

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

**OOSİT MATURASYONU SÜRECİNDE**  
**KROMOZOM GÖÇÜ SAĞLAYAN PROTEİNLERİN**  
**MAYOTİK MATURASYONA İLİŞKİN**  
**DÜZENLEYİCİ FAKTÖRLER İLE ETKİLEŞİMİ**

Filiz TEPEKÖY ÖZÇELİK

DOKTORA TEZİ

2017-ANTALYA

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

**OOSİT MATURASYONU SÜRECİNDE**  
**KROMOZOM GÖÇÜ SAĞLAYAN PROTEİNLERİN**  
**MAYOTİK MATURASYONA İLİŞKİN**  
**DÜZENLEYİCİ FAKTÖRLER İLE ETKİLEŞİMİ**

Filiz TEPEKÖY ÖZÇELİK

DOKTORA TEZİ

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**

Bu tez TÜBİTAK BİDEB 2214/A Yurtdışı Doktora Sırası Araştırma Bursu ve Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014.03.0122.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında, Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 18.04.2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Münire ERMAN  
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR  
Dokuz Eylül Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Sevil ÇAYLI  
Yıldırım Beyazıt Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN  
Enstitü Müdürü

## ETİK BEYAN

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

Filiz TEPEKÖY ÖZÇELİK



Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU



## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin başından itibaren tez çalışmamın gerçekleşmesinde maddi ve manevi desteklerini esirgemeyerek bana yol gösteren değerli danışman hocam Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU'ya,

Doktora tez çalışmamın yürütülmesi için laboratuvarının kapılarını bana açan ve tezimle ilgili değerli katkılarda bulunan Johns Hopkins Üniversitesi, Hücre Biyolojisi Departmanı, Hücre Dinamikleri Merkezi Başkanı Prof. Dr. Rong LI'ye ve tüm ekibine,

Akademik çalışmalarında öneri ve katkılarıyla bana yol gösteren Prof. Dr. David ALBERTINI'ye,

Tez çalışmam için araştırma bursu sağlayarak destek olan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Uzun yıllar aynı çalışma ortamını paylaştığım, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyelerine ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Hiçbir konuda yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına,

Doktora eğitimine adım attığım andan itibaren her anlamda bana destek olan, ilgisini ve anlayışını benden esirgemeyen sevgili eşim Mustafa Doğan ÖZÇELİK'e,

Sahip olmaktan gurur duyduğum karakterimi bana armağan eden ve her zaman yanımda olduklarını hissettiğim ailemin sevgili üyeleri; babam İrfan TEPEKÖY, annem Fethiye TEPEKÖY ve kardeşim Deniz TEPEKÖY'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Amaç:** Oosit maturasyonu sırasında aktinin sağladığı kromozom göçü ile oosit asimetrik olarak bölünmektedir. Bu çalışmada, fare oositlerinde *in vitro* maturasyon (IVM) sürecinde MAPK/ERK kinaz (MEK) inhibisyonunun ve protein kinaz A (PKA) inhibisyonu ile gerçekleşen “maturation promoting factor” (MPF) aktivasyonunun birinci mayoz bölünme sırasında aktin nukleasyonu sağlayan Formin-2 (FMN2), Spire-1 ve Spire-2’nin miktar ve lokalizasyonları üzerine olan etkisinin ve mitojen ile aktive olan kinazların (MAPK) bu proteinler ile etkileşiminin MPF aracılı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** 3-5 haftalık BalbC dişi farelerden folikül aktivasyonunun ardından preovulatuvar ovaryum foliküllerinden elde edilen germinal vezikül (GV) oositlere IVM sırasında MEK inhibitörü PD98059 ve MPF aktivasyonu sağlayan PKA inhibitörü H89 uygulanmıştır. Germinal vezikül yıkımı (GVBD) ve polar cisimcik atılımı (PBE) oranları, immunofloresan ile oositlerde FMN2, Spire-1 ve Spire-2’nin lokalizasyonu, Western blot ile bu proteinlerin miktarı belirlenmiştir.

**Bulgular:** GVBD oranları gruplar arasında benzerlik gösterirken, PBE oranı MEK inhibisyonu ile düşmüştür. FMN2’nin oositlerde iğ oluşumu aşamasından itibaren iğ çevresinde lokalize olduğu görülmüştür. Spire-1 ve Spire-2’nin kortikal lokalizasyonları belirlenmiştir. MEK inhibisyonu PBE aşamasındaki oositlerde FMN2, kortikal Spire-1 ve Spire-2 seviyelerini düşürmüştür. MPF aktivasyonu FMN2 seviyesini iğ göçü aşamasında düşürürken, Spire-1’in kortikal seviyesini, kortikal ve total Spire-2 seviyesini PBE oositlerde artırmıştır. MEK inhibisyonu ve MPF aktivasyonunun birlikte uygulanması PBE aşamasındaki FMN2 ve Spire-1 düşüşünü önlemiş, ancak Spire-2 seviyesindeki düşüşü telafi edememiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma MAPK ve MPF’nin aktin nukleasyonu sağlayan FMN2, Spire-1 ve Spire-2 proteinlerini oosit maturasyonunun belirli aşamalarında etkilediğini göstermektedir. Bu çalışmanın bulgularına göre, MAPK sinyalinin etkisi Spire-2 için doğrudan, FMN2 ve Spire-1 için ise MPF üzerinden dolaylı bir etkidir.

**Anahtar Kelimeler:** mapk, mpf, fmn2, spire-1, spire-2

## ABSTRACT

**Objective:** During oocyte maturation chromosome migration driven by actin nucleation give rise to asymmetric division of oocytes. The aim of this study was to determine the effects of MAPK/ERK kinase (MEK) inhibition and “maturation promoting factor” (MPF) activation on the amount and localizations of actin nucleators Formin-2 (FMN2), Spire-1 and Spire-2 and also to determine whether the relation of mitogen-activated protein kinases (MAPK) with these proteins is through MPF during *in vitro* maturation (IVM) of mouse oocytes.

**Method:** MEK inhibitor PD98059 and PKA inhibitor H89 for MPF activation was applied during IVM to the germinal vesicle (GV) oocytes retrieved from preovulatory ovarian follicles of 3-5 weeks old female BalbC mice after follicle activation. Germinal vesicle breakdown (GVBD) and polar body extrusion (PBE) rates were determined. The localization of Formin-2 (FMN2), Spire-1 and Spire-2 were determined through immunofluorescence, protein levels were determined via Western blot for oocytes at different stages.

**Results:** Though GVBD rates were similar in different groups, PBE rates were lower in MEK inhibition group. FMN2 was localized around spindle and cortex, while only cortical localizations of Spire-1 and Spire-2 were determined. MEK inhibition resulted in a decrease in FMN2, cortical Spire-1 and Spire-2 levels in PBE oocytes. MPF activation lead to decrease in FMN2 and increase in cortical Spire-1 levels in spindle migration stage oocytes, while it resulted in increase of cortical and total Spire-2 levels in PBE oocytes. Application of MEK inhibition and MPF activation at the same time resulted in compensation of the decrease in FMN2 and Spire-1, while Spire-2 levels remained low with no compensation of MPF activation.

**Conclusion:** This study shows that MAPK and MPF affects actin nucleators FMN2, Spire-1 and Spire-2 at particular stages of oocyte maturation. According to the results of this study, MAPK directly affects Spire-2, while it affects FMN2 and Spire-1 indirectly through MPF activation.

**Key words:** mapk, mpf, fmn2, spire-1, spire-2

# İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>İÇİNDEKİLER</b>	iii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	v
<b>ŞEKİLLER</b>	viii
<b>TABLolar</b>	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi	3
2.2. Ovaryumlar	3
2.3. Ovaryum gelişimi	4
2.4. Germ hücre gelişimi	5
2.5. Folikülogenez	9
2.6. Oositin nuklear maturasyonu	16
2.7. MAPK sinyali ve nuklear maturasyondaki rolü	24
2.8. Sitoplazmik oosit maturasyonu	24
2.9. Asimetrik hücre bölünmesi	26
2.10. Oositte hücre iskeleti elemanları	28
2.11. Aktin yapısı ve özellikleri	30
2.12. Aktin nukleasyonundan sorumlu proteinler	32
2.13. FMN2, Spire-1, Spire-2'nin oosit kromozom göçündeki rolleri	37
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	41
3.1 Fare Ovaryumundan Germinal Vezikül (GV) Oosit Eldesi ve in vitro Maturasyon (IVM)	41
	iii



3.2 IVM Sırasında Oositlerde MEK İnhibisyonu	43
3.3. IVM Sırasında Oositlerde PKA İnhibisyonu ile MPF Aktivasyonu	43
3.4. İmmunofloresan için Oosit Fiksasyonu ve Mikrotübül Stabilizasyonu	44
3.5. Western Blot Analizi	47
3.5.1. Hücre Lizatı Hazırlama	47
3.5.2. SDS-PAGE Western Blot protokolü	48
3.6. İstatistik	50
<b>4. BULGULAR</b>	<b>52</b>
4.1 MEK İnhibitörü Uygulaması için Doz Belirleme Analizi Bulguları	52
4.2 PKA İnhibitörü Uygulaması için Doz Belirleme Analizi Bulguları	53
4.3 IVM Uygulanan Oositlerde GVBD ve PBE Oranları	54
4.4. FMN2 İmmunofloresan Analizi Bulguları	55
4.5. FMN2 Western Blot Analizi Bulguları	60
4.6. Spire-1 İmmunofloresan Analizi Bulguları	62
4.7. Spire-1 Western Blot Analizi Bulguları	67
4.8. Spire-2 İmmunofloresan Analizi Bulguları	69
4.9. Spire-2 Western Blot Analizi Bulguları	74
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>76</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>85</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>86</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>114</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AMH</b>	:	Anti-Müllerian Hormon
<b>AP</b>	:	Alkalen Fosfataz
<b>APC</b>	:	“Anaphase-Promoting Complex”
<b>AP2<math>\gamma</math></b>	:	Aktivasyon artırıcı bağlayan protein 2 $\gamma$ (“Activating Enhancer-Binding Protein 2 $\gamma$ ”)
<b>ARP2/3</b>	:	Aktin ile İlişkili Protein 2/3 (“Actin-Related Protein 2/3”)
<b>BLIMP1</b>	:	B-lenfosit ile İndüklene Maturasyon Proteini-1 (“B-Lymphocyte-Induced Maturation Protein 1”)
<b>BMP4</b>	:	Kemik Morfogenetik Protein (“Bone Morphogenetic Protein”)
<b>BMPR1B</b>	:	Kemik Morfogenetik Protein Reseptör Tip 1B (“Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B”)
<b>cAMP</b>	:	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>CDK1</b>	:	Siklin Bağımlı Kinaz 1 (“Cyclin Dependent Kinase 1”)
<b>CDKN1B</b>	:	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1B (“Cyclin-Dependent Kinase İnhibitör 1B”)
<b>cGMP</b>	:	Siklik Guanozin Monofosfat
<b>DAZL</b>	:	“Deleted in Azoospermia-Like”
<b>DDX4</b>	:	“dead box” helikaz-4
<b>DEP</b>	:	“Dishevelled, Egl-10 ve Pleckstrin”
<b>Drf</b>	:	Diaphanous-İlişkili Forminler
<b>EGF</b>	:	Epidermal Büyüme Faktörü (“Epidermal Growth Factor”)
<b>ER</b>	:	Endoplazmik Retikulum
<b>FGF</b>	:	Fibroblast Büyüme Faktörü (“Fibroblast Growth Factor”)
<b>FH</b>	:	Formin Homoloji
<b>FMN</b>	:	Formin
<b>FOXL2</b>	:	“Forkhead Box L2”
<b>FOXO3A</b>	:	“Forkhead Box O3”
<b>FSH</b>	:	Folikül Stimule Edici Hormon
<b>FSHR</b>	:	FSH Reseptör

<b>FSI</b>	:	Formin-Spire Etkileşim (“Formin-Spire Interaction”)
<b>GDF</b>	:	Büyüme Farklılaşma Faktörü (“Growth Differentiation Factor”)
<b>GDNF</b>	:	Glial Hücre Kökenli Nörotropik Faktör (“Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor”)
<b>GEF</b>	:	Guanine Nükleotit Değişim Faktörü (“Guanine Nucleotide Exchange Factor”)
<b>Gja4</b>	:	Oluklu Bağlantı (“Gap Junction”) Protein Alfa 4
<b>GnRH</b>	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (“Gonadotropin Releasing Hormone”)
<b>GV</b>	:	Germinal Vezikül
<b>GVBD</b>	:	Germinal Vezikül Yıkımı (“Germinal Vesicle Breakdown”)
<b>IBMX</b>	:	3-isobutyl-1-methylxanthine
<b>IGF</b>	:	İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü (“Insülin-Like Growth Factor”)
<b>KL</b>	:	Kit Ligand
<b>LH</b>	:	Lüteinize Edici Hormon
<b>LHCGR</b>	:	Luteinizan Hormon, Koryonik Gonadotropin Reseptörü
<b>MI</b>	:	Metafaz I
<b>MII</b>	:	Metafaz II
<b>MEK</b>	:	(MAPK/ERK Kinaz)
<b>MPF</b>	:	“Maturation Promoting Factor”
<b>Myt1</b>	:	Miyelin Transkripsiyon Faktörü-1
<b>MTOC</b>	:	Mikrotübül Organize Edici Merkez (“Microtubule Organizing Center”)
<b>mTORC1</b>	:	Rapamisin Kompleksinin Memelilerdeki Hedefi (“Mammalian Target of Rapamycin Complex 1”)
<b>MVH</b>	:	Fare VAZA Homoloğu (“Mouse VAZA Homolog”)
<b>NEBD</b>	:	Nükleer Kılıf Yıkımı (“Nuclear Envelope Breakdown”)
<b>NGF</b>	:	Sinir Büyüme Faktörü (“Nerve Growth Factor”)
<b>NPF</b>	:	“Nucleation Promoting Factors”
<b>Npr2</b>	:	Natriüretik Peptit Reseptörü 2

<b>N-WASP</b>	:	Nöral-WASP
<b>p44ERK1</b>	:	Hücre dışı Sinyaller ile Kontrol Edilen Kinaz (“Extracellular Signal-Regulated Kinase”)
<b>PDE</b>	:	Fosfodiesteraz
<b>PGH</b>	:	Primordial Germ Hücreleri
<b>PI3K</b>	:	Fosfatidilinositol-3-kinaz
<b>PKA</b>	:	Protein Kinaz A
<b>PKC</b>	:	Protein Kinaz C
<b>Prdm</b>	:	Pr Domaini İçeren Protein (“Pr Domain Containing Protein”)
<b>Pten</b>	:	Fosfat ve Tensin Homoloğu (“Phosphatase and Tensin Homolog”)
<b>(Ser)</b>	:	Serin
<b>RAC</b>	:	Ras ile İlişkili C3 Botulinum Toksin Substrat
<b>RAN</b>	:	Ras ile İlişkili Nükleer Protein (“ <b>RA</b> s-Related Nuclear Protein”)
<b>RCC1</b>	:	“Regulator of Chromosome Condensation 1”
<b>RHO</b>	:	Ras Homolog Gen
<b>SOX</b>	:	SRY Box
<b>SRY</b>	:	Cinsiyet Belirleme Bölgesi Y (“Sex Determining Region Y”)
<b>SSEA1</b>	:	Evreye Özgü Embriyonik Antijen 1 (“Stage-Specific Embryonic Antigen 1”)
<b>TGF</b>	:	Transforme Edici Büyüme Faktörü (“Transforming Growth Factor”)
<b>Thr</b>	:	Treonin
<b>Tnap</b>	:	Dokuya Özgü Olmayan Alkalen Fosfataz (“Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase”)
<b>Tyr</b>	:	Tirozin
<b>WASL</b>	:	“Wiskott-Aldrich syndrome like”
<b>WASP</b>	:	“Wiskott-Aldrich syndrome protein”
<b>WAVE</b>	:	“WASP family verprolin-homologous protein”
<b>WH2</b>	:	WASP Homoloji
<b>WNT</b>	:	“ <b>W</b> ingless- <b>Int</b> 1”

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. İnsanda dişi üreme sistemi organları	3
2.2. Farede dişi üreme sistemi organları	4
2.3. Farede primordial germ hücre (PGH) göçü ve kolonizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan sinyaller ve zaman çizelgesi	6
2.4. Yirminci hafta ovaryum korteks kesiti	9
2.5. Foliküler maturasyon, sessizlik, atrezi, yırtılma, oosit atılması, korpus luteum oluşumu ve fonksiyonunu kontrol eden endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler	11
2.6. Oosit maturasyonunun şematik gösterimi.	17
2.7. cAMP dengesi ve mayotik duraklama	18
2.8. “Maturation promoting factor” (MPF) aktivitesini düzenleyen mekanizmalar	19
2.9. Mayotik duraklamanın korunmasını sağlayan hücre sinyali	21
2.10. LH’ın mayozun tamamlanmasına ilişkin potansiyel hedefleri	22
2.11. Asimetrik hücre bölünmesi tipleri	26
2.12. Aktomyozin oluşumunu sağlayan kromatin sinyaline ait olan muhtemel moleküler ağ	28
2.13. Aktin polimerizasyonunun şematik gösterimi	31
2.14. 8 formun alt ailesinde toplanan 15 memeli forminin multi-domain organizasyonunun şematik gösterimi	34
2.15. Spire tarafından gerçekleştirilen aktin nukleasyonunun muhtemel mekanizması	36
2.16. Spir ve Fmn2/Capu. KIND şematik gösterimi	37
2.17. Memeli oositi asimetrik bölünmesine ilişkin bilinen düzenleyiciler ve bunlara ait sinyal yolları	38
	viii

<b>2.18.</b> Fare oositlerinde kromozom göçü ve asimetrik bölünme sağlayan aktin nukleasyonunu etkileyen muhtemel mekanizmalar	40
<b>4.1.</b> p-ERK1/2 protein seviyeleri	52
<b>4.2.</b> pCREB protein seviyeleri	53
<b>4.3.</b> In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu	55
<b>4.4.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu	56
<b>4.5.</b> In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu	57
<b>4.6.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu	58
<b>4.7.</b> Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği	59
<b>4.8.</b> FMN2 protein seviyeleri	61
<b>4.9.</b> In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu	62
<b>4.10.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu	63
<b>4.11.</b> In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu	64
<b>4.12.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu	65
<b>4.13.</b> Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği	66
<b>4.14.</b> Spire-1 protein seviyeleri	68

<b>4.15.</b> In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu	69
<b>4.16.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu	70
<b>4.17.</b> In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu	71
<b>4.18.</b> In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu	72
<b>4.19.</b> Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği	73
<b>4.20.</b> Spire-2 protein seviyeleri	75

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
3.1. Immunofloresan deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	47
3.2. Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	50
4.1. IVM uygulanan oositlerde GVBD ve PBE oranları	54





# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Oositler, ovaryum folikülleri içerisinde gelişen büyük hücrelerdir ve nuklear genetik materyalin yarısını oluşturmanın yanı sıra, üremenin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli olan tüm membranöz ve sitoplazmik determinantları ile embriyoyu meydana getirirler. Yeterli büyüklüğe ulaşmış olan oositler LH preovulatuvar artışına cevaben mayoz I'ı tamamlarlar. Profaz I'de duraklamış olan oositlerin nukleusu germinal vezikül (GV) adını alır. Mayoz I'in tamamlanmasının en açık göstergesi GV'nin ortadan kalkması ya da yıkımı (GVBD), kromozom yoğunlaşması ve bipolar metafaz I (MI) iğinin oluşmasıdır. Birinci mayotik bölünme süresince, homolog kromozomlar ayrılır ve bir set birinci polar cisimciğe aktarılır ve böylece haploid genom oluşur. Daha sonra ikinci bir mayotik iğ oluşur ve oositler metafaz II'ye (MII) girerler ve bir spermatozoon tarafından aktive edilene kadar bu evrede beklerler (Hunter ve ark., 1976).

LH uyarısı olmadığında, oositin mayotik maturasyonunun duraklaması için oositteki yüksek cAMP düzeyi, "maturation promoting factor" (MPF) aktivasyonunu cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın etkisi ile baskılar (Bornslaeger ve ark., 1986). MPF katalitik siklin bağımlı kinaz 1 ("cyclin dependent kinase 1" =CDK1 ya da *Cdc2*) altünitesi ve onun regülatör altünitesi siklin B1'den oluşan bir komplekstir (Doree ve Hunt, 2002). Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki protein kinaz A (PKA), hem *Cdc25* fosfatazların hem de *Wee1* kinazların aktivitelerini doğrudan düzenleyerek MPF'nin mayotik duraklama sırasında inaktif halde kalmasını sağlar (Oh ve ark., 2010). cAMP düzeyinin düşmesi ve PKA'nın baskılanması ile MPF aktif hale gelerek oosit maturasyonunun devam etmesini sağlar (Mehlmann, 2005).

Mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK)'ın oositteki MPF aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Verlhac ve ark., 2000). Oositin nuklear maturasyonunu düzenleyen MPF'ye ilişkin mekanizmalar ve bu mekanizmaların MAPK sinyali ile olan ilişkisi iyi bilinmektedir. Ancak maturasyon sürecinde görev alan bu mekanizmaların oositin asimetrik bölünmesi için gerekli olan kromozom göçünü doğrudan etkileyip etkilemediği bilinmemektedir.

Oositin asimetrik bölünmesi metafaz iğinin oositin merkezinden periferine doğru göç etmesi ile gerçekleşir ve bu göçü sağlayan asıl hücre iskeleti elemanının aktin olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle aktin nukleasyonundan sorumlu olan proteinlerin oositin asimetrik bölünmesinde etkili olduğu düşünülmektedir (Yi ve Li, 2012). Paralel aktin demetleri oluşturabilen proteinlerden biri formin proteinleridir (Chesarone ve ark., 2010). Forminler, aktin oluşumu için birlikte çalışan formin homoloji 1 ve 2 (FH1 ve FH2) domainlerinin varlığı ile karakterize olan geniş bir protein ailesidir (Chesarone ve ark., 2010). Bu ailenin üyelerinden biri olan FMN2'nin oositin asimetrik bölünmesi sırasında aktin nukleasyonu sağladığı bilinmektedir (Yi ve ark., 2013). Aktin polimerize edici diğer bir protein olan Spire'in da fare oositlerinin asimetrik bölünmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Pfender ve ark., 2011). Memeli oositlerinde Spire-1 ve Spire-2'nin FMN1 ve FMN2'ye bağlandığı bilinmektedir (Vizcarra ve ark., 2011). Spire, polar cisimciğin atılmasında da rol oynar (Verlhac ve ark., 2000). Spire ve FMN2 ile ilgili kolokalizasyon çalışmaları, fare oositlerinde bu moleküllerin birlikte görev yaptığını göstermektedir (Pfender ve ark., 2011). Ancak, oositte FMN2, Spire-1 ve Spire-2 'nin birlikte kontrol ettiği aktin nukleasyonunu hangi sinyalin aktive ettiği henüz belirlenmemiştir.

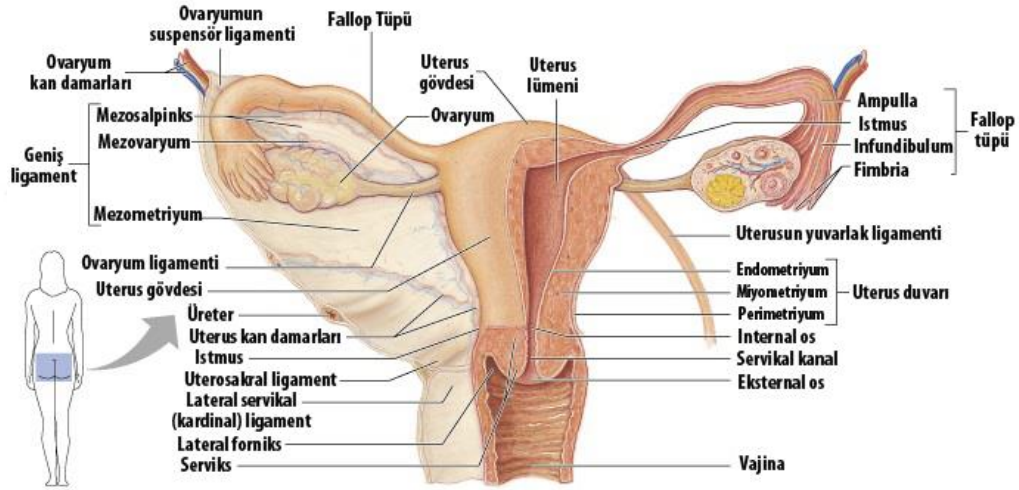
Omurgasız oositlerinde c-Mos'un, dolayısıyla MAPK sinyalinin forminler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Verlhac ve ark., 2000), ancak memeli oositlerinde benzer bir ilişki olup olmadığı bilinmemektedir. Bu çalışmada, Mos'un aktive ettiği MAPK sinyalinin, kromozom göçünde aktin nukleasyonunda görevli olduğu bilinen FMN2 ve bu süreçte FMN2 ile birlikte görev alan Spire-1 ve Spire-2 ile olan ilişkisi araştırılmıştır. MAPK'ın oositte kromozom göçü sağlayan bu proteinler ile etkileşiminin doğrudan bir ilişki mi, MAPK'ın MPF aktivasyonu nedeniyle gerçekleşen dolaylı bir ilişki mi olduğu sorgulanmıştır.

Bu çalışmada, fare oositlerinde in vitro maturasyon sürecinde MEK inhibisyonunun ve PKA inhibisyonu ile gerçekleşen MPF ("Maturation Promoting Factor") aktivasyonunun birinci mayoz bölünme sırasında FMN2, Spire-1 ve Spire-2 proteinlerinin miktar ve lokalizasyonları üzerine olan etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi insanda pelvik yerleşimli bir çift ovaryum, iletim kanalı, bir çift tuba uterina (oviduktlar), tek bir uterustan oluşur. Uterusun altında serviks ile ayrılan bölüm ise vajinadır (Demir, 2008) (Şekil 2.1). Dişi üreme sisteminin işlevi dişi eşey hücreleri olan gametlerin (oositler) üretimi ile embriyo ve fetüs evrelerinden doğuma kadar döllenmiş oositi taşımaktır. Ayrıca üreme sisteminin organlarını kontrol eden ve vücudun diğer organları üzerinde etkileri olan eşey hormonlarını da üretir. İlk menstrüasyon kanamalarının meydana geldiği menarşta (ilk adet) başlayarak üreme sistemi yapı ve işlevsel etkinlik bakımından döngüsel (siklik) değişiklikler geçirir. Bu değişiklikler hormonlar tarafından kontrol edilir. Menapoz ile döngüsel değişiklikler düzensizleşir ve sonuçta tümüyle ortadan kalkar. Menapoz sonrası dönemde üreme sisteminde yavaş bir gerileme görülür (Solakoglu, 2009).



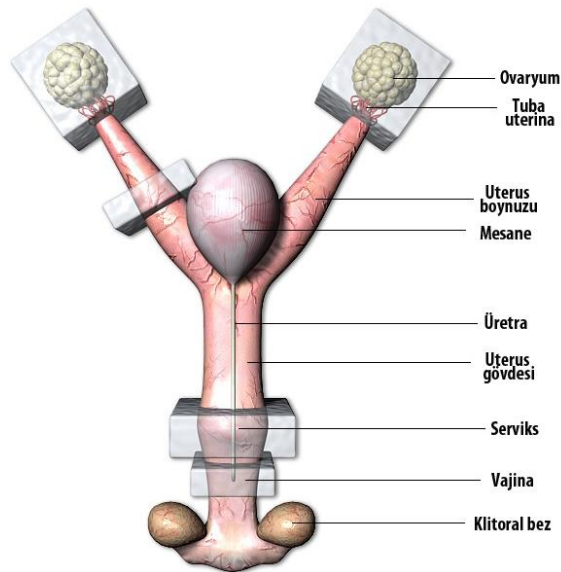
Şekil 2.1. İnsanda dişi üreme sistemi organları (Hoehn, 2001).

### 2.2. Ovaryumlar

Ovaryumlar, pelvis boşluğunun derinlerine yerleşmiş, yassı, ovalimsi bir çift yapıdır. Ovaryumun bir bölümü mezovaryum adı verilen bir periton kıvrımı aracılığıyla geniş bağa, diğer bir bölümü de ovaryum bağı aracılığıyla uterus duvarına tutunmuştur. Yüzeyi tek katlı yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitel germinal epitel olarak adlandırılır (Demir, 2008). Germinal epitelin altında ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda

bulunduğu kortikal bölge yer alır. Kortikal bölgenin altında medulla bulunur. Medulla; büyük kan damarları (ovaryumun sarmal ve kıvrımlı arteri ile ven), lenf damarları ve sinirler ile bunları destekleyen bağ dokusu içerir (Demir, 2006).

Farelerde ovaryumlar, dorsal vücut duvarına mezovaryum ligamentleri ile asılı olan, böbreklerin hemen yanında yer alan küçük oval organlardır (Şekil 2.2). Her bir ovaryum kendisini abdominal kaviteden ayıran bir kapsül tarafından çevrelenmiştir. İnsanda olduğu gibi kemirgenlerde de ovaryum kesin sınırları olmayan iki tabakadan, medulla ve korteksten oluşmuştur. Kan ve lenf damarları ile sinirler hilus ile medullaya girer ve daha sonra ovaryumun periferal bölgesindeki kortekse ulaşmak üzere medullanın stromal dokusu boyunca dallanır. Gelişimin tüm aşamalarındaki foliküller ve pek çok östrus siklusu geçirmiş hayvanlarda korpus luteum kalıntıları kortekste yer alır. Ovaryum yüzey epiteli veya germinal epitel olarak bilinen ince bir kuboidal epitel hücre tabakası bazal membran üzerindeki ovaryumun yüzeyini kaplar (Fox, 2007).



Şekil 2.2. Farede dişi üreme sistemi organları (Ruehl-Fehlert ve ark., 2003).

### 2.3. Ovaryum gelişimi

XX eşey kromozomuna sahip embriyolarda gonadın medullar kordonları geriler ve sekonder kordonlar olan kortikal kordonlar gelişir. XY eşey kromozomuna sahip embriyolarda, medullar kordonlar testisi oluşturur ve sekonder kortikal kordonlar

geriler (Dissen GA, 2003). Dişı embriyolarda ovaryum, ventral kranial mezonefroзда genital kabartı olarak isimlendirilen bir kalınlaşma şeklinde gelişir ve ilkel eşey kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılırlar (Basaklar, 1995). Embriyonun vitellüs kesesinde gelişen germ hücreleri, insanlarda erken gestasyonda (6. hafta (Kurilo, 1981)), fare gibi diğer türlerde ise orta-gestasyonda (embriyonik 11 veya 12. gün (Dissen GA, 2003)) öncelikle genital kabartıya gelerek ovaryuma göç ederler. Farklanmamış gonad içerisindeki germ hücrelerinin kolonize olmasının ardından, germ hücreleri ve somatik hücreler mitotik çoğalmalar gerçekleştirirler (Dissen GA, 2003). İlkel germ hücrelerini içeren hücre kümeleri, ovaryumun medulla kısmına dağılırlar. Daha sonra bu hücre grupları kaybolur ve ovaryum medullasını oluşturan bir vasküler stroma bu hücre gruplarının yerini alır. Erkek gonadın aksine dişı gonadın epitelinde hücre çoğalması devam eder. Daha sonra epitel, farklı bir kordon tipi olan kortikal kordonları oluşturur. Kortikal kordonlar, alt kısımda yer alan mezenşime doğru girintiler yapar ancak yüzeye yakın olarak kalırlar. Bu kordonlar izole hücre kümelerine ayrılırlar ve her bir hücre kümesi bir ya da iki germ hücrelerini çevreler. Daha sonra germ hücreleri oogonyumlara dönüşür. Oogonyumlar, yüzey epitelinden köken alan hücreler tarafından çevrenir ve bu hücreler foliküler hücreleri oluşturur (Basaklar, 1995).

#### **2.4. Germ hücre gelişimi**

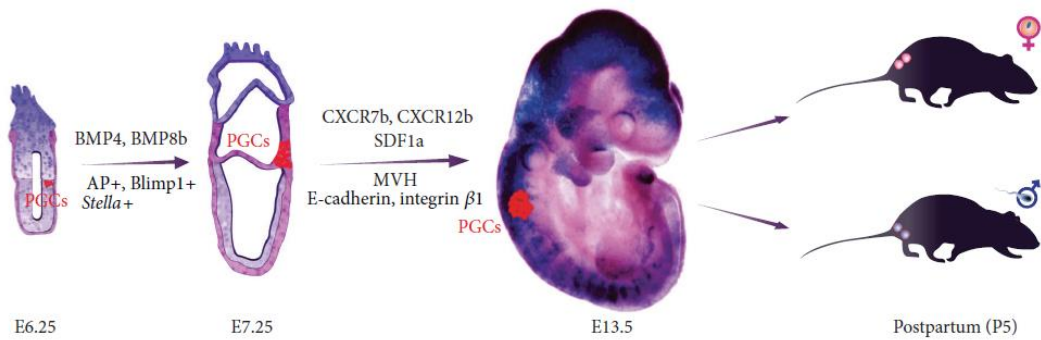
Primordial germ hücreleri (PGH) memelilerde ilk kez Chiquoine tarafından 1954'te tanımlanmıştır (Chiquoine, 1954). Farede embriyonik 7.25. günde (E 7.25) gelişen allantois tabanında, vitellüs kesesinin endoderminde, primitif çizginin hemen altında, yüksek alkalin fosfat (AP) aktivitesine sahip, hem oositlere hem de spermatozoonlara farklılaşabilen bir germ hücre popülasyonudur (Moore ve ark., 2008).

Strome S. ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Strome ve Updike, 2015), PGH, memeli embriyolarında, erken embriyonik bölünmeler sırasında görülmez, post-implantasyon epiblastında indüklenirler. E5.75 fare embriyolarında, proksimal epiblastın posteriyör kısmında **Wingless-Int1-3 (WNT3)** ekspresyonu görülen hücreler, komşu ekstra-embriyonik dokudan gelen kemik morfogenetik protein ("bone morphogenetic protein" = BMP4) sinyali ile uyarılır. WNT3 sinyali

mezodermal transkripsiyon faktörü T'nin ekspresyonunu uyarır. BMP4 sinyali T'nin mezodermal gen "promoter"larına bağlanmasını bloke eder ve böylece T'nin yalnızca germ hücre gelişimi için gerekli olan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu uyarması sağlanır (Magnusdottir ve ark., 2013). Fare embriyolarında T'nin germ hücrelerini uyarıcı fonksiyonu BMP4 tarafından indüklenirken, insanda endodermal transkripsiyon faktörü SRY ("sex determining region Y" = cinsiyet belirleme bölgesi Y) Box-17 (SOX17), B-lenfosit ile indüklenen maturasyon proteini-1 ("B-lymphocyte-induced maturation protein 1" = BLIMP1) ile birlikte germ hücre gelişimini uyarır (Şekil 2.3).

Germ hücrelerinin gelişiminde ve farklılaşma yeteneklerinde *Stella* ve *Fragilis* genlerinin önemli rolleri bulunmaktadır. *Fragilis* ekspresyonu, germ hücre topluluğunun tümünde görülürken, *Stella* ekspresyonu hücre kümesinin orta bölümündeki hücreler ile sınırlıdır (Evans ve ark., 2014). Göç etmekte olan germ hücreleri güçlü ve spesifik bir *Stella* ekspresyonu göstermeye devam ederken, çevredeki somatik hücrelerde yüksek düzeyde ekspresyonu görülen homeobox genlerinin (*Hoxb1*, *Hoxa1*, *Evx1* ve *Lim1*) germ hücrelerinde baskılanması söz konusudur (Saitou ve ark., 2003).

Farede germ hücre hattının özelleşmesi E6.25 civarında, proksimal epiblastta *Blimp1/ Prdm1* ("Pr domain containing protein"=Pr domaini içeren protein) (Ohinata ve ark., 2005) ve *Prdm14* (Yamaji ve ark., 2008) ekspresyonu ile tanımlanan küçük bir hücre popülasyonu ile başlar.



**Şekil 2.3.** Farede primordial germ hücre (PGH) göçü ve kolonizasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan sinyaller ve zaman çizelgesi (Nikolic ve ark., 2016).

BLIMP1, PRDM14 ve aktivatör artırıcı bağlayan protein 2 $\gamma$  (“activating enhancer-binding protein 2 $\gamma$ ” = AP2 $\gamma$ ) ekspresyonu, post-implantasyon epiblastındaki küçük bir grup hücrede, WNT3 ve BMP4 sinyali tarafından uyarılır. Bu üç transkripsiyon faktörü, hücreleri *in vitro*'da PGH benzeri hücrelere dönüşmek üzere programlayabilirler ve bu hücreler *in vivo*'da gamet ve yeni döller oluşturma yeteneğine sahip hücrelerdir (Magnusdottir ve ark., 2013). Bu transkripsiyon faktörleri somatik genlerin baskılanmasını ve pluripotensi genleri de dahil olmak üzere germ hücre genlerinin aktive olmasını sağlar (Hackett ve Surani, 2014). Bu hücreler sayıca artar ve AP aktivitesi olan, *Stella* ekspresyonu (*Dppa3* veya *Pgc7* olarak da bilinir) görülen PGH'yi oluştururlar (Saitou ve ark., 2002; Sato ve ark., 2002). Farede PGH, gastrulasyon sırasında, E6.5'te ekstraembriyonik ektoderm ve viseral endodermden, pluripotent epiblast hücrelerine gelen BMP sinyali ve henüz tanımlanmamış olan sinyaller tarafından indüklenir (Saga, 2008). Bu indüksiyon, *Stella* gibi PGH-spesifik genlerin ekspresyonunu artıran ve *Hox* gen ailesinin üyeleri gibi somatik hücre genlerini baskılayan epiblast hücrelerinin *Blimp1/Prdm1* aracılı transkripsiyonel düzenlenmesi ile sonuçlanır (Ohinata ve ark., 2005).

Kültürde epiblast benzeri hücreler somatik genlerin ekspresyonu ve somatik farklanma için hazır hale gelirler. Bu hücreler, çok sayıdaki gelişimsel düzenleyici genler “bivalent” kromatin belirteçleri (aktive edici ve baskılayıcı histon modifikasyonlarının bir karışımı) içerirler (Kurimoto ve ark., 2015). PGH indüksiyonu ile birlikte, bivalent kromatin belirteçleri birçok bölgeden kaybolur, global DNA demetilasyonu “temel durum” olarak tanımlanan bir evreye geçer ve baskılayıcı özellikteki histon H3 (H3K9me2)'deki *Lys9* (mono-metil-histon H3)'un dimetilasyonunun yerini, H3 (H3K27me3) 'deki *Lys27* (tri-metil-histon H3)'nin trimetilasyonu alır. H3K9me2 heterokromatin ile, H3K27me3 ise daha dinamik bir şekilde düzenlenen, baskılanmış kromatin ile ilişkilidir. Farede bu üç transkripsiyon faktöründen herhangi birinin kaybı mutant PGH oluşumuna ve bu hücrelerin kaybına ya da çevredeki somatik hücrelere benzer şekilde gelişimine neden olur (Ohinata ve ark., 2005; Magnusdottir ve ark., 2013).

Özelleşmenin hemen ardından, PGH polarize olmuş bir morfoloji ve sitoplazmik uzantılar sergilerler ve primitif çizgi boyunca, posteriyor embriyonik endoderm,

ekstraembriyonik endoderm ve allantoise doğru göç etmeye başlarlar (Anderson ve ark., 2000) . Nikolic A. ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Nikolic ve ark., 2016) farede PGH göçünde ilk adım, E7.5'te hücrelerin posteriyör primitif çizgiden endoderme doğru hareket etmesidir. E8.5 ve E13.5 arasında, dokuya özgü olmayan alkalin fosfataz ("tissue-nonspecific alkaline phosphatase" = Tnap) pozitif PGHler çoğalır ve bağırsak endodermi ve mezenter boyunca göç eder ve bunu takiben genital kabartılara bilateral göç meydana gelir. Bu göçün ardından dışıde hücreler mayozla başlarken erkekte mitotik duraklama oluşur ve oositlere ya da spermatozoa'ya farklılaşma başlar (Tilgner ve ark., 2008).

