT) miktarı, doku ve hücre kültüründen elde edilen hücrelerde ifade düzeyleri karşılaştırılarak incelendi. Kullanılan primer çiftleri Çizelge 4.2.7.5.1'de verilmiştir. 20 µl qRT-PCR reaksiyonu LightCycler 480[®] cihazında Çizelge 4.2.7.5.2'deki koşullarda ve Çizelge 4.2.7.5.3'deki programla kuruldu.

Çizelge 4.2.7.5.1. qRT-PCR'da kullanılan primer çiftleri

Gen ismi [mus musculus] NCBI Ref Seq	Primer dizisi	bç	Ürün bç
POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1, Oct-4), NM_013633.3	F: AGAAGGATGTGGTTCGAGTATGGT	24	204
	R: AAGGGACTGAGTAGAGTGTGGTG	23	
SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2), NM_011443.3	F: AGTGGTACGTTAGGCGCTTC	20	206
	R: CCCAGCAAGAACCCTTTCCT	20	
Nanog homeobox (Nanog), NM_028016.3	F: TGAGCTATAAGCAGGTTAAGAC	22	139
	R: CAATGGATGCTGGGATACTC	20	
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), NM_010029.2	F: AGGCAGAAATACTCAAACCTCAC	23	203
	R: AGACTCGCCAATATCTCTGCT	21	
Deleted in azoospermia-like (DAZL), NM_010021.5	F: TATAACTACCAGATGCCACC	20	229
	R: CAGGGTTAAACAGACAAGAG	20	
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), NM_013556.2	F: AAAGGACCTCTCGAAGTG	18	121
	R: CAAACGTGATTCAAATCCC	19	

Çizelge 4.2.7.5.2. qRT-PCR koşulları

SYBR Green karışımı (2x)	10 µl
Forward ve revers primer karışımı (10 pmol/µl)	2 µl
cDNA	5 µl
PCR suyu	3 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 4.2.7.5.3. qRT-PCR programı

	DDX4	Sox2, DAZL	Oct-4, Nanog
Denatürasyon	95°C'de 5 dk.	95°C'de 5 dk.	95°C'de 5 dk.
Amplifikasyon 45 döngü	95°C'de 10 sn.	95°C'de 10 sn.	95°C'de 10 sn.
	58°C'de 20 sn.	60°C'de 20 sn.	63°C'de 20 sn.
	72°C'de 10 sn.	72°C'de 10 sn.	72°C'de 10 sn.

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, qRT-PCR sonuçları Roche LightCycler 480® v1.5.0.39 yazılımı ile kantite edilmiş. Oct-4, Nanog, Sox2, DDX4 ve DAZL genlerinin verileri HPRT geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden çıkan verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism v6.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.2.8. İmmünoablottama (Western Blot)

Ovaryum dokusu farelerden alındıktan sonra soğuk PBS içine alındı ve stereomikroskop altında çevre dokulardan arındırıldı. Her farenin iki ovaryumu falkon tüpe alınarak sıvı azot içinde hızlı şekilde dondurularak analiz aşamasına kadar -80°C'de saklandı. Farklılaştırma öncesi (P₁) hücre kültüründen elde edilen hücreler ise 1 ml soğuk PBS ile kaldırarak falkon tüpüne alınıp 13000 g'de 3 dk. 4°C'de santrifüj edildiler. Santrifüj sonrası PBS hücre çökeltisi üzerinden alınarak hücreler sıvı azot içinde hızlı şekilde dondurulup analiz aşamasına kadar -80°C'de saklandı. İmmünoablottama analizi her iki grupta (ovaryum dokusu ve hücre kültürü) 3 biyolojik tekrarlar gerçekleştirildi.

4.2.8.1. Protein izolasyonu

1. Roche Lysis M kullanarak ovaryum dokusu, doku öğütücü ile parçalandı ve hücre kültüründen elde edilen hücreler ise pipetaj ve enjektör kullanarak homojenize edildi.
2. Doku ve hücreleri daha iyi parçalamak amacıyla sonikasyon yöntemi kullanıldı ve 5 dk. oda ısısında bekletildi.
3. Roche Lysis M içerisinde homojenize olan doku ve hücreler 14000 g'de 10 dk. 4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası supernatan dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarılarak -80°C'de saklandı.

4.2.8.2. Protein miktar tayini (Bradford Assey)

1. BSA stok solüsyonu 1 mg/ml olarak hazırlandı.
2. Referans olarak BSA stok solüsyonundan Çizelge 4.2.8.2.1.'de gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlar hazırlandı.
3. Protein içeren doku ve hücre lizatlarının supernatanlarından 5 µl tüplere konuldu ve üzerine 95 µl ddH₂O eklendi.
4. Tüm BSA referansları ve örneklerin üzerine 900 µl Bradford boyası (1x) eklendi ve 5 dk. oda ısısında bekletildi.
5. Spektrofotometri cihazında, örnekler ve referansların protein miktarı OD₅₉₅ nm'de ölçüldü.

Çizelge 4.2.8.2.1. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA referansları

BSA konsantrasyonu (µg/ml)	Stok BSA'dan eklenen miktar (µl)	Eklenen su miktarı (µl)
0.5	0.5	99.5
1	1	99
2.5	2.5	97.5
5	5	95
10	10	90
20	20	80

4.2.8.3. SDS poliakriamid jel elektroforezi

1. Jele yükleme aşamasında her örnek için 40 µg/µl protein kullanılmıştır.
2. Örnek yükleme tamponunu ve proteinler her örnek için eşit olarak 0.5 ml falkon tüplere dağıtılıp 85 °C’de 2 dk. denatürasyon yapıldı. Belirteç de (protein ladder) örnekler ile birlikte 85 °C’de 3 dk. denatüre edildi.
3. Denatürasyon sonrası örnekler ve belirteç buz üstüne aktarıldı ve örnekler 14000 g’de 2 dk. 4°C’de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası belirteç ve örnekler jele yüklenip 120 V’ta 90 dk. yürütülerek proteinlerin ayrıştırılması sağlandı.

4.2.8.4. Protein transferi

Protein transferi kuru transfer sistemi olan iBlot Dry Blotting System cihazı kullanılarak firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi.

1. iBlot cihazı açılıp anot bölümü alta gelecek şekilde cihazın hazinesine yerleştirilip hava kabarcığı oluşumu engellendi.
2. Yürütülen jel anot bölümünün üstüne yerleştirilip üzerine otoklavlanmış çift distile suda ıslatılan iBlot filtre kağıdı konuldu. Daha sonra cihazla gelen silindir kullanılarak oluşabilen hava kabarcıkları giderildi.
3. Filtre kağıdının üzerine katot bölümü yerleştirilerek tekrar silindir ile hava kabarcıkları giderildi.
4. Son aşamada cihaz kapağının iç kısmına ilgili sünger takılarak cihaz program 3’te 7 dk. çalıştırıldı. 7 dk. sonra proteinlerin jelden membrana geçişleri sağlandı.

4.2.8.5. Membrandaki proteinlerin immünolojik olarak tespiti

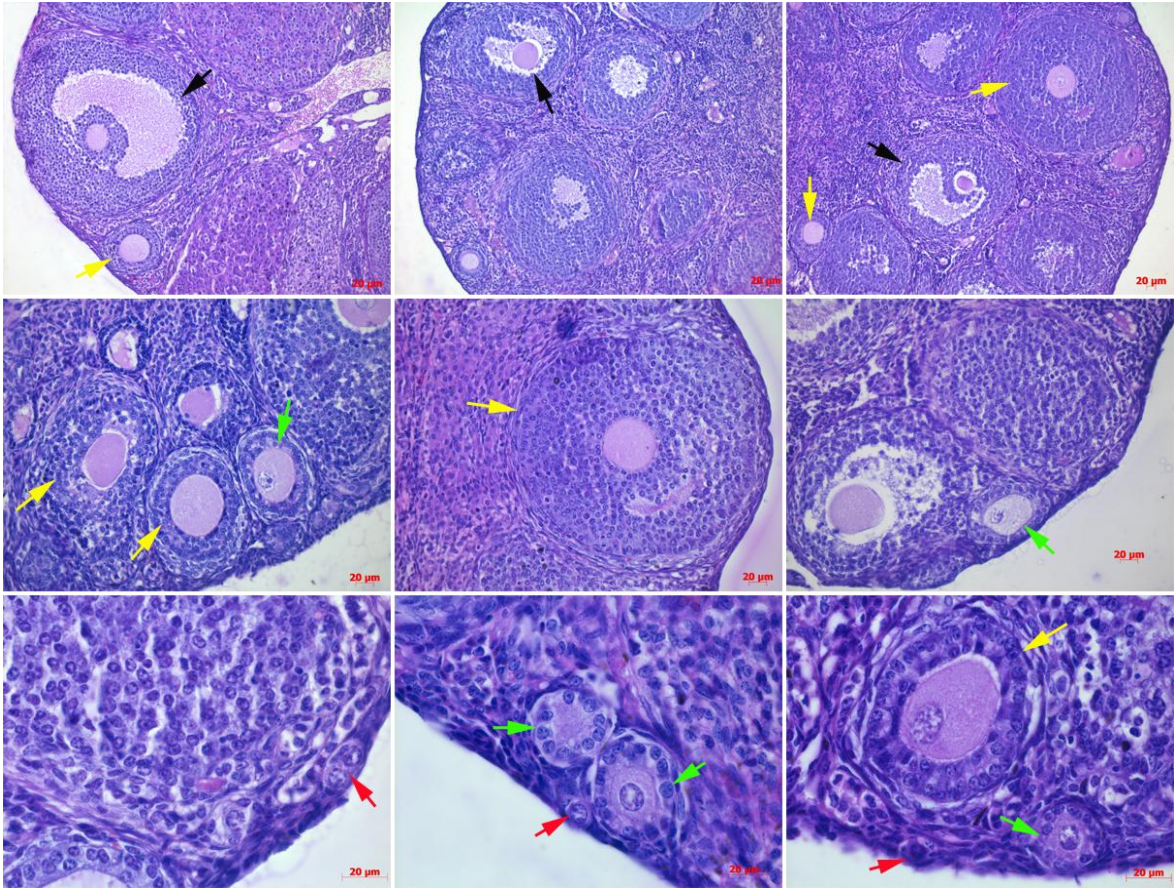
1. Proteinler membrana aktarıldıktan sonra 1.5 saat bloklama solüsyonunda (BSA-TBS-T) çalkalanarak inkübe edildi.
2. Bloklama sonrası membran üzerine primer antikor eklendi ve gece boyu 4°C’de çalkalanarak inkübe edildi.
3. Membran TBS-T ile 4 x 5 dk. yıkandı.

4. Membran üzerine sekonder antikor eklendi ve 1.5 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi.
5. Membran TBS-T ile 4 x 5 dk. yıkandı.
6. Membran üzerine ECL solüsyonu eklenip 1 dk. sonra Kodak cihazı ile görüntü alındı.
7. Görüntü alındıktan sonra membran TBS-T ile 3 x 10 dk. yıkandı.
8. Daha sonra membran 1 saat bloklama solüsyonunda çalkalanarak inkübe edildi.
9. Membran üzerine HRP konjüge aktin primeri eklendi ve 1 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edildi.
10. Membran TBS-T ile 4 x 5 dk. yıkandı.
11. Membran üzerine ECL solüsyonu eklenip 1 dk. sonra Kodak cihazı ile görüntü alındı.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. Ovaryum Dokusunun Histolojik İncelenmesi

Ovaryumlar HE yöntemleriyle boyandıktan sonra morfolojik olarak incelendi. Ovaryum yüzey epitel hücreleri, korteks bölgesindeki primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin normal olduğu izlendi (Şekil 5.1.1.).



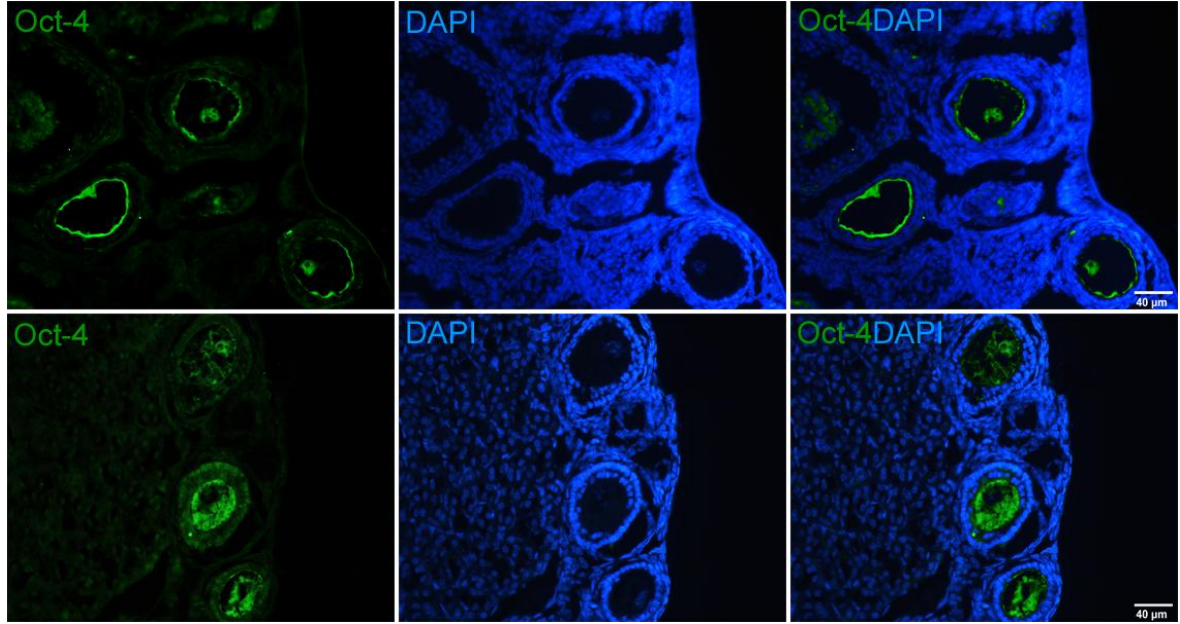
Şekil 5.1.1. Fare ovaryum dokusunda farklı aşamalarındaki foliküller. Kırmızı ok: Primordiyal folikül, Yeşil ok: Primer folikül, Sarı ok: Çok katlı primer ve sekonder folikül, Siyah ok: Graaf folikül

