



T.C.

MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PREİMLANTASYON GELİŞİM SÜRECİNDE  
c-Abı PROTEİNİN LOKALİZASYONU**

**DUYGU MUTLUAY**

**DOKTORA TEZİ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER**

**II. Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Vernadeth B. ALARCON**

**BURDUR - 2014**



T.C.  
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PREİMLANTASYON GELİŞİM SÜRECİNDE  
c-Abi PROTEİNİN LOKALİZASYONU**

**DUYGU MUTLUAY**

**DOKTORA TEZİ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Danışman**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER**

**II. Danışman**

**Yrd. Doç. Dr. Vernadeth B. ALARCON**

Bu Araştırma Hawaii Üniversitesi John A. Burns Tıp Fakültesi Biyogenez Araştırma  
Laboratuvarlarında yapılmıştır.

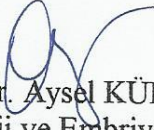
**BURDUR – 2014**

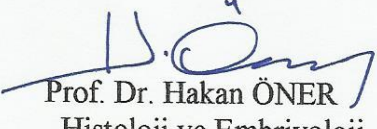
**KABUL ve ONAY**

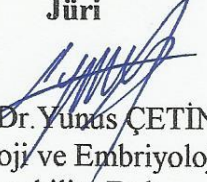
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

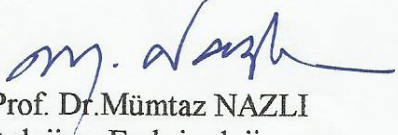
Duygu MUTLUAY tarafından Prof. Dr. Hakan ÖNER ve Yrd. Doç. Dr. Vernadeth B. ALARCON yönetiminde hazırlanan “Farelerde Preimplantasyon Gelişim Sürecinde c-Abl Proteinin Lokalizasyonu” başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

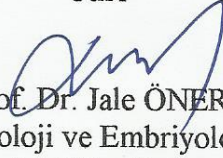
**Tez Savunma Tarihi 29/12/2014**

  
Prof. Dr. Aysel KÜKNER  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
**Başkan**

  
Prof. Dr. Hakan ÖNER  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
**Jüri**


  
Doç. Dr. Yunus ÇETİN  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
**Jüri**

  
Prof. Dr. Mümtaz NAZLI  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
**Jüri**

  
Prof. Dr. Jale ÖNER  
Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
**Jüri**

**ONAY**

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **30 / 12 / 2014** Tarih ve **2014-29** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Mehmet KARACA  
Müdür  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca sahip olduğum bilgi birikimini ve desteğini benden esirgemeyen, danışmanım Prof. Dr. Hakan ÖNER'e tez boyunca yaptığı katkılardan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamla ilgili beni çalışma grubuna kabul eden, laboratuvarımı açan, çalışma konusunun belirlenmesi, deneysel çalışmaların sağlıklı bir şekilde yürütülmesinde yol göstererek her türlü yardım ve katkıda bulunan, Yrd. Doç. Dr. Vernadeth B. ALARCON'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında karşılaştığım problemlerin çözümünde ve her türlü konuda katkılarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Mümtaz NAZLI ve Prof. Dr. Jale ÖNER'e teşekkür ederim.

Tez yazımı sırasında bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarıma, özellikle Yrd. Doç. Dr. Aykut Asım AKBAŞ'a ve ablam Ayşegül MUTLUAY BİLGİÇ'e teşekkür ederim.

Bugüne kadar bana her konuda desteğini hissettiren, her an yanımda olan, hem eğitim hayatım boyunca hem de özel hayatımda örnek aldığım ve saygı duyduğum annem Ayşe Hürriyet KARAKIŞ, dedem Necati KARAKIŞ ve anneannem Bercis KARAKIŞ'a çok teşekkür ederim. Yine her zaman desteklerini esirgemeyen ablam Ayşegül MUTLUAY BİLGİÇ ve kardeşim Nazlı MUTLUAY'a teşekkür ederim.

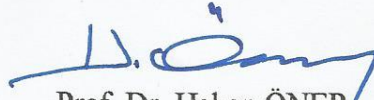
## BEYAN

“Farelerde Preimplantasyon Gelişim Sürecinde c-Abl Proteinin Lokalizasyonu” başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

29/12/2014

Duygu MUTLUAY

## ONAY



Prof. Dr. Hakan ÖNER

Danışman

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇ KAPAK</b>	i
<b>KABUL VE ONAY</b>	ii
<b>TEŞEKKÜR</b>	iii
<b>BEYAN</b>	iv
<b>İÇİNDEKİLER</b>	v
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>TÜRKÇE ÖZET</b>	xi
<b>İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)</b>	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Foliküler Gelişme	3
2.1.2. Genital Siklus ve Ovulasyon	6
2.1.3. Farelerde Oosit Maturasyonu ve Kutup Cisimciği Oluşumu	9
2.2. Döllenme (Fertilizasyon)	12
2.3. Erken Embriyo Gelişimi (Preimplantasyon)	15
2.3.1. Trofoektoderm Oluşumu ve Epitelizasyon	17
2.3.2. Trofoektoderm Hücrelerinin Gelişimi	19
2.3.3. Embriyo Gelişiminde İç-Dış Model	20
2.3.3.1. Hücre Kutuplaşması (Polarite) Modeli	20
2.4. Abelson Tirozin Kinaz (c-Abl) Proteini	24
2.4.1. Abl Proteinin Fare Gelişimindeki Rolü	26
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	28
3.1. Gereç	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Embriyo Toplanması	28
3.2.2. Oositlerin Toplanması	30
3.2.3. Parthenogenez ile Oosit	31

3.2.4. İmmunocerrahi Yöntemi ile ICM İzolasyonu	31
3.2.5. İmmunfloresan Boyama	32
3.2.6. Mikroskop ve Görüntü Analizleri Aktivasyonu	33
<b>4. BULGULAR</b>	<b>35</b>
4.1. c-Abl Proteinleri İle Mekik İplikleri Arasındaki İlişki	35
4.2. c-Abl Proteinin MII Oositlerde ve Preimplantasyon Dönemi Embriyolarında Lokalizasyonu	49
4.2.1. c-Abl Proteinin MII Oositlerde Lokalizasyonu	49
4.2.2. c-Abl Proteinin İki Hücreli Embriyolarda Lokalizasyonu	53
4.2.3. c-Abl Proteinin Sekiz Hücreli Embriyolarda Lokalizasyonu	53
4.2.4. c-Abl Proteinin Morula Hücrelerinde Lokalizasyonu	57
4.2.5. c-Abl Proteinin Orta Blastosist Evresindeki Embriyolarda Lokalizasyonu	58
4.3.İmmunocerrahi Yöntemi İle İzole Edilen ICM'lerde c-Abl Proteini Lokalizasyonu	63
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>66</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>74</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>75</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>96</b>
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>97</b>



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 2.1.</b>	Fare oositlerinde kutup hücresi oluşumu.	12
<b>Şekil 2.2.</b>	Fare embriyolarında fertilizasyon sonrası ilk üç gün boyunca gerçekleşen morfolojik değişimler	16
<b>Şekil 2.3.</b>	Abl kinazların modüler domainlerinin şematik gösterimi.	25
<b>Şekil 3.1.</b>	Fareden oviduktun disseke edilmesi.	29
<b>Şekil 3.2.</b>	Oviduktun yıkanması ve yıkamada kullanılan malzemeler.	30
<b>Şekil 4.1.</b>	Fare oositlerinde aktivasyon öncesi (0.saat) ve sonrasında sonrası (1.-2.-3.-6. saat) (c-19) ve $\beta$ -tubulin lokalizasyonunu gösteren konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	37
<b>Şekil 4.2.</b>	Fare oositlerinde aktivasyon öncesi ve sonrasında sonrası (1.-2.-3.-6. saat) (c-19) ve $\beta$ -tubulin lokalizasyonunu gösteren konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	38
<b>Şekil 4.3.</b>	c-Abl (c-19) ve $\beta$ -tubulin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonu.	39
<b>Şekil 4.4.</b>	c-Abl (c-19) proteinin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	39
<b>Şekil 4.5.</b>	c-Abl (c-19) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (1.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	40
<b>Şekil 4.6.</b>	c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (1.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	40
<b>Şekil 4.7.</b>	c-Abl (c-19) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	41
<b>Şekil 4.8.</b>	c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	41
<b>Şekil 4.9.</b>	c-Abl (c-19) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (3.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	42
<b>Şekil 4.10.</b>	c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (3.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	42
<b>Şekil 4.11.</b>	c-Abl (c-19) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (6.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	43

<b>Şekil 4.12.</b>	c-Abl (c-19) proteininin, aktivasyon sonrası (6.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	43
<b>Şekil 4.13.</b>	c-Abl (k-12) ve $\beta$ -tubulin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonu.	44
<b>Şekil 4.14.</b>	c-Abl (k-12) proteininin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	44
<b>Şekil 4.15.</b>	c-Abl (k-12) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (1.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	45
<b>Şekil 4.16.</b>	c-Abl (k-12) proteininin, aktivasyon sonrası (1.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	45
<b>Şekil 4.17.</b>	c-Abl (k-12) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	46
<b>Şekil 4.18.</b>	c-Abl (k-12) proteininin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	46
<b>Şekil 4.19.</b>	c-Abl (k-12) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (3.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.	47
<b>Şekil 4.20.</b>	c-Abl (k-12) proteininin, aktivasyon sonrası (3.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi	47
<b>Şekil 4.21.</b>	c-Abl (k-12) ve $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (6.saat) oositlerdeki lokalizasyonu	48
<b>Şekil 4.22.</b>	c-Abl (k-12) proteininin, aktivasyon sonrası (6.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.	48
<b>Şekil 4.23.</b>	Primer antikör, rabbit anti- c-Abl (c-19) varlığında (pozitif kontrol) ve yokluğunda (negatif kontrol) immunfloresan olarak boyanan oosit ve 8 hücreli embriyoların konfokal mikroskop görüntüleri.	51
<b>Şekil 4.24.</b>	Primer antikör, rabbit anti- c-Abl (k-12) varlığında (pozitif kontrol) ve yokluğunda (negatif kontrol) immunfloresan olarak boyanan oosit ve 8 hücreli embriyoların konfokal mikroskop görüntüleri.	52
<b>Şekil 4.25.</b>	c-Abl (c-19) ve aktin proteinlerinin ve Metafaz II oosit ve 2 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit	54

	görüntüleri.	
<b>Şekil 4.26.</b>	c-Abl (k-12) ve aktin proteinlerinin ve Metafaz II oosit ve 2 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	55
<b>Şekil 4.27.</b>	c-Abl (c-19) ve aktin proteinlerinin erken, orta, geç 8 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	56
<b>Şekil 4.28.</b>	c-Abl (k-12) ve aktin proteinlerinin erken, orta ve geç 8 hücreli embriyoda lokalizasyonunun, konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	57
<b>Şekil 4.29.</b>	c-Abl (c-19) proteini ve aktin mikrofilamentlerinin, morula ve E 3.5 blastosistlerdeki lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	59
<b>Şekil 4.30.</b>	Cdx-2, Oct-4, c-Abl (c-19) ile immunfloresan olarak boyanan E 3.5 blastosistin konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	60
<b>Şekil 4.31.</b>	c-Abl (k-12) ve aktin mikrofilamentlerinin, Morula ve E3.5 blastosistlerdeki lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	61
<b>Şekil 4.32.</b>	Cdx-2, Oct-4, c-Abl (k-12) proteinleri ile immunfloresan olarak boyanan E 3.5 blastosistin konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	62
<b>Şekil 4.33.</b>	İzole edilen ICM'lerde c-Abl (c-19) ve aktin filamentleri lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	64
<b>Şekil 4.34.</b>	İzole edilen ICM'lerde c-Abl (k-12) ve aktin filamentleri lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.	65

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>GnRH:</b>	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<b>FSH:</b>	Folikül Uyarıcı Hormonu
<b>LH:</b>	Luteinleştirici Hormon
<b>LTH::</b>	Luteotropik Hormonu
<b>OMI:</b>	Oosit Maturasyon İnhibitörü
<b>ZP</b>	Zona Pellusida
<b>MII:</b>	Metafaz II
<b>MTOCs:</b>	Mikrotübül Organize Eden Merkezler
<b>MAP:</b>	Mikrotübül ilişkili protein
<b>GV:</b>	Germinal Vezikül
<b>TE:</b>	Trofoektoderm
<b>ICM:</b>	İç Hücre Kitlesi
<b>E 2.5:</b>	İki buçukuncu Embriyonik Gün
<b>E 3.5:</b>	Üç buçukuncu Embriyonik Gün
<b>Em:</b>	Embriyonik
<b>Ab:</b>	Abembriyonik
<b>AJ:</b>	Adezyon bağlantı kompleksleri
<b>ZO:</b>	Zonula Okludens
<b>ES:</b>	Embriyonik Kök Hücre
<b>Con A:</b>	Canavalin A
<b>PKC:</b>	Protein Kinaz C
<b>PARD3:</b>	Par-3 ailesi Hücre Polarite Düzenleyicisi
<b>MARK:</b>	Mikrotubul Afiniteli Düzenleyici Kinaz
<b>Cdx-2:</b>	Caudal Type Homeobox 2 Geni
<b>Oct-4:</b>	POU Domain Sınıfı 5, Transkripsiyon Faktörü 1
<b>(Pou5f1)</b>	
<b>c-Abl:</b>	Abelson Tirozin Kinaz Proteini
<b>Nanog:</b>	Nanog Homeobox
<b>PMSG:</b>	Gebe Kısrak Serummu
<b>hCG:</b>	Human Chorionic Gonadotropin

**T. C.**  
**Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**  
**Doktora Tezi**  
**Farelerde preimplantasyon gelişim sürecinde c-Abl proteinin lokalizasyonu**  
**Duygu MUTLUAY**  
**Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**  
**Tez Danışmanları**  
**Prof. Dr. Hakan ÖNER, Yrd. Doç. Dr. Vernadeth ALARCON**  
**BURDUR – 2014**

**ÖZET**

Bu çalışma ile, non-reseptör protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan Abelson Tyrosine Kinase (c-Abl) proteinin farelerde yumurta ve preimplantasyon embriyo gelişimindeki rollerinin anlaşılması ve lokalizasyonun belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla oositler parthenogenez ile aktive edildi. Aktivasyon öncesi (0. saat) ve sonrasında farklı saatlerde (1., 2., 3., ve 6. saatler) toplanan yumurtalar tespit edildi, immunofloresan boyama uygulandı ve hem c-Abl lokalizasyonu hem de c-Abl proteinleri ile mekik iplikleri arasındaki ilişki araştırıldı. Sonrasında 2 hücreli, 8 hücreli, morula ve orta blastosist evresinde bulunan embriyolarda c-Abl lokalizasyonu araştırıldı. Ayrıca orta blastosist evresinde bulunan blastosistlerden immunocerrahi yöntemi ile iç hücre kitlesi (ICM) hücreleri izole edilerek bu hücrelerdeki c-Abl lokalizasyonuna bakıldı. Yapılan immunofloresan boyamalar sonucu elde edilen floresan ve konfokal lazer tarama mikroskop görüntüleri değerlendirildi. Metafaz II oositlerde ve preimplantasyon dönemi embriyolarının tümünde immunofloresan boyama ile tespit edilen c-Abl varlığı bu proteinin aktivasyon öncesinde oositlerde, sonrasında ise embriyolarda bir takım roller üstlendiğini gösterdi. Bu çalışma ile c-Abl proteinin yumurta korteksinde asimetrik bir lokalizasyona sahip olduğu belirlenmiştir ve bu bulgu c-Abl proteinin oositlerde mekik ipliği, kutup hücresi oluşumunda ve mekik ipliği oryantasyonunda önemli roller üstlendiğini göstermiştir. Ayrıca, implantasyondan ve plasantasyondan sorumlu trofektoderm hücrelerinin plazma membranında c-Abl protein

lokalizasyonuna sahip olduğu ve bu veriye dayanarak c-Abl proteinin trofektoderm oluşumunda bir takım roller üstlendiği anlaşılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** c-Abl, Fare gelişimi, Preimplantasyon.

**Mehmet Akif Ersoy University**

**Institute of Health Science**

**Doctora Thesis**

**Localization of c-Abl protein in preimplantation mouse development**

**Duygu MUTLUAY**

**Faculty of Veterinary Medicine Department of Histology and Embryology**

**Supervisor**

**Prof. Dr. Hakan ÖNER, Assist. Prof. Dr. Vernadeth ALARCON**

**BURDUR – 2014**

**ABSTRACT**

In this thesis, we aimed to understand the role and localization of c-Abl, the Abelson family of non-receptor tyrosine kinases, in eggs and preimplantation of mouse development. For this purpose, oocytes were artificially activated by parthenogenetic activation. Samples collected before (0 h) and after (1h, 2h, 3h, 6h) the activation procedure were fixed and immunofluorescently stained with c-Abl protein. And we looked for the localization of c-Abl proteins and relationships between c-Abl and spindle. After that we studied the localization of c-Abl proteins on 2 cell, 8 cell, morula and mid blastosist stage embryos. In addition, inner cell mass (ICM) was isolated by immunosurgery and c-Abl localization was demonstrated on ICMs. The oocytes and embryos were imaged and assessed, using an fluorescence microscope and confocal laser scanning microscope. The presence of cAbl protein was examined in Metaphase II oocytes and all embryos from preimplantation development shows that c-Abl proteins have some roles on oocytes prior to activation and on embryos after the activation. In this study, c-Abl protein was determined to have asymmetrical localization in the egg cortex, suggesting possible roles in positioning of the metaphase II spindle and polar body formation and orientation. Besides that, cell membrane enrichment for c-Abl in trophectoderm, the tissue responsible for implantation and placentation, suggesting a possible role in trophectoderm formation.

**Key words:** c-Abl, Mouse development, Preimplantation.

## 1. GİRİŞ

Abelson Tyrosine Kinase (c-Abl) geni, non-reseptör protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir (84) ve Abelson Murine Leukemia Virüs proteinin hücrel homologu olarak tanımlanmıştır (1). Non-reseptör tirozin kinaz, Abl ailesi c-Abl (Abelson tyrosine kinaz; Abl-1) ve onun paralogu olan Arg (Abl-iliskili gen; ABL-2) içerir (53). Abl-1 ilk kez bundan 30 yıl önce Abelson Murine Leukaemia virüsünde (42) onkojen olarak ve sonrasında insan lökemisinde onkojenle ilişkili kromozom translokasyonlarında bildirilmiştir (9). Abl-1 ve Abl-2 genlerini içeren Abl protein kinaz ailesi, hücre büyümesi, hücrenin hayatta kalması, invazyon, adezyon ve migrasyon gibi hücre için önemli olayları kontrol eden sinyal yollarında rol oynar (12, 19, 46, 90, 122).

c-Abl proteini çekirdek, sitoplazma, mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre korteksinde lokalize olmuştur. Bu lokalizasyon sayesinde sinyalizasyon adaptörleri, kinazlar, fosfatazlar, hücre döngüsü düzenleyicileri, transkripsiyon faktörleri ve hücre iskeleti proteinleri gibi çeşitli hücrel proteinler ile etkileşime geçerler. Dahası c-Abl proteinleri hücre büyümesinin düzenlenmesi, oksidatif stres, DNA hasarına verilen cevaplar ve aktin dinamikleri gibi çeşitli hücrel süreçlerin fonksiyonundan sorumludur (54).

c-Abl geni tıbbi olarak da önemli bir gendir. Çünkü 22. ve 9. kromozomlar (Philadelphia kromozomu olarak bilinir) arasında Abl-1'in ilk ekson dizisi ile BCR genden gelen dizilerin yer değiştirmesi ile oluşan translokasyon, Bcr-Abl füzyon proteinin ekspresyonu ile sonuçlanır. Hücre tipine bağlı olarak Bcr-Abl ekspresyonu, proliferasyonda artış, morfolojikal dönüşüm ve büyüme faktörü/adezyon bağımlılığının ortadan kalkması ile sonuçlanır (22, 43, 167). İnsanlarda kronik myeloid lökemi ve akut lenfositik lökemi hastalarının çoğunlukla rastlantısal olarak Bcr-Abl ekspresyonu ile bağlantılı olduğu görülmüştür (179). Bu nedenle Abl protein kinaz ailesi ile ilgili çalışmaların çoğu kanserle ilişkilendirilen ve tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri (örneğin, imatinib) çalışmalarıdır (136).



Özellikle tümör (lösemi) gelişiminde önemli olan bu genle ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ancak c-Abl'ın yumurtaya olan etkisi ve preimplantasyon dönemindeki görevleri ya da lokalizasyonu üzerine çok az çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmalar kapsamlı ve fazla aydınlatıcı olmadığından yaptığımız çalışma bu alanda ilk olma özelliği taşımaktadır.

Bu tez çalışması ile c-Abl ailesinin preimplantasyon dönemindeki rolünün ve moleküler mekanizmalarının açıklanmasının yanı sıra, hem kanser tedavisi gören kadınlarda üreme ve fertilitate problemlerinin anlaşılmasına hem de birçok önemli yolakta görev alan bu genin mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olunması amaçlanmaktadır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Ovaryum**

Ovaryum, oositleri meydana getiren, salgıladığı hormonlarla dişi genital sistemin diğer organları üzerinde etkili olan ve genital siklusun düzenlenmesini sağlayan bir organdır. Ovaryumlar, hem endokrin (östrojen ve progesteron hormonları salgılar) hem ekzokrin (oosit 2' yi dışarı atar) fonksiyona sahiptirler. Memelilerde genellikle oval şekillidir ve peritonun viseral yaprağından farklılaşan bir örtü ile sarıdır. Bu örtü germinal epitel olarak adlandırılır. Germinal epitel gelişmenin başlangıcında tek katlı kübiktir, ancak yaşın ilerlemesi ile birlikte tek katlı yassı epitele dönüşür. Epitel örtünün altında tunika albuginea olarak isimlendirilen fibröz bir bağ doku yer almaktadır. Ovaryum çoğu hayvanda dışta korteks içte medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Korteks, organın fonksiyon gören bölümüdür. Burada çok sayıda gelişme aşamasının çeşitli evrelerinde bulunan foliküller, korpus luteum, intersitisyel hücreler ve bağ dokuya ait unsurlar bulunur. Medulla da ise kollajen ve elastik iplikler, düz kas telleri, kan ve lenf damarları, sinir telleri yer alır. Ovaryum arterleri, organa hilus bölgesinden girerek medullaya dağılırlar ve korteksi besleyen pleksüsleri şekillendirirler (119).

#### **2.1.1. Foliküler Gelişme**

Ovaryumun korteks bölgesinde, oosit içeren olgunlaşma ve dejenerasyon sürecinin farklı evrelerinde, farklı boyutlarda ovaryum folikülleri bulunur. Doğumda, tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadır. Ancak bölünme metafaz safhasıyla devam etmek yerine, çekirdek kromatininin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği birinci mayoz bölünmenin profaz safhasının diyakinez dönemi olarak adlandırılan istirahat döneminde puberteye kadar beklerler. Bu süre boyunca oositin olgunlaşması folikül hücreleri tarafından salgılanan ve oosit olgunlaşmasını inhibe eden bir madde (OMI, Oosit Maturasyon İnhibitörü) ile sağlanır (133). Doğumla birlikte bütün oogonyumlar, birinci mayoz bölünmenin profazına kadar ilerlemiş olan primer oositlere farklılaşırlar (3).

Primer oosit (Oosit I), çekirdekçiği belirgin olarak ayırt edilebilen bir çekirdeğe sahiptir. Primer oositi bir sıra yassı epitel hücrelerinden oluşan folikül

epitel hücreleri çevreler. Ovaryum korteksinde, dinlenme sürecinde olan primordiyal foliküller, primer ve sekonder olarak adlandırılan olgunlaşmakta olan foliküller ve olgun-Graaf folikülleri gibi değişik evrelerde olan foliküller bulunur (118).

Primordiyal foliküller: Oosit I ve onu çevreleyen tek katlı yassı epitel hücrelerinin oluşturduğu, kortekste bulunan foliküllerdir. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan Folikül Uyarıcı Hormonu'nun (FSH) etkisiyle bu foliküller gelişmeye başlar. Bunlardan genellikle bir tanesi baskın duruma geçer ve primer folikül olmak üzere bir sonraki evreye geçer (119).

Primer Foliküller: Puberteden itibaren FSH'nın salınmasıyla gelişmeye başlayan primordiyal foliküler hücreler tek katlı yassı epitelden tek katlı kübik epitele dönüşür ve "tek tabakalı primer folikülleri" oluştururlar (74).

Foliküler hücreler mitoz bölünmeyle çoğalarak granuloza hücresi adını alırlar. Bu haliyle foliküle "çok tabakalı primer folikül" denir. Bu folikülden itibaren granuloza hücreleri ile oosit tarafından salgılanan ve üç farklı glikoproteinden oluşan, oosit etrafında parlak ve homojen bir membran olan zona pellusida meydana gelir. Zona pellusida, oosit ile folikülün granuloza hücreleri arasında kalın bir ekstrasellüler tabaka oluşturur. Oosit ile granuloza hücrelerinden çıkan ince mikrovilluslar, zona pellusida içine uzanır (74).

Granuloza hücreleri kendilerini çevrelerindeki, teka folikülü olarak bilinen stromal hücrelerden ayıran bir bazal membran üzerine otururlar. Folikül büyümeye devam ederken teka folikülünün hücreleri, içte damardan zengin, salgı yapan hücrelerden oluşan "teka interna" ve dışta da fibroblastlar ve bağ dokusu ipliklerinin oluşturduğu "teka eksterna" adı verilen iki belirgin tabakaya dönüşür (133).

Sekonder Foliküller: Folikül geliştikçe granuloza hücreleri 8-12 tabakaya ulaşır ve bu hücrelerin arasında küçük, düzensiz, hyaluronik asit ve proteoglikan içeren *Call Eksner* adı verilen boşluklar meydana gelir. Bu sıvı içeren ufak boşluklar birleşerek antrum adı verilen daha büyük bir boşluk oluştururlar. Bu foliküller artık, "sekonder folikül" ya da antral folikül olarak adlandırılırlar. Antrum içerisindeki saydam visköz sıvı, granuloza hücreleri tarafından üretilen steroid hormonlardan

(östrojen, progesteron ve androjen), proteolitik enzimlerden, inhibin, aktivitin (LH ve FSH salınımını kontrol eder) ve hiyaluronik asitten zengindir (118).

Ovulasyon yaklaştıkça antral sıvı miktarı artar ve içerisinde prostoglandinler (PGF2 $\alpha$  ve PGE2) birikmeye başlar. Gelişmekte olan ovaryum folikülleri steroid hormonlar östradiol, progesteron ve androjen salgırlar. Büyük antral foliküllerde folliküler sıvı, foliküler fazda yüksek düzeyde östradiol-17 $\beta$  içermekte, ovulasyona yaklaştıkça progesteronda artış meydana gelmektedir. Folikülün steroid hormonları salgılaması, FSH'ın granuloza, Luteinleştirici Hormon'un (LH) teka hücreleri üzerinde olan etkisine bağlıdır. Teka hücrelerinde FSH reseptörleri bulunmadığından FSH sadece granuloza hücrelerine etki eder. LH ise hem granuloza hem teka hücreleri üzerine etkilidir. Teka hücreleri LH'nın etkisi altında androjenleri (testosteron ve androstenedione) üretirler ki, bunlar da bazal membranı geçerek granuloza içine yayılırlar ve östrojene (östradiol-17 $\beta$ ) çevrilirler. Östrojenler granuloza hücreleri üzerine uyarıcı etki yaparak mitotik bölünmenin devam etmesini sağlarlar. İn vitro çalışmalar teka hücrelerinin başlıca testosteron salgıladığını, granuloza hücrelerinin testosteronu östradiole çevirdiğini göstermiştir (74, 118).

Teka interna hücreleri vaskülarize olur ve granuloza hücreleri tarafından östrojenlerin yapımında kullanılmak üzere steroid yapıdaki androstenedion salgılamaya başlarlar. Teka internanın dışında bir tabaka şeklinde farklılanan, teka eksterna hücreleri, stromadaki bağ doku hücreleri ile devam ederler. Teka interna ile eksterna arasındaki sınır belli değilken teka interna ve granuloza hücreleri arasında bir bazal membran olduğundan sınır bellidir (118).

Tersiyer Foliküller: Gelişimin son aşamasında olan foliküllerdir ve içerisindeki oositin çapı maksimum hacime ulaşır. Primer oosit granuloza hücre tabakasının yaptığı bir kalınlaşma olan ve antruma doğru bir çıkıntı yapan "kumulüs ooforus" içine yerleşmiş durumdadır. Oositi çevreleyen bir veya daha fazla tabakalı granuloza hücreleri artık "korona radyata" olarak adlandırılır ve ovulasyondan sonra da oosite eşlik eder. Folikülün en büyük kısmını oluşturan antrum, çok katlı granuloza hücreleri ile sarıdır. Bunlarında dışında teka eksterna ve teka interna tabakaları yer almaktadır. Sonrasında korona radyata ile sarılı olan oosit, foliküler duvardan ayrılır ve antrum içerisinde serbestçe yüzer hale gelir (118).

Her ovarial siklusta bir grup folikül gelişmeye başlasa da bunlardan bir tanesi tam anlamıyla olgunlaşırken diğerleri dejenere olarak atretik hale gelirler. Folikül olgunluğa eriştiğinde, primer oosit I.mayoz bölünmesini tamamlayarak, büyüklükleri farklı ancak her biri haploid sayıda çift kromatid içeren iki yavru hücre oluşturur. Bölünme sonunda sitoplazmanın neredeyse tamamını oluşturan haploid kromozomlu sekonder oosit (oosit II) ve pratik olarak hiç sitoplazma içermeyen 1. polar cisim meydana gelir. Polar cisim, oositin hücre membranıyla zona pellusidası arasında yer alan perivitellin aralıkta yer alır (133). Birinci mayoz bölünme ve 1. polar cismin atılması memelilerin çoğunda ovulasyondan birkaç saat önce tamamlanır.

Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasından sonra ve sekonder oositin çekirdeği dinlenme dönemine geçmeden önce, hücre DNA replikasyonu yapmadan ikinci olgunlaşma bölünmesine (II. mayoz) girer (119). Sekonder oositte bölünme mekiği oluşup, kromozomlar metafaz plağında dizildikleri sırada (metafaz II'de) ovulasyon gerçekleşir ve oosit dışarı atılır. Sekonder oosit, fertilizasyon gerçekleşinceye kadar ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde bekler. Böylece ikinci mayoz bölünme oositin bir spermium tarafından döllenmesinden sonra tamamlanır. Döllenmeyen oosit 24 saat içerisinde dejenere olur. Birinci mayoz bölünmede oluşan polar cismin ikinci kez bölünüp bölünmediği kesin değildir ancak sonuçta döllenmiş oosite eşlik eden 3 adet polar cisim bulunmaktadır (133).

### **2.1.2. Genital Siklus ve Ovulasyon**

Memelilerde ovaryum'un siklik faaliyetleri türlere göre değişmekle birlikte, cinsel olgunluğa erişince başlar ve değişik sürelerde düzene girer. Bu cinsel olgunluğa erişmeye, ergenlik veya puberta ismi verilir. Memelilerde oogenezis embriyonal hayatla başlar, hayvan puberteye ulaşınca kadar dinlenme dönemine girer ve I. mayoz'un profaz safhasının diyakinez döneminde primer oosit olarak bekler (3).

Puberteye ulaşan bir dişide, hipotalamus ve hipofiz bezinin kontrolü altında ovaryum ve uterusu bazı değişiklikler meydana gelir. Ovaryumda meydana gelen değişiklikler oogenezis ve ovulasyon ile ilgili olup bunlara ovarial siklus, uterusu

meydana gelen değişikliklere ise uterin al siklus denir. Her ikisine birden genital siklus ya da seksüel siklus adı verilir (119).

Puberte ile başlayan seksüel siklusun sürekliliği için hipotalamustan uyarıcı faktörler ya da inhibe edici faktörlerin salınımına gereksinim vardır. Hayvan, pubertaya ulaştıktan sonra hipotalamustan salgılanan Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) kana verilerek adenohipofize gider ve buradan FSH ve LH'ın salgılanmasını uyarır. FSH, ovaryumdaki sekonder ve tersiyer folliküllerin gelişmesine ve bunun sonucunda da östrojen salgısının artmasına neden olur. Östrojen hormonu, folikül epitel hücrelerinden, folikül dışında teka internadan ve intersitisyel hücrelerden salgılanır. Östrojenler kana verildikten sonra hedef organlar olan ovaryum, uterus ve vaginaya giderler. Östrojenlerin etkisiyle uterus mukozası kalınlaşır, vaskülarizasyonu artar, böylelikle çiftleşme ve dölleme için uygun ortam hazırlanmış olur (119). Östrojen dolaşımında belirli bir konsantrasyona ulaştıktan sonra hipofiz bezine ters etki yaparak FSH'ın salgılanmasını durdurur ve LH'ın salgılanmasını uyarır. Hipofiz ayrıca Luteotropik Hormonu (LTH) da salgılamaya başlar. Kan yolu ile ovaryuma gelen LH'ın etkisiyle Graaf folikülü patlar ve "ovulasyon" şekillenir (74, 158).

