

Yeşim BİLMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

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

**FARE OVARYUM DOKULARINDA HİSTON
METİLTRANSFERAZLARIN EKSPRESYON
DURUMLARININ BELİRLENMESİ**

Yeşim BİLMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

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

FARE OVARYUM DOKULARINDA HİSTON
METİLTRANSFERAZLARIN EKSPRESYON
DURUMLARININ BELİRLENMESİ

Yeşim BİLMEZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2020-5358 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 07/07/2021

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

.....

Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU

.....

Akdeniz Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Aydın CANDAN

.....

Alanya Alaaddin Keykubat 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. Erol GÜRPINAR

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Yeşim BİLMEZ

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca akademik ve bilimsel gelişimime önemli katkılarından dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK'e,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma ve teknik ekibe,

Güler yüzleri ve samimiyetleri ile her zaman yardıma hazır olan Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm kıymetli çalışanlarına,

Bu süreçte bana her daim destek olan değerli arkadaşlarım Günel TALİBOVA ve Mehmet DOĞAN'a,

Sonsuz inançları, en güzel dilekleriyle maddi ve manevi her zaman yanımda olan kıymetli babam Hasan BİLMEZ ve annem Suzan BİLMEZ'e,

Tüm hayatım boyunca hayallerim ve eğitimim için bana güç veren, inanan, her daim güvenen, maddi ve manevi destek olan çok değerli amcam Yücel BİLMEZ ve yengem Burcu BİLMEZ'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Histon metilasyonu, histon kuyruklarının genellikle lizin ve arjinin rezidülerine metil gruplarının eklenmesi işlemidir ve bu işlem histon metiltransferaz enzimleri (HMT'ler) tarafından gerçekleştirilmektedir. Histon metilasyonu, memeli oosit ve folikül gelişiminde kritik öneme sahip epigenetik düzenleyicilerden birisidir. Bu çalışmanın amacı, histon metiltransferaz genlerinin ekspresyonel durumlarının farklı postnatal yaşlardaki fare ovaryum dokularında belirlenmesidir.

Yöntem: Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki dişi farelerden; genç (puberte öncesi, 3. hafta; n=6), ergin (7. hafta; n=7), geç ergin (puberte sonrası, 18. hafta; n=7) ve yaşlı (52 ve 60. hafta; her bir haftadan n=7) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Fare ovaryum dokularında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin mRNA seviyeleri qRT-PCR ile protein seviyeleri ise immünohistokimya yöntemiyle belirlendi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

Bulgular: *Setd1b* mRNA düzeyi, yaşlı grup ovaryumlarda ergin ve geç ergin gruplara göre anlamlı bir azalma gösterdi ($P<0.001$). Ayrıca, *Setd2* mRNA düzeyinin de geç ergin ve yaşlı gruplarda belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi ($P<0.05$). *Cxxc1* mRNA düzeyi gruplar arasında önemli bir farklılık göstermezken; *Setdb1* mRNA düzeyi genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli olarak artmıştır ($P<0.05$). SETD1B protein seviyesi, genç gruptan yaşlı gruba doğru dikkate değer bir azalma gösterdi ($P<0.01$). CFP1 protein seviyesinin de genç gruptan yaşlı gruba doğru anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ($P<0.01$). Ergin grupta en yüksek seviyede olan SETD2 proteini, yaşlı gruba doğru belirgin bir şekilde azaldı ($P<0.001$). SETDB1 protein düzeyi ise genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir azalma gösterdi ($P<0.01$).

Sonuç: *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin yaşlanan ovaryumdaki ekspresyonel değişimlerinin yaşla birlikte gelişen fertilite kaybında etkili olabileceği düşünülmektedir. Yaşlanmayla meydana gelen fertilite kaybındaki moleküler mekanizmaların aydınlatılabilmesi amacıyla, bu genlerdeki değişimin nedenleri ile ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: histon metilasyonu, oosit, folikül, yaşlanma, fertilite

ABSTRACT

Objective: Histone methylation is a process of adding methyl groups commonly to lysine and arginine residues of histone tails and is performed by histone methyltransferase enzymes (HMTs). Histone methylation is one of the critical epigenetic mechanisms, which is critically important for mammalian oocyte and follicle development. The aim of this study is to determine the expression patterns of histone methyltransferase genes in mouse ovarian tissues at different postnatal ages.

Method: Four groups were created from female mice at the different ages of postnatal life as following: young (prepuberty, 3-week-old; n=6), adult (puberty, 7-week-old; n=7), late adult (postpuberty, 18-week-old; n=7) and aged (52-, and 60-week-old; n=7 from each week). In the mouse ovarian tissues, mRNA levels of *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, and *Setdb1* genes were determined by qRT-PCR, and their protein levels were detected by immunohistochemistry. The obtained data were evaluated statistically by using one-way ANOVA test.

Results: *Setd1b* mRNA level in the aged group showed a significant decrease compared to the adult and late adult groups ($P<0.001$). Also, the *Setd2* level exhibited a remarkable reduction in late adult and aged groups ($P<0.05$). While there were no differences for the *Cxxc1* mRNA levels, the *Setdb1* mRNA level increased gradually from the young to the aged groups ($P<0.05$). The SETD1B protein level displayed a notable decrease from the young group to the aged groups ($P<0.01$). There was a remarkable decrease for the CFP1 protein from the young to the aged groups ($P<0.01$). The SETD2 protein at highest level in the adult group decreased significantly toward the aged group ($P<0.001$). However, the SETDB1 protein levels gradually decreased from the young to the aged groups ($P<0.01$).

Conclusion: We think that the expressional changes of *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, and *Setdb1* genes in the aging ovaries may have an impact on fertility loss accompanying biological aging. More detailed studies are required related to the reasons for the changed expression of these genes to elucidate the molecular mechanisms of fertility loss emerging with aging.