Vasa proteini germ plazmanın önemli bir bileşenidir ve germ hücre belirlenmesinde gerekli olan RNA ve protein kompleksidir. Germ plazmanın bileşenleri, fare VAZA homologu ("mouse VAZA homolog"= MVH (DDX4 [dead box helikaz-4] olarak da bilinir) da dahil olmak üzere PGH'ların özelleşmesinin ardından eksprese olurlar (Toyooka ve ark., 2000). Bu bileşenler farklı granüllerde bir araya gelirler (Chuma ve ark., 2009). Embriyolarda ve gametogenez sırasında germ granülleri VASA, argonot proteinleri, PRDM5 ve Tudor-domain proteinlerini içerir. Germ granülleri ve germ plazma farede özelleşme ile ilgili herhangi bir rolü bulunmaz ancak bu yapılar farklı gelişimsel aşamadaki fare germ hücrelerinin özellikleridir.

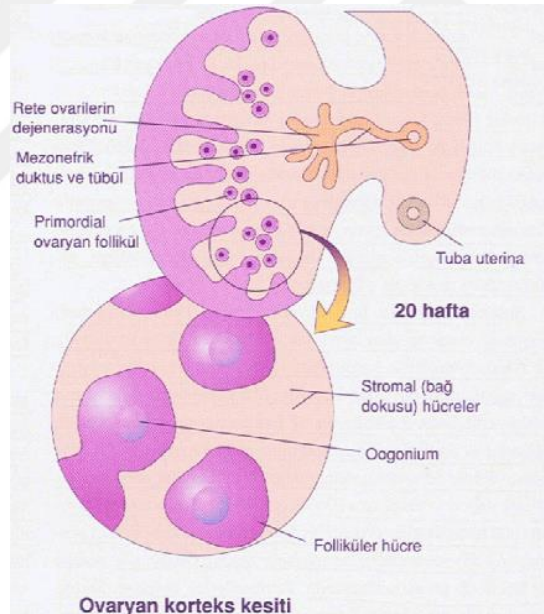
Göç etmekte olan PGH, pluripotensiye ilişkin genomik programını korur. Belli başlı pluripotensi genlerinin (*Oct4*, *Nanog* ve *Sox2*) ekspresyonu bu hücrelerde görülür. Bu hücreler postnatal fare testislerine enjekte edildiğinde teratoma oluştururlar (Saitou ve Yamaji, 2012). Göç eden PGH'da aynı zamanda evreye özgü embriyonik antijen 1 ("stage-specific embryonic antigen 1"=SSEA1) ekspresyonu görülür (Tilgner ve ark., 2008). Gonada ulaşmalarının ardından, gelişmekte olan PGH için germ hücrelerine özgü RNA bağlayıcı protein DAZL ("deleted in azoospermia-like") önem kazanır (Lin ve Page, 2005).

Dişi XX embriyoda, PGH çoğalmaya devam eder ve ardından mayoz bölünmenin profaz I aşamasına girer (Tam ve Snow, 1981). Bundan sonra mayoz I profazının diploten evresinde duraklarlar. Doğumdan sonra gonositler kortikal interstisiyel tabaka hücreleri tarafından çevrelenirler ve primordial folikül içindeki primer



oositleri oluştururlar. Puberte ile birlikte, ovulasyon sırasındaki hormonal stimülasyon ile maturasyon gerçekleşir ve oositler ovaryumdan ovidukta atılarak birinci mayoz bölünme tamamlanır, birinci polar cisimcik atılır. Haploid spermatozoon ile fertilizasyonun ardından, oosit ikinci mayoz bölünmeyi de tamamlar ve ikinci polar cisimcik de atılır (Saitou ve Yamaji, 2012).

Germ hücrelerinin mitotik proliferasyonu sona erdikten sonra mayoz başlar. Birinci mayoz bölünmenin profaz evresi dört farklı aşamadan oluşur: leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez (Dissen GA, 2003). Germ hücreleri, foliküller içerisinde yer aldıkları sırada, diploten evresinde duraklarlar. Germ hücrelerinin mitoz bölünmesinin tamamlanmasından önce, mezonefrik tübüller (Wolf kanalı) sürekliliğini kaybeder ve bunun sonucunda oluşan epitel hücre yığınları rete ovarii'yi oluştururlar (Dissen GA, 2003), gelişimin ilerleyen aşamalarında ovaryum folikülleri kortikal kordonlardan gelişir (Dalcik, 2009) (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** Yirminci hafta ovaryum korteks kesiti. Rete ovarilerin dejenerasyonu ve primordial foliküllerin oluşumu görülmektedir (Dalcik, 2009).

## 2.5. Folikülogenez

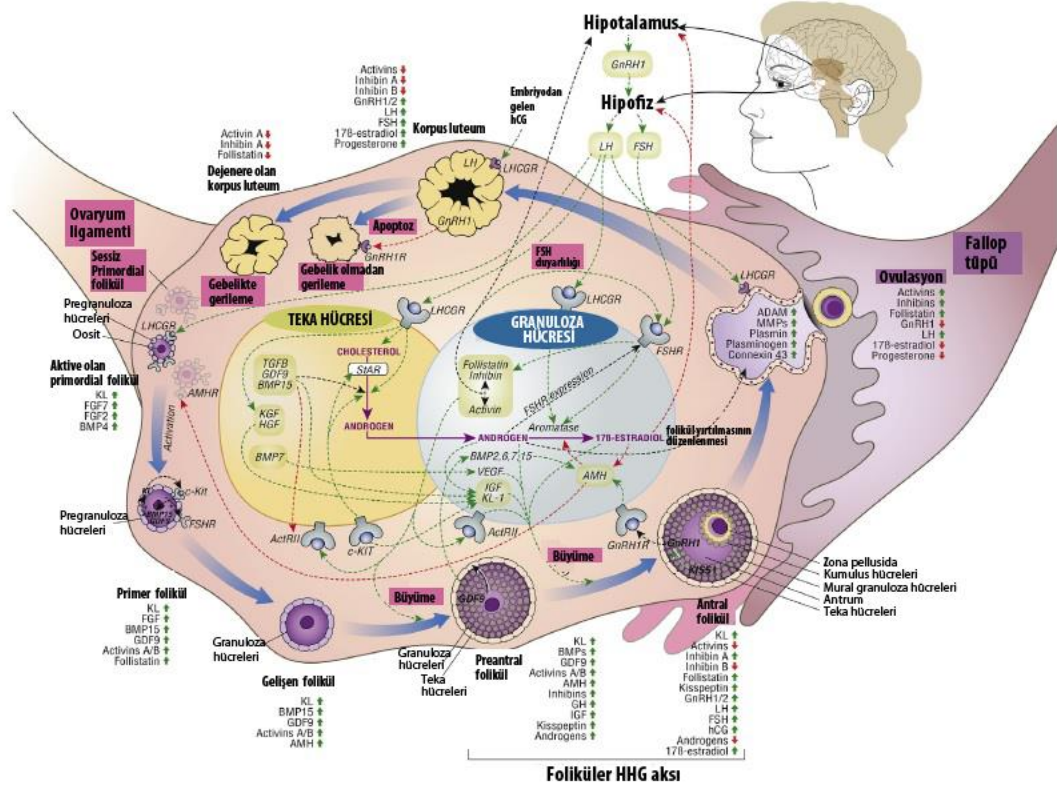
Primordial germ hücrelerinin dışide oogonia'yı oluşturmasından sonra bir dizi mitotik bölünme gerçekleşir. Bu mitoz bölünmelerin ardından, bazı hücreler mayoz I profaz evresinde duraklarlar ve primer oositleri oluştururlar. İnsanda 7. ayda neredeyse tüm oogonyumlar atretik hale gelir ve sadece ovaryum yüzey epitelinden

köken alan tek tabaka foliküler hücreler ile çevrili olan primer oositler hayatta kalır. Foliküler hücreler ve bunların çevrelediği oosit birlikte primordial folikülü oluşturur. Pubertede, sınırlı sayıda primordial folikülden oluşan, gelişmekte olan bir folikül havuzu seçilir. Hergün 15-20 folikül olgunlaşmaya başlar ve olgunlaştıkça üç farklı aşamadan geçerler: 1) primer veya preantral; 2) sekonder veya antral (vesiküler, Graaf); ve 3) preovulatuvar. Primer oosit, folikül sekonder aşamaya gelinceye kadar birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında kalır. Bu aşamada, lüteinize edici hormon (LH) uyarısı ile preovulatuvar gelişim indüklenir: mayoz I tamamlanır ve sekonder oosit ile polar cisimcik oluşur. Daha sonra sekonder oosit, ovulasyondan yaklaşık olarak 3 saat önce, mayoz II'nin metafaz aşamasında duraklar ve bu hücre bölünmesini fertilizasyona kadar tamamlayamaz (Basaklar, 1995).

Ovaryum folikülleri ovaryumun en basit fonksiyonel birimleridir. Folikülogenez, primordial oositi çevreleyen tek tabaka yassı granuloza hücrelerinden oluşan primordial foliküllerin aktive olmalarının ardından primer, sekonder ve preovulatuvar aşamaya gelmeleri sürecidir (McGee ve Hsueh, 2000) (Şekil 2.5).

Memelilerde üreme hipotalamik gonadotropin salgılatıcı hormon ("gonadotropin releasing hormone" = GnRH) nöronlarından aralıklı olarak salınan GnRH ile kontrol edilir (Knobil ve ark., 1980). GnRH ilk olarak hipotalamusta keşfedilmiş ve üremenin düzenlenmesi ile ilgili rolleri olduğu bilinen bir dekaeptittir (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) (Stanislaus ve ark., 1998). Folikülogenezi primer olarak düzenleyen, alfa ve beta olmak üzere iki polipeptit birimden oluşan 35.5 kDa'luk glikoprotein bir heterodimer olan folikül stimule edici hormonun (FSH) (Pierce ve Parsons, 1981) anterior hipofizden salınımı GnRH ve östrojen ile birlikte inhibin tarafından düzenlenir (Besecke ve ark., 1997). Juvenil ratlarda, hem hipofizektomi hem de GnRH antagonisti uygulaması sonrasında gonadotropin seviyesinin düşmesi ile ovaryum ağırlığı ve gelişen foliküllerin sayısı azalmıştır (McGee ve ark., 1997). Bunun aksine, hipofizektomi yapılmış veya GnRH antagonisti uygulanmış preantral ve daha küçük folikülleri bulunan prepubertal ratlarda, FSH uygulamasının ovaryum ağırlığını ve antral aşamaya kadar folikül gelişimini artırdığı görülmüştür (McGee ve ark., 1997). Önceki çalışmalar, primer aşamadan sonraki aşamalara kadar olan foliküllerde FSH reseptörlerinin

ekspresyonunun olduğunu (Oktay ve ark., 1997) ve FSH ve LH uygulanmasının preantral folikül gelişimini indüklediğini (McGee ve ark., 1997). FSH reseptörü olmayan fareler (Abel ve ark., 2000) ve hipofizektomize edilmiş kadınlarda (Schoot ve ark., 1994) foliküllerin preantral aşamalara kadar geliştikleri bilinse de, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar preantral folikül gelişiminin endojen ve eksojen gonadotropinler ile indüklenebildiğini göstermiştir (Tepekoy ve Akkoyunlu, 2016).



**Şekil 2.5.** Foliküler maturasyon, sessizlik, atrezi, yırtılma, oosit atılması, korpus luteum oluşumu ve fonksiyonunu kontrol eden endokrin, parakrin ve otokrin etkileşimler. Maternal LH, KL ekspresyonu aracılığıyla oositte mayozu düzenler ve FSH ile birlikte primordiyal folikül maturasyonunu gerçekleştirerek folikül gelişimini sağlar. LH ve FSH folikülde tekal hücre oluşumunu, androjen sentezi ve granuloza hücreleri östrojen sentezi için kolesterol taşınımını sağlar. Bu sırada oositin gelişimini tamamlamış bir zona pellusidası vardır ve çok sayıda granuloza hücre tabakası teka hücrelerinden bir bazal membran ile ayrılmıştır. Aktive olan foliküllerdeki granuloza hücreleri, aktive olmayan foliküllerin gelişimini baskılayan AMH sentezini artırır. LH, proteolitik enzim kaskadını aktive ederek ve oluklu bağlantı (“gap junction”) proteinlerini baskılayarak foliküler yırtılmayı indükler ve böylece Kumulus oosit kompleksi (KOK) ovidukta salınır (Atwood ve Vadakkadath Meethal, 2016).

Bu nedenle, Hsueh AJ ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Hsueh ve ark., 2015), folikül gelişimi gonadotropin bağımlı ve gonadotropine cevap veren aşamalardan oluşur. FSH içermeyen farelerde de gösterildiği gibi antral aşamaya kadar folikül gelişimi FSH bağımlı olmamasına rağmen (Abel ve ark., 2000),

preantral foliküller FSH uygulamasına karşı duyarlıdır. *In vivo* çalışmaların yanında, kültüre edilen preantral foliküllerin kullanıldığı *in vitro* çalışmalar da FSH ve diğer faktörlerin preantral folikül gelişiminde önemli olduğunu göstermiştir (Kreeger ve ark., 2005; Xu ve ark., 2009; Tepekoy ve Akkoyunlu, 2016).

Atwood CS ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Atwood ve Vadakkadath Meethal, 2016) folikülogenezin LH aracılı devamlılığı granuloza hücrelerinde Kit ligand (KL: diğer adıyla kök hücre faktörü) ekspresyonunun ve oosit ile teka-interstisiyel hücrelerde yer alan reseptörü olan c-Kit'e bağlanmasının düzenlenmesiyle gerçekleşir (Ye ve ark., 2009). KL-1 ve KL-2 ekstraselüler domain, hidrofobik transmembran domain ve kısa sitoplazmik kuyruktan oluşur (Hutt ve ark., 2006). KL otokrin mekanizmalar ile primordial ve preantral foliküllerdeki oosit gelişimini uyarmasının yanında (Ye ve ark., 2009), teka hücrelerinin çevre stromal dokudan seçilimini, proliferasyonunu, farklanmasını (Nilsson ve Skinner, 2004) ve ovaryan steroidogenezi (Reynaud ve ark., 2000), antrum oluşumu ve mayotik maturasyonu da uyarır (Hutt ve ark., 2006). KIT sinyalindeki mutasyonlar primordial germ hücrelerinin hayatta kalmasını, migrasyonunu ve proliferasyonunu etkileyerek, primordial folikül rezervini bozar (Besmer ve ark., 1993). KL ekspresyonunu pregranuloza ve granuloza hücrelerinde aktive eden faktörler, primordiyal folikülleri çevreleyen mezenşimal hücrelerden (prekürsör teka hücreleri) salgılanan fibroblast büyüme faktörü-7 ("fibroblast growth factor-7" = FGF-7) (Kezele ve ark., 2005) ve primordial foliküllerdeki oositlerden salgılanan FGF-2 (temel FGF) (Nilsson ve ark., 2001) KL ekspresyonunun artmasını sağlar.

Fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)'ın Kit genine bağlandığı noktadaki mutasyon, primer folikül aşamasındaki folikül gelişimini bozar (Kissel ve ark., 2000). Fosfat ve tensin homoloğu ("Phosphatase and tensin homolog") *Pten* geninin Zp3 promoteri ile koşullu olarak silinmesi, oositlerdeki PI3K aktivitesini artırır ancak büyüyen foliküllerin gelişimini etkilemez (Jagarlamudi ve ark., 2009). PI3K aktif mutanti, foliküllerde apoptozu anlamlı şekilde azaltır ve gelişimsel yeterliliği olan oositler içeren fazla sayıda folikül oluşumuna neden olur (Kim ve ark., 2015). PI3K sinyal yolağı elemanları primordial foliküllerin aktive olmasını sağlar ve aynı zamanda foliküllerin hayatta kalmasını ve gelişimini uyarır. KL, primordial foliküllerde ve

gelişiminin erken aşamasındaki foliküllerde bu yolağın aktive edilmesinde önemli bir rol oynar, ancak foliküler gelişimin sonraki aşamalarında KL yerini FSH ile etkileşim içerisinde olan insulin ve insulin-benzeri büyüme faktörü (“insülin-like growth factor” =IGF) gibi diğer bazı gelişim faktörlerine bırakır (Mani ve ark., 2010).

KIT’in sinyal yolağının alt basamağındaki efektörü olan transkripsiyon faktörü forkhead box O3 (FOXO3A)’nın primordial folikül rezervinin korunmasında önemli olduğu belirlenmiştir (Castrillon ve ark., 2003). FOXO3A aynı zamanda PI3K bağımlı olarak oosit gelişimini başlatan kilit bir moleküldür (John ve ark., 2008; Reddy ve ark., 2008). Transkripsiyon faktörü forkhead box L2 (FOXL2)’yi kodlayan geni çıkarılmış farelerde, primordial foliküllerin yassı granuloza hücreleri farklılaşamaz ve bu durum oositlerin ölmesine ve foliküler yıkıma neden olur (Schmidt ve ark., 2004).

Siklin bağımlı kinaz inhibitör 1B (“cyclin-dependent kinase inhibitör 1B”= CDKN1B) folikül aktivasyonunu baskılayarak (Rajareddy ve ark., 2007), PDPK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) ve ribozomal protein S6 (RPS6) foliküllerin hayatta kalmasını sağlar (Reddy ve ark., 2009). Primordial folikül dormansisi ve aktivasyonu, RPS6’yı aktive ederek hücre gelişimi, proliferasyonu ve metabolizmasını kontrol eden rapamisin kompleksinin memelilerdeki hedefi (“mammalian target of rapamycin complex 1” = mTORC1) tarafından düzenlenir (Lapante ve Sabatini, 2012). Oositte artmış mTORC1 aktivitesi olan mutant farelerde, tüm primordial folikül havuzu zamanından önce aktive olmuştur (Adhikari ve ark., 2010).

mTORC1 sinyali gelişim faktörleri, besinler, oksijen, stres ve enerji gibi birçok etken tarafından aktive edilmektedir (Lapante ve Sabatini, 2012). Gelişmekte olan foliküllerin granuloza hücreleri tarafından üretilen anti-müllerian hormon (AMH) (Monniaux ve ark., 2012), primordial folikül aktivasyonunu inhibe edebilir ve bu şekilde folikül rezervinin zamanından önce kaybedilmesini önleyebilir (Durlinger ve ark., 1999). mTORC1 sinyalinin yokluğunda PI3K sinyalinin telafi edici etkisi ile normal foliküler gelişim ve fertilitate devamlılığını korur (Gorre ve ark., 2014). Bunun

aksine, Rictor'un (MTOR'un RPTOR bağımsız olan üyesi, mTORC2'nin kilit bir bileşenini kodlayan kompleks 2) oositlerde koşullu olarak silinmesi, foliküler hücrelerde artmış apoptoz, büyük oranda folikül kaybı ve sekonder subfertilite gibi prematüre ovaryum yetmezliği fenotipleri sergilenmesine neden olur (Chen ve ark., 2015).

KL'dan bağımsız olarak çalışan BMP-4, primordial folikül gelişimini ve primordial-primer folikül geçişini sağlayan faktörlerden biridir (Nilsson ve Skinner, 2003). BMP-4'ün etkileri granuloza hücrelerindeki LH reseptör ekspresyonunun artışı ile düzenlenir (Glister ve ark., 2010) . Transforme edici büyüme faktörü-b (TGF-b) süperailisinin bir üyesi olan BMP4'ün yanısıra, granuloza hücreleri ve interstisyel teka hücrelerinde lokalizasyonu belirlenen TGF-a'nın da foliküler maturasyonda görevli olduğu düşünülmektedir (Akkoyunlu ve ark., 2003). Folikülogenez sürecinde hücre proliferasyonu ile farklanması, glial hücre kökenli nörotropik faktör ("glial cell-derived neurotrophic factor" = GDNF) 'ün reseptörüne (GFRa1) bağlanması ile ubikitoz tirozin kinaz reseptör RET'in aktive olması ile uyarılır (Naughton ve ark., 2006).

Folikülogenez sürecine oositte ekspresyonu görülen faktörler de katılır. Oositte üretilen BMP-15, granuloza hücrelerindeki KL ekspresyonunu artırır ve oosit membranında yer alan c-Kit üzerinden etkisini gösteren KL, gelişimi uyarır ve BMP-15 ekspresyonunu negatif yönde etkileyerek, erken ovaryum gelişiminde oluşumu sinir büyüme faktörü ("nerve growth factor"=NGF) tarafından düzenlenen (Romero ve ark., 2002) FSH reseptör (FSHR) düzeyini artırır (Hutt ve ark., 2006). *Gdf9* *-/-* fareler, foliküler gelişim primer folikül aşamasında bloke olduğu için sterildir (Dong ve ark., 1996). Büyüme farklılaşma faktörü ("growth differentiation factor" = GDF9) granuloza hücreleri tarafından çeşitli morfogjenlerin (Hedgehog ligandları) üretimini sağlar ve oositin foliküler teka farklanması için gerekli olduğu hipotezini doğrular (Liu ve ark., 2015). Bunun aksine, *Bmp15* *-/-* farelerde, folikülogenez ovulatuvar aşamalara kadar bozulmaz ve ovaryumlar yalnızca minimal histopatolojik defekt gösterir (Yan ve ark., 2001).

FSH'ın folikülün hem germ hücre hem de somatik bölümlerinin gelişimini koordine ettiği düşünülmektedir (Demeestere ve ark., 2012). LH, KL ekspresyonunu artırmasının yanında, granuloza hücrelerinden epidermal büyüme faktörü (EGF) salınımını uyarır ve germinal vezikül yıkımını (“germinal vesicle breakdown” = GVBD) sağlar (Kawamura ve ark., 2004). AMH, primordial folikül havuzundan seçilmiş olan foliküllerde görülür ve seçilmemiş olan foliküllerde gelişimin erken aşamalarını baskılar (Visser ve Themmen, 2005; Hillier, 2009). Kemik morfogenetik proteinler (BMP-2, -6, -7 ve -15), insan granuloza hücrelerinde AMH üretimini uyarır (Ogura-Nose ve ark., 2012).

Primer aşamadan sekonder (preantral) aşamaya geçişte daha fazla oosit ekspansiyonu, granuloza hücre proliferasyonu ve LH'a cevap veren teka hücre tabakası gereklidir (Hillier, 2009). KL aktivasyonu ve erken folikülogenezde görev alan LH, FGF-7 ve FGF-2'nin yanında, endojen olarak sentezlenen BMP'ler, aktivinler, inhibinler ve follistatinler (Yoshioka ve ark., 1998) primordial foliküllerin preantral foliküllere farklılaşmasında önemli düzenleyicilerdir (Silva ve ark., 2006). Aktivinler granuloza hücre proliferasyonunu uyarır, onların FSH'a olan duyarlılığını artırır ve teka androjen sentezini inhibe eder, inhibinler ise LH ile uyarılan androjen sentezini indükler ve androjen sentezinde folikül içi itici bir güç oluşturur (Hillier, 1991).

Konneksin-37 (heterolog oosit-granuloza oluklu bağlantılarını oluşturan)'yi kodlayan *Gja4* (“gap junction” = oluklu bağlantı protein alfa 4)'ün silinmesi preantral aşamada foliküler gelişimi durdurur ve oositi gelişiminin ve mayotik yeterlilik kazanmasını engeller (Carabatsos ve ark., 2000). KL/KIT sinyali preantral foliküllerdeki oosit gelişimini etkiler ancak heterozigot hayvanlarda folikülogenez, döllenabilir oositlerin ovulasyon aşamasına kadar normal şekilde ilerler (Reynaud ve ark., 2001).

Foliküler antrum oluşumu ve antral ekspansiyon FSH bağımlıdır (Combelles ve ark., 2004). Gelişimin son aşamalarında pre-ovulatuvar folikül endokrin (LH, FSH) ve parakrin (inhibin-A) sinyalin etkisi ile 17 $\beta$ -östradiol sentezler (Hillier, 1991). LH sinyali teka hücrelerinde kolesterolün androjenlere (androstenedion ve testosteron)

dönüşümünü sağlar ve bu androjenler artık luteinize edici hormon, koryonik gonadotropin reseptörü (LHCGR) ve FSHR, salgılamakta olan granuloza hücreleri tarafından alınırlar. FSH, bu reseptörleri kullanarak, aromataz (CYP19) aracılığı ile androjenlerin östrojenlere (17 $\beta$ -östradiol, östron) dönüşümünü uyarır (Palermo, 2007).

Oosit tarafından üretilen ve büyük ölçüde aktif olan BMP15/GDF9 heterodimerleri, kemik morfogenetik protein reseptör tip 1B (“bone morphogenetic protein receptor type 1B” = BMPR1B) ’yi de içeren spesifik bir reseptör kompleksine bağlanabilir ve böylece SMAD2/3 sinyal yolağını ve kumulus hücrelerindeki hedef gen ekspresyonunu aktive edebilir (Mottershead ve ark., 2015). BMP15 ve GDF9 aynı zamanda kumulus hücrelerinde natriüretik peptit reseptörü 2 (*Npr2*)’nin ekspresyonunu artırarak oositlerin mayotik duraklamasını dolaylı olarak etkileyebilir (Zhang ve ark., 2010). Folikülogenezin farklı aşamalarında granuloza hücrelerinde (PKC $\alpha$  ve PKC $\delta$ ) ve oositlerde (PKC $\epsilon$ ) lokalize olan belirli protein kinaz C (PKC) izotiplerinin folikülogenez süreciyle ilişkili hücre fonksiyonlarında görevli olabileceği düşünülmektedir (Tepekoy ve ark., 2014).

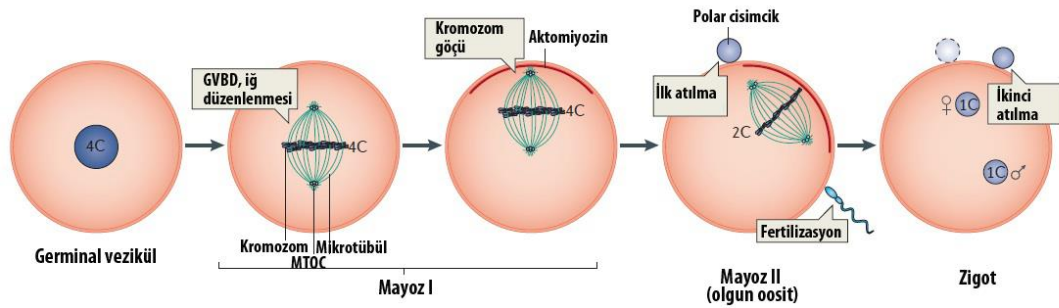
## **2.6. Oositin nuklear maturasyonu**

Oositler, ovaryum folikülleri içerisinde gelişen büyük hücrelerdir. Eşeyli üreyen organizmalarda nuklear genetik materyalin yarısını oluşturmanın yanı sıra, üremenin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için gerekli olan tüm membranöz ve sitoplazmik determinantları ile embriyoyu meydana getirirler. Memeli oositleri, çevredeki somatik hücrelerden kaynaklanan parakrin sinyaller ve etkileşimlerin bir sonucu olan uzun bir gelişim sürecine girerler. Yeterli büyüklüğe ulaşmış olan oositler LH preovulatuvar artışına cevaben mayoz I’i tamamlarlar. Profaz I’de duraklamış olan oositler tam bir nuklear membran ile karakterize edilirler ve nukleus, germinal vezikül (GV) adını alır. Mayoz I’in tamamlanmasının en açık göstergesi GV’nin ortadan kalkması ya da yıkımı (GVBD), kromozom yoğunlaşması ve bipolar metafaz I (MI) iğinin oluşmasıdır. Birinci mayotik bölünme süresince, homolog kromozomlar ayrılır ve bir set birinci polar cisimciğe aktarılır ve böylece haploid genom oluşur. Daha sonra ikinci bir mayotik iğ oluşur ve oositler metafaz II’ye (MII) girerler ve bir



spermatozoon tarafından aktive edilene kadar bu evrede beklerler (Hunter ve ark., 1976) (Şekil 2.6).

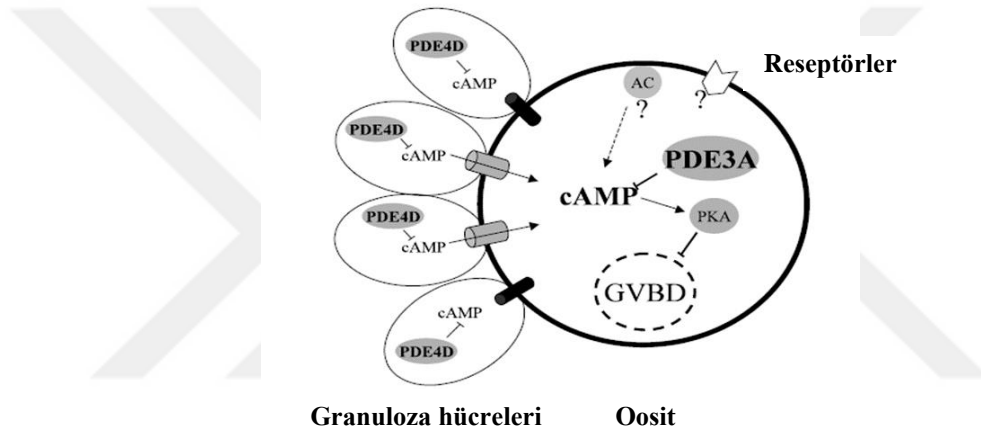
Pekçok memelide MII evresine kadar olan mayotik maturasyon ovulasyon ile tamamlanır ancak maturasyon ve ovulasyon arasındaki korelasyon deneysel olarak ayrılabilir. LH bağımsız (spontan) maturasyon oosit- kumulus hücre kompleksinin antral foliküllerden ayrılarak uygun bir medyuma kültüre edilmesiyle gerçekleşir (Pincus ve Enzmann, 1935). Bu nedenle ovulasyonun hormonal indüksiyonu nuklear maturasyonun başlaması için gerekli değildir. Aksine, gonadotropinlerin domuzlarda erken östrus evresinde enjeksiyonu ile ovulasyon indüksiyonu primer (diploid) oositlerin ovulasyonu ile sonuçlanmıştır (Hunter ve ark., 1976). Oositler mayozun devamında defektler gösteren belirli fare türlerinde MI evresinde de ovule olmuşlardır (Eppig ve ark., 1977).



**Şekil 2.6.** Oosit maturasyonunun şematik gösterimi. Profaz I'de duraklayan bir oosit, maturasyona germinal vezikül yıkımı (GVBD) ile başlar. GVBD'yi takiben mayoz I iğ oluşur ve kromozom göçü başlar. Kromozom göçü ile birlikte kortikal aktomiyozin bölgesi oluşur (kırmızı). Mayoz I anafaz ve birinci polar cisimciğin atılmasının ardından, subkortikal bölgede mayoz II iğ oluşur ve ikinci bir polar aktomiyozin bölgesinin oluşumunu indükler. 2C DNA içeren olgun oosit metafaz II aşamasında duraklar ve bu sırada iğ'in asimetrik konumu da korunur. Fertilizasyonun ardından mayoz kaldığı yerden devam eder ve kardeş kromatidlerin ayrılması ve ikinci polar cisimciğin atılmasının ardından 1C DNA içeriği bulunan dişi pronukleus oluşur (Li ve Albertini, 2013).

Oositin nuklear maturasyonunun kontrolü, maturasyonun duraklaması veya devam etmesi oositte yer alan siklik adenozin monofosfat (cAMP) dengesi ile ilişkilidir. Oositteki cAMP konsantrasyonundaki düşüş mayozun tamamlanmasına yani maturasyonun devam etmesine neden olur (Conti ve ark., 2002). Gilchrist RB ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Gilchrist ve ark., 2016) Orta büyüklükteki antral ve pre-ovulatuvar foliküllerdeki oositler mayotik maturasyon için yeterlidir ancak foliküler çevrenin etkisi ile GV aşamasında duraklarlar. Bu

nedenle, folikülden uzaklaştırılan ve *in vitro* ortama alınan oositlerde, hormon bağımsız, spontan mayotik maturasyon gerçekleşir (Edwards, 1965). Foliküler somatik ve germ hücrelerinde gelen siklik nukleotitler cAMP ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) oositin mayotik maturasyonunu koruyan temel moleküllerdir. Theophylline (Cho ve ark., 1974) ve 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) (Dekel ve Beers, 1978), gibi spesifik olmayan fosfodiesteraz (PDE) inhibitörleri *in vitro*'da oosit mayotik duraklamasını korur. Mayotik duraklama sürecinde PDElerin rolü (Masciarelli ve ark., 2004), cAMPlerin yanı sıra (Mehlmann ve ark., 2002) cGMP lerin oositteki kaynağı ve rolü ve natriüretik peptitlerin katılımı belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2010).

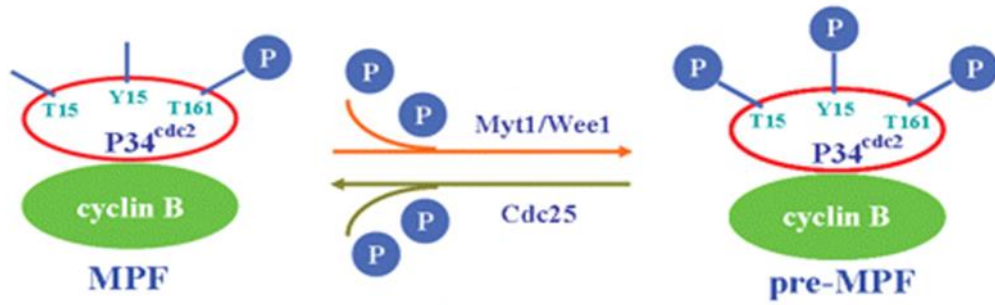


**Şekil 2.7.** cAMP dengesi ve mayotik duraklama. PDE izotipleri oosit ve granuloza hücrelerinde özgünlük göstermektedir. PDE3A izotipi oositlerde bulunurken, PDE4D granuloza hücrelerine özgündür. Her iki izotipin görevi cAMP enzimini baskılamak ve oositin mayotik duraklamasına son vermektir (Conti ve ark., 2002).

PDEler, cAMP veya cGMP veya her iki siklik nukleotiti de hidrolize edebilen farklı PDE izozimlerinden oluşan 11 aileye ayrılmıştır. Oositteki baskın PDE olan PDE3A, cGMP ile inhibe olan bir cAMP hidrolize edici enzimdir (Maurice ve Haslam, 1990). cGMP'nin bir oosit maturasyon inhibitörü olduğu (Hubbard, 1986) ve LH uyarımının ardından ovaryumdaki cGMP seviyesinin düştüğü (Ratner, 1976) bilinmektedir. Granuloza/kumulus bölümünden oosite oluklu bağlantılar aracılığı ile geçen cGMP'nin oositteki PDE3A'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Norris ve ark., 2009; Vaccari ve ark., 2009). Bu nedenle foliküler somatik hücrelerden gelen cGMP, oositin mayotik duraklamasını korumak üzere yeterli oosit-içi cAMP düzeyinin oluşmasını sağlar. Farmakolojik ve moleküler yaklaşımlar ile cAMP'yi yıkan ve

inaktive eden PDE'lerin ekspresyonunun ovaryan folikülde farklı bölgelere özgü olduğu belirlenmiştir. PDE3 oositte bulunurken, PDE4 granuloza hücrelerinde yer almaktadır (Şekil 2.7). Fare oositinde ekspresyonu görülen PDE3'ün somatik hücrelerde bulunan PDE3A ile benzer özellikler sergilediği belirlenmiştir. Oositte bulunan PDE3'ün tamamen inhibe edilmesi oosit maturasyonunu hem *in vitro* hem de *in vivo* düzeyde bloke etmiştir ve bu enzimin oosit maturasyonu için gerekliliği kanıtlanmıştır (Conti ve ark., 2002).

Oositteki yüksek cAMP düzeyi, “maturation promoting factor” (MPF) aktivasyonunu cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA)'nın etkisi ile baskılar (Bornslaeger ve ark., 1986). MPF katalitik siklin bağımlı kinaz 1 (“cyclin dependent kinase 1” =CDK1 ya da *Cdc2*) altünitesi ve onun regülatör altünitesi siklin B1'den oluşan bir komplekstir (Doree ve Hunt, 2002). MPF'nin aktivitesi *Cdc2*'nin büyük oranda korunmuş bölgeleri olan Thr14 ve Tyr15'in fosforilasyonu ile düzenlenir. Bu bölgelerde gerçekleşen inhibitör fosforilasyonlar Wee1 kinazlar tarafından katalize edilirken, bu bölgelerin defosforilasyonu ise Cdc25 fosfatazlar tarafından gerçekleştirilir (Lew ve Kornbluth, 1996) (Şekil 2.8). Son yapılan çalışmalar göstermiştir ki protein kinaz A (PKA), hem Cdc25 fosfatazların hem de Wee1 kinazların aktivitelerini doğrudan düzenler (Oh ve ark., 2010).



**Şekil 2.8.** “Maturation promoting factor” (MPF) aktivitesini düzenleyen mekanizmalar. Mature olan oositlerde pre-MPF ve MPF dengesi Myt1/Wee1 ve cdc25 aktivitesi ile kontrol edilir. Yaşlanmış oositlerde, Myt1/Wee1 ve cdc25 aktivitelerindeki dengenin bozulması ile gerçekleşen pre-MPF birikimi ile MPF aktivitesi azalır. Vanadat, genç oositlerde cdc25 aktivitesini baskılar ve böylece pre-MPF birikimi ve MPF aktivitesinde azalma gerçekleşir. Bunun aksine, kafein yaşlanmış oositlerde Myt1/Wee1 aktivitesini baskılar ve pre-MPF'den aktif MPF'ye dönüşüme neden olur ve MPF aktivitesi artar (Miao ve ark., 2009).

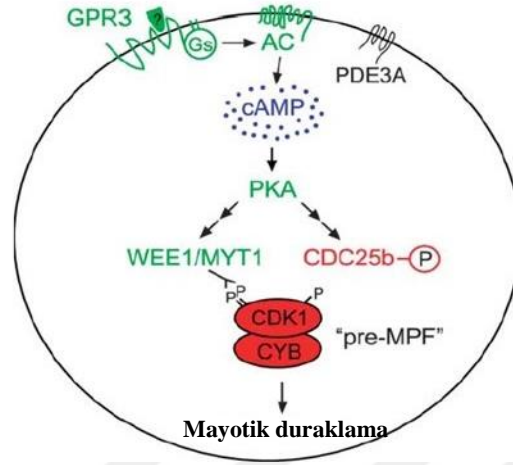
Adhikari D ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Adhikari ve Liu, 2014) profaz -I duraklaması düşük MPF aktivitesi ile ilişkilidir ve hormonal sinyallerin

gelmesinin ardından mayozun tamamlanması MPF aktivasyonu ile gerçekleşir (Jones, 2004; Adhikari ve ark., 2012). CDK1, matur olmayan oositlerde mayozun tamamlanmasında önemli bir rol oynar ve diğer CDKlar CDK1 fonksiyon kaybını telafi edemezler (Adhikari ve ark., 2012). Mature olmayan oositlerde profaz I evresinden çıkış mitozdaki G2/M faz geçişine karşılık gelir ve CDK1, G2/M geçişinde de önemli bir rol oynar (Santamaria ve ark., 2007; Diril ve ark., 2012). Hem mitoz hem de mayozda Cdc2-Siklin B kompleksi farklı sitoplazmik bölgelerdeki aktivasyonundan sonra profazdan metafaza geçişin işareti olan GVBD için gerekli olan belirli hedefleri fosforile etmek üzere nukleusa girer (Marangos ve Carroll, 2004).