Ovulasyon, olgun folikül duvarının yırtılması ve oositin serbest kalmasıdır. Serbest kalan sekonder oosit oviduktun genişlemiş ucu tarafından yakalanır (74).

Ovulasyon için uyarıyı oluşturan, büyüyen folikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeylerine yanıt olarak ön hipofizden salgılanan LH hormonundaki ani artıştır. Kandaki LH seviyesindeki artıştan birkaç dakika sonra kan akımında bir artış meydana gelir ve plazma proteinleri kapiller ve post kapiller venüllerden sızarak ödeme yol açarlar. Lokal olarak, prostoglandinler, histamin, vazopressin ve kolajenaz salıverilir. Granuloza hücreleri daha fazla miktarda hyaluronik asit üretir. Hyaluronik asit korona radiatayı oluşturan granuloza hücrelerinde bulunur ve kumulus ooforus hücrelerinin birbirine yapışmasını sağlayan makromoleküllerden biridir. Folikül duvarının küçük bir kısmı, tunika albugineadaki kollagen yıkımı, iskemi ve bazı hücrelerin ölmesi sebebiyle zayıflar. Foliküler sıvı basıncındaki artış ve büyük ihtimalle düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıflama, folikül dış duvarının yırtılmasına ve ovulasyona yol açar. Ovulasyonun

yaklaştığının bir belirtisi, folikül yüzeyinde stigmanın görülmesidir. Stigma kan akımının durması sonucu folikül duvarının renginde ve saydamlığında şekillenen lokal değişikliktir (74).

Folikül duvarının yırtılmasıyla, sekonder oosit ve birinci kutup cismi, zona pellusida, korona radiata ve bir miktar folikül sıvısıyla birlikte ovaryumu terk eder ve tuba uterinanın açık ucundan içeri girer. Oosit burada döllenebilir, insanlarda eğer ilk 24 saat içerisinde döllenmezse oosit bozulur ve ortadan kalkar (74). Tuba uterinanın fimbriaları tarafından oositlerin daha kolay toplanabilmesini sağlayan korona radiata hücreleri sığır haricindeki bütün türlerde spermatozoonla temas aşamasına kadar kalırken ineklerde ovulasyon anında kaybolur (3).

İnekler hariç diğer evcil hayvanlarda ovulasyon östrus içinde veya hemen bitiminde olurken sadece ineklerde östrus bittikten sonra metöstrus döneminde gerçekleşir (3).

Ovulasyon sonrasında östrojen miktarı azalır. Patlayan folikülün yerine folikülün granuloza ve teka hücreleri, lipid ve sarı lipokrom pigmenti (lutein) içeren ve korpus luteum olarak isimlendirilen geçici bir iç salgı bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Folikül boşluğunda bir miktar kanama olur ve oluşan bu kan burada pıhtılaşır ve sonrasında yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte zamanla ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmını oluşturur (74).

Ovulasyon sonrasında granuloza hücreleri bölünmezler ancak boyutlarında büyük bir artış gözlenir. Bu yapılar korpus luteum parankimasının yaklaşık %80'ini oluşturur ve granuloza lutein hücreleri olarak adlandırılır. Bu hücreler steroid salgılayan hücrelerin özelliklerine sahiptirler (74).

Teka internadaki hücreler ise teka lutein hücrelerini oluştururlar ve korpus luteum duvarının kıvrımlarına yerleşirler. Bu hücrelerin yapısı granuloza lutein hücrelerine benzer ancak onlardan daha küçüktürler ve daha koyu boyanırlar (74).

Ovulasyon öncesinde salgılanan LH uyarımı sayesinde yumurtayı atan folikül hücreleri yeniden düzenlenir ve korpus luteum oluşumu şekillenir. Yine LH

uyarımıyla korpus luteum hücrelerinin enzimlerinde değişiklik olur ve korpus luteum, progesteron ve östrojen salgılar (74). Korpus luteum inekte 14-18 gün aktif olarak progesteron salgılar. Progesteron hormonu olumsuz geri tepkiyle hipotalamus ve hipofizi baskı altında tutarak GnRH, FSH ve LH'nın salgılanmasını engeller. Ayrıca uterus kontraksiyonlarını engeller, endometriyum bezlerini uyararak onların gelişmesini, uterus sütü salgılanmasını ve ruminantlarda servikal mukusu (çara) koyulaştırarak serviksin kapanmasını sağlar. Böylece östrojen ve progesteron birlikte etki yaparak dişiyi gebeliğe hazırlarlar (3, 56).

Korpus luteumun kaderi gebeliğin şekillenip şekillenmemesine bağlıdır. Döllenme gerçekleşmez ise, korpus luteum periodikum (korpus luteum siklikum) olarak adlandırılır ve yavaş yavaş dejenere olur. Korpus luteumun yıkılmasından sonra yerinde bir nedbe dokusu şekillenir. Korpus luteumun yerinde oluşan bu beyazımsı nedbe dokusuna korpus albicans denilir. Fertilizasyon gerçekleşirse korpus luteumu gelişir ve gebelik boyunca aktivitesine devam eder ve korpus luteum graviditatis şekillenir (119).

Döllenmenin gerçekleşmemesi durumunda ise hipofizden salgılanan oksitosin ve ovaryumdan salgılanan östrojen, memelilerde siklusun 13-16. gününden itibaren endometriyumdan prostaglandin (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) salgısını uyarırlar (3). Kan yolu (genel dolaşıma girerek ya da ovaryum arterleri aracılığı) ile ovaryumlara gelen prostaglandin, korpus luteumu luteolizise uğratarak (gerileterek) kanda progesteron ve östrojen düzeylerinin hızla düşmesine sebep olur. Prostaglandin, uterus-ovaryum damarlarının daralmasına sebep olur ve luteal hücreler beslenemez, böylece uterus mukozası kabarık ve kanlı durumunu kaybeder. İnsanda uterus mukozasının incilmesi yanında bir de kanama görülür; bu olaya menstruasyon denir. Menstruasyonda uterus mukozasının bir kısmı dökülür (118).

### **2.1.3.Farelerde Oosit Maturasyonu ve Kutup Cisimciği Oluşumu**

Memeli oositlerinde meydana gelen olgunlaşma bölünmesi olarak adlandırılan ve mayoz ile son bulan dönem, fonksiyonel gametlerin meydana gelmesi için çok önemlidir. Bu dönem sırasında DNA replikasyonunun intermediate fazı olmadan, oosit iki hücresel bölünmeye girer. Bu bölünmeler, oositin hücre iskeleti



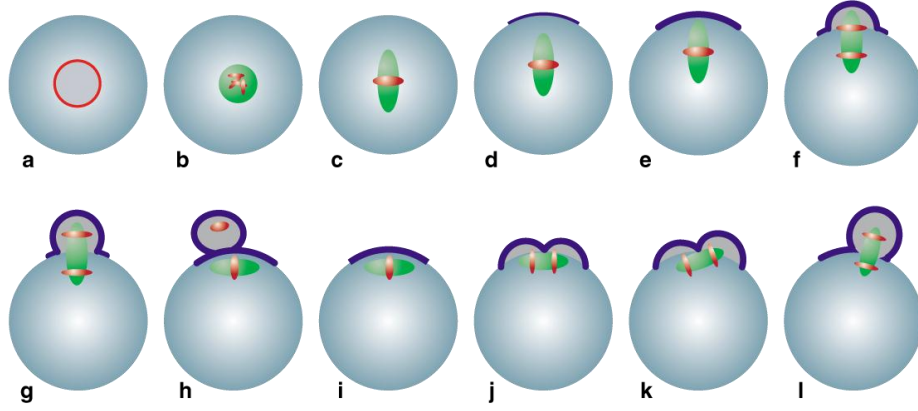
tarafından ve zaman ayarlı olarak düzenlenen bir dizi hücresele olayı içerir. Mikrotubuller mekik ipliklerini meydana getirirler ve birinci mayoz bölünme sırasında homolog kromozomları, ikinci mayoz bölünme sırasında da kardeş kromatidleri ayırırlar. Buna ek olarak, mikrotubuller ve aktin mikrofilamentler bu mayoz bölünmelerin asimetrisini kontrol ederler. Her iki bölünme sonucunda kutup cisimciği olarak adlandırılan küçük hücreler ile boyutunu koruyan, oogenezis boyunca tüm maternal yapıları içinde bulunduran büyük bir hücre olan oosit meydana gelir (14). Mitoz sırasında mekik demetleri sentrozomlar tarafından yönetilir (117). Mitozun başlangıcında tek sentrozom dublike olur ve iki sentrozom ayrılarak çekirdeğin zıt uçlarına göç ederler. Sonuç olarak çekirdek kılıfının yıkılması ile büyüyen mikrotubuller her iki sentrozomdan dışarı çıkarlar ve kromozomlarla etkileşime geçerek hızlıca bipolar mekiği organize ederler. Sentrozomlardan ve mikrotubüllerden yoksun olan oositler sitoplazmada mikrotübül organize eden merkezler (MTOCs) adı verilen farklı alanlarda polimerize olurlar. Sitoplazmada birçok MTOCs'ın dağılık olarak bulunduğu fare oositlerinde, kromozomlar mekik demeti oluşumuna öncülük eder. MI'in başlangıcında germinal vesikülün yıkılmasından hemen sonra MTOC'lar tercihen kromozomların civarında aktive olurlar, kuvvetlenirler ve mikrotubuller tercihen bu alanda stabilize olurlar. Başta rastgele oryante olan büyüyen mikrotubuluslar aşama kaydederek kromozomlar etrafında bipolar olarak organize olmaya başlarlar. Yapılan çalışmalar, fare oositlerinde, mikrotubullerin kromozom yokluğunda, motor proteinlerin hareketleri ve mikrotübül ilişkili proteinler (MAPs) sebebiyle bipolar yapılar, polimerize ve organize olma potansiyeline sahip olduklarını ve bu özelliğin mekik ipliği oluşumunda esansiyel bir rol oynadığını göstermiştir (14).

Fare oositlerinde mekik ipliğinin eksantrik pozisyonu oosit korteksinin yeniden düzenlenmesi ile ilişkilidir. Bu kortikal alan mekik ipliği migrasyonu sırasında ortaya çıkar ve MII boyunca mekik ipliği üzerinde devam eder. Bu yeniden düzenlenme, mikrovillusların lokal kaybı (67), aktin mikrofilamentlerin plazma membranı altında toplanması (91, 97) ve kortikal granüllerin çıkarılması (25) gibi olaylarla kendini belli eden bu sürecin görevi bilinmemektedir. Kortikal alanın, yeniden düzenlenmesi kromozomlarda bulunan aktin ağına bağlı iken, mikrotübül üzerindeki aktin ağına bağlı değildir (98, 99, 164, 168). Buna ek olarak kromozomlar

ile korteks arasında fiziksel bir etkileşimin olması gerekli değildir. Çünkü kromozomlar bu yeniden düzenlemeyi kendileri “mesafe” etkisi ile tetikleyebilmektedir (99).

Sonuç olarak, fare oositlerinde meydana gelen asimetrik bölünme, kromozomların aktin ağı düzenlenmesi üzerine olan rolüne bağlıdır. Buna ek olarak kromozomlar, “mesafe” etkisi ile kortikal aktin reorganizasyonuna aracılık eder. Mikrotubuller düşünüldüğünde, kromatin ile ilişkili motorlar, kromozomlar ve mekik ipliği mikrotubulleri arasındaki fiziksel etkileşimlere aracılık ederler. Buna ek olarak kromozomlar mekik demeti için gerekli olan aktivasyon faktörlerini de kontrol ederler (75, 76, 185). Bu benzerlikleri temel alarak Brunet ve ark. (14), kromozomların sitoplazma içinde “bölge işaretleyici” olarak davranarak hem mikrotubul hem de aktin mikrofilamentleri organize ettiklerini öngörmüşlerdir.

Birinci mayoz bölünme sırasında asimetrik hücre bölünmesi öncelikle oositin merkezinde oluşan ve oositin korteksine ulaşmış olan mekik ipliklerinde meydana gelir. Mayoz II, fertilizasyondan sonra kaldığı yerden devam eder, ikinci asimetrik bölünme ve kutup cisimciğinin çıkması ile son bulur. Mayoz bölünme sırasında asimetrik hücre bölünmesinin meydana gelebilmesi için iki önemli olayın gerçekleşmesi gerekmektedir. Bunlardan ilki mayoz mekiğinin hücre korteksine doğru göç etmesi, ikincisi kortikal bölgenin mekik ipliğinin üzerinde oluşmuş olmasıdır. Buna ek olarak ikinci mayoz bölünmede yarıklanmanın meydana gelmesi ve ikinci kutup cisimciğinin dışarı atılması için mekik ipliğinin rotasyon yapması gerekmektedir. Mekik tamamen döndüğünde, yarıklanma meydana gelir ve ikinci kutup cisimciği dışarıya çıkar ve mayoz bölünme tamamlanır (99).



**Şekil 2.1.** Fare oositlerinde kutup hücresi oluşumu. a) Ovaryum içerisinde, mayozun profaz evresinde beklemekte olan ve germinal vezikül (GV) olarak adlandırılan büyük bir çekirdeğe sahip olan oosit (GV; kırmızı); b,c) Mayoz I kaldığı yerden devam ettiği zaman, germinal vezikülün bozulması meydana gelir ve merkezde mekik ipliği meydana gelir (yeşil); d,e) Mekik ipliği uzun eksen boyunca kortekse en yakın olduğu yere göç eder. Aynı anda mikrovilluslardan yoksun, aktin filamentlerden zengin alan mekik ipliğinin üzerinde oluşur (mavi); f-h) Mekik ipliği kortekse ulaştığında, metafaz-anafaz geçişi tetiklenir ve aktinden zengin kortikal alanda birinci kutup cisimciği meydana gelir; i) Metafaz II’de bekleyen oositlerde, mekik ipliği mikrofilamentlerden zengin ve mikrovilluslardan yoksun (mavi) olan kortikal alanın altında yüzeye paralel olarak yerleşir; j) Fertilizasyondan sonra, iki set anafaz kromozomu üstünde bulunan kortikal alanda iki kortikal yumru meydana gelir; k) Bu yumruların bir tanesi geriye çekilirken diğeri genişler ve bu süreç mekik ipliğinin rotasyonu ile sonuçlanır; l) Mekik ipliği tamamen döndüğünde, yarıklanma meydana gelir ve ikinci kutup cisimciği dışarı çıkar (99).

## 2.2. Döllenme (Fertilizasyon)

Zigot, olgun dişi ve erkek cinsiyet hücrelerinin birleşmesiyle meydana gelmiş hücredir. Anne ve babadan gelen kromozomları ve genleri içerdiğinden bu birleşenlerin tüm özelliklerini yansıtacak saklı bir potansiyele sahiptir (24, 109).

Döllenme tuba uterinaların en uzun ve en geniş parçası olan ampullada, oosit ve spermatozoonun birbirine değmesi ile başlayan, maternal ve paternal kromozomların zigotun 1. mitoz bölünmesinin metafaz evresinde birbirleriyle karşılaşmaları ile sona eren karmaşık bir moleküler olaylar zinciridir (109).

Memelilerde koitus (çiftleşme) sonucunda birçok spermatozoon dişi genital kanalında biriktirilir. Bu alanlardan infundibulum, ampulla ve isthmus olarak üç

bölümü olan uterus tüplerine taşınır. İnfundibulum, ovaryuma yakın olan huni şekilli serbest ucunda da oositin tutulmasında önemli bir role sahip olan fimbria adı verilen uzantılardan oluşur. İnfundubulum iki bölgeye ayrılan tubular kısımla devam eder. Bunlardan birisi proksimal bölgede yer alan fertilizasyonun gerçekleştiği ampulladır. Bir diğeri ise uterusu açılan isthmustur (101).

Memeli yumurtaları uterus tüpünün silyaları üzerinde bulunan özel reseptörlerle tanınarak, silyalar tarafından toplanır. İnfundubulumdan toplanma sonrası, oviduktun ampulla bölgesine hareket ederler ve burada sperm tarafından döllemeyi beklerler. Bu bölgede neden ve nasıl beklediği bilinmemektedir. Pasif bir hareket döngüsü içinde kendisini tubal akıntıya bırakmış olan haploid kromozomlu sekonder oosit, zona pellisuda ve onun dışında yer alan daha fazla tabakalı granuloza hücrelerinin oluşturduğu, korona radiata tarafından kuşatılmış şekilde bulunur. Zona pellusida hücrenin plazma membranını çevreler ve oosit ile korona radiatayı birbirine bağlar. Proteoglikanlardan zengin olan bu yapı hem oosit hem de granuloza hücreleri tarafından sentezlenir. Bu hücre tabakalarıyla korunan oosit II'ye binlerce spermatozoon aktif hareketlerle ulaşır. Foliküle ait olan bu hücreler birbirlerine matriks ağıyla kenetlenmişlerdir. Bunların başında da zona pellusida gelir. Kumulus ooforus hücreleri, sitoplazmik uzantılarıyla zona pellusidaya geçerek oositin plazmalemmasına ulaşırlar ve gerekli maddeleri buradan sağlarlar. Yumurta fertilizasyon meydana gelinceye kadar kumulus kitlesi tarafından kuşatılmış şekilde bekler. Fertilizasyon sonrasında kumulus kitlesi kaybolur ve oviduktan, implantasyonun gerçekleşeceği alan olan uterusu doğru iner (115).

Spermatozoonun oviduktta bulunan yumurtayı dölleyebilmesi için dişi üreme kanalına tırmanması gereklidir. Spermatozoonun fertilizasyonun meydana geleceği bölgeye ulaşmak için kuyruklarını kullanarak yüzdükleri tahmin edilmektedir. Ancak kanal boyunca olan bu hareket daha çok uterus kontraksiyonlara cevap olarak gerçekleşmektedir. Milyonlarca spermatozoon insanlarda bir, farelerde ise ortalama on adet yumurtayı döllemek üzere yarışmaya başlarlar. Bu yarışmanın kazananı, yumurtaya ulaşan ve ovumu dölleyen spermatozoondur. Uterus ve ovidukt birbirine utero-tubal bağlantıyla bağlanmıştır ve bu kanalın spermatozoonun buraya özgürce taşınmasını engelleyecek şekilde dar bir yapıya sahiptir. Oviduktun dış kısmı uterus

içerisine asılır. Fare, domuz ve ineklerde bir tepecik meydana getirir. Bu alanda spermatozoonun ovidukt içerisine rahatça taşınmasını sağlayacak geniş-açık bir giriş yoktur (115).

Bunun aksine bazı türlerde örneğin, domuzlarda bu kanal yumurtayı dölleyecek olan spermatozoon için mukusla dolu bir rezervuar şeklindedir ve spermatozoon sayısının azaltılmasını sağlar. Spermatozoonların dişi üreme kanalı içinde kısa sürecek olan yaşamlarını sürdürebilmeleri için kapasitasyon adı verilen fizyolojik yüzey değişikliğini gerçekleştirmeleri gereklidir (115). Kapasitasyon sayesinde spermatozoon serbest kalır, döllemenin gerçekleşmesi ve spermatozoon-yumurta bağlanma yerlerinin serbest kalmasını sağlayacak olan akrozom reaksiyonu gerçekleşir (63). Akrozom reaksiyonu, spermatozoonun zona pellusidaya penetrasyonu için gerekli olan enzimatik mekanizmaların gerçekleşmesini sağlayan ekzositotik bir süreçtir (150). Bu reaksiyon spermatozoonun akrozomu içindeki litik enzimlerin (akrozin, proteazlar, hiyaluronidaz, glukoronidaz ve N-asetil glukozaminidaz) salınmasını ve oositi saran örtüleri geçmesini sağlar (24, 119).

Akrozomal reaksiyonun ilk aşaması, akrozom dış membranı ile spermatozoonun dış membranının kaynaşmasıdır. Daha sonra kaynaşan bölgeler yıkımlanarak, açılan aralıktan akrozomal enzimler bir sonraki aralığa salınır ve bu enzimler spermatozoon girişinin olacağı alandaki zona pellusidayı eritirler (111).

Spermatozoonun zona pellusidayı geçmesiyle zona pellusidanın fiziksel özellikleri değişir ve diğer spermatozoonlara karşı geçirgen olmasını engelleyen zona reaksiyonu gerçekleşir. Oosit ve spermatozoon plazma membranlarının kaynaşması gerçekleştiği alanda hücre membranları yıkılır, spermatozoonun başı ve kuyruğu oosit plazmasının içine girerken plazma membranı dışarıda kalır. Sonrasında oosit, ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak oosit ve ikinci kutup cisimciğini oluştururken olgun oositin çekirdeği dişi pronukleusu oluşturur. Oosit sitoplazması içinde bulunan spermatozoonun çekirdeği, genişleyerek erkek pronukleusu oluşturur, spermatozoonun kuyruğu ise dejenere olur (109).

Bu safhadan sonra morfolojik olarak dişi ve erkek pronukleus birbirinden ayırt edilemez. İki cinse ait çekirdekler mekik düzeni üzerinde, birinci ve ikinci

olgunlaşma bölünmesi sırasında oolemma ile zona pellusida arasına atılmış olan I. ve II. kutup hücrelerinin arasından geçen düzlem üzerinde birleşerek kaynaşır ve mitotik aktivite için seri değişimler ve farklılaşmalara uğrarlar (24). Erkek ve dişi pronukleuslar büyümeleri sırasında ikisi de haploidtir ve birbirlerine doğru hareket ederken her ikisi de kendi DNA'larını replike ederek DNA replikasyonunu gerçekleştirirler. Bu sayede zigotun her hücresi normal DNA miktarını içermiş olur sonrasında ise çekirdek zarını kaybederler (101).

### **2.3. Erken Embriyo Gelişimi (Preimplantasyon)**

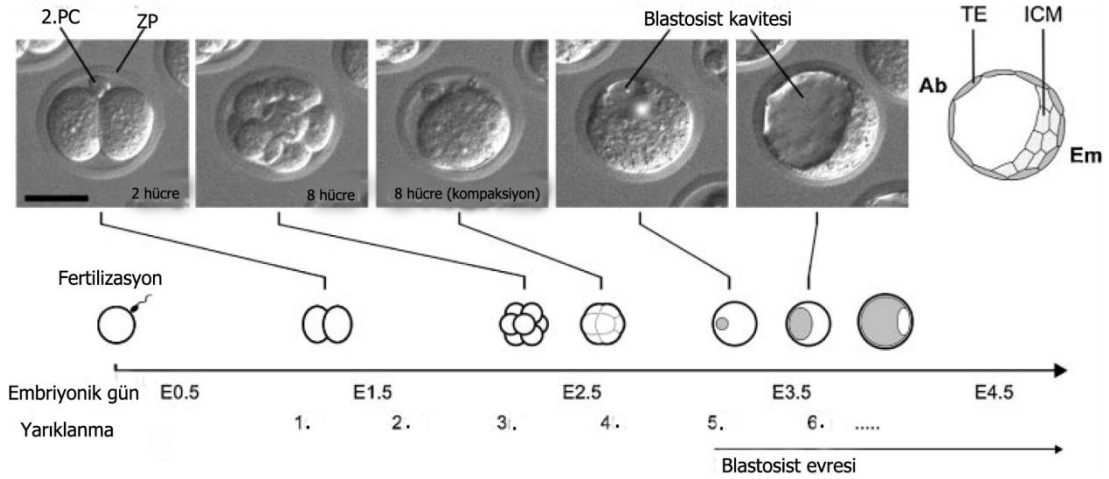
Preimplantasyon dönemi, farelerde trofoektoderm (TE) ve iç hücre kitlesi (ICM)'nin oluştuğu embriyo gelişiminin ilk üç gününde meydana gelen temel morfolojik olayları kapsar (Şekil 2.2). Preimplantasyon dönemi, normalde annenin oviduktunda gerçekleşir, ancak kültür ortamlarında in vitro olarak embriyoların gelişim potansiyeline olumsuz bir etki yapmadan da gerçekleştirilebilir (96, 149).

Döllenmemiş yumurta mayoz bölünmenin metafaz II evresinde bekler ve yumurta çekirdeğinin olduğu kısım animal kutup olarak adlandırılır. Fertilizasyondan sonra mayoz bölünmeye devam eder ve ikinci kutup cisimciğın salınımıyla mayoz bölünmeyi tamamlar. Birçok vaka da ikinci kutup cisimciği, hücre içi köprü ile yumurtaya bağlı şekilde kalır, bu da sonraki gelişim dönemlerinde animal kutubu işaret eden bir belirteç olarak kullanılır. İkinci kutup cisimciğının ne kadar süre yumurtaya bağlı olarak kalacağı embriyolar arasında farklılık gösterir (41, 96).

İlk yarıklanma fertilizasyondan 16-20 saat sonra, bundan sonraki yarıklanmalar ise ortalama 12 saatlik aralıklarla gerçekleşir. Hücre siklusunun uzunluğu yalnızca farklı embriyolar arasında değil aynı embriyonun blastomerleri arasında da farklılık gösterebilir. Bu yüzden embriyonun toplam blastomer sayısı verilen zaman için  $2^n$  den (n: yarıklanma sayısı) farklıdır (96).

İlk üç yarıklanma sonucu morfolojik olarak birbirine benzer toplam sekiz blastomer meydana gelir (Şekil 2.2). Dördüncü yarıklanma öncesi, sekiz hücreli embriyo, sınırları belirli blastomer yapısından, sınırları tam olarak ayırt edilemeyen top benzeri paketlenmiş hücrelerin meydana geldiği kompaksiyon olarak adlandırılan bir hücre küresi oluşur. Kompaksiyonla birlikte tüm sekiz blastomerde apikal-bazal

kutuplaşma meydana gelir ve bu blastomerlerin çeşitli membran ve sitoplazmik elemanları embriyonun apikal-yüzey ekseninden merkezi-bazal eksenini boyunca kutuplaşma gösterirler (36, 51, 68, 73, 96, 128, 129).



**Şekil 2.2** Fare embriyolarında fertilizasyon sonrası ilk üç gün boyunca gerçekleşen morfolojik değişimler. Embriyonik gün genellikle makalelerde embriyonun gelişim evrelerini tanımlamak için kullanılır ve bu günler ebeveynlerin çiftleşmesi sonrasında karşılık gelmektedir. Gelişimsel sürecin zamanlaması ile ilgili olan bu şema, in vitro ortamda kültüre edilen embriyolar baz alınarak hazırlanmıştır. 2.PC, ikinci polar cisimcik; ZP, zona pellusida; TE, trofektoderm; ICM, iç hücre kitlesi; Ab, Abembriyonik kısım; Em, embriyonik kısım. Ölçüm bar, 50µm (96).

Dördüncü yarıklanmayla birlikte bir kısmı embriyonun yüzeyinde diğer kısmı tamamı ile etrafındaki komşu blastomerlerle çevrilmiş şekilde yerleşim gösteren 16 blastomerli yapı meydana gelir. Onaltı hücreli evrede, eksternal ve internal blastosist sayısı embriyolar arasında farklılık gösterir. Yapılan çalışmalarda ortalama 6-7 internal, 9-10 eksternal blastomer olduğu görülmüştür. Eksternal blastomerler apikal-bazal polariteyi sürdürürken, internal blastomerler polariteden yoksundur (37, 52, 69, 96, 151).

Beşinci yarıklanma ile daha fazla sayıda internal ve eksternal blastomer meydana gelir ve 32 hücreli evrede embriyo ortalama 12-13 internal ve 19-20 eksternal blastomer içerir. Onaltı ve otuziki hücreli evrede eksternal ve internal hücre sayıları blastomer ayrışmasından sonra yüzey işaretlenmesi ile (37, 50, 52, 96, 151) ya da ayrışan blastomerlerin şekil ve büyüklüğüne (örneğin, polarize ve büyük

olanlar eksternal; bakılarak belirlenebilir (69, 96). Onaltı hücreli evrede embriyonun tespit edilerek yapılan floresan işaretleme yöntemi ile hücre korteksinde, ortalama 1-2 internal blastomerin bulunması, beraberinde farklı tahminlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (26, 39). Bu tür çelişkilerin neden meydana geldiği henüz bilinmemektedir. Ancak yüzey kısma maruz kalan alanın büyüklüğü bireysel eksternal blastomerler arasında da önemli farklılıklar gösterir. Bu da kullanılan bazı yöntemlerde, özellikle daha az yüzey alanına maruz kalan blastomerlerin, eksternal blastomer olarak tanımlanmaması ya da algılanmamasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (96).

Beşinci yarıklanma sonrası, blastomerler arasında bir ya da birden çok kavite oluşmaya başlar. Bu başlangıçtaki hücreler arası kaviteler, eksternal blastomerlerden ekzositozis yoluyla salınan, hücre içi veziküllerden ya da vakuollerden meydana gelir (5, 96). Kaviteler, tek ve büyük bir kavite oluşturmak üzere sürekli olarak genişler ve birbiri ile birleşir. Bu noktada embriyo özel bir isim alır ve blastosist olarak adlandırılır. Blastosistte eksternal hücreler (trofoektoderm-TE) tüm embriyoyu sararak epidermal morfoloji gösterirken, internal hücreler (iç hücre kitlesi-ICM) tek bir hücre kütlesi şeklinde bir araya gelerek TE hücrelerinin bazal yüzeyine tutunurlar (Şekil 2.1). ICM'in ekzantrik lokalizasyonu nedeniyle blastosist farklı morfolojik eksen gösterir; ICM'in konumlandığı yer embriyonik kutup (Em), kavitenin bulunduğu onun karşısındaki yer ise abembriyonik (Ab) kutup olarak adlandırılır (Şekil 2.2). Bu kutuplaşma TE ve ICM hücrelerinin ileri gelişim dönemlerinde farklılaşmaları açısından önemlidir. Örneğin TE hücrelerinin ICM hücreleri ile temasta olduğu kısımdaki hücreler parakrin sinyallere (ICM tarafından oluşturulan Fgf4) cevaben ekstraembriyonik ektodermi oluştururlar (40, 112). Ayrıca blastosist kavitesine bakan ICM hücreleri popülasyonu ilkel endodermi meydana getirir (96).

### **2.3.1. Trofoektoderm Oluşumu ve Epitelizasyon**

TE, embriyo gelişiminde farklılaşan ve epitel özelliğine sahip olan ilk hücre tipidir. Epitel oluşumuna embriyonun merkezinde büyük bir kavitenin oluşumu eşlik eder. Blastosöl olarak tanımlanan bu kavite epitelde, iyon ve suyun polarize olmuş transportu ile gerçekleşir (96).



Fare embriyolarında epitel oluşumu, “geç 8 hücreli evrede” ve sonraki 24 saat içerisinde, ortalama 32 hücreli evrede tamamlanır. Kompaksiyon sırasında öncelikli olarak  $Ca^{+2}$  bağlantılı adezyon molekülü E-kaderin molekülü ile hücrelerarası adezyon belirgin biçimde artar (23, 72, 96, 141). Adezyon bağlantı kompleksleri (AJ) içerisinde esas molekül olan E-kaderin, birçok epitel dokuda hücre-hücre bağlantılarında bulunan protein komplekslerinden biridir (113). Fare embriyolarında E-kaderin ekspresyonunun eksikliği AJ’de, sonra da diğer bir epitel bağlantı kompleksi olan sıkı bağlantılarda bozulmaya neden olur (86, 114).

Tipik epitel hücrelerinde, hücre membranları yanındaki hücrelere klaudin, okludin ve zonula okludens (ZO) proteinleri gibi çeşitli proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşan ve sıvı geçirgenliğini engelleyen bir bariyer oluşturan ZO aracılığı ile bağlanırlar (96, 162). Fare embriyolarında, kompaksiyon sırasında bazı ZO komponentleri hücre-hücre sınırlarının apikal kısımlarının yanında lokalize olmaya başlarlar. Ayrıca blastosist kavitesini kapatma yeteneğinde olan olgun ZO yapıları, 32 hücreli evrede tamamlanır (30, 73). Çeşitli deneysel çalışmalarda ZO bileşenlerinin blastosist kavitesinin oluşumu ve sürdürülmesi için kritik roller oynadığı gösterilmiştir. ZO bileşenleri, ZO-1, ZO-2 ve kludin’i 4/6 içerir ve bunların bulunmaması ya da inhibisyonları sonucunda bozulmuş ya da gecikmiş kavite oluşumu meydana gelir (96, 110, 140, 171).