5.2. Ovaryum Dokusunda Pluripotent Kök Hücrelerin İmmü Floresan İşaretlenmesi

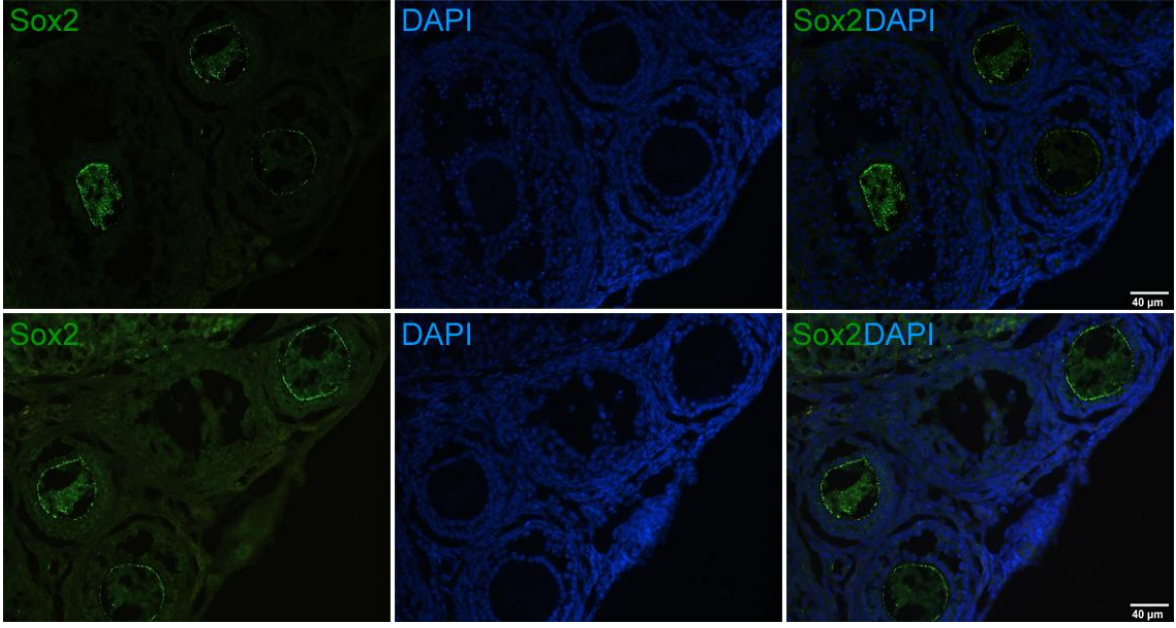
Ovaryum dokusunda immü floresan boyama sonucu Oct-4, Sox2 ve Nanog proteinlerinin sadece oositte ifade olduğu tespit edildi. Bu proteinlerin oosit sitoplazması ve çekirdeğindeki ifade profili ve farklı gelişme aşamasındaki foliküllerde ifade dağılımı Çizelge 5.2.1 ve Şekil 5.2.1., 5.2.2. ve 5.2.3.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.2.1. Ovaryum dokusunda Oct-4, Sox2 ve Nanog proteinlerinin ifade profili. **Ç:** çekirdek, **S:** sitoplazma, **F:** folikül, **H:** hücre. ++ yüksek ifade, + ifade edilmiş, - ifade yok

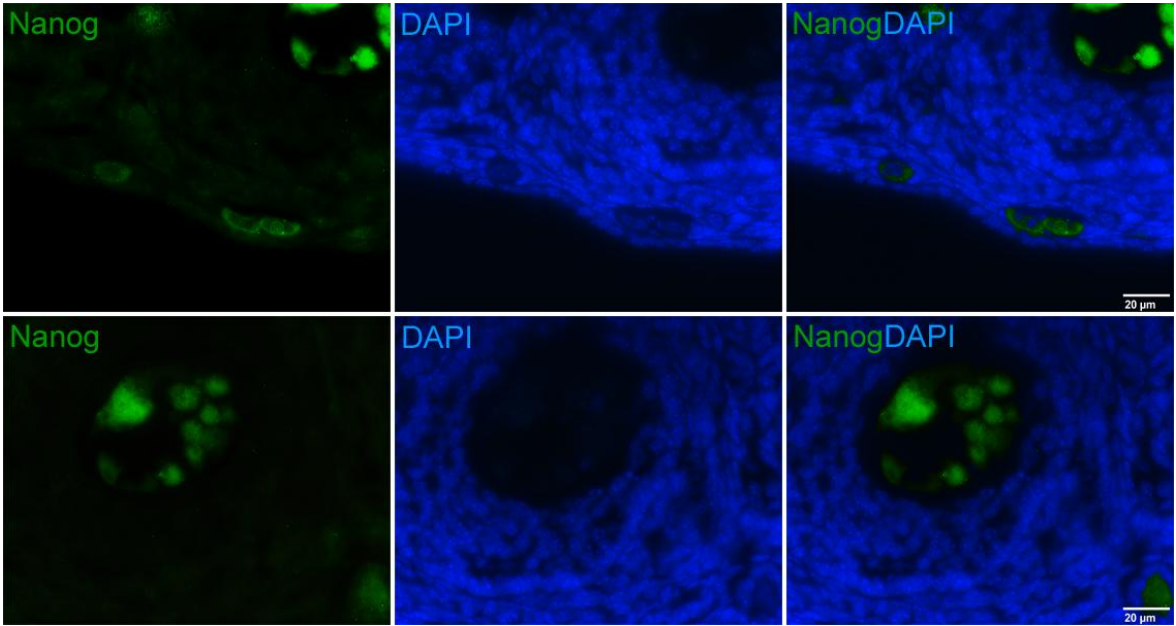
İfade Profili	Oosit Ç.	Oosit S.	Primordiyal F.	Primer F.	Sekonder F.	Graaf F.	Granüloza H.	Stromal H.	Epitel H.
Oct-4	+	++	+	+	+	+	-	-	-
Sox2	+	++	+	+	+	+	-	-	-
Nanog	+	++	++	+	+	+	-	-	-



Şekil 5.2.1. Ovaryum dokusunda Oct-4 proteinin ifadesi



Şekil 5.2.2. Ovaryum dokusunda Sox2 proteinin ifadesi



Şekil 5.2.3. Ovaryum dokusunda Nanog proteinin ifadesi

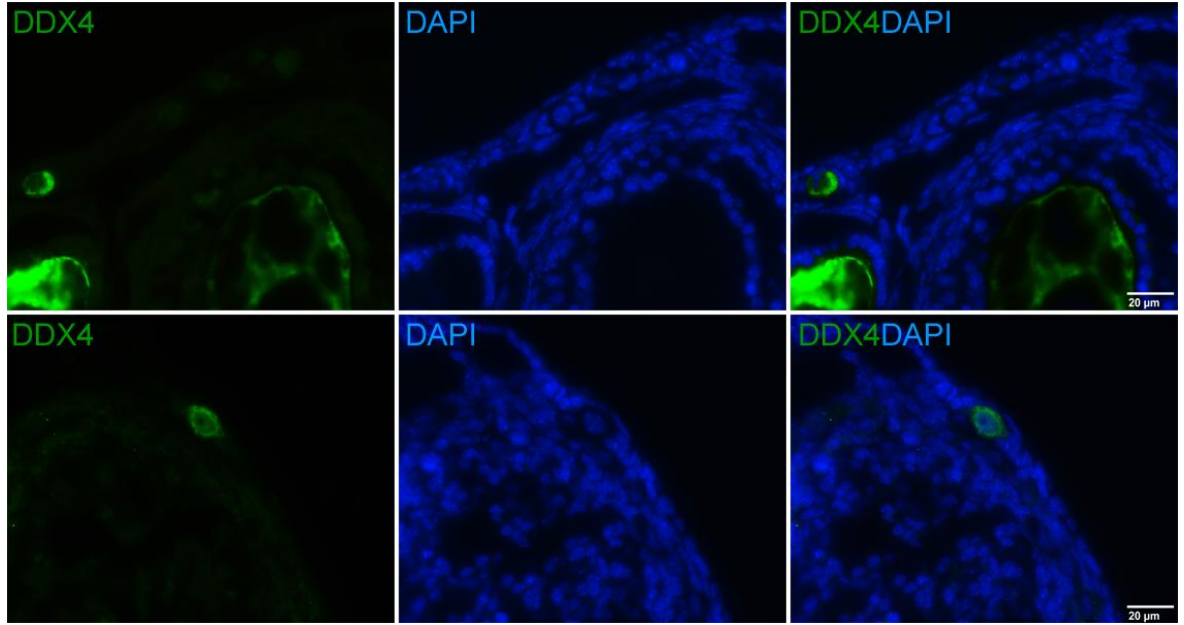
5.3. Ovaryum Dokusunda Germline Kök Hücrelerin İmmünfloresan İşaretlenmesi

Ovaryum dokusunda immünfloresan boyama sonucu DDX4 ve DAZL proteinlerinin sadece oositte ifade edildiği tespit edildi. Bu proteinlerin oosit sitoplazması ve

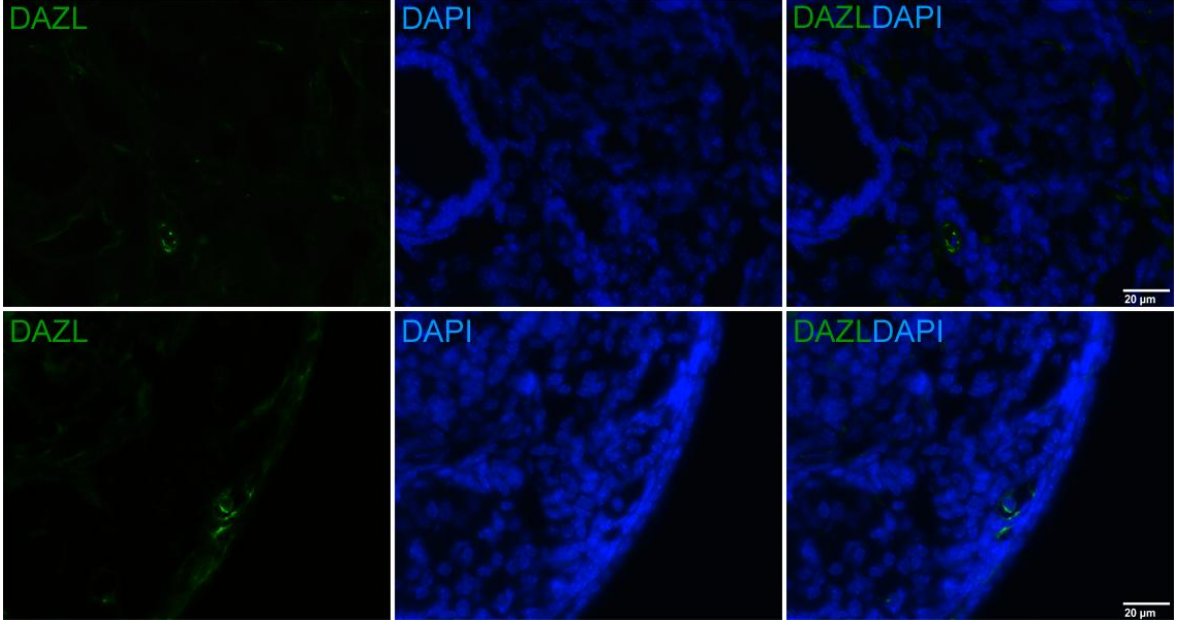
çekirdeğindeki ifade profili ve farklı gelişme aşamasındaki foliküllerde ifade dağılımı Çizelge 5.3.1 ve Şekil 5.3.1. ve 5.3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.3.1. Ovaryum dokusunda DDX4 ve DAZL proteinlerinin ifade profili. **Ç:** çekirdek, **S:** sitoplazma, **F:** folikül, **H:** hücre. ++ yüksek ifade, + ifade edilmiş, +/- zayıf ifade, - ifade yok

İfade Profili	Oosit Ç.	Oosit S.	Primordiyal F.	Primer F.	Sekonder F.	Graaf F.	Granüloza H.	Stromal H.	Epitel H.
DDX4	+/-	+	++	+	+/-	+/-	-	-	-
DAZL	-	+	+	-	-	-	-	-	-