Fare oositleri antral foliküllerden ayrıldıklarında ve in vitro kültüre edildiklerinde mayozu kendiliğinden tamamlarlar. Ancak, PKA'nın katalitik altünitesinin mikroenjeksiyonu profaz I duraklamasını koruyabilir (Bornslaeger ve ark., 1986). Benzer şekilde, PDE3A içermeyen fare oositlerinde GVBD gerçekleşmezken, PKA sinyalinin inhibe edilmesi bu oositlerde GVBD'yi indükler (Masciarelli ve ark., 2004). Bu sonuçlar gösterir ki, cAMP tarafından sağlanan profaz I duraklaması PKA aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. PKA, CDK1'i doğrudan fosforile etmez ancak CDK1'in inaktif olarak kaldığı süreçte Wee1 kinaz ve Cdc25b fosfataz'ın aktivitesini düzenler ve dengeler. Preovulatuvar LH uyarımı ve oositin folikülden atılması ile birlikte, cAMP'deki azalma CDK1'in aktive olmasını sağlar. Cdc25 fosfataz ve Wee1B kinaz, fare oositlerinde PKA'nın doğrudan substratları olarak gösterilmiştir (Han ve Conti, 2006).

GV aşamada duraklayan oositlerde, Cdc25b'nin PKA aracılı fosforilasyonu fonksiyonunun baskılanmasına neden olur (Pirino ve ark., 2009). Wee1B'nin PKA tarafından fosforilasyonu Wee1B aktivitesini artırır ve böylece nukleustaki MPF aktivitesini inhibe eder (Şekil 2.9). MPF, GV aşamada duraklamış olan oositlerde genel olarak sitoplazmada lokalize olsa da sitoplazmik lokalizasyon, nukleustan hızlı bir şekilde sitoplazmaya doğru hareket veya nukleusa gidişin oldukça yavaş olması sonucu olabilir (Reis ve ark., 2006). Bu nedenle, Wee1B, mayotik duraklama süresince nukleusa giden MPF'nin aktivasyonunu önler. Diğer taraftan miyelin transkripsiyon faktörü-1 (*Myt1*), sitoplazmada lokalize olan MPF'nin aktivitesini

inhibe eder. Bu inhibisyon *Myt1*'in morfolino oligonükleotit "knockdown" uygulaması ile gösterilmiştir (Oh ve ark., 2010).

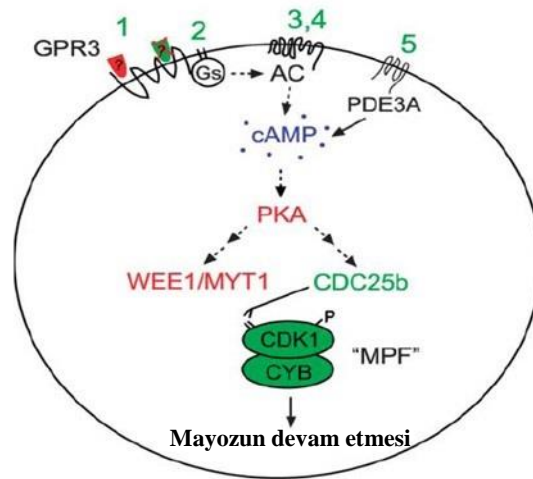


**Şekil 2.9.** Mayotik duraklamanın korunmasını sağlayan hücre sinyali. GPR3'ün, foliküler hücrelerden gelen sinyal veya bilinmeyen bir ligand aracılığı ile aktive olmasının ardından Gs aktive olur ve adenilat siklaz'ı (AC) uyararak cAMP artışına neden olur. cAMP ise protein kinaz A (PKA)'yı aktive eder ve aktive olan PKA hücre siklusu regülatör kompleksinin (CDK1/siklinB) fosforile olmasını (P) ve bu şekilde inaktive olmasını sağlar. PKA (doğrudan veya dolaylı olarak) inaktive edici fosfataz CDC25b (CDC25b-P)'nin fosforilasyonuna neden olur. PKA aynı zamanda CDK1'i fosforile ederek mayozun tamamlanmasını önleyen WEE1/MYT1 kinazların aktivitesini de uyarabilir. cAMP fosfodiesteraz, PDE3A'nın aktivitesinin de immatür oositte düşük tutulduğu ve oositte cAMP yıkımının önlenerek cAMP düzeyinin korunduğu düşünülmektedir (Mehlmann, 2005).

Adhikari D ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Adhikari ve Liu, 2014), CDK1, Wee1/MYT1 kinazlar tarafından, treonin-14 (Thr14) ve tirozin-15 (Tyr15) bölgelerinden fosforile olduğunda inaktive olur (Mueller ve ark., 1995). Fare oositlerinde Wee1B, CDK1'i Tyr15 bölgesinden fosforile eden kilit bir CDK1 inhibitör kinazdır (Han ve ark., 2005). Wee1B mRNA germinal vezikül (GV) aşamada duraklayan oositlerde translyasyona uğrar ve ekspresyonunun baskılanmasını hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda mayozun erken tamamlanmasına neden olur (Han ve ark., 2005; Han ve Conti, 2006). Wee1B inhibisyonu, normalde folikülden atılmasının ardından GVBD görülmeyen PDE3A içermeyen fare oositlerinde GVBD gerçekleşmesini sağlar. Bu bilgi de Wee1B'nin profaz 1 duraklamasını sağlamada PKA'nın hedef proteini olarak görev aldığı gösterir (Masciarelli ve ark., 2004; Han ve ark., 2005). PKA'nın Wee1B'yi serin-15 (Ser15) bölgesinden doğrudan fosforile ettiği ve kinaz aktivitesini artırdığı *in vitro* ortamda gösterilmiştir (Han ve ark., 2005). MYT1 kinazın azalması da fare oositlerinde mayozun erken tamamlanmasına neden olur. Wee1B oosit nukleusunda lokalize olurken, MYT1 sitoplazmadaki

CDK1 aktivitesini inhibe eder (Oh ve ark., 2010). Hem Wee1B hem de MYT1 baskılandığında, mayozun devamlılığına olan etkileri her birinin tek başına baskılandığı durumdaki etkisinden çok daha fazladır (Han ve ark., 2005).

Cdc25'nin 3 izoformu (Cdc25A, Cdc25B, ve Cdc25C), memeli hücre siklusunun düzenlenmesinde, CDK1'in Wee1/MYT1 kinazlar tarafından gerçekleştirilen inhibitör fosforilasyonlarının tersine çevrilmesinde görev alır (Rudolph, 2007). PKA, *Xenopus* oositlerinde Cdc25'yi Ser287 bölgesinden fosforile ederek inaktive eder. Cdc25b'nin PKA tarafından fosforile edilemeyen mutant bir versiyonu oositte aşırı derecede eksprese edildiğinde, PKA profaz I duraklamasını korumaya daha fazla devam edemez (Duckworth ve ark., 2002).



**Şekil 2.10.** LH'nin mayozun tamamlanmasına ilişkin potansiyel hedefleri. Mayotik duraklama mekanizmasının aksine oositte aktif olan PDE3A, cAMP düzeyinin düşmesine neden olur ve bunun sonucu olarak PKA inaktif hale gelir. Böylece WEE1/MYT1 inaktif hale gelirken CDC25b aktive olur ve MPF'yi aktive ederek mayozu tamamlanmasını sağlar (Mehlmann, 2005).

Fare oositlerinde, Cdc25B'nin CDK1 aktivasyonu ve mayozun tamamlanması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Lincoln ve ark., 2002). Fare oositlerinde mayotik duraklama süresince, PKA'nın Cdc25B'yi Ser321 bölgesinden fosforile ederek inaktive ettiği düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2008; Pirino ve ark., 2009). Cdc25B, PKA tarafından fosforile edildiğinde 14-3-3 proteinlerine bağlanır ve substratından uzağa, sitoplazmaya aktarılır (Pirino ve ark., 2009). Cdc25B'nin PKA tarafından fosforile edilemeyen bir mutant versiyonu fare oositlerinde eksprese edildiğinde nukleusta lokalize olur ve GVBD'yi hızlandırır (Pirino ve ark., 2009; Oh ve ark., 2010).

Oositte LH uyarımının ardından cAMP seviyeleri düştüğünde ve PKA inaktive olduğunda, Cdc25B PKA tarafından fosforile edilmez ve dolayısıyla inaktive edilemez ve nukleusa hareket eder (Oh ve ark., 2010). Nukleustaki fosfataz birikimi, Wee1B/MYT1 kinazlar tarafından gerçekleştirilen inhibitör fosforilasyonları ortadan kaldırarak CDK1 aktivitesini artırır ve nukleusa giden MPF'nin aktivasyonunu indükler (Şekil 2.10).

Nukleusta, aktive olan MPF, Wee1B'nin sitoplazmaya gönderilmesini indükler. Böylece, mayotik duraklama PKA'nın cAMP aracılı aktivasyonu ve MPF aktivitesini düzenleyen kinaz ve fosfatazların doğrudan regülasyonu ile düzenlenir. Regülatör zincirin bu iki halkası mayotik duraklama süresince MPF'yi inaktif halde tutmak üzere sinerjistik olarak çalışır (Conti ve ark., 2012).

Siklin miktarının artması CDK1 aktivasyonu için önemli bir gerekliliktir (Murray ve Kirschner, 1989). Mitotik hücre sikluslarında, her mitozda yeni siklin sentezi meydana gelir (Evans ve ark., 1983) ve mitozdan çıkış siklin B1'in ubiquitin bağımlı, proteozom aracılı yıkımı ile gerçekleşir (Glotzer ve ark., 1991). GV aşamada duraklayan fare oositlerinde, MPF aktivasyonu veya GVBD için protein sentezi gerekli değildir (Hashimoto ve Kishimoto, 1988). Yeni siklin B sentezi için gereklilik yok ise, oogenez sürecindeki pre-MPF'nin defosforilasyonu MPF aktivasyonu için yeterlidir (Chesnel ve Eppig, 1995). Protein sentezi inhibitörleri normal mayoz I (MI) iğ oluşumunu engellediklerinden (Hashimoto ve Kishimoto, 1988), MI süresince protein sentezinin gerekli olduğu düşünülmektedir. MI süresi ve GVBD ile MI arasındaki MPF aktivitesindeki artış siklin sentez hızı ile ilişkili olduğundan, siklin B'nin gerekli proteinlerden biri olduğu düşünülmektedir (Hampl ve Eppig, 1995).

CDK1-siklin B aktivitesi ile ilgili önemli olan diğer bir nokta bu kompleksin hücre içerisinde nasıl bir dağılım gösterdiğidir (Pines, 1999; Takizawa ve Morgan, 2000). CDK1-siklin B interfaz süresince sitoplazmiktir ve nuklear kılıf yıkımından ("nuclear envelope breakdown" = NEBD) hemen önce, profazın geç aşamalarında nukleusa girer (Pines ve Hunter, 1991; Casas ve ark., 1999). GV oositlerde siklin B1'in aktif nuklear eksport ile sitoplazmada tutulduğu ve sonrasında, GVBD'den

hemen önce siklin B1'in kromatin ile ilişkide olacağı nukleusa taşındığı gösterilmiştir (Marangos ve Carroll, 2004).

Olgun oositler ikinci mayoz bölünmenin (MII) metafaz evresinde duraklar. Fertilizasyon ile birlikte hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun hızlı ve geçici olarak artışı tetiklenir. Bu  $Ca^{2+}$  sinyalleri MPF'yi inaktive ederek hücre siklusunun devam etmesini sağlar (Jones, 2005). Genel olarak siklin B'nin proteolitik yıkımının MPF inaktivasyonunu ve M-faz çıkışını kontrol ettiği düşünülmektedir (Wasch ve Cross, 2002; Jones, 2005). Oositlerde siklin B yıkımı "anaphase-promoting complex" (APC)'nin koaktivatörü Cdc20 (APCcdc20) ile birlikte aktivasyonu ile gerçekleşir (Wasch ve Cross, 2002).

### **2.7. MAPK sinyali ve nuklear maturasyondaki rolü**

Mitojen ile aktive olan protein kinazlar (MAPK), birçok hücre tipinde yer alan, bir dizi hücre dışı uyaran ve sinyal yolağı aracılığıyla düzenlenen, hücre siklusu, proliferasyon ve farklılaşmanın kontrolünde görev alan serin/threonin kinazlardır (Pearson ve ark., 2001). Memeli oositlerinde MAPK'ın p42ERK1 ("extracellular signal-regulated kinase" = hücre dışı sinyaller ile kontrol edilen kinaz) ve p44ERK2 olmak üzere iki izoformu bulunur ve pek çok çalışma bu kinazların mayotik maturasyon sürecinde aktive olduğunu göstermiştir (Fan ve Sun, 2004). MAPK fosforilasyonu ve aktivasyonu için sinyal yolağının bir üst basamağında yer alan MEK (MAPK/ERK Kinaz)'in MOS proteini tarafından fosforilasyonu ve aktivasyonu gerekir (Verlhac ve ark., 2000). MAPK'ın MPF aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Verlhac ve ark., 2000).

### **2.8. Sitoplazmik oosit maturasyonu**

Oositin MPF ile düzenlenen nuklear maturasyonu sırasında, sitoplazmik maturasyon da gerçekleşmektedir. Sitoplazmik maturasyon sırasında organellerdeki artışın yanı sıra hücre iskeleti elemanlarının yeniden organize olması mayoz bölünmenin uygun şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır (Watson, 2007). Sitoplazmik maturasyon gelişen oositlerde gerçekleşen, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için gerekli olan bir süreçtir. Nuklear maturasyon ile paralel olarak gerçekleştiği düşünülse de,



mayozun devamından önce oosit büyümesi sırasında da kilit adımlar gerçekleşir (Eppig JJ, 2003).

Primordiyal folikül oositleri genellikle yanıltıcı biçimde “sessiz” olarak tanımlanırlar. Ancak bu sadece dinlenme halinde olan nukleusun durumudur. Küçük oositlerdeki bir veya daha fazla nukleusun varlığı, RNA polimeraz aktivitesi ve aminoasitler ile ribonükleotidlerin alımı aktif olduklarını gösterir. Orta-gelişmiş evredeki oositler pek çok somatik hücreden 10 kat daha fazla RNA üretirler ve nukleoluslar daha geniş ve yoğun hale gelir. Primordiyal foliküllerdeki oositler ile karşılaştırıldığında, olgun oositler çok daha karmaşık bir sitoplazmik organizasyona sahiptir, mayozu tamamlamak için yeterlidirler ve fertilizasyonu gerçekleştirip yarıklanma bölünmelerini tamamlayabilirler (Grudzinskas, 1995).

Küçük oositlerin organelleri genellikle nukleus çevresinde kümelenmiştir. Işık mikroskobu altında bu organeller Balbiani vitellin cisimciği (yolk nukleusu) de denen, Golgi aygıtı, mitokondri ve yağ damlacıkları gibi pek çok membranöz organeli içeren tam bir perinuklear yapı olarak gözlemlenir. Oosit büyümeye başladığında bu organeller hücre polarize olmaksızın periferine doğru göç eder. Golgi aygıtı, dışarı verilecek olan glikoproteinlerin üretimindeki rolüne uygun olarak kortikal bölgede iki ayrı bölgeye bölünür (Grudzinskas, 1995).

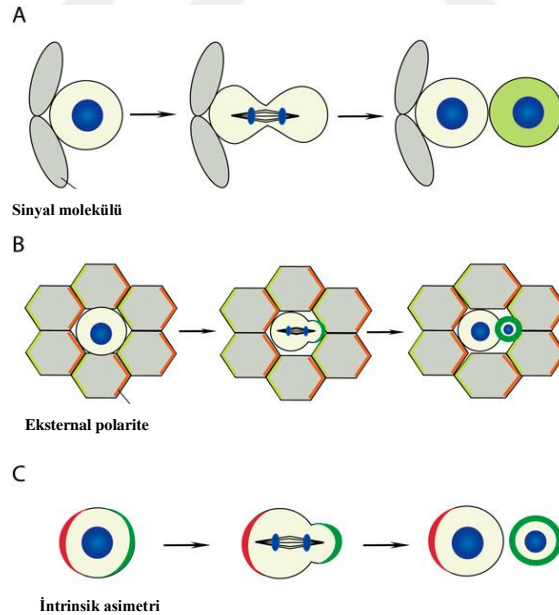
Kortikal granül oluşumu rodentlerde oosit gelişiminin başlangıcından hemen sonra gerçekleşir ve post ovulatör evreye kadar devam eder. Olgun evrede, döllenmenin ardından veya diğer aktive edici sinyallere cevaben perivitellin aralığa salınmak üzere hücre membranının hemen altında yer alırlar (Grudzinskas, 1995). Oositte bulunan küçük, oval veya yuvarlak şekilli mitokondriler preovulatör evrede sayıca artar ve krista daha sütunsu bir hal alır (Grudzinskas, 1995). Babayev E. ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Babayev ve Seli, 2015) memeli oositlerindeki mitokondriler transkripsiyonel ve biyoenerjetik olarak sessizdir ve bu fonksiyonel evre, özellikle düşük ATP üretimi görülen olgun olmayan oositlerde (Bentov ve ark., 2011) evrimsel olarak korunmuştur (Allen ve de Paula, 2013). Bu sessiz evrenin, daha sonra embriyoya geçmesi muhtemel olan mitokondriyal DNA

mutasyonlarını minimum düzeyde tutmak için önemli olduğuna inanılmaktadır (de Paula ve ark., 2013).

Oositler, hücre bölünmesi sırasında kromozomları ayıran iğ ipliklerinin düzenlenmesinden sorumlu olan sentriyollere sahip değildir. Primordiyal oositlerde var olan sentriyoller orta-gelişmiş evrede kaybolurlar ve embriyo birçok yarıklanma bölünmesini tamamlayıncaya kadar ortaya çıkmazlar (Grudzinskas, 1995). Hem granüllü hem de düz yüzlü endoplazmik retikulum (ER) oogenez süresince mevcuttur ancak olgun oositlerde başka yapılara dönüştükleri için granüllü ER daha seyrek, düz yüzlü ER ise daha az önemli hale gelir. Ribozom sayısı farede oogenez sürecinde ooplazmanın genişlemesi nedeniyle dört kat artar (Grudzinskas, 1995).

## 2.9. Asimetrik hücre bölünmesi

Hücre bölünmesi düşünüldüğünde genellikle bir hücrenin iki özdeş hücreyi vermesi akla gelir. Ancak birçok durumda, hücre bölünmeleri asimetriktir ve protein içeriği, hücre boyutu veya gelişimsel potansiyeli açısından farklı olan yavru hücreleri oluşturur (Knoblich, 2008) (Şekil 2.11).

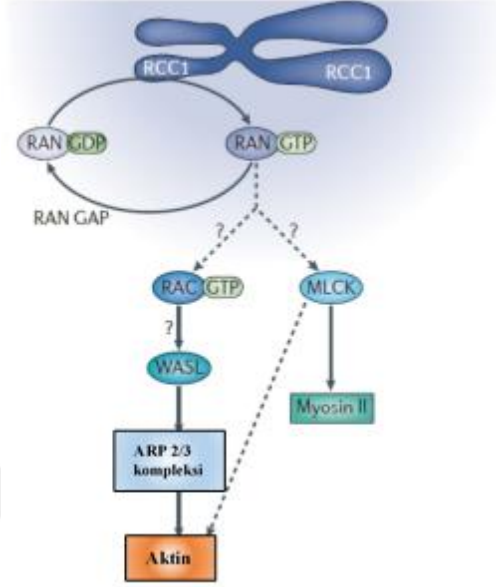


**Şekil 2.11.** Asimetrik hücre bölünmesi tipleri. (A) Asimetrik hücre kaderi belirlenmesi niş'ten elde edilen bir sinyal ile düzenlenir. Niş ile temas halinde bulunan hücreler kimliklerini korurken, bölünmeden sonra niş'ten ayrılan hücreler farklı bir hücre kaderine sahip olurlar (B) Eksternal polarite hücre kaderi determinantlarının (yeşil) asimetrik lokalizasyonunu içerir (C) İntrinsik asimetride hücre kaderi determinantlarına (yeşil) mitoz süresince ekstraselüler bileşenlerin yokluğunda yol gösteren polarite proteinleri (kırmızı) bulunur (Neumuller ve Knoblich, 2009).

Memeli oositleri tarafından gerçekleştirilen ardarda gelen iki hücre bölünmesi ile maturasyon sürecinde haploid, fonksiyonel bir gamet meydana gelmektedir. Bu iki bölünme, hem yavru hücrelerin boyutları hem de gelişim potansiyelleri açısından oldukça asimetrikdir. Büyük olan oosit fertilize olarak embriyoya gelişebilirken, küçük polar cisimcikler ise dejenere olur. Bu asimetrik hücre bölünmesi, olgun oositin geniş bir sitoplazmaya sahip olmasını ve sperm girişinin kolaylaşmasını sağlarken, tek bir zona pellusida içerisinde gelişim potansiyeli düşük olan çok sayıda fertilize olmuş oosit oluşumunu önlemek için gereklidir (Otsuki ve ark., 2012).

Farklı memeli türlerinde profaz I aşamasında duraklayan oositlerin germinal vezikülü merkezi konumdadır. *In vitro* maturasyon sırasında fare oositlerinde kromozomlar metafaz plağında dizildiklerinde, mayoz I iğ kortekse göç eder ve anafazı başlatır. Bu süreç, “kromozom göçü” olarak adlandırılır. Mikrotübül inhibitörlerinin bu süreçte kullanılması kromozom göçünü engellemediğinden kromozom göçü için itici gücün mikrotübüller olmadığı düşünülmektedir (Longo ve Chen, 1985). Polar cisimciğin atılması mayotik iğ kortekse doğru hareketini ve burada demirlenmesini gerektirir, ki bu hareket için itici güç aktin filamanlardır (Yi ve Li, 2012; Almonacid ve ark., 2014). Mayotik iğ konumlanmasının ardından bölünme çizgisi iğ ipliklerinin hemen yanında belirir (Heidemann ve Kirschner, 1978) ve sitokinezin ardından polar cisimcik atılır (Maro ve Verlhac, 2002). Mayoz I kromozom göçü, oosit polaritesinin kazanılmasında asimetrik hücre bölünmesi için iğ pozisyonunun yanı sıra farklı katkılarda da bulunur. Kortekste F-aktin birikimi ve mikrovillustan fakir bir zonun oluşumu ve miyozin II halkası ile karakterize olan korteksin yeniden şekillenmesini indükler (Deng ve ark., 2007). Yeniden organize olan bu korteks bölgesinde hücre polaritesini düzenlemekten sorumlu “partitioning defective 3” (PAR3) (Duncan ve ark., 2005) RHO (Ras homolog gen) ailesi GTPaz aktif formu olan RAC (Ras-related C3) (Halet ve Carroll, 2007) lokalize olur. Bu bölge polar cisimciğin atılacağı kısımdır. Mayoz I’in ardından mayoz II’ye ait iğ de subkortikal bölgede oluşur ve kromozom yeni bir aktomyozin bileşeninin konumunu belirler. Olgun oosit kortikal polariteyi fertilizasyona kadar korur (Deng ve ark., 2007). Mayoz II geçiren oositlerde kromozom, kortekse olan uzaklığı “small GTPase RAN (“RAS-related Nuclear protein”)’i içeren bir mekanizma ile belirler. Mayotik iğ oluşumu RAN-GTP gradienti/yoğunluk farkı ile sağlanır. Bu gradient kromatin ile

ilişkili olan “regulator of chromosome condensation 1” (RCC1), RAN GEF (“guanine nucleotide exchange factor”) ve RAN’a ilişkin sitoplazmik GTPaz aktive edici protein aracılığıyla kromozomlarda yoğunlaşır (Kalab ve Heald, 2008) (Şekil 2.12).



**Şekil 2.12.** Aktomyozin oluşumunu sağlayan kromatin sinyaline ait olan muhtemel moleküler ağ. Kromatin tarafından oluşturulan RAN ·GTP gradienti RAC GTPaz aktivasyonu sağlar ve RAC GTPaz da WASL’yi (nöral Wiskott–Aldrich sendromu proteininin fare homoloğu) ve ARP2/3 (aktin ile ilişkili protein 2/3) kompleksini aktive eder ve aktin polimerizasyonunu başlatır. Diğer bir yolak ile, RAN·GTP, muhtemelen MLCK (miyozin hafif zincir kinaz) aktivasyonu aracılığı ile miyozin II’nin kortikal lokalizasyonunu uyarır. MLCK’nın da bilinmeyen bir mekanizma ile aktin oluşumunu etkilediği düşünülmektedir. Kesikli çizgiler direkt olmayabilecek etkileşimleri gösterirken, soru işaretleri spekülasyon olan etkileşimleri işaret etmektedir (Li ve Albertini, 2013).

## 2.10. Oositte hücre iskeleti elemanları

Mayotik maturasyon süresince oosit, arada DNA replikasyon fazı içermeyen iki hücre bölünmesi geçirir. Bu bölünmeler oositin hücre iskeleti elemanları tarafından kontrol edilen ve büyük ölçüde zaman bağımlı olan bir dizi hücresel olayı içerir. Mikrotübüller iğ ipliklerini oluşturur ve birinci mayoz bölünmede homolog kromozomları (MI, yarılanma bölünmesi), ikinci mayoz bölünmede kardeş kromatidleri (MII, eşitleme bölünmesi) ayırır. Buna ek olarak iğ mikrotübülleri ve aktin mikrofilamanları bu mayotik bölünmelerin asimetrisini kontrol eder. İki bölünmede de küçük bir polar cisimcik ve polar cisimciğe göre oldukça büyük olan ve boyutunu koruyan ve oogenezi süresince biriken tüm maternal depoyu içeren oosit oluşur. Mitoz süresince iğ düzenlenmesi mikrotübül polimerizasyonunun temel noktaları olan sentrozomlar tarafından geniş bir alana yayılır (Ou ve Rattner, 2004).

Mitozun başlangıcında tek olan sentrozom duplike olur ve iki sentrozom ayrılarak nukleusun zıt noktalarına göç ederler. Bunun bir sonucu olarak, nuklear kılıfın yıkılmasının ardından, her iki sentrozomdan çıkan mikrotübüller kromozomlar ile etkileşime geçer ve hızlı bir şekilde bipolar iğe organize olurlar. Oositte sentrozom yoktur ve mikrotübüller, mikrotübül organize edici merkez (“Microtubule organizing centers” = MTOC) adı verilen sitoplazmanın farklı noktalarında polimerize olurlar. Çok sayıda MTOC’un sitoplazmaya yayıldığı fare oositinde, kromozomlar iğ düzenlenmesinde öncü rol alırlar. GVBD’den hemen sonra, MI başlangıcında MTOClar aktive edilir ve/veya kromozomların yakınına getirilir ve mikrotübüller bu alanda stabilize olurlar. Daha sonra, rastgele düzenlenen gelişen mikrotübüller kromozomların çevresinde bipolar şekilde düzenlenirler.

Bipolar iğ düzeni sağlandığında kromozomlar metafaz plağını oluşturmak üzere iğ ekvatorunda dizilirler. Mitoz süresince bu dizilim, her iki kardeş kromatit ile ilişkili yapılar olan kinetokorlar tarafından düzenlenir. Kinetokorlar mikrotübülleri tutar, stabilize eder ve dirençli bir ‘kinetokor ipliği’ (K-ipliği) oluşturur. K-iplikleri bir kromozomun her iki kinetokorunu zıt iğ kutuplarına çektiğinde, kromozom iğ ekvatoruna taşınır (Biggins ve Walczak, 2003). Fare oositlerinde, birinci mayotik M fazında metafaz plağında bivalent kromozom dizilimi alternatif mekanizmalar içerir. Mitozda tanımlanan durumun aksine, mayoz I M fazında bivalentler ile ilişkili olan kinetokorlar, mikrotübülleri demirlemek ve/veya stabilize etmek için yeterli değildir. Ancak, K-ipliklerinin yokluğunda, bivalent kromozomlar iğ ekvatoruna doğru taşınır ve birkaç saat bu alanda kalır (Brunet ve ark., 1999). İğ mikrotübüllerinin kromozom kollarına itici güç uyguladığı gösterilmiştir. ‘polar rüzgar’ olarak da adlandırılan bu güçler kromatin ile ilişkili mikrotübül motorları ile düzenlenirler (Brunet ve Vernos, 2001).

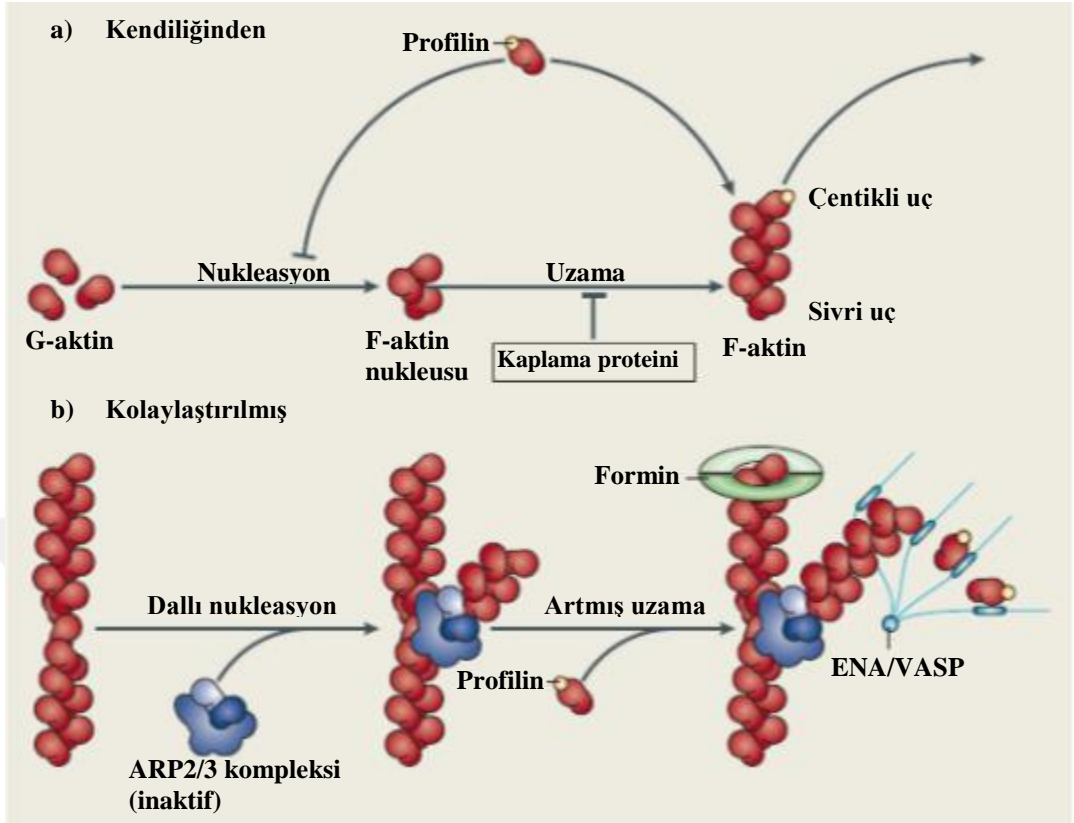
Asimetrik bölünme ile ilgili bilgiler genellikle, iğ konumlanmasının hücre korteksi ve iğ kutuplarını hücre korteksine bağlayan ‘astral’ mikrotübüller ile gerçekleştiği (Cowan ve Hyman, 2004) mitotik hücreler üzerinde yapılan gözlemlere dayanır (Betschinger ve Knoblich, 2004). Oositte sentrozom yoktur ve iğ, astral mikrotübülleri içermez. Fare oositlerinde, diğer türlere ait oositlerde tanımlananın aksine (Weber ve ark., 2004; Yang ve ark., 2005) iğ göçü ve demirleme için

mikrotübüller değil aktin mikrofilamanlar gereklidir. Fare oositlerinde bu süreçler, mikrofilamanlar ve kromozomların etkileşimlerine bağlıdır (Verlhac ve ark., 2000), ancak bu etkileşimlerin moleküler temeli henüz tam olarak bilinmemektedir. Aktin ile ilişkili motor protein olan miyozinII'nin polar cisimcik oluşumunda rol oynayarak sürece katkısı olduğu düşünülmektedir (Simerly ve ark., 1998).

Fare oositlerinde için eksentrik konumlanması oosit korteksinin lokal reorganizasyonu ile ilişkilidir. Bu kortikal domain, iğ göçü sırasında ortaya çıkar ve MII süresince iğ üzerinde tutulur. Reorganizasyon, mikrovillusların lokal olarak kaybolması (Johnson ve ark., 1975), aktin mikrofilamanlarının plazma membranının altında birikmesi (Longo ve Chen, 1985) ve kortikal granüllerin atılması (Deng ve ark., 2005) ile karakterizedir.

### **2.11. Aktin yapısı ve özellikleri**

42-kDa'luk bir protein olan aktin monomeri, çift zincirli helikal bir aktin filamanını oluşturmak için en temel birimdir (Holmes ve ark., 1990; Kabsch ve ark., 1990). Aktin nukleasyonu, aktin dimer ve trimerlerinin oluşumu ve yoğunlaşmasıdır. Aktin filaman düzenlenmesinin kinetiği, nukleasyon aşaması ile termodinamik olarak sınırlanır (Sept ve ark., 1999). Trimerler oluşur oluşmaz, mevcut aktin monomerlerinin konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak hızlı bir şekilde uzamaya başlarlar (Wegner ve Engel, 1975). Aktin monomerlerinin filaman uçlarındaki polimerizasyonunu takiben filaman içerisindeki aktin altünitelerine bağlı ATP'nin  $0,3 \text{ s}^{-1}$  hızında hidrolizi ve  $0,002 \text{ s}^{-1}$  hızında fosfat ayrışması gerçekleşir (Blanchoin ve Pollard, 2002). Buna ek olarak, aktin monomerleri, kalsiyum ve magnezyum gibi divalent katyonları bağlar ve bağlanmış katyonun özelliği polimerizasyon dinamiklerini etkiler (Blanchoin ve Pollard, 2002).  $\text{Mg}^{2+}$ 'un hücrel konsantrasyonları milimoların üzerinde olduğundan, fizyolojik koşullar altındaki aktin monomerleri MgATP ile yüklüdür (Pollard ve ark., 2000). Blanchoin L. ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Blanchoin ve ark., 2014) aktin filamanlar, sağa dönük helikal burğu şeklinde, çentikli ve sivri uç olarak adlandırılan dinamik olarak farklı iki ucu bulunan polar polimerlerdir. Çentikli uç, aktin filamanının daha dinamik olan ucudur ve  $11,6 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 'lik bir hız ile sivri uca göre 10 kat daha hızlı uzar (Pollard, 1986).



**Şekil 2.13.** Aktin polimerizasyonunun şematik gösterimi. G-aktin, çiftli heliks içerisinde organize olan, birbirine dolanmış iki protofilamandan oluşan F-aktin polimerlerine polimerize olur. Aktin filamanları polardır ve çentikli uç sivri uçtan daha hızlı büyür. a) Nukleasyon, yeni aktin filamanlarının oluşum sürecidir ve filaman uzamasına öncüllük etmektedir. Uzunlaşabilen uçları olan bir filaman nükleusu oluşturmak için üç G-aktin monomeri biraraya gelmelidir. Aktin filamanlarının kendiliğinden uzaması G-aktin monomerlerinin eklenmesi ile gerçekleşir ve kaplama olarak adlandırılan bir işlem ile heterodimerik bir kaplama proteini tarafından bloke edilir. b) Nükleusun oluşumu aktin polimerizasyonunda hız sınırlayıcı bir aşamadır ve çok sayıda nükleasyon yapan protein tanımlanmıştır: aktin filaman nükleasyonu yapabilen ve bu filamanların uzamasını sağlayabilen forminler; tekrarlayan WH2 motifleri içeren ve monomerik aktine bağlanabilen WH2 aktin nükleasyonu sağlayıcıları ve ARP2 (aktin ile ilişkili protein 2) ve ARP3'ü içeren ARP2/3 protein kompleksi. Aktive edildiğinde ARP2/3 kompleksi önceden var olan aktin filamanına bağlanır ve ARP2 ve ARP3'ü biraraya getirecek bir konformasyonel değişiklik geçirir. Bu değişiklik aktin filamanının uzayabildiği çentikli ucu taklit eder. Yeni aktin filamanı, daha önceden var olan aktin filamanına sivri ucu aracılığı ile bağlanır ve ARP2/3 dallanmış bir aktin ağı oluşturur. Aktin filamanlarının uzaması, çentikli uçları kaplama proteininden koruyan iki sınıf protein tarafından kolaylaştırılır ve hızlandırılır: ENA/VASP proteinleri ve forminler. Her iki protein sınıfı da F-aktin'in uzaması için profilin bağlı G-aktin'i alır (profilin, G-aktin üzerinde ADP'den ATP dönüşümünü sağlar ve polimerizasyon için G-aktini yeterli hale getirir). Profilin-aktin kompleksi filamanların nükleasyonunu kendiliğinden sağlayamaz ve sivri uçları uzatamaz. Ancak ENA/VASP proteinleri ve forminler ile çentikli uçları uzatabilir. Kofilin, filamanları depolimerize eder ve aktin moleküllerinin yıkılmasını destekler (Krause ve Gautreau, 2014).

Aktin filamanlarının polimerizasyonu ve aktin regülasyon proteinleri ile ilişkileri çok farklı aktin mimarilerinin oluşmasını sağlar. Aktin polimerizasyonu termodinamik olarak elverişsizdir; ancak oligomerler oluştuğunda spontan aktin

düzenlenmesi, aktin monomeri ‘kritik konsantrasyon’ olarak adlandırılan noktanın (örneğin 0.1 $\mu$ M) üzerindeyse çentikli uçlarda gerçekleşebilir (Pollard ve ark., 2000).

Aktin monomer bağlayıcı bir protein olan profilin, aktin homeostazında önemli bir rol oynar (Pollard ve ark., 2000). Profilin, yeni aktin filamanlarının nukleasyonu için yapı taşları olan aktin dimer veya trimerlerinin spontan oluşumunu inhibe ederek fonksiyon görür (Pollard ve ark., 2000). Profilin ile kompleks oluşturan aktin monomerleri yalnızca hücrel nukleasyon faktörleri ile katalize edilen de novo aktin oluşumu için kullanılabilir. Bu faktörler WASP/WAVE (“Wiskott–Aldrich syndrome protein/ WASP family verprolin-homologous protein”) ailesi proteinleri tarafından aktive edilen aktin ile ilişkili protein 2/3 (actin-related protein 2/3= ARP2/3) kompleksi, ve forminlerdir (Şekil 2.13). Profilin, formin varlığında filamanların hızlı bir şekilde uzaması için kilit bir moleküldür: aktin filamanının serbest çentikli uçları 10 $\mu$ M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> hızında uzarken, formin/profilin ikilisi bu uzama hızını 90 $\mu$ M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>'e kadar artırır (Higashida ve ark., 2004).