Key words: histone methylation, oocyte, follicle, aging, fertility

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ovaryumların Histolojik Yapısı	4
2.2. Memelilerde Oogenez	5
2.3. Memelilerde Folikülogenez	8
2.4. Histon Metilasyonu	12
2.4.1. Histon Arjinin Metilasyonu	13
2.4.2. Histon Lizin Metilasyonu	14
2.5. Histon Demetilasyonu	17
2.6. Histon Lizin Metiltransferazlar	17
2.6.1. SET1 (SET Domaini İçeren 1) Kompleksi	18
2.6.2. SETD2 (SET Domaini İçeren 2)	20
2.6.3. SETDB1 (SET Domaini Çatallı Histon Lizin Metiltransferaz 1)	20
2.7. Ovaryal Yaşlanma ve Histon Lizin Metilasyonu	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması	25
3.2. Postnatal Fare Ovaryumlarında <i>Setd1b</i> , <i>Setd2</i> , <i>Cxxc1</i> ve <i>Setdb1</i> mRNA Düzeylerinin qRT-PCR ile Belirlenmesi	25
3.2.1. Postnatal Fare Ovaryumlarından Trizol Yöntemi ile RNA İzolasyonu	25
3.2.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması	27
3.2.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	27
3.2.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları	28
3.3. Postnatal Fare Ovaryumlarında SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1	30

Protein Düzeylerinin İmmünohistokimya ile Belirlenmesi	
3.3.1. Postnatal Hayatın Farklı Yaşlarındaki Farelerden Ovaryumların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi	30
3.3.2. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerinde Hematoksilen-Eozin Boyama	31
3.3.3. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerinde İmmünohistokimya Uygulaması	31
4. BULGULAR	35
4.1. Postnatal Ovaryum Dokularında qRT-PCR Sonuçları	35
4.1.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Setd1b</i> ve <i>Setd2</i> mRNA Ekspresyonları	36
4.1.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelî <i>Cxxc1</i> ve <i>Setdb1</i> mRNA Ekspresyonları	39
4.2. Postnatal Ovaryum Dokularında SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	42
4.2.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî SETD1B Ekspresyonu	43
4.2.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelî SETD2 Ekspresyonu	46
4.2.3. Postnatal Ovaryumlarda Görelî CFP1 Ekspresyonu	49
4.2.4. Postnatal Ovaryumlarda Görelî SETDB1 Ekspresyonu	52
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Memeli lizin metiltransferazlar	16
Tablo 3.1.	Postnatal fare ovaryum dokularından elde edilen RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri	26
Tablo 3.2.	Postnatal fare ovaryum dokularından elde edilen RNA'ların DNaz uygulamasından sonraki konsantrasyon ve saflık değerleri	27
Tablo 3.3.	qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler	29
Tablo 3.4.	İmmünohistokimya uygulamasında kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Ovaryumun histolojik yapısı	5
Şekil 2.2.	Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü	7
Şekil 2.3.	Memelilerde oositin mayotik olgunlaşması	8
Şekil 2.4.	Memelilerde folikülogenez süreci	10
Şekil 2.5.	Histon metilasyonu ve demetilasyonu	13
Şekil 2.6.	SET1/CFP1 kompleksi	19
Şekil 4.1.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Beta Aktin</i> için uygulanan qRT-PCR reaksiyon sonucu	35
Şekil 4.2.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Beta Aktin</i> için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu	36
Şekil 4.3.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Setd1b</i> ve <i>Setd2</i> genleri için uygulanan qRT-PCR reaksiyon sonucu	36
Şekil 4.4.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Setd1b</i> ve <i>Setd2</i> genleri için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu	37
Şekil 4.5.	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>Setd1b</i> mRNA ekspresyonu	38
Şekil 4.6.	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>Setd2</i> mRNA ekspresyonu	39
Şekil 4.7.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Cxxc1</i> geni için uygulanan qRT-PCR reaksiyon sonucu	39
Şekil 4.8.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Cxxc1</i> geni için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu	40
Şekil 4.9.	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>Cxxc1</i> mRNA ekspresyonu	40
Şekil 4.10.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Setdb1</i> geni için uygulanan qRT-PCR reaksiyon sonucu	41

Şekil 4.11.	Postnatal fare ovaryum dokularına <i>Setdb1</i> geni için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu	41
Şekil 4.12.	Postnatal fare ovaryumlarında görel <i>Setdb1</i> mRNA ekspresyonu	42
Şekil 4.13.	Fare ovaryum dokularının hematoksil-eozin boyama sonuçları	43
Şekil 4.14.	Postnatal fare ovaryumlarında SETD1B ekspresyonu	44
Şekil 4.15.	Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel SETD1B ekspresyon analizi	45
Şekil 4.16.	Postnatal fare ovaryumlarında SETD2 ekspresyonu	47
Şekil 4.17.	Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi	49
Şekil 4.18.	Postnatal fare ovaryumlarında CFP1 ekspresyonu	51
Şekil 4.19.	Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel CFP1 ekspresyon analizi	52
Şekil 4.20.	Postnatal fare ovaryumlarında SETDB1 ekspresyonu	54
Şekil 4.21.	Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel SETDB1 ekspresyon analizi	56

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	:	Adenozin Difosfat
AMH	:	Anti-Müllerian Hormon
ASH1L	:	Yok, Küçük veya Homeotik 1 Benzeri
BMP4/7	:	Kemik Morfogenik Protein 4/7
cDNA	:	Komplementer (Tamamlayıcı) DNA
CFP1	:	CxxC Parmak Protein 1
CpG	:	Sitozin-fosfat-Guanin
CXXC	:	Sisteince Zengin Bölge
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	:	Deoksinükleotid Trifosfat
DOT1L	:	Telomerik Susturmayı Engelleyen Protein 1 Benzeri
EGA	:	Embriyonik Genom Aktivasyonu
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotid
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
FSH	:	Folikül Uyarıcı Hormon
GDF9	:	Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
GV	:	Germinal Vezikül
GVBD	:	Germinal Vezikül Yıkımı
H	:	Histidin
H₂O₂	:	Hidrojen Peroksit
HDM	:	Histon Demetilaz
HMT	:	Histon Metiltransferaz
JmjC	:	Jumonji C

K	:	Lizin
KL	:	Kit Ligand
KMT	:	Lizin Metiltransferaz
KMT1A/1B/1E:		Lizin Metiltransferaz 1A/1B/1E
KOK	:	Kumulus-Oosit Kompleksi
LH	:	Lüteinize Edici Hormon
LIF	:	Lösemi İnhibe Edici Faktör
LSD	:	Lizine Özgü Demetilaz
LTR	:	Uzun Uç Tekrarları
me1	:	Tekli Metilasyon
me2	:	İkili Metilasyon
me3	:	Üçlü Metilasyon
MI	:	Metafaz I
MII	:	Metafaz II
MLL1/2/3	:	Karışık Soy Lösemi Protein 1/2/3
MTaz	:	Metiltransferaz
Myr	:	Miristolasyon
NSD1/2/3	:	Nüklear Reseptör Bağlanma SET Domain Protein 1/2/3
NSN	:	Çevrili Olmayan Çekirdekçik
Omt2a	:	Oosit Olgunlaşması, Alfa
Omt2b	:	Oosit Olgunlaşması, Beta
Oog3	:	Oogenezin 3
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PGH	:	Primordiyal Germ Hücreleri