Şekil 5.3.1. Ovaryum dokusunda DDX4 proteinin ifadesi

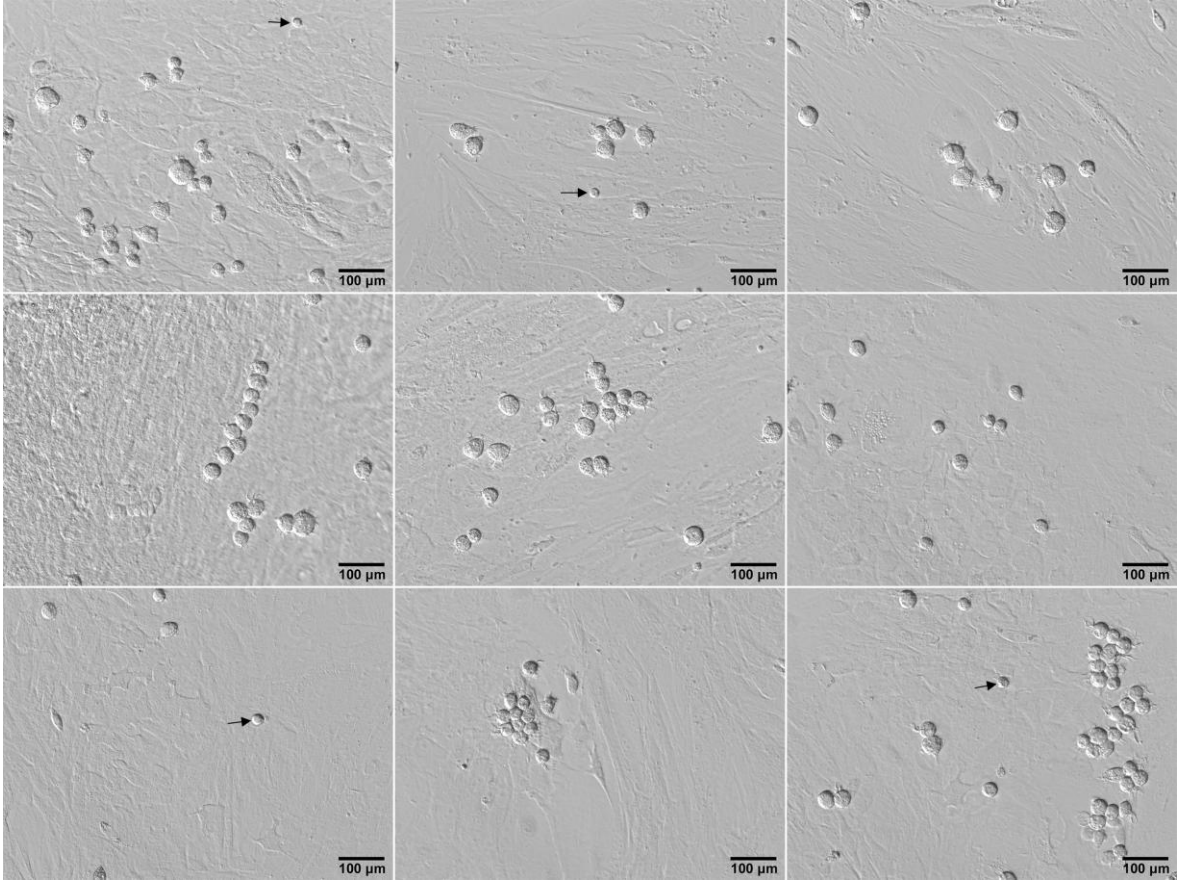


Şekil 5.3.2. Ovaryum dokusunda DAZL proteinin ifadesi

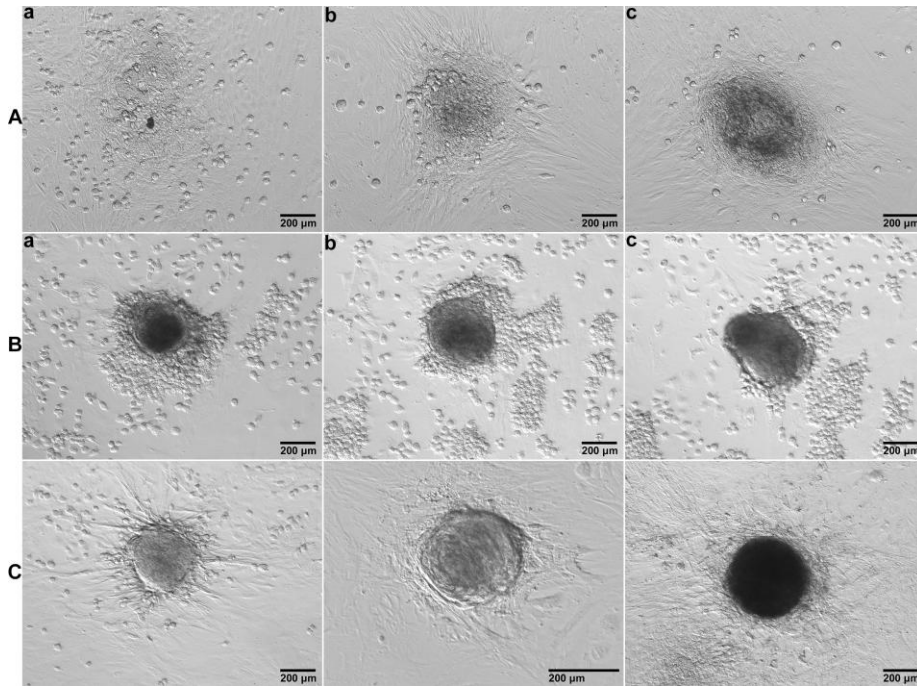
5.4. Ovaryum Hücre Kültürü

5.4.1. Oosite farklılaştırma öncesi hücre kültürü

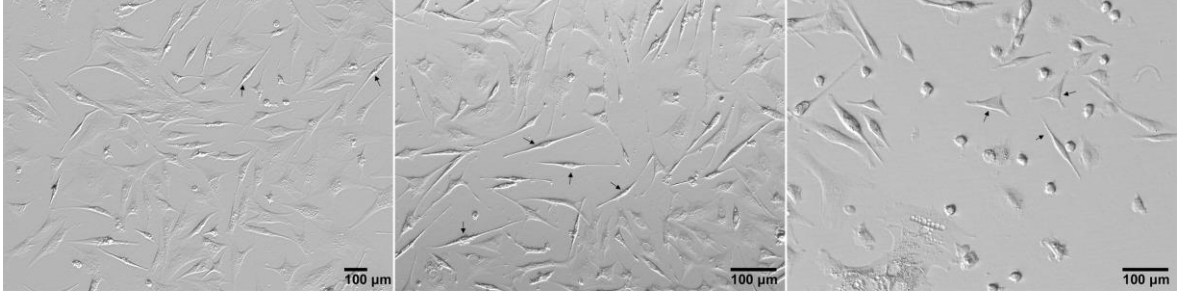
Ovaryumun hücre kültürününün P_1 ve P_2 aşamasında 5-50 μm çapında, olası germline ve pluripotent kök hücreler gözlemlendi (Şekil 5.4.1.1.). Bu yuvarlak hücrelerden bazılarının 5-10 μm çapında oldukları tespit edildi. Bu hücreler, literatür (123, 128) esas alınarak çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler olarak değerlendirildi. Olası germline ve pluripotent kök hücrelerin fibroblast hücrelerinin üzerinde yerleştikleri görüldü ve bu da fare embriyonik kök hücrelerinin gösterdiği bir özellikti. Bu hücrelerin fare embriyonik kök hücreleri gibi fibroblast hücrelerinden besleyici (feeder) olarak yararlandıkları düşünüldü. Hücre kültürününün P_2 aşamasında 200-500 μm çapında embryoid cisimciklerin oluşumu tespit edildi (Şekil 5.4.1.2.). Bu aşamada morfolojik olarak mezenkimal benzeri kök hücreler gözlemlendi (Şekil 5.4.1.3.). Hücre kültürününün P_0 aşamasında epitel hücreleri koloniler şeklinde tespit edildi (Şekil 5.4.1.4.).



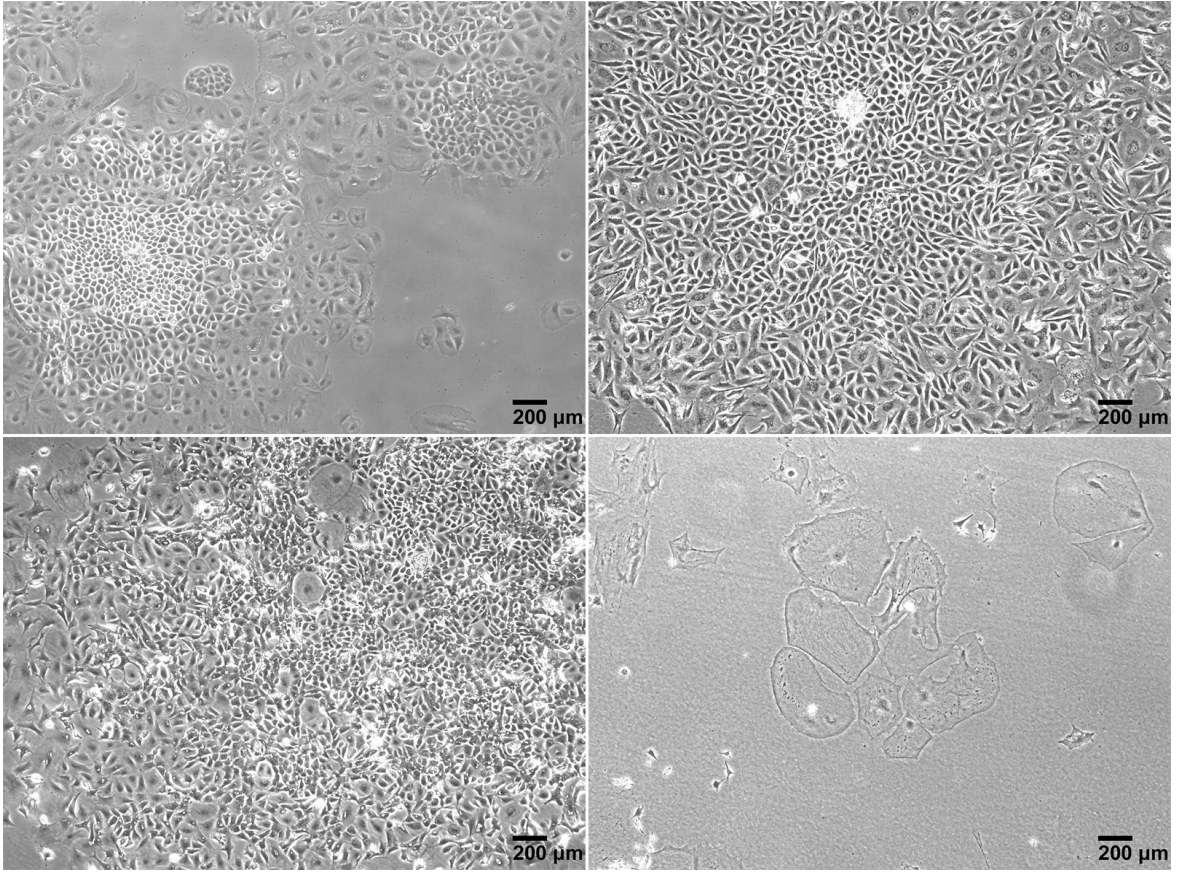
Şekil 5.4.1.1. Hücre kültüründe olası germline ve pluripotent kök hücreler (yuvarlak hücreler). Çok küçük embriyonik benzeri kök hücreler okla işaretlenmiştir



Şekil 5.4.1.2. Embriyoid cisimciğin oluşma aşaması (A ve B), olgun embriyoid cisimcikleri (C)



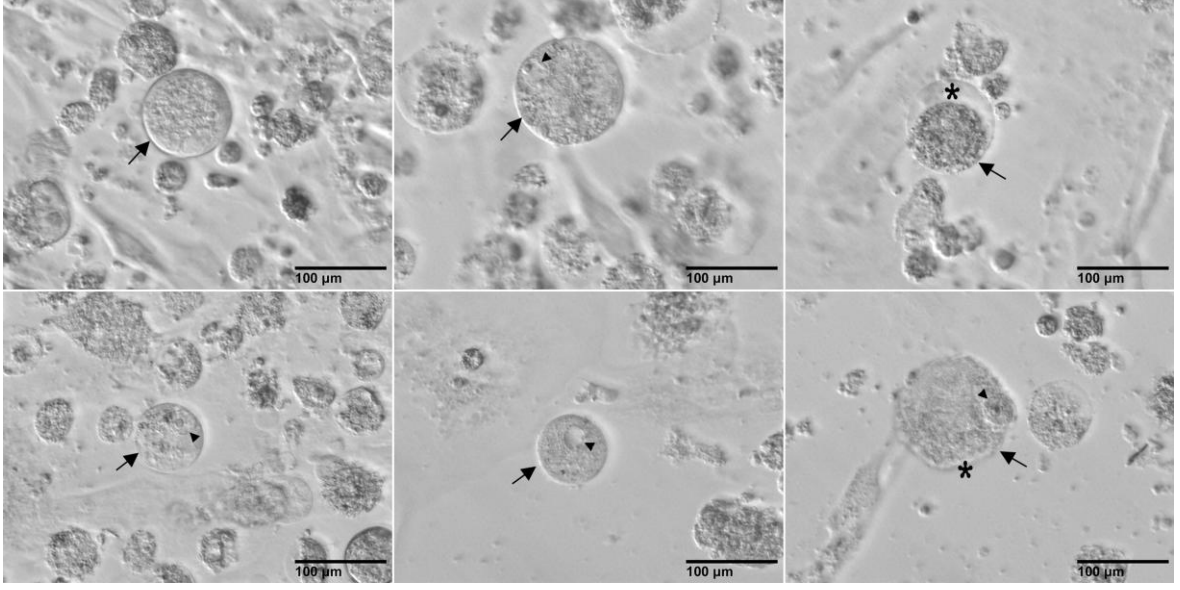
Şekil 5.4.1.3. Mezenkimal benzeri hücreler (oklar)



Şekil 5.4.1.4. Epitel hücreleri

5.4.2. Farklılaştırma sonucu oosite benzer hücrelerin oluşması

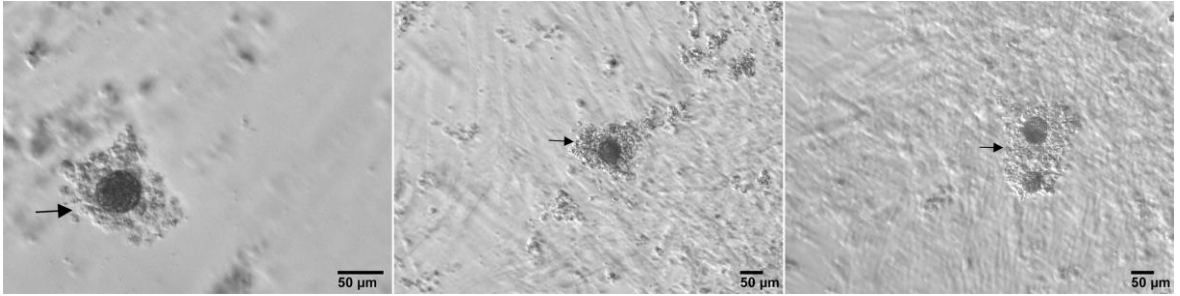
P₃ aşamasındaki hücrelerin oosit yönünde farklılaştırılması sonucu yaklaşık üçüncü haftada 70-100 µm çapında oosit benzeri hücrelerin oluşumu gözlemlendi. Bu hücreler ilk aşamada kültür kabının tabanına yapışmışken kısa süre sonra yüzen hücreler halinde gözlemlendi. Oosit hücrelerinin bazılarında germinal vezikül (GV) ve zona pellusida (ZP) tespit edildi (Şekil 5.4.2.1.).