## 2.12. Aktin nukleasyonundan sorumlu proteinler

Kromozom sinyalinin hücre iskeletindeki hedeflerinden biri ARP2/3 komplekstir (Sun ve ark., 2011). Dallanmış aktin ağının Arp2/3 kompleks varlığında polimerizasyonu çok yönlüdür ve *in vivo*'da dallanma oluşumunun kinetiğinin ayarlanması için çoklu bir kilit mekanizma gereklidir (Higgs ve Pollard, 1999). Tüm süreç, Arp2/3 kompleksi ile etkileşim halindeki önceden var olan bir filament ya da “primer” ile başlatılır (Machesky ve ark., 1999). ARP 2/3 aktivasyonu sağlayan iki sinyal yolağı vardır: Bunlardan biri CDC42 ve “nöral WASP” (N-WASP) ‘i içerirken, diğeri RAC ve WAVE’i kullanır. CDC42 ve RAC, çeşitli sinyallere cevaben aktin nukleasyonu sağlayan RHO-tip GTPazlar iken, N-WASP ve WAVE, ARP2 /3’ü doğrudan aktive eden NPF (“nucleation promoting factors”) içeren aynı WCA domain ailesine aittir (Pollard, 2007). Tüm NPF’lerin Arp2/3 aktive edici domainlerinin bir özelliği, Arp2/3 kompleksi bağlayıcı motifinin NH2 terminali olan WASP Homoloji (WH2) domaininin varlığıdır. WH2 domainleri, monomerik aktine bağlanan ve aktin filaman nukleasyonu gibi görevleri olan kısa domainlerdir (30-50 amino asit) (Husson ve ark., 2010). Hem RAC1 hem de WASL (N-WASP’ın fare homoloğu – “Wiskott-Aldrich syndrome like”) kortikal bölümde yer alır ve

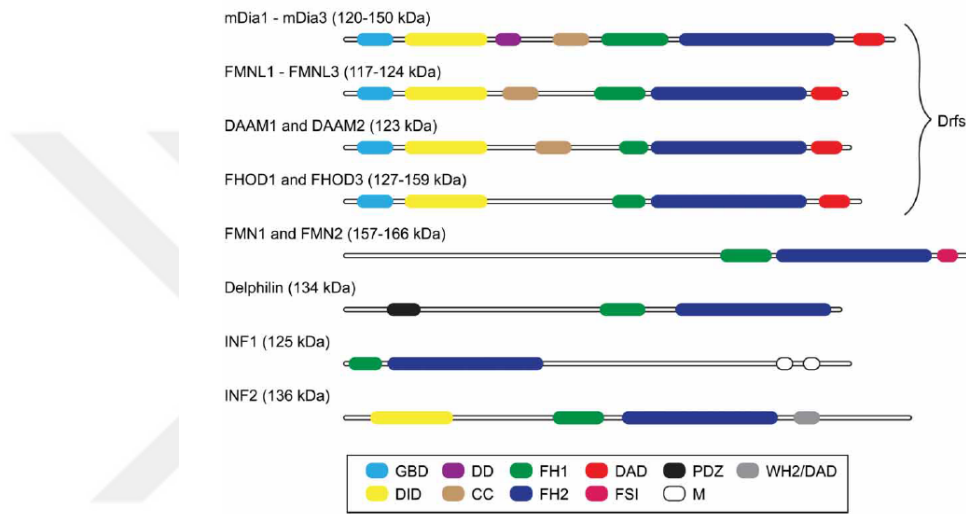


inhibisyonları, ARP2/3 kompleksinin aktivasyon bozukluğuna bağlı olarak mayoz II iğinin konumlanmasında hatalara yol açar (Yi ve ark., 2011). CDC42 ve WASF2 (WAVE2'nin fare homoloğu – “WAS Protein Family Member”) ise daha çok iğ veya kromozom bölgesinde yer alır ve her ikisinin inhibisyonu hem iğ defektlerine hem de kromozom göçünün engellenmesine yol açar (Na ve Zernicka-Goetz, 2006). Kromozomların kortikal polariteyi indklemesinde miyozin hafif zincir kinaz (Deng ve ark., 2005), FYN Tyr kinaz (Luo ve ark., 2009) ve hücre siklusunun temel düzenleyicisi olan Ser/Thr kinaz MOS 'un (Deng ve ark., 2005) da görevleri vardır. Bu moleküler düzenleyicilerin etki ettikleri noktaların ve bu moleküller arasındaki iletişim ağının tam olarak belirlenmesi gerekmektedir.

Paralel aktin demetleri oluşturmak için alternatiflerden biri de formin proteinleridir (Chesarone ve ark., 2010). Forminler, aktin oluşumu için birlikte çalışan formin homoloji 1 ve 2 (FH1 ve FH2) domainlerinin varlığı ile karakterize olan geniş bir protein ailesidir (Chesarone ve ark., 2010). FH1 domaini profilin-aktin molekülleri için bir kement olarak işlev görürken, FH2 domaini aktin filamanlarının sivri ucu ile ilişkilidir (Chen ve ark., 2012). Birçok formin için FH2 domaini, filamanlar uzadıkça büyüyen sivri uçlara bağlı kalır ve formini ilerleyen bir uzama makinası haline getirirler (Higashida ve ark., 2004). Bazı durumlarda forminler aktin oluşumu için Arp2/3 kompleksi veya tümör supresör APC ile birlikte çalışırlar (Breitsprecher ve ark., 2012).

Forminler isimlerini memelilerde tanımlanan ilk formin geninden (fmn1) alırlar (Mass ve ark., 1990). Isogai T. ve arkadaşlarının derlemelerinde belirtildiği gibi (Isogai ve Innocenti, 2016) formin ailesi hem çok hücreli hem de tek hücreli ökaryotlarda çok sayıda proteini ve memelilerde 15 farklı proteini içerecek şekilde genişlemiştir. Tüm forminler bir FH1 domaini ve fonksiyonel bir birim oluşturmak üzere bu domainin yanında yer alan bir FH2 domaini içerirler (Castrillon ve Wasserman, 1994). Forminlerin FH1–FH2 bölgesi aktinin polimerizasyonunu katalize eden ve komşu bölgelerinin de yardımıyla mikrotübül stabilizasyonu sağlayan bölgesidir (Gaillard ve ark., 2011). Diaphanous-ilişkili forminler (Drf) (Kuhn ve Geyer, 2014), protein-protein ve protein-lipid etkileşimleri ile FH1–FH2 aktivitesini kontrol eden düzenleyici bileşenlere sahiptir (Aspenstrom, 2010). İki iyi

karakterize edilmiş düzenleyici bileşen Diaphanous inhibitör ve Diaphanous otoregülatör domainlerdir (sırasıyla DID ve DAD). Diğer formin ailesi üyeleri de FH1–FH2 modülü ile işbirliği içinde veya bu modülden bağımsız olarak aktin dinamiklerini kontrol eden domainler içerir (Ramabhadran ve ark., 2013) (Şekil 2.14). Forminler mitokondriyal füzyonu (Hatch ve ark., 2014), vezikül trafiğini ve membranın dışarı doğru uzanmasını düzenler, asimetrik hücre bölünmesi ve yönlendirilmiş hücre göçü için polaritenin oluşturulması ve korunmasını kontrol eder (Goode ve Eck, 2007).



**Şekil 2.14.** 8 formin alt ailesinde toplanan 15 memeli formininin multi-domain organizasyonunun şematik gösterimi. GBD, GTPaz-bağlayıcı domain; DID, Diaphanous inhibitör domain; DD, dimerizasyon domaini; CC, coiled-coil region; FH1, formin homoloji domain 1; FH2, formin homoloji domaini 2; DAD, Diaphanous otoregülatör domain; FSI, Formin–Spire etkileşim domaini; PDZ, postsynaptic density 95; Discs large, Zona occludens-1 domain; M, microtubule-bağlayıcı domain; WH2/DAD, WASP homoloji 2-benzeri domain/DAD. Tahmin edilen moleküler ağırlık veya ağırlık aralıkları altaile adının hemen yanında belirtilmiştir (kDa) (Isogai ve Innocenti, 2016).

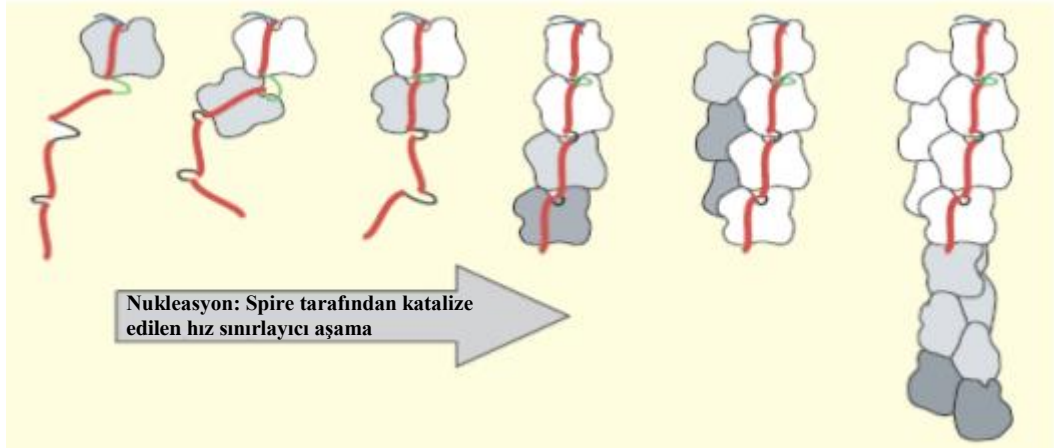
Aynı zamanda sitozoldeki sinyal iletimini ve nukleustaki gen transkripsiyonunu etkiler (Olson ve Nordheim, 2010). Son yıllarda yapılan çalışmalar forminlerin hücre siklusu ve apoptoz ile ilişkili fonksiyonlarının olabileceğini göstermiştir (Yamada ve ark., 2013). Ayrıca, hem omurgasız hem de memeli forminleri embriyonik gelişim ve doku homeostazına katkıda bulunurlar (Randall ve Ehler, 2014). Forminlerin aktivitesini ve ekspresyonunu etkileyen germ hücre mutasyonları ve somatik mutasyonlar çok sayıda kalıtsal hastalık ve kanser ile ilişkilidir (Randall ve Ehler, 2014).

Formin 2 (FMN2) ve Cappuccino (FMN2'nin Drosophila homoloğu), Rho-GTPaz bağımsız FMN ailesinin birer üyesi olan forminlerdir (Bor ve ark., 2012). *FMN2*, *FMN1* geni ile özellikle korunmuş formin tekrar domaini ile homoloji gösterdiği için bu şekilde isimlendirilmiştir. FMN2'de bu formin tekrar bölgesi proteinin orta kısmından C terminaline kadar mevcuttur. Formin domainleri hücre iskeletindeki aktin filamanlarının nukleasyonu için gereklidir (Faix ve Grosse, 2006).

FMN2 insanda tanımlanan 15 formin proteininden biridir. Tanımlanması katalitik aktin nukleasyonu sağlayıcı ve polimerize edici FH2 domaininin varlığına dayanır (Schonichen ve Geyer, 2010). FMN2 ek olarak DEP (Dishevelled, Egl-10 ve Pleckstrin) domainini de kodlar, bu nedenle G-protein ile ilişkili reseptör sinyalinde de bir rolü olduğu düşünülür. Bunun yanında prolinden zengin bir FH1 domaini, aktin nukleasyonunda görevleri olan bir Formin-Spire1 etkileşim ("Formin-Spire interaction" =FSI) domaini (Zeth ve ark., 2011) ve muhtemelen aktivitesini düzenlemekle görevli olan çok sayıda fosforilasyon bölgesi içerir. *Fmn2*'nin 18 eksonu vardır, 3 major izoformu kodlar ve aktin hücre iskeleti organizasyonu ve hücre polaritenin oluşturulmasında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. *Fmn2* ekspresyonu ağırlıklı olarak gelişen ve olgun beyinde görülse de (Leader ve Leder, 2000) *Fmn2* "knockout" fareler herhangi bir majör defekt olmaksızın hayatta kalırlar ve aynı batındaki diğer yavrular ile karşılaştırıldıklarında beyinlerinde büyük ölçüde ya da histolojik olarak fark gözlenmez (Leader ve Leder, 2000).

*Fmn2* <sup>-/-</sup> germ hücre hattı dışı mutant farelerde düşük fertilitite oranı, oogenez süresince metafaz içinin anormal yerleşimi ve anormal birinci polar cisimcik oluşumu gözlenir ancak erkeklerde bunlara karşılık gelen herhangi bir defekt görülmez (Leader ve ark., 2002).

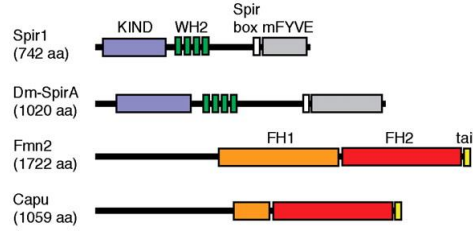
Spire ilk olarak Drosophila embriyogenezini etkileyen maternal bir faktör olarak tanımlanmıştır (Theurkauf, 1994). Spire, aktin nukleasyonu aktivitesi için gerekli olan 4 adet WH2 domainine (Paunola ve ark., 2002) ve monomerik aktin bağlayıcı motiflere sahiptir (Quinlan ve ark., 2005) (Şekil 2.15).



**Şekil 2.15.** Spire tarafından gerçekleştirilen aktin nukleasyonunun muhtemel mekanizması. Spire'daki dört ardışık WH2 domaini (kırmızı) dört ATP-aktin monomerini bağlar ve yeni aktin polimerizasyonuna köken oluşturacak yeni bir tek zincirli aktin tetrameri oluşturur. Daha çok karboksil terminal içeren WH2 domaini ve araya giren bağlayıcı bölge (yeşil halka) bu olayı başlatır ve yeni oluşan filamanın çentikli ucunu kapatır (mavi halka). Daha sonra, tek zincirli bir polimer oluşturmak üzere ek ATP-aktin monomerleri seçilir. Bu tek zincirli polimer, çift zincirli forma dönüştükten sonra hızlı 'çentikli uç' aktin filaman uzaması için uygun bir substrat haline gelir. En son eklenen ATP-aktin monomerleri gri ile gösterilmiştir (Baum ve Kunda, 2005).

WH2 domainine ek olarak, N-terminal bölgesinde yer alan ve FMN2 veya cappuccino'nun C-terminali ile etkileşen bir kinaz non-katalitik C-lob domainine (KIND) sahiptir (Pechlivanis ve ark., 2009). C terminal bölgesinde ise çinko parmak domaini ve modifiye olmuş FYVE domainleri yer alır (Kerckhoff ve ark., 2001) (Şekil 2.16). Farede Spire'ı kodlayan 2 genin, *Spire1* ve *Spire2*'nin "knockdown" edilmesi, *Fmn2* "knockdown" fenotipine benzer şekilde (Dumont ve ark., 2007) farede oosit maturasyonunu ve aktin ağı oluşumunu bozar (Pfender ve ark., 2011). FMN2 ve Spire arasındaki evrimsel olarak korunmuş protein-protein etkileşimine ve *Drosophila*'daki (Quinlan ve ark., 2007) ve fare oositlerindeki (Pfender ve ark., 2011) kolokalizasyonlarına dayanarak, FMN2 ve Spire'in hem *Drosophila* hem de memelilerde oogeneze aktin nukleasyonu için tek bir birim olarak işlev gördükleri düşünülmektedir. *In vitro*'da Spire proteininin zayıf aktin nukleasyon aktivitesi vardır ancak bu aktivite Cappuccino ile etkileşim sonucu anlamlı şekilde artar (Quinlan ve ark., 2007). Formin ailesi proteinler dimer şeklinde olduklarından ve Spire'in WH2 domaininin yapay dimerizasyonu *in vitro* aktin nukleasyon aktivitesini anlamlı derecede artırdığından (Namgoong ve ark., 2011) ve Spire'in bağlanması ile FMN2/cappuccino'nun nukleasyon aktivitesi inhibe edildiğinden (Montaville ve

ark., 2014) Spire'm FMN2 ile ilişkili olarak aktin nukleasyonunda yalnızca in vivo'da görev yaptığı düşünülmektedir. FMN2 ile etkileşiminin dışında, Spire ile ilgili düzenleyici mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır.



**Şekil 2.16.** Spire ve Fmn2/Capu. KIND şematik gösterimi. Capu kuyruğu Capu aktivitesi ve Spire-KIND bağlanması için gereklidir. kinaz katalitik olmayan C-lobe domaini(mavi); WH2, Wiscott-Aldrich homoloji-2 motif (yeşil); Spir box (beyaz); mFYVE, modifiye Fab1/YOTB/Vac1/EEA1 çinko bağlayıcı domain (gri); FH1, formin homoloji-1 (turuncu); FH2, formin homoloji-2 (kırmızı); kuyruk (sarı) (Vizcarra ve ark., 2011).

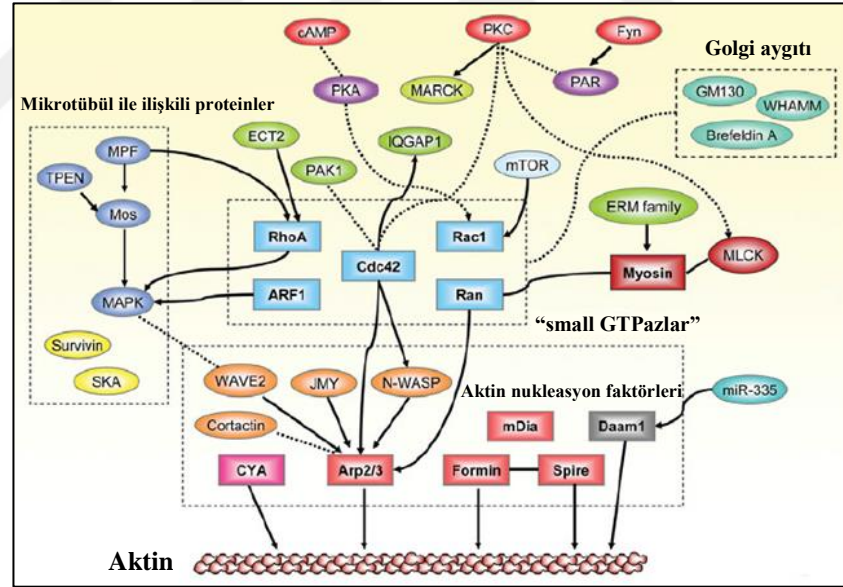
Spire'da olması muhtemel olan bir rab-bağlayıcı domain'in varlığına ve Spire'in fare oositlerinde veziküllerde ve kortekste RAB11A (Ras ile ilişkili protein) ve FMN2 ile kolokalizasyonuna dayanarak (Schuh, 2011), Spire'in RAB11A ile etkileşimde bulunarak veziküllerde lokalize olabileceği düşünülmektedir. Dominant-negatif RAB11A ekspresyonu fare oositlerinde iç göçünü ve aktin ağı oluşumunu bozduğundan (Holubcova ve ark., 2013), veziküllerdeki Spire lokalizasyonunun Spire aktivitesini düzenleyen ve sitoplazmik aktin ağını oluşturan bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir (Namgoong ve Kim, 2016).

### 2.13. FMN2, Spire-1, Spire-2'nin oosit kromozom göçündeki rolleri

ARP 2/3 sinyaline ek olarak, formin protein ailesinin bir üyesi olan ve aktin nukleasyonunda görevli bir protein olan FMN2'nin de mayotik kromozom göçünde önemli bir rolü olduğu belirlenmiştir (Leader ve ark., 2002). FMN2, GVBD'den önce kortekste sınırlı kalırken (Schuh ve Ellenberg, 2008), kromozom göçünden önce kortikal lokalizasyonuna ek olarak mayoz I için periferinde yoğunlaşır (Li ve ark., 2008). Kortikal FMN2'nin sitoplazmik bir F-aktin ağı oluşumuna aracılık ettiği düşünülmektedir (Azoury ve ark., 2011). Aynı zamanda sitoplazmik FMN2'nin ER vezikülleri ile ilişkili olduğu ve bu sitoplazmik FMN2 havuzunun iç periferinde aktin nukleasyonunda gerekli olduğu belirlenmiştir. FMN2, RHO GTPaz bağlayıcı domain

içerip içermediği bilinmediğinden, FMN2'nin doğrudan GTPazlar ile kontrol edildiği şüphelidir (Yi ve ark., 2013).

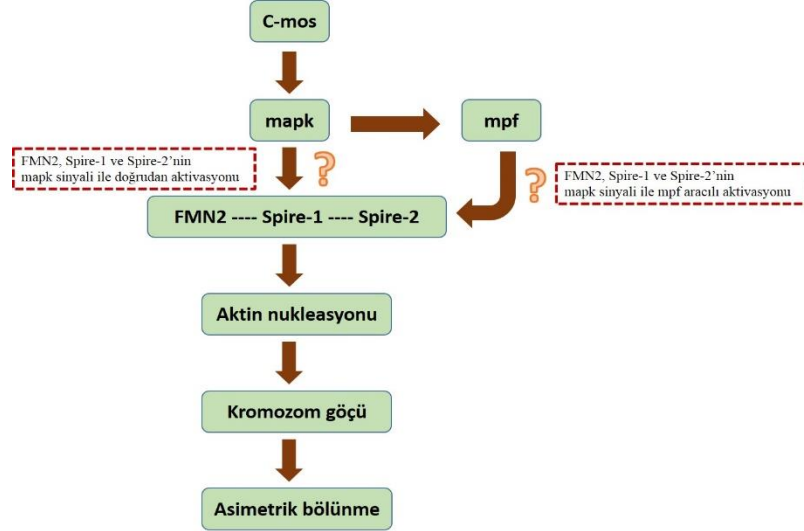
Aktin polimerize edici diğer bir protein olan Spire'in fare oositlerinin asimetrik bölünmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Pfender ve ark., 2011). Memeli oositlerinde Spire-1 ve Spire-2 'nin FMN1 ve FMN2'ye bağlandığı bilinmektedir (Vizcarra ve ark., 2011). Spire, polar cisimciğin atılmasında da rol oynar (Verlhac ve ark., 2000). Spire ve FMN2 ile ilgili kolokalizasyon çalışmaları, fare oositlerinde bu moleküllerin birlikte görev yaptığını göstermektedir (Pfender ve ark., 2011). Fare oositlerinde Spire-1 ve Spire-2 birlikte inhibe edildiğinde asimetrik iğ konumlanması başarısız olmuştur. Spire-1 ve -2'nin birlikte inhibe edildiği oositlerde FMN2 'nin aşırı ekspresyonu aktin yoğunluğunu değiştirmemiştir. Benzer şekilde FMN-2 "knockout" oositlerde Spire-1 ve -2'nin aşırı ekspresyonu aktin yoğunluğunu değiştirmemiştir. Aktin nukleasyonu için Spire-1 ve -2, FMN2 ile birbirine bağımlı moleküllerdir (Pfender ve ark., 2011) (Şekil 2.17).



**Şekil 2.17.** Memeli oositi asimetrik bölünmesine ilişkin bilinen düzenleyiciler ve bunlara ait sinyal yolları. Aktin nukleasyon faktörleri (N-WASP, JMY, WAVE2, cortactin, CYA, Arp2/3 kompleks, formin, mDia, and Spire), oositlerde aktin oluşumuna doğrudan katılırlar. "small GTPazlar" (RhoA, Rac1, Ran, Cdc42, ve ARF1) ise aktin nukleasyon faktörlerini aktive etmek üzere sinyal yolağının üst basamaklarında yer alırlar. Mikrotübül ile ilişkili proteinler (MPF, TPEN, Mos, MAPK, Survivin, SKA), "small GTPazlar" ve nukleasyon uyarıcı faktörler ile etkileşebilirler. Kesikli çizgiler farklı modellerde tanımlanan sinyal yollarını gösterir (Sun ve Kim, 2013).

FMN2'nin düzenleyicilerinden biri olduğu düşünölen Mos'un oosit maturasyonundaki etkisi ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, Mos "knockout" fare oositlerinde anormal derecede büyük polar cisimcik atılımı ve partenogenez gerçekteği (Verlhac ve ark., 2000), ancak yabancı tip fare oositlerinde GV aşamada Mos "antisense" oligonukleotit (MosAS) (Paules ve ark., 1989) enjeksiyonunun PBE'yi önlediği görölmektedir. MEK aktivitesinin GV aşamada MEK inhibitörü U0126 ile inhibe edilmesi fare ve domuz oositlerinde PBE'yi kalıcı olarak önler (Amiel ve ark., 2009). Ancak, fare oositlerinde GVBD'nin ardından MEK inhibisyonu yapılması sonucu; normal polar cisimcik, büyük polar cisimcik, kromozom içermeyen polar cisimcik atılımı veya polar cisimcik atılmaması gibi farklı sonuçlar elde edilmiştir (Lee ve ark., 2007). Omurgasız oositlerinde Mos–MAPK–p90Rsk sinyal yolağının PBE için gerekli olduğu ve bu yolak ile Dia forminlerin bir bağlantısı olduğu belirlenmiştir (Ucar ve ark., 2013). *Drosophila* oogenezi süresince Spire-1 ve FMN2 etkileşiminin olduğu ve bu etkileşimin Spire'a ait kinaz katalitik olmayan C-lob domain ve formine ait C-terminal kuyruk ile gerçekteği belirlenmiştir (Vizcarra ve ark., 2011).

Fare oositlerinde asimetrik bölünme sağlayan aktin nukleasyonunu FMN2, Spire-1 ve Spire-2'nin sağladığı bilinse de bu proteinlerin miktar ve lokalizasyonunu etkileyen mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu çalışma kapsamındaki hipotezimiz: Fare oositlerinde FMN2, Spire-1 ve Spire-2'nin miktar ve lokalizasyonunun MAPK sinyali tarafından doğrudan ya da MPF aracılı olarak dolaylı şekilde etkilenir (Şekil 2.18).



**Şekil 2.18.** Fare oositlerinde kromozom göçü ve asimetrik bölünme sağlayan aktin nukleasyonunu etkileyen muhtemel mekanizmalar.

Bu hipotez doğrultusunda, fare oositlerinde IVM sürecinde MEK inhibisyonunun ve PKA inhibisyonu ile gerçekleşen MPF aktivasyonunun birinci mayoz bölünme sırasında aktin nukleasyonu sağlayan FMN2, Spire-1 ve Spire-2'nin miktar ve lokalizasyonları üzerine olan etkisinin ve MAPK'ın bu proteinler ile etkileşiminin MPF aracılı olup olmadığının belirlenmesi amaçlanmıştır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Fare Ovaryumundan Germinal Vezikül (GV) Oosit Eldesi ve in vitro Maturasyon (IVM)

##### Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- **CO<sub>2</sub> Kafesi**
- **Stereomikroskop:** Zeiss (Oberkochen, Almanya), Stemi SV-11-APO
- **CO<sub>2</sub> İnkübatör:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #3308
- **Su banyosu:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #1300 A2
- **Gebe Kısrak Serum Gonadotropini (“Pregnant Mare’s Serum Gonadotropin” = PMSG):** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #G4527.
- **%0,9 Sodyum Klorid Solüsyonu:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #S 8776.
- **Hyaluronidaz:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #H4272. 1 vial hyaluronidaz 3mL M2 medyumunda çözdürüldü ve 10 mg/mL stok solüsyon elde edildi. Stok solüsyon, son konsantrasyon 300 µg/ml olacak şekilde M2 medyumunu kullanılarak seyreltili.
- **3-Izobutil-1-metilksantin (IBMX):** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #I5879. 0,2 mM olacak şekilde DMSO içerisinde çözdürüldü.
- **Dimetilsülfoksit (DMSO):** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), 276855
- **M2 Medyumu:** EMD Millipore, (Billerica, MA, ABD), #MR-015-D
- **M16 Medyumu:** EMD Millipore, (Billerica, MA, ABD), #MR-016-D
- **Mineral Yağ:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #M5904

Johns Hopkins Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi’nden elde edilen 3-5 haftalık BalbC dişi farelere ovaryum folikül aktivasyonu amacıyla yukarıda 5IU PMSG enjeksiyonu yapıldı. 1 vial PMSG, 1 ml % 0,9 Sodyum Klorid Solüsyonu içerisinde konsantrasyon 50 IU/mL olacak şekilde çözdürüldü. Farelere 0,1 mL (5 IU) intraperitoneal olarak enjekte edildi. PMSG enjeksiyonunun ardından folikül aktivasyonunun optimum şekilde sağlandığı düşünülen 48 saat sonunda farelere CO<sub>2</sub> inhalasyonu ile ötanazi uygulandı.

**CO<sub>2</sub> ile ötanazi tekniği:** Gaz tüpünden CO<sub>2</sub>'nin akım hızı başlangıçta CO<sub>2</sub> odacığının hacminin dakikada %10-30'unu dolduracak şekilde ayarlandı. Bu şekilde CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun yavaş bir şekilde artışı sağlanarak ani ve sert CO<sub>2</sub> uygulamasından kaçınıldı. Gaz seviyesi %40-50'ye ulaştığında farelerde baygınlık oluşmaya başladığı ve doğrultma refleksinin ("righting reflex") kaybolduğu gözlemlendi. Bu noktadan sonra CO<sub>2</sub> akım hızı artırılarak kafesin daha hızlı bir şekilde CO<sub>2</sub> ile dolması ve ölüm için geçen zamanın azalması sağlandı. Respiratuvar duraklamadan sonra bir dakika daha CO<sub>2</sub> akımı devam ettirildi. Gazın kesilmesinin ardından fareler tüm kas aktivitesi durana ve tüm hayat belirtileri kaybolana kadar en az 30 sn süre ile gözlemlendi. Ölümün kesin olarak sağlanması için sekonder fiziksel yöntem olarak farelere servikal dislokasyon uygulandı.

**Oosit eldesi ve IVM:** Farelerin karın ön duvarı, steril koşullarda açılarak ovaryumları alındı ve önceden 37<sup>0</sup>C'ye getirilen su banyosunda bekletilmiş olan 0,2 mM IBMX içeren M2 medyumu içerisine aktarıldı. Steromikroskop altında olgun antral foliküller belirlenerek, bu foliküller içerisindeki GV oositler insülin iğnesi yardımıyla foliküllerden izole edildi. İzole edilen GV oositlerin çevresinde yer alan kumulus ve granuloza hücreleri hiyaluronidaz uygulaması (5 dk. 37<sup>0</sup>C, %5 CO<sub>2</sub>) ile uzaklaştırıldı. GV aşamadaki oositler ağız pipeti ile IBMX içeren M16 *in vitro* maturasyon kültür medyumu içerisine aktarıldı. 50 µL damlacıklar şeklinde petri kabına konan kültür medyumunun kurummasını engellemek üzere üzerini örtecek şekilde mineral yağ eklendi. IBMX içeren medyumda GV oositler 3 saat süre ile 37<sup>0</sup>C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültüre edildi. 3 saatin sonunda GV oositler olgunlaştırılmak üzere IBMX içermeyen M16 medyumu içerisine aktarıldı. Maturasyonun farklı aşamasındaki oositler deneysel parametreleri uygulamak üzere kültür ortamından toplandı.

**0. saat:** GV oositler

**2. saat:** GVBD oositler

**5. saat:** İğ oluşumu gerçekleşmiş olan oositler

**7. saat:** Kortikal bölgeye kromozom göçü gerçekleşmiş olan oositler

**9. saat:** Birinci mayoz bölünmeyi tamamlamış ve 1. polar cisimcik atılımını ("polar body extrusion" = PBE) gerçekleştirmiş olan oositler

Kontrol grubunda fare oositlerinin maturasyon evrelerinin belirtilen saatler ile uyumlu olduğu görölse de, inhibitör uygulamalarında uygulanan inhibisyona bağlı olarak bu sürelerin daha kısa ya da daha uzun olabildiği görölmüştür. Bu nedenle değerlendirmeler yapılırken oositlerin maturasyon aşaması dikkate alınmıştır. Oositlerin GVBD ve PBE oranları belirlenmiştir.

### 3.2 IVM Sırasında Oositlerde MEK İnhibisyonu

#### Kullanılan Kimyasallar

- **PD98059:** Cell Signaling Technology (Danvers, MA, ABD) #9900
- **DMSO:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #276855

MEK proteinini gelişmekte olan oositlerde inhibe etmek üzere IVM sırasında MEK spesifik kimyasal inhibitör PD98059 uygulandı. IVM medyumuna etkin inhibitör dozu belirlemek üzere literatürde daha önce uygulandığı belirlenen dozlarda inhibitör eklendi (LaRosa ve Downs, 2005). IVM süresince, oositlerin IBMX içermeyen M16 kültür medyumuna alınmasını takiben 2 saat süresince 10µM, 25µM ve 50µM dozlarda PD98059 uygulaması yapıldı. İnhibisyonun etkinliğinin belirlenmesi için, MEK proteininin fosforile ettiği hedef proteini olan ERK1/2 proteininin fosforile formunun oositlerdeki miktarı western blot yöntemi ile belirlendi. Aynı zamanda ERK1/2 proteininin total formunun oositlerdeki miktarı da belirlendi. Western blot sonuçlarına göre ERK1/2 proteininin fosforile formunun miktarının en fazla düşüş gösterdiği 50µM'lık doz optimal doz olarak belirlendi.

### 3.3. IVM Sırasında Oositlerde PKA İnhibisyonu ile MPF Aktivasyonu

#### Kullanılan Kimyasallar

- **H89:** Cell Signaling (Danvers, MA, ABD), #9844
- **DMSO:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #276855

Gelişmekte olan oositlerde MPF aktivasyonu, IVM sırasında PKA'nın kimyasal inhibitörü H89 kullanılarak gerçekleştirildi. Etkin inhibitör dozu belirlemek üzere IVM medyumuna literatürde daha önce uygulandığı belirlenen dozlarda H89 eklendi (Mishra ve Joy, 2006). IVM süresince oositlerin IBMX içermeyen M16 kültür medyumuna alınmasını takiben 2 saat süresince 0,1µM, 5µM ve 10µM dozlarda H89

uygulaması yapıldı. İnhibisyonun etkinliğini değerlendirmek için PKA'nın fosforilasyon hedefi olan fosforile CREB proteininin miktarı western blot yöntemi ile belirlendi. Ayrıca CREB proteininin total formunun oositlerdeki miktarı da belirlendi. Western blot sonuçlarına göre CREB proteininin fosforile formunun miktarının en fazla düşüş gösterdiği 10 $\mu$ M'lık doz optimal doz olarak belirlendi.

MAPK sinyalinin aktin nukleasyonu sağlayan proteinler ile olan ilişkisinin MPF aracılı olup olmadığının test edilebilmesi için IVM sırasında her iki inhibitör aynı anda optimal dozlarında uygulandı. Kontrol grubunda inhibitör çözgen maddesi olarak kullanılan DMSO uygulandı.

### Deney Grupları:

- 1) Çözgen Grubu (Kontrol)
- 2) MEK İnhibisyon Grubu (PD98059)
- 3) MPF Aktivasyon Grubu (H89)
- 4) MEK İnhibisyon + MPF Aktivasyon Grubu (PD98059 + H89)

GV, GVBD, İğ oluşumu, İğ göçü, PBE aşamadaki oositler

### 3.4. Immunofloresan için Oosit Fiksasyonu ve Mikrotübül Stabilizasyonu

#### Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

- **%4 Paraformaldehit (PFA)** (PBS içerisinde hazırlanmış): Affymetrix (Waltham, MA, ABD), #19943
- **Triton X-100**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #T-9284
- **Tween-20**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #P9416
- **Bovin Serum Albumin (BSA)**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #A3733
- **“Phosphate Buffer Saline” (PBS) pH 7.4**: Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #10010023
- **EGTA**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #E0396
- **PIPES**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #P6757
- **MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O**: Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #M2670
- **Aprotinin** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #A1153

- **DTT:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #D9779
- **D<sub>2</sub>O:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #D4501
- **Taxol:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #T7402
- **Phenylarsine oxide (PAO):** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #P3075
- **Sodium ortho-vanadate:** Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ABD), #S6508
- **Falloidin:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #R415
- **DAPI'li kapatma medyumu:** Vector Labs (Burlingame, CA, ABD), #H-1200
- **Konfokal mikroskop:** Zeiss (Oberkochen, Almanya), LSM-510

#### **Stabilizasyon Tamponu (ST) (5X)**

PIPES	15,12g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,51g
EGTA	0,48g
Distile su	100 mL

- Distile su ile 1X olarak dilue edilerek kullanıldı.

#### **Mikrotübül Stabilizasyon Tamponu (MTST)**

Stabilizasyon Tamponu (ST)	2 ml
Aprotinin	1 µl
DTT (1M H <sub>2</sub> O stoğu)	10 µl
D <sub>2</sub> O	5 ml
Taxol (1 mg/ml DMSO stoğu)	10 µl
Triton X-100 (%10 PBS stoğu)	100 µl
%4 paraformaldehit (37% v/v)	540 µl
Phenylarsine oxide (PAO - 40 µM DMSO stoğu)	10 µl
Sodium ortho-vanadate (100 µM H <sub>2</sub> O stoğu)	100 µl

-Bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı.

- IVM sürecinin ardından oositler PBS ile yıkandı.
- FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikoları için 2 farklı fiksasyon yöntemi uygulandı: FMN2 antikoru için oositler %4 PFA ile 45 dakika oda ısısında

fikse edildi. Spire-1 ve Spire-2 antikorları için oositler %4 PFA ile 15 dakika 37°C'de fikse edildi.

- Fiksasyonun ardından üç kez 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı.
- Mikrotübül stabilizasyonu ve permeabilizasyon için 45 dakika oda ısısında MTST uygulandı.
- Üç kez 5 dakika PBS ile yıkama yapıldı
- PBS içerisinde hazırlanan % 0,01 Tween 20 + %2 BSA (bloklama/yıkama solüsyonu) ile 2 saat boyunca bloklama yapıldı.
- Oositler %2 BSA içerisinde hazırlanmış olan FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikorları (Tablo 3.1) ile gece boyu +4°C'de inkübe edildi.
- FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikorlarının her biri ile a-tubulin çiftli boyaması yapıldı.
- Primer antikör inkübasyonunun ardından oositler 3 kez 5 dakika bloklama/yıkama solüsyonu ile yıkandı
- Uygulanan primer antikora uygun sekonder antikörler BSA içerisinde 1:200 dilusyonda hazırlanarak 4 saat boyunca oda ısısında inkübasyon yapıldı.
- Sekonder antikör inkübasyonunun ardından oositler 3 kez 5 dakika bloklama/yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Falloidin oda ısısında 10 dk uygulandı (Stok falloidin solüsyonu metanol içerisinde çözdürüldüğü için stok solüsyon %2,5 oranında PBS ile dilue edildi).
- Bloklama/yıkama solüsyonu ile 3 kez 5 dakika yıkama yapıldı.
- DAPI'li kapatma medyumunu ile kapatma yapıldı.
- Zeiss LSM-510 konfokal mikroskop ile uygun filtreler kullanılarak görüntüleme yapıldı.
- Her bir immunofloresan deneyinde, farklı deneysel gruplara ait, maturasyonun farklı aşamasındaki 3'er adet oositin boyanma yoğunlukları belirlendi ve deneyler 3'er kez tekrar edildi. Dolayısıyla istatistiksel değerlendirmeler yapılırken her gruptan (kontrol, PD98059, H89, PD98059+H89) farklı aşamadaki (GV, GVBD, iğ oluşumu, iğ göçü, PBE) 9'ar adet oosit kullanıldı.

- Tüm deneysel grupları içeren her bir floresan deneyi için 10 adet fareden elde edilen oositlerden havuz oluşturuldu.

**Tablo 3.1.** Immunofloresan deneylerinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

<b>Primer Antikor</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Dilüsyon</b>	<b>Sekonder Antikor</b>
FMN2	ab-72052	1:100	AlexaFlour 488 anti-rabbit (ab150077) (1:200)
Spire-1	sc-85162	1:100	AlexaFlour 488 anti-rabbit (ab150077) (1:200)
Spire-2	sc-136905	1:100	AlexaFlour 488 anti-goat (Thermo, A-11055) (1:200)
a-Tubulin	Sigma T9026	1:1000	AlexaFlour 647 anti-mouse (Thermo, A-21235) (1:400)

### 3.5. Western Blot Analizi

#### 3.5.1 Hücre Lizatı Hazırlama

##### Kullanılan Solüsyonlar

- **Sample Buffer 2X, Laemli electrophoresis Reagent** (Sigma, #S3401)
  - IVM prosedürünün ardından oositler PBS ile 3 kez yıkanarak kültür medyumunun uzaklaştırılması sağlandı.
  - FMN2 ve Spire-1 antikorları için, her bir kuyucuğa yüklenmek üzere, 40'ar adet oosit; Spire-2, p-ERK1/2 ve p-CREB antikorları için 20'şer adet oosit kullanıldı. Tüm deneysel grupları içeren her bir Western blot deneyi için, FMN2 ve Spire-1 antikorları için 10 adet, Spire-2, p-ERK1/2 ve p-CREB antikorları için 5 adet fareden elde edilen oositlerden havuz oluşturuldu ve deneyler 3 kez tekrar edildi.
  - 0,5 mL ependorf tüp içerisindeki 20 uL 1X Laemli Buffer içerisine aktarıldı ve vorteksenerek oositlerin parçalanması sağlandı.
  - Hücre lizatları 95<sup>0</sup>C'de 5 dakika boyunca kaynatıldı.