Blastosist kavitesinin oluşması ve genişlemesi için, TE hücreleri, hücre bağlantı kompleksleriyle sıkıca kapatılmış bir katman oluşturmasının yanı sıra sıvıyı da kavitenin içine pompalamaları gerekmektedir. TE’in apikal kısmından bazal kısmına su akışı için gerekli olan ana yürütücü güç, epitelin bazal kısmında artan sodyum iyon ( $Na^{+}$ ) konsantrasyonu sonucu meydana gelen ozmotik basınçtır. Blastosist boşluğunun şekillenmeye başladığı bazal tarafa sodyum iyonlarının transportu, apikal membranda  $Na^{+}$  içe akışı için gerekli olan  $Na^{+}/H^{+}$  dönüştürücüsü ve bazal membranda  $Na^{+}$  dışa akışı için gerekli olan  $Na^{+}/K^{+}$ -ATPaz gibi çeşitli taşıyıcı hareketleri ile sağlanır (6, 7, 77, 94, 96, 172, 175, 177).

Embriyonun epitel oluşumuna ne zaman başlayacağı, nasıl karar verdiği ve bu mekanizmanın zamanlamasının nasıl düzenlendiği halen tam olarak anlaşılamamıştır. Kompaksiyon tipik olarak 8 hücreli evrede başlar. Ancak bu zamanlama hücre bölünme sayıları ile kontrol edilmez, çünkü sitokinezisin inhibisyonu ya da DNA

replikasyonu kompaksiyonun başlaması ile gecikmez (96, 143, 144). İlginç bir şekilde embriyoların 1 hücreli evredeki sitoplazmasının bir kısmı uzaklaştırılıp yerine daha ileri evrelerdeki embriyonun sitoplazması ile değiştirilmesi gibi manipulasyonlar yapıldığında, kompaksiyon ve kavite oluşumu hız kazanır. Bu durum için olası açıklama 1 hücreli embriyoda eksprese edilen bazı belirli baskılayıcı faktörler kompaksiyonu engellemektedir ancak bu faktörler gelişim sırasında zamanla kaybolmaktadır. Böylece geç 8 hücreli evrede bu faktörler artık baskılanmamaktadır (35, 87, 96).

### 2.3.2. Trofoektoderm Hücrelerinin Gelişimi

Blastosistin dış epitel katmanını oluşturan TE, embriyo gelişiminde belirlenmiş ilk doku tipidir ve erken blastosist döneminde morfolojik olarak pluripotent iç hücre kitlesinden ayrılır. Trofoblastların progenitörü olan TE hücreleri, blastosistin uterus duvarına implante olmasına eşlik eder aynı zamanda plasenta oluşumuna katkıda bulunurken, ICM hücreleri fetüsü meydana getirir (83).

Transkripsiyon faktörleri, hayvanların embriyonik gelişimi sırasında hücrenin akıbetinin belirlenmesini sağlayan kritik düzenleyicilerdir. Fare blastosistinde, TE ve ICM hücrelerinin oluşumunda esansiyel olarak tanımlanmış birkaç transkripsiyon faktörü vardır. Moleküler olarak TE ve ICM'nin kökeni bu soy-spesifik transkripsiyon faktörleri ile ayırt edilebilir (96, 116, 130, 135). Bunlar, blastosistin TE hücreleri tarafından eksprese edilen *Drosophila Caudal* ile ilişkili olan *Cdx-2* (8, 96, 148) ve iki ICM spesifik transkripsiyon proteinleri olan, *POU domain protein Oct-4 (Pou5f1)* ve *homeodomain protein* olan *Nanog*'dur (17, 107, 120). Blastosist oluşumu sırasında bu faktörler arasındaki ilişkilerin TE ve ICM'in akıbetini güçlendirdiği düşünülmektedir. *Cdx2*, pluripotent özelliğin anahtar düzenleyicisi olan Oct4'un ekspresyonunu baskılar böylece ileride meydana gelecek olan TE soyunun ICM'den ayrılmasını sağlar (83). *Cdx2*, TE'nin varlığını sürdürebilmesi açısından esansiyel iken, ICM'nin oluşumu ve varlığını sürdürebilmesi için gerekli değildir. Blastosist döneminde, *Cdx2* yalnızca TE hücrelerinden eksprese edilirken, *Oct4 (Pou5f1)* transkripsiyon faktörü güçlü şekilde ICM hücrelerinde eksprese edilir. (96, 116, 130, 135). *Homeodomain* transkripsiyon faktörünü kodlayan *Nanog* ise, ICM ve embriyonik kök hücrelerinde (ES) pluripotent durumun sürdürülmesi için gereklidir

ve Oct4'un aksine ES hücrelerinden primitif endoderm soyunun meydana gelmesini de engeller (17, 82, 107).

### **2.3.3. Embriyo Gelişiminde İç-Dış Model**

Fare embriyo gelişimiyle ilgili önerilen eski modeller, sitoplazmik kalıtım belirleyicilerinin hücrenin kaderini belirlediği yönündeydi (4, 182). Ancak bu öneriler erken embriyo dönemindeki hücrelerin yeri değiştirildiğinde yani yeni bir pozisyona getirildiğinde kaderinin de değişeceği görüldükten sonra reddedilmiştir (106, 182). Bu gözlemler diğer araştırmacıların erken soy belirlenmesi için yeni bir model geliştirmelerine sebep olmuştur. Bu iç-dış model ile (159, 182) sitoplazmik belirleyicilerin yerine, hücrenin kaderinin içerideki ve dışarıdaki hücre popülasyonlarının farklı olduğu, geç morula evresindeki pozisyonuna göre kurulduğu önerilmiştir. Pozisyonun hücrenin kaderine olan etkisi farklı şekillerde anlatılabilir. Örneğin hücre-hücre bağlantısının genişliği hücrenin pozisyonu hakkında bilgi verebilir, bu da hücrenin kaderini belirler. İçteki hücreler simetrik olarak komşu hücrelerle bağlantılı iken, dıştaki hücreler asimetric olarak diğer hücrelerle bağlantılıdır (182).

#### **2.3.3.1. Hücre Kutuplaşması (Polarite) Modeli**

Hücre polarite modeline göre hücrenin kaderi, geç morula evresinden önce kurulur. Sonraki hücre bölünmeleri, polarite bilgisine göre simetrik ya da asimetric olarak dağılım gösterir. Bu dağılım hücre bölünmesinin açısına göre düzenlenir. Paralelden radial eksene doğru olan bölünme, polaritenin dağılımı ile ilgili tüm bilgiyi taşıyan, özdeş polarize olmuş hücre meydana getirir. Bunun aksine iç-dış eksene dik olan bölünme sonucu iki farklı hücre meydana gelir, bir tanesi tüm polarite bilgisine sahipken (öyle kalıtımlanmışken) diğeri içeride konumlanmış apolar hücredir. Daha sonra polar ve apolar hücreler gelişim potansiyeli olarak farklılık gösterir ve bu da TE ve ICM soylarını oluşturur. İç-dış model ve polarite modelleri önemli bir noktada birbirinden farklılık gösterir. İç-dış model hücrenin pozisyonunun, hücrenin akıbetini belirlediği yönünde tahminde bulunurken, hücre polarite modeli hücrenin akıbetinin hücrenin pozisyonunu belirlediği yönündedir.

Kapsamlı yapılan araştırmalarda hücre polarite modelini desteklemektedir ve yapılan gözlemlere rehberlik etmiştir (182).

Hücrede polarite ilk kez kompaksiyon sırasında, çeşitli yüzey mikrovillusları, hücre iskeleti unsurları, endozomlar ve mikrotubul organizasyon merkezler gibi hücre altı komponentlerin hücrenin apikal kutbunda (dışa bakan kısımlarda) polarite oluşturması ile gözlenmiştir (70, 73).

Floresanla işaretlenen belirli proteoglikanlara bağlanan bir lektin olan *concanavalin A (Con A)* da kompaksiyon sırasında apikal mikrovillus kutbunda lokalize olur ( 51, 68, 186). Çünkü apikal ve bazal bölgelerin kalıtımının hücrenin kaderinde farklılığa yol açtığı ve bu domainlerin orada bulunmasının hücre polarite modeli için merkezi rol oynadığı belirlenmiştir (69).

Hücre-hücre bağlantılarının hücre polaritesindeki rolünü çalışmak için bozulmamış tam embriyoların yerine, bozulmuş ya da toplanmış embriyoların kullanılması, bu tür embriyolardan hücrenin diğer hücreler arasındaki ilişkiyi bozmadan çıkarılması kolay olduğu için daha uygundur. Bu tam olmayan embriyolarda kompaksiyonun programa uygun şekilde meydana geldiği görölmüş, bu da polarite gelişiminin hücre-hücre bağlantı varlığında daha etkili bir şekilde başladığı bildirilmiştir. Ayrıca polaritenin oryantasyonun hücre-hücre bağlantı alanlarından etkileniyor olabileceği de düşünölmüştür. 8 hücreli embriyodan alınan hücre ikililerinde polarize olmuş Con A boyamasının, hücre bağlantısının yeni konulan hücrelerin olduğu tarafın tersi olan bölgede şekillendiği gözlenmiştir. Bu da hücre-hücre bağlantılarının hücreye oryantasyon konusunda ip uçları verdiğini göstermiştir. Böylece hücre-hücre bağlantılarının polaritenin açısını tanımlamada gerekli olduğu ancak polaritenin sürdürölmesinde gerekli olmadığı görüşüne varılmıştır (69, 182, 186).

Polarizasyon ve kompaksiyonun, protein sentezini bloklayan ilaç uygulamasından (88, 182) ya da protein kinaz C (PKC) ile aktivasyondan sonra devam ettiği ve öncesinde de oluştuğu görölmüştür (178, 182). Bu bulgular a) bu komponentlerin erken embriyo döneminde polarizasyon ve kompaksiyondan önce zaten bulunduğu, b) erken embriyo döneminde yapılan proteinlerin erken gelişmiş polarizasyon ve kompaksiyona neden olduğu, c) translasyon sonrası mekanizmalar

özellikle fosforilasyonun polarizasyon ve kompaksiyonu denetlemesi gibi süreçle ilgili önemli ip uçları vermiştir (182).

Hücre polarite modelinin diğer önemli bir bileşeni, hücrenin kaderinin yarıklanma düzleminin oryantasyonu ile belirlenen polarite kalıtımından etkilenmesidir. Hücre bölünmesi sırasında şekillenen iç-dış ekseni boyunca meydana gelen hücre bölünmesi sonucunda iki polar hücre meydana gelir, ikisi de dış alanda bulunur ve TE hücrelerini meydana getirir. Diğer taraftan iç-dış eksene dik gerçekleşen bölünme sonucu bir polar ve bir apolar hücre meydana gelir ve bunlar içeride ve dışarıda bulunur ve sırasıyla TE ve ICM hücrelerini meydana getirirler. Böylelikle her 8 hücreli evredeki hücre bölünme sırasında en az bir TE hücresi meydana gelir (68, 182).

Hücre polaritesi ve hücre kaderi arasındaki bağlantı, polarite meydana getiren proteinlerin, TE'nin farklılaşmasını yönetme olasılığı olduğunu göstermiştir. Olgun TE hücreleri, apikal mikrovilluslu, polarize olmuş bir epitelin ayırıcı özelliklerini ve polarize olmuş bir dağılım gösteren sıkı ve aderens bağlantılar gibi özel protein komplekslerinin işaretlerini taşır (182).

Bakılan zamana göre 8 hücreli evrede kompaksiyon sırasında apikal domain kurulması ile aderens bağlantıların bulunması birbirleri ile uyumlu olarak görülür. Bu sırada hücre adezyon molekülü olan E-kaderin ve aderens bağlantıların esas komponentleri hücre-hücre bağlantı alanlarında önemli ölçüde bulunmaya başlar (169). Bunlara ek olarak *serine/threonine kinase* EMK1 (Par1) bazo-lateral olarak lokalize olur (170). Ayrıca bu dönemde bazı proteinler apikal hücre korteksinde küçük bir alanda lokalize olurlar. Bu proteinler, Par3, Par6 ve atipik PKCs (aPKCs) (121, 126, 160, 170). Geç morula döneminde *tight junctionlar*, *adherens junction*'lara apikal olacak şekilde toplanmaya başlarlar (38, 139). Bu sırada birçok apikal protein *tight junctionlar* etrafında lokalize olur (29, 170). Par3, Par6 ve aPKC apikal protein komplekslerini oluştururlar (33). Bu kompleksin oluşumu mikrotubul organizasyonunu kontrol eder ve *Lethal giant larvae* (Lgl) gibi bazo-lateral proteinleri apikal membranın dışında tutarlar (124, 181).

Kompaksiyon sırasında 8 hücreli embriyoda apikal domainlerinde apikal protein toplanması, bazo-lateral proteinlerin apikal membrandan dışlanmasına sebep

olur. Yapılan çalışmalar, fonksiyonel apikal domainin polarite, dış hücrelerin oluşumu ve muhtemelen TE kaderi için esas olduğu fikrini desteklemektedir (182).

*Caenorhabditis elegans* gibi bazı mikroorganizmalarda fertilizasyon, embriyonik polarite için önemli olan moleküllerin asimetrik dağılımını indüklemektedir (170, 173). *C.elegans*ta fertilizasyon PKC3 ile seyreden PAR3 ve PAR6'nın anterior kortekste (32, 49, 62, 155, 170), PAR1'in ise posterior kortekste polarize olmuş lokalizasyonlarını indükler (11, 49, 170). Sitoplazmik belirleyicilerde ve mekik ipliklerinin yerleşiminin asimetrik dağılımında yer alan bu proteinler, asimetrik bölünmelerin meydana gelmesine ve germ hatlarının ayrılmasına izin verirler. Elde edilen bilgilere göre fare oositinde ya da embriyosunda fertilizasyona cevap olarak meydana gelen asimetrik dağılımın bir belirleyicisi yoktur. Fare embriyolarında böyle bir ayrılma 8 hücreli evrede blastomerlerin polarize olduğu kompaksiyon sırasında başlar (73, 170).

PAR3 ve PAR6'nın homologları PARD3 ve PARD6 olarak memelilerde de tanımlanmıştır. Farelerde PARD3'ün üç ekli formu gözlenmiştir (100kDa, 150kDa ve 180kDa). Ayrıca farelerde üç farklı gen tarafından kodlanmış üç PARD6 proteini kodlanmıştır: PARD6a, PARD6b ve PARD6g. *Drosophila* ve memeli epitel hücrelerinde üçlü PAR3/PAR6/aPKC kompleksi tight junctionlarda lokalize olurken PAR1 bazo-lateral kortekste lokalize olur (64, 152). PAR1, *C. elegans* zigotu (49) ve *Drosophila* oositinde polaritenin kurulması için esas olan bir serin/threonine'dir (142, 161). PAR1'in memeli homologları MARK (*Microtubules Affinity Regulating Kinases*) ailesindedir. PAR1'in farelerdeki homoloğu EMK olarak adlandırılır. Bu proteinlerin mikrotubullerle ilişkili bazı proteinleri fosforilize ettikleri gösterilmiştir (27). PAR1'in, *Drosophila* oositlerinde ve foliküler epitel hücrelerinde mikrotubul hücre iskeletini düzenlediği gösterilmiştir (21).

Kompaksiyon öncesinde hücreler polarize olmamıştır ve mikrovilluslar hücrenin tüm yüzeyine dağılmıştır. Kompaksiyon sırasında, blastomerler E-kaderin aracılı hücre bağlantılarının kurulması yoluyla birbiri üzerine doğru düzleşirler ve polarize olurlar. Mikrovilluslar ise hücre bağlantı alanlarından kaybolur ve apikal kutbun yüzeyinde kalıcı hale gelir. Bu durum ezrin'in dağılımı ve sitoplazmik komponentlerin (örneğin, klatrin vezikülleri, endozomlar ve mikrofilamentler) asimetrik olarak dağılması ile gösterilmiştir (92, 93, 170). Asetillenmiş mikrotubuller

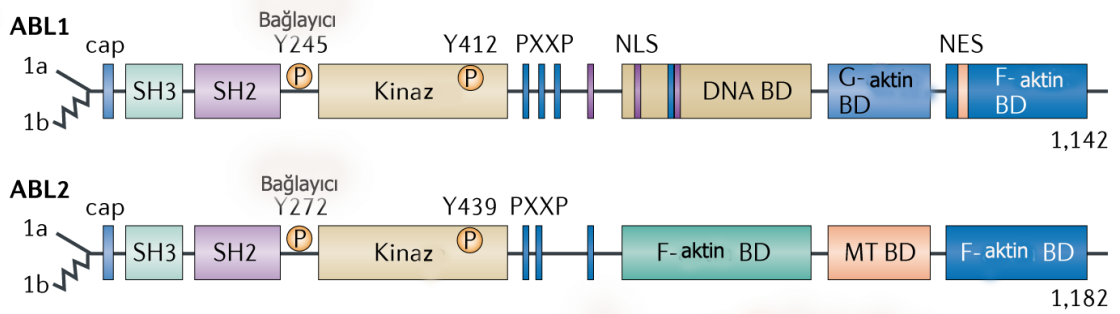
bazal kutupta yer alırken daha dinamik mikrotubuller daha çok miktarda apikalde bulunurlar (60, 170). Kompaksiyon, embriyoda aktif olarak gözlenen en az iki yolak aracılığı ile yönetilir, biri düzleşme gerektirir ve mikrotubuller olmadan da şekillenebilir, diğeri düzleşmeden bağımsızdır fakat çekirdekler ve hücre yüzeyi arasında mikrotubul aracılı etkileşim içerir (61, 170). Dördüncü yarıklanma sırasında mitotik ipliklerin oryantasyonu rast geledir. Ancak ipliğin oryantasyonuna göre apikal-bazal eksene de bakılarak asimetrik bölünmeler oluşabilir (71, 73). Mikrovillusların ucunun büyük bir kısmının kalıtımını sağlayan non-adeziv alana sahip olan kardeş hücreler, dış blastomerleri meydana getirirlerken, mikrovilluslardan yoksun olan tüm yüzeyleri boyunca adeziv olan hücreler de iç hücreleri oluştururlar. Böylece kaderleri farklı olan iki farklı hücre tipi meydana gelmiş olur: Blastosistlerde iç hücre kitlesini meydana getirecek olan internal polarize olmamış hücreler ve TE hücrelerini meydana getirecek olan eksternal polarize olmuş hücreler (37,69) bulunmaktadır. Bu iki farklı hücre tipinin oluşum süreci fare embriyosunun gelişimi için çok önemlidir. ICM, embriyonun ve bazı ekstra-embriyonik yapıların oluşumuna katkıda bulunurken, TE ekstra-embriyonik yapılara katılır (40, 170).

#### **2.4. Abelson Tirozin Kinaz (c-Abl) Proteini**

Abelson Tirozin Kinaz (c-Abl) geni non-reseptör protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir ve Abelson Murine Leukemia Virüs proteininin hücrel homologu olarak tanımlanmıştır (1, 47, 84). Non-reseptör protein tirozin kinaz'lar normal hücrel c-Abl (Abl) ve Arg ve onkojen formlar olan v-Abl, Bcr-Abl, Tel-Arg içerir. Abl-1 ilk kez bundan 30 yıl önce Abelson Murine Leukaemia virüsünde (42, 47) onkojen olarak ve sonrasında insan lökemisinde onkojenle ilişkili kromozom translokasyonlarında bildirilmiştir. Abl-1'in insan otologu sonrasında mutasyonal olarak aktive edilmiş füzyon onkoproteini, BCR-Abl-1 olarak tanımlanmıştır (9, 47) Abl-2, (Abl-ilişkili gen ya da Arg olarak bilinir), Abl-1'in paralogudur ve dizilim benzerliği ile tanımlanmıştır (80, 123).

Abl-1 ve Abl-2, %90'nın üzerinde benzerlik gösteren ve SRC homolog 3 domain (SH3 domain), SH2 domain, SH1(tirozin kinaz ) domainleri içeren, amino-

terminal düzenleyici ve katalitik domainlere sahiptirler (Şekil 2.3) (31, 47). Abl ve Arg, C terminal yarımalarında hücre iskeletine bağlanan bölgeler içerirler. Bunlar, Abl ve Arg de görülen F aktin bağlanma bölgesi (31, 103, 166, 174) ve Arg de görülen mikrotubul (MT) bağlanma bölgesidir (31, 105). Bu bölgeler hücre içerisinde Abl ve Arg de lokalize olurlar ve bunların fiziksel olarak aktin ve mikrotubul yapılarının düzenlenmesini sağlarlar (31).



**Şekil 2.3** Abl kinazların modüler domainlerinin şematik gösterimi. F-aktin BD: filamentöz aktin bağlanma domaini, G-aktin BD: globular aktin bağlanma domaini, P: fosforilasyon, SH3: SRC homoloğu 3, SH2: SRC homoloğu 2, SH1: SRC homoloğu ( tirozin kinaz) domaini, NLS: nükleer lokalizasyon sinyali motifleri, NES: nükleer eksport sinyali motifleri (47).

Her iki Abl kinazın karboksil uçları filamentöz (F)-aktin bağlanma bölgesi içerir (Şekil 2.3) (45, 47, 166). Abl-1, globular (G)-aktin bağlanma bölgesi içerir. Abl-2'nin I/LWEQ motifi ile karakterize ikinci internal F-aktin bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu domain, hücrenin periferinde yer alan F-aktin zengin yapıların oluşumunun desteklenmesi için gereklidir. Her iki Abl kinaz da, SH3 içeren proteinlerin bağlanmasına aracılık eden PXXP motifleri içerirler. Sitoplazmik ve nükleer lokalizasyon gösteren Abl-1; üç nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) motifi ve C ucunda yer alan bir nükleer eksport sinyali (NES) bulundurmaktadır. Bu bölgeler, çekirdek ile sitoplazma arasında mekik dokuyarak Abl'nin çeşitli uyarılara cevap vermesini sağlarlar (47, 174). Bu durumun tersine NLS motifinden yoksun olan Abl-2, sitoplazmada lokalize olur ve öncelikli olarak hücrenin periferinde, fokal



adezyonlar, aderens bağlantılar, invadopodia ve fagositik kuplar gibi F-aktin zengin alanlarda toplanır (46, 47, 105, 145, 184). Abl-1'de fizyolojik görevi tam olarak anlaşılammış olan DNA bağlanma bölgesi de tanımlanmıştır (104).

SH3 domain, SH2 ve kinaz domainleri bağlayan polyproline-içeren bağlayıcı dizilere bağlanır ve SH2 domain, kinaz domain (SH1)'in C terminal lobu ile etkileşime girer. Sonuçta, SH3-SH2-SH1 bulunduran birbirine kenetlenen bir yapı oluşur (54).

Abl kinazların enzimatik aktiviteleri, tirozin fosforilasyonu ile de düzenlenir. Abl-1 üzerinde fosforile edilen tirozin kalıntıları aktivasyon loop da Y412 (Abl-2 de Y439'a karşılık gelmektedir), SH-2 kinaz domain bağlayıcı da Y245 (Abl-2 de Y272'ye karşılık gelmektedir)'dir. Bu tirozinlerin fosforilasyonu, Abl kinazların aktif yapılarını stabilize eder ve Abl proteinleri arasındaki transfosforilasyon ile ya da SRC kinaz ailesi aracılığı ile meydana gelebilir (47, 156).

Abl kinaz aktivitesinin düzenlenmesinde intramoleküler etkileşimlerin rolünün bilinmesi için kapalı ve açık Abl kinazların mekanizmasının gösterilmesi önemlidir. SH3 domain, SH2 ve kinaz domainlere bağlanan, bağlayıcı dizilere bağlanır. Sonrasında SH2 domain, SH1 kinaz domainin C terminal lobu ile SH2-SH3 birbirine kenetlenen bir yapı meydana getirecek şekilde etkileşime girer. 1b Abl izoformunun N ucunda bulunan myristoylated kalıntısı, kinaz domainin C lobu içindeki hidrofobik cebe, kapalı yapıyı stabilize ederek bağlanır (47).

#### **2.4.1. Abl Proteinin Fare Gelişimindeki Rolü**

c-Abl, hücrede çekirdek, sitoplazma ve hücre zarını da içeren birçok farklı alanda lokalize olmuştur (134, 154). c-Abl'lar çeşitli hücrel proteinlerle etkileşime geçerek hücre morfogenezisi, hareketi (59), büyüme ve çoğalmasını (özellikle G1/S kontrol noktasında), apoptozisin modülasyonunu (59, 125) ve dişi ve erkek farelerin germ hücrelerinin gelişimini (66) kontrol eden farklı sinyal yollarında önemli rol oynarlar. Memelilerde bulunan iki Abl kinaz olan Abl-1 ve Abl-2'nin farelerde bu genlerin inaktivasyonları ile ortaya çıkarılan benzersiz ve birbirleriyle örtüşen fizyolojik birtakım rolleri vardır (47, 137, 163).

Abl-1 -/- ( Abl-1 *knockout*) olan farelerin ortalama %50'sinin doğum sonrası öldüğü hayatta kalan farelerde ise timik atrofi, lenfopeni, osteoblast proliferasyonuna bağlı osteoporozis, kalp anomalileri, hatalı göz gelişimi ve erken yaşlanmanın meydana geldiği bildirilmiştir (31, 55, 79, 81, 89, 127, 137, 163). Bunun tersine Arg -/- (Abl-2 *knockout*) farelerin canlı olduğu ancak yaşla ilişkili dendirit destabilizasyonu gibi nöronal defektlerin olduğu bildirilmiştir (45, 47, 79). Normal gelişim sırasında birbirlerini kompanse eden enzimlerin Abl ve Arg genlerinin her ikisi de silindiğinde erken gelişim döneminde (E 9-11) düzgün bir embriyonik gelişim için gerekli olan her iki enzim için yoksunluğun indüklendiği ve nörolojik defektler sonucunda hayvanların öldüğü görülmüştür (79).

## **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1.Gereç**

Mevcut çalışmada, Amerika Ulusal Kanser Enstitüsünden temin edilen B6D2F1 (C57BL/6 3 DBA/2) hibrid farelerinden (n=40) elde edilen oosit ve embriyolar kullanıldı. Çalışma sürecinde Hawaii Üniversitesi Etik Kurul kararlarına (protokol no: 05-029-8) uyulmuştur. Tüm hayvanlar deneyler sonlanıncaya kadar Hawaii Üniversitesi Deney Hayvanları Labartuvarlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık 20-22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Bu çalışmada kullanılan fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

### **3.2.Yöntem**

#### **3.2.1 Embriyo Toplanması**

B6D2F1 dişi farelere, gebe kısrak gonadotropini (PMSG) enjeksiyonu (5 IU) yapıldıktan 48 saat sonra farelerin kendi fizyolojik LH pikleri oluşmadan intraperitoneal olarak insan koriyonik gonadotropin (hCG; EMD Milipore) enjeksiyonu (5 IU) yapılarak superovule edildi. hCG enjeksiyonunu takiben çiftleşmenin sağlanması için dişi ve erkek B6D2F1 fareler aynı kafese konuldu. Ertesi sabah çiftleşmenin etkinliğini gözlemlemek için vaginal plak kontrolü yapıldı. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra, embriyolar iki hücreli evreye ulaştığı gün, dişi fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Oviduktlar disseke edildikten sonra stereomikroskop altında ovidukt enjektör yardımı ile FHM HEPES- buffered medium (MR-024-D;EMD Milipore) kullanılarak basınçla yıkandı ve iki hücreli embriyolar stereomikroskop altında toplandı. Embriyolar istenilen evrede kullanılmak üzere mineral yağ ile kaplanmış KSOM-AA mediumu (MR-021-D; EMD Milipore) içinde 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş havalı inkübatöre yerleştirildi. İki hücreli embriyolar inkübatöre konulduktan yaklaşık 24 saat sonra sekiz hücreli embriyo evresine, yaklaşık 42-48 saat sonra morula evresine, yaklaşık 54-60 saat sonra da orta blastosist evresine ulaşan embriyolar çalışmada kullanıldı.

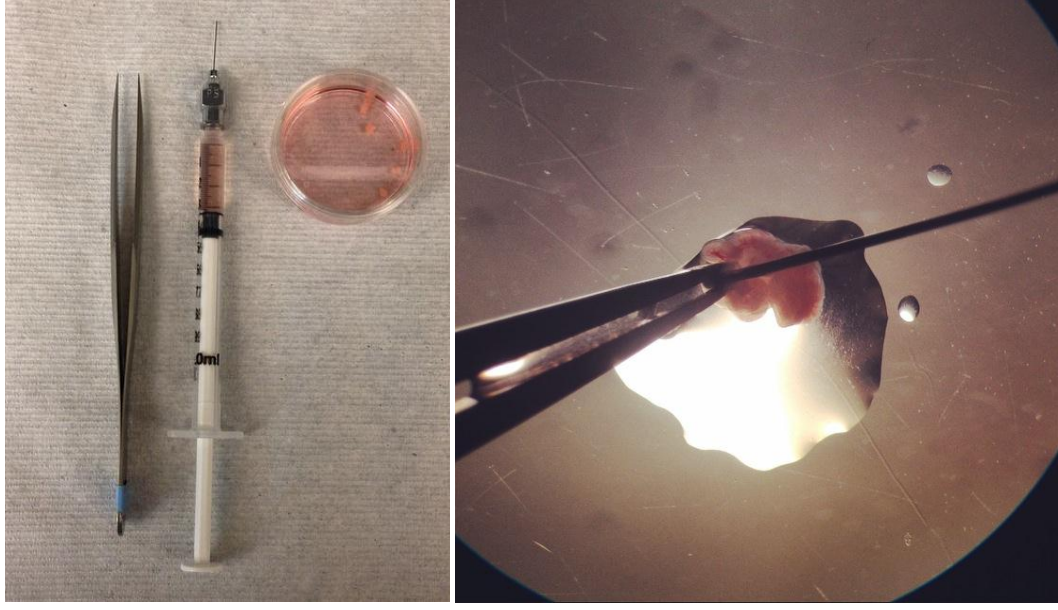
İki hücreli evrede bulunan embriyolar (n=47), morula evresindeki embriyolar (n=45) ve E 3.5 dönemindeki blastosistler (n=88) c-Abl protein lokalizasyonuna bakılmak üzere tespit edildi.

Araştırmada 8 hücreli evredeki aynı kalitedeki embriyolar ise üç gruba bölünerek gün içerisinde, saat 9:00 (n=45), 12:30 (n=45) ve 16:00 (n=45) olmak üzere farklı zaman aralıklarında toplandı ve bu gruplardaki embriyolar sırası ile erken, orta ve geç 8 hücreli evredeki embriyolar olarak adlandırıldı.

ICM hücrelerinde c-Abl lokalizasyonunun değeriendirilmesi amacı ile orta blastosist evresinde bulunan embriyolardan kavite çapı tüm blastosistin %50'si kadar ya da büyük olan embriyolar (n=38) ayrıldı ve tespit edildi.



**Şekil 3.1.** Fareden oviduktun disseke edilmesi, ok: ovidukt.



**Şekil 3.2.** Oviduktun yıkanması ve yıkamada kullanılan malzemeler.

### 3.2.2. Oositlerin Toplanması

B6D2F1 dişi farelere, gebe kısrak gonadotropini (PMSG) enjeksiyonu (5 IU) yapıldıktan 48 saat sonra farelerin kendi fizyolojik LH pikleri oluşmadan intraperitoneal olarak insan koriyonik gonadotropin (hCG; EMD Milipore) enjeksiyonu (5 IU) yapılarak superovule edildi. hCG enjeksiyonundan 17 saat sonra, dişi fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Oviduktlar disseke edildikten sonra, kumulus-oosit kompleksi stereomikroskop altında oviduktun ampulla bölgesi yırtılarak elde edildi. Metafaz II evresindeki oositler (n=103) hyaluronidaz (SAGE, In Vitro Fertilization Inc. Trumbull, CT, USA) ve cam pipet yardımıyla mekanik ayırma ile kumulus hücrelerinden temizlendi. Çıplak oositler, FHM HEPES-buffered medium (MR-024-D;EMD Milipore) kullanılarak yıkandı ve araştırmada kullanılmak üzere mineral yağ ile kaplanmış KSOM-AA mediumu (MR-021-D;EMD Milipore) içinde 37 °C' de % 5 CO<sub>2</sub> ile nemlendirilmiş havalı inkübatöre yerleştirildi.

c-Abl (c-19), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -aktin boyaması yapılması için 103 adet embriyo toplanıp tespit edilirken mekik iplikleri ile c-Abl ilişkisinin incelendiği deney için toplam 140 oosit tespit edildi.

### 3.2.3. Parthenogenez ile Oosit Aktivasyonu

Partenogenez ile aktivasyon teknolojisinin amacı sperm olmayan koşullar altında fertilizasyonun uyarılması ve oositlerin suni olarak aktive edilmesidir.

Partenogenezle aktivasyon için Strontium Klorid ( $\text{SrCl}_2$ ) (0.5M) ve etilenglikol-bis (b-aminoethyl ether)-N,N0-tetraasetik asit (EGTA) (0.5M) KASOM-AA mediumuna eklenerek solüsyon hazırlandı. Hazırlanan bu solüsyondan 20 $\mu\text{l}$ 'lik damlalar orta büyüklükteki kaplara konulduktan sonra mineral yağ ile kaplandı ve oositler bu damlaların içine pipetle transfer edildi. Oositler hazırlanan bu solüsyon içinde 37°C'de %5'lik  $\text{CO}_2$  ile nemlendirilmiş inkübatöre kaldırıldı. Aktivasyon işlemi öncesi, 0. saat (n=32) olarak kabul edildi, sonrasında aktivasyonun 1. saatinde (n=30), 2. saatinde (n=32), 3. saatinde (n=23), 6. saatinde (n=23) oositler toplanarak tesbit edildi.