Şekil 5.4.2.1. Farklılaştırma sonucu oluşan oositler (oklar), GV (ok başı), zona pellusida (yıldız)

5.4.3. Farklılaştırma sonucu folikül benzeri yapıların oluşumu

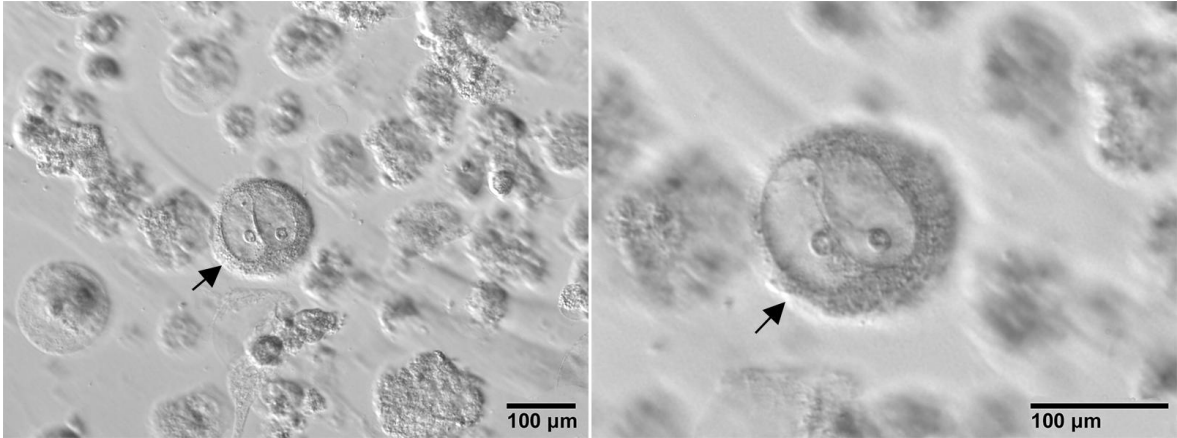
P₃ aşamasındaki hücrelerin oosit yönünde farklılaştırılması sonucu yaklaşık üçüncü haftada folikül benzeri yapıların oluşumu tespit edildi. Bu yapılar aynen oosit hücreleri gibi ilk aşamada kültür kabının tabanına yapışmışken kısa süre sonra yüzen yapılar halinde gözlemlendi (Şekil 5.4.3.1.).



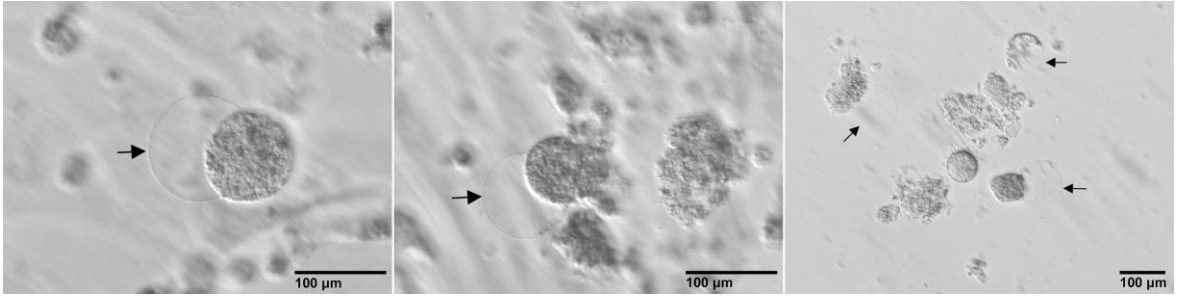
Şekil 5.4.3.1. Farklılaştırma sonucu folikül benzeri yapıların oluşumu

5.4.4. Farklılaştırma sonucu partenogenezin meydana gelmesi

P₃ aşamasındaki hücrelerin oosit yönünde farklılaştırılması sonucu yaklaşık dördüncü haftada az sayıda oosit hücrelerinde partenogenezin meydana geldiği tespit edildi. Bu hücrelerden bazılarında çekirdek bölünmesi (Şekil 5.4.4.1.) ve bazılarında ise implantasyon öncesi blastosistler gibi ZP kılıfından ayrılma (hatching) gözlemlendi (Şekil 5.4.4.2.).



Şekil 5.4.4.1. Blastosist benzeri hücrede çekirdek bölünmesi

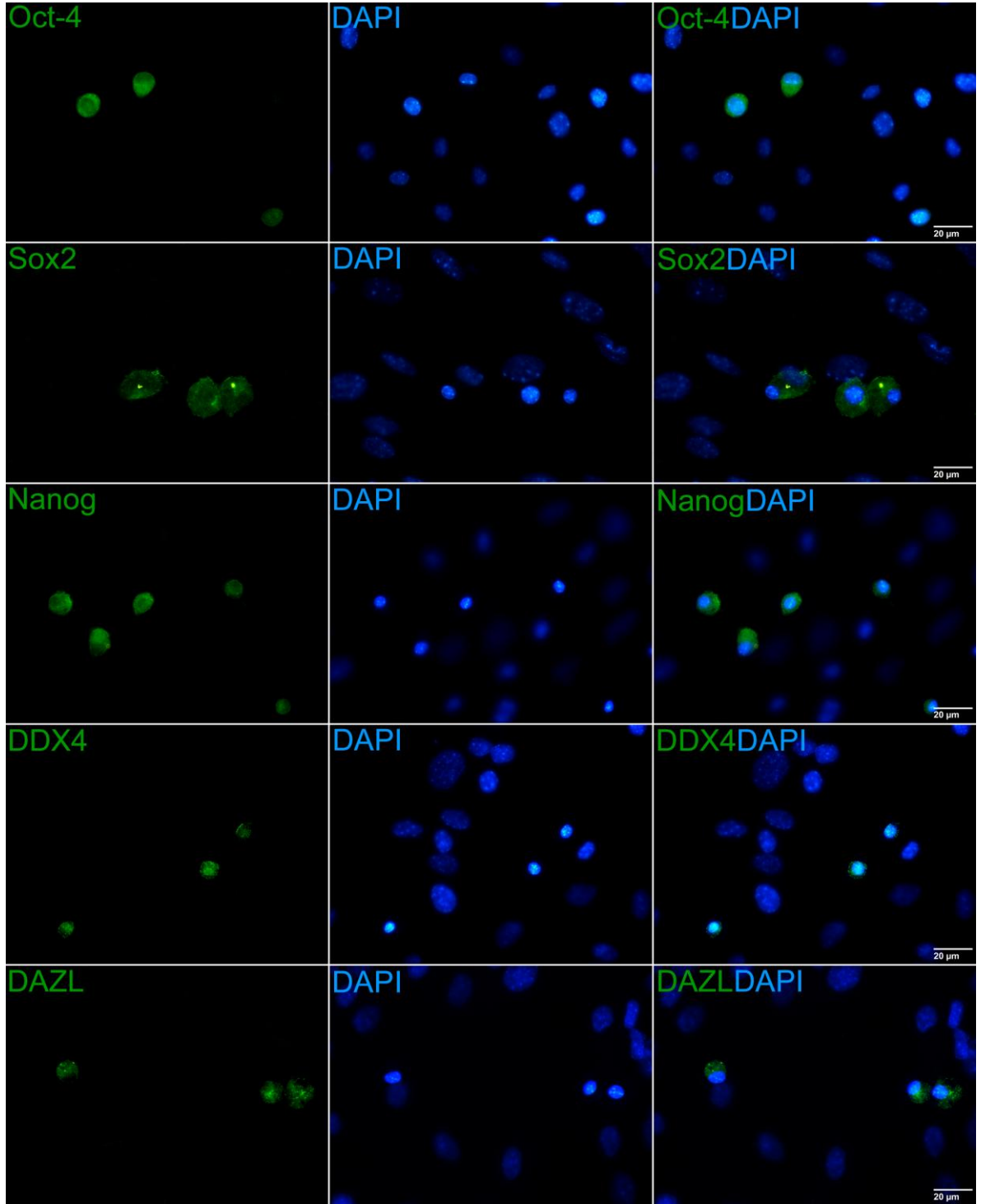


Şekil 5.4.4.2. Blastosist benzeri hücrelerin ZP kılıflarından ayrılması

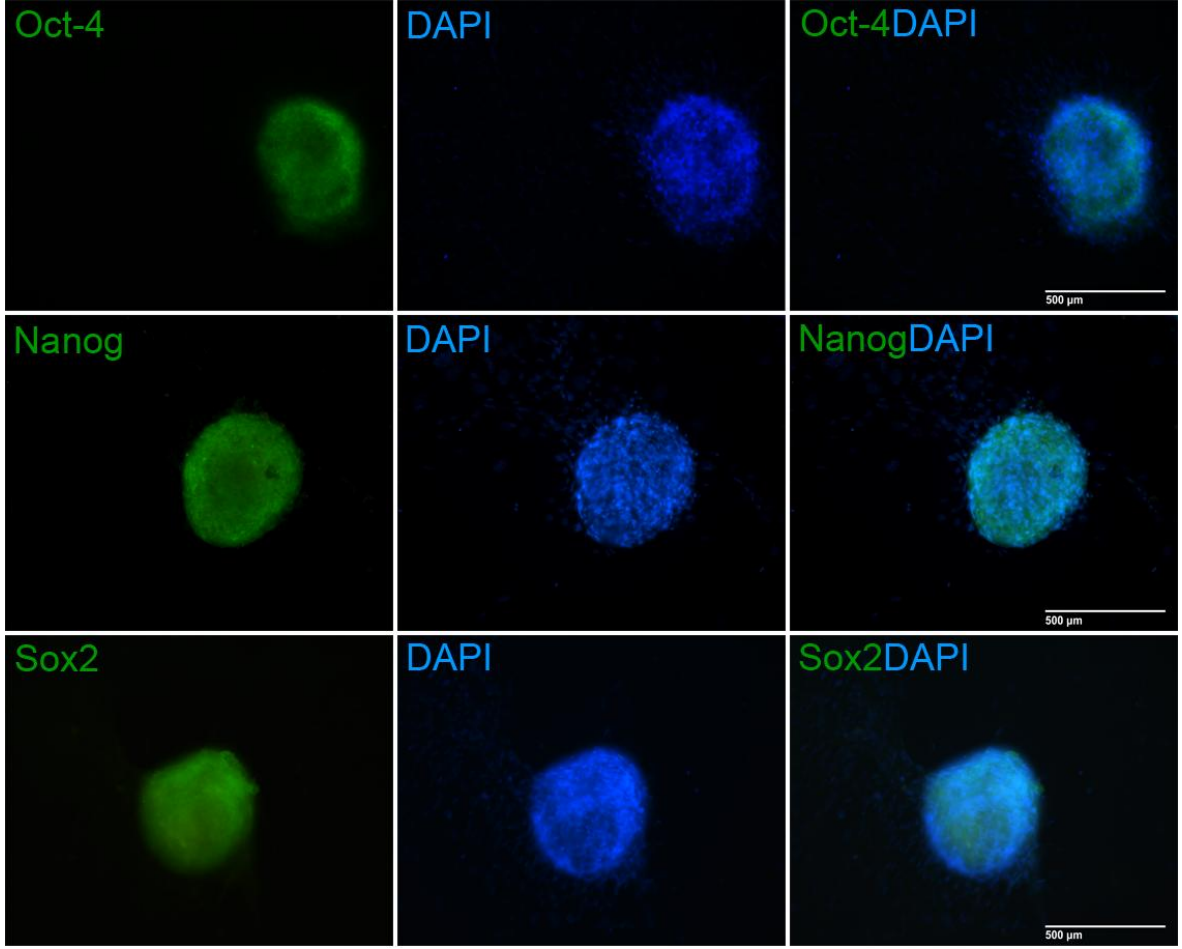
5.5. Olası Germline ve Pluripotent Kök Hücrelerin İmmüno Floresan İşaretlenmesi

Ovaryum hücre kültürünün P₁-P₂ aşamasında, pluripotent ve germline kök hücre belirteçlerinin (Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL) 5-20 µm çapında yuvarlak hücrelerde pozitif olarak ifade edildiği tespit edildi (Şekil 5.5.1.). Bu hücrelerde çekirdeklerin daha parlak olduğu ve çekirdek/sitoplazma oranının yüksek olduğu gözlemlendi

(Şekil 5.5.1.). Hücre kültürünün P₂ aşamasında oluşan embriyoid cisimciklerde Oct-4, Sox2 ve Nanog proteinlerinin ifade edildiği gösterildi (Şekil 5.5.2.).