### 3.5.2 SDS-PAGE Western Blot protokolü

#### Kullanılan Solüsyonlar

➤ **5X Yürütme Tamponu:**

<b>Tris (Bio-Rad, #161-0719)</b>	<b>: 9 g</b>
<b>Glisin (Bio-Rad, #161-0718)</b>	<b>: 43,2 g</b>
<b>SDS (Sigma,# L4390)</b>	<b>: 3 g</b>
<b>Distile su</b>	<b>: 600 mL</b>

-Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

➤ **Transfer Tamponu:**

<b>Glisin (Bio-Rad, #161-0718)</b>	<b>: 14.3 g</b>
<b>Tris (Bio-Rad, #161-0719)</b>	<b>: 3 g</b>
<b>Distile su</b>	<b>: 700 mL</b>
<b>Metanol</b>	<b>: 200 mL</b>
<b>(Merck,#1.06.008.2500)</b>	

-Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

- **Bloklama Solüsyonu (%5'lik BSA):** 5g BSA (Sigma, #A3733) 100 ml TBS-T içerisinde çözüldü ve +4°C'de en fazla 24 saat kalacak şekilde muhafaza edildi.
- **%4-20 Gradyan Jel:** Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, ABD), #4568094
- **10X TBS Tamponu pH:7.4:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #BP2471500. Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.
- **TBS-T Solüsyonu:** 1 litre 1X TBS içerisine 1 mL Tween-20 (Sigma, P9416) eklendi ve oda ısısında saklandı.
- **Thick Blot Paper:** Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, ABD), #165-0921
- **Clarity Western ECL Substrate:** Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, ABD), #1705060
- **PVDF Membran:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #88518
- **Kaleidoscope Prestained Standards, broad range:** Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, ABD), #161-0324



- **CL-Xposure film 18x24 cm:** Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, ABD), #34089
- **PQ Universal Developer:** ILFORD (San Clemente, CA, ABD), #1757314
- **Hypam Fixer:** ILFORD, (San Clemente, CA, ABD), #1758285
- **Medical Film Processor:** Konica, (Newark, NJ, ABD), #SRX101

Çalışılacak olan proteinin kilo dalton (kDa) ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdede hazır jel seçildi (%4-10). Her kuyucuğa 20 mikrolitre numune yüklenerek jel elektroforezi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrasında immunoblotting yapılarak jeldeki proteinlerin membrana geçmesi sağlandı. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısısında pH'sı 7.2-7.4 olan, % 0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solüsyonu ile hazırlanan % 5 lik BSA ile bloklandı. Membran ERK, p-ERK, CREB, p-CREB, FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikoları ile +4<sup>0</sup>C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. Kullanılan primer ve sekonder antikolar liste halinde Tablo 3.2.'de görülmektedir. İnkübasyon sonrasında, 3 kez 10 dakika TBS-T ile yıkamanın ardından membran, sekonder antikor ile oda ısısında karıştırıcı üzerinde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tekrar 3 kez 10 dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandı. Membran "Clarity Western ECL Substrate" ile uygun sürede geliştirilip, membrandaki protein bandları karanlık odada "Medical Film Processor" ile hiperfilme aktarıldı.

**Tablo 3. 2.** Western Blot analizinde kullanılan primer ve sekonder antikorlar

<b>Primer Antikor</b>	<b>Katalog Numarası</b>	<b>Dilüsyon</b>	<b>Sekonder Antikor</b>
FMN2	ab-72052	1:200	anti-rabbit HRP (1:2000) Cell Signaling #7074
Spire-1	sc-85162	1:500	anti-rabbit HRP (1:1000) Cell Signaling #7074
Spire-2	sc-136905	1:500	anti-goat HRP (1:2000) Thermo #31402
b-Tubulin	Sigma T9026	1:3000	anti-mouse HRP (1:3000) Cell Signaling #7076
ERK1/2	Cell Signalling 4695	1:1000	anti-rabbit HRP (1:2000) Cell Signaling #7074
p-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Cell Signalling 4370	1:1000	anti-rabbit HRP (1:2000) Cell Signaling #7074
CREB	Cell Signalling 9197	1:1000	anti-rabbit HRP (1:2000) Cell Signaling #7074
p-CREB(Ser133)	Cell Signalling 9198	1:1000	anti-rabbit HRP (1:2000) Cell Signaling #7074

### 3.6. İstatistik

FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikorları ile yapılan immunofloresan boyanmaların yoğunluğu Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) programı ile belirlendi. FMN2, Spire-1 ve Spire-2 antikorları kullanılarak yapılan western blot deneylerinin sonucunda elde edilen bantların yoğunluğu da Image J programı ile belirlendi. Bu antikorlara ait bantların yoğunluğu b-Tubulin'e ait bant yoğunluklarına oranlanarak normalize edildi. p-ERK1/2 bant yoğunluğu total ERK1/2 ile, p-CREB bant yoğunluğu total CREB ile normalize edildi. Belirtilen şekilde elde edilen immunofloresan ve western blot deneylerinin verileri ile GVBD ve PBE oranları Sigma Stat programı (Sigma Stat for Windows, version 3.0, Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA, USA) ile One-Way ANOVA testleri uygulanarak değerlendirildi. Veriler  $\pm$ SEM olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık  $p < 0,05$  olarak tanımlandı.

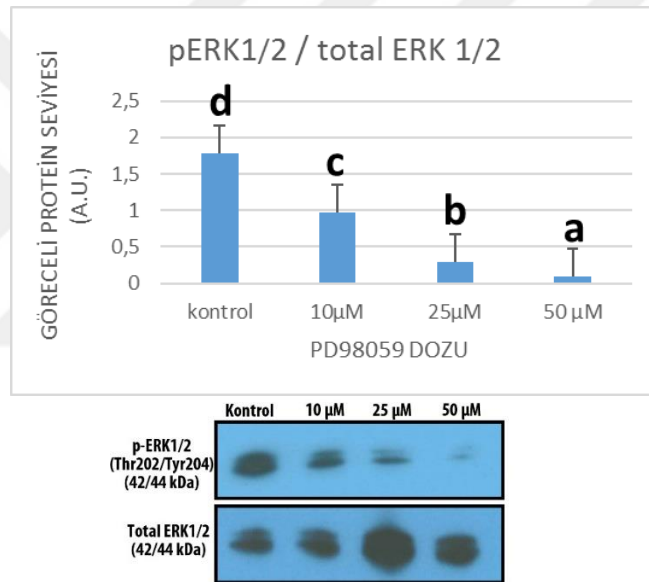
Grafiklerde yer alan farklı harfler, tüm grupların birbirleri arasındaki istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. Grafikte aynı harf ile işaretlenen sütunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yok iken, farklı harfler ile işaretlenen sütunlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.



## 4. BULGULAR

### 4.1 MEK İnhibitörü Uygulaması için Doz Belirleme Analizi Bulguları

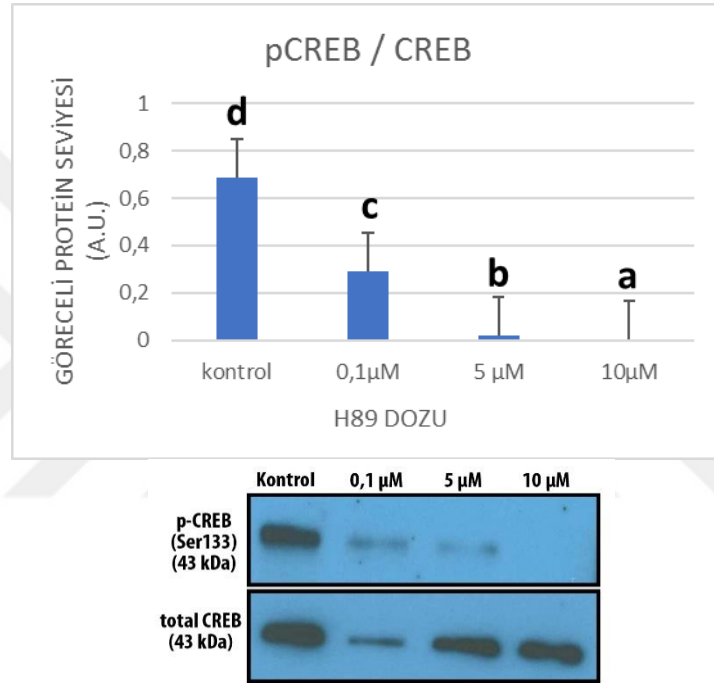
Oositlere IBMX içermeyen M16 kültür medyumuna alınmalarını takiben 2 saat süreyle daha önce literatürde kullanılmış dozlar olan 10 $\mu$ M, 25  $\mu$ M ve 50 $\mu$ M dozlarda PD98059 uygulaması yapılmıştır. İnhibisyonun etkinliği, MEK proteininin fosforile ettiği hedef proteini olan ERK1/2 proteininin fosforile formunun oositlerdeki miktarının Western blot analiz sonucuna göre değerlendirilmiştir. Western blot sonuçlarına göre ERK1/2 proteininin fosforile formunun miktarının en fazla 50 $\mu$ M'lık doz uygulamasında düşüş gösterdiği görülmüş (Şekil 4.1) ve daha sonraki deneysel prosedürlerde bu doz uygulanmıştır.



**Şekil 4.1.** p-ERK1/2 protein seviyeleri. Belirtilen dozlarda MEK inhibitörü PD98059 varlığında IVM uygulanan oositlerde p-ERK1/2 / ERK1/2 proteinlerinin Western blot bantları ve protein seviyelerinin Image J değerlendirmelerinin matematiksel değerlerinin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak metodu). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir.

#### 4.2 PKA İnhibitörü Uygulaması için Doz Belirleme Analizi Bulguları

IBMX içermeyen M16 kültür medyumuna alınan oositlere, 2 saat süreyle daha önce literatürde kullanılmış dozlar olan 0,1µM, 5 µM ve 10µM dozlarda H89 uygulaması yapılmıştır. İnhibisyonun etkinliği, PKA proteininin fosforilasyon hedefi olan CREB proteininin fosforile formunun oositlerdeki miktarının Western blot analiz sonucuna göre değerlendirilmiştir. Western blot analizi sonucunda CREB proteininin fosforile formunun miktarının en fazla 10µM'lık doz uygulamasında düşüş gösterdiği görülmüş (Şekil 4.2) ve daha sonraki deneysel prosedürlerde bu doz uygulanmıştır.



**Şekil 4.2.** pCREB protein seviyeleri. Belirtilen dozlarda PKA inhibitörü H89 varlığında IVM uygulanan oositlerde pCREB / CREB proteinlerinin Western blot bantları ve protein seviyelerinin Image J değerlendirmelerinin matematiksel değerlerinin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak metodu). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir.

### 4.3 IVM Uygulanan Oositlerde GVBD ve PBE Oranları

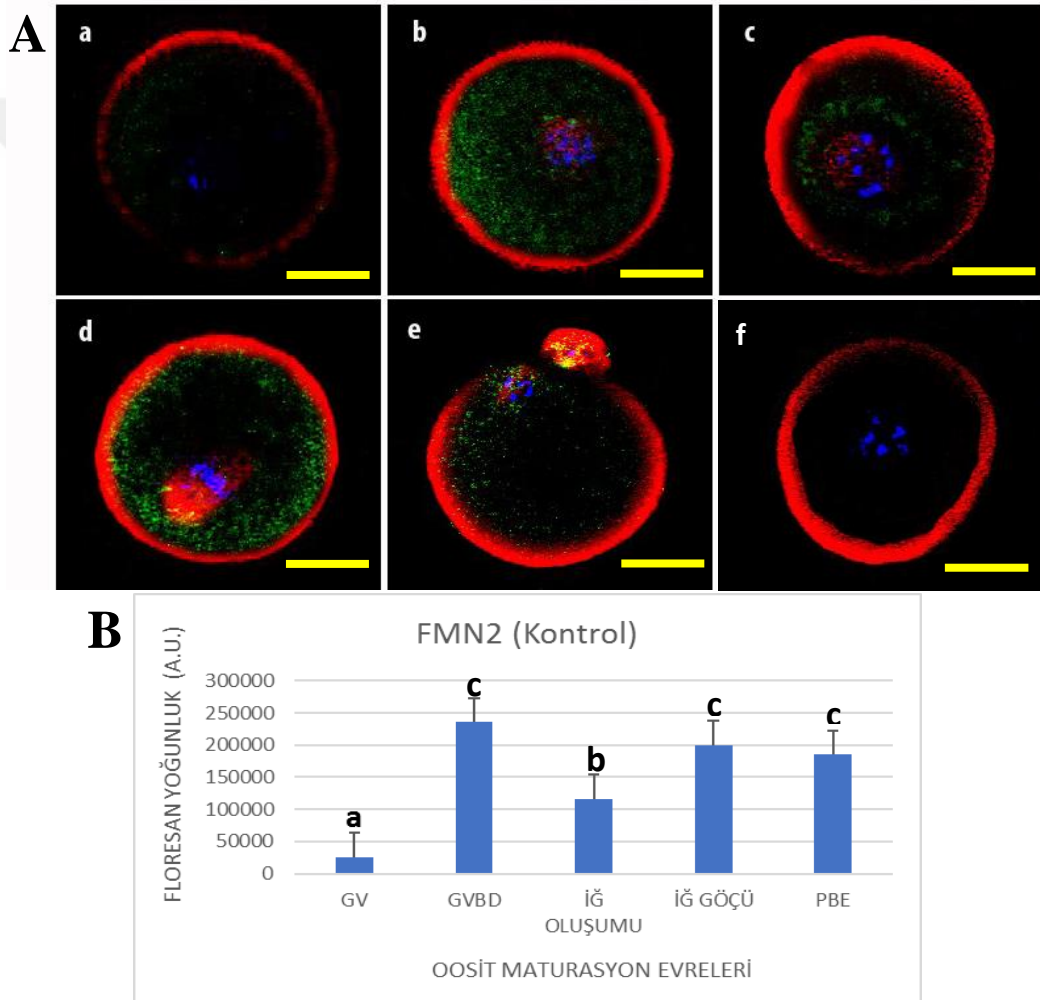
IVM uygulanan kontrol grubu oositlerde, MEK inhibitörü PD98059 uygulanan oositlerde, MPF aktivatörü H89 uygulanan oositlerde ve PD98059+H89 uygulaması yapılan oositlerde GVBD ve PBE oranları belirlenmiştir. GVBD oranları tüm gruplarda benzerlik gösterirken, PBE oranlarının PD98059 grubunda anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Tablo-4.1).

**Tablo 4.1.** IVM uygulanan oositlerde GVBD ve PBE oranları. Farklı harfler sütunlar arasındaki (kontrol, PD98059, H89 ve PD98059+H89 grupları arasındaki) istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak metodu). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplar aynı harf ile işaretlenmiştir.

	<b>KONTROL</b>	<b>PD98059</b>	<b>H89</b>	<b>PD98059+H89</b>
<b>GVBD</b>	89,2 ± 2,3 <sup>a</sup>	85,6 ± 3,1 <sup>a</sup>	82,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	84 ± 1,9 <sup>a</sup>
<b>PBE</b>	68,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	52,2 ± 2,2 <sup>a</sup>	63 ± 2,9 <sup>b</sup>	59 ± 3,3 <sup>b</sup>

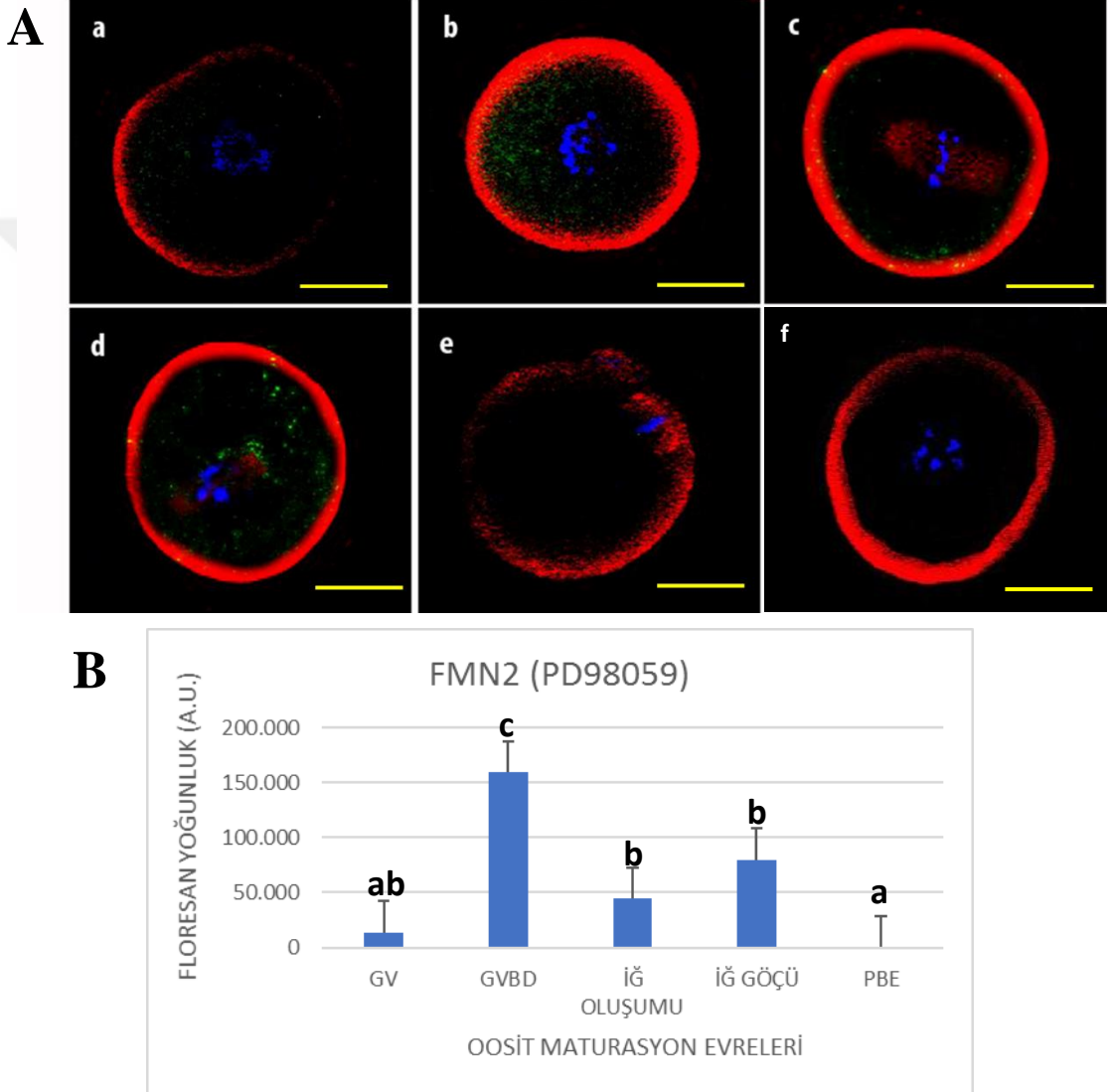
#### 4.4. FMN2 İmmunofloresan Analizi Bulguları

Immunofloresan deneyleri ile FMN2'nin kontrol grubunda GV aşamadan PBE aşamasına kadar tüm maturasyon evrelerinde oosit sitoplazmasında lokalize olduğu görülmüştür. FMN2 floresan yoğunluğunun GVBD aşamada GV'ye göre anlamlı şekilde fazla olduğu belirlenmiştir. İğ oluşumu aşamasında FMN2'nin floresan yoğunluğunun GVBD'ye göre azaldığı ve özellikle iğ çevresinde lokalize olduğu görülmüştür. FMN2, iğ göçü ve PBE aşamasında hem iğ çevresindeki sitoplazmik alanlarda hem de kortikal alanlarda lokalizasyon göstermektedir ve floresan yoğunluğu iğ oluşumu aşamasına göre daha fazladır (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde FMN2 immünolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20 µm. Yeşil: FMN2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığını ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

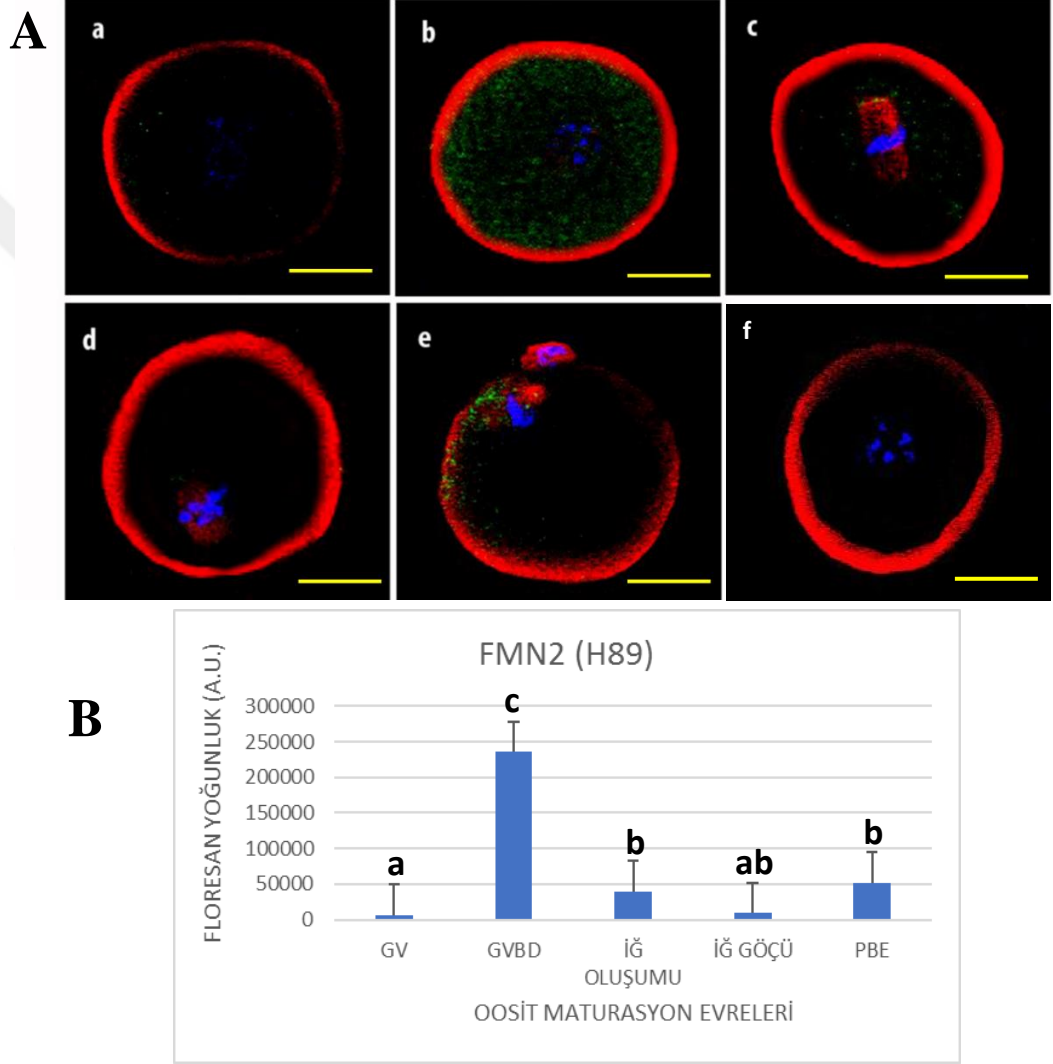
IVM süresince PD98059 ile MEK inhibisyonu yapıldığında, FMN2 floresan yoğunluğunun en fazla GVBD aşamada olduğu belirlenmiştir. İğ oluşumu ve iğ göçü aşamalarında FMN2 floresan yoğunluğu GVBD'ye göre azalmıştır. İğ oluşumu aşamasında iğ çevresinde spesifik bir FMN2 lokalizasyonu görülmemiş, kortikal alanlarda lokalizasyon saptanmıştır. İğ göçü sırasında FMN2'nin hem iğ çevresi hem de kortekste lokalize olduğu, PBE aşamasında FMN2 floresan yoğunluğunun anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: FMN2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

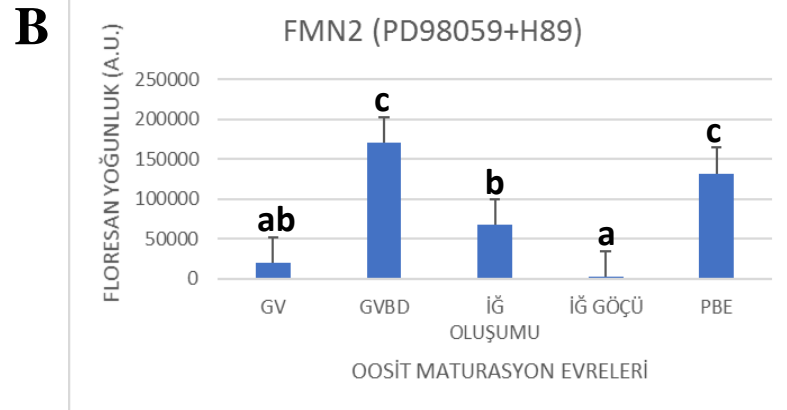
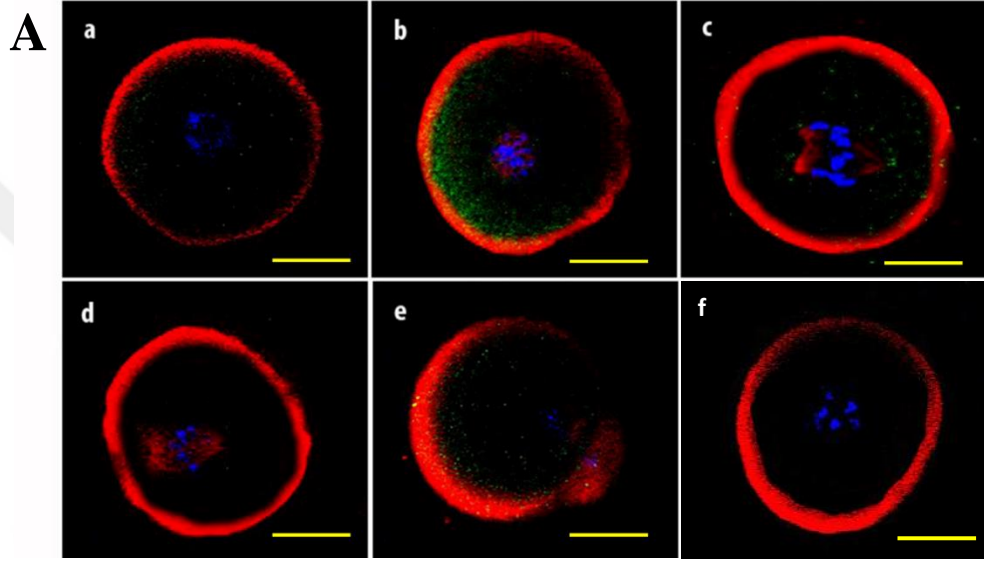


H89 uygulaması ile MPF aktive edildiğinde, GV aşamada düşük olan FMN2 floresan yoğunluğunun, GVBD oositlerde diğer aşamalara göre anlamlı şekilde daha fazla olduğu belirlenmiştir. İğ oluşumu aşamasında FMN2 yoğunluğu GVBD'ye göre azalmıştır ve FMN2 lokalizasyonunun iğ çevresinde olduğu görülmüştür. H89 uygulamasının özellikle iğ göçü aşamasında FMN2 yoğunluğunu azalttığı belirlenmiştir. PBE aşamasında hem iğ çevresinde hem de kortekste lokalize olan FMN2'nin floresan yoğunluğunun GVBD'ye göre düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



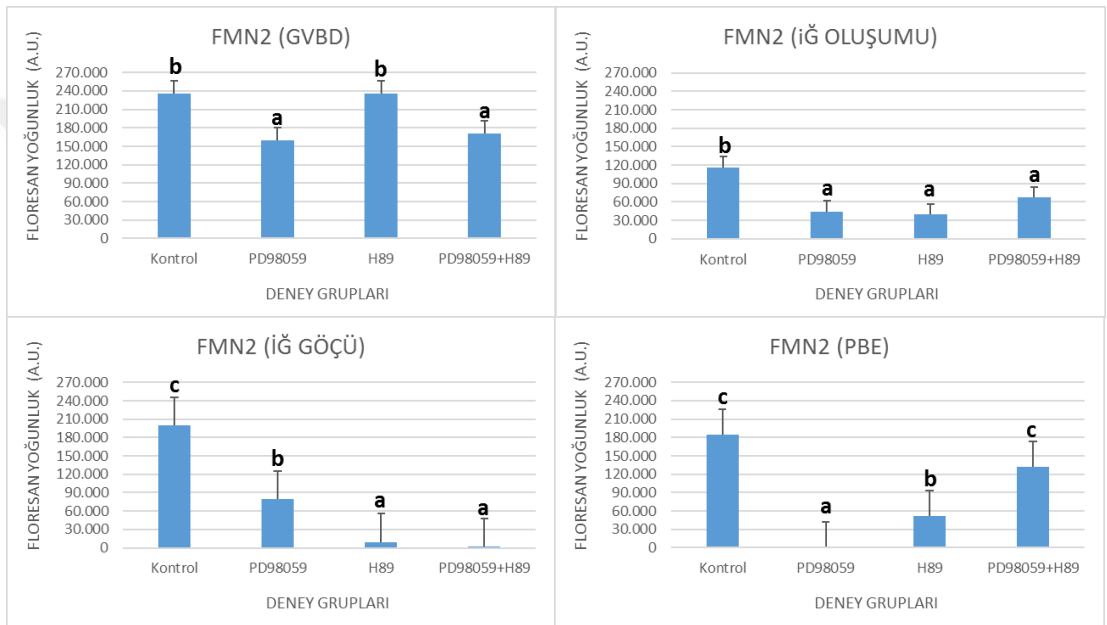
**Şekil 4.5.** In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20 µm. Yeşil: FMN2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

IVM sırasında hem PD98059 hem de H89 uygulandığında, diğer deney gruplarında olduğu gibi GVBD aşamadaki oositlerde FMN2 floresan yoğunluğunun GV'ye oranla arttığı görülmüştür. İğ oluşumu aşamasında iğ çevresinde FMN2 lokalizasyonu görülürken, iğ göçü aşamasında FMN2 floresan yoğunluğunda azalma olduğu belirlenmiştir. PBE aşamasında ise iğ çevresinde yoğunlaşmaksızın sitoplazmik ve kortikal alanlarda lokalize olan FMN2'nin floresan yoğunluğunda GV, iğ oluşumu ve iğ göçü aşamalarına göre anlamlı düzeyde artış görülmüştür (Şekil 4.6).



**Şekil 4.6.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde FMN2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20 µm. Yeşil: FMN2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığını ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

FMN2 floresan yoğunluğu verileri farklı deney grupları arasında oosit maturasyonunun belirli aşamalarında değerlendirildiğinde GVBD aşamada PD98059 ve PD98059+H89 gruplarında FMN2 seviyesinde düşüş olduğu belirlenmiştir. İğ oluşumu aşamasında FMN2 floresan yoğunluğu kontrol grubunda diğer gruplara göre yüksektir. İğ göçü aşamasında PD98059 grubunda kontrol grubuna göre düşük olan FMN2 yoğunluğunun H89 ve PD98059+H89 grubunda daha da düştüğü görülmektedir. PBE aşamasında ise FMN2 yoğunluğu PD98059 uygulaması ile kontrole göre azalmış, H89 ve PD98059+H89 gruplarında ise tekrar yükseldiği görülmüştür (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki FMN2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

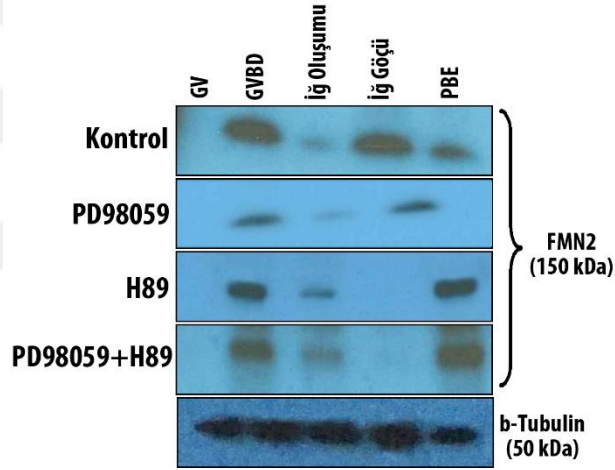
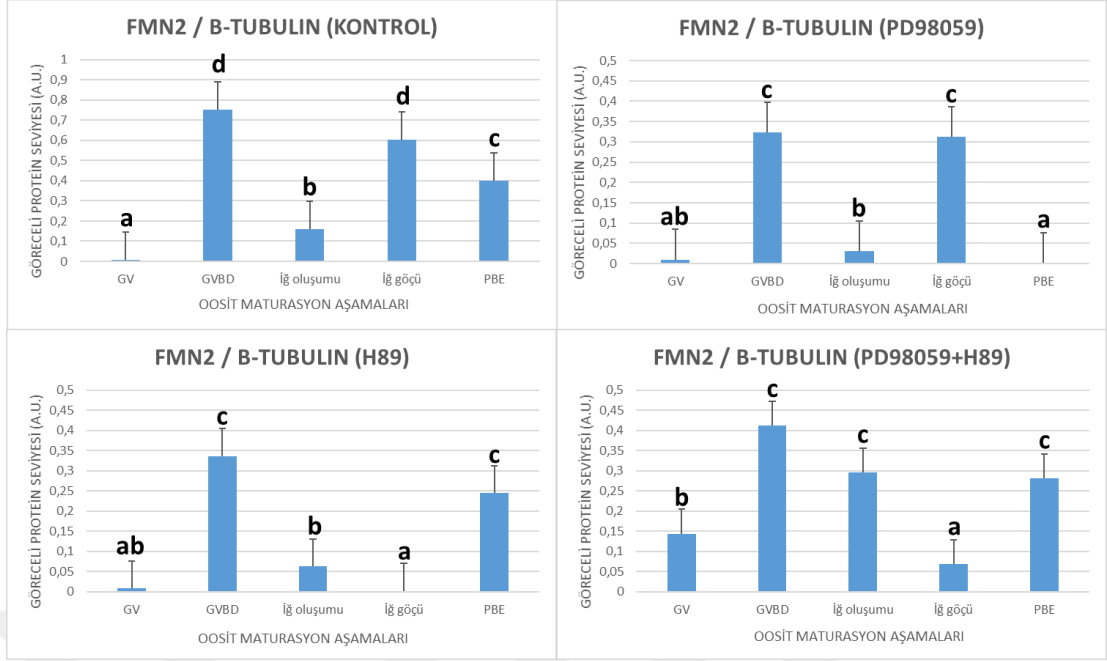
#### 4.5. FMN2 Western Blot Analizi Bulguları

Western blot analizi bulguları, kontrol grubunda FMN2 protein seviyesinin GVBD oositlerde GV'ye göre anlamlı şekilde arttığını göstermektedir. İğ oluşumu aşamasındaki oositlerde ise FMN2 protein seviyesinin düştüğü gözlenmiştir. İğ göçü ve PBE aşamalarında ise FMN2 seviyesinin artış gösterdiği görülmüştür.

IVM süresince PD98059 ile MEK inhibisyonu uygulandığında ise GVBD aşamada FMN2 seviyesinde artış olmuş, iğ oluşumu aşamasının yanı sıra bu grupta PBE aşamasında da FMN2 düzeyinde anlamlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.

H89 ile MPF aktivasyonu gerçekleştirildiğinde FMN2 seviyesi GVBD aşamada GV'ye oranla artmıştır. İğ göçü aşamasında FMN2 seviyesinin GVBD, iğ oluşumu ve PBE aşamalarına göre anlamlı şekilde düşük olduğu görülmüştür.