PHD	:	Bitki Homeodomain
PI	:	Profaz I
PRMT	:	Protein Arjinin Metiltransferaz
qRT-PCR	:	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
R	:	Arjinin
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
SAM	:	S-Adenozil-Metiyonin
SET	:	Çeşitliliğin Baskılayıcısı, Zeste ve Tritoraksın İlerleticisi
SET1	:	SET Domaini İçeren 1
SETD1A/1B	:	SET Domaini İçeren 1A/1B
SETD2	:	SET Domaini İçeren 2
SETD3	:	SET Domaini İçeren 3
SETDB1	:	SET Domaini Çatalhı Lizin Metiltransferaz 1
SH3	:	Src-Homoloji 3
SN	:	Çevrili Çekirdekçik
SUV39H1/H2	:	Çeşitliliğin Baskılayıcısı 3-9 Homolog 1/2
TDF	:	Testis Belirleyici Faktör
TGF-β	:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta
Zn	:	Çinko
ZP	:	Zona Pellusida

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Ovaryum foliküllerinin gelişimi, granuloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması, oosit olgunlaşması, ovulasyon ve atrezi gibi süreçler belirli genlerin aktive edilmesi ve baskılanmasını sağlayan epigenetik mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilir (Allegrucci ve ark., 2005). Bu epigenetik mekanizmalardan birisi olan histon modifikasyonları, folikül gelişimi ile oogenez boyunca oositlerin mayotik ilerlemesini içeren nüklear ve sitoplazmik olgunlaşmasında görev alan genlerin ekspresyonel kontrollerini gerçekleştirirler (Kota ve Feil, 2010). Kromatin yapısı, gen ekspresyonu ve genom kararlılığının düzenlenmesinde kritik rollere sahip olan histon modifikasyonlarından biri de histon metilasyonudur (Gu ve ark., 2010; Bannister ve Kouzarides, 2011).

Histon metilasyonu, histon metiltransferaz (HMT) enzimleri tarafından, metil vericisi olarak işlev gören S-adenozil-metiyoninden (SAM) elde edilen metil gruplarının genellikle lizin ve arjinin rezidülerine aktarımı olarak tanımlanmaktadır (Greer ve Shi, 2012). Lizin rezidüleri tekli, ikili veya üçlü metilasyon (sırasıyla me1, me2, me3) geçirebilirken; arjinin rezidüleri ise tekli veya ikili metilasyon (simetrik veya asimetrik şekilde) geçirebilmektedir (Greer ve Shi, 2012). HMT'ler, metil grubunun eklendiği amino asit rezidüsüne bağlı olarak histon lizin metiltransferazlar (KMT'ler) veya protein arjinin metiltransferazlar (PRMT'ler) olarak adlandırılmaktadır. Histon metilasyonu geri dönüşümlü bir süreç olup; eklenen metil grupları histon demetilazlar (HDM'ler) tarafından kaldırılabilir (Black ve ark., 2012). HMT ve HDM'ler gen ekspresyonu, deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu, hücre bölünmesi ve kromatin yeniden düzenlenmesi gibi süreçleri dinamik bir şekilde kontrol etmektedirler (Cui ve ark., 2019).

Histon metilasyonu ve HMT'ler, oosit gelişimi ve folikülogenez boyunca gereksinim duyulan genlerin transkripsiyonel aktivitelerini kontrol eder (Gu ve ark., 2010). Bu genlerin ekspresyonel düzenlenimlerinde meydana gelen değişimler, memeli oosit gelişiminin ilerlemesini geciktirebilmesinin yanı sıra oositteki kromozom organizasyonu ve ayrılmasını bozabilmektedir (Gu ve ark.,

2010). KMT'leri kodlayan genlerin ekspresyonlarındaki eksiklik veya fazlalıkların, oositlerdeki sitoplazmik ile nükleer olgunlaşmada ve folikül gelişiminde bozulmalara sebep olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmaların ilkinde, oositte gen ekspresyonunu düzenleyen H3K4 metilasyonunu gerçekleştiren SET domaini içeren 1B (SETD1B)'nin, oosit olgunlaşması için önemli olan KMT'lerden biri olduğu belirlenmiştir (Brici ve ark., 2017). *Setd1b* geninin bu araştırmada koşullu nakavt edilmesi: oositteki ana transkripsiyon faktörlerin düzeyinin azalması, atretik folikül sayısının yükselmesi, ooplazmada granüllerin artması, polispermi, 2-hücreli embriyo aşamasında tutulumlara ve sonuçta dişi infertilitesine neden olmuştur.

Bir başka KMT olan SET domaini içeren 2 (SETD2)'nin oosit epigenomunun kurulmasında anahtar bir rolü olduğunun gösterildiği çalışmada; SETD2'nin maternal eksikliğinin oosit olgunlaşmasında bozukluklara, metafaz II (MII) oosit sayısının azalmasına ve dişi sterilitesine neden olduğu ortaya konulmuştur (Xu ve ark., 2019). Ayrıca, SETD2'nin yokluğu oositte normal olmayan DNA metilasyon kurulumuna, embriyoların 1-hücreli aşamada tutulumuna, DNA replikasyonu ve embriyonik genom aktivasyonunda (EGA) başarısızlığa sebep olmuştur. Sitozin-fosfat-guanin (CpG) bağlanma proteini veya CXXC parmak proteini 1 (CFP1) ise fare oositlerinde H3K4me3 metilasyonunu gerçekleştiren SETD1B'in içinde bulunduğu kompleksin anahtar bir bileşenidir (Lee ve Skalnik, 2005). *Cxxc1*'in oosite koşullu nakavtı, germinal vezikül yıkımı (GVBD) ve birinci polar cisimcik atılım oranında azalmaya ve metafaz I (MI) aşamasında mayotik hücre döngüsünün tutulumuna; sonuç olarak oosit mayotik olgunlaşmasında bozulmalara neden olarak dişi infertilitesine yol açmıştır (Sha ve ark., 2018). Bununla birlikte bu çalışmada, CFP1'in aşırı ekspresyonunun MI ve MII aşamalarında iğ ipliklerinin oluşumunu bozduğu da rapor edilmiştir. SET domaini bifürkat (çatallı) histon lizin metiltransferaz 1 (SETDB1)'in gelişen oositlerde genel H3K9me2 metilasyon seviyelerini kontrol ettiği belirlenmiştir (Kim ve ark., 2016). *Setdb1*'in oositte koşullu nakavt edildiği bu çalışmada, mayoz boyunca GV ve MI aşamasında tutulumlar ve mayoza yeniden başlayıp devam etmede bozulmalar meydana gelmiştir.