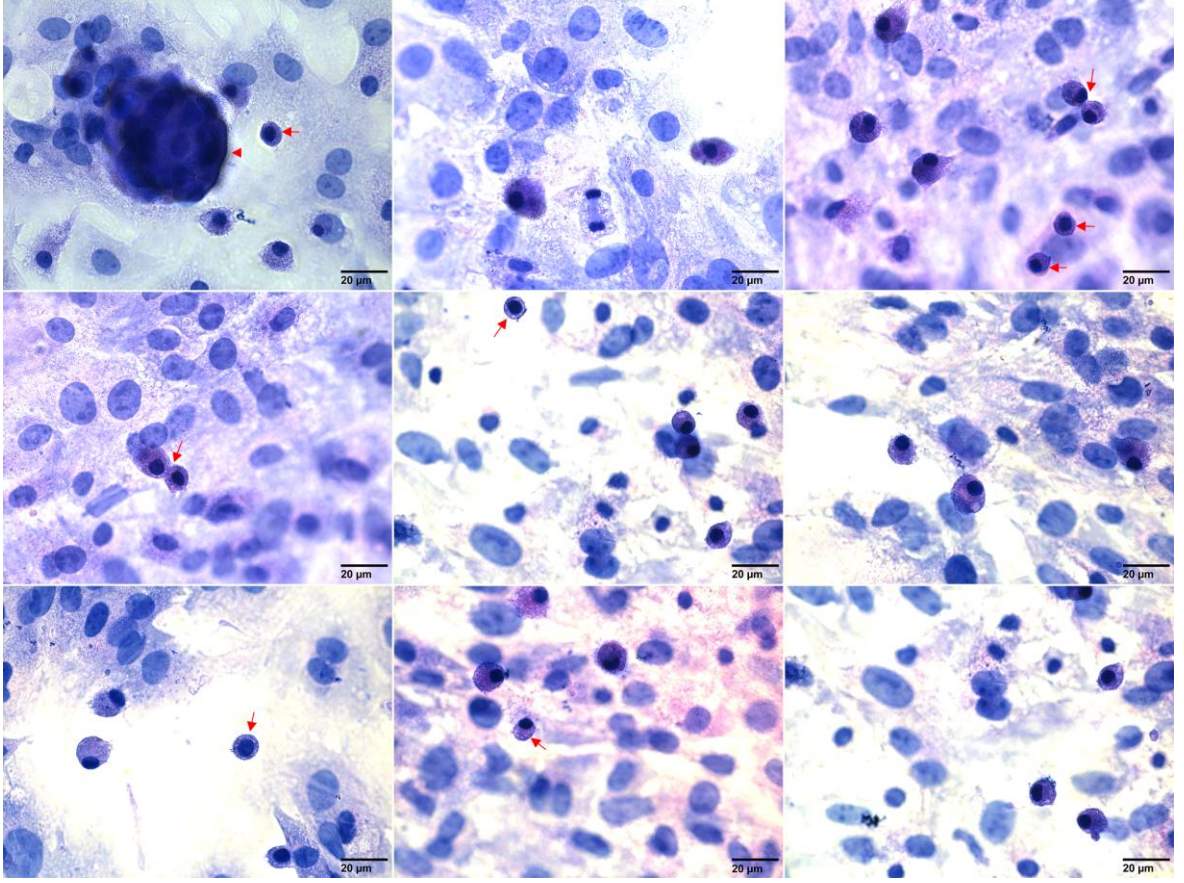
Şekil 5.5.1. Farklılaştırma öncesi hücre kültüründe pluripotent ve germline kök hücre proteinlerini ifade eden hücreler



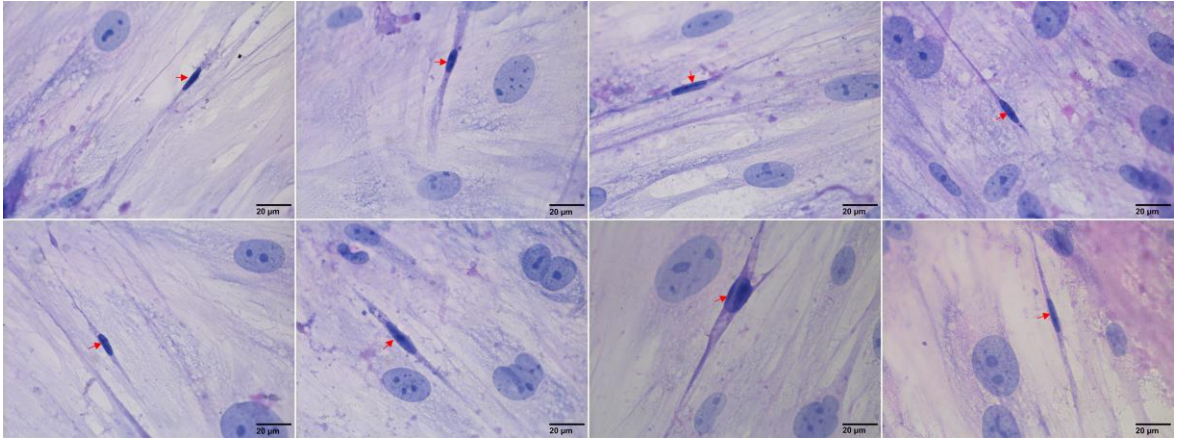
Şekil 5.5.2. Hücre kültüründe oluşan embriyoid cisimciklerin immüno Floresan boyanması

5.6. Hücrelerin HE Yöntemiyle Boyanması

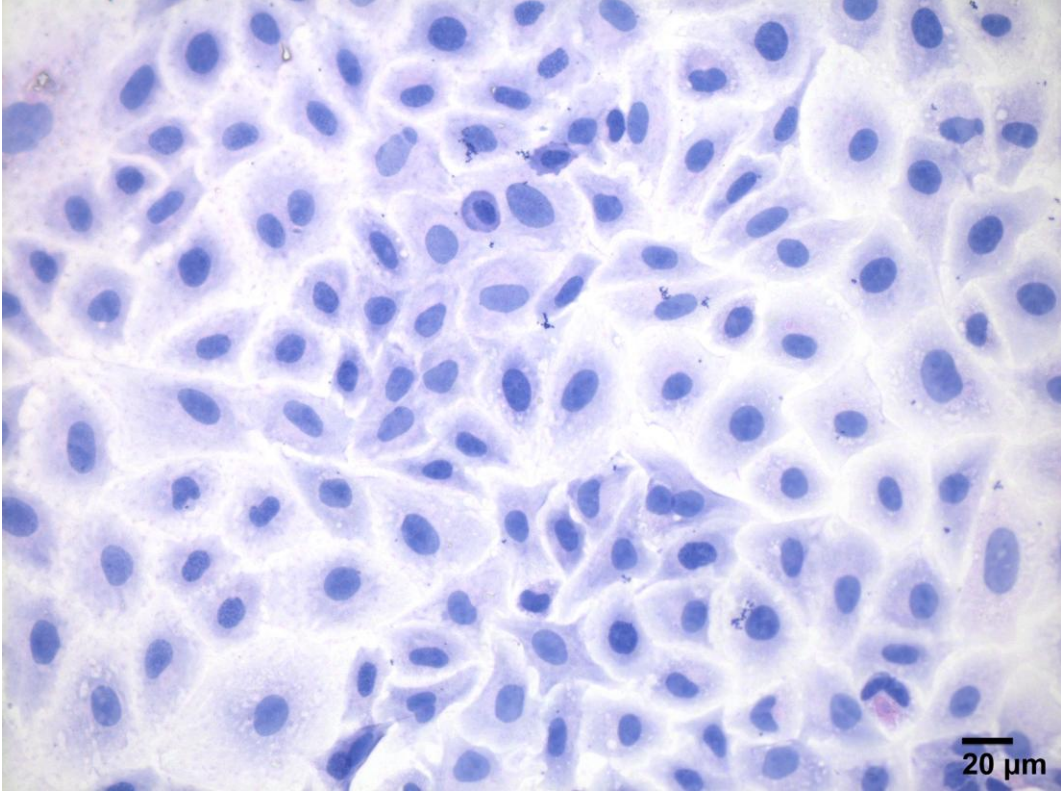
P₁-P₂ aşamasındaki hücrelerin HE boyama ve immüno Floresan boyama sonuçlarına paralel olarak olası germline ve pluripotent kök hücrelerde çekirdeklerin daha koyu boyandığı ve çekirdek/sitoplazma oranının daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 5.6.1.). P₁-P₂ aşamasındaki hücrelerin HE boyamasında koyu ve çekik çekirdeğe sahip fibrosit benzeri hücrelerin olası mezenkimal kök hücreler olduğu tahmin edildi (Şekil 5.6.2.). HE boyaması sonucu epitel hücreleri kaldırım taşı şeklinde gözlendi (Şekil 5.6.3.).



Şekil 5.6.1. Farklılaştırma öncesi hücrelerin HE boyanması. Olası germline ve pluripotent kök hücrelerde çekirdekler daha koyu boyanmış ve çekirdek/sitoplazma oranını daha yüksektir (oklar), embriyoid cisimciğinin oluşma aşaması (ok başı)



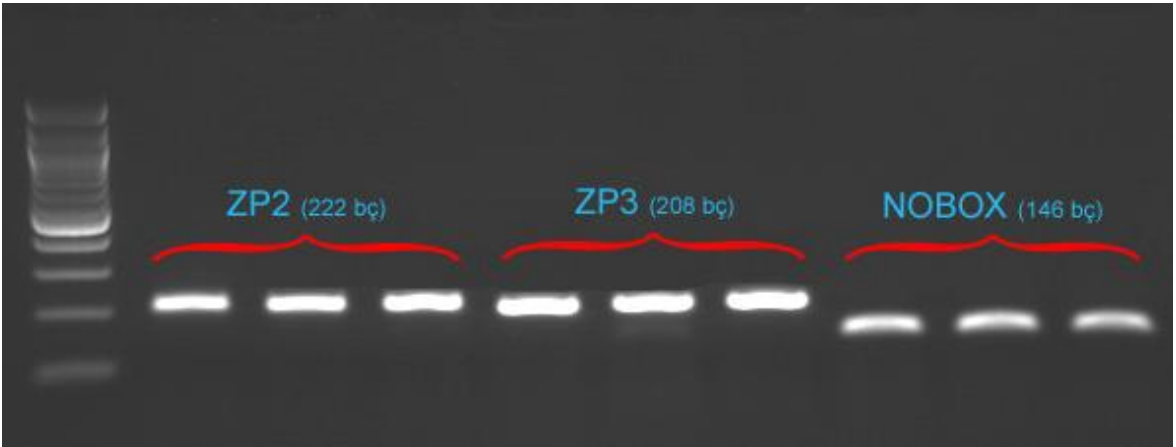
Şekil 5.6.2. Farklılaştırma öncesi hücrelerin HE boyanması. Koyu ve çekik çekirdeğe sahip fibrosit benzeri hücreler (oklar)



Şekil 5.6.3. Epitel hücreleri

5.7. Oosite Farklılaşan Hücrelerde RT-PCR Analizi

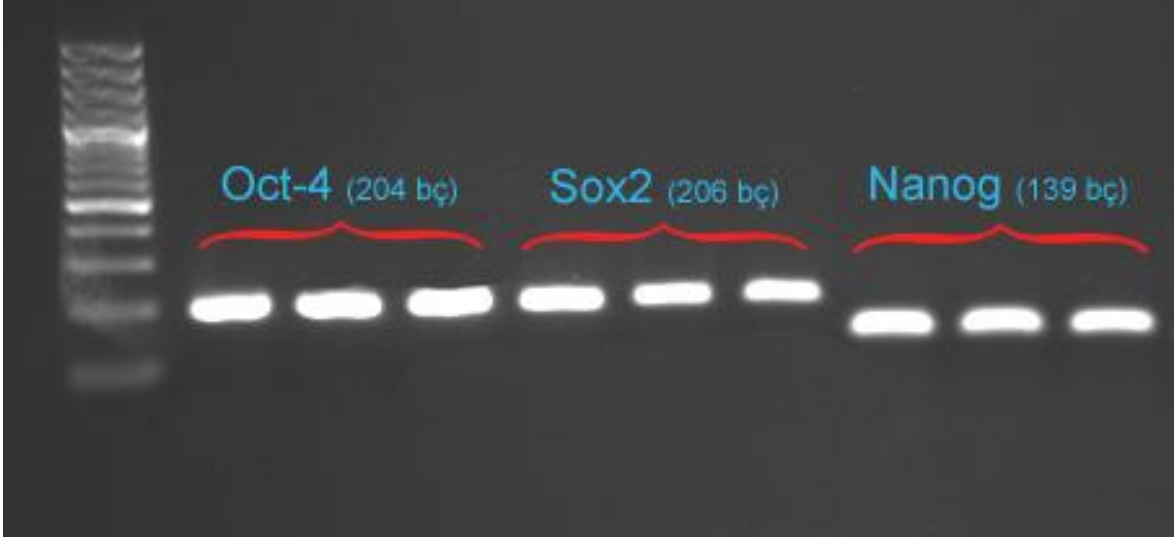
Oosite farklılaşan hücrelerde RT-PCR analiz sonucu bu hücrelerde ZP2, ZP3 ve NOBOX genlerinin ifade edildiği tespit edildi (Şekil 5.7.1.).



Şekil 5.7.1. Farklılaştırma sonucu oluşan oosite benzer hücrelerde ZP2, ZP3 ve NOBOX genlerinin ifadesi. Belirteç 100 bç

5.8. Partenogenezin Meydana Geldiği Hücrelerde RT-PCR Analizi

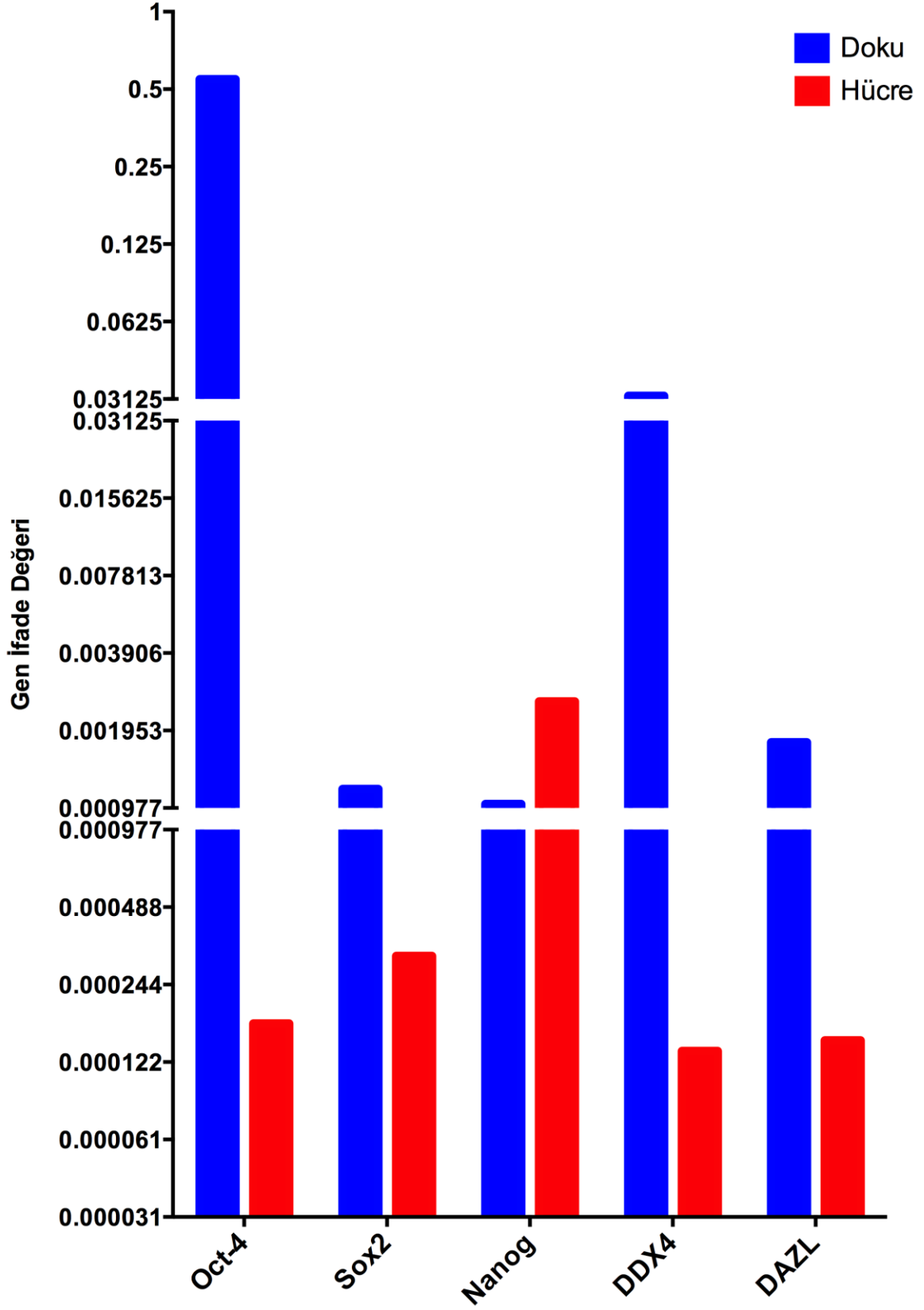
Partenogenezin meydana geldiği hücrelerde RT-PCR analiz sonucu bu hücrelerde Oct-4, Sox2 ve Nanog genlerinin ifade edildiği tespit edildi (Şekil 5.8.1.).