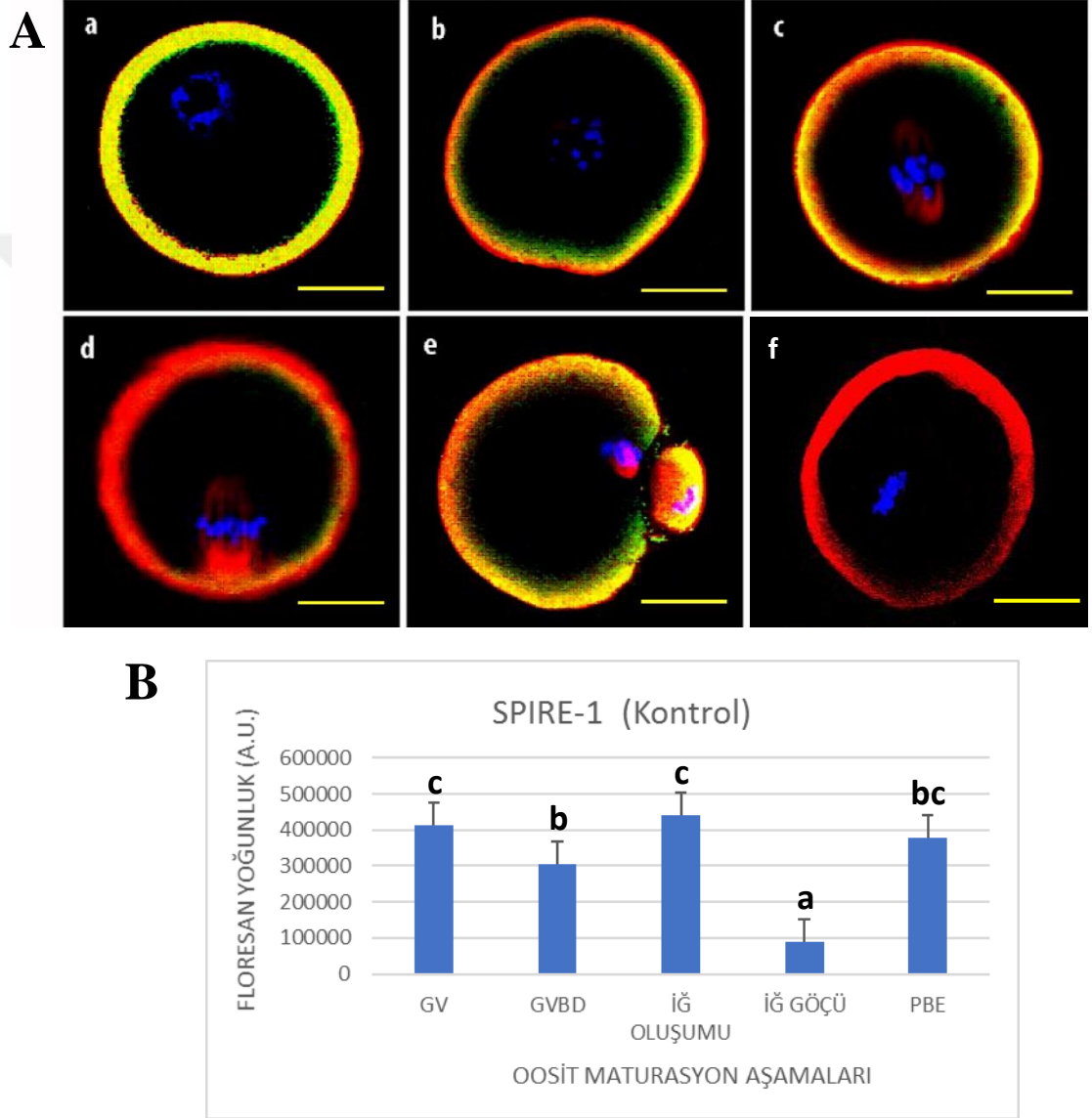
Hem PD98059 hem de H89 uygulaması yapıldığında, FMN2 protein seviyesinde GVBD aşamasında GV'ye göre artış olduğu görülse de daha sonraki aşamalar olan iğ oluşumu, iğ göçü ve PBE aşamalarında düşüş olduğu belirlenmiştir. Bu aşamalardan iğ göçü aşamasındaki FMN2 seviyesi diğer aşamalara göre anlamlı şekilde düşüktür (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** FMN2 protein seviyeleri. IVM uygulanan kontrol, PD98059, H89, PD98059+H89 grubu fare oositlerinde FMN2/b-Tubulin protein seviyelerini gösteren Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği ve Western blot bantları. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

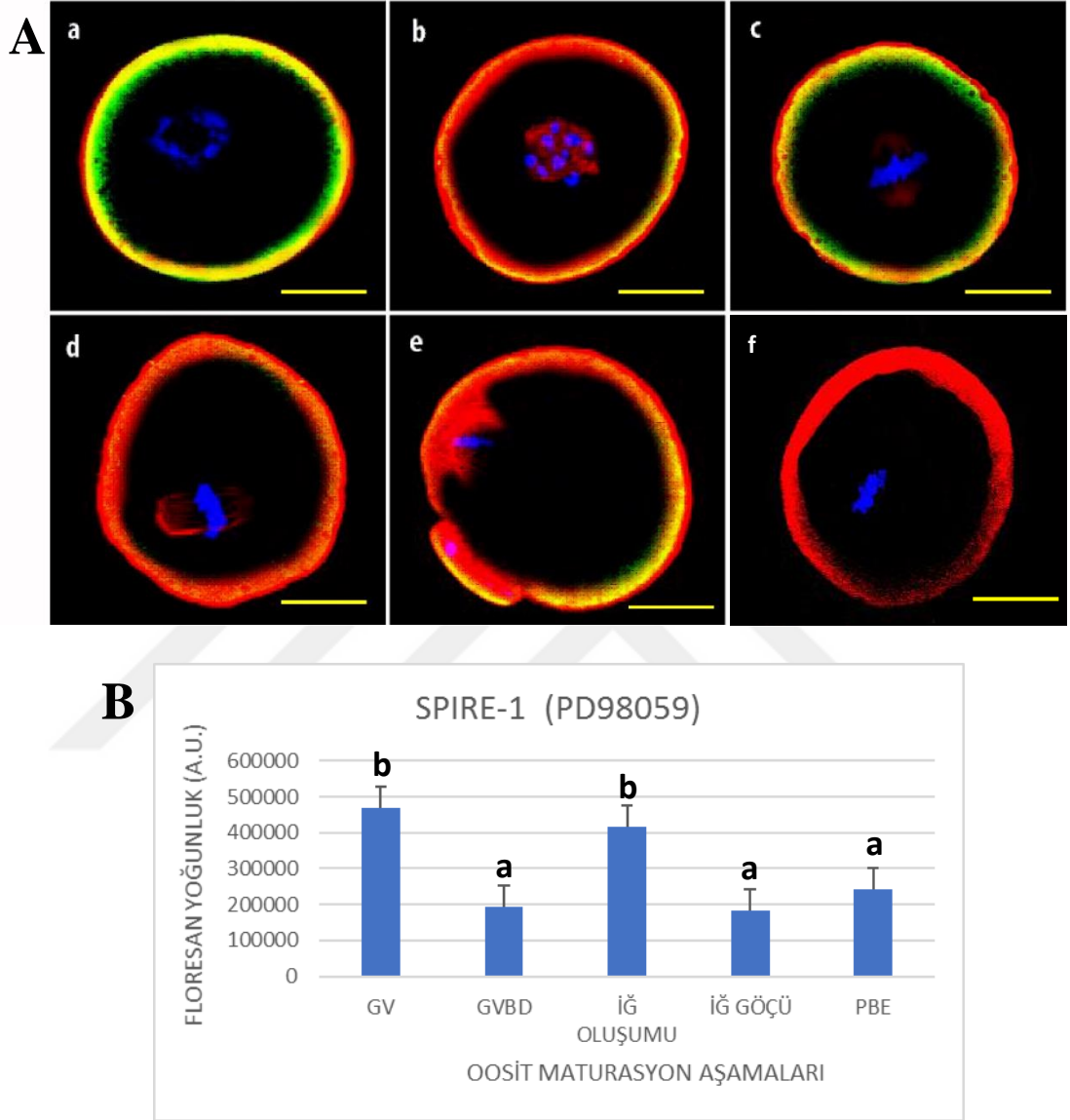
#### 4.6. Spire-1 İmmunofloresan Analizi Bulguları

IF deneyleri ile oositlerde Spire-1'in kortikal lokalizasyonu maturasyonun tüm aşamalarında belirlenmiştir. Kontrol grubunda GVBD ve iğ göçü aşamasındaki oositlerde Spire-1 floresan yoğunluğunun diğer aşamadaki oositlere göre anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Floresan yoğunluğun en düşük olduğu aşama ise iğ göçü aşamasıdır (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9.** In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-1. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığını ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

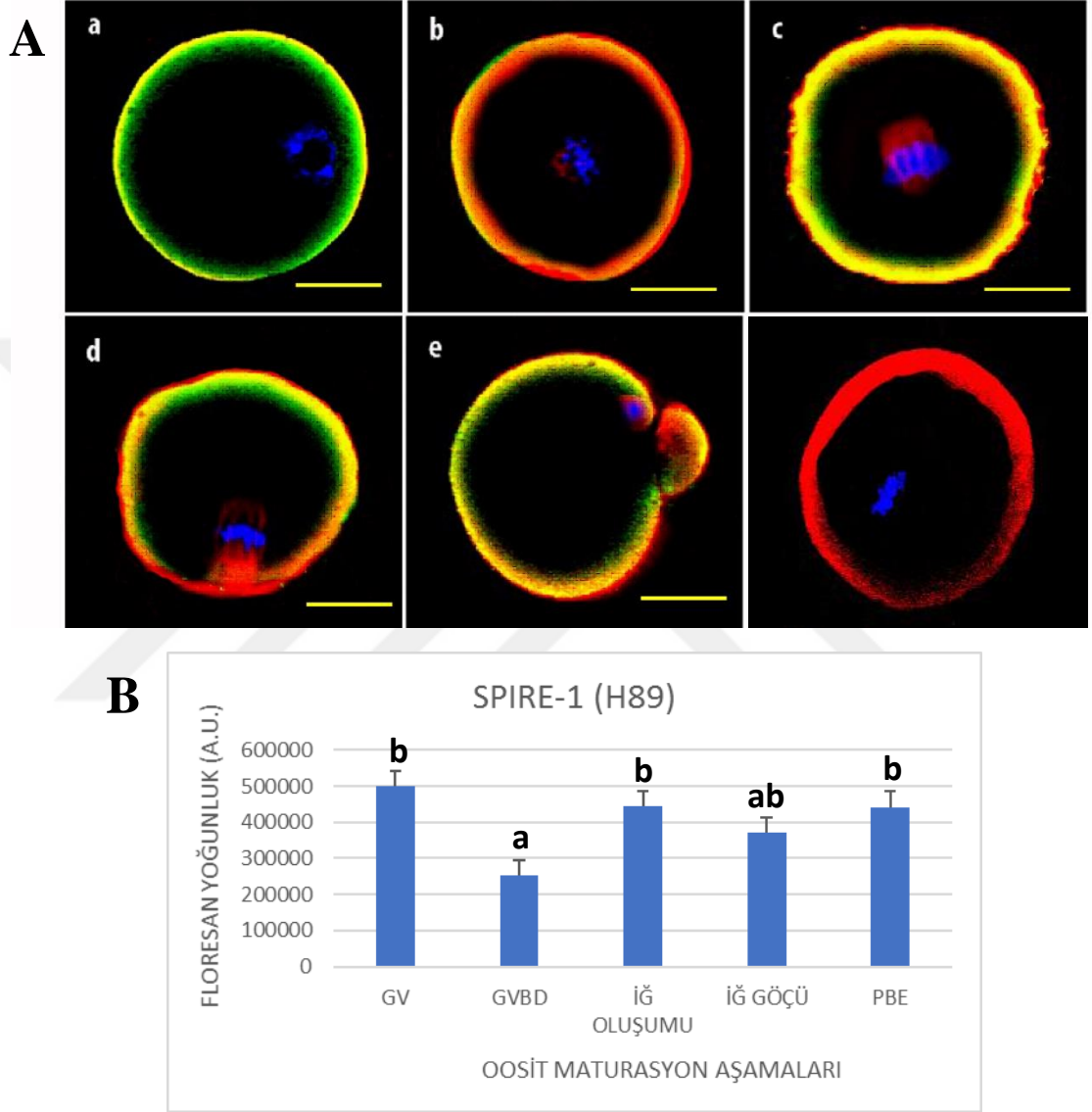
MEK inhibitörü PD98059 varlığında Spire-1 kortikal floresan yoğunluğunun GVBD ve iğ göçü aşamasındaki oositlerin yanı sıra PBE aşamasındaki oositlerde de diğer aşamalara göre düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-1. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.



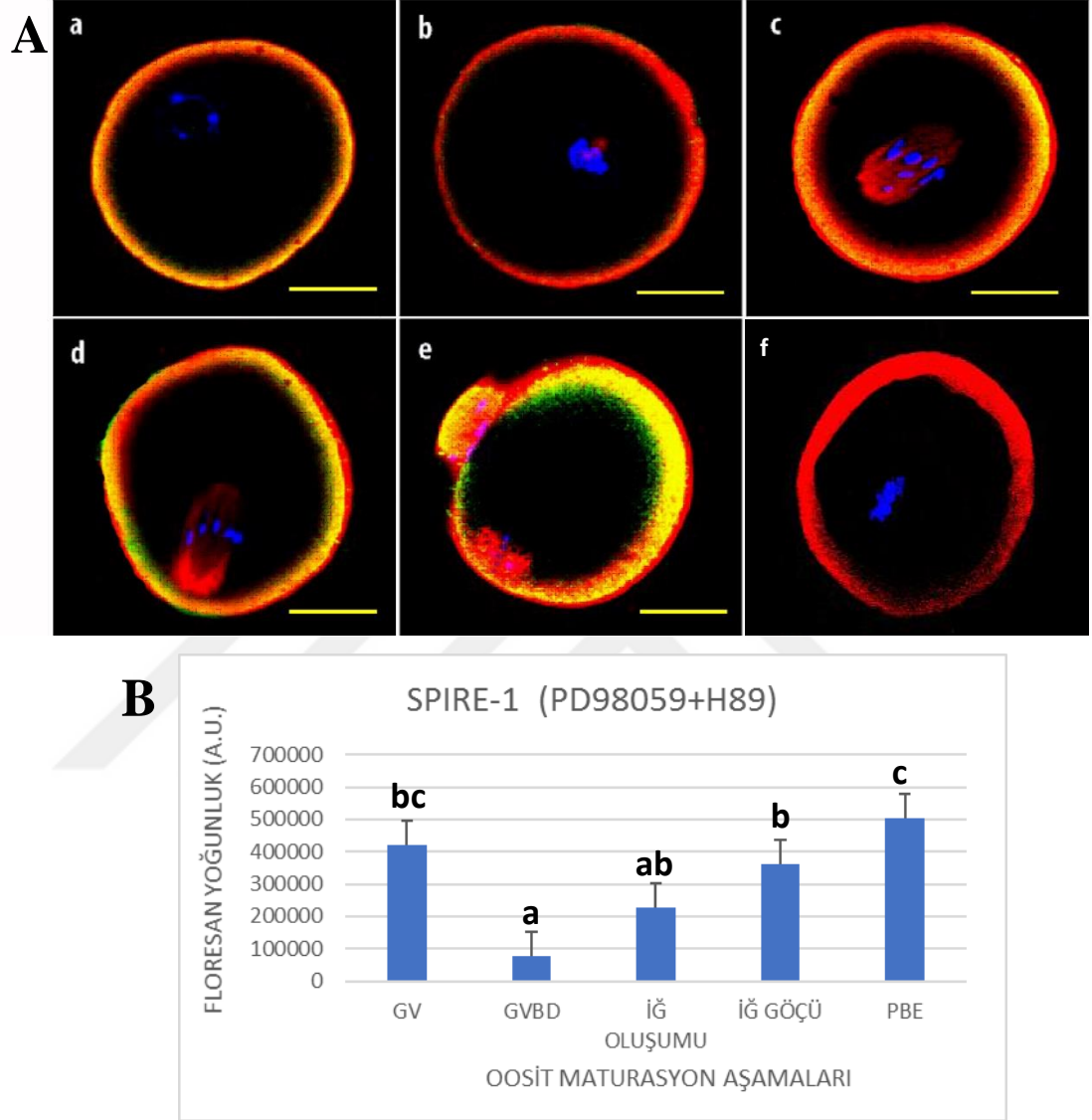
H89 uygulaması ile MPF aktive edildiğinde Spire-1'in kortikal floresan yoğunluğunun yalnızca GVBD aşamasında anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir. Maturasyonun tüm diğer aşamalarında kortikal Spire-1 seviyesinin birbirine yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iç oluşumu (c), iç göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-1. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iç):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

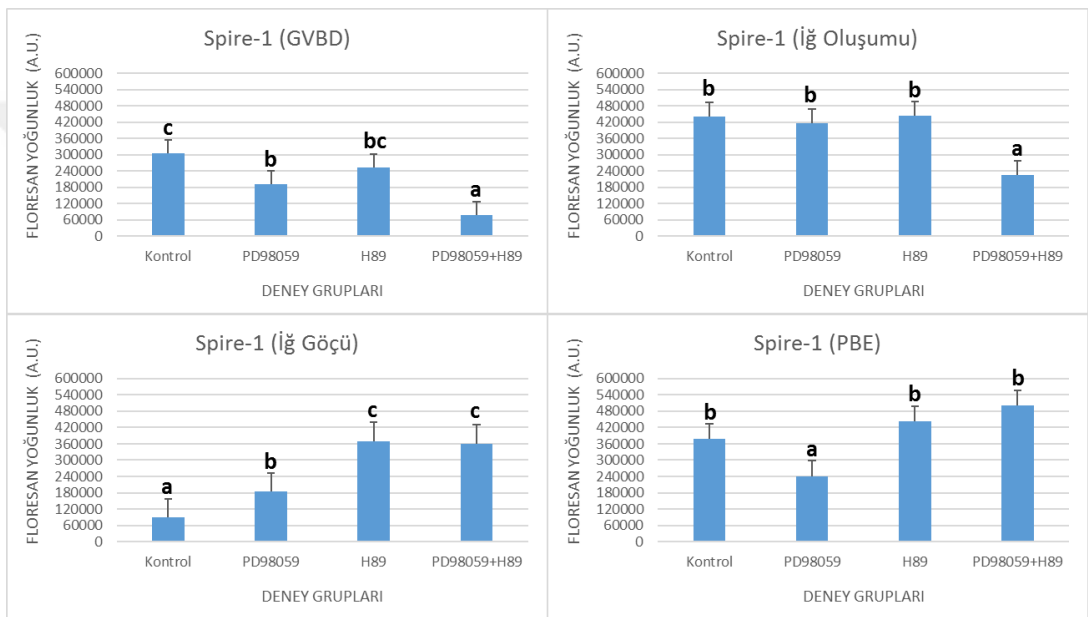


PD98059+H89 grubunda, Spire-1'in kortikal floresan yoğunluğunun GVBD aşamasında anlamlı şekilde düşük olduğu belirlenmiştir. PBE aşamasında ise Spire-1 kortikal düzeyinin anlamlı şekilde artmış olduğu görülmüştür (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde Spire-1 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-1. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

Spire-1 floresan yoğunluğu deney grupları arasında oosit maturasyonunun farklı aşamalarında değerlendirildiğinde GVBD oositlerde PD98059 uygulamasının Spire-1 kortikal yoğunluğunu düşürdüğü, PD98059+H89 grubunda da Spire-1 kortikal seviyesinin diğer gruplara göre daha düşük olduğu görülmüştür. İğ oluşumu aşamasında Spire-1 kortikal floresan yoğunluğu PD98059+H89 grubunda diğer gruplara göre daha düşüktür. İğ göçü aşamasında ise Spire-1 kortikal seviyesinin H89 ve PD98059+H89 uygulaması ile artış gösterdiği belirlenmiştir. PBE aşamasındaki oositlerde kortikal Spire-1 seviyesi PD98059 uygulaması ile azalmış, H89 uygulaması ile artış göstermiştir (Şekil 4.13).



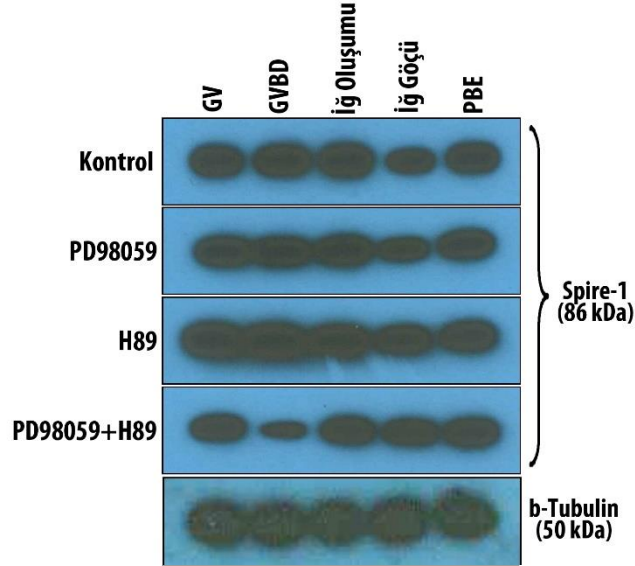
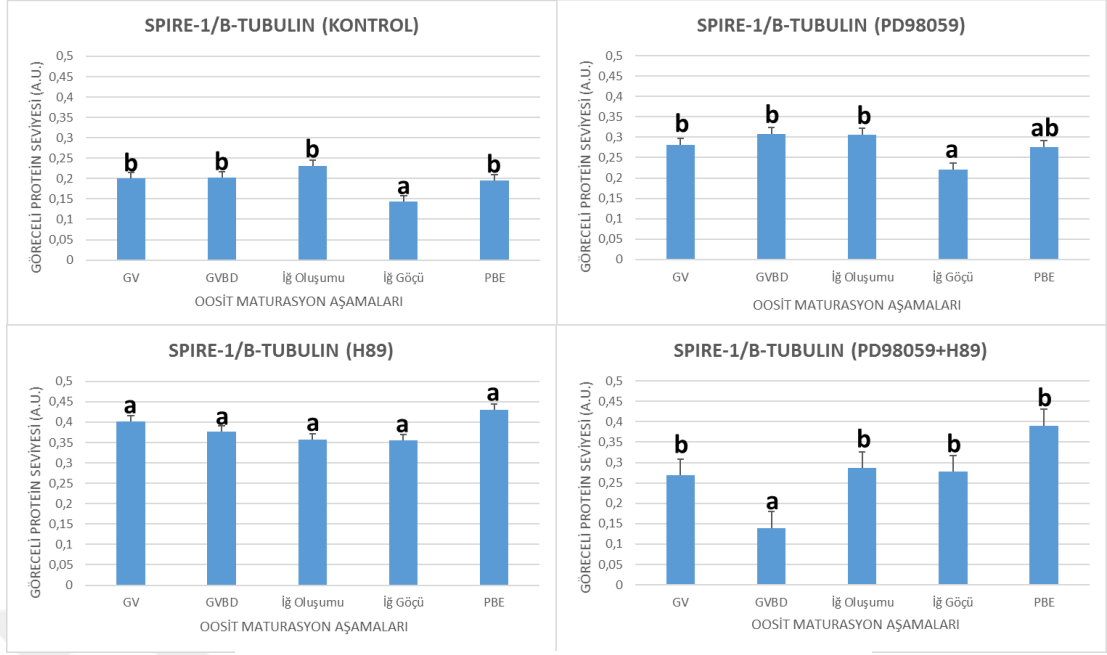
**Şekil 4.13.** Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki Spire-1 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

#### **4.7. Spire-1 Western Blot Analizi Bulguları**

Western blot deneyleri ile kontrol grubunda Spire-1 protein seviyesinin IVM süresince GV, GVBD, iğ oluşumu ve PBE aşamadaki oositlerde benzer olduğu, ancak iğ göçü aşamasında anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir.

IVM süresince MEK inhibitörü PD98059 uygulandığında da Spire-1 seviyesinin iğ göçü aşamasında en düşük olduğu belirlenmiştir. Oosit maturasyonunun diğer aşamalarında Spire-1 protein seviyesinin iğ göçü aşamasından daha yüksek seviyede ve birbirine yakın olduğu görülmüştür.

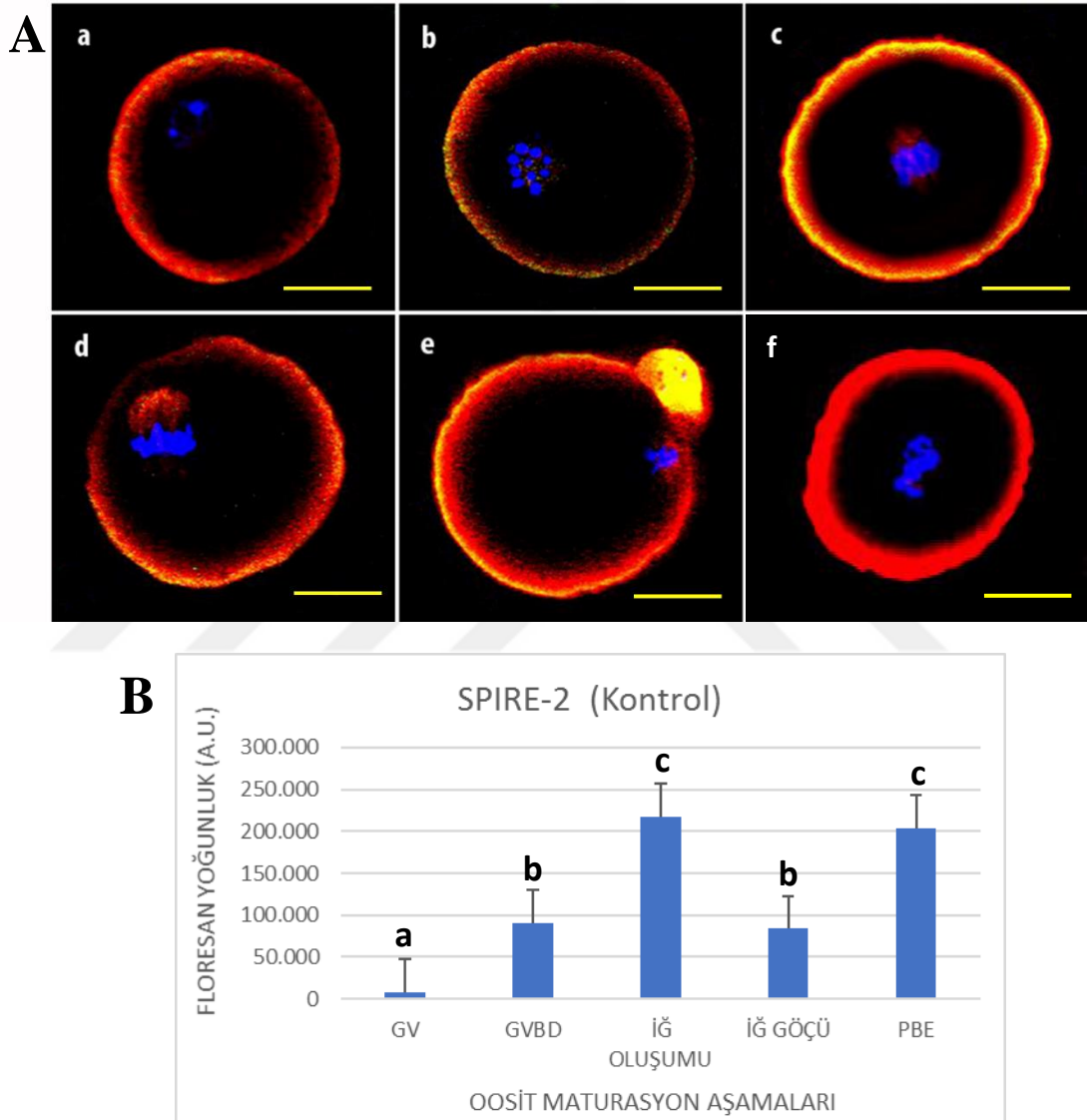
H89 ile MPF aktivasyonu sağlandığında Spire-1 protein seviyesinin oosit maturasyonunun farklı aşamalarında anlamlı fark göstermediği belirlenmiştir. PD98059+H89 grubunda, Spire-1 seviyesinin GVBD aşamada anlamlı şekilde düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.14).



**Şekil 4.14.** SpiRE-1 protein seviyeleri. IVM uygulanan kontrol, PD98059, H89, PD98059+H89 grubu fare oositlerinde SpiRE-1/b-Tubulin protein seviyelerini gösteren Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği ve western blot bantları. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

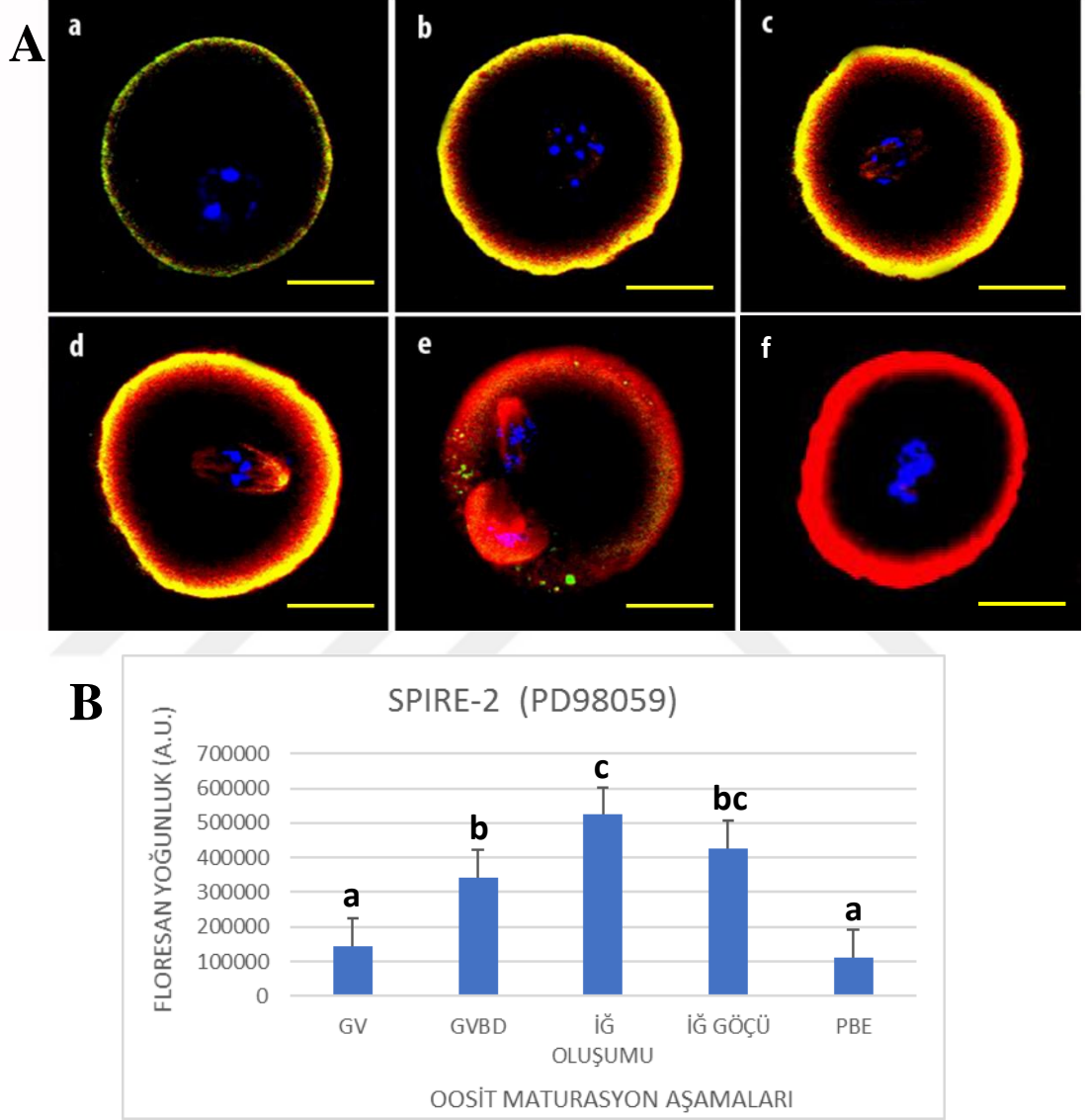
#### 4.8. Spire-2 İmmunofloresan Analizi Bulguları

Kontrol grubunda Spire-2 kortikal floresan yoğunluğunun GV oositlerde en düşük olduğu belirlenmiştir. GVBD aşamasında Spire-2 düzeyinin arttığı, iğ oluşumu ve PBE aşamalarında en yüksek düzeyde olduğu, iğ göçü aşamasında ise bir düşüş meydana geldiği görülmüştür (Şekil 4.15).



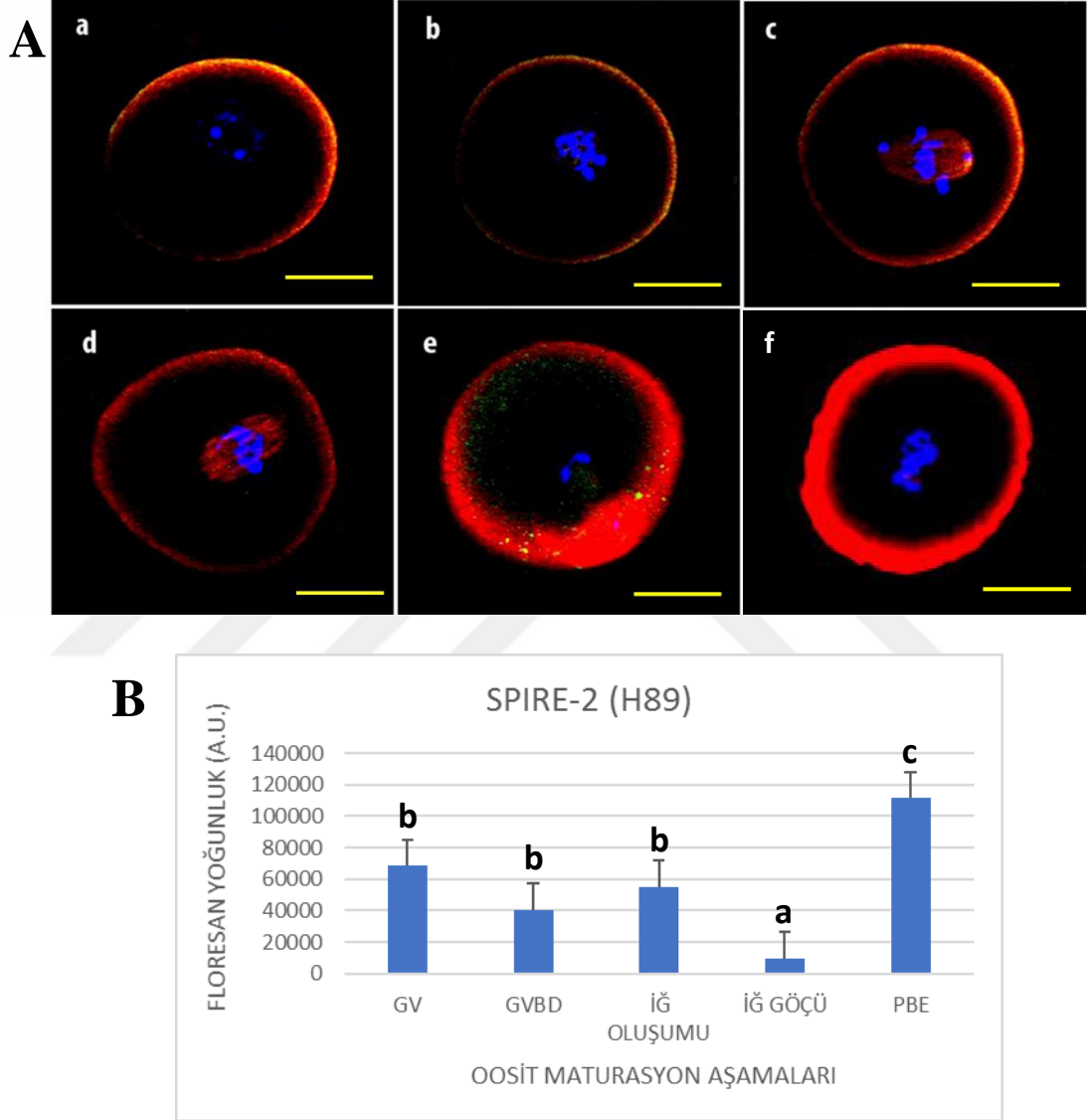
**Şekil 4.15.** In vitro maturasyon uygulanan kontrol grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20 µm. Yeşil: Spire-2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

PD98059 ile MEK inhibisyonunun ardından, Spire-2'nin kortikal floresan yoğunluğunun GV aşamada düşük olduğu, GVBD ve iğ oluşumu aşamalarında artış gösterdiği belirlenmiştir. İğ göçü aşamasında da GV ve PBE'ye göre yüksek düzeyde görülen Spire-2 floresan yoğunluğu, PBE aşamasında diğer aşamalara göre anlamlı bir düşüş göstermiştir (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059 (MEK inhibisyon) grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20 µm. Yeşil: Spire-2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

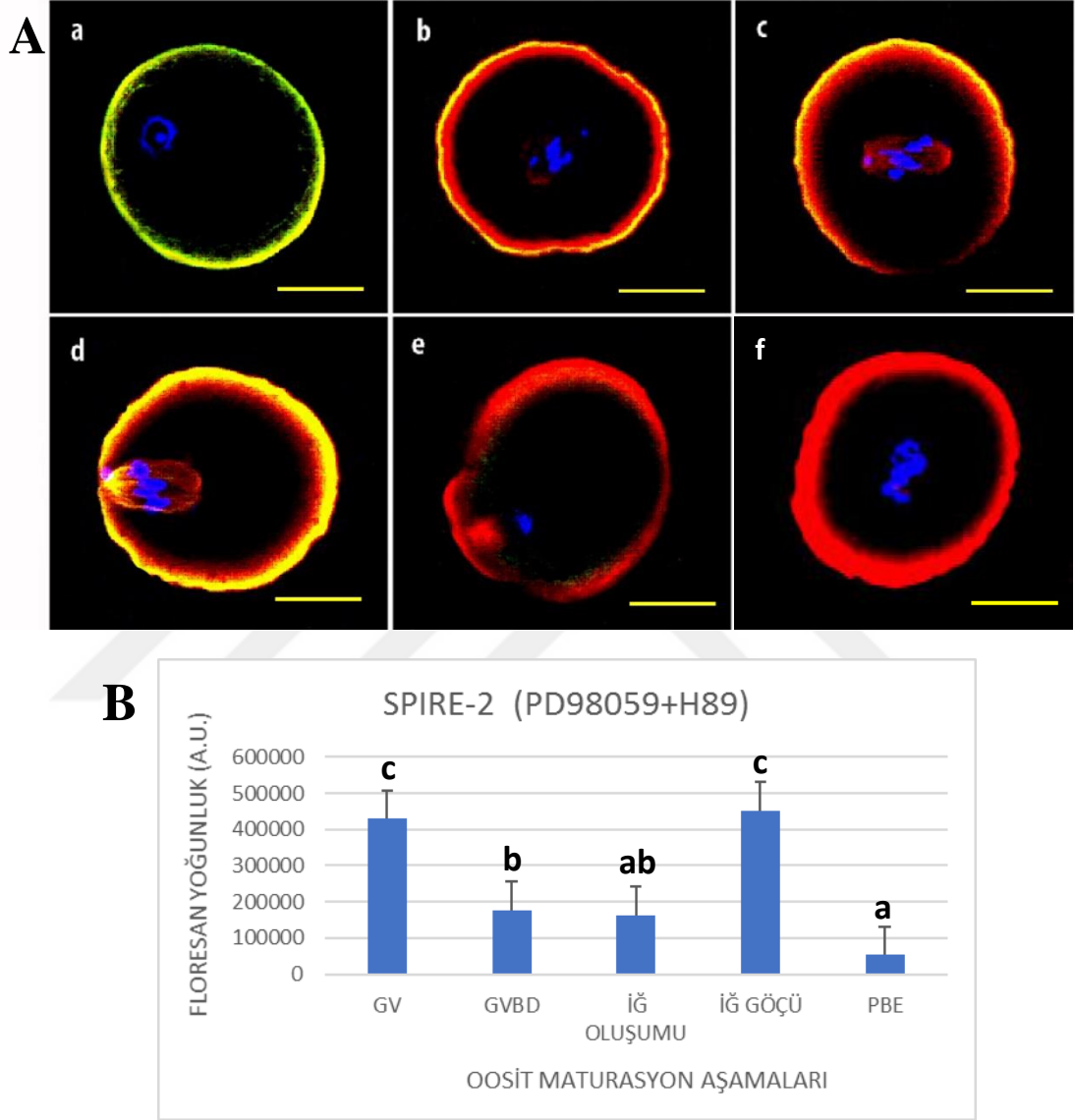
H89 uygulaması ile MPF aktivasyonu yapılan oositlerde Spire-2'nin kortikal floresan yoğunluğunda iğ göçü aşamasında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir. PBE aşamasında Spire-2 seviyesinin en yüksek olduğu görülmüştür. GVBD ve iğ oluşumu aşamalarında Spire-2 boyanma yoğunluğu GV'ye göre düşüktür, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.17).



**Şekil 4.17.** In vitro maturasyon uygulanan H89 (MPF aktivasyon) grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ): a-tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.



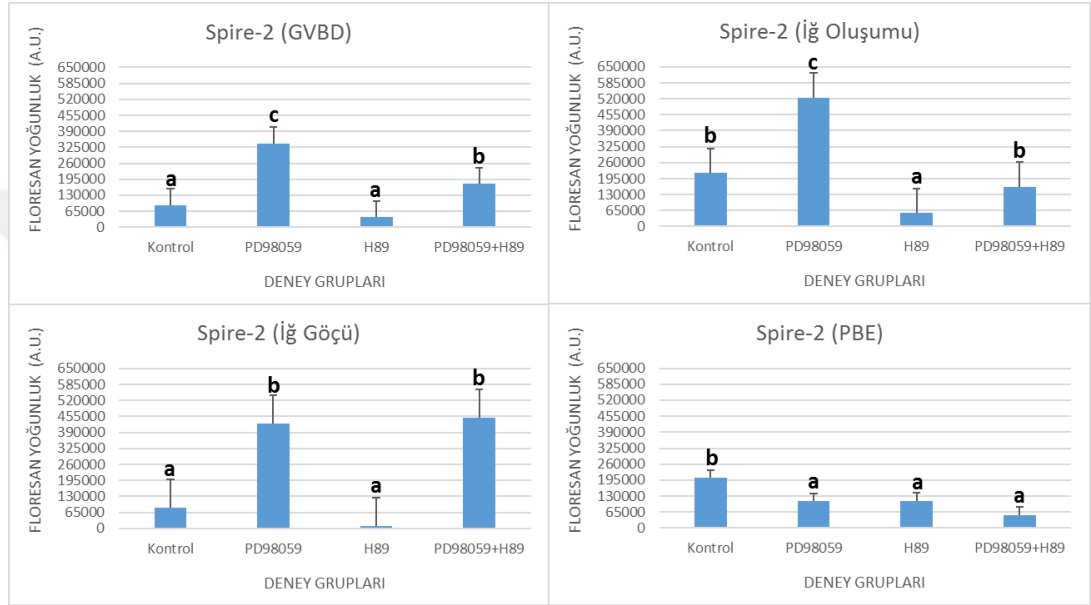
PD98059+H89 grubundaki oositlerde GV ve iğ göçü aşamalarında Spire-2'nin kortikal floresan yoğunluğunun anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür. PBE oositlerde ise Spire-2'nin kortikal floresan yoğunluğunun en düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.18).



**Şekil 4.18.** In vitro maturasyon uygulanan PD98059+H89 grubu oositlerde Spire-2 immunolokalizasyonu. A) GV (a), GVBD (b), iğ oluşumu (c), iğ göçü (d) ve PBE (e) aşamadaki oositler, negatif kontrol (f). Bar: 20  $\mu$ m. Yeşil: Spire-2. Kırmızı (korteks): F-Aktin. Kırmızı (iğ):  $\alpha$ -tubulin. Mavi: Dapi. B) Oositteki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.



Spire-2 boyanma yoğunluğu oosit maturasyonunun farklı aşamalarında değerlendirildiğinde, PD98059 uygulamasının GVBD ve İğ oluşumu aşamalarındaki oositlerde Spire-2 kortikal yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. İğ göçü aşamasında ise hem PD98059 hem de PD98059 ve H89'un birlikte uygulandığı grupta kortikal Spire-2 floresan yoğunluğunun arttığı görülmüştür. PBE aşamasındaki oositlerde kontrol grubundaki kortikal Spire-2 yoğunluğunun diğer gruplara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.19).