Dişi fertilitesindeki kayıp, ileri anne yaşı, hormonal dengesizlik, çevresel faktörler ve epigenetik değişimler gibi pek çok farklı faktörlere bağlı olabilmektedir (Senapati, 2018). Yaşlanmayla birlikte dişi fertilitesinde düşüş olduğu da bilinmektedir (Shirasuna ve Iwata, 2017). *Kmt*'lerin mRNA ve protein seviyelerindeki değişimlerin, yaşla birlikte fertilitite kaybına neden olabilecek histon metilasyon kurumunda bozulmalara neden olabileceği düşünülmektedir. Yaşla birlikte, fare oositlerinde histon metilasyon seviyelerinin de değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Kageyama ve ark., 2007; Manosalva ve Gonzalez, 2010). Fakat, oosit olgunlaşması için kritik öneme sahip KMT'lerin gen ve protein düzeylerinin biyolojik yaşlanmaya bağlı değişimleri ayrıntılı olarak bilinmemektedir.

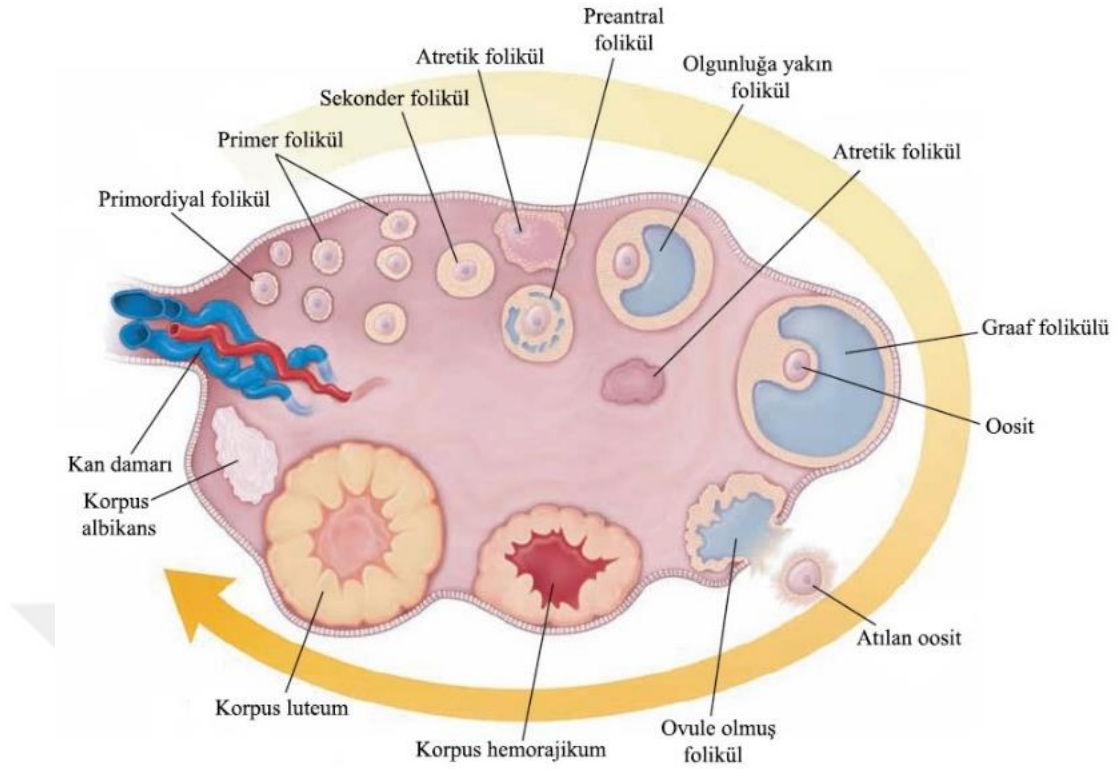
Bu bilgiler ışığında hipotezimiz: üçüncü hafta (genç grup), 7. hafta (ergin grup), 18. hafta (geç ergin grup), 52 ve 60. haftalar (yaşlı grup) postnatal fare ovaryumlarında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, *Setdb1* genleri mRNA ve protein düzeyinde değişimler gösterir.

Bu hipotezden yola çıkarak, bu projede postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryumlarında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* histon lizin metiltransferaz genlerinin zamansal ve uzamsal ekspresyon durumlarının oositler, farklı gelişim aşamasındaki foliküller ve ovaryum hücrelerinde detaylı bir şekilde araştırılması amaçlanmıştır. Böylece, fertilitite kaybının eşlik ettiği ovaryum yaşlanmasının moleküler temelinde bu genlerdeki ekspresyonel değişimlerin etkisinin olup olmadığının belirlenmesine yönelik önemli bir adım atılacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumların Histolojik Yapısı

Ovaryumlar, karın boşluğunun sağ ve sol alt kadrantlarında olmak üzere bir çift şeklinde bulunan periton içi yerleşimli endokrin organlardır (Ross ve Pawlina, 2017). Her bir ovaryumun belirli bir kısmı, geniş ligamente mezovaryum olarak adlandırılan bir periton katlantısı aracılığıyla; uterus tüp bölümü ise pelvis duvarına bağlayıcı ligament aracılığıyla tutunmaktadır. Ovaryum ligamenti ise organın uterusla bağlanmasına aracılık etmektedir. Ovaryum yüzeyi ergenlik (puberte) öncesi daha düzgün bir yapıya sahipken, ergenlik sonrası gelişen foliküller ve tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle daha girintili çıkıntılı bir hal almaktadır. Ovaryum yüzeyi, tek katlı kübik veya yassı hücrelerden oluşan bir germinal epitel ile kaplanmaktadır. Germinal epitelin hemen altında sıkı bağ doku yapısındaki tunika albuginea yer almaktadır. Tunika albugineanın altında ise ovaryumun korteksi bulunmaktadır. Korteks, ovaryumun medullasını çevrelemektedir. Bu bölgede bağ doku hücreleri ve gelişimin farklı aşamalarındaki ovaryum folikülleri bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2017). Medulla bölgesi ise ovaryumun merkezinde ve gevşek bağ doku yapısında olup; kan ve lenf damarları ile sinirleri içermektedir (Şekil 2.1). Bilindiği gibi, ovaryumlar olgun oositlerin üretimi (oogenezi), ovaryum foliküllerinin gelişimi (folikülogenez) ve başlıca steroid hormonlar olan östrojen ve progesteron üretimi (steroidogenezi) gibi işlevleri yerine getirmektedir (Edson ve ark., 2009; Ross ve Pawlina, 2017).