### 3.2.4. İmmunocerrahi Yöntemi ile ICM İzolasyonu

İmmunocerrahinin yapılacağı gün KSOM-AA içinde seyreltilmiş rabbit anti-mouse serumu (1:10 in KSOM-AA) ve KSOM-AA içinde seyreltilmiş guinea pig komplementi (1:10 in KSOM-AA) (Invitrogen) içeren solüsyonlar taze olarak hazırlandı. Bu solüsyonlardan 20 $\mu\text{l}$ 'lik damlalar, mineral yağın altında kalacak şekilde orta büyüklükteki kaplar (*medium dish*) içerisine konuldu ve kaplar 37 °C' de %5'lik  $\text{CO}_2$  ile nemlendirilmiş inkübatöre kaldırıldı. İnkübatörde bulunan blastosistlerden kavite çapı tüm blastosistin %50si kadar ya da büyük olan orta blastosist evresinde olan embriyolar (n=38) ayrıldı. Bir kısmı kontrol embriyoları (n=12) olarak seçildi. Kalan embriyolar (n=26) ise immunocerrahi yöntemi ile ICM hücreleri izole edilmek üzere ayrıldı. TE hücrelerinin lize edilebilmesi için zona pellusidalı olan embriyolar, önce KSOM-AA içinde seyreltilmiş rabbit anti-mouse serumu sonrasında KSOM-AA içinde seyreltilmiş guinea pig bileşeni içinde bekletildi ve FHM HEPES-tamponlu medium ile yıkandı. TE hücreleri lize edildikten sonra zona pellucidanın uzaklaştırılması için embriyolara FHM içinde % 0.5 Pronase (Roche) uygulandı. İzole edilen ICM'ler (n=26) mineral yağ ile kaplanarak hazırlanmış KSOM-AA mediumu içerisine konulup inkübatöre konuldu.

### 3.2.5. İmmunfloresan Boyama

Embriyolar istenilen gelişim evresine ulaştığı zaman inkübatörden çıkarıldı. Embriyolardan zona pellucidanın uzaklaştırılması amacıyla embriyolara FHM içinde % 0.5 Pronase (Roche) uygulandı. Sonrasında Fosfat Buffer Saline (PBS) içinde %4 paraformaldehit ile hazırlanan solüsyon içinde 30 dakika bekletildi ve membran geçirgenliğini sağlamak için %0.5 Tritron X-100 içeren PBS solüsyonunda 15 dakika bekletildi. %5 bovine serum albümin içeren %0.1 Tween-20'lik PBS ile hazırlanan solüsyon içinde bloklandı. Embriyolar primer antikor içinde +4°C de gece boyunca, sekonder antikor da ise 25°C de 2-3 saat boyunca inkübe edildi.

Bu çalışmada primer antikor olarak, poliklonal rabbit anti-c-Abl (k-12) (1:400; Santa Cruz Biotechnology), poliklonal rabbit anti-c-Abl (c-19) (1:400; Santa Cruz Biotechnology), poliklonal mouse anti- $\beta$ -tubulin (1:4000), monoklonal mouse *anti-Cdx-2* (1:100; BioGenex) ve monoklonal mouse *anti-Oct-4* (1:100; BioGenex) kullanıldı. Sekonder antikor olarak, Alexa Fluor 488 (Green) (1:1000; Life Technologies) ile konjuge edilmiş anti-rabbit ve anti-mouse, ayrıca aktin filamentlerinin gösterilmesi için de Alexa 546 (Red) (1:200; Life Technologies) ile konjuge edilmiş phalloidin kullanıldı. Boyanma sonrası oosit ve embriyolar, Poly-L-lysinli lam üstüne 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Life Technologies) içeren Prolong Gold rejanı kullanılarak kapatıldı ve mikroskop altında incelendi.

Aktivasyon işlemi öncesi MII'de bekleyen oositler (0.saatte) ve aktivasyon sonrası (1.- 2. -3. -6.) saatlerde tespit edilen oositlerde c-Abl lokalizasyonunu göstermek için anti c-19, anti-k-12 antikorları, mekik ipliklerini göstermek amacı ile  $\beta$ -tubulin, kromozomları göstermek amacı ile de DAPI kullanıldı. Sıfırıncı saatte c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin (n=18), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin (n=14) ile immunfloresan olarak boyandı. Sonrasında aktivasyonun 1. saatinde c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin (n=17), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin (n=13), 2. saatinde c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -aktin (n=17), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin (n=15), 3. saatinde c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin (n=16), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin (n=7), 6. saatinde c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin (n=17), c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin (n=6) bulunan oositlere immunfloresan boyama yapıldı.

MII oositleri c-Abl ve  $\beta$ -aktin proteinleri (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n=66, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=37) kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı. İki hücreli embriyolar da

c-Abl ve  $\beta$ -aktin proteinleri (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n=27, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=20) kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı.

Farklı zamanlarda inkübatörden çıkarılıp tespit edilen, 8 hücreli embriyolara da, anti-c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -aktin antikorları kullanılarak [erken (n=21), orta (n=21) ve geç (n=21) dönem embriyoları] ve anti-c-Abl (k-19) ile  $\beta$ -aktin antikorları kullanılarak [erken (n=24), orta (n=24) ve geç (n=24) dönem embriyoları] immunfloresan boyama yapıldı.

Morula evresinde bulunan embriyolar c-Abl ve  $\beta$ -aktin proteinleri (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n=27, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=18) kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı. Orta blastosist evresinde bulunan embriyolara da c-Abl ve  $\beta$ -aktin proteinleri (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n=32, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=27) kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı. Ayrıca TE hücrelerini ICM hücrelerinden rahatça ayırabilmek için *Cdx-2* ve c-Abl proteinleri (c-19 ve *Cdx-2*; n= 10, k-12 ve *Cdx-2*; n=5) buna ek olarak *Oct-4* ve c-Abl proteinleri (c-19 ve *Oct4*; n= 7, k-12 ve *Oct-4*; n=7) kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı.

Ayrıca kontrol grubu blastosistler ve izole edilmiş ICM hücreleri sırasıyla, c-Abl ve  $\beta$ -aktin (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n= 6, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=6) (c-19 ve  $\beta$ -aktin; n= 12, k-12 ve  $\beta$ -aktin; n=14) ile immunfloresan olarak boyandı.

MII evresindeki oositler ve 8 hücreli evredeki embriyolarda spesifik immunreaktivite olup olmadığına bakılmak amacı ile negatif ve pozitif kontrol grupları c-19 (MII oosit; n=8, 8 hücreli evre; n=14) ve k-12 (MII oosit; n=8, 8 hücreli evre; n=12) proteinleri ile immunfloresan olarak boyandı. Negatif kontrol gruplarına (MII oosit; n=8, 8 hücreli evre; n=9) primer antikor (rabbit anti-c-Abl) kullanımını haricinde aynı boyama protokolü uygulandı.

### **3.2.6. Mikroskop ve Görüntü Analizleri**

Aynı deney grubundan olan embriyo ve oositler Axiovert 200 floresan mikroskop (Carl Zeiss) ve FV1000 Konfokal Lazer Tarama mikroskobu (Olympus) kullanılarak aynı zamanlarda görüntülendi ve fotoğraflandı. Konfokal mikroskopta alınan optikal seri kesitler 2  $\mu$ m aralıklarla alınarak, 40x objektif kullanılarak



görüntüler elde edildi. Z-axis (projections) de alınan optikal seri kesitler, Fluoview Viewer software (Olympus) programı yardımıyla incelendi.

Aktivasyon öncesi ve sonrası incelenen oositlerden 2  $\mu\text{m}$  aralıklarla alınan ve fotoğraflanan konfokal optikal kesit görüntülerine bakılarak her oositten rastgele 1 kesit görüntüsü seçildi. Seçilen her kesit görüntünün, ilgili floresan intensitesi ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Bu elde edilen değerler, piksel tabanlı nicel verilerin elde edilmesini sağladı. Elde edilen floresan intensite değerleri Microsoft EXCEL programına aktarılarak ilgili grafikler oluşturuldu.

## 4. BULGULAR

### 4.1. c-Abl Proteinleri İle Mekik İplikleri Arasındaki İlişki

c-Abl proteinlerinin metafaz II (MII) oositlerinin aktivasyon öncesi ve sonrasında nasıl lokalize olduğu ve bu dönemde c-Abl ve mekik iplikleri arasındaki ilişki araştırıldı. Bu amaçla oositlerde parthenogenetik aktivasyon sağlayan strontium klorid kullanılarak oositler yapay olarak aktive edildi.

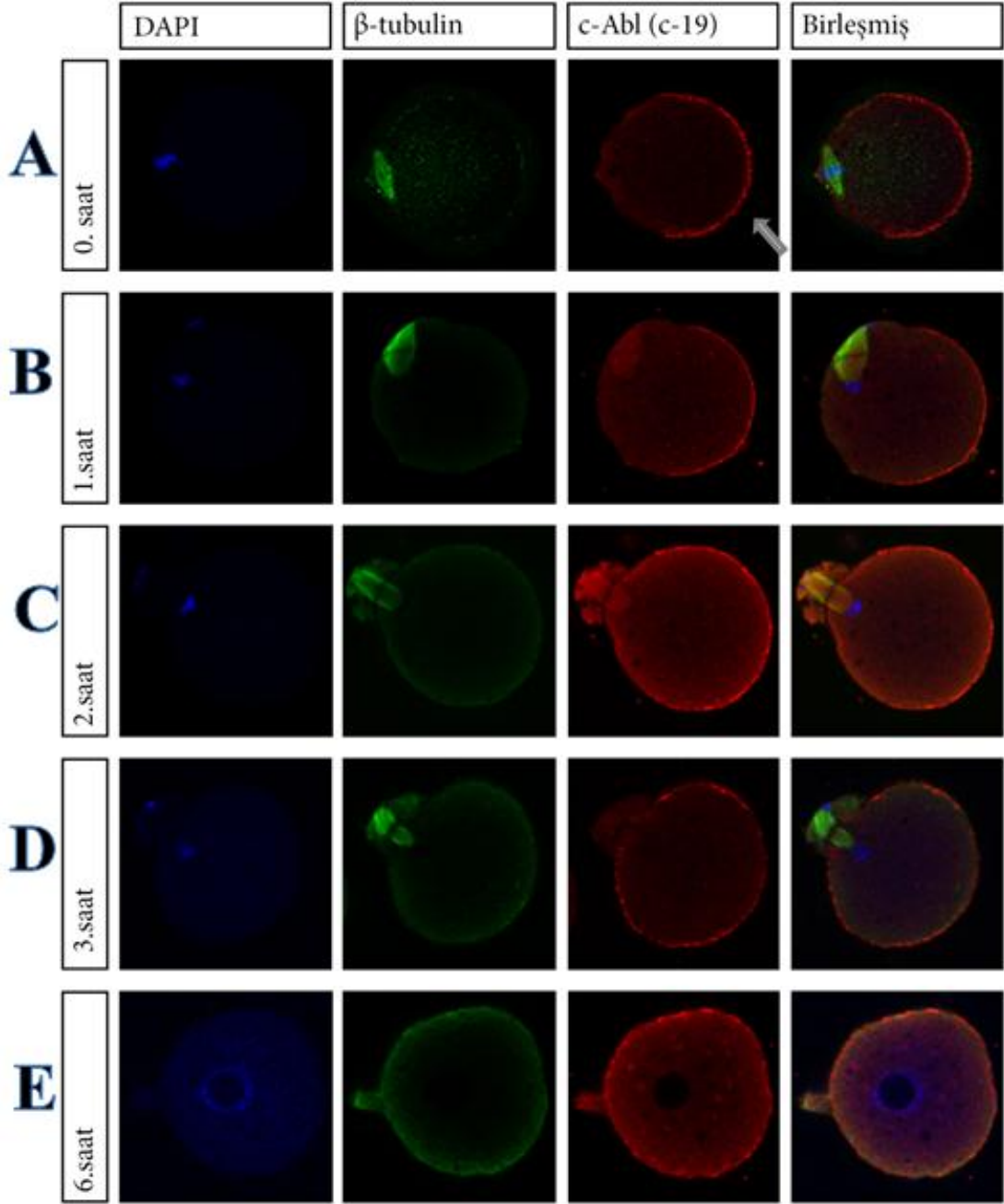
Sıfırinci saatte toplanan MII' de bekleyen oositler (n= 17) anti-c-Abl (c-19) ile immunfloresan olarak boyandı ve oositlerin optikal konfokal kesit görüntüleri incelendi. Bu görüntülere göre 0. saatte toplanan oositlerde c-Abl (c-19)'un mekik ipliğinin yer aldığı alanın üstündeki aktin filamentlerden zengin olduğu bilinen korteks alanında yer almazken, bu alanın devamında korteksi saracak biçimde yarım ay şeklinde lokalize olduğu görüldü. (Şekil 4.1.A). İntensite değerleri ölçülerek oluşturulan grafik ile de bu lokalizasyon gösterildi (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4). Bu da c-Abl'ın polarize olmuş bir dağılım gösterdiğini ortaya koydu.

Aktivasyondan 1 saat sonra tespit edilen oositlerde (n=17) c-Abl (c-19) proteinin dağılımının, 0. saatte görülen c-Abl lokalizasyonuna benzer olduğu görüldü (Şekil 4.1.B, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Oositlerin Metafaz II evresinden anafaz II evresine geçtikleri görüldü (Şekil 4.1.B ve Şekil 4.5).

Aktivasyondan 2 saat sonra tespit edilen oositler (n=17) ile 3 saat sonra tespit edilen oositlerde (n=17), c-Abl (c-19) proteinin lokalizasyonu 0.saatteki lokalizasyonu ile karşılaştırıldığında, 0. saatte c-Abl lokalizasyonunu görülmediği alanlarda cAbl proteinlerinin korteks boyunca lokalize olmaya başladığı görüldü (Şekil 4.1.C-D). Aktivasyon sonrası 2. ve 3. saatlerde meydana gelen lokalizasyon floresan intensite değerlerini gösteren grafiklerle de ifade edildi (Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

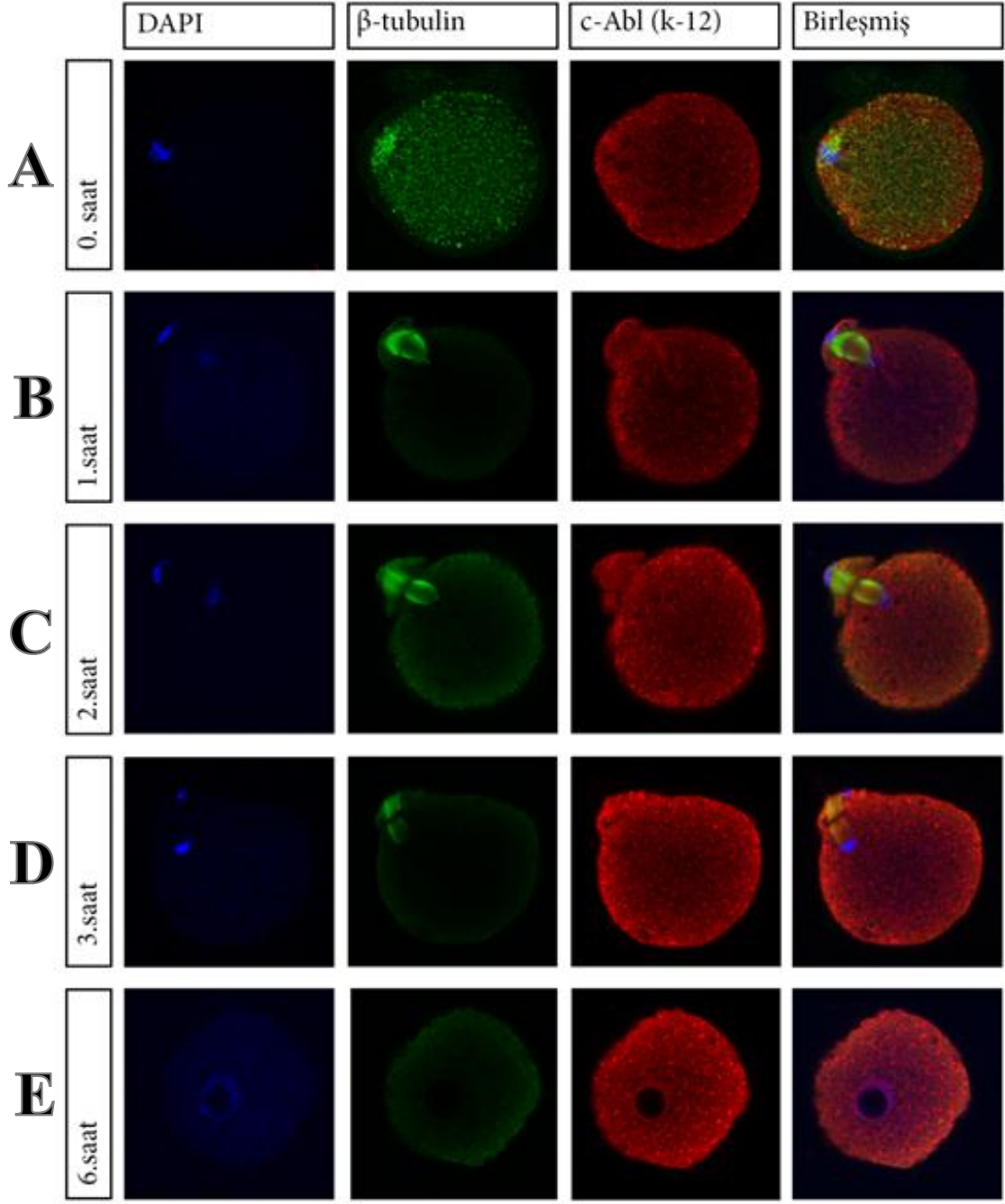
Aktivasyondan 6 saat sonra tespit edilip incelenen oositler de (n=17), c-Abl (c-19) proteininin oositin tüm korteksi boyunca güçlü bir şekilde lokalize olduğu ve ikinci kutup cisimciğinin oositten atıldığı görüldü (Şekil 4.1.B, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).

MII'de bekleyen oositler (0. saat) (n=13) ile aktivasyon sonrası 1. saat (n=13), 2. saat (n=13), 3. saat (n=7) ve 6. saat (n=7) sonrasında tespit edilen oositlerde, c-Abl (k-12) lokalizasyonunun sitoplazma boyunca granüler ve yamalı şekilde görüldüğü, ancak oositin merkezi ile korteks altında kalan alandaki c-Abl (k-12) lokalizasyonu karşılaştırıldığında oositin periferinde daha güçlü şekilde lokalize olduğu görüldü (Şekil 4.2). Bu veriler her saat için rastgele seçilen oositlerden alınan konfokal kesit görüntülerinden program kullanılarak elde edilen floresan intensite değerleri grafiklerle gösterilerek veriler onaylandı (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 19, Şekil 20).



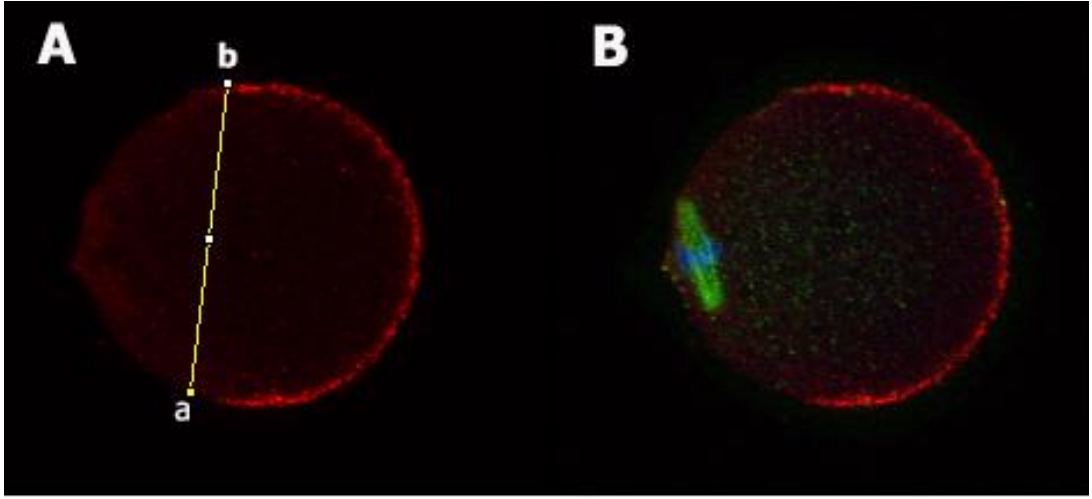
**Şekil 4.1.** Fare oositlerinde aktivasyon öncesi (0. saat) ve sonrasında sonrası (1.-2.-3.-6. saat) (c-19) ve  $\beta$ -tubulin lokalizasyonunu gösteren konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Aktivasyon öncesi toplanan oositler (0. saat) B) Aktivasyon sonrası 1. saatte C) 2. saatte D) 3. saatte E) 6. saatte tespit edilen oositler. ok: c-Abl'ın asimetric lokalizasyonunu göstermektedir. İmmunfloresan olarak, Nükleer boyama (DAPI) (mavi),  $\beta$ -tubulin (mekik ipliği) (yeşil) c-Abl (c-19) (kırmızı) boyama yapıldıktan sonra üç boyamanın birleşimi (mavi, yeşil, kırmızı).

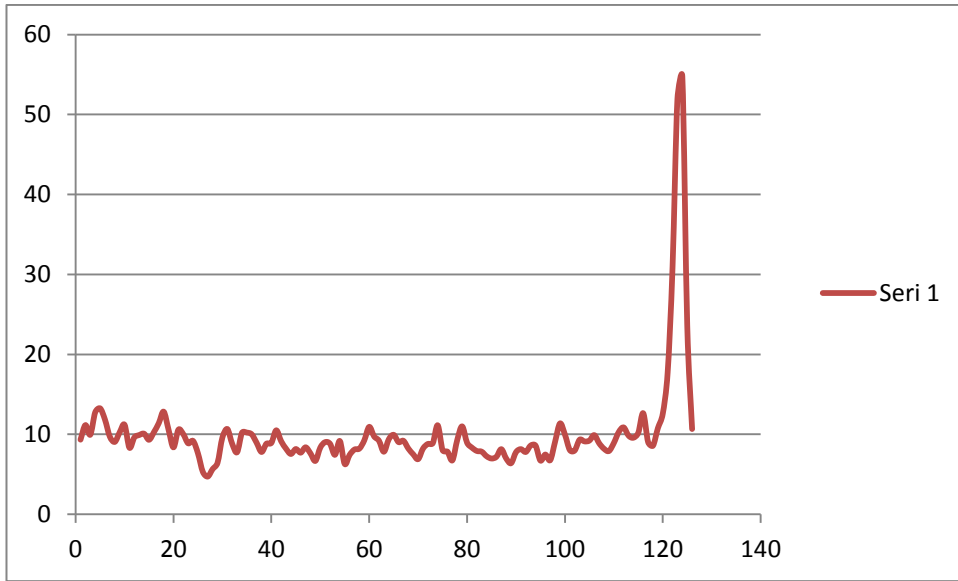


**Şekil 4.2.** Fare oositlerinde aktivasyon öncesi ve sonrasında sonrası (1.-2.-3.-6. saat) (c-19) ve  $\beta$ -tubulin lokalizasyonunu gösteren konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Aktivasyon öncesi toplanan oositler (0. Saat) B) Aktivasyon sonrası 1. saatte C) 2. saatte D) 3. saatte E) 6. saatte tespit edilen oositler. İmmunfloresan olarak, Nükleer boyama (DAPI) (mavi),  $\beta$ -tubulin (mekik ipliği) (yeşil) c-Abl (c-19) (kırmızı) boyama yapıldıktan sonra üç boyamanın birleşimi (mavi, yeşil, kırmızı).

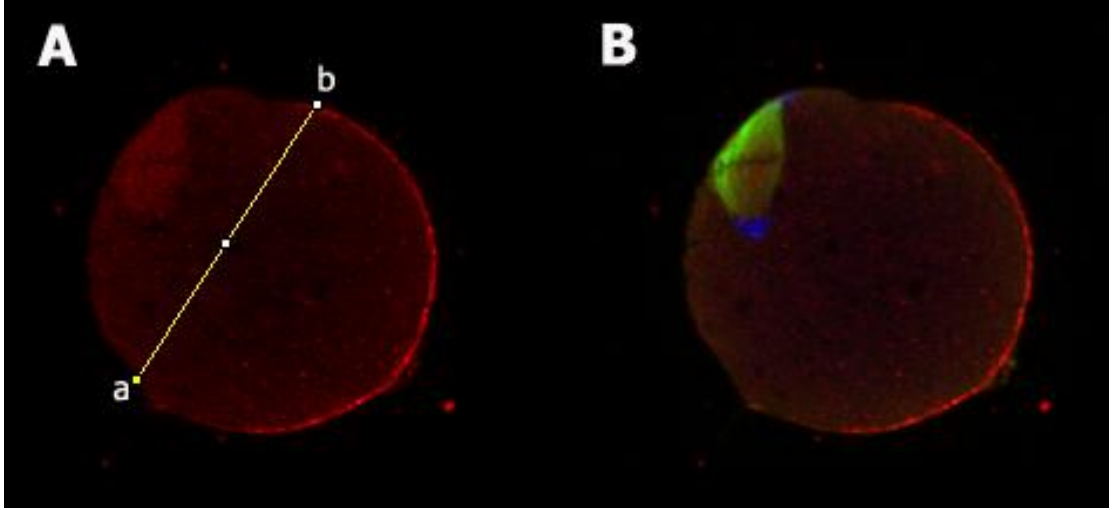


**Şekil 4.3.** c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonu  
A: c-Abl (c-19)'nin lokalizasyonu (kırmızı) , a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe  
B: c-Abl (c-19) (kırmızı),  $\beta$ tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyaalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.4.** c-Abl (c-19) proteininin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

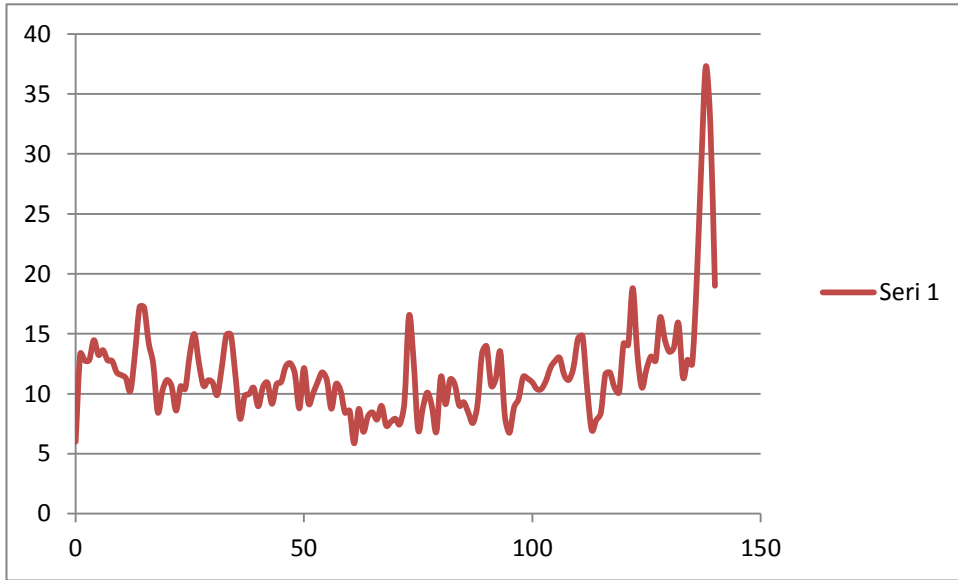
X eksenini: İntensite değerleri. Y eksenini: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.5.** c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (1. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

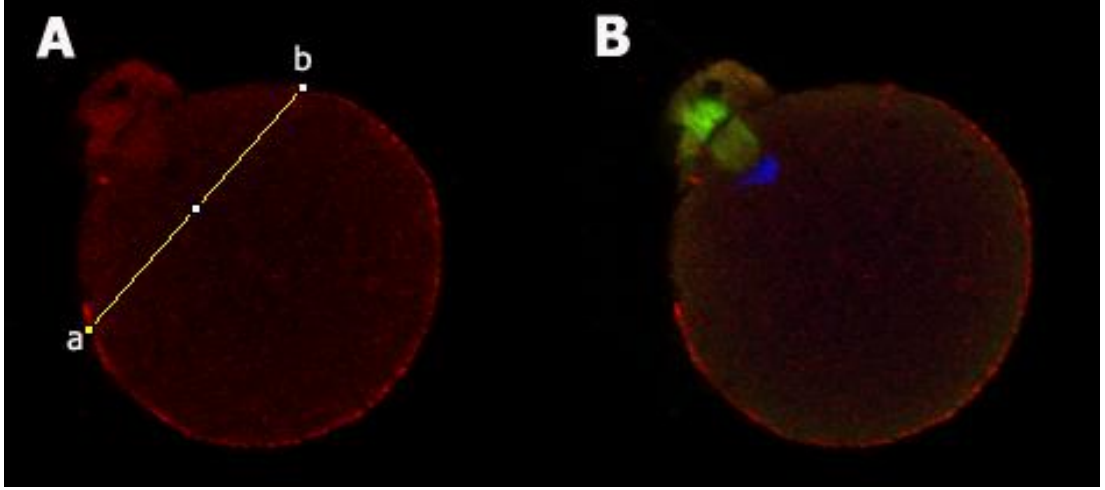
A: c-Abl (c-19)'nin lokalizasyonu (kırmızı) , a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (c-19) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.6.** c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (1. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

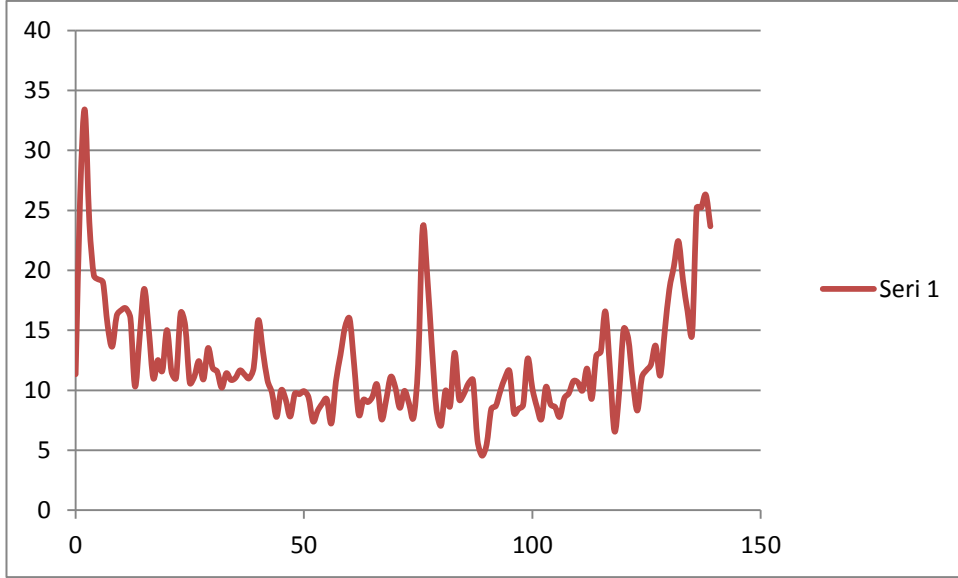
X eksenini: İntensite değerleri. Y eksenini: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.7.** c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

A: c-Abl (c-19)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

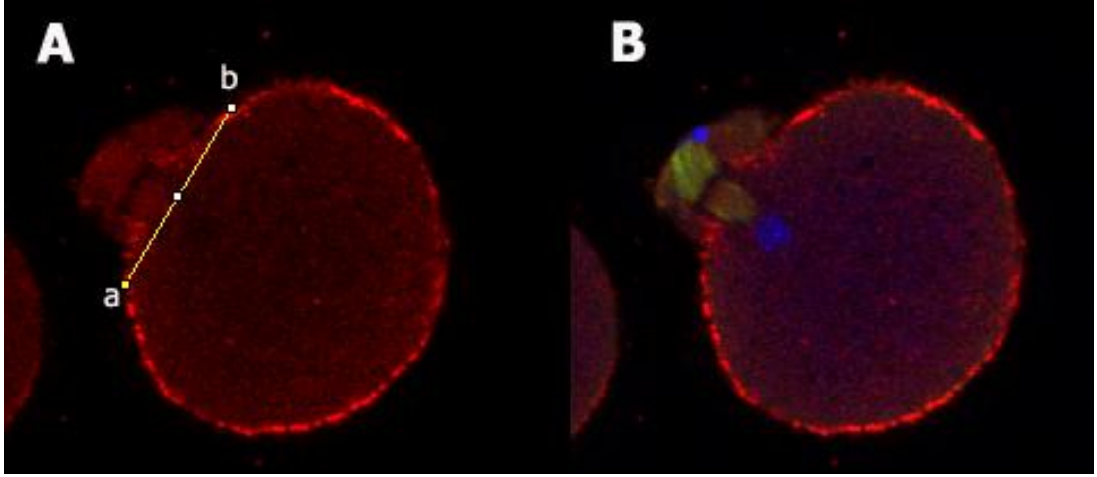
B: c-Abl (c-19) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.8.** c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (2.saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