Şekil 5.8.1. Farklılaştırma sonucu oluşan blastosist benzeri hücrelerde Oct-4, Sox2 ve Nanog genlerinin ifadesi. Belirteç 100 bç

5.9. Ovaryum Dokusu ve Hücre Kültüründen Elde Edilen Hücrelerde qRT-PCR Analizi

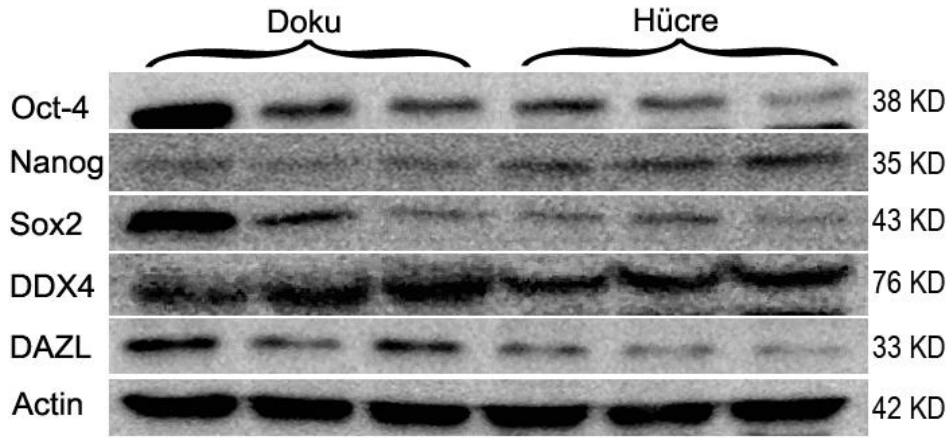
qRT-PCR analiz sonucu, Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL genlerinin ifadesi hem ovaryum dokusu hem de farklılaştırma öncesi (P₁) hücre kültüründen elde edilen hücrelerde tespit edildi. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, hücre kültüründe ovaryum dokusuna karşın Oct-4, Sox2, DDX4 ve DAZL genlerinin ifadesi kayda değer ölçüde ($p < 0.05$) düşerken Nanog geninin ifadesi yükseldi (Şekil 5.9.1.).



Şekil 5.9.1. Pluripotent ve germline kök hücre mRNA'larının ovaryum dokusu ve farklılaştırma öncesi hücrelerdeki ifade seviyesi

5.10. Ovaryum Dokusu ve Hücre Kültüründen Elde Edilen Hücrelerde İmmünoBlotlama Analizi

İmmünoBlotlama analiz sonucu pluripotent kök hücrelere (Oct-4, Sox2 ve Nanog) ve germline kök hücrelere (DDX4 ve DAZL) özgün proteinler hem ovaryum dokusu hem de farklılaştırma öncesi (P₁) hücre kültüründen elde edilen hücrelerde tespit edildi (Şekil 5.10.1.). Bu proteinlerin ifade seviyesi aynı zamanda qRT-PCR analiz sonucu çıkan mRNA'ların ifade seviyesi ile tamamen uyum göstermektedir.



Şekil 5.10.1. Pluripotent ve germline kök hücre proteinlerinin ovaryum dokusu ve farklılaştırma öncesi hücrelerdeki ifadesi.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kök hücre biyolojisi üzerine yapılan birçok araştırmaya göre; erişkinlik döneminde vücudun farklı yerlerinde bulunan kök hücreler genellikle multipotent veya bazen pluripotent, kendini yenileyen ve iyileştirici (regenerative) özelliklere sahiptirler. Memeli ovaryumu kök hücre biyolojisi alanında ise, doğum sonrası olası oogenez ve folikül oluşumu ile ilgili son zamanlarda tartışmalar giderek büyümüştür. Üreme biyolojisinin temel doktrini olarak, doğum sonrası oogenezin alt sınıf omurgalılarda meydana geldiği ve memelilerde mümkün olmadığı halen kabul edilmektedir. Ancak, son yıllarda yapılan araştırma sonuçları, doğum sonrası memeli ovaryumlarında germline kök hücrelerin bulunduğunu ve bu hücrelerden yeni oosit ve folikülleri oluşturduğunu öne sürmektedir.

6.1. Ovaryum Dokusu ve Farklılaştırma Öncesi Hücre Kültüründe Pluripotent ve Germline Kök Hücrelerin Protein ve mRNA Bazında Değerlendirilmesi

Daha önce yapılan bazı araştırmalarda doğum sonrası ovaryumunda pluripotent ve germline kök hücre özelliği taşıyan hücrelerin tespit edildiği (3, 6, 7, 113) fakat buna rağmen birkaç araştırmada da doğum sonrası ovaryumlarda bu özellikleri taşıyan hücrelerin bulunmadığı öne sürülmüştür. Bu çalışmada ovaryum dokusunda, immünofloresan boyama sonucu Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL proteinleri sadece oositlerin sitoplazması ya da çekirdeğinde gözlemlendi (Şekil 5.2.1., 5.2.2., 5.2.3., 5.3.1. ve 5.3.2.). Hücre kültüründe oositlerin tamamen uzaklaştırılmasına rağmen bu proteinler, bazı hücrelerin (olası germline ve pluripotent kök hücreler) çekirdek veya sitoplazmasında işaretlendi (Şekil 5.5.1.).

Oct-4, Sox2 ve Nanog proteinleri transkripsiyon faktörleri olduklarından fonksiyon yapabilmeleri için çekirdekte olmaları gerekmektedir, oysa araştırmamızda ve daha önce yapılan bazı çalışmalarda da bu proteinler, erişkin ovaryum hücrelerinin sitoplazmasında gözlemlenmiştir (105, 127, 149, 150). Bu proteinlerin hücre sitoplazmasında bulunduğu süreçte bu hücrelerin pluripotent kök hücre olmaları sorgulanabilir (150). Fakat transkripsiyon faktörleri hücresel uyarılara bağlı olarak kısa amino asit sekansları aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya (Nuclear Export Sequence or NES) veya ters yönde (Nuclear Localization Sequence or NLS) geçiş yapmaktadırlar (151).

Ovaryum dokusu ve farklılaştırma öncesi hücre kültüründen elde edilen hücrelerin qRT-PCR analizi sonucu bu hücrelerde pluripotent ve germline kök hücreye özgün mRNA'lar tespit edildi. Doku örneklerinde Oct-4, Sox2, DDX4 ve DAZL genlerinin ifadesi hücre kültürüne göre daha yüksekken Nanog geni hücre kültüründe daha yüksek ifade olmaktadır (Şekil 5.9.1. ve 5.9.2.). İmmünofloresan boyama sonucu dokuda Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL belirteçlerinin sadece oositlerde pozitif olduğu gözlemlendi, dolayısıyla hücre kültüründen oositlerin uzaklaştırılması sonucu Nanog geni hariç diğer genlerde dokuya göre büyük ifade düşüşü meydana geldi. Hücre kültüründe *in vitro* koşullar altında hücre nişinin etkilendiği ve bilinmeyen faktörlerden dolayı Nanog geninin yüksek miktarda ifade edildiği düşünüldü.

İmmünoablottama analiz sonucu Oct-4, Sox2, Nanog, DDX4 ve DAZL proteinleri hem doku hem de hücre kültüründe tespit edildi. Bu proteinlerin ifade seviyesi aynı zamanda qRT-PCR analiz sonucu çıkan mRNA'ların ifade seviyesi ile tamamen uyum göstermekteydi (Şekil 5.10.1.).

6.2. Ovaryum Hücre Kültüründe Farklılaştırma Sonucu Oluşan Hücrelerin mRNA Bazında Değerlendirilmesi

Daha önce yapılan bazı araştırmalarda olası germline kök hücrelerin gelişimi sonucu oosit benzeri hücrelerin oluştuğu iddia edilmiştir (116, 125). Çalışmamızda da bunu destekler şekilde oosite farklılaştırma sonucu oluşan oosit benzeri hücrelerde, oosite özgün (ZP2, ZP3 ve NOBOX) mRNA'lar tespit edildi (Şekil 5.7.1.). Doğum sonrası ovaryum hücre kültüründe blastosist benzeri hücrelerin oluştuğu rapor edilen bazı araştırmalara (5, 108) uygun olarak partenogenezin meydana geldiği hücrelerde RT-PCR analizi sonucu bu hücrelerde Oct-4, Sox2 ve Nanog genlerinin ifade edildiği tespit edildi (Şekil 5.8.1.).

6.3. Ovaryum Hücre Kültüründeki Hücrelerin Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Farklılaştırma öncesi ovaryum hücre kültüründe olası germline ve pluripotent kök hücreler gözlemlendi (Şekil 5.4.1.1.). Bu yuvarlak hücrelerden bazılarının 5-10 µm çapında çok küçük embriyonik benzer kök hücreler olarak tanımlanan hücreler olduğu düşünüldü (123, 128).

Olası germline ve pluripotent kök hücreler olarak düşündüğümüz hücrelerimiz embriyonik kök hücrelere benzer bir şekilde fibroblast hücrelerinin üzerinde yerleşti ve bu hücrelerden besleyici (feeder) olarak yararlandılar (40). Oosite farklılaştırma sonucu oosit benzeri hücreler (Şekil 5.4.2.1.), folikül hücreleri (Şekil 5.4.3.1.) ve blastosist benzeri yapılar (Şekil 5.4.4.1., 5.4.4.2.) oluşturdular.

6.4. Sonuç

Kök hücre belirteçlerinin hem doku hem de kültürde gözlenmesi, bu hücrelerin kök hücre potansiyeline sahip olduklarını ancak doku ve hücre kültüründe bu belirteçlerin farklı ifade profili göstermeleri, açıklanmaya çalışıldığında– kullanılan belirteçler dokuda sadece oositte ifade olurken hücre kültüründe oosit dışı, olası germline ve pluripotent kök hücrelerde de ifade göstermiştir – hücrelerin niş etkisi ve epigenetik modifikasyonlarına bağlı olarak *in vivo* ve *in vitro* koşullarda farklı davranış gösterdikleri düşünüldü. Buna ilaveten doğum sonrası oogenezin olabileceği hipotezini destekleyen bütün araştırmalara rağmen normal fizyolojik şartlarda bu mekanizmanın meydana gelmediğini bilmekteyiz. Ancak, yapılan araştırmalar ve bizim de araştırmamızın sonuçlarına göre, doğum sonrası memeli ovaryumunda germline ve pluripotent kök hücrelerin varlığı ile ilgili önemli kanıtlar vardır. Bizim açımızdan, laboratuvar sonuçları ile normal fizyolojik şartlardaki doğum sonrası oogenez olasılığında bulunan çelişki, aslında *in vitro* ve *in vivo* koşulların ne kadar farklı olduğunu ve bu durumun da hücre nişinin, bilinmeyen farklı faktörler ve epigenetik mekanizmalardan etkilendiğini göstermektedir. Sonuç olarak, normal fizyolojik şartlarda doğum sonrası oogenez mümkün olmasa da ovaryumlar bu potansiyele sahiptir ve bazı modifikasyonlar sonucu yeni oosit ve folikül oluşturma kapasiteleri bulunmaktadır.

Doğum sonrası olası oogenezde, kromatinin yeniden modellenmesi, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu ve kodlayıcı olmayan transkriptler, olarak adlandırılan epigenetik mekanizmalarının belirleyici rolleri olduğunu düşünmekteyiz. Epigenetik mekanizması ile oogenez ilişkisi üzerine yapılan araştırma sonuçlarına göre, histon asetilasyonu, mayozun başlangıcı ve devamı dahil olmak üzere germ hücre gelişiminin transkripsiyonel regülasyonu aşamasında rol almaktadır. Mayoz öncesi germ hücrelerde, STRA8 promotörünün, histon deasetilasyonu sonucu baskılandığı ve mayoz bölünmesine neden olduğu tespit edilmiştir (152, 153). Ayrıca, erişkin fare ovaryumunda

STRA8 geninin bulunduğu ve fizyolojik olarak regüle edildiği gösterilmiştir. STRA8 geninin aktif hale gelmesinin, I/II. sınıf histon deasetilaz (HDAC) inhibitörü olan trikostatın-A (TSA) enzimi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (152). Erişkin fare ovaryumunda, oosit yenilenmesinde kritik role sahip olan CABLES1 geni, sikline bağımlı kinazlar (CDK) ile etkileşime geçerek hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan proteini kodlar (129). Yapılan başka araştırmalara göre, LIN28A geni primordiyal germ hücreleri havuzunun yenilenmesi ve çoğalmasında (154) ve FOXO3 geni folikül havuzunun yenilenmesinde (155) kritik role sahiptir. Erişkinlik döneminde FOXO3 geninin yüksek ifadesinin ovaryumdaki üreme kapasitesini yükselttiği öne sürülmüştür.