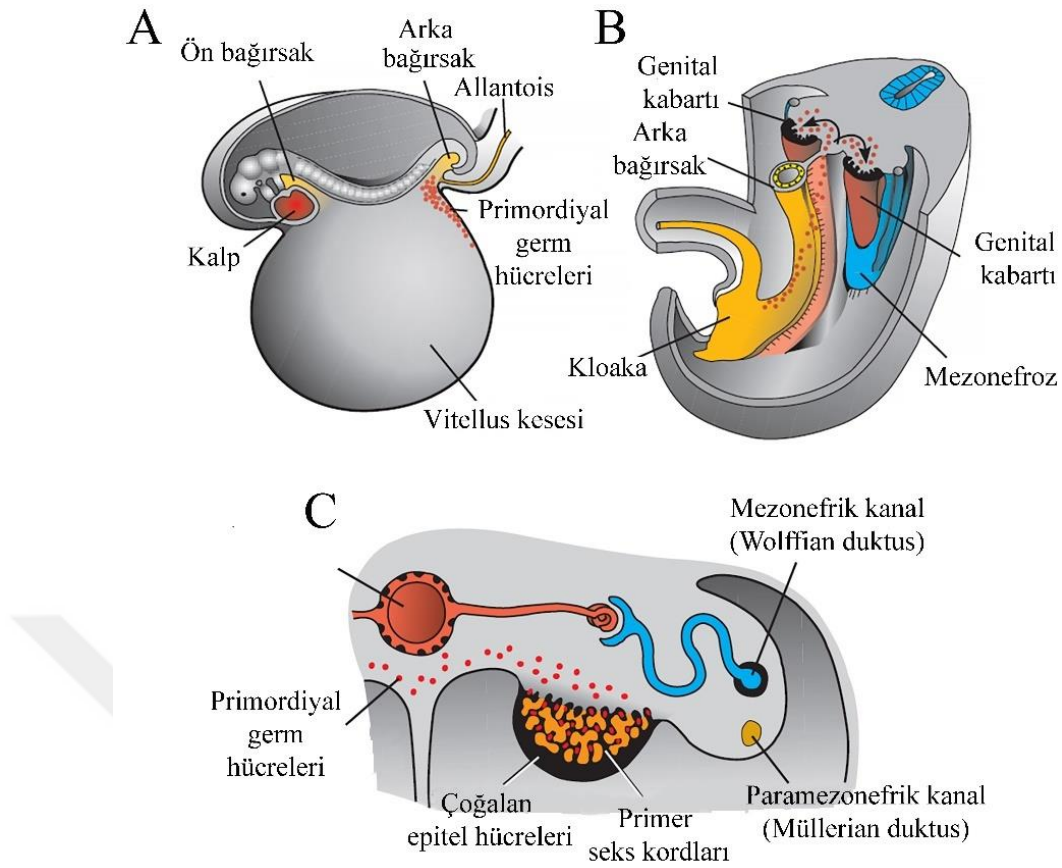
Şekil 2.1. Ovaryumun histolojik yapısı. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Ross ve Pawlina, 2017) değiştirilerek alınmıştır. Ovaryum en dıştan germinal epitel ile çevrilidir. Germinal epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu karakterinde tunika albuginea bulunmaktadır. Ovaryum, dışta foliküllerin yer aldığı korteksten; içte, kan ve lenf damarları ile sinirlerin bulunduğu medulladan oluşur.

2.2. Memelilerde Oogenez

Dişi gonadlar mezodermal epitel (mezotel), embriyonik bağ dokusu olan mezenkimal doku ve farklanmamış cinsiyet hücreleri olan, daha sonraya buraya göç eden primordiyal germ hücrelerinden (PGH'ler) oluşurlar (Şekil 2.2) (Moore ve ark., 2016). İnsanda gonadal gelişim, ilk olarak 5. haftada mezotelin kalınlaşmasıyla başlar. Daha sonra mezotel ve hemen altındaki mezenkimal doku çoğalarak mezonefrozun orta hattının her iki yanında gonadal kabartı olarak adlandırılan bir kabarıklık meydana getirir. Parmak şekilli gonad kordonları, hemen altında yer alan mezenkim içerisine doğru gelişirler ve bu farklanmamış gonadlar dışta korteks ve içte medulladan oluşmaktadırlar. Gelişiminin 7. haftasından önce dişi ve erkek gonadların görünümü benzerdir ve bu nedenle farklanmamış gonadlar olarak isimlendirilirler. Testislerin gelişebilmesi için Y kromozomunun kısa kolunda testis belirleyici faktörü (TDF) kodlayan *SRY* geni bulunmaktadır (Makela ve ark., 2019). TDF, testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. TDF'nin varlığında, gonad kordonları seminifer tübüllere farklılaşmaktadır. Y kromozomunun yokluğunda ise ovaryum gelişimi meydana gelir. Dişi fenotipin gelişimi için iki X kromozomuna ihtiyaç vardır ve X kromozomu

ovaryum gelişimi için gerekli genleri taşır. Ovaryumların, gelişimin 10. haftasına kadar histolojik detayları net olarak ayırt edilememektedir. Primer seks kordonları belirgin değildir ve medulla içerisine girerek kalıntı bir yapı olan rete ovaryumu meydana getirirler. Erken fetal dönemde, kortikal kordonlar, ovaryum yüzey epitelinden köken alır ve altta bulunan mezenkim içerisine girinti yaparlar. Kortikal kordonların boyutları arttığı zaman, PGH'ler kortikal kordonların içlerine girerler. Hem erkek hem de dişi embriyolarda iki çift genital kanal bulunmaktadır. Erkek üreme sisteminin gelişiminde mezonefrik kanallar (Wolffian duktus) rol oynarken; dişi üreme sisteminin gelişiminde ise paramezonefrik kanallar (Müllerian duktus) önemli bir yer tutmaktadır (Moore ve ark., 2016)