X eksen: İntensite değerleri. Y eksen: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

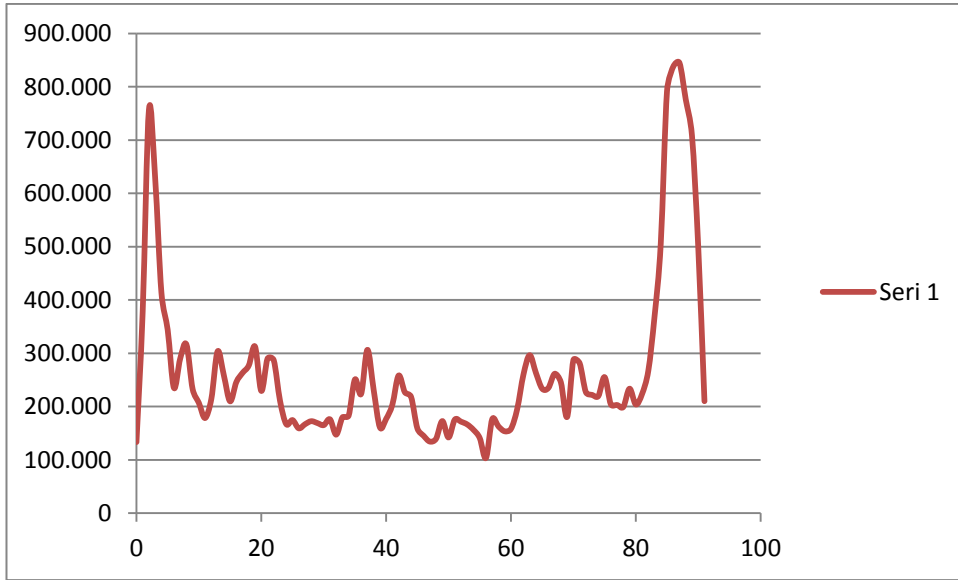




**Şekil 4.9.** c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (3. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

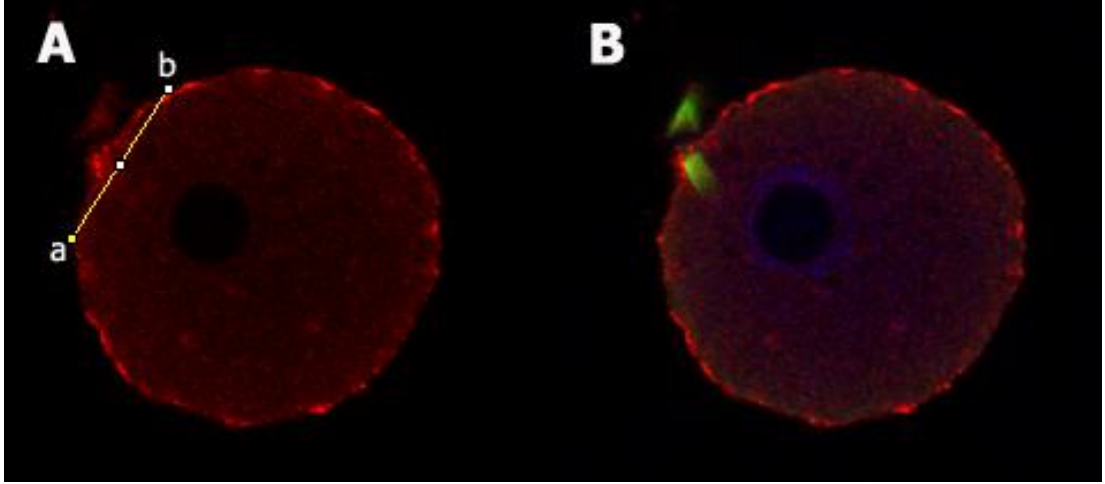
A: c-Abl (c-19)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (c-19) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.10.** c-Abl (c-19) proteinin, aktivasyon sonrası (3. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

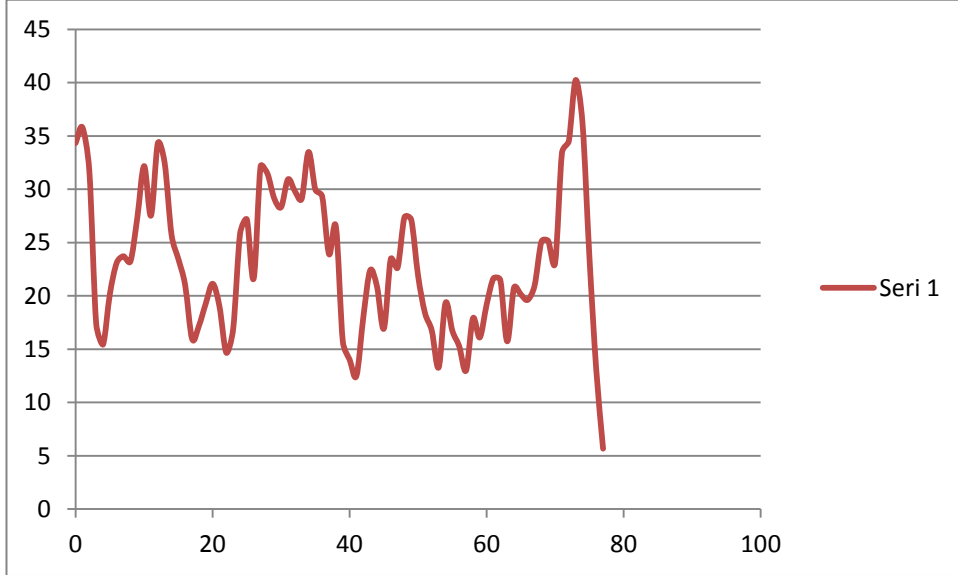
X eksen: İntensite değerleri. Y eksen: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.11.** c-Abl (c-19) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (6. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

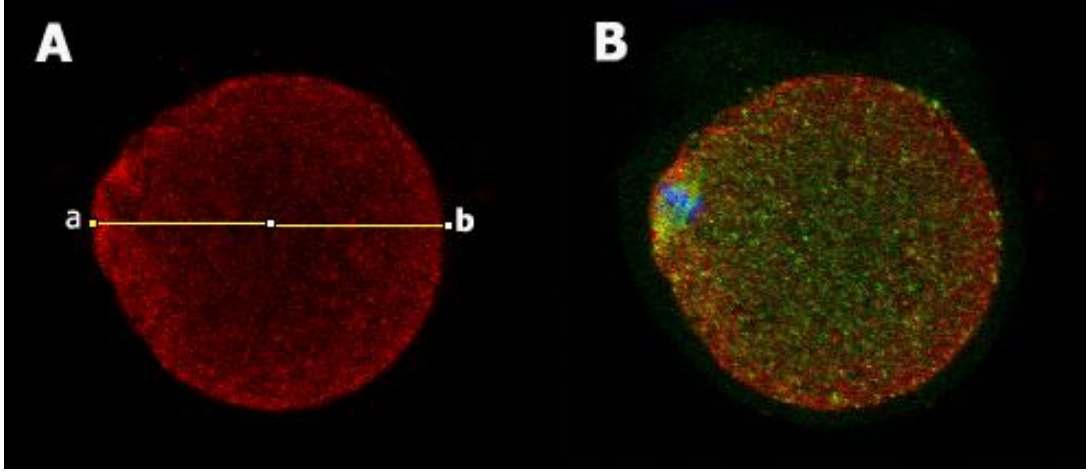
A: c-Abl (c-19)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: piksel ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (c-19) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boylarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.12.** c-Abl (c-19) proteininin, aktivasyon sonrası (6. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

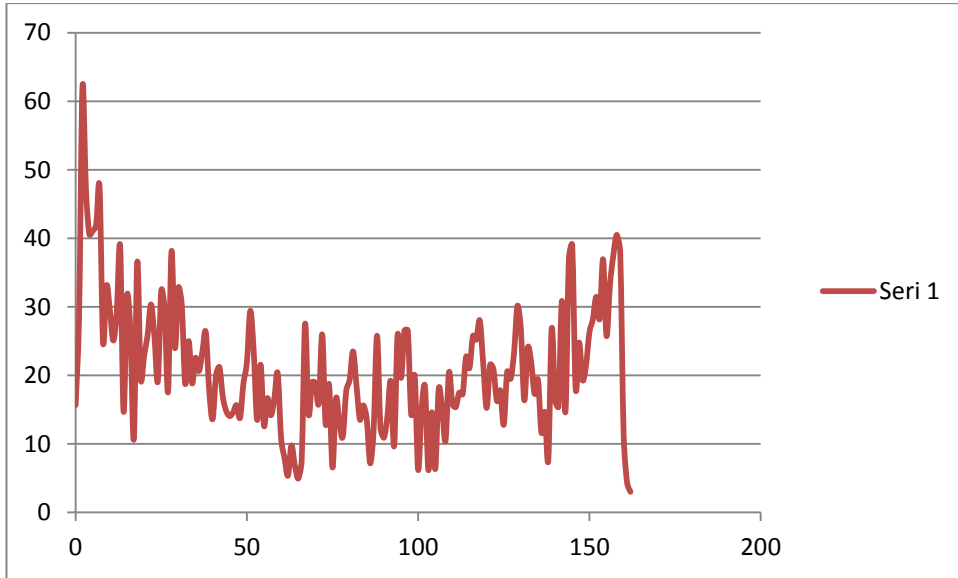
X eksenini: İntensite değerleri. Y eksenini: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.13.** c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonu.

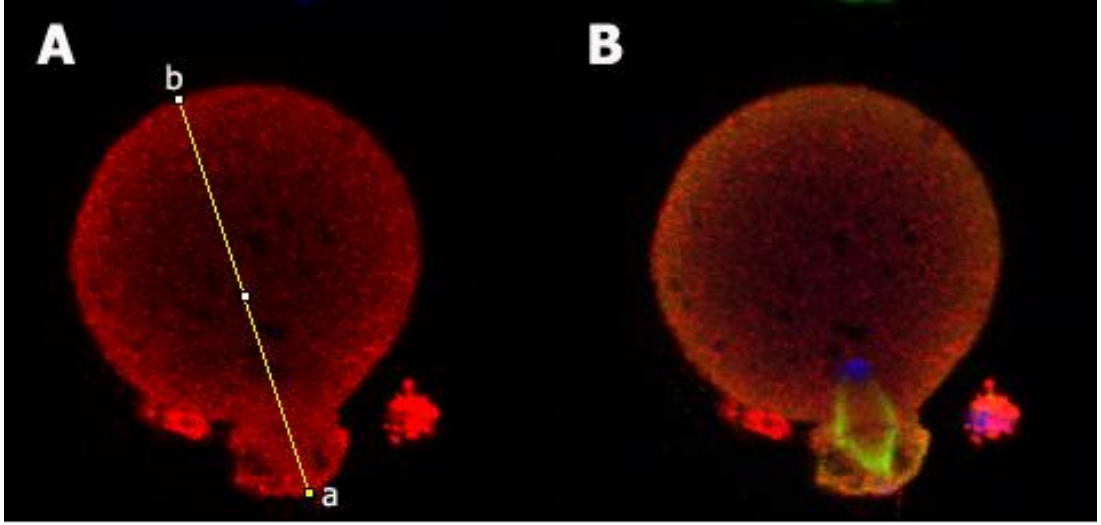
A: c-Abl (k-12)'nin lokalizasyonu (kırmızı) , a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (k-12) (kırmızı),  $\beta$ tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.14.** c-Abl (k-12) proteinin, Metafaz II oositlerdeki (0. saat) lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

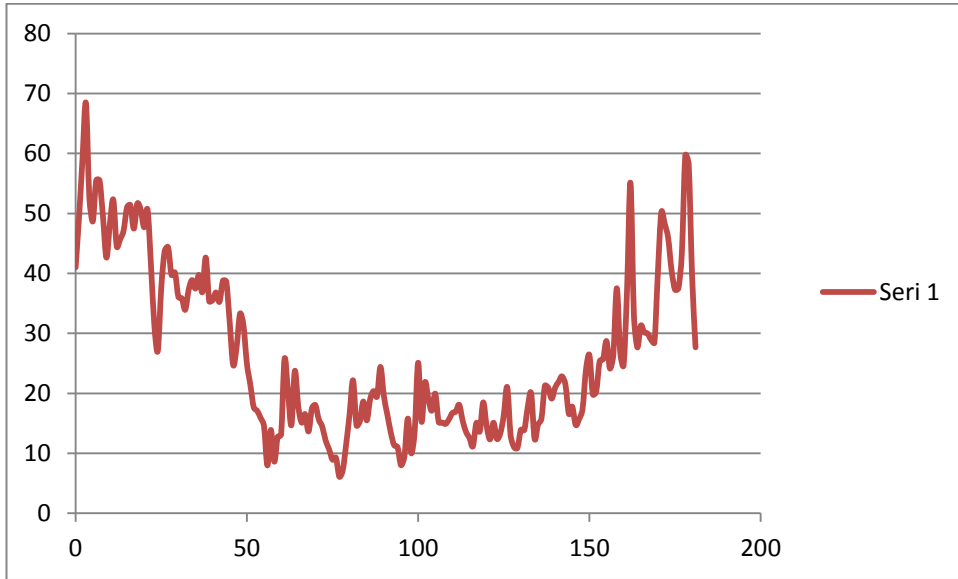
X eksen: İntensite değerleri. Y eksen: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.15.** c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (1. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

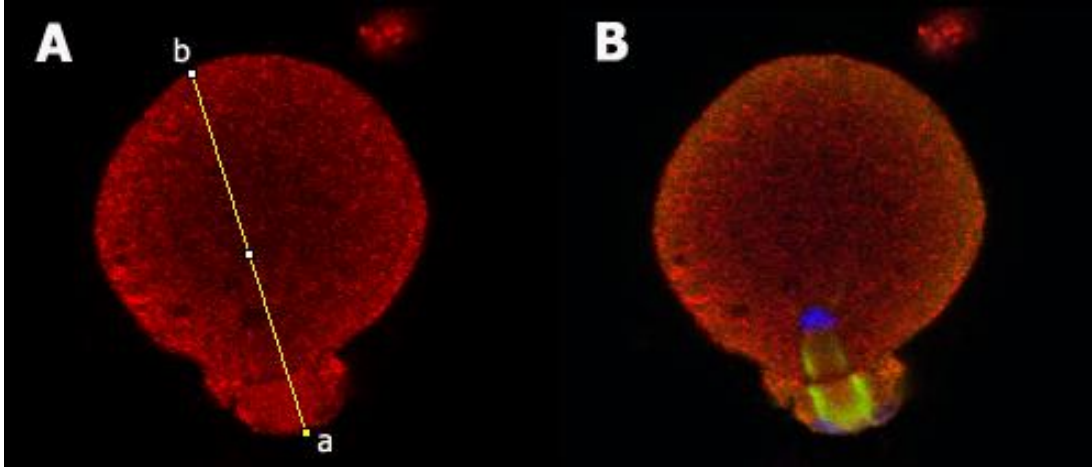
A: c-Abl (k-12)'nin lokalizasyonu (kırmızı) , a-b: piksel ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (k-12) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.16.** c-Abl (k-12) proteinin, aktivasyon sonrası (1. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

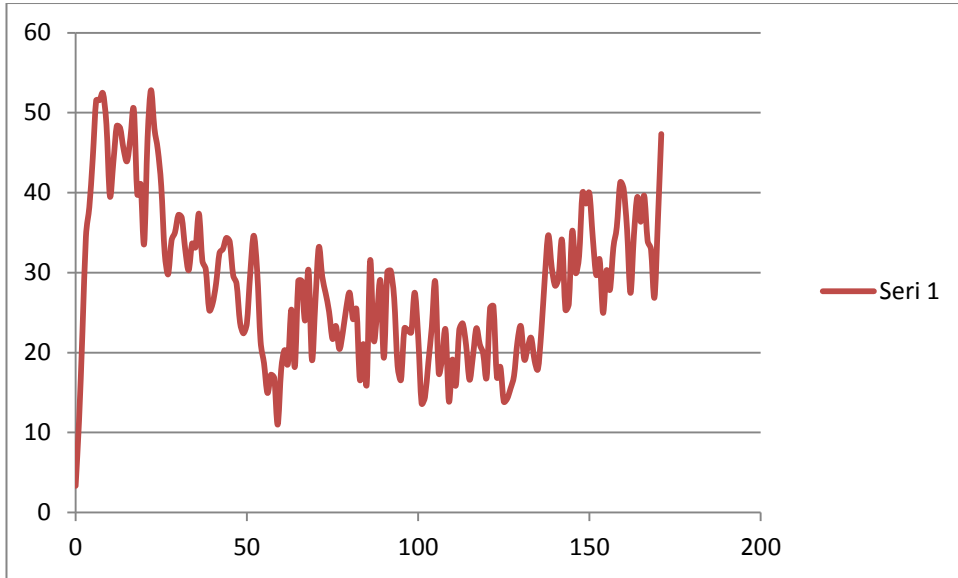
X eksenini: İntensite değerleri. Y eksenini: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.17.** c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (2. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

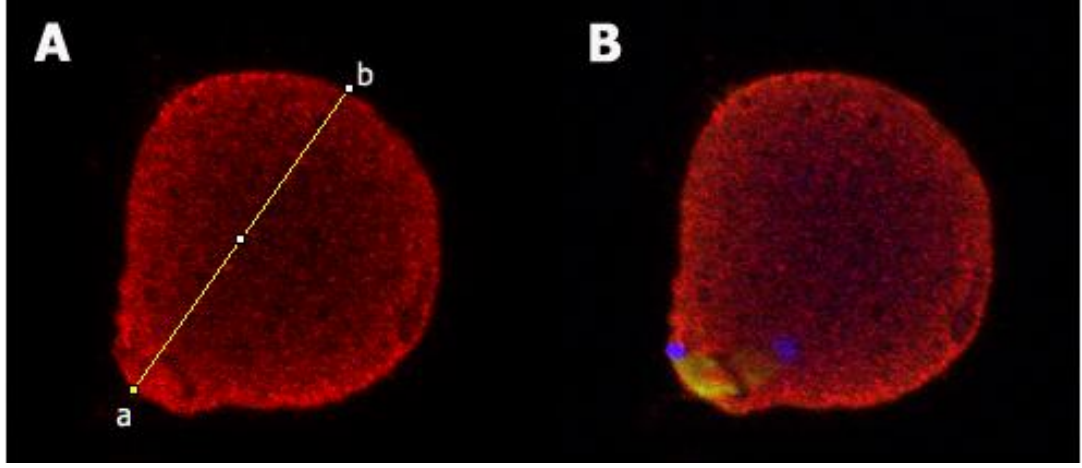
A: c-Abl (k-12)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (k-12) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.18.** c-Abl (k-12) proteinin, aktivasyon sonrası (2. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

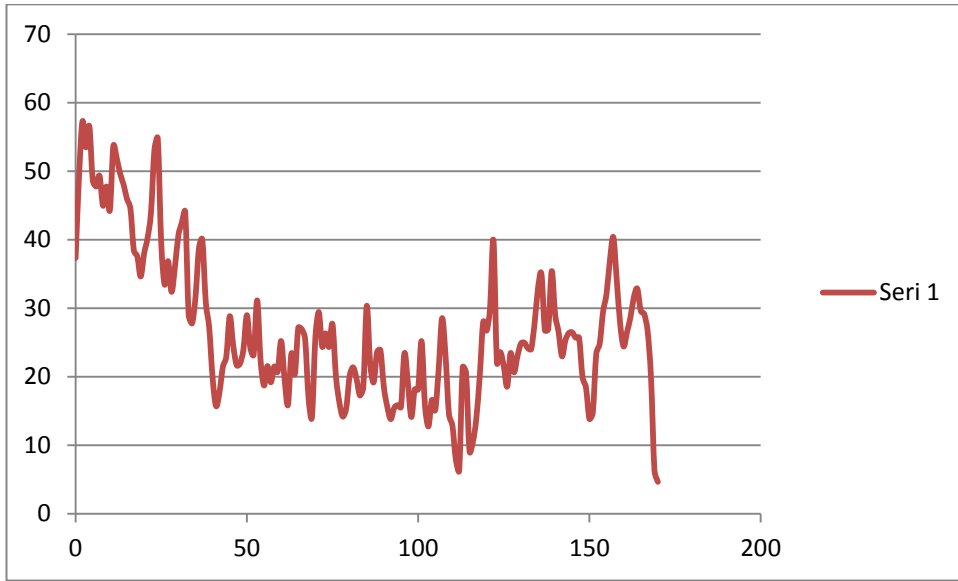
X eksen: İntensite değerleri. Y eksen: İntensite ölçümü yapılan mesafe



**Şekil 4.19.** c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (3. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

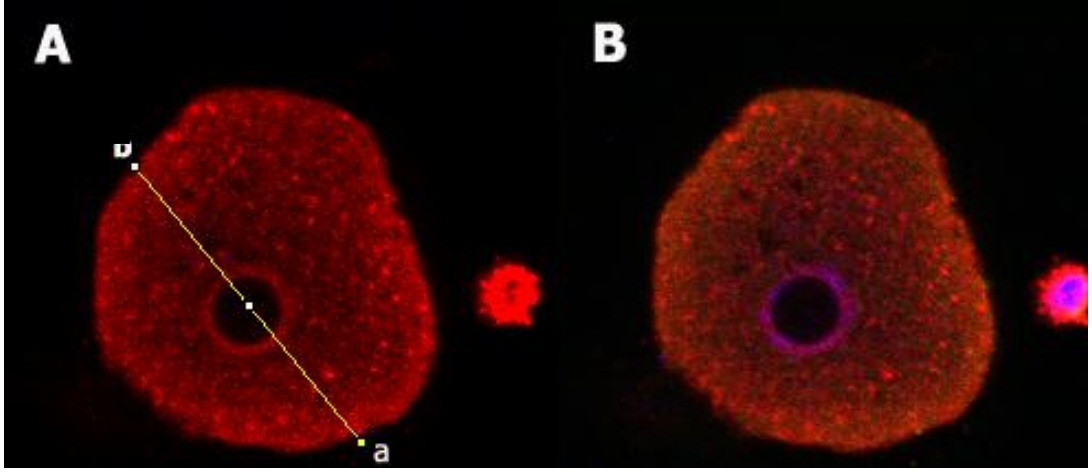
A: c-Abl (k-12)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (k-12) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boyalarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.20.** c-Abl (k-12) proteinin, aktivasyon sonrası (3. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

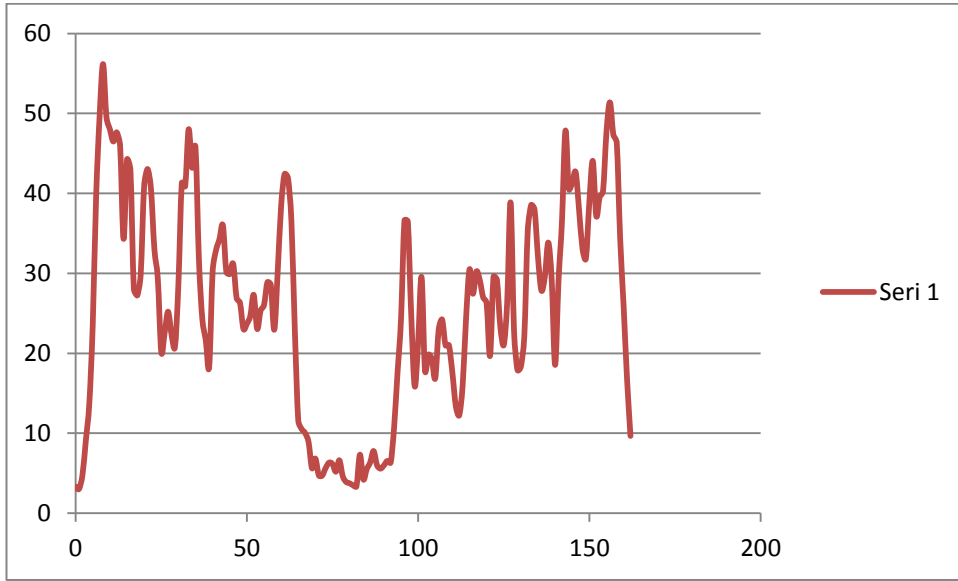
X eksenini: İntensite değerleri. Y eksenini: İntensite ölçümü yapılan mesafe.



**Şekil 4.21.** c-Abl (k-12) ve  $\beta$ -tubulin, aktivasyon sonrası (6. saat) oositlerdeki lokalizasyonu.

A: c-Abl (k-12)'nin lokalizasyonu (kırmızı), a-b: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

B: c-Abl (k-12) (kırmızı),  $\beta$ -tubulin (yeşil) ve DAPI (mavi) boylarının birleşmiş hali.



**Şekil 4.22.** c-Abl (k-12) proteinin, aktivasyon sonrası (6. saat) oositlerdeki lokalizasyonunun grafiksel gösterimi.

X eksen: İntensite değerleri. Y eksen: İntensite ölçümü yapılan mesafe.

## **4.2. c-Abl Proteinin MII Oositlerde ve Preimplantasyon Dönemi Embriyolarında Lokalizasyonu**

c-Abl'nin preimplantasyon embriyo gelişiminde yer alıp almadığının araştırılması için öncelikle oosit ve embriyolar, c-Abl proteinlerinin dağılımını göstermek için, anti-c-Abl antikorları (c-19 ve k-12), çekirdeği göstermek için DAPI, aktin filamanlarını göstermek için floresanla işaretli phalloidin kullanılarak boyandı. Hem MII oositlerde hem de preimplantasyon dönemi embriyolarında c-Abl protein varlığı tespit edildi.

MII evresindeki oositler ve 8 hücreli evredeki embriyolarda spesifik immunreaktivite olup olmadığına bakılmak amacı ile negatif ve pozitif kontrol grupları c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) proteinleri ile immunfloresan olarak boyandı (Şekil 4.23.A ve 4.24.A). Negatif kontrol gruplarında hem c-Abl (c-19) hem de c-Abl (k-12)'nin hariç tutulduğu boyama sonucunda oosit ve 8 hücreli embriyolarda hiçbir c-Abl boyaması gözlenmediğinden, sekonder antikor bağlanmasının spesifikliği onaylanmış oldu, yani primer antikor yokluğunda sekonder antikor ile inkübe edilen oosit ve embriyolarda spesifik immunoreaktivite gözlemlenmedi (Şekil 4.23.B ve 4.24.B).

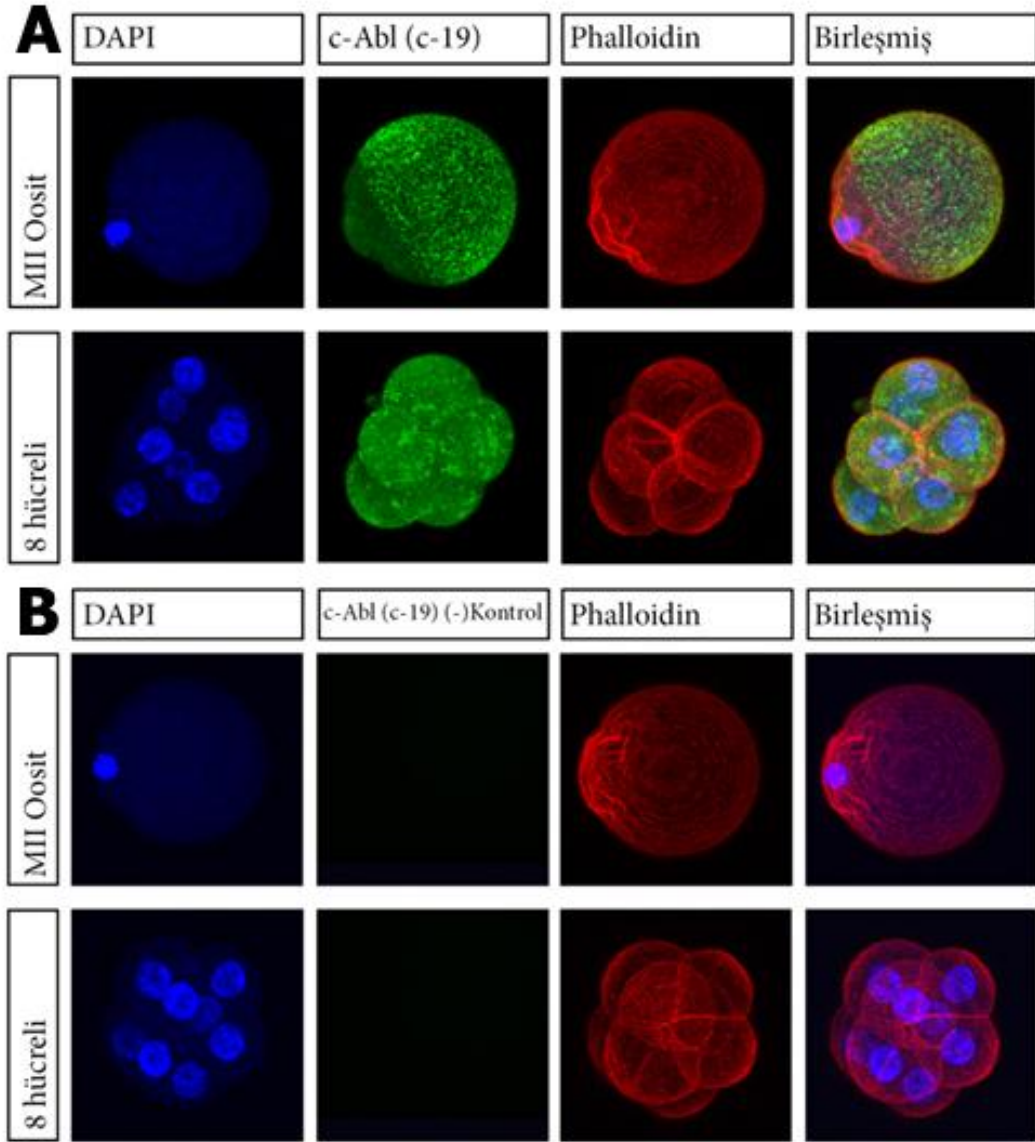
### **4.2.1. c-Abl Proteinin MII Oositlerde Lokalizasyonu**

MII oositlerinin c-Abl (c-19) (n=66) ve (k-12) (n=37) ile boyanmaları sonucu, c-Abl proteinin varlığı oositler de hem mekik ipliğinde hem de sitoplazma da tespit edildi (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26).

c-Abl (c-19) proteinin lokalizasyonu yumurta korteksinde asimetric olarak gözlemlendi. c-Abl (c-19) boyaması yarım ay şeklinde oosit korteksinde gözlenirken, mekik ipliğinin yer aldığı alanın üstünde bulunan korteks kısmında c-Abl lokalizasyonu gözlemlenmedi (4.25Aa). c-Abl (c-19)'un MII'de bekleyen oositlerde polarize olmuş bir dağılım gösterdiği görüldü. c-Abl (c-19) lokalizasyonunun olmadığı, aktin filamanlarından zengin olan korteksin mekik ipliğini örten alanda başlık şeklinde aktin lokalizasyonu gözlemlendi (Şekil 4.25Ab ve c).