Yukarıda sözü edildiği gibi, normal fizyolojik şartlarda doğum sonrası memeli ovaryumunda yeni oosit ve folikül oluşması olasılığının düşük olduğu ancak bu ovaryumların germline ve pluripotent kök hücrelere sahip oldukları ve uygun modifikasyonlar sonucu yeni oosit ve folikül oluşturma olasılıklarının yüksek olduğuna inanmaktayız. Buradan yola çıkarak, doğum sonrası yeni oosit ve folikül oluşma olasılığını ve bu süreçte hangi faktörlerin etkili olduğunu araştırmak için oogenez ve folikülogenez ile ilgili genetik faktörler, niş etkisi ve epigenetik mekanizmaların, aydınlatılmasına daha çok ihtiyaç duyulduğu kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- 1 Zuckerman S. The Number of Oocytes in the Mature Ovary. *Recent Progress in Hormone Research*. 1951;**6**:63-109.
- 2 Liu YF, Wu C, Lyu QF, et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Developmental Biology*. 2007;**306**(1):112-20.
- 3 Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;**428**(6979):145-50.
- 4 Bukovsky A. Immune system involvement in the regulation of ovarian function and augmentation of cancer. *Microscopy Research and Technique*. 2006;**69**(6):482-500.
- 5 Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, et al. Parthenogenetic Embryo-Like Structures in the Human Ovarian Surface Epithelium Cell Culture in Postmenopausal Women with No Naturally Present Follicles and Oocytes. *Stem Cells and Development*. 2009;**18**(1):137-49.
- 6 Zou K, Yuan Z, Yang Z, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature cell Biology*. 2009;**11**(5):631-6.
- 7 White YA, Woods DC, Takai Y, Ishihara O, Seki H, Tilly JL. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Medicine*. 2012;**18**(3):413-21.
- 8 Waldeyer-Hartz WV. *Eierstock und Ei*: Engelmann, Leipzig; 1870.
- 9 Kingery HM. Oogenesis in the white mouse. *Journal of Morphology*. 1917;**30**:261-315.
- 10 Allen E, Creadick RN. Ovogenesis during sexual maturity. the first stage, mitoses in the germinal epithelium, as shown by the colchicine technique. *American Journal of Anatomy*. 1937;**69**:191-5.
- 11 Pearl R, Schoppe WE. Studies on the physiology of reproduction in the domestic fowl. *The Journal of Experimental Zoology*. 1921;**34**:101-18.
- 12 Zuckerman S, Baker TG. The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary*, Edited by Zuckerman, S. and Weir, B. J. Academic Press, New York. 1977;**1**:41-67.
- 13 Pansky B, Mossman HW. The regenerative capacity of the rabbit ovary. *Anatomical Record*. 1953;**116**(1):19-51.
- 14 Vermandevaneck GJ. Neo-Ovogenesis in the Adult Monkey - Consequences of Atresia of Ovocytes. *Anatomical Record*. 1956;**125**(2):207-24.

- 15 Artem'eva N. Regenerative capacity of rat ovary after compensatory hypertrophy. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1961;**51**(1):76-81.
- 16 Peters H, Levy E, Crone M. Deoxyribonucleic acid synthesis in oocytes of mouse embryos. *Nature*. 1962;**195**:915-6.
- 17 Faddy MJ. Follicle dynamics during ovarian ageing. *Molecular Cell Endocrinology*. 2000;**163**(1-2):43-8.
- 18 Faddy MJ, Telfer E, Gosden RG. The kinetics of pre-antral follicle development in ovaries of CBA/Ca mice during the first 14 weeks of life. *Cell and Tissue Kinetics*. 1987;**20**(6):551-60.
- 19 Faddy MJ, Jones EC, Edwards RG. An analytical model for ovarian follicle dynamics. *The Journal of Experimental Zoology*. 1976;**197**(2):173-85.
- 20 Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics*. 1999;**21**(2):200-3.
- 21 Tilly JL. Commuting the death sentence: How oocytes strive to survive. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;**2**(11):838-48.
- 22 Richardson SJ, Senikas V, Nelson JF. Follicular depletion during the menopausal transition: evidence for accelerated loss and ultimate exhaustion. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1987;**65**(6):1231-7.
- 23 Borum K. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental Cell Research*. 1961;**24**:495-507.
- 24 Franchi LL, Mandl AM, Zuckerman S. The development of the ovary and the process of oogenesis. In *The Ovary*. Edited by Zuckerman, S. . Academic Press, London. 1962:1-88.
- 25 Peters H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 1970;**259**(828):91-101.
- 26 McLaren A. Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1984;**38**:7-23.
- 27 Anderson LD, Hirshfield AN. An overview of follicular development in the ovary: from embryo to the fertilized ovum in vitro. *Maryland Medical Journal*. 1992;**41**(7):614-20.
- 28 Gougeon A, Notarianni E. There is no neo-oogenesis in the adult mammalian ovary. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2011;**12**:270-3.

- 29 Woods DC, Tilly JL. The next (re) generation of ovarian biology and fertility in women: is current science tomorrow's practice? *Fertility and Sterility*. 2012;**98**(1).
- 30 Woods DC, White YA, Tilly JL. Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: an assessment of the literature and a view toward the future. *Reproductive Sciences*. 2013;**20**(1):7-15.
- 31 Virant-Klun I, Stimpfel M, Skutella T. Ovarian pluripotent/multipotent stem cells and in vitro oogenesis in mammals. *Histology and Histopathology*. 2011;**26**(8):1071.
- 32 Sawyer HR, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*. 2002;**66**(4):1134-50.
- 33 L.C. J, J. C. Basic Histology. 11th ed: Mc-Graw-Hill press; 2005.
- 34 Griffin J, Emery BR, Huang I, Peterson CM, Carrell DT. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*. 2006;**3**:2.
- 35 Pavlik EJ, DePriest PD, Gallion HH, et al. Ovarian volume related to age. *Gynecologic Oncology*. 2000 ;**77**(3):410-2.
- 36 Carlson BM. Human embryology and developmental biology. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2014.
- 37 Sadler TW, Langman J. Langman's medical embryology. 12th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- 38 Satoh M. Histogenesis and organogenesis of the gonad in human embryos. *Journal of Anatomy*. 1991;**177**:85-107.
- 39 Gosden RG, Boland, N. I., Spears, N., Murray, A. A., Chapman, M., Wade, J. C., Brown, N. . The biology and technology of follicular oocyte development in vitro. *Reproductive Medicine Review*. 1993;**2**.
- 40 Baharvand H. Embryonic Stem Cells. 1 ed. Iran: Home of Biology; 2007.
- 41 Beckmann J, Scheitza S, Wernet P, Fischer JC, Giebel B. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood*. 2007;**109**(12):5494-501.
- 42 Hans. R. S, Dagmar. S, Stefan. L. S. The Potential of Stem Cells: An Inventory: Ashgate; 2007.
- 43 Filip S, English D, Mokry J. Issues in stem cell plasticity. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2004;**8**(4):572-7.
- 44 Cinalli RM, Rangan P, Lehmann R. Germ cells are forever. *Cell*. 2008;**132**(4):559-62.

- 45 Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 2000;**24**(4):372-6.
- 46 Chambers I, Colby D, Robertson M, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003;**113**(5):643-55.
- 47 Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003;**113**(5):631-42.
- 48 Chambers I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*. 2007;**450**(7173):1230-4.
- 49 Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends in Genetics*. 2000;**16**(4):182-7.
- 50 Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*. 2007;**9**(6):625-35.
- 51 Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*. 2010;**15**(5):455-70.
- 52 Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R. Molecular control of pluripotency. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2006;**16**(5):455-62.
- 53 Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;**280**(26):24731-7.
- 54 Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, et al. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*. 2005;**23**(8):1035-43.
- 55 Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development*. 2006;**133**(6):1193-201.
- 56 Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005;**23**(3):299-305.
- 57 Kuroda T, Tada M, Kubota H, et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Molecular and Cellular Biology*. 2005;**25**(6):2475-85.

- 58 Pan G, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;**20**(10):1730-2.
- 59 Babaie Y, Herwig R, Greber B, et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007;**25**(2):500-10.
- 60 Rodriguez RT, Velkey JM, Lutzko C, et al. Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Experimental Biology and Medicine*. 2007;**232**(10):1368-80.
- 61 Hay DC, Sutherland L, Clark J, Burdon T. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2004;**22**(2):225-35.
- 62 Ivanova N, Dobrin R, Lu R, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006;**442**(7102):533-8.
- 63 Kopp JL, Ormsbee BD, Desler M, Rizzino A. Small increases in the level of Sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008;**26**(4):903-11.
- 64 Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;**280**(7):5307-17.
- 65 Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mechanisms of Development*. 2000;**93**(1-2):139-49.
- 66 Raz E. The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biology*. 2000;**1**(3):REVIEWS1017.
- 67 Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Human Molecular Genetics*. 2004;**13**(7):727-39.
- 68 Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA. Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*. 2006;**15**(6):831-7.
- 69 Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N. Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Structure and Function*. 2001;**26**(3):131-6.
- 70 Sengoku T, Nureki O, Nakamura A, Kobayashi S, Yokoyama S. Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell*. 2006;**125**(2):287-300.

- 71 Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;**97**(17):9585-90.
- 72 Collier B, Gorgoni B, Loveridge C, Cooke HJ, Gray NK. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *The EMBO journal*. 2005;**24**(14):2656-66.
- 73 Hasegawa E, Karashima T, Sumiyoshi E, Yamamoto M. C. elegans CPB-3 interacts with DAZ-1 and functions in multiple steps of germline development. *Developmental Biology*. 2006;**295**(2):689-99.
- 74 Moore FL, Jaruzelska J, Dorfman DM, Reijo-Pera RA. Identification of a novel gene, DZIP (DAZ-interacting protein), that encodes a protein that interacts with DAZ (deleted in azoospermia) and is expressed in embryonic stem cells and germ cells. *Genomics*. 2004;**83**(5):834-43.
- 75 Reynolds N, Collier B, Maratou K, et al. Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. *Human Molecular Genetics*. 2005;**14**(24):3899-909.
- 76 Yu Z, Ji P, Cao J, et al. Dazl promotes germ cell differentiation from embryonic stem cells. *Journal of Molecular Cell Biology*. 2009;**1**(2):93-103.
- 77 van Duin M, Polman JE, Verkoelen CC, et al. Cloning and characterization of the human sperm receptor ligand ZP3: evidence for a second polymorphic allele with a different frequency in the Caucasian and Japanese populations. *Genomics*. 1992;**14**(4):1064-70.
- 78 Han L, Monne M, Okumura H, et al. Insights into egg coat assembly and egg-sperm interaction from the X-ray structure of full-length ZP3. *Cell*. 2010;**143**(3):404-15.
- 79 Suzumori N, Yan C, Matzuk MM, Rajkovic A. Nobox is a homeobox-encoding gene preferentially expressed in primordial and growing oocytes. *Mechanisms of Development*. 2002;**111**(1-2):137-41.
- 80 Huntriss J, Hinkins M, Picton HM. cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Molecular Human Reproduction*. 2006;**12**(5):283-9.
- 81 Qin Y, Choi Y, Zhao H, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *American Journal of Human Genetics*. 2007;**81**(3):576-81.

- 82 Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science*. 2003;**300**(5623):1251-6.
- 83 Ioannou JM. Oogenesis in adult prosimians. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 1967;**17**(1):139-45.
- 84 Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004;**2**:20.
- 85 Bukovsky A, Keenan JA, Caudle MR, Wimalasena J, Upadhyaya NB, Vanmeter SE. Immunohistochemical Studies of the Adult Human Ovary - Possible Contribution of Immune and Epithelial Factors to Folliculogenesis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1995;**33**(4):323-40.
- 86 Bazer FW. Strong science challenges conventional wisdom: new perspectives on ovarian biology. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2004;**2**:28.
- 87 Gosden RG. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more like a testis? *Human Reproduction Update*. 2004;**10**(3):193-5.
- 88 Oktem O, Oktay K. Current Knowledge in the Renewal Capability of Germ Cells in the Adult Ovary. *Birth Defects Research Part C*. 2009;**87**(1):90-5.
- 89 Esmaeilian Y, Atalay A, Erdemli E. Post-natal oogenesis: a concept for controversy that intensified during the last decade. *Zygote*. 2015;**23**(3):315-26.
- 90 Virant-Klun I. Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells and Cloning : Advances and Applications*. 2015;**8**:49-60.
- 91 Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, Mladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction*. 2006;**132**(1):95-109.
- 92 Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Developmental Biology*. 2006;**298**(1):149-54.
- 93 Faddy M, Gosden R. Let's Not Ignore the Statistics. *Biology of Reproduction*. 2009;**81**(1):231-2.
- 94 Wallace WHB, Kelsey TW. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. *Plos One*. 2010;**5**(1):e8772.
- 95 Zhang H, Zheng WJ, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse

- ovaries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2012;**109**(31):12580-5.
- 96 Zhang P, Lv LX, Xing WJ. Early Meiotic-Specific Protein Expression in Post-natal Rat Ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*. 2010;**45**(6):e447-e53.
- 97 Byskov AG, Hoyer PE, Andersen CY, Kristensen SG, Jespersen A, Mollgard K. No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Human Reproduction*. 2011;**26**(8):2129-39.
- 98 Kerr JB, Brogan L, Myers M, et al. The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or gamma-irradiation mediated depletion. *Reproduction*. 2012;**143**(4):469-76.
- 99 Lei L, Spradling AC. Female mice lack adult germ-line stem cells but sustain oogenesis using stable primordial follicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;**110**(21):8585-90.
- 100 Yuan J, Zhang D, Wang L, et al. No evidence for neo - oogenesis may link to ovarian senescence in adult monkey. *Stem Cells*. 2013.
- 101 Zhang D, Fouad H, Zoma WD, Salama SA, Wentz MJ, Al-Hendy A. Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. *Reproductive Sciences*. 2008;**15**(2):139-46.
- 102 Pacchiarotti J, Maki C, Ramos T, et al. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*. 2010;**79**(3):159-70.
- 103 Gong SP, Lee ST, Lee EJ, et al. Embryonic stem cell-like cells established by culture of adult ovarian cells in mice. *Fertility and Sterility*. 2010;**93**(8):2594-601. e9.
- 104 Song SH, Kumar BM, Kang EJ, et al. Characterization of Porcine Multipotent Stem/Stromal Cells Derived from Skin, Adipose, and Ovarian Tissues and Their Differentiation In Vitro into Putative Oocyte-Like Cells. *Stem Cells and Development*. 2011;**20**(8):1359-70.
- 105 Hu Y, Bai Y, Chu Z, et al. GSK3 inhibitor-BIO regulates proliferation of female germline stem cells from the postnatal mouse ovary. *Cell Proliferation*. 2012;**45**(4):287-98.
- 106 Esmailian Y, Gur Dedeoglu B, Atalay A, Erdemli E. Investigation of stem cells in adult and prepubertal mouse ovaries. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;**03**(07):936-44.
- 107 Lu Z, Wu M, Zhang J, et al. Improvement in Isolation and Identification of Mouse Oogonial Stem Cells. *Stem Cells International*. 2015:2015.
- 108 Lai D, Xu M, Zhang Q, et al. Identification and characterization of epithelial cells derived from human ovarian follicular fluid. *Stem Cell Research & Therapy*. 2015;**6**:13.