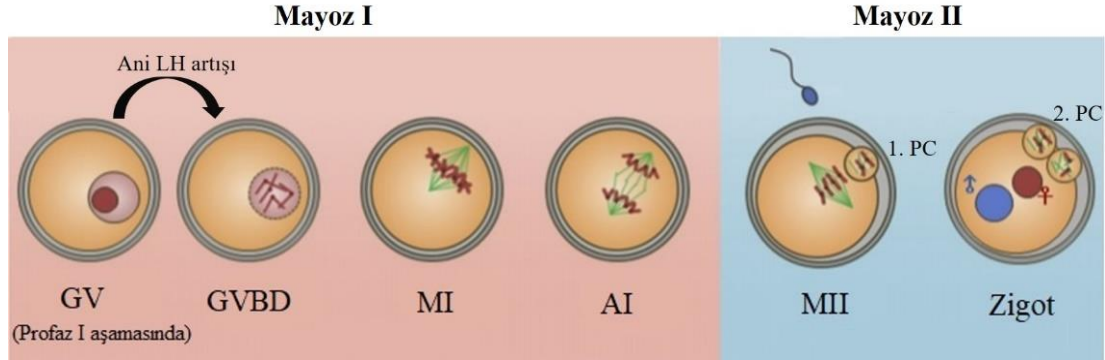
PGH'ler, insanda ilk olarak vitellus kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın olan endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar (Şekil 2.2A) (Sadler, 2017). Gelişimin yaklaşık 4. haftasında, embriyo katlanmaları esnasında vitellus kesesi embriyo içerisine dahil olur. Bu esnada, PGH'ler, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2.2B). Gelişimin 6. haftasında PGH'ler mezenkim içerisine girerek kortikal kordonlarla birleşirler (Şekil 2.2C). Gonadal farklılaşma ile birlikte PGH'lerin etrafının sarıldığı kortikal kordonlar gelişir. PGH'ler gonadlara yerleştikleri zaman oogonyumlara farklılaşırlar ve oogonyumlar bir araya gelerek germinal kist olarak da bilinen germinal hücre kümelerini meydana getirirler. Daha sonra gonadal kabartının yüzey epitelinden köken alan hücreler, germinal kistteki her bir oogonyumu çevreleyerek primordiyal folikülleri oluşturur.



Şekil 2.2. Primordiyal germ hücrelerinin (PGH'lerin) genital kabartıya göçü. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Sadler, 2017) değiştirilerek alınmıştır. PGH'ler ilk olarak allantoise yakın kısımda endoderm hücreleri arasında ortaya çıkarlar. Daha sonra, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek, gonadal (genital) kabartıya ulaşır ve yerleşimlerini tamamlarlar.

Oogonyumlar, gebeliğin ikinci ayından yedinci aya kadar mitotik bölünmelerle çoğalarak sayılarını 7 milyona kadar ulaştırırlar ve daha sonra bunların bir kısmı apoptoz ile ortadan kaldırılırken, kalanlar ilk mayotik bölünmeye girerler (Pinkerton ve ark., 1961). Mayoza giren oositler, bu aşamadan itibaren primer oosit olarak isimlendirilirler ve fetal dönemin sonuna kadar tüm primer oositler oluşmaktadır. Primer oositler, ergenliğe kadar ilk mayoz bölünmenin profaz I evresinin diploten aşamasında [profaz I (PI) oosit] beklemektedirler. Bu aşamada, primer oositin çekirdeği germinal vezikül (GV) olarak tanımlandığı için bu oositlere GV oosit de denilmektedir. Ergenlik ile her menstrual döngüde 5-12 primordiyal folikül gelişir fakat sadece bir tanesi olgun (dominant) foliküle dönüşür ve bu süreçte oosit de hacimsel olarak büyümektedir. Hipofizden salgılanan lüteinize edici hormonun (LH) uyarısına bağlı olarak germinal vezikül yıkımı (GVBD) gerçekleşir. Böylece, ilk mayotik bölünme tamamlanarak, birinci polar cisim atılmaktadır. Daha sonra, oosit ikinci mayotik bölünmeye başlar fakat tamamlayamaz ve metafaz II (MII) evresinde

durur. Bu aşamadaki oosit, sekonder veya MII oosit olarak tanımlanır. Döllenmenin gerçekleşmesi durumunda ikinci mayotik bölünme tamamlanır ve ikinci polar cisim atılır.



Şekil 2.3. Memelilerde oositin mayotik olgunlaşması. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Fan ve Sun, 2019) değiştirilerek alınmıştır. Primer oosit, doğum öncesinde birinci mayoz bölünmeye başlar ve profaz I'ın diploten aşamasında beklemektedir. Ergenlikte, ani lüteinize edici hormon (LH) artışından sonra oositin birinci mayoz bölünmesi devam eder, germinal vezikül yıkımı (GVBD) gerçekleşir. Metafaz I (MI), anafaz I (AI) ve telofaz I aşamalarından sonra ilk mayotik bölünme tamamlanır ve birinci polar cisim (1. PC) atılır. Oositin ikinci mayotik bölünmesi, metafaz II evresinde (MII) durur. Sperm ile döllenmenin gerçekleşmesi durumunda ikinci mayotik bölünme tamamlanır ve ikinci polar cisim (2. PC) atılır.

Tamamen büyümüş GV oositler, kromatin düzenine göre, yoğun olmayan bir kromatin yapısına sahip ise çevrili olmayan çekirdekçik (NSN); yoğun ve sıkı bir kromatin yapısına sahip ise çevrili çekirdekçik (SN) olarak tanımlanabilmektedir. Başlangıçta GV oositler, NSN tipte bir kromatin düzenine sahipken, oosit olgunlaşması devam ettikçe transkripsiyon baskılanma belirteci olan SN tip kromatin düzenine geçmektedir (Tan ve ark., 2009).

2.3. Memelilerde Folikülogenez

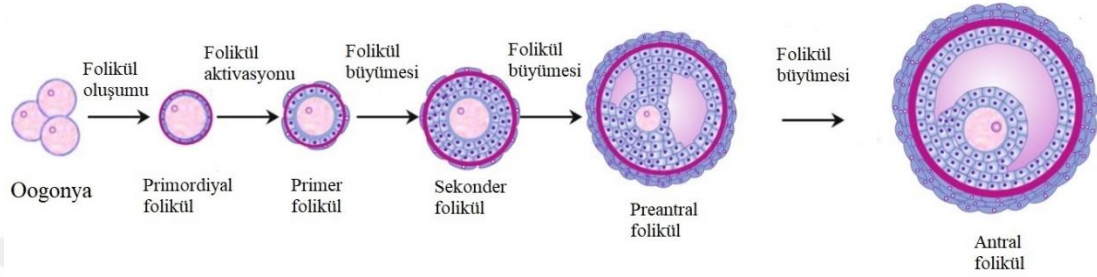
Çeşitli boyutlardaki ovaryum folikülleri, her birinin içinde birer oosit olacak şekilde ovaryum korteksinin stroması içinde dağılmışlardır. Primordiyal foliküller, ovaryuma ait yassı epitel hücrelerin profaz I aşamasındaki primer oositi çevrelemesiyle meydana gelmektedir (Şekil 2.4). Bu yassı epitel hücreleri, bazal lamina üzerine oturmaktadır. Primordiyal foliküller, genellikle tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Ergenlik dönemine doğru 5-12 kadar primordiyal folikül aktive olarak sırasıyla primer, sekonder, preantral ve antral folikülleri meydana getirmektedir (Moore ve ark., 2016). Primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar olan bu süreç folikülogenez olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4). Primordiyal foliküllerin toplam sayısı, dişinin sahip olduğu folikül havuzunu temsil etmektedir. Fetüste yaklaşık 5 milyon olan