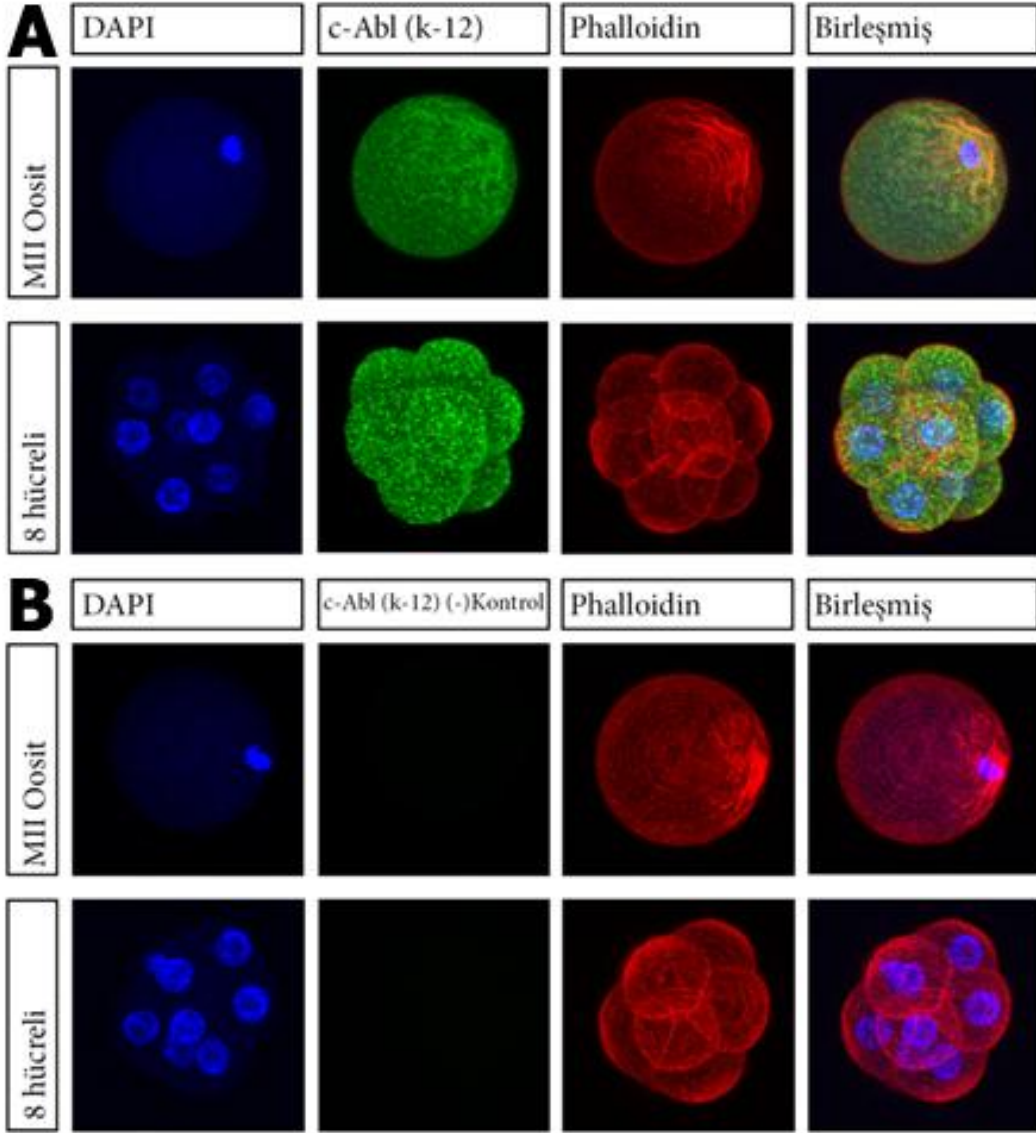


c-Abl (k-12) proteini ise oosit sitoplazmasında granüler ve yamalı şekilde bir lokalizasyon gösterirken, oositin perifer kısımlarında c-Abl (k-12)'nin yoğunlaştığı görüldü. Buna ek olarak konfokal optikal kesitlerde sitoplazmada mayoz mekiği olduğu alanlarda boyanmanın daha güçlü olduğu tespit edildi. Aktin boyaması ise yumurta korteksinde ve özellikle korteksin mekik ipliğini örten kısmında daha güçlü olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).



**Şekil 4.23.** Primer antikor, rabbit anti- c-Abl (c-19) varlığında (pozitif kontrol) (A) ve yokluğunda (negatif kontrol) (B) immunfloresan olarak boyanan oosit ve 8 hücreli embriyoların konfokal mikroskop görüntüleri.

Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı). Konfokal görüntüler z-serisi tasarımı ile elde edilen görüntülerdir.



**Şekil 4.24.** Primer antikor, rabbit anti- c-Abl (k-12) varlığında (pozitif kontrol) (A)ve yokluğunda (negatif kontrol) (B) immunfloresan olarak boyanan oosit ve 8 hücreli embriyoların konfokal mikroskop görüntüleri.

Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı). Konfokal görüntüler z-serisi tasarımı ile elde edilen görüntülerdir.

#### **4.2.2. c-Abl Proteinin İki Hücreli Embriyolarda Lokalizasyonu**

hCG enjeksiyonundan 46 saat sonra toplanan 2-hücreli embriyolar, c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) proteinleri kullanılarak immunfloresan olarak boyandığında, c-Abl (c-19) ve (k-12) proteinlerinin, blastomerlerin çekirdek ve sitoplazmasında granüler şekilde dağılım gösterdiği görüldü. c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) ile boyanan blastomerlerin perifer kısımlarının daha güçlü olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.25 ve Şekil 4.26). Bununla birlikte blastomer adezyonu, aktin filamentler, c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) boyaması sonucu elde edilen kolokalizasyon boyaması ile gözlemlendi (Şekil 4.26.B). Ayrıca 2. kutup hücresinin de her iki c-Abl proteini ile pozitif olarak boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.26.B).

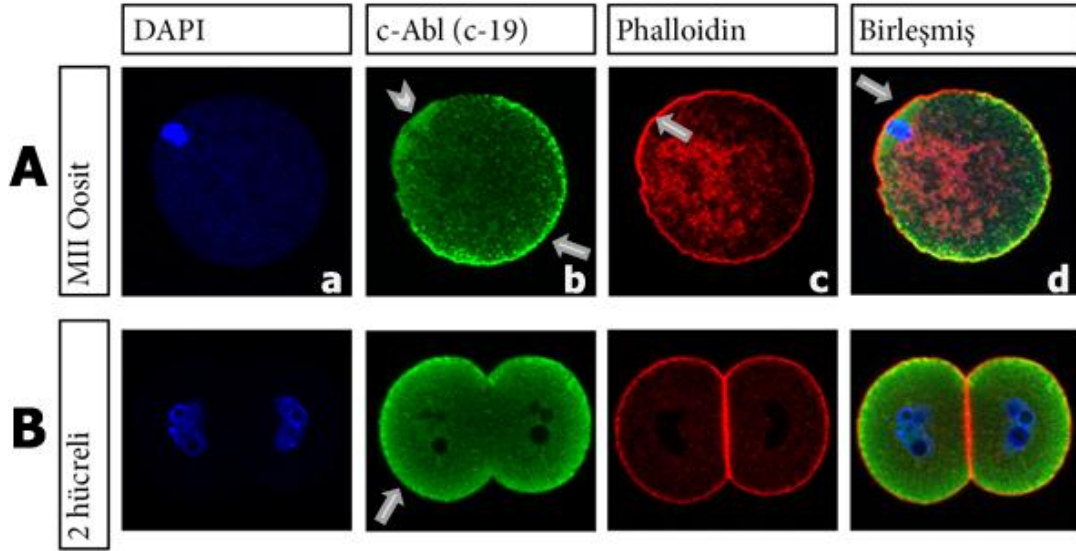
#### **4.2.3. c-Abl Proteinin Sekiz Hücreli Embriyolarda Lokalizasyonu**

İlk üç yarıklanma sonucunda morfolojik olarak birbirine benzeyen 8 hücreli embriyo meydana geldi. Preimplantasyonun ikinci gününde dördüncü yarıklanma öncesinde embriyoların kompaksiyon düzeyine geldikleri gözlemlendi. Kompaksiyon, apikal-bazal polaritenin meydana geldiği, hücre korteksinde çeşitli polarite proteinlerinin lokalize olduğu çok önemli bir dönemdir. Sekiz hücreli evredeki embriyolarda kompaksiyon öncesi ve sonrasında c-Abl proteinlerine bakılarak bu dönemde c-Abl proteinlerinin varlığı, lokalizasyonu ve olası rolleri incelenmek için farklı zaman aralıklarında 8 hücreli embriyolar, inkübasyon sonrası tespit edildi. c-Abl lokalizasyonunu belirlemek üzere toplanan erken, orta ve geç 8 hücreli evrede bulunan embriyolar da c-Abl'ın dağılım varyasyonları incelendi.

Farklı zamanlarda inkübatörden çıkarılıp tespit edilen ve c-Abl (c-19) proteini ile boyanan erken, orta ve geç dönem 8 hücreli embriyoların arasında c-Abl lokalizasyonu olarak bir farklılık görülmedi. Blastomerlerin hem çekirdeği hem de sitoplazması pozitif olarak boyandı. Ayrıca çekirdek ve sitoplazmanın granüler olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.27).

İncelenen optikal konfokal kesitlerde c-Abl (k-12) proteinin 8 hücreli evrede blastomerlerin çekirdek ve sitoplazmasında pozitif olarak bulunduğu ve çekirdeğin sitoplazmaya oranla daha güçlü, granüler olarak boyandığı gözlemlendi. c-Abl (k-12) ile immunfloresan olarak boyanan erken, orta ve geç 8 hücreli evrede bulunan

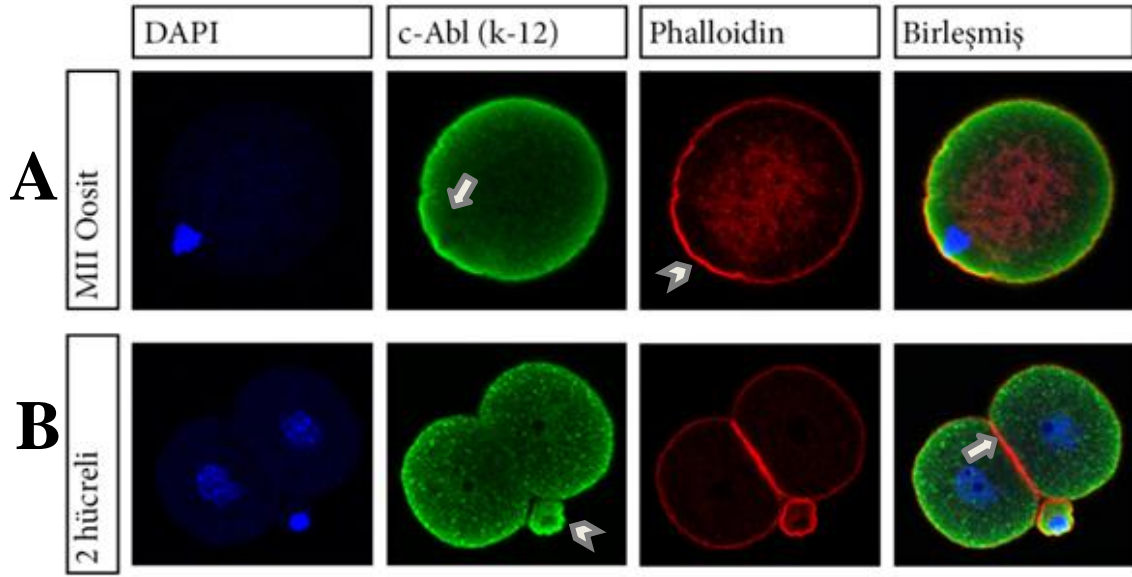
embriyolar karşılaştırıldığında, c-Abl lokalizasyonunda bir farklılık olmadığı tespit edildi (Şekil 4.28). Erken, orta ve geç dönem embriyoların periferal blastomerlerinin apikal membranlarında, c-Abl (k-12) proteininin yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.28).



**Şekil.4.25.** c-Abl (c-19) ve aktin proteinlerinin ve Metafaz II Oosit ve 2 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

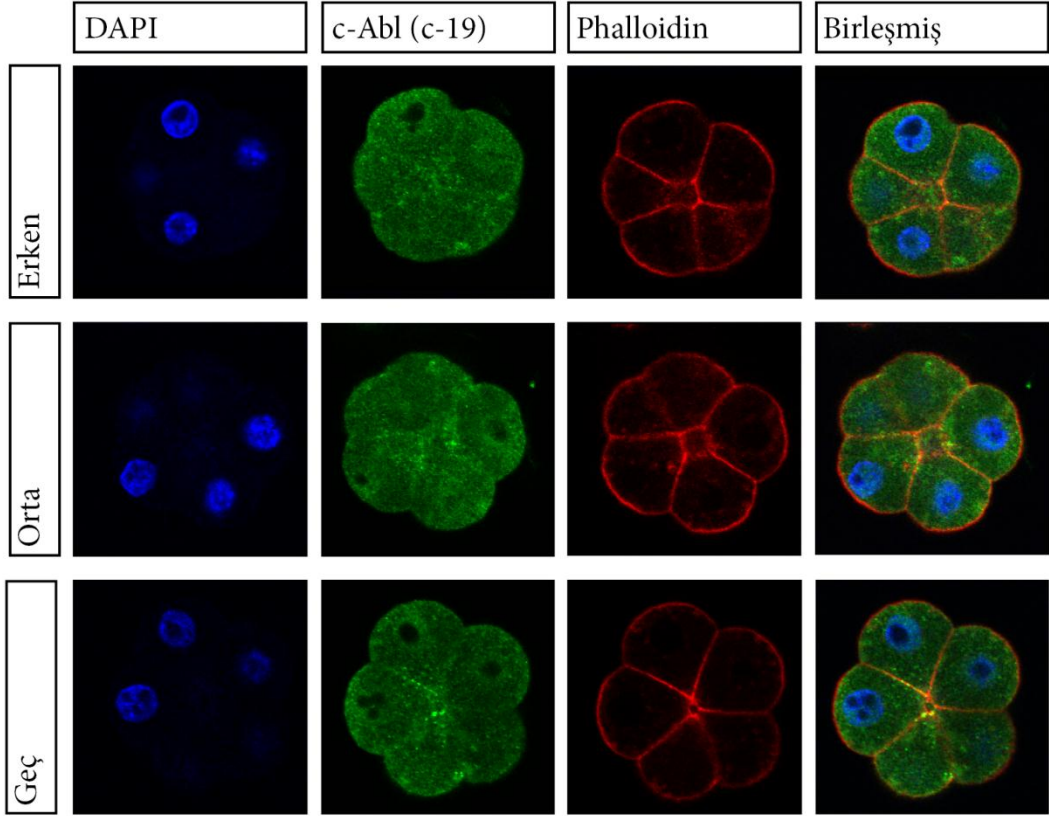
A) Metafaz II'de bekleyen oositler, b) ok ucu: mekik ipliklerinde lokalize olmuş c-Abl proteini ok: yarım ay şeklinde c-Abl protein lokalizasyonu; c ve d) ok: aktin mikrofilamentlerinden zengin kortikal alan. B) 2 hücreli evrede bulunan embriyo, ok: blastomerlerin apikal kısımlarında c-Abl lokalizasyonu.

Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı).

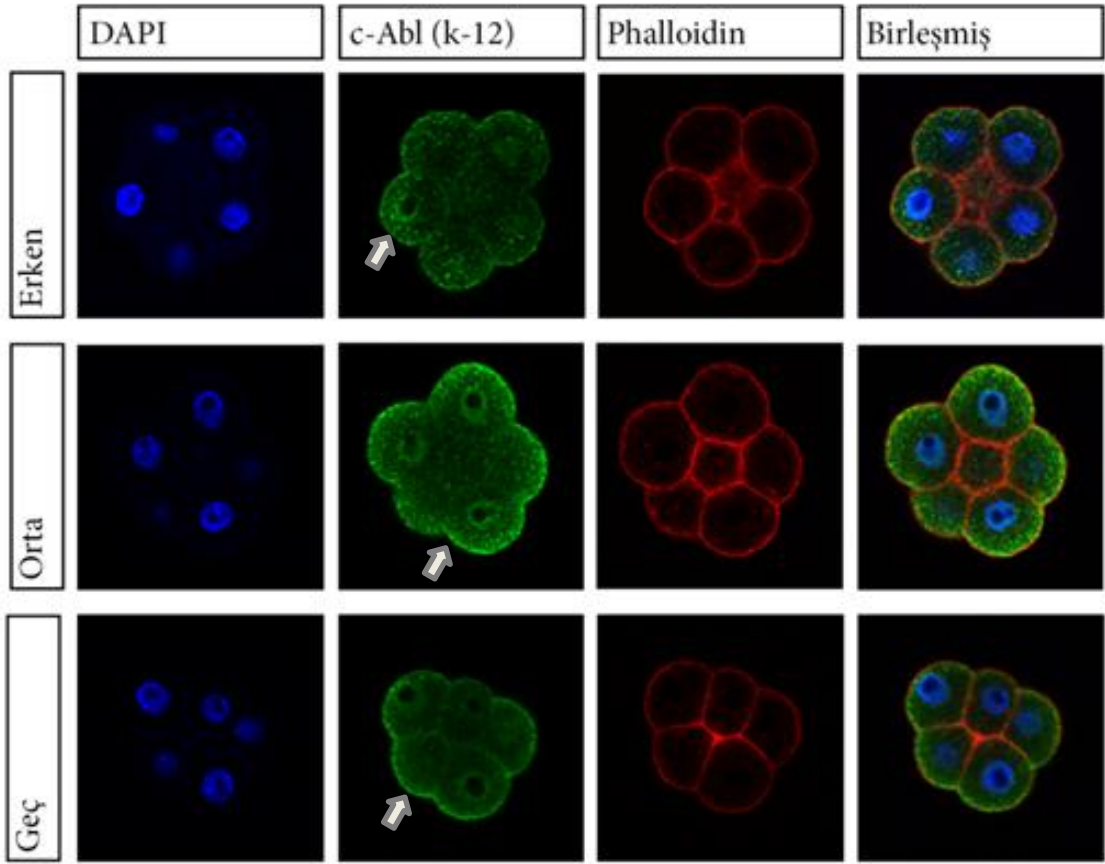


**Şekil.4.26.** c-Abl (k-12) ve aktin proteinlerinin ve Metafaz II oosit ve 2 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) MII'de bekleyen oositler, ok: mekik ipliklerinde lokalize olmuş c-Abl proteini ok ucu: aktin mikrofilamentlerinden zengin kortikal alan. B) 2 hücreli embryo, ok ucu: II. Kutup cisimciği, ok: blastomer adezyonu. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (k-12) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı).



**Şekil.4.27.** c-Abl (c-19) ve aktin proteinlerinin erken, orta, geç 8 hücreli embriyoda lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.  
Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (k-12) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı).



**Şekil.4.28.** c-Abl (k-12) ve aktin proteinlerinin erken, orta, geç 8 hücreli embriyoda lokalizasyonunun, konfokal mikroskop kesit görüntüleri. Oklar: blastomerlerin apikal kısımlarında c-Abl lokalizasyonu.

Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (k-12) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren phalloidin (kırmızı).

#### 4.2.4. c-Abl Proteinin Morula Hücrelerinde Lokalizasyonu

Preimplantasyonun ikinci gününde (E 2.5), 16 hücreli aşamayı takiben morula evresine ulaşan embriyolar inkübatörden çıkarılıp tespit edildikten sonra c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) ile immunfloresan olarak boyandı. İç ve dış blastomerlerin çekirdek ve sitoplazmalarının c-Abl (c-19) ve c-Abl (k-12) ile pozitif olarak boyandığı gözlemlendi. Sitoplazma ve çekirdekte c-Abl protein boyamasının granüler olduğu ve nokta şeklinde yoğunlaşan alanların yer aldığı görüldü (Şekil 4.29A ve Şekil 4.31A).



Morula evresinde eksternal ve internal hücrelerdeki c-Abl (c-19) c-Abl (k-12) proteinlerinin intensite oranları karşılaştırıldığında, polarite özelliği olan eksternal hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasının daha güçlü boya aldığı, boyamanın polariteden yoksun olan internal hücrelerde ise daha zayıf olduğu tespit edildi (Şekil 4.29A ve Şekil 4.31A). Ayrıca c-Abl (k-12) proteini ile işaretlenen blastomerlere bakıldığında, eksternal ve internal blastomerlerin çekirdeğinin sitoplazmadan daha güçlü olarak boyandığı görüldü (Şekil 4.31A).

Konfokal optikal kesitler incelendiğinde c-Abl (c-19) ile immunfloresan olarak boyanan eksternal ve internal blastomerlerde proteinin plazma membranını da boyadığı gözlemlendi. Ayrıca proteinin eksternal blastomer korteksinin apikal kısımlarında bazo-lateral alanlara oranla yoğunlaştığı, internal hücrelerde ise c-Abl (c-19)'ın hücre korteksi boyunca dağılım gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.29A). c-Abl (k-12) proteinin ise membranları boyamadığı, ancak eksternal hücrelerin apikal kısımlarında boyamanın yoğunlaştığı bu alanlarda daha güçlü olduğu gözlemlendi (Şekil 4.31A).

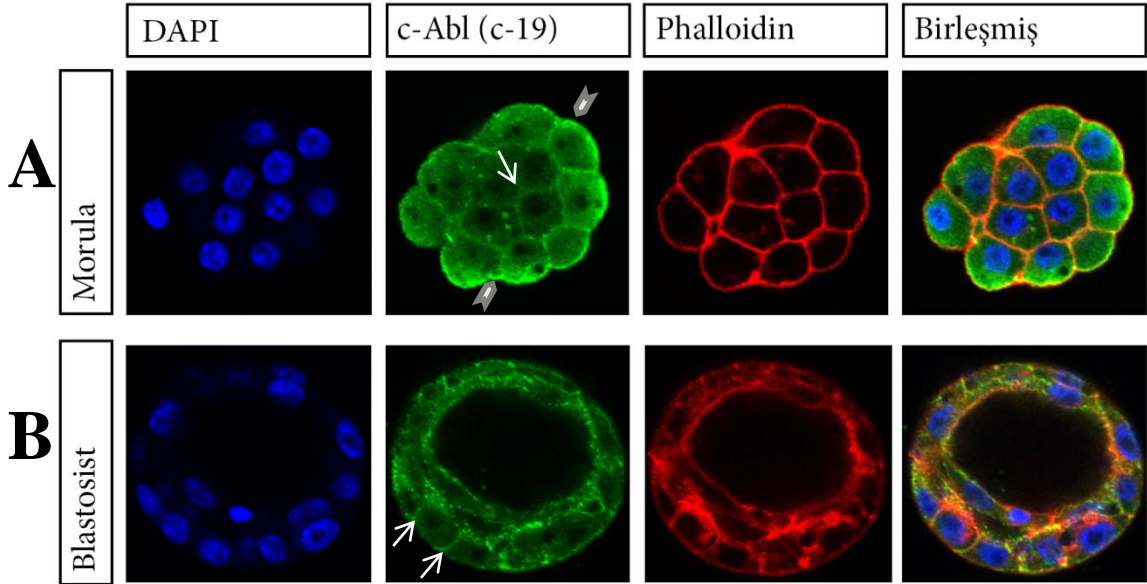
#### **4.2.5. c-Abl Proteinin Orta Blastosist Evresindeki Embriyolarda Lokalizasyonu**

Preimplantasyonun üçüncü gününde orta blastosist evresinde (E 3.5) olan embriyolar inkübatörden çıkarıldı ve kavitesi embriyonun toplam çapının %50'sine eşit ya da daha büyük olan embriyolar seçildi. Farelerde E 3.5 evresinde TE ve ICM hücreleri birbirinden morfolojik olarak da ayırt edilebilmektedir. Bunun için öncelikle c-Abl proteini ve hücre-hücre sınırlarını ayırt etmek için aktin filamentleri boyayan floresanla işaretli phalloidin kullanıldı. Ayrıca TE hücrelerini ICM hücrelerinden rahatça ayırabilmek için TE işaretleyicisi olan *Cdx-2* (spesifik olarak yalnızca TE hücrelerini boyar) ve c-Abl proteinleri (Şekil 4.30A ve Şekil 4.32A) buna ek olarak da TE hücrelerinden ve daha güçlü şekilde de ICM hücreleri tarafından eksprese edilen transkripsiyon faktörü olan *Oct-4* ve c-Abl proteinleri kullanılarak immunfloresan boyama yapıldı (Şekil 4.30B ve Şekil 4.32B).

Konfokal optikal kesitlerde yapılan incelemeler sonucu, c-Abl (c-19) proteini TE hücrelerinin plazma membranında güçlü bir boyanma gösterirken, TE hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasını daha zayıf şekilde boyadığı görüldü (Şekil

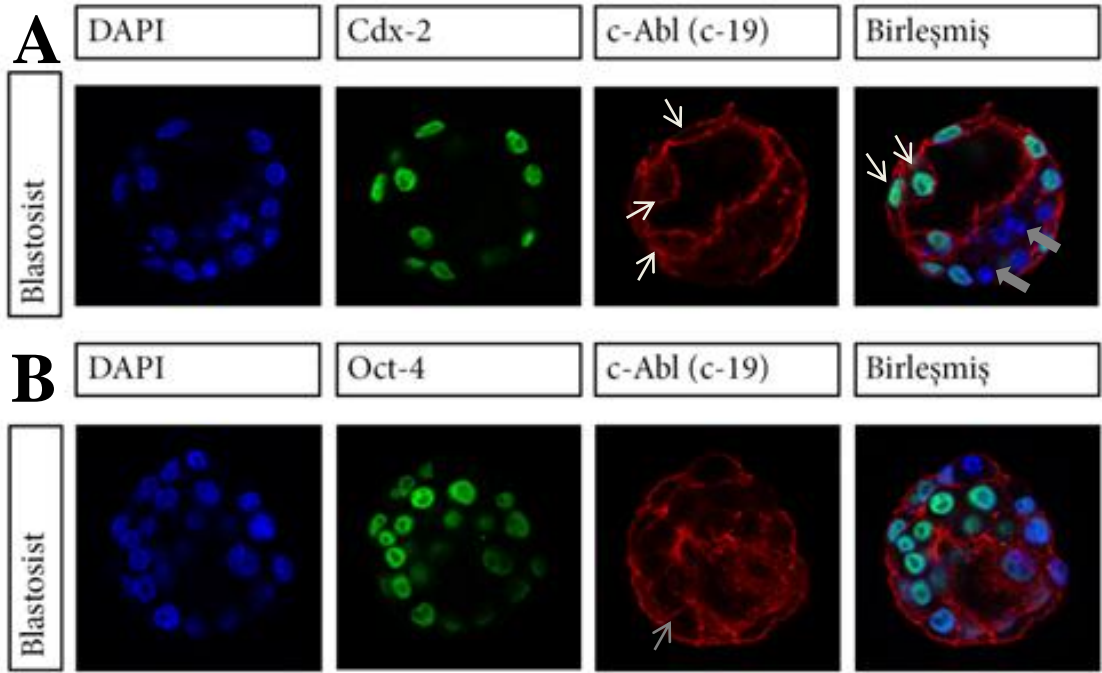
4.29B ve Şekil 4.30). ICM hücreleri incelendiğinde ise TE hücrelerindeki gibi güçlü bir membran boyaması gözlenmedi. ICM hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasının da TE hücrelerine göre daha zayıf boya aldığı tespit edildi (Şekil 4.29B ve Şekil 4.30).

İmmunfloresan c-Abl (k-12) proteininin boyaması sonrası elde edilen konfokal optikal kesit görüntülerinde, TE hücreleri, ICM hücreleri ile karşılaştırıldığında, c-Abl (k-12) proteininin TE hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında güçlü olarak lokalize olurken ICM hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında zayıf olarak lokalize olduğu tespit edildi (Şekil 4.31B ve Şekil 4.32).



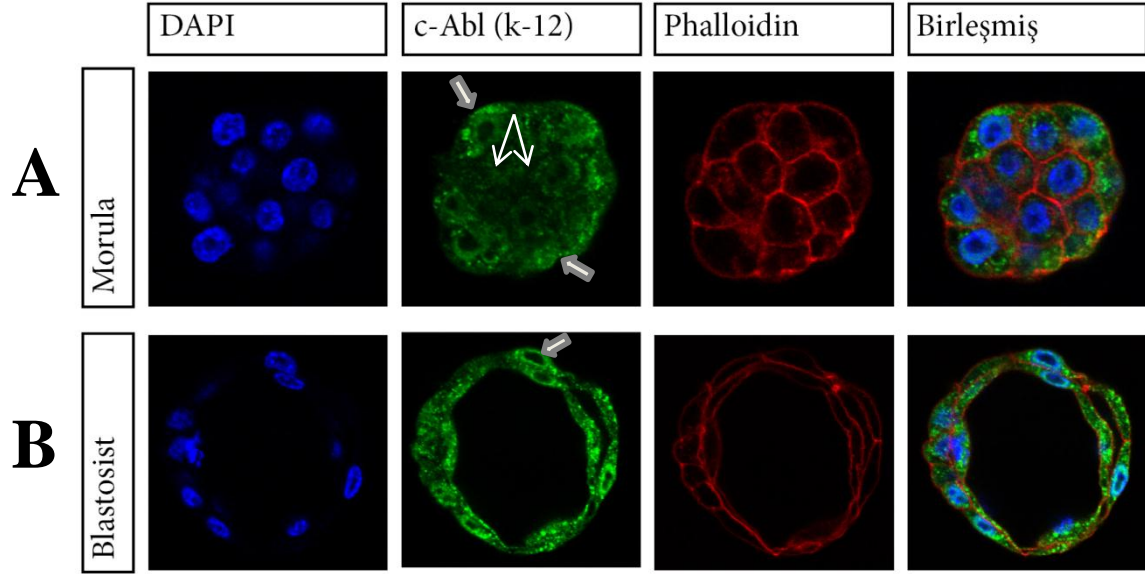
**Şekil.4.29.**c-Abl (c-19) proteini ve aktin mikrofilamentlerinin, morula ve E 3.5 blastosistlerdeki lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Morula evresinde embriyo, ok ucu: eksternal hücrelerin apikal kısımlarında c-Abl protein yoğunluğu, ince ok: internal hücrelerin plazma membranında c-Abl lokalizasyonu. B) E 3.5 dönemindeki blastosist, ok: TE hücrelerinde c-Abl membran lokalizasyonu. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren Phalloidin (kırmızı).



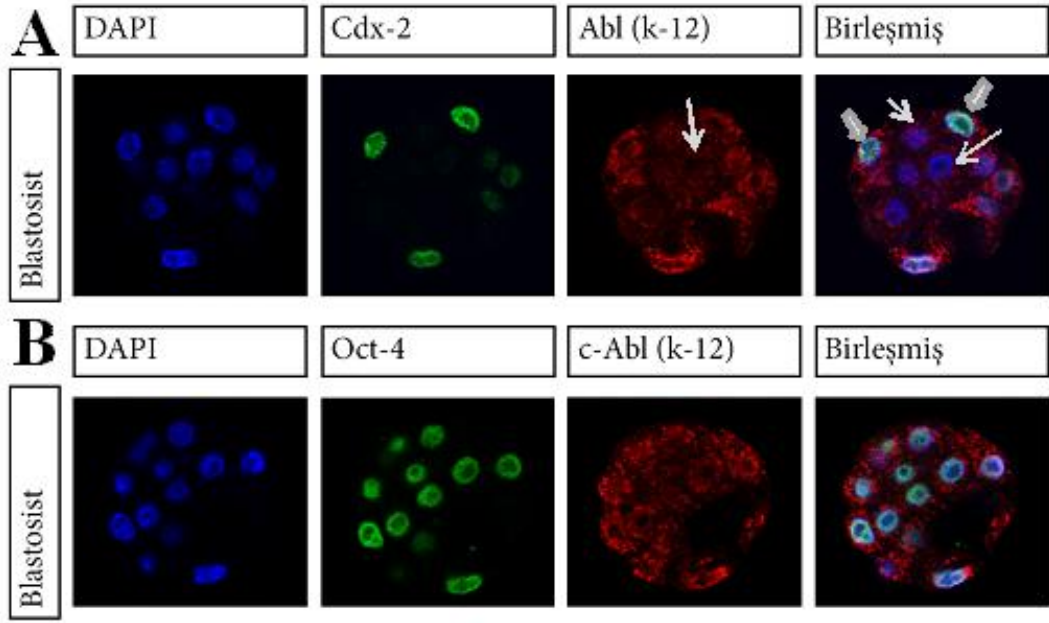
**Şekil.4.30.** *Cdx-2*, *Oct-4*, *c-Abl (c-19)* ile immunfloresan olarak boyanan E 3.5 blastosistin konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Orta blastosistin, özel olarak Trofektoderm (TE) hücreleri tarafından eksprese edilen *Cdx-2* ile *c-Abl (c-19)* ile immunfloresan olarak boyanması, ince oklar: *c-Abl* 'ın TE hücrelerinde membran lokalizasyonu, kalın oklar: iç hücre kitlesi (ICM) hücreleri. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), *Cdx-2* (yeşil), *c-Abl (c-19)* (kırmızı). B) Orta blastosistin, güçlü olarak ICM hücreleri tarafından eksprese edilen *Oct-4* ile *c-Abl (c-19)*'un immunfloresan olarak boyanması, ince ok: *c-Abl* 'ın TE hücrelerinde membran lokalizasyonu. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), *Oct-4* (yeşil), *c-Abl (c-19)* (kırmızı).



**Şekil.4.31.** c-Abl (k-12) ve aktin mikrofilamentlerinin, Morula ve E3.5 blastosistlerdeki lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Morula evresinde embriyo, kalın oklar: eksternal hücrelerin apikal kısımlarında c-Abl protein yoğunluğu, ince ok: internal hücreler. B) E 3.5 dönemindeki blastosist, ok: TE hücresinde c-Abl (k-12) lokalizasyonu. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (k-12) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren Phalloidin (kırmızı).