- 109 Li J, Zhou F, Zheng T, et al. Ovarian Germline Stem Cells (OGSCs) and the Hippo Signaling Pathway Association with Physiological and Pathological Ovarian Aging in Mice. *International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2015;**36**(5):1712-24.
- 110 Honda A, Hirose M, Hara K, et al. Isolation, characterization, and in vitro and in vivo differentiation of putative thecal stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;**104**(30):12389-94.
- 111 Lee Y-M, Kumar BM, Lee J-H, et al. Characterisation and differentiation of porcine ovarian theca-derived multipotent stem cells. *The Veterinary Journal*. 2013.
- 112 Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, et al. The Multipotency of Luteinizing Granulosa Cells Collected from Mature Ovarian Follicles. *Stem Cells*. 2009;**27**(1):210-9.
- 113 Stimpfel M, Skutella T, Cvjeticanin B, et al. Isolation, characterization and differentiation of cells expressing pluripotent/multipotent markers from adult human ovaries. *Cell and Tissue Research*. 2013:1-15.
- 114 Crone M, Levy E, Peters H. The duration of the premeiotic DNA synthesis in mouse oocytes. *Experimental Cell Research*. 1965;**39**(2):678-88.
- 115 Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*. 1999;**140**(2):941-9.
- 116 Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005;**3**:1-13.
- 117 Niikura Y, Niikura T, Tilly JL. Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging*. 2009;**1**(12):971-8.
- 118 Virant-Klun I, Zech N, Rozman P, et al. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation*. 2008;**76**(8):843-56.
- 119 Virant-Klun I, Skutella T, Stimpfel M, Sinkovec J. Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*. 2011;**2011**:381928.

- 120 Virant-Klun I, Skutella T, Hren M, et al. Isolation of Small SSEA-4-Positive Putative Stem Cells from the Ovarian Surface Epithelium of Adult Human Ovaries by Two Different Methods. *BioMed Research International*. 2013;**2013**:690415.
- 121 Virant-Klun I, Stimpfel M, Cvjeticanin B, Vrtacnik-Bokal E, Skutella T. Small SSEA-4-positive cells from human ovarian cell cultures: related to embryonic stem cells and germinal lineage? *Journal of Ovarian Research*. 2013;**6**(1):24.
- 122 Virant-Klun I, Skutella T, Kubista M, Vogler A, Sinkovec J, Meden-Vrtovec H. Expression of pluripotency and oocyte-related genes in single putative stem cells from human adult ovarian surface epithelium cultured in vitro in the presence of follicular fluid. *BioMed Research International*. 2013;**2013**:861460.
- 123 Parte S, Bhartiya D, Telang J, et al. Detection, Characterization, and Spontaneous Differentiation In Vitro of Very Small Embryonic-Like Putative Stem Cells in Adult Mammalian Ovary. *Stem Cells and Development*. 2011;**20**(8):1451-64.
- 124 Bhartiya D, Sriraman K, Gunjal P, Modak H. Gonadotropin treatment augments postnatal oogenesis and primordial follicle assembly in adult mouse ovaries. *Journal of Ovarian Research*. 2012;**5**(1):32.
- 125 Parte S, Bhartiya D, Manjramkar DD, Chauhan A, Joshi A. Stimulation of ovarian stem cells by follicle stimulating hormone and basic fibroblast growth factor during cortical tissue culture. *Journal of Ovarian Research*. 2013;**6**(1):1-10.
- 126 Patel H, Bhartiya D, Parte S, Gunjal P, Yedurkar S, Bhatt M. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant FSH-R3. *Journal of Ovarian Research*. 2013;**6**(1):52.
- 127 Parte S, Bhartiya D, Patel H, et al. Dynamics associated with spontaneous differentiation of ovarian stem cells in vitro. *Journal of Ovarian Research*. 2014;**7**:25.
- 128 Sriraman K, Bhartiya D, Anand S, Bhutda S. Mouse Ovarian Very Small Embryonic-Like Stem Cells Resist Chemotherapy and Retain Ability to Initiate Oocyte-Specific Differentiation. *Reproductive Sciences*. 2015;**22**(7):884-903.
- 129 Lee HJ, Sakamoto H, Luo H, et al. Loss of CABLES1, a cyclin-dependent kinase-interacting protein that inhibits cell cycle progression, results in germline expansion at the expense of oocyte quality in adult female mice. *Cell Cycle*. 2007;**6**(21):2678-84.
- 130 Szotek PP, Chang HL, Brennand K, et al. Normal ovarian surface epithelial label-retaining cells exhibit stem/progenitor cell characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;**105**(34):12469-73.

- 131 Virant-Klun I, Knez K, Tomazevic T, Skutella T. Gene expression profiling of human oocytes developed and matured in vivo or in vitro. *BioMed Research International*. 2013;**2013**:879489.
- 132 Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 2005;**122**(2):303-15.
- 133 Johnson J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Niikura Y, Tilly JC, Tilly JL. Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. *Cell Cycle*. 2005;**4**(11):1471-7.
- 134 Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min IM, Wagers AJ. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006;**441**(7097):1109-14.
- 135 Begum S, Papaioannou VE, Gosden RG. The oocyte population is not renewed in transplanted or irradiated adult ovaries. *Human Reproduction*. 2008;**23**(10):2326-30.
- 136 Lee HJ, Selesniemi K, Niikura Y, et al. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;**25**(22):3198-204.
- 137 Bukovsky A. Immune maintenance of self in morphostasis of distinct tissues, tumour growth and regenerative medicine. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2011;**73**(3):159-89.
- 138 Bukovsky A, Ayala ME, Dominguez R, Svetlikova M, Selleck-White R. Bone marrow derived cells and alternative pathways of oogenesis in adult rodents. *Cell Cycle*. 2007;**6**(18):2306-9.
- 139 Bukovsky A, Caudle MR. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;**10**:97.
- 140 Bukovsky A, Caudle MR, Virant-Klun I, et al. Immune physiology and oogenesis in fetal and adult humans, ovarian infertility, and totipotency of adult ovarian stem cells. *Birth Defects Research Part C*. 2009;**87**(1):64-89.
- 141 Bukovsky A. Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *The Anatomical Record*. 2011;**294**(8):1284-306.
- 142 Selesniemi K, Lee HJ, Niikura T, Tilly JL. Young adult donor bone marrow infusions into female mice postpone age-related reproductive failure and improve offspring survival. *Aging*. 2009;**1**(1):49-57.

- 143 Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, et al. Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;**105**(39):14976-80.
- 144 Niikura Y, Niikura T, Wang N, Satirapod C, Tilly JL. Systemic signals in aged males exert potent rejuvenating effects on the ovarian follicle reserve in mammalian females. *Aging*. 2010;**2**(12):999-1003.
- 145 Ghadami M, El-Demerdash E, Zhang D, et al. Bone Marrow Transplantation Restores Follicular Maturation and Steroid Hormones Production in a Mouse Model for Primary Ovarian Failure. *Plos One*. 2012;**7**(3):e32462.
- 146 Santiquet N, Vallières L, Pothier F, Sirard M-A, Robert C, Richard F. Transplanted bone marrow cells do not provide new oocytes but rescue fertility in female mice following treatment with chemotherapeutic agents. *Cellular Reprogramming*. 2012;**14**(2):123-9.
- 147 Gheorghisan-Galateanu AA, Hinescu ME, Enciu AM. Ovarian adult stem cells: hope or pitfall? *Journal of Ovarian Research*. 2014;**7**:71.
- 148 Hanna CB, Hennebold JD. Ovarian germline stem cells: an unlimited source of oocytes? *Fertility and Sterility*. 2014;**101**(1):20-30.
- 149 Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*. 2003;**17**(1):126-40.
- 150 Cauffman G, Van de Velde H, Liebaers I, Van Steirteghem A. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular Human Reproduction*. 2005;**11**(3):173-81.
- 151 Whiteside ST, Goodbourn S. Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *Journal of Cell Science*. 1993;**104**(4):949-55.
- 152 Wang N, Tilly JL. Epigenetic status determines germ cell meiotic commitment in embryonic and postnatal mammalian gonads. *Cell Cycle*. 2010;**9**(2):339-49.
- 153 Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M, Aoki F. Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *The Journal of Cell Biology*. 2003;**162**(1):37-46.
- 154 Shinoda G, De Soysa TY, Seligson MT, et al. Lin28a regulates germ cell pool size and fertility. *Stem cells*. 2013;**31**(5):1001-9.

155 Pelosi E, Omari S, Michel M, et al. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nature Communications*. 2013;**4**:1843.

EKLER

Ek 1: Etik Kurul Kararı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Genel Sekreterlik

Sayı : B.30.2.ANK.0.70.00.00/

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Ankara

Konu:

18/01/2012

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ :18/01/2012
TOPLANTI NO :2012-1
DOSYA NO :2012-2
KARAR NO :2012-1-3

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Esra Erdemli'nin araştırma yürütücüsü olduğu ve Prof.Dr.Esra Erdemli ile Yashar Esmacilian'ın ortak çalışmaları olan "Ovaryumda germ-line kök hücre varlığının araştırılması" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre;

- Uygun bulunarak onaylanmasına,
 Düzeltilmesine,
oy birliği ile karar verilmiştir.

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. Oğuz SARİMEHMETOĞLU (Başkan)	Parazitoloji ABD.	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Eyüp Sabri AKARSU (Başkan Vekili)	Tıbbi Farmakoloji ABD.	Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Üye)	Farmakoloji ABD.	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof.Dr.Nuri YİĞİT (Üye)	Biyoloji ABD.	Fen Fakültesi	E	
Prof.Dr.Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme ABD.	Ziraat Fakültesi	E	
Prof.Dr.Aydın YAĞMURLU (Üye)	Çocuk Cerrahisi ABD.	Tıp Fakültesi	E	
Yrd.Doç.Dr.Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi ABD.	Veteriner Fakültesi	E	

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yashar Esmaeilian

Doğum Yeri: İRAN

Doğum Tarihi: 07.02.1981

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Sema Lisesi

Lisans: Urmia Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

İş Tecrübesi

Kurumu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD

Görevi: “Erişkin fare ovaryumu kök hücrelerinin in vitro farklılaşma potansiyeli” başlıklı ve SBAG 115S244 numaralı TÜBİTAK destekli projede araştırmacı

Yıllar: 2015-devam ediyor

Kurumu: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Görevi: “Erişkin Fare Ovaryumunda Olası Germline ve Pluripotent Kök Hücrelerin Moleküler ve Hücrel Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı ve 13B4143003 numaralı Ankara Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi destekli projede araştırmacı

Yıllar: 2013-2015

Yayımlar

SCI’da Yer Alan Makaleler:

Esmaeilian Y, Atalay A, Erdemli E. Post-natal oogenesis: a concept for controversy that intensified during the last decade. *Zygote*. 2015;23(03):315-26.

Hakemli Dergilerde Yer Alan Makaleler:

Esmailian Y, Dedeoglu BG, Atalay A, Erdemli E. Investigation of stem cells in adult and prepubertal mouse ovaries. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2012;3(7):936-44.

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Esmailian Y, Atalay A, Erdemli E. Germline and pluripotent stem cells in adult mouse ovaries and their in vitro differentiation potential. 13th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 24-27, 2015, Stockholm, Sweden

Esmailian Y, Dedeoglu B, Atalay A, Erdemli E. Investigation of stem cells in adult and pre-adult mouse ovaries. 9th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 15-18, 2011, Toronto, Canada

Ulusal Kongrelerde Sunulan Bildiriler:

Esmailian Y, Atalay A, Erdemli E. Erişkin ovaryumunda germline ve somatik kök hücre var mıdır?. 12. Ulusal Histoloji Embriyoloji Kongresi. 27-30 Mayıs, 2014, Ankara, Türkiye

Esmailian Y, Atalay A, Erdemli E. Fare ovaryumu kök hücrelerinin Real Time-PCR ve immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu. 29 Eylül-01 Ekim, 2010, Samsun, Türkiye

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR

1. **Esmailian Y**, Atalay A, Erdemli E. Post-natal oogenesis: a concept for controversy that intensified during the last decade. *Zygote*. 2015;23(03):315-26.
2. **Esmailian Y**, Atalay A, Erdemli E. Germline and pluripotent stem cells in adult mouse ovaries and their in vitro differentiation potential. 13th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 24-27, 2015, Stockholm, Sweden
3. **Esmailian Y**, Atalay A, Erdemli E. Erişkin ovaryumunda germline ve somatik kök hücre var mıdır?. 12. Ulusal Histoloji Embriyoloji Kngresi. 27-30 Mayıs, 2014, Ankara, Türkiye