primer oositin büyük çoğunluğu prenatal hayatın beşinci ayından itibaren atreziye uğrar ve doğumda %20'sinden azı kalır. Ergenlikte ise primer oosit sayısı 300-400 bine kadar düşmektedir. Bir kadının üreme yaşamı boyunca primer oositlerin yaklaşık 400 tanesi olgunlaşmasını tamamlayıp sekonder oosit olur ve ovulasyonla atılır (Moore ve ark., 2016; Ross ve Pawlina, 2017).

Primordiyal folikülde bulunan epitel kaynaklı yassı folikül hücreleri, çoğalarak kübik bir hal alırlar. Tek katlı kübik folikül hücrelerinin primer oositi çevrelediği bu aşama, primer folikül olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada primer oosit büyümeye başlar ve folikül hücreleri ile birlikte belirli proteinleri sentezlemeye başlarlar. Bu proteinler bir araya gelerek, glikoprotein yapıda ve oosit ile folikül hücreleri arasındaki bir kılıf olan zona pellusidayı (ZP) oluştururlar. Daha sonra, tek katlı kübik hücreler mitotik bölünmelere devam eder ve çok tabakalı bir hal alırlar. Bu şekilde folikül hücrelerinin çok tabakalı bir hal aldığı ve hücrelerin arasında herhangi bir boşluk bulunmadığı aşama sekonder folikül olarak tanımlanır. Bu aşamadan itibaren folikül hücreleri artık granuloza hücreleri olarak adlandırılır. Ayrıca bu aşamada, granuloza hücreleri çoğaldığı zaman hemen çevresinde yer alan stromal hücreler folikül etrafında yeni bir düzenlenim sergileyerek teka tabakasını (Teka folikülü olarak da bilinir.) meydana getirirler. Folikül gelişimi ile birlikte, bu tabaka teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya farklılaşır. Teka interna bol miktarda kan damarı içermekle birlikte, fibroblastlar ve kollajen demetlerine de sahiptir. Teka interna hücreleri, LH reseptörü ifade ederler. Teka eksterna ise bağ doku hücrelerinden oluşan bir tabakadır ve düz kas hücreleri ile kollajen demetlerini içerir.

Sekonder folikül gelişerek preantral folikülü meydana getirmektedir. Preantral folikül, çok tabakalı granuloza hücreleri arasında küçük veziküler boşlukların oluşmaya başlaması ile karakterizedir. Bu boşluklarda, hiyaluronan bakımından zengin bir folikül sıvısı (likör folikülü) bulunmaktadır. Bu sıvıda, büyüme faktörleri ve steroid yapılı çeşitli moleküller de yer almaktadır. Granuloza hücreleri arasındaki bu sıvı biriktikçe, boşluklar büyür ve daha sonra bu boşluklar birleşerek hilal biçimli tek, büyük bir boşluk olan antrumu oluşturur. Oosit, bu folikül içerisinde merkezi olmayan (eksantrik) bir yerleşim gösterir ve korona radyata isimli tek katlı granuloza hücreleri ile çevrelenir. Korona radyatanın dışında, oositi çevreleyen özel granuloza hücrelerine de kumulus hücreleri adı verilir. Oositi folikül duvarına bağlayan kumulus hücre kitlesi

de kumulus ooforus olarak bilinmektedir. Antruma doğru çıkıntı yapan, oosit ve kumulus hücrelerinden oluşan yapının tamamı ise kumulus-oosit kompleksi (KOK) olarak tanımlanır. Bu arada, folikül duvarını oluşturan granuloza hücreleri, membrana granuloza ya da stratum granulozum olarak isimlendirilir. Bu şekilde büyük, tek bir antrum ve eksantrik yerleşim gösteren KOK içeren foliküllere olgun, antral veya Graaf folikülü denir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Memelilerde folikülogenez süreci. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Araujo ve ark., 2014) değiştirilerek alınmıştır. Oogonya primordiyal germ hücrelerinden köken alır ve ovaryumda oositlere gelişirler. Ergenlikte (pubertede), bir grup primordiyal folikülden sırasıyla primer, sekonder, preantral ve antral foliküller oluşur. Primordiyal folikül, tek katlı yassı folikül hücrelerine sahipken, primer folikül tek katlı kübik folikül hücrelerini içerir. Sekonder folikülde, iki veya daha fazla sayıda granuloza hücre katmanı bulunmaktadır. Preantral folikül ise küçük boşluklar içeren çok katmanlı granuloza hücreleri ile karakterizedir; antral folikülde bu boşluklar birleşerek büyük ve tek bir antrumu meydana getirmektedir.

Folikülogenez, gonadotropin bağımsız ve gonadotropin bağımlı olmak üzere iki evrede gerçekleşmektedir. Folikül gelişiminin başlangıç aşaması olan gonadotropin bağımsız faz, oositin büyüme ve gelişmesi ile karakterizeyken; gonadotropin bağımlı faz folikül boyutlarındaki belirgin artış ile tanımlanmaktadır (Williams ve Erickson, 2015). Gonadotropinler olarak bilinen folikül uyarıcı hormon (FSH) ve LH, hipofiz bezinin ön lobunda yer alan gonadotrop hücreleri tarafından sentez edilip, salgılanırlar. Folikülogenez sürecinin sekonder folikül aşamasına kadarki dönemi içeren gonadotropin bağımsız evre, otokrin ve parakrin mekanizmalar aracılığıyla üretilen büyüme faktörleri ile kontrol edilmektedir. Preantral ve antral folikül aşamalarını içeren gonadotropin bağımlı evre ise büyüme faktörlerinin yanı sıra FSH ve LH hormonları tarafından düzenlenir (Williams ve Erickson, 2015). Oosit, granuloza hücreleri ve teka ile interstisiyel hücreler arasındaki parakrin etkileşimler, primordiyal folikül aktivasyonunu düzenler (Adhikari ve Liu, 2009). Bu etkileşime, dönüştürücü büyüme faktörü-beta ($TGF-\beta$) üst ailesi tarafından salgılanan kemik morfogenezik protein 4 ve 7 (BMP4 ve BMP7), büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) gibi büyüme faktörleri aracılık eder. Bunların yanı sıra, trombosit kaynaklı büyüme faktörü