**Şekil.4.32.** *Cdx-2*, *Oct-4*, c-Abl (k-12) proteinleri ile immunfloresan olarak boyanan E 3.5 blastosistin konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

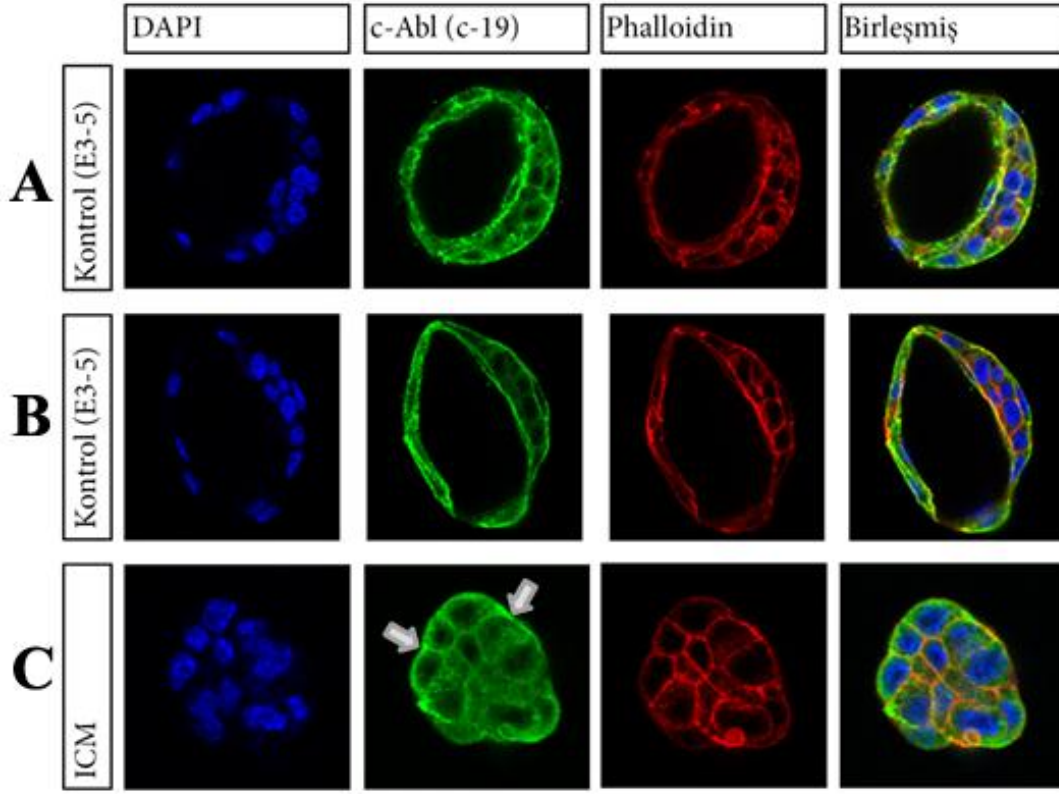
A) Orta blastosistin, özel olarak Trofektoderm (TE) hücreleri tarafından eksprese edilen *Cdx-2* ve c-Abl (c-19) ile immunfloresan olarak boyanması, kalın oklar: TE hücrelerinde c-Abl (k-12) lokalizasyonu, ince oklar: c-Abl 'ın ICM hücrelerinde c-Abl (k-12) lokalizasyonu. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), *Cdx-2* (yeşil), c-Abl (k-12) (kırmızı). B) Orta blastosistin, güçlü olarak ICM hücreleri tarafından eksprese edilen *Oct-4* ve c-Abl (k-12) proteinleri ile immunfloresan olarak boyanması. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), *Oct-4* (yeşil), c-Abl (k-12) (kırmızı).

### **4.3.İmmunocerrahi Yöntemi İle İzole Edilen ICM'lerde c-Abl Proteini Lokalizasyonu**

Preimplantasyonun üçüncü gününde E 3.5 evresine ulaşmış olan blastosistlerden kavite çapı tüm blastosistin %50'si kadar ya da büyük olanlar embriyolar ayrıldı. Bir kısmı kontrol embriyoları (n=12) olarak seçildi. Kalan embriyolardan ise immunocerrahi yöntemi ile ICM hücreleri izole edildi. İzolasyon sonrası kontrol blastosistler ve ICM'ler c-Abl (c-19) (k-12) ve aktin ile immunfloresan olarak boyandı (Şekil 4.33 ve Şekil 4.34).

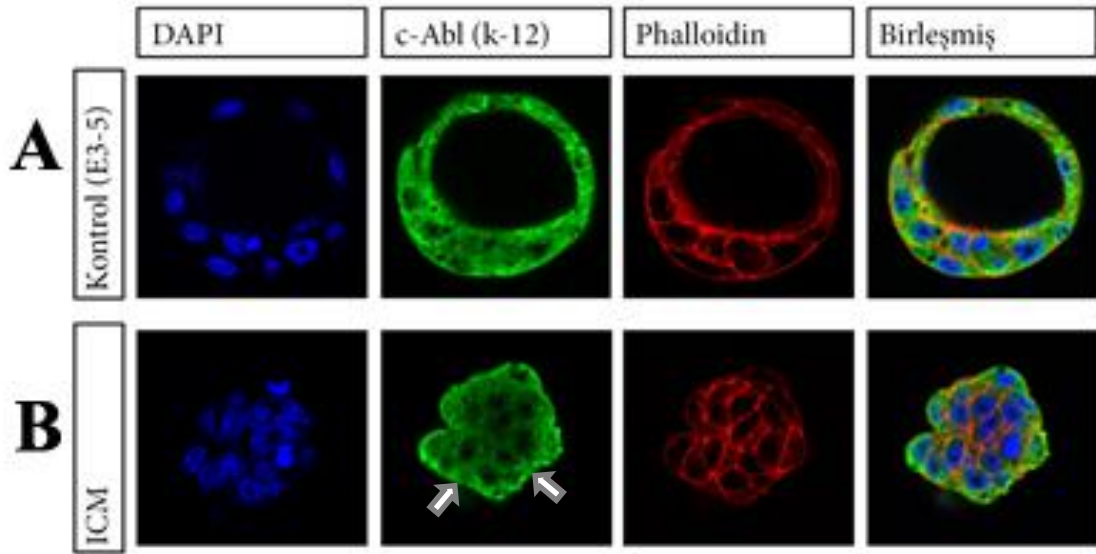
Kontrol grubu c-Abl (c-19) ile boyanan E 3.5 blastosistlerin (n=6) TE hücrelerinde ICM hücrelerine kıyasla çekirdek ve sitoplazmalarının daha yoğun boyandığı tespit edildi (Şekil 4.33Ave B). İzolasyon sonrası tespit edilen, c-Abl (c-19) ile boyanan ICM'lerde (n=14) kontrol grubundaki gibi c-Abl boyaması görüldü, ancak izole edilmiş ICM'lerin eksternal hücrelerinin apikal korteksinde, bazal ve lateral kortekse oranla daha güçlü bir boyama tespit edildi (Şekil 4.33C).

Kontrol grubu c-Abl (k-12) ile boyanan E 3.5 blastosistlerin (n=6) TE hücrelerinde ICM hücrelerine kıyasla çekirdek ve sitoplazmalarının daha yoğun boyandığı tespit edildi (Şekil 4.34A). İmmunocerrahi sonrası izole edilen ve c-Abl (k-12) proteini ile boyanan ICM hücrelerinin (n=12) yüzeyinde bulunan eksternal hücrelerin apikal kısımlarında c-Abl (k-12)'nin daha yoğun boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.34A).



**Şekil.4.33.** İzole edilen ICM'lerde c-Abl (c-19) ve aktin filamentleri lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A ve B) Kontrol blastosist (E 3.5) C) İzole edilen ICM hücreleri, oklar: ICM hücrelerinin, eksternal hücrelerinin apikal kısımlarında c-Abl (c-19) proteinin güçlü boyandığı alanlar. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren Phalloidin (kırmızı).



**Şekil.4.34.** İzole edilen ICM'lerde c-Abl (k-12) ve aktin filamentleri lokalizasyonunun konfokal mikroskop kesit görüntüleri.

A) Kontrol blastosist (E 3.5) B) İzole edilen ICM hücreleri, oklar: ICM hücrelerinin, eksternal hücrelerinin apikal kısımlarında c-Abl (k-12) proteininin güçlü boyandığı alanlar. Çekirdeği gösteren DAPI (mavi), c-Abl (c-19) (yeşil), Aktin filamentleri gösteren Phalloidin (kırmızı).



## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile c-Abl protein tirozin kinaz'ın fare oositlerde ve implantasyon dönemi embriyolardaki lokalizasyonu incelendi. Hem oositlerde hem de preimplantasyon dönemi boyunca fare embriyolarında her evrede c-Abl protein lokalizasyonunu görmemiz c-Abl proteinin bu dönemde bir takım roller üstlendiğini göstermiştir.

Ahmad ve ark. (2) yaptığı çalışmada somatik ve germ hücre soylarında c-Abl ekspresyonunu belirlemişler ve farenin preimplantasyon döneminde embriyonik gelişiminde c-Abl proteinin yer aldığını ve görevleri olduğunu göstermişlerdir. Daha önce yapılan çalışmalarda, c-Abl knockout farelerde, neonatal letalitenin olduğu, fertilitenin düştüğü (89) ve bu farelerin hematopoietik ve embriyonal gelişiminde çeşitli bozuklukların meydana geldiği görülmüştür (54, 59, 85, 163).

Yapılan çalışmalar ile c-Abl'lar çeşitli hücre proteinlerle etkileşime geçerek hücre morfogenezisi, hareketi (59), büyüme ve çoğalmasını (özellikle G1/S kontrol noktasında), apoptozisin modülasyonunu (54, 125), dişi ve erkek farelerin germ hücrelerinin gelişimini kontrol eden farklı sinyal yollarında önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (66).

Yaba ve ark. (180) yapmış oldukları çalışmada ise, c-Abl tirozin kinazın fare plasentasının fetal kısmında lokalize olduğunu, maternal kısımda lokalize olmadığını gözlemlemişler ve c-Abl'ın uterus modellenmesi ve plasental gelişiminde yer aldığını göstermişlerdir. Daha önceki araştırmalarda ise c-Abl ekspresyonunu somatik ve germ hücre soylarında tanımlanmış, fare embriyonik gelişiminin preimplantasyon sürecindeki rolleri gösterilmiştir (2). Ayrıca Iwaoki ve ark. (66) ovaryumda yüksek orandaki c-Abl mRNA ekspresyonunun farklı boyutlardaki oosit büyüklüğü ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Carson ve ark. (16) ise özellikle gebeliğin 1. ve 2. gününden implantasyonun meydana geldiği 5. güne kadar c-Abl immunoboyamanın aşamalı olarak arttığını tespit etmişlerdir. Yaba ve ark. (180) da immunohistokimyasal olarak farenin embriyonik gelişimi sırasında güçlü miktarda sitoplazmik ve membranöz boyamanın olduğunu ve gebeliğin 1. gününden 5. gününe doğru uterus lumen ve bez hücrelerinde, c-Abl ekspresyonunun arttığını

göstermişlerdir. Bu artış, implantasyon ve desidualizasyon için gerekli olan uterusun yeniden düzenlenmesinde c-Abl'ın yerinin olduğunu göstermiştir.

Oosit ve preimplantasyon dönemi embriyoları üzerinde yaptığımız c-Abl ile immunfloresan boyama sonucunda, c-Abl'ın çekirdek, sitoplazma ve hücre membranında lokalize olduğu görülmüştür. Daha önce yapılan çalışmalarda da c-Abl'ın çekirdek, sitoplazma ve hücre zarında lokalize olduğu ve buralarda birtakım roller üstlendiği bildirilmiştir (134, 154). Çalışmamız c-Abl lokalizasyonu açısından diğer çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

Proteinlerin hücrede lokalize oldukları yerler, onların hücredeki fonksiyonları hakkında önemli ip uçları vermektedir. c-Abl'ın hücre-altı lokalizasyonu ilk defa fibroblastlarda murine tip IV proteinin aşırı ekspresyonu ile tanımlanmış ve yüksek oranda nükleer lokalizasyon olduğu, ancak sitoplazmadaki önemli bir bölümünün daha çok filamentöz aktin (F-aktin) ve plazma membranı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (165, 167).

c-Abl'ın hücre-altı lokalizasyonunun, nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLSs) ve nükleer eksport sinyali (NES) ile kontrol edildiği bilinmektedir. Bu c-Abl'ın hücresel dağılım modeli ve çeşitli nükleer ve sitoplazmik fonksiyonlarının olması, c-Abl'ın birçok olası moleküler yollarda yer alıyor olduğunu düşündürmüştür (134, 167). Bu çalışmada c-Abl proteinin sitoplazmada granüler ve yamalı şekilde lokalize olması ya da dağılım göstermesi de c-Abl'ın hücre içi taşımada görev alıyor olabileceğini düşündürmektedir ve bu verileri desteklemektedir.

c-Abl'ın çekirdekte olan lokalizasyonu ise nükleer c-Abl'ın hücre siklusunun düzenlenmesinde özellikle G1/S kontrol noktasında roller üstlendiğini göstermektedir (167, 173). Bunlara ek olarak Abl 'ın C terminal yarımında 3 HMG-benzeri motif ile birlikte DNA bağlayıcı alan (95, 104), 3 nükleer lokalizasyon dizisi (95, 176) ve nükleer eksport dizisi bulunmaktadır (95, 154) ve bu özellikler Abl'ın hücre çekirdeğinde görev yapması açısından önemlidir.

c-Abl'ın sitoplazmik fonksiyonları hakkında çok fazla bilgi yoktur ancak sitoplazmik Abl'ın büyük bir kısmının C-terminal aktin bağlayıcı alan aracılığıyla ile gerçekleşen F aktin, hücre iskeleti ile ilişkilidir. Bu domain her iki filamentöz (F) ve

monomerik (G) aktin için farklı bağlama aktivitelerine sahiptir ve bu iki domain birlikte F aktin filamentleri paketlenmesine aracılık eder (166, 167).

Moore ve Kinsey (108) yaptıkları çalışmada c-Abl protein tirozin kinazın hücre iskeleti unsurları ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan diğer çalışmalarda c-Abl'ın amino terminal ucunda F ve G-aktin bağlanma domainin olduğunu ve nöroepitelyal hücrelerin apikalinde bulunan aktin filamentlerine bağlandığı gösterilmiştir (54, 59, 167). Elde edilen bu veriler c-Abl'ın, apikal hücre iskeletinin düzenlenmesi (179), hücre adezyonu ve G-aktin polimerizasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığını göstermiştir (85). Bu bilgiler ışığında, yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz verilere göre, özellikle morula evresinde eksternal hücrelerde ve TE hücrelerinin apikal kısımlarında c-Abl lokalizasyonunun yoğunlaşması, c-Abl'ın preimplantasyon dönemi süresince hücre farklılaşmasında ve hücre soylarının düzenlenmesinde görev aldığını düşündürmektedir.

Fare oositlerinde meydana gelen mayoz I ve mayoz II bölünmelerinin her ikisi de asimetriktir. Bu asimetri mekik ipliğinin oositin periferine konumlanması ile gerçekleşir (91, 99). Birinci kutup cisimciği migrasyon ekseninde dışarı doğru çıkar. Metafaz II mekik ipliği ise oositin periferinde meydana gelir ve metafaz bekleme sırasında plazma membranının altında varlığını devam ettirir. Fertilizasyon ya da deneysel aktivasyon (parthenogenez gibi) mekik ipliği rotasyonunu ve ikinci kutup cisimciğinin dışarı çıkmasını tetikler (99). Asimetrik bölünmelerin mekanizması hakkında bilinenler, hücre korteksi ile mekik ipliği uçlarını hücre korteksine bağlayan astral mikrotubuluslar arasındaki etkileşime dayanan mitotik hücreler üzerine yapılan araştırmalardan kaynaklanmaktadır (10, 20). Mekik ipliklerinin migrasyonu ve rotasyonu genellikle hücre korteksinde bulunan bağlantılar ve mekik asterlerindeki mikrotubuluslar arasındaki etkileşim ile ilgilidir (44, 48, 65). Ayrıca farelerdeki mekik iplikleri, fiçı şeklindeki sentriollerden ve aster mikrotubullerinden yoksundur (13, 153). Mikrotubul depolimerize eden ilaçlarla oositler inkübe edildiğinde mayoz mekik ipliklerinin oluşmadığı, ancak kromozomların kortekse göç ettiği görülmüştür mekik iplikleri ile kortekse bağlanan aster mikrotubulusların yokluğu ile mikrotubulusların eksikliğinde kromozomların kortekse hareket edebilmeleri mekik ipliği migrasyonunda başka mekanizmaların da yer aldığını

göstermiştir (99). Fare oositlerinde bu süreçler mikrofilamentler ile kromozomlar arasındaki etkileşimlerine dayanmaktadır, ancak moleküler temeli bilinmemektedir. Öncelikle aktin mikrofilamentlerin organizasyonunun oosit içindeki dinamiğinin karakterinin belirlenmesi gerekmektedir. Ancak bu süreçte kromozomlar ile aktin ağına bağlanan komponentler bilinmemektedir.

Yapılan bu çalışmada c-Abl (c-19) proteinin MII'de bekleyen oositlerin aktinden zengin alanlarda lokalize olmadığı, mekik kompleksinin yer aldığı alanın karşı tarafında yarım ay şeklinde lokalize olduğu görülmüştür. Bu bizlere c-Abl proteinin yumurtada asimetrik bir lokalizasyonu olduğunu ve c-Abl proteinin metafaz II de mekik ipliği ve kutup hücrelerinin oluşumunda bir takım roller üstlendiğini göstermektedir. Partenogez ile aktive edilen oositlerde ise aktivasyon sonrasında (2., 3., 6.saat) oositin korteksi etrafında devamlı olarak seyreden c-Abl protein yoğunlaşması ve lokalizasyonu bize c-Abl proteinin mayoz bölünme sırasında metafaz II mekik ipliği ve kutup hücrelerinin oluşumunda, mekik ipliği migrasyonunda ve oryantasyonunda bazı görevler üstleniyor olabileceğini göstermiştir. Kısaca bu veriler bize kutup hücreleri oluşturmak için, yumurta da meydana gelen asimetrik mayoz bölünmede c-Abl proteini görev alıyor olabileceğini göstermiştir. Ayrıca c-Abl (k-12) proteini ile aynı şekilde tekrarlanan çalışmada c-Abl (k-12) proteinin MII evresinde ve aktivasyondan sonra mekik ipliği etrafında yoğunlaştığı ve oositin periferinde konsantre olduğu gözlemlenmiştir ki, bu da diğer verileri desteklemektedir. Matsumurai S ve ark. (100) yaptığı çalışma ile hem epitelyal hücre kültüründe hem de fare epidermisinde, Abl-1'in mekik oryantasyonunu düzenlediğini göstermişlerdir.

Abl kinazlar tarafından fosforile edilen birçok protein bulunmuştur ve bu Abl substratları fonksiyonel olarak farklılık gösterir, bunların içinde adaptörler, diğer kinazlar, hücre iskeleti proteinleri, transkripsiyon faktörleri ve kromatin düzenleyicileri sayılabilir (19, 172). İki hücre içi kompartman arasında taşımacılık yapan Abl, nükleer ve sitoplazmik proteinleri fosforile eder. Sitoplazmik Abl'a karşı nükleer Abl değerlendirildiğinde, Abl substratı iki önemli kısma ayrılır ilki, aktin polimerizasyonu ve aktin içeren biyolojik süreçlerin düzenlenmesi, ikincisi ise transkripsiyon ve kromatinin düzenlenmesidir (172). Aktin hücre iskeleti birçok

süreçte kritik roller üstlenir ve Abl tarafından gerçekleştirilen aktin polimerizasyonunun düzenlenmesinin birçok süreci etkileme potansiyeli vardır. Lamellipodia, filopodia gibi membran çıkıntıları aktin polimerizasyonunu gerektirir ve Abl'ın hücre adezyonu ve migrasyonunda temel olan bu süreçleri düzenlediği bilinmektedir (172, 179).

Membranlı organeller arasındaki hücre içi taşımının aktin hücre iskeleti tarafından düzenlendiği bilinmektedir (132). Bu yüzden Abl kinazın, endositoz (157, 172) ve otofaji (57, 172, 183) üzerine olan rapor edilmiş etkileri, o membransal organellerin aktin ile olan Abl ile düzenlenmiş etkileşimlerini içeriyor olabilir. Dahası Abl'ın epitelyal hücre-hücre adezyonları ve migrasyon üzerine olan rolleri onun aktin polimerizasyonunu düzenlemesi ile açıklanabilir (47, 172).

MII oositlerde yapılan c-Abl immunofloresan boyama sonucu, mayoz mekik ipliğinde c-Abl lokalizasyonu gözlemlenmiştir. Bu veri, c-Abl'ın mikrotubul hücre iskeletini düzenlediği ve bu süreçte birtakım roller üstlendiğini düşündürmüştür. Mayotik kromozomların pozisyonunun ve/veya mikrotubul hücre iskeletinin düzenlenmesinde bazı roller oynadığını düşündürmüştür.

Bu çalışmada elde edilen optikal konfokal kesitlerde hem MII'de bekleyen oositlerde hem de ikinci kutup hücresinde c-Abl'ın ekspre edildiği, c-Abl lokalizasyonu ile gösterilmiştir. c-Abl proteinin bu hücrelerdeki varlığı, c-Abl'ın maternal olarak da ekspre edildiğini göstermiştir.

Moore ve Kinsey (108) de deniz kestanesi yumurtasının korteksinde Abl-ilişkili protein tirozin kinaz'ın tanımlanması ve fertilizasyona olası rollerinin belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, fertilizasyon sırasında aktive olan proteinlerden biri olan 220-kDa Abl ilişkili kinazın yumurta aktivasyon sürecinde bir rol oynayabileceğini göstermişlerdir ve yaptıkları Western blot analiz sonuçları ile c-Abl'ın yumurta korteksinde yüksek oranda yoğunlaştığını tespit etmişlerdir. İzole ettikleri yumurta korteks kesimi birkaç membran kompartmanlarını (plazma membranı, kortikal salgı vezikülleri ve granülsüz endoplazmik retikulumu içeren) bununla beraber aktin filament ağlarını içerdiğini ve c-Abl ilişkili kinazın hem membran bağlı hem de hücre iskeleti ilişkili olabileceğini öngörmüşlerdir. Bu

çalışma sonunda 220kDa proteinin direkt ya da indirekt olarak aktin filamentlere ya da vitellin katmandaki dayanıklı elementlere bağlandığını göstermişlerdir. Ayrıca 220-kDa kinazın döllenmemiş yumurtada varlığını ve yumurtanın aktivasyonu sonrası evrelerde ve yarıklanmalar sırasında bulunup bulunmadığını araştırmışlardır. Bunun sonucunda fertilizasyonun postinseminasyonun ilk birkaç dakikasında geçici kinaz aktivasyonu ile sonuçlandığı saptanmıştır. Daha sonra fertilizasyondan önce görülen seviyenin altına düştüğü ve 2 hücreli evre boyunca da artışın olmadığı saptanmıştır.

Iwaoki ve ark.'nın (66) yaptığı çalışma ile de farelerde döllenmemiş oositlerde c-Abl transkripsiyonunun olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalar da ise memelilerde c-Abl'ın, var olduğu sayılan aktin bağlayıcı fonksiyonu üzerine etkisi (102, 108) bununla birlikte diğer SH3 içeren kinazların hücre iskeletine lokalizasyonu gibi bulgular, kinazın yumurta korteksinde bolca bulunan filamentöz aktine bağlandığını düşündürmektedir (15, 34, 58, 108).

Fertilizasyondan sonra ilk birkaç dakikada yumurtada meydana gelen birçok karakterize olaylar gerçekleşir. Bunlar içinde intraselüler serbest kalsiyumda artış, sitoplazmik alkalinizasyon ve kortikal hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi bulunmaktadır. Bu kısa sürede çok sayıda protein kinaz aktive olmaktadır ancak c-Abl ilişkili kinazların fertilizasyondan sonra kısa süre ile aktive olduğu gösterilmiş olan ilk tirozin kinazlar oldukları bildirilmiştir (78, 108, 138).

Morula evresinde olan embriyolarda da c-Abl lokalizasyonunun araştırıldığı bu çalışmada, internal hücreler eksternal hücreler ile karşılaştırıldığında, eksternal hücrelerin çekirdek ve sitoplazmasında c-Abl (c-19)'un daha yoğun olarak boyandığı ve proteinin eksternal hücrelerin apikal kısımlarında daha güçlü olarak lokalize olduğu tespit edilmiştir. E3.5 döneminde c-Abl (c-19) ile boyanan embriyolarda ise c-Abl proteininin, ICM hücreleri ile karşılaştırıldığında TE hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında boyanmanın daha güçlü olduğu tespit edilmiştir. Bilindiği üzere, polarite özelliğine sahip olan eksternal hücreler daha sonradan TE hücrelerini meydana getirmektedir. Birbirini destekleyen bulgularımız bize, c-Abl proteinin TE hücrelerinin oluşumunda birtakım roller üstlendiğini göstermektedir.

Ayrıca c-Abl (c-19) ile yapılan immunfloresan boyama sonucu TE hücrelerinin plazma membranında c-Abl lokalizasyonu gözlenirken; ICM hücrelerinde gözlenmemiştir. Bu durumdan hareketle c-Abl proteinin epitelyum belirteci olup olmadığını tespit etmek üzere immunocerrahi yöntemi ile izole edilen ICM hücrelerine immunfloresan boyama uygulanmıştır. Bunun sonucunda izole edilen ICM hücrelerinin morula evresindeki hücreler gibi davrandığını, hücrelerde membran boyaması olduğunu ve c-Abl proteinin, morula evresindeki eksternal hücreler de olduğu gibi dış kısımda bulunan (eksternal) hücrelerin apikal kısımlarında yoğunlaştığı gözlenmiştir.

Önceki yıllarda immunocerrahi kullanılarak yapılan çalışmalarda izolasyon sonrası yüzeyde bulunan esasında non-polarize olan internal blastomerlerde morfolojik değişikliklerin görüldüğü, epitelizasyon ve yeni blastosist kavitesinin oluşumunu izleyen farklı apikal-bazal polarite özelliği kazandığı bildirilmiştir (18, 28, 51, 93, 96, 146). Ayrıca izole edilen bu internal blastomerlerde (izole edilmiş ICM) TE hücrelerinin fonksiyonel bir şekilde rejenere olarak tekrar şekillendiği ve taşıyıcı anneye transfer edildiğinde uterusu implante olduğu bildirilmiştir (96, 131). Deneysel olarak manipüle edilen bu embriyolarda ilk olarak, apolar hücrelerin dışarıda lokalize olmaya zorlandığı, bunun sonucunda polarizasyona yol açıldığı ve TE kaderini kabul ettiği bildirilmiştir (182, 187, 188). İkinci olarak, izole edilmiş ICM'lerden TE rejenerasyonunu takiben polariteyle ilişkili proteinlerin ICM'lerin dış hücrelerinin apikal membranlarına yeniden lokalize olduğu bildirilmiştir (182).

Stephenson ve ark. (147), yaklaşık 32 hücreli evrede hücre kavitesi daha şekillenmemiş ya da kavitesi toplam embriyo volümünün yarısından az olan embriyoları (geç morula dönemi ya da erken blastosist dönemi) kullanarak immunocerrahi yöntemi ile ICM'leri izole etmişlerdir. İzole edilen ICM'lerin izolasyonu yaklaşık 1 saat sürmüştür. Sonrasında bir kısmı hemen (0. saat) tespit edilirken bir kısmı ise 6, 12 ya da 30 saatlik kültür sonrasında tespit edilmiştir. Şaşırtıcı bir şekilde izolasyon sonrası 0. saatte tespit edilen hücrelerin %32'sinin yeniden polarize olduğu ve bu hücrelerin zamanla *Cdx-2* ekspresyonunu arttırdıkları bildirilmiştir. Oysa normal TE gelişimi için *Cdx-2*'nin gerekli olduğu ve 32 hücreli evre civarında bu transkripsiyon faktörünün eksternal blastomerlerde işlendiği

bilinmektedir (96). Böylece Stephenson ve ark. (147) yaptığı çalışma, izole edilmiş hücrelerinde meydana gelen polarizasyonun *Cdx-2* ekspresyonunu önceden tahmin ettiği ve yeniden polarizasyon için izole edilmiş olan ICM hücrelerinin *Cdx-2* ekspresyonuna ihtiyaçları olmadığını göstermiştir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma non-reseptör protein tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan c-Abl proteinin, fare oositlerinde ve preimplantasyon gelişimi sürecinde rolünün belirlenmesi üzerine yapılmıştır. Bu amaçla hem oositlerde hem de preimplantasyon dönemi embriyolarında c-Abl protein lokalizasyonuna bakılmıştır. Metafaz II oositlerde ve preimplantasyon dönemi embriyolarının tümünde immunofloresan boyama ile tespit edilen c-Abl varlığı bu proteinin fertilizasyon öncesinde oositlerde, sonrasında ise embriyolarda bir takım roller üstlendiğini göstermiştir. Elde ettiğimiz önemli sonuçlardan bir tanesi de c-Abl proteinin yumurta korteksinde asimetric bir lokalizasyona sahip olduğunun belirlenmesidir ve bu durum c-Abl proteinin Metafaz II'de bekleyen oositlerde mekik ipliği, kutup hücresi oluşumunda ve mekik ipliği oryantasyonunda önemli roller üstlendiğini göstermektedir. Çalışmada elde edilen diğer bir önemli bulgu ise, implantasyondan ve plasentasyondan sorumlu trofoektoderm hücrelerinin plazma membranında c-Abl protein lokalizasyonudur. Bu lokalizasyon c-Abl proteinin trofoektoderm oluşumunda bir takım roller üstlendiğini göstermektedir.

Elde edilen sonuçların daha anlamlı hale gelebilmesi için ileriki zamanlarda bir takım çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bunlardan ilki c-Abl gen ekspresyonunun *knockdown* edilmesi, farelerde preimplantasyon gelişimi sırasında embriyolarda ne gibi değişikliklerin meydana geldiğinin gözlemlenmesini ve dolayısıyla c-Abl geninin fonksiyonu hakkında önemli veriler elde edilmesini sağlayacaktır. Çalışma sonucunda yapılması önerilen bir başka çalışma ise, özellikle BCR-ABL1 pozitif lösemi hastalarının tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinden (imatinib, desatinib ve nilotinib) birinin kullanılarak c-Abl proteinin inhibisyonunun sağlanmasıdır. Böylelikle hem oositlerde hem de preimplantasyon dönemi embriyolarına uygulanan bu inhibisyon sonrasında oositlerde ve embriyolarda c-Abl lokalizasyonuna bakılabilir ve olası sonuçlar tez çalışmasında elde edilen verilerle karşılaştırılabilir.

## KAYNAKLAR

1. **Abelson HT, Rabstein LS** (1970): Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.*, **30**, 2213-2222.
2. **Ahmad K, Naz RK** (1994): Protein phosphorylation pattern and role of products of c-erbB-1 and c-abl proto-oncogenes in murine preimplantation embryonic development. *Am J Reprod Immunol.*, **32**, 226–237.
3. **Alaçam E** (2007): *Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite*, 6. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 23-40.
4. **Alexandre H** (2001): A history of mammalian embryological research. *Int J Dev Biol.*, **45**, 457–467.
5. **Aziz H, Alexandre H** (1991): The origin of the nascent blastocoele in preimplantation mouse embryos: Ultrastructural cytochemistry and effect of chloroquine. *Roux's Arch Dev Biol.*, **200**, 77–85.
6. **Barcroft LC, Moseley AE, Lingrel JB, Watson AJ** (2004): Deletion of the Na/K-ATPase alpha1-subunit gene (*Atp1a1*) does not prevent cavitation of the preimplantation mouse embryo. *Mech Dev.*, **121**, 417–426.
7. **Barr KJ, Garrill A, Jones DH, Orlowski J, Kidder GM** (1998): Contributions of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms to preimplantation development of the mouse. *Mol Reprod Dev.*, **50**, 146– 153.
8. **Beck F, Erler T, Russell A, James R** (1995): Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes. *Dev Dyn.*, **204**, 219–227.
9. **Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D** (1986): The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science.*, **233**, 212–214.