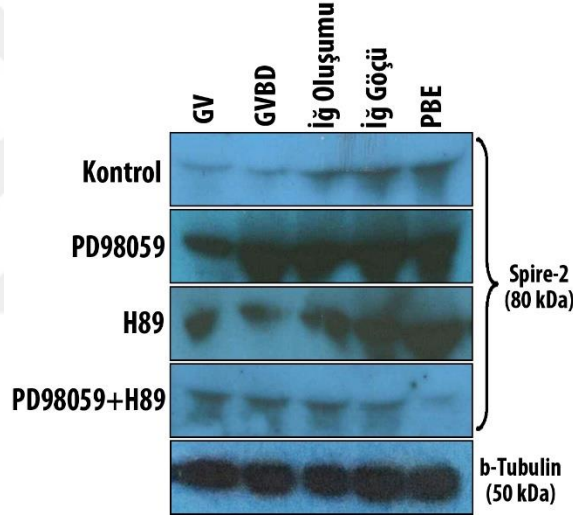
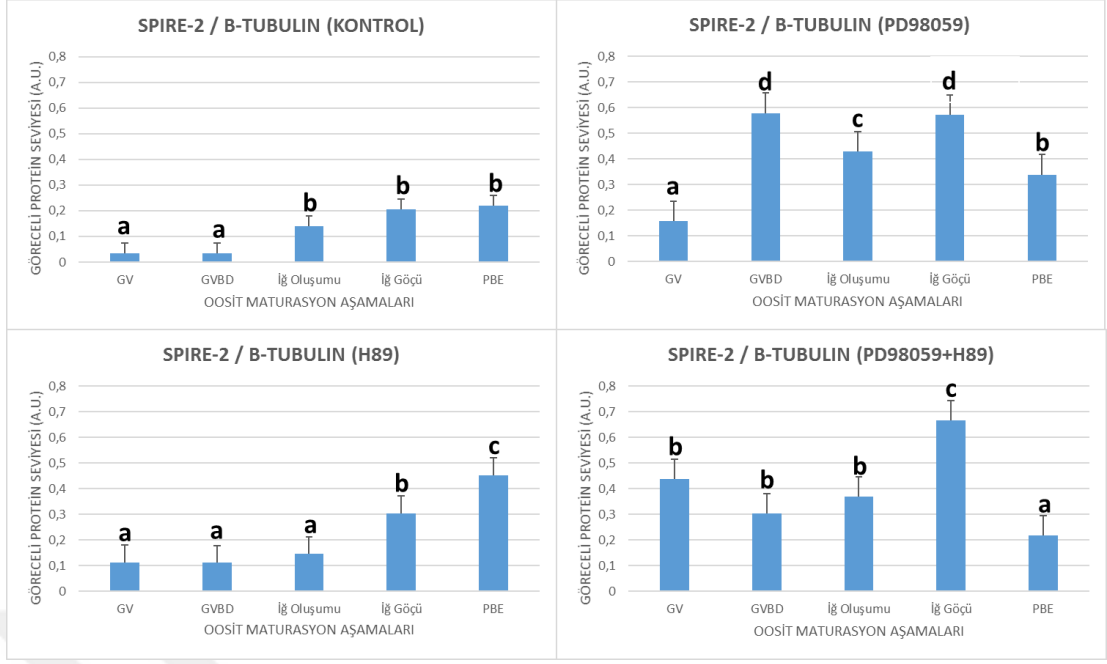


**Şekil 4.19.** Oosit maturasyonunun farklı aşamalarındaki Spire-2 immünboyanmalarının Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

#### **4.9. Spire-2 Western Blot Analizi Bulguları**

Western blot analizi bulgularına göre, kontrol grubunda Spire-2 protein seviyesinin GVBD aşamadan sonra anlamlı şekilde arttığı ve PBE aşamasına kadar yüksek düzeyde kaldığı görülmüştür. PD98059 ile MEK inhibisyonunun ardından, WB analizi ile Spire-2 seviyesinin GV ve PBE aşamalarda maturasyonun diğer aşamalarına göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. H89 ile MPF aktivasyonunun ardından Spire-2 protein seviyesinin PBE aşamasında en yüksek olduğu ve iğ göçü aşamasında diğer aşamalara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PD98059+H89 grubunda Spire-2 seviyesinin iğ göçü aşamasında en yüksek, PBE aşamadaki oositlerde en düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.20).





**Şekil 4.20.** Spire-2 protein seviyeleri. IVM uygulanan kontrol, PD98059, H89, PD98059+H89 grubu fare oositlerinde Spire-2/b-Tubulin protein seviyelerini gösteren Image J analizinden elde edilen matematiksel değerlerin grafiği ve western blot bantları. Farklı harfler istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir ( $p < 0.05$ ) (One way anova, Holm Sidak yöntemi). Tüm gruplar birbirleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış, anlamlı fark olan gruplara ait sütunlara farklı harfler verilmiş, fark görülmeyen gruplara ait sütunlar aynı harf ile işaretlenmiştir. Grafikteki değerler 3 farklı deney sonucunda elde edilen verilerin ortalamasını yansıtmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

Oosit maturasyonu, oositin fertilizasyona hazır hale geldiği ve fertilizasyondan sonra gelişecek olan embriyonun gelişim potansiyelinde etkili olan bir süreçtir. Memeli oositleri tarafından gerçekleştirilen ardarda gelen iki hücre bölünmesi ile maturasyon sürecinde haploid, fonksiyonel bir gamet meydana gelmektedir (Otsuki ve ark., 2012). Oositlerde gerçekleşen mayotik hücre bölünmesi ile erken embriyogenez sırasında meydana gelen somatik hücre bölünmesi arasındaki en önemli fark mayoz bölünmenin asimetrik olarak gerçekleşmesidir (Clift ve Schuh, 2013). Hücrenin bölünme düzleminin iğın konumu tarafından belirlenmesi nedeniyle, mayotik iğın korteks bölgesine doğru göç etmesi memeli gametlerinde asimetrik hücre bölünmesi sürecinin gerçekleşmesi için önemli bir aşamadır (Sun ve Kim, 2013).

Fare oositlerindeki her iki mayotik bölünme de hem yavru hücrelerin boyutları hem de gelişim potansiyelleri açısından asimetriktir. Bu bölünmeler sonucunda oldukça küçük bir hücre olan polar cisimcik ve orijinal boyutunu koruyan oosit oluşmaktadır. İlk polar cisimcik kromozom göçü ekseninde atılır. Oosit periferinde MII iği oluşur ve metafaz duraklaması boyunca plazma membranının altında tutulur (Maro ve Verlhac, 2002). Büyük olan oosit fertilize olarak embriyoya gelişebilirken, küçük polar cisimcikler ise dejenere olur. Bu asimetrik hücre bölünmesi, olgun oositin geniş bir sitoplazmaya sahip olmasını ve sperm girişinin kolaylaşmasını sağlarken, tek bir zona pellusida içerisinde gelişim potansiyeli düşük olan çok sayıda fertilize olmuş oosit oluşumunu önlemek için gereklidir (Otsuki ve ark., 2012).

Hücre iskeleti elemanlarından aktinin murin (Longo ve Chen, 1985) ve domuz (Kim ve ark., 1996) oositleri dahil olmak üzere memeli oositlerinde gerçekleşen asimetrik bölünmenin temel itici gücü olduğu bilinse de, bugüne kadar yapılan çalışmalarda aktin hücre iskeleti yeniden modellenmesinin hangi mekanizmalar ile oositteki asimetrik bölünmeye katkıda bulunduğu henüz ortaya çıkarılamamıştır (Namgoong ve Kim, 2016).

Oositte aktin nukleasyonu başarılı bir maturasyon süreci ve ardından gelen embriyonik gelişim için önemlidir. Oositte gerçekleşen asimetrik hücre bölünmesi aktin ağı ile büyük ölçüde ilişkilidir ve dolayısıyla aktin nukleasyonu sağlayan

proteinlerin bu süreçte önemli rolleri vardır (Namgoong ve Kim, 2016). Aktin nukleasyonu sağlayıcı proteinler FMN2, Spire-1 ve Spire-2'nin fare oositlerindeki varlığı önceki çalışmalarda belirlenmiştir (Leader ve ark., 2002; Pfender ve ark., 2011). Bu proteinleri birbirleriyle olan etkileşimleri açısından inceleyen çalışmalar da yapılmıştır (Pfender ve ark., 2011; Montaville ve ark., 2014). Bu çalışmada ise aktin nukleasyonu sağlayan bu proteinlerin lokalizasyonunu ve miktarını etkileyen düzenleyici faktörlerin neler olduğu araştırılmıştır.

Farede mayoz I sırasında iğın PBE bölgesinde belirleyici olan kortikal bölgeye göçü oosit polaritesinin oluşmasında ilk adım olarak kabul edilir (Verlhac ve ark., 2000). Sitoplazmik aktin filamanlarının düzenlenmesi ile yönetilen bu süreçte FMN2 önemli bir rol oynar (Yi ve Li, 2012). FMN2 yokluğunda metafaz iğının doğru konumu alması gerçekleşemez, gebelik kayıpları ve infertilite meydana gelir (Leader ve ark., 2002). FMN2 izotropik, dinamik bir sitoplazmik ağıın oluşumu için gereklidir ancak aktin düzenlenmesinin hangi mekanizma ile iğın konumunu almasını sağladığı henüz tam olarak bilinmemektedir (Azoury ve ark., 2011).

Bu çalışmada gerçekleştirilen hem IF hem de WB analizleri sonucunda, IVM süresince herhangi bir inhibitör uygulamanın yapılmadığı kontrol grubunda FMN2 seviyesinin GV aşamadan GVBD'ye geçtiğinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular FMN2'nin GVBD sürecinde etkili olabileceğini göstermesinin yanında, GVBD'den sonra gerçekleşecek olan iğ oluşumu ve iğ göçü aşamaları için gerekli olan FMN2 protein sentezinin bu aşamada gerçekleştiğini düşündürmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar formin ailesi üyesi proteinlerin GVBD'de rolü olabileceğini göstermiştir (Gao ve ark., 2017). İğ oluşumu aşamasında ise hem IF hem de WB analizi FMN2 seviyesinin düştüğünü göstermiş, IF ile FMN2'nin bu aşamada spesifik olarak iğ çevresinde lokalize olduğu görülmüştür. İğ göçü ve PBE süresince de iğ çevresinde lokalize olmaya devam ettiği görülen FMN2'nin oositte iğ çevresinde lokalize olduğu önceki çalışmalarda da gösterilmiştir (Yi ve ark., 2013). FMN2'nin aynı zamanda, oosit maturasyonu sırasında dinamik olarak değişen ve iğ göçü için gerekli olan sitoplazmik aktin ağıının oluşumundan da sorumlu olduğu bilinmektedir (Azoury ve ark., 2008; Holubcova ve ark., 2013). İğ göçü ve PBE aşamalarında, iğ oluşumu aşamasına göre hem IF hem de WB analizi ile gösterilen

artışın bu aşamalarda artan kromozom sinyali (Li ve Albertini, 2013) ile ilişkili olabileceği ve özellikle iğ çevresinde lokalize olan FMN2'nin bu bölgedeki kromozom sinyali ile etkileşim halinde olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ilk grupta MEK'in IVM süresince kimyasal inhibitörü PD98059 ile inhibe edilmesinin ardından hem IF hem de WB verilerine göre GVBD aşamada GV'ye göre artış gözlenmesi nedeniyle MAPK sinyalinin FMN2 üzerinde bu aşamada etkili olmadığını düşündürmektedir. Ancak MEK inhibitörünün PBE aşamasındaki oositlerde FMN2 seviyesini düşürdüğü görülmüştür ve bu nedenle MAPK sinyalinin PBE aşamasındaki oositlerde FMN2 düzeyini etkilediği düşünülmektedir. GVBD ve PBE oranlarına bakıldığında, PD98059 grubunda yalnızca PBE oranlarının etkilenmiş olması bu bulguları doğrulamaktadır. Daha önce yapılan çalışmalar da MAPK ile PBE ilişkisini göstermektedir (Tong ve ark., 2003). Bu çalışmada elde edilen bulgular MAPK'ın PBE üzerindeki bu etkisinin FMN2 aracılığı ile gerçekleştiriyor olabileceğini göstermektedir. MEK inhibisyonu ile aynı zamanda iğ oluşumu aşamasında iğ çevresinde lokalize olan FMN2 seviyesinin azalmış olması, MAPK sinyalinin FMN2'nin iğ çevresinde lokalize olmasını sağlayan kromozom sinyali ile etkileşim halinde olabileceğini düşündürmektedir.

İkinci deney grubumuz olan PKA inhibitörü H89 uygulaması ise kontrol grubundan farklı olarak iğ göçü aşamasında FMN2 seviyesinde düşüşe neden olmuştur. Bu çalışmada PKA inhibitörü MPF aktivasyonu sağlaması amacıyla kullanılmış olsa da PKA'nın hücre iskeleti organizasyonundaki potansiyel rolleri düşünüldüğünde (Matsuoka ve ark., 1996), iğ göçü aşamasında FMN2 düzeyinde gerçekleşen bu düşüşün PKA inhibisyonu nedeniyle olabileceği düşünülmektedir.

Son deney grubumuzda ise IVM medyumuna MEK inhibitörü ile MPF aktivatörünün aynı anda eklenmesi ile PBE aşamasında FMN2 seviyesindeki düşüş önlenmiştir. Bu bulgular MPF'nin aktive edilmesinin, FMN2 ekspresyonu açısından MEK inhibisyonunu telafi edebileceğini göstermektedir. Bu durumda MAPK sinyalinin FMN2 üzerindeki etkisi MPF aktivasyonu üzerinden dolaylı bir şekilde gerçekleşiyor olabilir. MPF'nin MAPK sinyali tarafından aktive edildiği bilindiğinden (Ohashi ve

ark., 2003), MPF'nin MAPK aracılı aktivasyonu oositlerde FMN2 protein seviyesinin artmasına neden olabilir.

FMN2 oosit maturasyonu ile ilişkili olduğu gösterilen ilk aktin nukleasyonu sağlayıcı proteindir (Leader ve ark., 2002). Farede FMN2'nin "knockout" edilmesi iğ göçünün ve fertilizasyonun başarısız olmasına neden olur ve MI aşamasında gerçekleşen duraklamaya bağlı olarak gerçekleşen poliploidiye neden olur (Leader ve ark., 2002; Dumont ve ark., 2007). Oosit maturasyonu süresince FMN2'nin kortkste (Azoury ve ark., 2008) ve intraselüler veziküllerde (Schuh, 2011; Holubcova ve ark., 2013) lokalize olduğu gösterilmiştir. Forminin fare homologu olan *Drosophila diaphanous* (mDia) formin ailesi de dahil olmak üzere formin ailesine dahil olan pekçok protein otoinhibitör mekanizmalar ile kontrol edilir ve Rho ailesi GTPaz RHOA tarafından aktive edilir (Goode ve Eck, 2007) ancak FMN2'yi kontrol eden spesifik mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemektedir.

FMN2'nin etkileşim içerisinde olduğu bilinen diğer iki protein Spire ve profilindir (Dahlgaard ve ark., 2007). Fare oositlerinde yapılan aşırı ekspresyon çalışmaları Spire ve FMN2'nin iğ translokasyonunu gerçekleştirmek üzere fonksiyonel bir birimde iş birliği yaptıklarını göstermiştir (Pfender ve ark., 2011). Floresan füzyon proteinleri ile yapılan çalışmalar oosit yüzeyinde, sitoplazmasında ve bölünme çizgisinde hem Spire-1 hem de Spire-2'nin FMN2 ile kolokalizasyon gösterdiğini belirlemiştir (Vizcarra ve ark., 2011; Montaville ve ark., 2014).

Bu çalışmadaki WB analizine göre GV ve GVBD aşamalarındaki Spire-1 seviyeleri birbirine yakın olmasına rağmen, IF verilerine göre Spire-1 seviyesi GVBD aşamasında GV'ye göre düşüş göstermiştir. Bu bulgular bize Spire-1 protein düzeyini belirlemek üzere kullanılan antikorun IF uygulamasında sitoplazmik lokalizasyonunu belirleyemediğini düşündürmüştür. Daha önceki çalışmalarda Spire-1'in sitoplazmada yer alan Rab-11a ile ilişkili veziküllerde yer aldığı belirlendiğinden (Holubcova ve ark., 2013) vezikül içerisinde yer alan Spire-1'in IF ile tespit edilemediği düşünülmektedir. Bu nedenle bu çalışmada Spire-1 proteini ile ilgili IF bulguları Spire-1'in kortikal düzeyi, WB bulguları ise total düzeyi olarak değerlendirilmiştir.

Spire-1'in kortikal düzeyi GVBD ve iğ oluşumu sırasında düşük olsa da total düzeyinin daha yüksek olması, bu aşamalarda Spire-1'in daha çok sitoplazmada lokalize olabileceğini düşündürmektedir. Önceki çalışmalarda FMN2 ile birlikte iğ göçünde görev aldığı belirtilen Spire-1 (Holubcova ve ark., 2013), maturasyonun belirli aşamalarında sitoplazmada lokalize olduğu belirlenen FMN2 (Yi ve ark., 2013) ile birlikte görev yapıyor olabilir. İğ göçü aşamasında hem IF hem de WB verilerine göre Spire-1 düzeyinin düşük olması, bu aşamada Spire-1'in etkili olmadığını düşündürmektedir.

MEK inhibisyonunun PBE aşamasındaki oositlerde yalnızca kortikal Spire-1 seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Önceki çalışmalarda Spire proteininin PBE ile ilişkili olduğu gösterildiğinden (Pfender ve ark., 2011), çalışmamızda oositlerdeki PBE oranının düşmesinde Spire-1'in kortikal seviyesinin düşmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. H89 ile MPF aktivasyonu sonucu total Spire-1 seviyesi maturasyonun farklı aşamalarında benzer şekilde iken, iğ göçü aşamasında kortikal düzeyde anlamlı bir düşüş gözlenmemiştir. Bu bulgular MPF aktivasyonunun iğ göçü sırasında Spire-1'in kortikal alanda kalmasını sağladığını düşündürmektedir.

PD98059+H89 grubunda, yalnızca PD98059 uygulandığı durumda görülen PBE aşamasındaki kortikal Spire-1'deki düşüş görülmemiştir. Bu nedenle H89 ile MPF'nin aktive edilmesinin, MEK inhibisyonunu telafi ettiği düşünülmektedir. Bu bulgular, Spire-1 üzerindeki MAPK sinyali etkisinin MPF aktivasyonu üzerinden indirekt olarak gerçekleşiyor olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada Spire-2 proteini de IF ile yalnızca oositin kortikal bölgelerinde tespit edilebilmiştir. Önceki çalışmalarda da Spire-2 proteininin negatif yüklü hücre membranına yüksek afinite gösterdiği belirlenmiştir (Tittel ve ark., 2015). Çalışmamızda Spire-1'in aksine Spire-2'nin kortikal seviyesi GV aşamadan GVBD aşamaya geçildiğinde artış göstermiştir ve bu nedenle Spire-2'nin GVBD aşamasında kortikal alanda etkili olduğu düşünülmektedir. IF boyanmaları Spire-2'nin kortikal lokalizasyonunun iğ göçü aşamasında azaldığını gösterirken, WB analizine göre total protein seviyesinde herhangi bir düşüş olmaması, Spire-2'nin iğ göçü aşamasında sitoplazmik alanda yer aldığını düşündürmektedir. Önceki yıllarda yapılan



çalışmalarda da Spire-2'nin sitoplazmik veziküller ile ilişkili olarak sitoplazmada yer aldığı gösterilmiştir (Holubcova ve ark., 2013).

PD98059 ile MEK inhibisyonu Spire-2'nin PBE ařamasındaki oositlerde hem kortikal hem de total düzeyinde azalmaya neden olmuřtur. Bu bulgular MAPK sinyalinin Spire-2 seviyesi üzerinde PBE ařamasında etkili olduđunu göstermektedir. H89 ile MPF aktive edildiđinde GVBD ve iđ oluřumu ařamalarında Spire-2'nin hem kortikal hem de total düzeyinin dūřuk olmasının, PKA'nın hücre iskeleti ile olan iliřkisi dūřünüldüđünde (Gao ve ark., 2017), H89 ile PKA'nın inhibe edilmesinden kaynaklandıđı dūřünülmektedir. MPF aktivasyon grubunda PBE ařamadaki oositlerde daha yüksek Spire-2 protein seviyesi gözlemlenmiř, bu nedenle MPF aktivasyonunun özellikle bu ařamada Spire-2 seviyesini artırdıđı dūřünülmüřtür.

Hem PD98059 hem de H89 uygulandıđında, PBE oositlerde Spire-2 düzeyi dūřtüđü gözlemlendiđinden, MPF aktivasyonunun MEK inhibisyonunu Spire-2 düzeyi ačasından telafi edemediđi dūřünülmüřtür. Bu nedenle MAPK sinyalinin Spire-2 üzerindeki etkisinin, MPF ile etkileřim olmaksızın, dođrudan gerçekleřiyor olabileceđi dūřünülmektedir.

Farede Spire-1 ve Spire-2'nin "knockdown" edilmesinin oosit maturasyonunu bloke ettiđi ve aktin ađının oluřumunu engellediđi bilinmektedir (Pfender ve ark., 2011) ve bu fenotip FMN2 "knockdown" fenotipi ile benzerlik göstermektedir (Leader ve ark., 2002) FMN2 (Drosophila'da Cappucino) ve Spire arasındaki evrimsel olarak korunmuř protein-protein etkileřimine ve bu proteinlerin Drosophila (Quinlan ve ark., 2005) ve fare oositlerindeki (Pfender ve ark., 2011) kolokalizasyonuna dayanarak FMN2 ve Spire'in aktin nukleasyonunu gerçekleřtirmek üzere hem Drosophila hem de memeli oositlerinde tek bir birim olarak iřlev gördükleri dūřünülmektedir.

Hücre siklusu boyunca M-fazı MPF'nin aktivasyonu ve inaktivasyonu ile kontrol edilir (Masui ve Markert, 1971). MPF'nin regülatör bileşeni olan siklin B'nin (Doree ve Hunt, 2002) sentezi ve degradasyonu ile gerçekleşen konsantrasyon değişikliği MPF aktivitesinin kontrolünde büyük bir öneme sahiptir (Murray ve Kirschner, 1989). Mitotik siklinler hücre siklusu boyunca sentezlenirler ve metafaz-anafaz

geçişinde kısa bir süreliğine (Evans ve ark., 1983) 6 ubikutin yolağı ile yıkılırlar (Glotzer ve ark., 1991). Oositte mayotik maturasyon süresince meydana gelen, iki asimetrik hücre bölünmesi ile sonuçlanacak olan tüm hücreyel olayların zamanında gerçekleşmesi oldukça önemlidir. Mayotik maturasyonun zamanlamasının kontrolü daha çok siklin B'ye bağlıdır. Siklin B seviyesindeki değişiklik MPF aktivitesinde yol açtığı değişiklikler ile hem mayoz süresince hücre siklusu fazlarının zamanlamasını hem de fonksiyonel mayotik iğ oluşumu ve asimetrik bölünme ile ilişkili olayları kontrol eder (Brunet ve Maro, 2005).

MPF, GVBD sırasında aktive olur ve ilk mayozun M fazında platoya erişinceye kadar artmaya devam eder (Verlhac ve ark., 1994). Mayoz I'den Mayoz II'ye geçiş sırasında MPF aktivitesinde geçici bir düşüş meydana gelir. Mayoz II'ye geçiş için MPF hızlıca tekrar aktive edilir ve metafaz II duraklaması boyunca yüksek bir seviyede tutulur. Olgunlaşmamış oosit çok küçük bir miktar, yalnızca ilk mayozun M fazına girmeye yetecek kadar siklin B içerir (Ledan ve ark., 2001). GVBD'den hemen önce germinal vezikül içerisine girer (Marangos ve Carroll, 2004). GVBD'nin ardından siklin B sentezini seviyesi sürekli artar ve ilk mayozun M fazının sonunda maksimum düzeye ulaşır ve yeni sentezlenen protein aktif bir kompleks oluşturmak üzere hemen p34cdk1 kinaz ile birleşir (Hampl ve Eppig, 1995). PBE için siklin B degradasyonu gereklidir (Ledan ve ark., 2001).

MPF aktivitesinin oositte fonksiyonel bir iğ oluşumunu kontrol ettiği belirlenmiştir. MPF'nin aynı zamanda iğın konumunu da dolaylı olarak kontrol ediyor olabileceği düşünülmektedir. Kinetokor aktivasyonunda olduğu gibi, iğ göçü de ancak MPF aktivitesi yüksek seviyeye ulaştığında başlar. Bu nedenle MPF'nin mikrofilamanlar ile ilişkili olan proteinlerin aktivitesini kontrol edebileceği ve böylece iğ göçünü indükleyebileceği düşünülmektedir (Satterwhite ve ark., 1992). Ancak bu sürece dahil olan mekanizmalar ve moleküller henüz tam olarak bilinmemektedir.

Mayotik bölünmede asimetrinin ortadan kalkması, daha genel olarak oosit hücre iskeletinin organizasyon bozukluğu gametlerin yaşlanması veya düşük kalitede olması ile karakterizedir (Diaz ve Esponda, 2004). Hücre iskeletindeki bu organizasyon bozukluğunun tam olarak hangi moleküler mekanizmalardan ve

maturasyonun hangi aşamalarında etkilendiğinin belirlenmesi bu organizasyon bozukluğunun önüne geçmek veya düzeltilebilmesini sağlamak açısından önemlidir. Bu çalışmada elde edilen bulgular MPF ve MAPK'ın aktin düzenleyici moleküller üzerinde maturasyonun belirli aşamalarında etki göstererek bu süreçte yer aldıkları belirlenmiştir.

Memeli oositlerinde MAPK ve MPF aktivitesi maturasyon süresince dalgalanma gösterir ve en yüksek seviyede oldukları iki nokta MI ve MII metafaz aşamalarıdır (Wehrend ve Meinecke, 2001). MAPK mayoz süresince mikrotübül dinamiklerinin kontrol edilmesinde (Minshull ve ark., 1994) ve birinci polar cisimciğin boyutunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Choi ve ark., 1996). Farelerde oosit maturasyonu süresince MAPK aktivitesinin mikrotübül ve kromatin organizasyonu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Verlhac ve ark., 1994). *c-mos* "knockout" farelerde oositlerin anormal iğ dağılımına sahip olduğu görülmüştür (Araki ve ark., 1996). MEK inhibitörü U0126'nın neden olduğu mayotik anomaliler, MEK'in asimetric bölünmedeki önemli rollerini ortaya koymuştur (Tong ve ark., 2003)

Memeli oositleri p44ERK1 ve p42ERK2 olmak üzere MAPK'ın iki izoformunu içerir. Çok sayıda çalışma bu kinazların varlığının ve aktivasyonunun oositin mayotik maturasyonu sürecinde gerekli olduğunu göstermiştir (Fan ve Sun, 2004). MAPK sinyali, oositte mazyozun sürekliliğini devam ettiren temel sinyal yollarından biri olduğu ve MPF ile ilişkili olarak fonksiyon yaptığı bilinmektedir (Villa-Diaz ve Miyano, 2004). Ancak MAPK ile MPF arasındaki ilişkinin aktin nukleasyonu sağlayan moleküller üzerindeki etkisinin ne şekilde olduğu bu çalışma ile ilk kez ortaya konmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda MAPK sinyalinin aktin nukleasyonu sağlayan FMN2, Spire-1 ve Spire-2 proteinlerini oosit maturasyonunun belirli aşamalarında etkilediği gösterilmiştir. Bu çalışmanın bulgularına göre, MAPK sinyalinin bu etkisi Spire-2 proteini için doğrudan, FMN2 ve Spire-1 için ise MPF üzerinden dolaylı bir etkidir. Aktin nukleasyonu sağlayan bu proteinlerin oosit maturasyonunda ne şekilde kontrol edildiklerinin anlaşılabilmesi için, MAPK sinyalinin etkilediği diğer sinyal yolları

ve oositin hücre siklusunda görevli kilit moleküllerden biri olan siklin B ile olan ilişkilerinin belirlenmesi gereklidir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen bulgular ile oositin mayotik ve sitoplazmik maturasyonunu etkileyen mekanizmalar arasında nasıl bir ilişki kurulduğu ortaya konmuş, oositin asimetrik bölünmesinde görevli olan aktin nukleasyonu sağlayan proteinlerin bu mekanizmalardan nasıl etkilendiği gösterilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, aktin nukleasyonu sağlayan FMN2, Spire-1 ve Spire-2 proteinlerinin oosit maturasyonunun belirli aşamalarında MAPK sinyali tarafından etkilendiği belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen verilere göre, FMN2 ve Spire-1 proteinleri MAPK sinyali tarafından MPF aracılı olarak etkilenirken, Spire-2 proteini MAPK sinyalinden doğrudan etkilenmektedir. Oosit maturasyonu sırasında aktin nukleasyonu sağlayan bu proteinleri kontrol eden mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için, MAPK sinyalinin oositte etkilediği diğer sinyal yolları ve oositin hücre siklusunda görevli kilit moleküllerden biri olan siklin B ile olan ilişkilerinin belirlenmesi gereklidir.

Oosit maturasyonunun hem nuklear hem de sitoplazmik açıdan hatasız gerçekleşmesi, kusursuz bir embriyonik gelişimin ilk basamağıdır. Oositin mayotik bölünmesi sırasında gerçekleşen kromozom ayrılma hatalarının embriyonik gelişim problemlerine ve Down Sendromu gibi anomalilere neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca gebelik kayıpları ve maternal yaşa bağlı olarak gerçekleşen genetik hastalıkların kökenlerinin oositin mayotik iğ yapısındaki veya erken embriyonik mitotik iğ yapısındaki hatalardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Oositin asimetrik bölünmesi sırasında iğın doğru şekilde konumlanmasını sağlayan aktin nukleasyonu sağlayıcı moleküller sadece oosit maturasyonunun başarılı bir şekilde tamamlanmasına aracılık etmekle kalmaz, aynı zamanda embriyonun hatasız gelişimine de katkı sağlarlar. Bu nedenle oositte aktin nukleasyonu sağlayan moleküllerin oosit içerisinde ve çevre kumulus hücrelerinde yer alan potansiyel düzenleyicileri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç vardır.

## KAYNAKLAR

- Abel, M. H., Wootton, A. N., Wilkins, V., Huhtaniemi, I., Knight, P. G., Charlton, H. M. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*. 2000; 1415: 1795-1803.
- Adhikari, D., Liu, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol Cell Endocrinol*. 2014; 3821: 480-487.
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Hamalainen, T., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., Lan, Z. J., Liu, K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2010; 193: 397-410.
- Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Ning, Y., Halet, G., Kaldis, P., Liu, K. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Hum Mol Genet*. 2012; 2111: 2476-2484.
- Akkoyunlu, G., Demir, R., Ustunel, I. Distribution patterns of TGF-alpha, laminin and fibronectin and their relationship with folliculogenesis in rat ovary. *Acta Histochem*. 2003; 1054: 295-301.
- Allen, J. F., de Paula, W. B. Mitochondrial genome function and maternal inheritance. *Biochem Soc Trans*. 2013; 415: 1298-1304.
- Almonacid, M., Terret, M. E., Verlhac, M. H. Actin-based spindle positioning: new insights from female gametes. *J Cell Sci*. 2014; 127Pt 3: 477-483.
- Amiel, A., Leclere, L., Robert, L., Chevalier, S., Houliston, E. Conserved functions for Mos in eumetazoan oocyte maturation revealed by studies in a cnidarian. *Curr Biol*. 2009; 194: 305-311.
- Anderson, R., Copeland, T. K., Scholer, H., Heasman, J., Wylie, C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mech Dev*. 2000; 911-2: 61-68.

Araki, K., Naito, K., Haraguchi, S., Suzuki, R., Yokoyama, M., Inoue, M., Aizawa, S., Toyoda, Y., Sato, E. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biol Reprod.* 1996; 556: 1315-1324.

Aspenstrom, P. Formin-binding proteins: modulators of formin-dependent actin polymerization. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 18032: 174-182.

Atwood, C. S., Vadakkadath Meethal, S. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 430: 33-48.

Azoury, J., Lee, K. W., Georget, V., Hikal, P., Verlhac, M. H. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development.* 2011; 13814: 2903-2908.

Azoury, J., Lee, K. W., Georget, V., Hikal, P., Verlhac, M. H. Symmetry breaking in mouse oocytes requires transient F-actin meshwork destabilization. *Development.* 2011; 13814: 2903-2908.

Azoury, J., Lee, K. W., Georget, V., Rassinier, P., Leader, B., Verlhac, M. H. Spindle positioning in mouse oocytes relies on a dynamic meshwork of actin filaments. *Curr Biol.* 2008; 1819: 1514-1519.

Babayev, E., Seli, E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015; 273: 175-181.

Basaklar, A. C., Ed. Langman medikal embriyoloji. 1995. Ankara, Palme Yayıncılık.

Baum, B., Kunda, P. Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. *Curr Biol.* 2005; 158: R305-308.

Bentov, Y., Yavorska, T., Esfandiari, N., Jurisicova, A., Casper, R. F. The contribution of mitochondrial function to reproductive aging. *J Assist Reprod Genet.* 2011; 289: 773-783.

Besecke, L. M., Guendner, M. J., Sluss, P. A., Polak, A. G., Woodruff, T. K., Jameson, J. L., Bauer-Dantoin, A. C., Weiss, J. Pituitary follistatin regulates activin-mediated production of follicle-stimulating hormone during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 1997; 1387: 2841-2848.

Besmer, P., Manova, K., Duttlinger, R., Huang, E. J., Packer, A., Gyssler, C., Bachvarova, R. F. The kit-ligand (steel factor) and its receptor c-kit/W: pleiotropic roles in gametogenesis and melanogenesis. *Dev Suppl*. 1993: 125-137.

Betschinger, J., Knoblich, J. A. Dare to be different: asymmetric cell division in *Drosophila*, *C. elegans* and vertebrates. *Curr Biol*. 2004; 1416: R674-685.

Biggins, S., Walczak, C. E. Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr Biol*. 2003; 1311: R449-460.

Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*. 2014; 941: 235-263.

Blanchoin, L., Pollard, T. D. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*. 2002; 412: 597-602.

Bor, B., Vizcarra, C. L., Phillips, M. L., Quinlan, M. E. Autoinhibition of the formin Cappuccino in the absence of canonical autoinhibitory domains. *Mol Biol Cell*. 2012; 2319: 3801-3813.

Bornslaeger, E. A., Mattei, P., Schultz, R. M. Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev Biol*. 1986; 1142: 453-462.

Breitsprecher, D., Jaiswal, R., Bombardier, J. P., Gould, C. J., Gelles, J., Goode, B. L. Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science*. 2012; 3366085: 1164-1168.

Brunet, S., Maria, A. S., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J. Z., Maro, B. Kinetochores 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.* 1999; 1461: 1-12.

Brunet, S., Maro, B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction.* 2005; 1306: 801-811.

Brunet, S., Vernos, I. Chromosome motors on the move. From motion to spindle checkpoint activity. *EMBO Rep.* 2001; 28: 669-673.

Carabatsos, M. J., Sellitto, C., Goodenough, D. A., Albertini, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol.* 2000; 2262: 167-179.

Casas, E., Betancourt, M., Bonilla, E., Duculomb, Y., Zayas, H., Trejo, R. Changes in cyclin B localisation during pig oocyte in vitro maturation. *Zygote.* 1999; 71: 21-26.

Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., DePinho, R. A. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science.* 2003; 3015630: 215-218.

Castrillon, D. H., Wasserman, S. A. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development.* 1994; 12012: 3367-3377.

Chen, Q., Nag, S., Pollard, T. D. Formins filter modified actin subunits during processive elongation. *J Struct Biol.* 2012; 1771: 32-39.

Chen, Z., Kang, X., Wang, L., Dong, H., Wang, C., Xiong, Z., Zhao, W., Jia, C., Lin, J., Zhang, W., Yuan, W., Zhong, M., Du, H., Bai, X. Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *J Biol Chem.* 2015; 29010: 6387-6396.

Chesarone, M. A., DuPage, A. G., Goode, B. L. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 111: 62-74.

Chesnel, F., Eppig, J. J. Synthesis and accumulation of p34cdc2 and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis. *Mol Reprod Dev.* 1995; 404: 503-508.

Chiquoine, A. D. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *Anat Rec.* 1954; 1182: 135-146.

Cho, W. K., Stern, S., Biggers, J. D. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J Exp Zool.* 1974; 1873: 383-386.

Choi, T., Fukasawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borror, K., Resau, J., Vande Woude, G. F. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 9314: 7032-7035.

Chuma, S., Hosokawa, M., Tanaka, T., Nakatsuji, N. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 3061-2: 17-23.

Clift, D., Schuh, M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 149: 549-562.

Combelles, C. M., Carabatsos, M. J., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Albertini, D. F. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Mol Reprod Dev.* 2004; 693: 347-355.

Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F., Mehats, C., Chun, S. Y., Horner, K., Jin, C., Tsafiriri, A. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 1871-2: 153-159.

Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M., Oh, J. S. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 3561-2: 65-73.

Cowan, C. R., Hyman, A. A. Asymmetric cell division in *C. elegans*: cortical polarity and spindle positioning. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004; 20: 427-453.

Dahlgaard, K., Raposo, A. A., Niccoli, T., St Johnston, D. Capu and Spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the Drosophila oocyte. *Dev Cell*. 2007; 134: 539-553.

Dalcik, H., Ed. Klinik yönleriyle insan embriyolojisi. 2009. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.

de Paula, W. B., Agip, A. N., Missirlis, F., Ashworth, R., Vizcay-Barrena, G., Lucas, C. H., Allen, J. F. Female and male gamete mitochondria are distinct and complementary in transcription, structure, and genome function. *Genome Biol Evol*. 2013; 510: 1969-1977.

Dekel, N., Beers, W. H. Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 759: 4369-4373.

Demeestere, I., Streiff, A. K., Suzuki, J., Al-Khabouri, S., Mahrous, E., Tan, S. L., Clarke, H. J. Follicle-stimulating hormone accelerates mouse oocyte development in vivo. *Biol Reprod*. 2012; 871: 3, 1-11.

Demir, R., Ed. Histoloji ve hücre biyolojisi: patolojiye giriş. 2006. Ankara, Palme yayıncılık.

Demir, R., Ed. Di Fiore histoloji atlası fonksiyonel ilişkileriyle. 2008. Ankara, Palme Yayıncılık.

Deng, M., Suraneni, P., Schultz, R. M., Li, R. The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Dev Cell*. 2007; 122: 301-308.

Deng, M., Williams, C. J., Schultz, R. M. Role of MAP kinase and myosin light chain kinase in chromosome-induced development of mouse egg polarity. *Dev Biol*. 2005; 2782: 358-366.

Diaz, H., Esponda, P. Ageing-induced changes in the cortical granules of mouse eggs. *Zygote*. 2004; 122: 95-103.

Diril, M. K., Ratnacaram, C. K., Padmakumar, V. C., Du, T., Wasser, M., Coppola, V., Tessarollo, L., Kaldis, P. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA re-replication but not for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 10910: 3826-3831.

Dissen GA, P. A., Romero C, Dees WL, Ojeda SR. Neural and Neurotrophic Control of Ovarian Development. *The Ovary.* 2003 P. C. K. L. Peter Leung, Eli Adashi, Elsevier: 664.

Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., Matzuk, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 1996; 3836600: 531-535.

Doree, M., Hunt, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci.* 2002; 115Pt 12: 2461-2464.

Duckworth, B. C., Weaver, J. S., Ruderman, J. V. G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 9926: 16794-16799.

Dumont, J., Million, K., Sunderland, K., Rassinier, P., Lim, H., Leader, B., Verlhac, M. H. Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes. *Dev Biol.* 2007; 3011: 254-265.

Duncan, F. E., Moss, S. B., Schultz, R. M., Williams, C. J. PAR-3 defines a central subdomain of the cortical actin cap in mouse eggs. *Dev Biol.* 2005; 2801: 38-47.

Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen, A. P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology.* 1999; 14012: 5789-5796.

Edwards, R. G. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature.* 1965; 2085008: 349-351.

Eppig, J. J., Kozak, L. P., Eicher, E. M., Stevens, L. C. Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division. *Nature*. 1977; 2695628: 517-518.

Eppig JJ, V. M., Bivens CM, De La Fuente R. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. *The Ovary*. 2003 P. C. K. L. Peter Leung, Eli Adashi, Elsevier: 664.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*. 1983; 332: 389-396.

Evans, T., Wade, C. M., Chapman, F. A., Johnson, A. D., Loose, M. Acquisition of germ plasm accelerates vertebrate evolution. *Science*. 2014; 3446180: 200-203.

Faix, J., Grosse, R. Staying in shape with formins. *Dev Cell*. 2006; 106: 693-706.

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biol Reprod*. 2004; 703: 535-547.

Fox, G. *The Mouse in biomedical research*. 2007, Academic Press.

Gaillard, J., Ramabhadran, V., Neumann, E., Gurel, P., Blanchoin, L., Vantard, M., Higgs, H. N. Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Mol Biol Cell*. 2011; 2223: 4575-4587.

Gao, L. L., Zhou, C. X., Zhang, X. L., Liu, P., Jin, Z., Zhu, G. Y., Ma, Y., Li, J., Yang, Z. X., Zhang, D. ZP3 is Required for Germinal Vesicle Breakdown in Mouse Oocyte Meiosis. *Sci Rep*. 2017; 7: 41272.

Gilchrist, R. B., Luciano, A. M., Richani, D., Zeng, H. T., Wang, X., Vos, M. D., Sugimura, S., Smitz, J., Richard, F. J., Thompson, J. G. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. *Reproduction*. 2016; 1525: R143-157.

Glister, C., Satchell, L., Knight, P. G. Changes in expression of bone morphogenetic proteins (BMPs), their receptors and inhibin co-receptor betaglycan during bovine

antral follicle development: inhibin can antagonize the suppressive effect of BMPs on thecal androgen production. *Reproduction*. 2010; 1405: 699-712.

Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 1991; 3496305: 132-138.

Goode, B. L., Eck, M. J. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76: 593-627.

Gorre, N., Adhikari, D., Lindkvist, R., Brannstrom, M., Liu, K., Shen, Y. mTORC1 Signaling in oocytes is dispensable for the survival of primordial follicles and for female fertility. *PLoS One*. 2014; 910: e110491.

Grudzinskas, J. G. *Gametes - The Oocyte*. 1995 Cambridge, Cambridge Uni. Press. .

Hackett, J. A., Surani, M. A. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 2014; 154: 416-430.

Halet, G., Carroll, J. Rac activity is polarized and regulates meiotic spindle stability and anchoring in mammalian oocytes. *Dev Cell*. 2007; 122: 309-317.

Hampl, A., Eppig, J. J. Translational regulation of the gradual increase in histone H1 kinase activity in maturing mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 1995; 401: 9-15.

Han, S. J., Chen, R., Paronetto, M. P., Conti, M. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol*. 2005; 1518: 1670-1676.

Han, S. J., Conti, M. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*. 2006; 53: 227-231.

Hashimoto, N., Kishimoto, T. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Dev Biol*. 1988; 1262: 242-252.

Hatch, A. L., Gurel, P. S., Higgs, H. N. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *J Cell Sci*. 2014; 127Pt 21: 4549-4560.

- Heidemann, S. R., Kirschner, M. W. Induced formation of asters and cleavage furrows in oocytes of *Xenopus laevis* during in vitro maturation. *J Exp Zool.* 1978; 2043: 431-444.
- Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Oceguera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., Watanabe, N. Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science.* 2004; 3035666: 2007-2010.
- Higgs, H. N., Pollard, T. D. Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J Biol Chem.* 1999; 27446: 32531-32534.
- Hillier, S. G. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J Endocrinol.* 1991; 1312: 171-175.
- Hillier, S. G. Paracrine support of ovarian stimulation. *Mol Hum Reprod.* 2009; 1512: 843-850.
- Hoehn, K. Human anatomy and physiology. 2001 San Francisco, Pearson Education-Benjamin Cummings, an imprint of Addison-Wesley Longman.
- Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature.* 1990; 3476288: 44-49.
- Holubcova, Z., Howard, G., Schuh, M. Vesicles modulate an actin network for asymmetric spindle positioning. *Nat Cell Biol.* 2013; 158: 937-947.
- Hsueh, A. J., Kawamura, K., Cheng, Y., Fauser, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015; 361: 1-24.
- Hubbard, C. J. Cyclic AMP changes in the component cells of Graafian follicles: possible influences on maturation in the follicle-enclosed oocytes of hamsters. *Dev Biol.* 1986; 1182: 343-351.
- Hunter, R. H., Cook, B., Baker, T. G. Dissociation of response to injected gonadotropin between the Graafian follicle and oocyte in pigs. *Nature.* 1976; 2605547: 156-158.

Husson, C., Cantrelle, F. X., Roblin, P., Didry, D., Le, K. H., Perez, J., Guittet, E., Van Heijenoort, C., Renault, L., Carlier, M. F. Multifunctionality of the beta-thymosin/WH2 module: G-actin sequestration, actin filament growth, nucleation, and severing. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1194: 44-52.

Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., Holland, M. K. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2006; 122: 61-69.

Isogai, T., Innocenti, M. New nuclear and perinuclear functions of formins. *Biochem Soc Trans.* 2016; 446: 1701-1708.

Jagarlamudi, K., Liu, L., Adhikari, D., Reddy, P., Idahl, A., Ottander, U., Lundin, E., Liu, K. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One.* 2009; 47: e6186.

John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J., Castrillon, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol.* 2008; 3211: 197-204.

Johnson, M. H., Eager, D., Muggleton-Harris, A., Grave, H. M. Mosaicism in organisation concanavalin A receptors on surface membrane of mouse egg. *Nature.* 1975; 2575524: 321-322.

Jones, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod.* 2004; 101: 1-5.

Jones, K. T. Mammalian egg activation: from Ca<sup>2+</sup> spiking to cell cycle progression. *Reproduction.* 2005; 1306: 813-823.

Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., Holmes, K. C. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature.* 1990; 3476288: 37-44.

Kalab, P., Heald, R. The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle. *J Cell Sci.* 2008; 121Pt 10: 1577-1586.



Kawamura, K., Kumagai, J., Sudo, S., Chun, S. Y., Pisarska, M., Morita, H., Toppari, J., Fu, P., Wade, J. D., Bathgate, R. A., Hsueh, A. J. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 10119: 7323-7328.

Kerkhoff, E., Simpson, J. C., Leberfinger, C. B., Otto, I. M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U. R., Raabe, T., Pepperkok, R. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol*. 2001; 1124: 1963-1968.

Kezele, P., Nilsson, E. E., Skinner, M. K. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod*. 2005; 735: 967-973.

Kim, N. H., Day, B. N., Lee, H. T., Chung, K. S. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. *Zygote*. 1996; 42: 145-149.

Kim, S. Y., Ebbert, K., Cordeiro, M. H., Romero, M., Zhu, J., Serna, V. A., Whelan, K. A., Woodruff, T. K., Kurita, T. Cell autonomous phosphoinositide 3-kinase activation in oocytes disrupts normal ovarian function through promoting survival and overgrowth of ovarian follicles. *Endocrinology*. 2015; 1564: 1464-1476.

Kissel, H., Timokhina, I., Hardy, M. P., Rothschild, G., Tajima, Y., Soares, V., Angeles, M., Whitlow, S. R., Manova, K., Besmer, P. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *EMBO J*. 2000; 196: 1312-1326.

Knobil, E., Plant, T. M., Wildt, L., Belchetz, P. E., Marshall, G. Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 1980; 2074437: 1371-1373.

Knoblich, J. A. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008; 1324: 583-597.

Krause, M., Gautreau, A. Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 159: 577-590.

Kreeger, P. K., Fernandes, N. N., Woodruff, T. K., Shea, L. D. Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional in vitro culture system is dependent on follicle stage and dose. *Biol Reprod.* 2005; 735: 942-950.

Kuhn, S., Geyer, M. Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases.* 2014; 5: e29513.

Kurilo, L. F. Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet.* 1981; 571: 86-92.

Kurimoto, K., Yabuta, Y., Hayashi, K., Ohta, H., Kiyonari, H., Mitani, T., Moritoki, Y., Kohri, K., Kimura, H., Yamamoto, T., Katou, Y., Shirahige, K., Saitou, M. Quantitative Dynamics of Chromatin Remodeling during Germ Cell Specification from Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2015; 165: 517-532.

Laplante, M., Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012; 1492: 274-293.

LaRosa, C., Downs, S. M. MEK inhibitors block AICAR-induced maturation in mouse oocytes by a MAPK-independent mechanism. *Mol Reprod Dev.* 2005; 702: 235-245.

Leader, B., Leder, P. Formin-2, a novel formin homology protein of the cappuccino subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system. *Mech Dev.* 2000; 931-2: 221-231.

Leader, B., Lim, H., Carabatsos, M. J., Harrington, A., Ecsedy, J., Pellman, D., Maas, R., Leder, P. Formin-2, polyploidy, hypofertility and positioning of the meiotic spindle in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2002; 412: 921-928.

Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M. E., Maro, B. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev Biol.* 2001; 2322: 400-413.

Lee, S. E., Kim, J. H., Kim, N. H. Inactivation of MAPK affects centrosome assembly, but not actin filament assembly, in mouse oocytes maturing in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007; 747: 904-911.

Lew, D. J., Kornbluth, S. Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol.* 1996; 86: 795-804.

Li, H., Guo, F., Rubinstein, B., Li, R. Actin-driven chromosomal motility leads to symmetry breaking in mammalian meiotic oocytes. *Nat Cell Biol.* 2008; 1011: 1301-1308.

Li, R., Albertini, D. F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 143: 141-152.

Lin, Y., Page, D. C. Dazl deficiency leads to embryonic arrest of germ cell development in XY C57BL/6 mice. *Dev Biol.* 2005; 2882: 309-316.

Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., Donovan, P. J. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet.* 2002; 304: 446-449.

Liu, C., Peng, J., Matzuk, M. M., Yao, H. H. Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells. *Nat Commun.* 2015; 6: 6934.

Longo, F. J., Chen, D. Y. Development of cortical polarity in mouse eggs: involvement of the meiotic apparatus. *Dev Biol.* 1985; 1072: 382-394.

Luo, J., McGinnis, L. K., Kinsey, W. H. Fyn kinase activity is required for normal organization and functional polarity of the mouse oocyte cortex. *Mol Reprod Dev.* 2009; 769: 819-831.

Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., Pollard, T. D. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 967: 3739-3744.

Magnusdottir, E., Dietmann, S., Murakami, K., Gunesdogan, U., Tang, F., Bao, S., Diamanti, E., Lao, K., Gottgens, B., Azim Surani, M. A tripartite transcription factor network regulates primordial germ cell specification in mice. *Nat Cell Biol.* 2013; 158: 905-915.

Mani, A. M., Fenwick, M. A., Cheng, Z., Sharma, M. K., Singh, D., Wathes, D. C. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction.* 2010; 1391: 139-151.

Marangos, P., Carroll, J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction.* 2004; 1282: 153-162.

Marangos, P., Carroll, J. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction.* 2004; 1282: 153-162.

Maro, B., Verlhac, M. H. Polar body formation: new rules for asymmetric divisions. *Nat Cell Biol.* 2002; 412: E281-283.

Masciarelli, S., Horner, K., Liu, C., Park, S. H., Hinckley, M., Hockman, S., Nedachi, T., Jin, C., Conti, M., Manganiello, V. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest.* 2004; 1142: 196-205.

Mass, R. L., Zeller, R., Woychik, R. P., Vogt, T. F., Leder, P. Disruption of formin-encoding transcripts in two mutant limb deformity alleles. *Nature.* 1990; 3466287: 853-855.

Masui, Y., Markert, C. L. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool.* 1971; 1772: 129-145.

Matsuoka, Y., Hughes, C. A., Bennett, V. Adducin regulation. Definition of the calmodulin-binding domain and sites of phosphorylation by protein kinases A and C. *J Biol Chem.* 1996; 27141: 25157-25166.

Maurice, D. H., Haslam, R. J. Molecular basis of the synergistic inhibition of platelet function by nitrovasodilators and activators of adenylate cyclase: inhibition of cyclic AMP breakdown by cyclic GMP. *Mol Pharmacol.* 1990; 375: 671-681.

McGee, E. A., Hsueh, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 212: 200-214.

McGee, E. A., Perlas, E., LaPolt, P. S., Tsafiriri, A., Hsueh, A. J. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod.* 1997; 575: 990-998.

Mehlmann, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction.* 2005; 1306: 791-799.

Mehlmann, L. M., Jones, T. L., Jaffe, L. A. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science.* 2002; 2975585: 1343-1345.

Miao, Y. L., Kikuchi, K., Sun, Q. Y., Schatten, H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update.* 2009; 155: 573-585.

Minshull, J., Sun, H., Tonks, N. K., Murray, A. W. A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell.* 1994; 793: 475-486.

Mishra, A., Joy, K. P. 2-Hydroxyestradiol-17 $\beta$ -induced oocyte maturation: involvement of cAMP-protein kinase A and okadaic acid-sensitive protein phosphatases, and their interplay in oocyte maturation in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *J Exp Biol.* 2006; 209Pt 13: 2567-2575.

Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touze, J. L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbies-Tran, R., Fabre, S. Regulation of anti-Mullerian hormone production in domestic animals. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 251: 1-16.

Montaville, P., Jegou, A., Pernier, J., Compper, C., Guichard, B., Mogessie, B., Schuh, M., Romet-Lemonne, G., Carlier, M. F. Spire and Formin 2 synergize and

antagonize in regulating actin assembly in meiosis by a ping-pong mechanism. *PLoS Biol.* 2014; 122: e1001795.

Moore, H., Udayashankar, R., Aflatoonian, B. Stem cells for reproductive medicine. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 2881-2: 104-110.

Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J. J., Richani, D., White, M. A., Martin, G. A., Trotta, A. P., Ritter, L. J., Shi, J., Mueller, T. D., Harrison, C. A., Gilchrist, R. B. Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor-beta Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *J Biol Chem.* 2015; 29039: 24007-24020.

Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science.* 1995; 2705233: 86-90.

Murray, A. W., Kirschner, M. W. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature.* 1989; 3396222: 275-280.

Na, J., Zernicka-Goetz, M. Asymmetric positioning and organization of the meiotic spindle of mouse oocytes requires CDC42 function. *Curr Biol.* 2006; 1612: 1249-1254.

Namgoong, S., Boczkowska, M., Glista, M. J., Winkelman, J. D., Rebowski, G., Kovar, D. R., Dominguez, R. Mechanism of actin filament nucleation by Vibrio VopL and implications for tandem W domain nucleation. *Nat Struct Mol Biol.* 2011; 189: 1060-1067.

Namgoong, S., Kim, N. H. Roles of actin binding proteins in mammalian oocyte maturation and beyond. *Cell Cycle.* 2016; 1514: 1830-1843.

Namgoong, S., Kim, N. H. Roles of actin binding proteins in mammalian oocyte maturation and beyond. *Cell Cycle.* 2016; 1514: 1830-1843.

Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., Milbrandt, J. Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol Reprod.* 2006; 742: 314-321.

Neumuller, R. A., Knoblich, J. A. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 2009; 2323: 2675-2699.

Nikolic, A., Volarevic, V., Armstrong, L., Lako, M., Stojkovic, M. Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 1741072.

Nilsson, E., Parrott, J. A., Skinner, M. K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 1751-2: 123-130.

Nilsson, E. E., Skinner, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod.* 2003; 694: 1265-1272.

Nilsson, E. E., Skinner, M. K. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; 2141-2: 19-25.

Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, L. A. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* 2009; 13611: 1869-1878.

Ogura-Nose, S., Yoshino, O., Osuga, Y., Shi, J., Hiroi, H., Yano, T., Taketani, Y. Anti-Mullerian hormone (AMH) is induced by bone morphogenetic protein (BMP) cytokines in human granulosa cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 1641: 44-47.

Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol.* 2010; 1882: 199-207.

Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., Tojo, H. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod.* 2003; 682: 604-609.

Ohinata, Y., Payer, B., O'Carroll, D., Ancelin, K., Ono, Y., Sano, M., Barton, S. C., Obukhanych, T., Nussenzweig, M., Tarakhovsky, A., Saitou, M., Surani, M. A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature.* 2005; 4367048: 207-213.

Oktay, K., Briggs, D., Gosden, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 8211: 3748-3751.

Olson, E. N., Nordheim, A. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 115: 353-365.

Otsuki, J., Nagai, Y., Lopata, A., Chiba, K., Yasmin, L., Sankai, T. Symmetrical division of mouse oocytes during meiotic maturation can lead to the development of twin embryos that amalgamate to form a chimeric hermaphrodite. *Hum Reprod.* 2012; 272: 380-387.

Ou, Y., Rattner, J. B. The centrosome in higher organisms: structure, composition, and duplication. *Int Rev Cytol.* 2004; 238: 119-182.

Palermo, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2007; 153: 326-337.

Paules, R. S., Buccione, R., Moschel, R. C., Vande Woude, G. F., Eppig, J. J. Mouse Mos protooncogene product is present and functions during oogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 8614: 5395-5399.

Paunola, E., Mattila, P. K., Lappalainen, P. WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers. *FEBS Lett.* 2002; 5131: 92-97.



- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; 22: 153-183.
- Pechlivanis, M., Samol, A., Kerkhoff, E. Identification of a short Spir interaction sequence at the C-terminal end of formin subgroup proteins. *J Biol Chem.* 2009; 284: 25324-25333.
- Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., Schuh, M. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol.* 2011; 21: 955-960.
- Pierce, J. G., Parsons, T. F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 1981; 50: 465-495.
- Pincus, G., Enzmann, E. V. The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs. *J Exp Med.* 1935; 62: 665-675.
- Pines, J. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol.* 1999; 13: E73-79.
- Pines, J., Hunter, T. Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol.* 1991; 115: 1-17.
- Pirino, G., Wescott, M. P., Donovan, P. J. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle.* 2009; 8: 665-670.
- Pollard, T. D. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 1986; 103: 2747-2754.
- Pollard, T. D. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007; 36: 451-477.
- Pollard, T. D., Blanchoin, L., Mullins, R. D. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000; 29: 545-576.

Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., Mullins, R. D. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature*. 2005; 4337024: 382-388.

Quinlan, M. E., Hilgert, S., Bedrossian, A., Mullins, R. D., Kerkhoff, E. Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J Cell Biol*. 2007; 1791: 117-128.

Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Liu, L., Jagarlamudi, K., Tang, W., Shen, Y., Berthet, C., Peng, S. L., Kaldis, P., Liu, K. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol*. 2007; 219: 2189-2202.

Ramabhadran, V., Hatch, A. L., Higgs, H. N. Actin monomers activate inverted formin 2 by competing with its autoinhibitory interaction. *J Biol Chem*. 2013; 28837: 26847-26855.

Randall, T. S., Ehler, E. A formin-g role during development and disease. *Eur J Cell Biol*. 2014; 935-6: 205-211.

Ratner, A. Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries in vitro. *Endocrinology*. 1976; 996: 1496-1500.

Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hamalainen, T., Tohonen, V., Ogawa, W., Noda, T., Volarevic, S., Huhtaniemi, I., Liu, K. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum Mol Genet*. 2009; 1815: 2813-2824.

Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S. L., Lan, Z. J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., Liu, K. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*. 2008; 3195863: 611-613.

Reis, A., Chang, H. Y., Levasseur, M., Jones, K. T. APC<sup>cdh1</sup> activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat Cell Biol.* 2006; 85: 539-540.

Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J., Bernex, F., Panthier, J. J., Driancourt, M. A. Alterations in ovarian function of mice with reduced amounts of KIT receptor. *Reproduction.* 2001; 1212: 229-237.

Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J., Driancourt, M. A. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev.* 2000; 564: 483-494.

Romero, C., Paredes, A., Dissen, G. A., Ojeda, S. R. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology.* 2002; 1434: 1485-1494.

Rudolph, J. Cdc25 phosphatases: structure, specificity, and mechanism. *Biochemistry.* 2007; 4612: 3595-3604.

Ruehl-Fehlert, C., Kittel, B., Morawietz, G., Deslex, P., Keenan, C., Mahrt, C. R., Nolte, T., Robinson, M., Stuart, B. P., Deschl, U. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--part 1. *Exp Toxicol Pathol.* 2003; 552-3: 91-106.

Saga, Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2008; 184: 337-341.

Saitou, M., Barton, S. C., Surani, M. A. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature.* 2002; 4186895: 293-300.

Saitou, M., Payer, B., Lange, U. C., Erhardt, S., Barton, S. C., Surani, M. A. Specification of germ cell fate in mice. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 3581436: 1363-1370.

Saitou, M., Yamaji, M. Primordial germ cells in mice. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012; 411.

Santamaria, D., Barriere, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K., Caceres, J. F., Dubus, P., Malumbres, M., Barbacid, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*. 2007; 4487155: 811-815.

Sato, M., Kimura, T., Kurokawa, K., Fujita, Y., Abe, K., Masuhara, M., Yasunaga, T., Ryo, A., Yamamoto, M., Nakano, T. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev*. 2002; 1131: 91-94.

Satterwhite, L. L., Lohka, M. J., Wilson, K. L., Scherson, T. Y., Cisek, L. J., Corden, J. L., Pollard, T. D. Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J Cell Biol*. 1992; 1183: 595-605.

Schmidt, D., Ovitt, C. E., Anlag, K., Fehsenfeld, S., Gredsted, L., Treier, A. C., Treier, M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*. 2004; 1314: 933-942.

Schonichen, A., Geyer, M. Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 18032: 152-163.

Schoot, D. C., Harlin, J., Shoham, Z., Mannaerts, B. M., Lahlou, N., Bouchard, P., Bennink, H. J., Fauser, B. C. Recombinant human follicle-stimulating hormone and ovarian response in gonadotrophin-deficient women. *Hum Reprod*. 1994; 97: 1237-1242.

Schuh, M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol*. 2011; 1312: 1431-1436.

Schuh, M., Ellenberg, J. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol*. 2008; 1824: 1986-1992.

Sept, D., Elcock, A. H., McCammon, J. A. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry. *J Mol Biol*. 1999; 2945: 1181-1189.

Silva, J. R., Tharasanit, T., Taverne, M. A., van der Weijden, G. C., Santos, R. R., Figueiredo, J. R., van den Hurk, R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J Endocrinol.* 2006; 1891: 113-125.

Simerly, C., Nowak, G., de Lanerolle, P., Schatten, G. Differential expression and functions of cortical myosin IIA and IIB isotypes during meiotic maturation, fertilization, and mitosis in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell.* 1998; 99: 2509-2525.

Solakoglu, S., Ed. *Temel Histoloji.* 2009. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri.

Stanislaus, D., Pinter, J. H., Janovick, J. A., Conn, P. M. Mechanisms mediating multiple physiological responses to gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 1441-2: 1-10.

Strome, S., Updike, D. Specifying and protecting germ cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015; 167: 406-416.

Sun, S. C., Kim, N. H. Molecular mechanisms of asymmetric division in oocytes. *Microsc Microanal.* 2013; 194: 883-897.

Sun, S. C., Wang, Z. B., Xu, Y. N., Lee, S. E., Cui, X. S., Kim, N. H. Arp2/3 complex regulates asymmetric division and cytokinesis in mouse oocytes. *PLoS One.* 2011; 64: e18392.

Takizawa, C. G., Morgan, D. O. Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 126: 658-665.

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

Tepekoy, F., Akkoyunlu, G. The effect of FSH and activin A on Akt and MAPK1/3 phosphorylation in cultured bovine ovarian cortical strips. *J Ovarian Res.* 2016; 9: 13.

Tepekoy, F., Ustunel, I., Akkoyunlu, G. Protein kinase C isoforms alpha, delta and epsilon are differentially expressed in mouse ovaries at different stages of postnatal development. *J Ovarian Res.* 2014; 7: 117.

Theurkauf, W. E. Premature microtubule-dependent cytoplasmic streaming in cappuccino and spire mutant oocytes. *Science.* 1994; 265: 2093-2096.

Tilgner, K., Atkinson, S. P., Golebiewska, A., Stojkovic, M., Lako, M., Armstrong, L. Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2008; 26: 3075-3085.

Tittel, J., Welz, T., Czogalla, A., Dietrich, S., Samol-Wolf, A., Schulte, M., Schwille, P., Weidemann, T., Kerkhoff, E. Membrane targeting of the Spir. formin actin nucleator complex requires a sequential handshake of polar interactions. *J Biol Chem.* 2015; 290: 6428-6444.

Tong, C., Fan, H. Y., Chen, D. Y., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res.* 2003; 13: 375-383.

Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Takahashi, Y., Matsui, Y., Satoh, M., Noce, T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* 2000; 93: 139-149.

Ucar, H., Tachibana, K., Kishimoto, T. The Mos-MAPK pathway regulates Diaphanous-related formin activity to drive cleavage furrow closure during polar body extrusion in starfish oocytes. *J Cell Sci.* 2013; 126: 5153-5165.

Vaccari, S., Weeks, J. L., 2nd, Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti, M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod.* 2009; 81: 595-604.

Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., Maro, B. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development.* 1994; 120: 1017-1025.

Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Guillaud, P., Rassinier, P., Maro, B. Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos. *Curr Biol.* 2000; 1020: 1303-1306.

Verlhac, M. H., Lefebvre, C., Kubiak, J. Z., Umbhauer, M., Rassinier, P., Colledge, W., Maro, B. Mos activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* 2000; 1922: 6065-6074.

Villa-Diaz, L. G., Miyano, T. Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biol Reprod.* 2004; 712: 691-696.

Visser, J. A., Themmen, A. P. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 2341-2: 81-86.

Vizcarra, C. L., Kreutz, B., Rodal, A. A., Toms, A. V., Lu, J., Zheng, W., Quinlan, M. E., Eck, M. J. Structure and function of the interacting domains of Spire and Fmn-family formins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 10829: 11884-11889.

Wasch, R., Cross, F. R. APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature.* 2002; 4186897: 556-562.

Watson, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007; 8513 Suppl: E1-3.

Weber, K. L., Sokac, A. M., Berg, J. S., Cheney, R. E., Bement, W. M. A microtubule-binding myosin required for nuclear anchoring and spindle assembly. *Nature.* 2004; 4317006: 325-329.

Wegner, A., Engel, J. Kinetics of the cooperative association of actin to actin filaments. *Biophys Chem.* 1975; 33: 215-225.

Wehrend, A., Meinecke, B. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Anim Reprod Sci.* 2001; 663-4: 175-184.

Xu, M., West-Farrell, E. R., Stouffer, R. L., Shea, L. D., Woodruff, T. K., Zelinski, M. B. Encapsulated three-dimensional culture supports development of nonhuman primate secondary follicles. *Biol Reprod.* 2009; 813: 587-594.

Yamada, K., Ono, M., Perkins, N. D., Rocha, S., Lamond, A. I. Identification and functional characterization of FMN2, a regulator of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Mol Cell.* 2013; 495: 922-933.

Yamaji, M., Seki, Y., Kurimoto, K., Yabuta, Y., Yuasa, M., Shigeta, M., Yamanaka, K., Ohinata, Y., Saitou, M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet.* 2008; 408: 1016-1022.

Yan, C., Wang, P., DeMayo, J., DeMayo, F. J., Elvin, J. A., Carino, C., Prasad, S. V., Skinner, S. S., Dunbar, B. S., Dube, J. L., Celeste, A. J., Matzuk, M. M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol.* 2001; 156: 854-866.

Yang, H. Y., Mains, P. E., McNally, F. J. Kinesin-1 mediates translocation of the meiotic spindle to the oocyte cortex through KCA-1, a novel cargo adapter. *J Cell Biol.* 2005; 1693: 447-457.

Ye, Y., Kawamura, K., Sasaki, M., Kawamura, N., Groenen, P., Gelpke, M. D., Rauch, R., Hsueh, A. J., Tanaka, T. Kit ligand promotes first polar body extrusion of mouse preovulatory oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7: 26.

Yi, K., Li, R. Actin cytoskeleton in cell polarity and asymmetric division during mouse oocyte maturation. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012; 6910: 727-737.

Yi, K., Rubinstein, B., Li, R. Symmetry breaking and polarity establishment during mouse oocyte maturation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013; 3681629: 20130002.

Yi, K., Rubinstein, B., Unruh, J. R., Guo, F., Slaughter, B. D., Li, R. Sequential actin-based pushing forces drive meiosis I chromosome migration and symmetry breaking in oocytes. *J Cell Biol.* 2013; 2005: 567-576.



Yi, K., Unruh, J. R., Deng, M., Slaughter, B. D., Rubinstein, B., Li, R. Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nat Cell Biol.* 2011; 1310: 1252-1258.

Yoshioka, K., Takata, M., Taniguchi, T., Yamanaka, H., Sekikawa, K. Differential expression of activin subunits, activin receptors and follistatin genes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev.* 1998; 103: 293-298.

Zeth, K., Pechlivanis, M., Samol, A., Pleiser, S., Vonrhein, C., Kerkhoff, E. Molecular basis of actin nucleation factor cooperativity: crystal structure of the Spir-1 kinase non-catalytic C-lobe domain (KIND)\*formin-2 formin SPIR interaction motif (FSI) complex. *J Biol Chem.* 2011; 28635: 30732-30739.

Zhang, M., Su, Y. Q., Sugiura, K., Xia, G., Eppig, J. J. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science.* 2010; 3306002: 366-369.

Zhang, Y., Zhang, Z., Xu, X. Y., Li, X. S., Yu, M., Yu, A. M., Zong, Z. H., Yu, B. Z. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev Dyn.* 2008; 23712: 3777-3786.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Filiz	<b>Uyruğu</b>	TC
<b>Soyadı</b>	Tepeköy Özçelik	<b>Tel no</b>	0555 418 45 40
<b>Doğum tarihi</b>	16/09/1986	<b>e-posta</b>	filiztepekoy@gmail.com

### Eğitim Bilgileri

	<b>Mezun olduğu kurum</b>	<b>Mezuniyet yılı</b>
<b>Lise</b>	İSTEK Özel Acıbadem Lisesi	2004
<b>Lisans</b>	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hücre ve Doku Biyolojisi Kümesi	2008
<b>Yüksek Lisans</b>	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programı	2011
<b>Doktora</b>	Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programı	2017

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (yıl-yıl)</b>
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2010-2017

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Sınav türü</b>	<b>Puanı</b>
İngilizce	ÜDS	96.25

### Proje Deneyimi

<b>Proje Adı</b>	<b>Destekleyen kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
Strese bağlı bozulan gastrointestinal motilitede apelin ve kolesistokinin ilişkisinin beyin-bağırsak ekseninde araştırılması	TÜBİTAK-ARDEB 1001 (Proje No: 214S349)	2015-2017
Oosit maturasyonu sürecinde kromozom göçü sağlayan proteinlerin mayotik maturasyona ilişkin düzenleyici faktörler ile etkileşimi	Akdeniz Üniversitesi BAP (Proje No: 2014.03.0122.006)	2014-2017

Sığır Ovaryan Folikül Kültüründe Gelişen Oositlerin Mayotik Yeterliliğinin Değerlendirilmesi	TÜBİTAK-ARDEB 1002 (Proje No: 112S390)	2013-2014
Fare ovaryumunda Wnt sinyal yolağı elemanlarının gonadotropinler ve gelişim faktörleri ile etkileşimi	Akdeniz Üniversitesi BAP (Proje No: 2012.01.0103.003)	2012-2015
Sican Kalp Dokusunda Apelin ve Atrial Natriuretik Peptid ve Apoptoz Uzerine Suya Batırma ve Hareketsizlik Stresinin Etkisi	Akdeniz Üniversitesi BAP (Proje No: 2012.01.0103.011)	2012-2015
Fare Ovaryumunda Protein Kinaz C İzotiplerinin Dağılımı ve Folikülogenezle ilişkisi	Akdeniz Üniversitesi BAP (Proje No: 2009.02.0122.010)	2009-2011

#### **Burslar-Ödüller:**

- 1) TÜBİTAK 2214A Yurtdışı Doktora Sırası Burs Programı: Amerika Birleşik Devletleri, Johns Hopkins Üniversitesi, Hücre Biyolojisi Departmanı, Hücre Dinamikleri Merkezi, Ağustos 2015-Ağustos 2016 (Prof Dr Rong LI laboratuvarı)
- 2) ERASMUS Programı Staj Hareketliliği: Birleşik Krallık, Edinburgh Üniversitesi, Fizyoloji Departmanı, Şubat- Mayıs 2011. (Prof Dr. Evelyn TELFER laboratuvarı)
- 3) TÜBİTAK 2224 Yurtdışı Bilimsel Etkinliklere Katılma Desteği Programı (Nisan 2009)

#### **Yayınlar ve Bildiriler:**

##### **Science Citation Index'te Kayıtlı Uluslararası Yayınlar**

- 1) **Tepekoy F**, Akkoyunlu G: The effect of FSH and activin A on Akt and MAPK1/3 phosphorylation in cultured bovine ovarian cortical strips. J Ovarian Res 2016, **9**:13.
- 2) Akkoyunlu G, **Tepekoy F**. Immunohistochemistry of Paraffin Sections from Mouse Ovaries. Methods Mol Biol. 2016;1457:269-74.

- 3) **Tepekoy F**, Ozturk S, Sozen B, Ozay RS, Akkoyunlu G, Demir N. CD90 and CD105 expression in the mouse ovary and testis at different stages of postnatal development. *Reprod Biol.* 2015 Dec;15(4):195-204.
- 4) **Tepekoy F**, Akkoyunlu G & Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2015. **32** 337–346.
- 5) **Tepekoy F**, Ustunel I, Akkoyunlu G. Protein kinase C isoforms  $\alpha$ ,  $\delta$  and  $\epsilon$  are differentially expressed in mouse ovaries at different stages of postnatal development. *J Ovarian Res.* 2014 Dec 10;7:117.
- 6) Akkoyunlu G, **Tepekoy F**, Bebis A, Uysal F. *Acta Histochem.* 2014 Oct;116(8):1519-21. Bilateral total ovarian hypoplasia in a Holstein Friesian heifer
- 7) Ozbey O, Sahin Z, Acar N, **Ozcelik FT**, Ozenci AM, Koksoy S, et al. Characterization of colony-forming cells in adult human articular cartilage. *Acta Histochem* 2014; 116:763–70.
- 8) Ustunel I, Acar N, Gemici B, Ozbey O, Edizer I, Soylu H, **Tepekoy F**, IzgutUysal VN. The effects of water immersion and restraint stress on the expressions of apelin, apelin receptor (APJR) and apoptosis rate in the rat heart, *Acta Histochem.* 116 (2014) 675–681

#### **Uluslararası Bildiriler**

- 1) **Tepekoy F**, Akkoyunlu G: The effect of FSH and Activin A activation on Akt and pAkt protein levels of bovine ovarian follicles cultured in vitro. ESHRE (European Society for Human Reproduction and Embryology) Annual Meeting. June 30-July 2, 2014. Munich, GERMANY (poster presentation)
- 2) **Tepekoy-Ozcelik F.**, Uysal F., Akkoyunlu G. Identification of WNT signaling pathway components in bovine cumulus-oocyte complexes. EMBO Workshop on Oocyte Maturation and Fertilization, 12-15 June 2013, Banyuls-sur-Mer, France (poster presentation)
- 3) Akkoyunlu G., **Tepekoy-Ozcelik F.**, Uysal F. Localization of WNT glycoproteins are varied through gonadotropin dependence of postnatal

mouse ovaries,EMBO Workshop on Oocyte Maturation and Fertilization, 12-15 June 2013, Banylus-sur-Mer,France (poster presentation).

- 4) Ustunel I., Ozbey O., Sahin Z., Acar N., **Tepekoy F.**, Ozenci A.M., Koksoy S.: Isolation and culture of colony forming cell from human articular cartilage and research of mesenchymal stem cell characteristics. MDC Conference: Stem Cells in Development and Disease. September 11-14, 2011. Berlin, GERMANY (poster presentation).
- 5) **Tepekoy F.**, Sahin Z., Akkoyunlu G. : The localisation of specific protein kinase C isotypes in mouse ovary. 15<sup>th</sup> Word Congress on In Vitro Fertilization and 4<sup>th</sup> Word Congress on In vitro Maturation. April 19-22, 2009. Geneve, SWITZERLAND (oral presentation)

### **Ulusal Bildiriler**

- 1) Uysal V.N., Acar N., Birsen İ. , Özcan F., Özbey Ünlü Ö., Soylu H., Avcı S, **Tepekoy F** et al.,The Effect of Apelin on the Expression of Atrial Natriuretic Peptide in Cardiac Tissue. 42. Ulusal Fizyoloji Kongresi. Düzce, 5-8 Eylül 2016
- 2) **Tepekoy F.**, Uysal F., Akkoyunlu G. Doğum sonrası dönemin farklı evrelerindeki fare ovaryumlarında WNT Glikoproteinlerinin Yerleşimleri. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Mersin, 28-31 Mayıs 2013.
- 3) Akkoyunlu G., Ozer S., **Tepekoy F.**, Uysal F. Hipoksi modeli uygulanan sıçanlarda connexin 43 ve zona pellucida 1'in ovaryumlardaki lokalizasyonu. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Mersin, 28-31 Mayıs 2013.
- 4) **Tepekoy F.**, Ozturk S., Akkoyunlu G., Demir N. Postnatal dönemin farklı evrelerinde fare ovaryumlarında CD90 ve CD105 proteinlerinin immünlokalizasyonları. 5. Ulusal Üreme endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. İzmir, 27-30 Eylül 2012.
- 5) **Tepekoy Özçelik F.**, Kalay S., Şahin Z., Akçakuş M., Ustunel İ., Akkoyunlu G. Hipoksi modeli uygulanan sıçanlarda PKC $\alpha$ 'nın ovaryumdaki lokalizasyonu. XI. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Denizli, 16-19 Mayıs 2012.
- 6) Özbey Ünlü Ö., Acar N., Sahin Z., **Tepeköy Özçelik F.** , Özenci A.M., Köksoy S., et al.,. İnsan eklem kıkırdağında var olduğu düşünülen

projenitör/kök hücrelerin spesifik belirteçler kullanılarak araştırılması. XI.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Denizli, 16-19 Mayıs 2012.

- 7) Akkoyunlu G., Özbey Ünlü Ö., Özer S., **Tepeköy Özçelik F.**, Acar N., Üstünel İ. Gelişmekte olan sıçan humerusu proksimal epifizinde transglutaminaz pozitif hücrelerin dağılımı. XI.Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. Denizli, 16-19 Mayıs 2012.
- 8) Ustunel I, Ozbey O., Sahin Z., Acar N., **Tepekoy F.**, Koksoy S., Ozenci A.M. İnsan Eklem Kıkırdağı Progenitör/Kök Hücrelerinin Cd105 Cd166 Ekspresyonları Ve Ultrastrüktürel Özellikleri. 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Antalya, 25-28 Ekim, 2011.
- 9) Akkoyunlu G, **Tepekoy F**, Albertini D : Sıçan embriyolarında çevresel toksik etkenlerden dolayı görülen asimetrik sitokinez. 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi. Antalya, 25-28 Ekim, 2011.
- 10) Ustunel I, Ozbey O, Sahin Z, Acar N, **Tepekoy F**, Ozenci A.M., Koksoy S. İnsan eklem kıkırdağından progenitör/kök hücre izolasyonu, kültürü ve kök hücre özelliklerinin araştırılması. 1. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi. Kocaeli, 28 Eylül- 2Ekim 2011.
- 11) Akkoyunlu G., **Tepekoy F.**, Albertini DF. Cyclophosphamide uygulamasından sonra gamma h2ax ve rad51'in bovine granuloza hücrelerindeki lokalizasyonları. 4. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. Antalya, 7-10 Ekim 2010.
- 12) **Tepekoy F.**, Ustunel İ., Akkoyunlu G. İmmatür fare ovaryumunda farklı protein kinaz C izotiplerinin yerleşimi. 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. İzmir, 17-20 Mayıs 2010.