10. **Betschinger J1, Knoblich JA** (2004): Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol.*, 14, 674-85.
11. **Boyd L, Guo S, Levitan D, Stinchcomb DT, Kempfues KJ** (1996): PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development.*, **122**, 3075–3084.
12. **Bradley W D, Koleske A J** (2009): Regulation of cell migration and morphogenesis by Abl-family kinases: emerging mechanisms and physiological contexts. *J. Cell Sci.*, **122**, 3441–3454.
13. **Brunet S, Santa Maria A, Philippe G, Dujardin D, Jacek Z, Kubiak, Maro B** (1999): Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in Mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. *J. Cell Biol.*, **146**, 1–12.
14. **Brunet S, Maro B** (2005): Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction.*, **130**, 801-811.
15. **Burr JG, Dreyfuss G, Penman S, Muchanan JM** (1981): Association of the src gene product of Rous sarcoma virus with cytoskeletal structures of chick embryo fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **77**, 3484-3488.
16. **Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K** (2000): Embryo implantation. *Dev Biol.*, **223**, 217–237.
17. **Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A** (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.*, **113**, 643–655.
18. **Chisholm JC, Johnson MH, Warren PD, Fleming TP, Pickering SJ** (1985): Developmental variability within and between mouse expanding blastocysts and their ICMs. *J Embryol Exp Morphol.*, **86**, 311–336.

19. **Colicelli J** (2010): ABL Tyrosine kinases: evolution of function, regulation, and specificity. *Sci Signal.*, **3**, re6.
20. **Cowan CR, Hyman AA** (2004): Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **20**, 427-53.
21. **Cox DN, Lu B, Sun TQ, Williams LT, Jan YN** (2001): *Drosophila* par-1 is required for oocyte differentiation and microtubule organization. *Curr Biol.*, **11**, 75–87.
22. **Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D** (1990): Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science.*, **247**, 824–830.
23. **De Vries WN, Evsikov AV, Haac BE, Fancher KS, Holbrook AE, Kemler R, Solter D, Knowles BB** (2004): Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development.*, **131**, 4435–4445.
24. **Demir R** (1995): İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi, Palme Yayınevi, Ankara, s:78-94.
25. **Deng M, Williams CJ, Schultz RM** (2005): Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev Biol.*, **278**, 358–366.
26. **Dietrich JE, Hiiragi T** (2007): Stochastic patterning in the mouse preimplantation embryo. *Development.*, **134**, 4219–4231.
27. **Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E** (1997): MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell.*, **89**, 297– 308.
28. **Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby MG, Cameron IT, Fleming TP** (2004): PKC signalling regulates tight junction membrane assembly in the pre-implantation mouse embryo. *Reproduction.*, **127**, 653–667.

29. **Eckert JJ, McCallum A, Mears A, Rumsby- MG, Cameron IT, Fleming TP** (2005): Relative contribution of cell contact pattern, specific PKC isoforms and gap junctional communication in tight junction assembly in the mouse early embryo. *Dev Biol.*, **288**, 234–247.
30. **Eckert JJ, Fleming TP** (2008): Tight junction biogenesis during early development. *Biochim Biophys Acta.*, **1778**, 717–728.
31. **Emami S, Klemke RL** (2006): *Regulation of cell motility by Abl Family Kinases Abl Family Kinases in Development and Disease* Ed(s): KOLESKE AJ, Abl family kinases in development and disease, Landes bioscience-Springer, Texas, p: 68-73.
32. **Etemad-Moghadam B, Guo S, Kempfues KJ** (1995): Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell.*, **83**, 743 – 752.
33. **Etienne-Manneville S, Hall A** (2003): Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Curr Opin Cell Biol.*, **15**, 67–72.
34. **Felice GR, Eason P, Nermut MV, Kellie S** (1990): Pp60vsre association with the cytoskeleton induces actin reorganization without affecting polymerization status. *J Cell Biol.*, **52**, 47-59.
35. **Feng YL, Gordon JW** (1997): Removal of cytoplasm from one-celled mouse embryos induces early blastocyst formation. *J Exp Zool.*, **277**, 345–352.
36. **Fleming TP, Pickering SJ** (1985): Maturation and polarization of the endocytotic system in outside blastomeres during Mouse preimplantation development. *J Embryol Exp Morphol.*, **89**, 175–208.
37. **Fleming TP** (1987): A quantitative analysis of cell allocation to trophoctoderm and inner cell mass in the mouse blastocyst. *Dev Biol.*, **119**, 520–531.

38. **Fleming TP, McConnell J, Johnson MH, Stevenson BR** (1989): Development of tight junctions de novo in the mouse early embryo: control of assembly of the tight junction-specific protein, ZO-1. *J Cell Biol.*, **108**, 1407–1418.
39. **Fujimori T, Kurotaki Y, Komatsu K, Nabeshima Y** (2009): Morphological organization of the mouse preimplantation embryo. *Reprod Sci.*, **16**, 171–177.
40. **Gardner RL** (1983): Origin and differentiation of extra-embryonic tissues in the mouse. *Int Rev Exp Pathol.*, **24**, 63–133.
41. **Gardner RL** (1997): The early blastocyst is bilaterally symmetrical and its axis of symmetry is aligned with the animal-vegetal axis of the zygote in the mouse. *Development.*, **124**, 289–301.
42. **Goff SP, Gilboa E, Witte ON, Baltimore D** (1980): Structure of the Abelson murine leukemia virus genome and the homologous cellular gene: studies with cloned viral DNA. *Cell.*, **22**, 777–785.
43. **Goldman JM, Melo JV** (2003): Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment. *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1451–1464.
44. **Gonczy P** (2002): Mechanisms of spindle positioning: focus on flies and worms. *Trends Cell Biol.*, **12**, 332–339.
45. **Gourley SL, Koleske AJ, Taylor JR** (2009): Loss of dendrite stabilization by the Abl-related gene (Arg) kinase regulates behavioral flexibility and sensitivity to cocaine. *Proc Natl Acad Sci US.*, **106**, 16859–16864.
46. **Greuber EK, Pendergast AM** (2012): Abl family kinases regulate Fc $\gamma$ R-mediated phagocytosis in murine macrophages. *J Immunol.*, **189**, 5382–5392.
47. **Greuber EK, Smith-Pearson P, Wang J, Pendergast AM** (2013): Role of ABL family kinases in cancer: from leukaemia to solid tumours. *Nat Rev Can.*, **13**, 560–571.

48. **Grill SW, Gonczy P, Stelzer EH, Hyman AA** (2001): Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature.*, **409**, 630–633
49. **Guo S, Kemphues KJ** (1995): Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell.*, **81**, 611– 620.
50. **Handyside AH** (1978): Time of commitment of inside cells isolated from preimplantation mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.*, **45**, 37–53.
51. **Handyside AH** (1980): Distribution of antibody- and lectin-binding sites on dissociated blastomeres from mouse morulae: Evidence for polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol.*, **60**, 99–116.
52. **Handyside AH** (1981): Immunofluorescence techniques for determining the numbers of inner and outer blastomeres in Mouse morulae. *J Reprod Immunol.*, **2**, 339–350.
53. **Hanks SK** (2003): Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.*, **4**, 111.
54. **Hantschel O, Superti-Furga G** (2004): Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature Rev Mol Cell Biol.*, **5**, 33–44.
55. **Hardin JD1, Boast S, Schwartzberg PL, Lee G, Alt FW, Stall AM, Goff SP** (1996): Abnormal peripheral lymphocyte function in c-abl mutant mice. *Cell Immunol.*, **172**,100-7.
56. **Hassa O, Aşti RN** (2003): Embriyoloji, Yorum Basın Yayın, Ankara, s: 7-28.
57. **Hebron ML, Lonskaya I, Moussa CE** (2013): Tyrosine kinase inhibition facilitates autophagic SNCA/alpha-synuclein clearance. *Autophagy.*, **9**, 1249–1250.

58. **Henderson D, Rohrschneider L** (1987): Cytoskeletal association of pp60src. The transforming protein of the Rous sarcoma virus. *Exp Cell Res.*, **168**, 411-421.
59. **Hernandez SE, Krishnaswami M, Miller AL, Koleske AJ** (2004): How do Abl family kinases regulate cell shape and movement?. *Trends Cell Biol.*, **14**, 36-44.
60. **Houliston E, Maro B** (1989): Posttranslational modification of distinct microtubule subpopulations during cell polarization and differentiation in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Biol.*, **108**, 543– 551.
61. **Houliston E, Pickering SJ, Maro B** (1989): Alternative routes for the establishment of surface polarity during compaction of the Mouse embryo. *Dev Biol.*, **134**, 342–350.
62. **Hung TJ, Kempfues KJ** (1999): PAR-6 is a conserved PDZ domaincontaining protein that colocalizes with PAR-3 in Caenorhabditis elegans embryos. *Development.*, **126**, 127– 135.
63. **Hunter RH** (2005): The fallopian tubes in domestic mammals: how vital is their physiological activity?. *Reprod Nutr Dev.*, **45**, 281-290.
64. **Hurov JB, Watkins JL, Piwnica-Worms H** (2004): Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol.*, **14**, 736– 741.
65. **Hyman AAJ** (1989): Centrosome movement in the early divisions of Caenorhabditis elegans: a cortical site determining centrosome position. *Cell Biol.*, **109**, 1185–1193.
66. **Iwaoki Y, Matsuda H, Mutter GL, Watrin F, Wolgemuth DJ** (1993): Differential expression of the proto-onkogens c-Abl and c-mos in developing Mouse germ cells. *Exp Cell Res.*, **206**, 212-219.



67. **Johnson MH, Eager D, Muggleton-Harris AL, Graves HM** (1975): Mosaicism in the organisation of concanavalin A receptors on surface membrane of mouse eggs. *Nature.*, **257**, 321–322.
68. **Johnson MH, Ziomek CA** (1981): Induction of polarity in mouse 8- cell blastomeres: Specificity, geometry, and stability. *J Cell Biol.*, **91**, 303–308.
69. **Johnson MH, Ziomek CA** (1981): The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell.*, **24**, 71–80.
70. **Johnson MH, Chisholm JC, Fleming TP, Houliston E** (1986): A role for cytoplasmic determinants in the development of the mouse early embryo. *J Embryol Exp Morphol.*, **55**, 97–121.
71. **Johnson MH, Maro B** (1986): Time and space in the early mouse embryo: a cell biological approach to cell diversification. In: Rossant, J., Pedersen, R. (Eds.), *Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 35 –65.
72. **Johnson MH, Maro B, Takeichi M** (1986): The role of cell adhesion in the synchronization and orientation of polarization in 8-cell mouse blastomeres. *J Embryol Exp Morphol.*, **93**, 239–255.
73. **Johnson MH, McConnell JM** (2004): Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol.*, **15**, 583–597.
74. **Junqueira LC, Carneiro J** (2009) :Basic Histology Text & Atlas (Temel Histoloji). Çeviren: Solakoğlu S, Aytekin Y, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s: 418-452.
75. **Kalab P, Weis K, Heald R** (2002): Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science.*, **295**, 2452–2456.
76. **Karsenti E, Vernos I** (2001): The mitotic spindle: a self-made machine. *Science.*, **294**, 543–547.

77. **Kawagishi R, Tahara M, Sawada K, Morishige K, Sakata M, Tasaka K, Murata Y** (2004): Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger-3 is involved in mouse blastocyst formation. *J Exp Zool A Comp Exp Biol.*, **301**, 767–775.
78. **Keller C, Gundersen G, Shapiro BM** (1980): Altered in vitro phosphorylation of specific proteins accompanies fertilization of *Strongylocentrotus purpuratus* eggs. *Dev Biol*, **74**, 86-100.
79. **Koleske AJ, Gifford AM, Scott ML, Nee M, Bronson RT, Miczek KA, Baltimore D** (1998): Essential roles for the Abl and Arg tyrosine kinases in neurulation. *Neuron.*, **21**, 1259–1272.
80. **Kruh GD, Perego R, Miki T, Aaronson SA** (1990): The complete coding sequence of arg defines the Abelson subfamily of cytoplasmic tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 5802–5806.
81. **Kua HY, Liu H, Leong WF, Li L, Jia D, Ma G, Hu Y, Wang X, Chau JF, Chen YG, Mishina Y, Boast S, Yeh J, Xia L, Chen GQ, He L, Goff SP, Li B** (2012): c-Abl promotes osteoblast expansion by differentially regulating canonical and noncanonical BMP pathways and p16INK4a expression. *Nature Cell Biol.*, **14**, 727–737.
82. **Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T** (2005): Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.*, **25**, 2475–2485.
83. **Laeno AMA, Tamashiro DAA, Alarcon VB** (2013): Rho-associated kinase Activity is required for proper morphogenesis of the inner cell mass in the mouse blastocyst. *Biol. Reprod.*, **89**,122.
84. **Laneuville P** (1995): Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol.*, **7**, 255-266.
85. **Lanier LM, Gertler FB** (2000): From Abl to actin: Abl tyrosine knase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol.*, **10**, 80-87.

86. **Larue L, Ohsugi M, Hirschhain J, Kemler R** (1994): E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **91**, 8263–8267.
87. **Lee DR, Lee JE, Yoon HS, Roh SI, Kim MK** (2001): Compaction in preimplantation mouse embryos is regulated by a cytoplasmic regulatory factor that alters between 1- and 2-cell stages in a concentration-dependent manner. *J Exp Zool.*, **290**, 61–71.
88. **Levy JB, Johnson MH, Goodall H, Maro B** (1986): The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis. *J Embryol Exp Morphol.*, **95**, 213–237.
89. **Li B, Boast S, de los Santos K, Schieren I, Quiroz M, Teitelbaum SL, Tondravi MM, Goff SP** (2000): Mice deficient in Abla re osteoporotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat Genet.*, **24**, 304-308.
90. **Lin J, Arlinghaus R** (2008): Activated c-Abl tyrosine kinase in malignant solid tumors. *Oncogene.*, **27**, 4385–4391.
91. **Longo FJ, Chen DY** (1985): Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol.*, **107**, 382–394.
92. **Louvet S, Aghion J, Santa-Maria A, Mangeat P, Maro B** (1996): Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetric division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.*, **177**, 568–579.
93. **Louvet-Vallee S, Dard N, Santa-Maria A, Aghion J, Maro B** (2001): A major posttranslational modification of ezrin takes place during epithelial differentiation in the early mouse embryo. *Dev Biol.*, **231**, 190–200.
94. **Manejwala FM, Cragoe EJ, Jr Schultz RM** (1989): Blastocoel expansion in the preimplantation mouse embryo: Role of extracellular sodium and chloride and possible apical routes of their entry. *Dev Biol.*, **133**, 210–220.

95. **Marie E, Moresco Y** (2006): *Abl Kinases in Mammalian Development Abl Family Kinases in Development and Disease*. Ed(s): KOLESKE AJ, Abl family kinases in development and disease, Landes Bioscience-Springer, Texas, p: 93-103
96. **Marikawa Y, Alarcon VB** (2009): Establishment of trophoderm and inner cell mass lineages in the mouse embryo. *Mol Reprod Dev.*, **76**, 1019-32.
97. **Maro B, Johnson MH, Pickering SJ, Flach G** (1984): Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morphol.*, **81**, 211–237.
98. **Maro B, Johnson MH, Webb M, Flach G** (1986): Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol.*, **92**, 11–32.
99. **Maro B, Verlhac MH** (2002): Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol.*, **4**, 281-283.
100. **Matsumura S, Hamasaki M, Yamamoto T, Ebisuya M, Sato M, Nishida E, Toyoshima F** (2012): ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin. *Nat. Commun.*, 3:626. doi: 10.1038/ncomms1634.
101. **McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT** (2006): *Veterinary Embryology*, 1st edition, Blackwell Publishing, UK, p:1-22.
102. **McWhirter JR, Wang JY** (1991): Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol Cell Biol.*, **11**,1553-1565.
103. **McWhirter JR, Wang JY** (1993): An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Embo J.*, **12**, 1533-1546.

104. **Miao YJ, Wang JY** (1996): Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem.*, **271**, 22823-30.
105. **Miller AL, Wang Y, Mooseker MS, Koleske AJ** (2004): The Abl-related gene (*Arg*) requires its F-actin-microtubule cross-linking activity to regulate lamellipodial dynamics during fibroblast adhesion. *J Cell Biol.*, **165**, 407-419.
106. **Mintz B** (1965): Experimental genetic mosaicism in the mouse. Editors: Wolstenholme GW, O'Conner M, Preimplantation stages of pregnancy. London: Churchill. p, 194–207.
107. **Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S** (2003): The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.*, **113**, 631–642.
108. **Moore KL, Kinsey WH** (1994): Identification of an abl-related protein tyrosine kinase in the cortex of the sea urchin egg: possible role at fertilization. *Dev Biol*, **164**, 444–455.
109. **Moore KL, Persaud TVN** (2009): Before we are born (Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri). Çeviren: Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F, 7. Baskı, Güneş Tıp Kitapevi, Ankara, s: 23-26.
110. **Moriwaki K, Tsukita S, Furuse M** (2007): Tight junctions containing claudin 4 and 6 are essential for blastocyst formation in preimplantation mouse embryos. *Dev Biol.*, **312**, 509–522.
111. **Mukhopadhyay CS, Archana Verma, Joshi BK, Avtar Singh, Chakravarty AK, Dubey PP** (2008): In vitro acrosome reaction: its pertinence in assessing fertility of cryopreserved semen. *Indian J Anim Res.*, **42**, 201-204.

112. **Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A** (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.*, **95**, 379–391.
113. **Niessen CM, Gottardi CJ** (2008): Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta.*, **1778**, 562–571.
114. **Ohsugi M, Larue L, Schwarz H, Kemler R** (1997): Cell-junctional and cytoskeletal organization in mouse blastocysts lacking E-cadherin. *Dev Biol.*, **185**, 261–271.
115. **Okabe M, Cummins JM** (2007): Mechanisms of sperm-egg interactions emerging from gene-manipulated animals. *Cell Mol Life Sci.*, **64**, 1945-1958.
116. **Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H** (1990): A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell.*, **60**, 461–472.
117. **Ou Y, Rattner JB** (2004): The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol.*, **238**, 119–182.
118. **Ovalle WK, Nahirney PC** (2009): Netter’s essential histology (Temel histoloji). Çeviren: Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, s: 377-407.
119. **Özer A** (2007): Veteriner Embriyoloji, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, Bursa, s: 11-45.
120. **Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR** (1994): Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol.*, **166**, 259–267.

121. **Pauken CM, Capco DG** (2000): The expression and stage-specific localization of protein kinase C isoforms during Mouse preimplantation development. *Dev Biol.*, **223**, 411–421.
122. **Pendergast AM** (2002): The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res.*, **85**, 51–100.
123. **Perego R, Ron D, Kruh GD** (1991): Arg encodes a widely expressed 145 kDa protein-tyrosine kinase. *Oncogene.*, **6**, 1899–1902.
124. **Plant PJ, Fawcett JP, Lin DC, Holdorf AD, Binns K, Kulkarni S, Pawson T** (2003): A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl. *Nat Cell Biol.*, **5**, 301–308.
125. **Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM** (1999): c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev.*, **13**, 2400–2411.
126. **Plusa B, Frankenberg S, Chalmers A, Hadjantonakis AK, Moore CA, Papalopulu N, Papaioannou VE, Glover DM, Zernicka-Goetz M** (2005): Down regulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Sci.*, **118**, 505–515.
127. **Qiu Z, Cang Y, Goff S** (2010): P. Abl family tyrosine kinases are essential for basement membrane integrity and cortical lamination in the cerebellum. *J Neurosci.*, **30**, 14430–14439.
128. **Reeve WJ** (1981): Cytoplasmic polarity develops at compaction in rat and mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.*, **62**, 351–367.
129. **Reeve WJ, Ziomek CA** (1981): Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: Evidence for surface polarization at compaction. *J Embryol Exp Morphol.*, **62**, 339–350.

130. **Rosner MH, Vigano MA, Ozato K, Timmons PM, Poirier F, Rigby PW, Staudt LM** (1990): A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature.*, **345**, 686–692.
131. **Rossant J, Lis WT** (1979): Potential of isolated mouse inner cell masses to form trophectoderm derivatives in vivo. *Dev Biol.*, **70**, 255–261.
132. **Rotty JD, Wu C, Bear JE** (2013): New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **14**, 7–12.
133. **Sadler TW** (1993): Langman’s Medikal Embryology (Medikal Embriyoloji). Çeviren: Başaklar C, 6. Baskı, Palme Yayınları, Ankara, s: 20-29.
134. **Schaul Y** (2000): c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ.*, **7**, 10-16.
135. **Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P** (1990): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature.*, **344**, 435–439.
136. **Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, Wang C, Davies SM, Gaynon PS, Trigg M, Rutledge R, Burden L, Jorstad D, Carroll A, Heerema NA, Winick N, Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll WL, Camitta B** (2009): Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children’s oncology group study. *J Clin Oncol.*, **27**, 5175-5181.
137. **Schwartzberg PL, Stall AM, Hardin JD, Bowdish KS, Humaran T, Boast S, Harbison ML, Robertson EJ, Goff SP** (1991): Mice homozygous for the ablml mutation show poor viability and depletion of selected B and T cell populations. *Cell.*, **65**, 1165-75.
138. **Shen SS, Ricke LA** (1989): Protein kinase C from sea urchin eggs. *Comp Biochem Physiol.*, **92B**, 251-254.



139. **Sheth B, Fesenko I, Collins JE, Moran B, Wild AE, Anderson JM, Fleming TP** (1997): Tight junction assembly during mouse blastocyst formation is regulated by late expression of ZO-1 alpha. isoform. *Development.*, **124**, 2027–2037
140. **Sheth B, Nowak RL, Anderson R, Kwong WY, Papenbrock T, Fleming TP** (2008): Tight junction protein ZO-2 expression and relative function of ZO-1 and ZO-2 during mouse blastocyst formation. *Exp Cell Res.*, **314**, 3356–3368.
141. **Shirayoshi Y, Okada TS, Takeichi M** (1983): The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell.*, **35**, 631–638.
142. **Shulman JM, Benton R, St Johnston D** (2000): The Drosophila homolog of C. elegans PAR-1 organizes the oocyte cytoskeleton and directs oskar mRNA localization to the posterior pole. *Cell.*, **101**, 377– 388.
143. **Smith R, McLaren A** (1977): Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *J Embryol Exp Morphol.*, **41**, 79–92.
144. **Smith RK, Johnson MH** (1985): DNA replication and compaction in the cleaving embryo of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.*, **89**, 133–148.
145. **Smith-Pearson PS, Greuber EK, Yogalingam G, Pendergast AM** (2010): Abl kinases are required for invadopodia formation and chemokine-induced invasion. *J Biol Chem.*, **285**, 40201–40211.
146. **Spindle AI** (1978): Trophoblast regeneration by inner cell masses isolated from cultured mouse embryos. *J Exp Zool.*, **203**, 483–489.
147. **Stephenson RO, Yamanaka Y, Rossant J** (2010): Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development.*, **137**, 3383-3391.

148. **Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J** (2005): Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development.*, **132**, 2093–2102.
149. **Summers MC, Biggers JD** (2003): Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: Historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.*, **9**, 557–582.
150. **Sun QY, Nagai T** (2003): Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *J Reprod Dev.*, **49**, 347-359.
151. **Suwinska A, Czołowska R, Ozdzanski W, Tarkowski AK** (2008): Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol.*, **322**, 133–144.
152. **Suzuki A, Hirata M, Kamimura K, Maniwa R, Yamanaka T, Mizuno K, Kishikawa M, Hirose H, Amano Y, Izumi N, Miwa S, Ohno S** (2004): aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol.*, **14**, 1425– 1435.
153. **Szollosi D, Calarco P, Donahue RP** (1972): Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *J Cell Sci.*, **11**, 521-41.
154. **Taagepera S, Mc Donald D, Loeb JE, Whitaker L, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ** (1998): Nuclear cytoplasmic shuttling of c-Abl tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7457-7462.
155. **Tabuse Y, Izumi Y, Piano F, Kempfues KJ, Miwa J, Ohno S** (1998): Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Development.*, **125**, 3607–3614.
156. **Tanis KQ, Veach D, Duewel HS, Bornmann WG, Koleske AJ** (2003): Two distinct phosphorylation pathways have additive effects on Abl family kinase activation. *Mol Cell Biol.*, **23**, 3884–3896.

157. **Tanos B, Pendergast AM** (2006): Abl tyrosine kinase regulates endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.*, **281**, 32714–32723.
158. **Tanyolaç A** (1999): Özel Histoloji, 3. Baskı, Yorum Basın Yayın, Ankara, s: 132-152.
159. **Tarkowski AK, Wroblewska J** (1967): Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol*, **18**, 155–180.
160. **Thomas FC, Sheth B, Eckert JJ, Bazzoni G, Dejana E, Fleming TP** (2004): Contribution of JAM-1 to epithelial differentiation and tight-junction biogenesis in the mouse preimplantation embryo. *J Cell Sci*, **117**, 5599–5608.
161. **Tomancak P, Piano F, Riechmann V, Gunsalus KC, Kempfues KJ, Ephrussi A** (2000): A *Drosophila melanogaster* homologue of *Caenorhabditis elegans* par-1 acts at an early step in embryonic-axis formation. *Nat Cell Biol.*, **2**, 458–460.
162. **Tsukita S, Yamazaki Y, Katsuno T, Tamura A, Tsukita S** (2008): Tight junction-based epithelial microenvironment and cell proliferation. *Oncogene*, **27**, 6930–6938.
163. **Tybulewicz VL Crawford, C E, Jackson PK, Bronson R T, Mulligan R C** (1991): Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell*, **65**, 1153–1163.
164. **Van Blerkom J, Bell H** (1986): Regulation of development in the fully grown mouse oocyte: chromosome-mediated temporal and spatial differentiation of cytoplasm and plasma membrane. *J Embryol Exp Morphol.*, **93**, 213–238.
165. **Vestweber D, Gossler A, Boller K, Kemler R** (1987): Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Dev Biol.*, **124**, 451–456.

166. **Van Etten RA, Jackson P, Baltimore D** (1989): The mouse type IV c-abl gene product is a nuclear protein, and activation of transforming ability is associated with cytoplasmic localization. *Cell.*, **58**, 669–678.
167. **Van Etten RA, Jackson PK, Baltimore D, Sanders MC, Matsudaira PT, Janmey PA** (1994): The COO H terminus of the c-Abl tyrosine kinase contains distinct F- and G-actin binding domains with bundling activity. *J Cell Biol*, **124.**, 325-340.
168. **Van Etten RA** (1999): Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.*, **9**, 179–186.
169. **Verlhac M-H, Lefebvre C, Guillaud P, Rassinier P, Maro B** (2000): Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol.*, **10**, 1303–1306.
170. **Vinot S, Le T, Ohno S, Pawson T, Maro B, Louvet-Vallee S** (2005): Asymmetric distribution of PAR proteins in the Mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Dev Biol.*, **282**, 307–319.
171. **Wang H, Ding T, Brown N, Yamamoto Y, Prince LS, Reese J, Paria BC** (2008): Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev Biol.*, **318**, 112–125.
172. **Wang JYJ** (2014): The capable Abl: What is its biological function? *Mol Cell Biol.*, **34**, 1188.
173. **Wang PJ** (1993): Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr. Biol.*, **3**, 35-43.
174. **Wang Y, Miller AL, Mooseker MS, Koleske AJ** (2001): The Abl-related gene (Arg) nonreceptor tyrosine kinase uses two F-actin-binding domains to bundle F-actin. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **98**, 14865–14870.

175. **Watson AJ** (1992): The cell biology of blastocyst development. *Mol Reprod Dev.*, **33**, 492-5804.
176. **Wen ST, Jackson PK, Van Etten RA** (1996): The cytotostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J.*, **15**, 1583-95.
177. **Wiley LM** (1984): Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoel fluid. *Dev Biol.*, **105**, 330-342.
178. **Winkel GK, Ferguson JE, Takeichi M, Nuccitelli R** (1990): Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the four-cell stage mouse embryo. *Dev Biol.*, **138**, 1-15.
179. **Woodring PJ, Hunter T, Wang JY** (2003): Regulation of F-actin dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci.*, **116**, 2613-2626.
180. **Yaba A, Kayisli UA, Johnson J, Demir R, Demir N** (2011): The abelson tyrosine kinase (c-Abl) expression on the mouse uterus and placenta during gestational period. *J Mol Hist.*, **42**, 91-96.
181. **Yamanaka T, Horikoshi Y, Sugiyama Y, Ishiyama C, Suzuki A, Hirose T, Iwamatsu A, Shinohara A, Ohno S** (2003): Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol.*, **13**, 734-743.
182. **Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J** (2006): Cell and Molecular Regulation of the Mouse Blastocyst. *Dev Dyn.*, **235**, 2301-2314.
183. **Yogalingam G, Pendergast AM** (2008): Abl kinases regulate autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components. *J Biol Chem.*, **283**, 35941-35953.
184. **Zandy NL, Playford M, Pendergast AM** (2007): Abl tyrosine kinases regulate cell-cell adhesion through Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **104**, 17686-17691.

185. **Zheng Y** (2004): G protein control of microtubule assembly. *Ann Rev Cell Dev Biol.*, **20**, 867–894.
186. **Ziomek CA, Johnson MH** (1980): Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell.*, **21**, 935–942.
187. **Ziomek CA, Johnson MH** (1982): The roles of phenotype and position in guiding the fate of 16-cell mouse blastomeres. *Dev Biol.*, **91**, 440–447.
188. **Ziomek CA, Johnson MH, Handyside AH** (1982): The developmental potential of mouse 16-cell blastomeres. *J Exp Zool.*, **221**, 345–355.

## 8.EKLER



UNIVERSITY  
of HAWAII®  
MĀNOA

Office of Research Compliance  
Animal Welfare and Biosafety Program

July 19, 2012

Protocol No.05-029-8  
Ref. No. 1179


Dr. Vernadeth B. Alarcón  
Assistant Researcher  
John A. Burns School of Medicine  
Department of Anatomy, Biochemistry, and Physiology  
BioScience Building, 163J/H  
651 Ilalo St.  
Honolulu, HI 96813

This is to certify the animal use protocol annual renewal submitted for this research project has received approval from the Animal Care & Use Committee on July 19, 2012.

The Protocol No. for this application is **05-029-8**. Please refer to this number when ordering animals from Animal and Veterinary Services.

Title of Application:	"Cellular and Molecular Mechanisms of Blastocyst Development."
Principal Investigator	Dr. Vernadeth B. Alarcon
Types of Vertebrates Involved:	Mice

This institution has an Animal Welfare Assurance on file with the Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). The Assurance number is A3423-01.

  
Manuel G. Himenes, Jr., D.V.M.  
Chairman, UH IACUC

  
Date

*Committee approval is applicable for no more than three (3) years from the date of the most recent full protocol review and approval; however, all protocols are subject to mandatory annual review. The annual review renewal deadline for this protocol is provided below.*

Annual Review Renewal Deadline: **July 19, 2013**

The LAS *Use of Chemicals in Animals Policy* requires that the AVS Operations Manager be contacted at least 10 business days prior to the initiation of this study and/or whenever new experimental procedures are implemented in which hazardous materials will be used.

Effective September 17, 2009, UH IACUC Policy 18.0, "Investigator and Staff Responsibilities Prior to the Initiation of Vertebrate Animal Use Activities Independent of IACUC Review and Approval." For information on this policy, visit the UH IACUC website <http://www.hawaii.edu/ansc/IACUC/>

MH:dy

c: Ching Yuan Hu, Interim AVCRGE, Designated Institutional Official  
Sylvia Kondo, UH Veterinarian and Director, AVS  
Yaa-Yin Fong, Director, Office of Research Services  
Administrative Officer, AVS  
Investigator/Protocol File - 05-029-8 [Ref. 1179]

1960 East-West Road  
Biomedical Sciences Building T110  
Honolulu, Hawaii 96822-2025  
Telephone: (808) 956-9061  
Fax: (808) 956-3690

An Equal Opportunity/Affirmative Action Institution

## 9. ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı	: Duygu MUTLUAY	
Doğum Yeri ve Yılı	: Ankara / 20.11.1985	
Medeni Hali	: Bekar	
Yabancı Dili	: İngilizce	
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti	
Telefon No	: 0 248 2132048	
Elektronik Posta	: duygumutluay@mehmetakif.edu.tr	
İletişim Adresi	: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A. D. İstiklal Yerleşkesi 15030 Burdur	

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):
Lisans / Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 2009

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):
1. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı 2010 (Araştırma Görevlisi)

**Uluslararası kongre, sempozyum, panel gibi bilimsel toplantılarda sunularak, programda yer alan poster bildiri**

**1. Mutluay D, Mosier Evan A., Erica B. Wang, Thomas T.F. Huang, Vernadeth B. Alarcon. Wound repair in preimplantation embryo after trophectoderm injury. Third Biennial Western Regional IDeA Conference Book of Abstract, 6-8 October 2013, Honolulu, Hawaii, U.S, p: 5**



**-EK (Alanıyla ilgili katıldığı kurs ve etkinlikler)**

1. Deney Hayvanları Kullanımı Eğitim Programı, Ankara Üniversitesi, 31 Mayıs-8 Haziran 2010, Ankara.
2. Western Blot, İmmunopresipitasyon ve İmmunohistokimya için Optimizasyon Teknikleri Semineri, ABCAM, 12 Haziran 2011, Ankara.
3. ‘Moleküler Biyoloji Yöntemleri’ konulu uygulamalı eğitimi, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, 25-29 Nisan 2011, Gebze, Kocaeli.
4. I.Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Teorik Kursu, 24-25 Kasım 2011, İzmir.