(PDGF), fibroblast büyüme faktörü 7 (FGF7), kit-ligand (KL) ve lösemi inhibe edici faktör (LIF) gibi moleküller de primordiyal folikülün primer foliküle dönüşümünde kritik bir rol oynar. Primer folikül aşamasındaki granuloza hücreleri, FSH reseptör mRNA'sını eksprese etmeye başlar ve FSH'ın primer folikülün preantral aşamaya gelişebilmesi için gerekli olduğu ortaya konulmuştur (Oktay ve ark., 1997; Oktay ve ark., 1998). LH reseptörü ise FSH'ın uyarımıyla preantral folikülün granuloza hücrelerinde eksprese olur (Sullivan ve ark., 1999). Ayrıca, LH reseptörü, teka hücreleri ve stromal alandaki bazı hücrelerde de bulunmaktadır (Nahum ve ark., 1995).

FSH ve LH sentez ve salınımı, hipotalamus-hipofiz-ovaryum ekseninde düzenlenir (Klein, 2003). TGF- β ailesinin üyelerinden olan aktivin ve inhibitörler, FSH sentez ve salınımının başlıca düzenleyicileridir. Aktivin A ve B, FSH'ı kodlayan genin transkripsiyonunu düzenleyerek FSH salınımını uyarırken; inhibitör A ve B izoformları ise aktivinlerin bu etkisini bloke ederek FSH sentez ve salınımını inhibe eder. Benzer şekilde, aktivin A, LH üretimini artırır. Ayrıca, FSH ve LH hormonlarının salınımı östrojen, progesteron ve testosteron hormonları tarafından da düzenlenir. Östrojen, negatif geri bildirim ile FSH ve LH salınımını azaltırken; pozitif geri bildirim mekanizması ile ovulasyondan hemen önce ani LH artışına (LH piki) neden olur. LH üretimindeki ani artış ile ovulasyon tetiklenir ve KOK, antral folikülde oluşan folikül içi basınç ve teka tabakasındaki düz kasların kasılmasına bağlı olarak uterus tüplerinin (ovidukt) ampulla kısmına atılır. Ovulasyondan sonra geriye kalan granuloza ve teka hücreleri, derin katlantılar yaparak korpus luteum isimli luteal bezi oluşturur. Korpus luteum, gelişmekte olan erken dönem embriyonun implantasyonu için endometriyumu hazırlamak amacıyla östrojen ve progesteron salgılar. Fertilizasyonun gerçekleşmesi durumunda korpus luteum büyür ve hormon salınımına devam eder. Eğer fertilizasyon gerçekleşmez ise korpus luteum dejenere olur. Daha sonra dejenere olan korpus luteum hücrelerinde hiyalin materyali birikir ve bir yara (skar) dokusu olarak ifade edilen korpus albicans oluşur. Korpus albicans, birkaç ay içerisinde ovaryum korteksinin derinlerine gömülür ve sonrasında kaybolur.

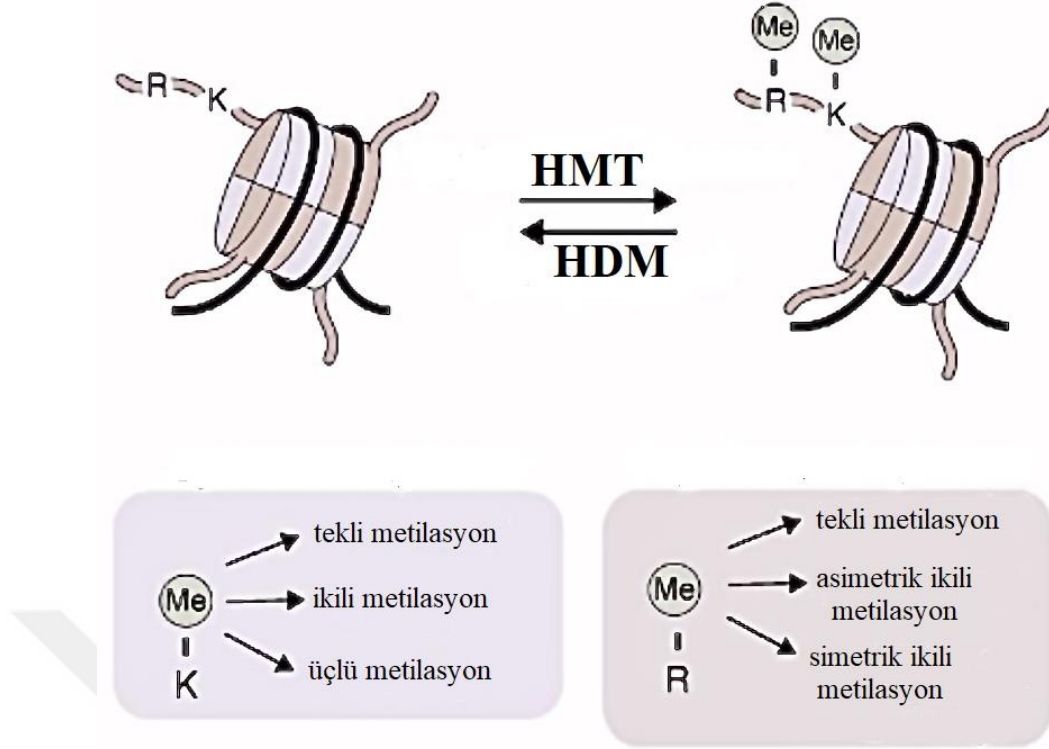
Memeli oogenez ve folikülogenez süreçlerinde, kromatin yapısı ve gen transkripsiyonu genetik ve epigenetik mekanizmalarla düzenlenir (Allegrucci ve ark., 2005; Seneda ve ark., 2008). Bu süreçler boyunca transkripsiyonel aktivitenin epigenetik kontrolü, oosit ve folikül gelişimi için kritik öneme sahiptir (Bromfield ve

ark., 2008; Pan ve ark., 2012). Epigenetik modifikasyonlardan biri olan histon metilasyonu; folikül büyümesi ve oosit mayotik olgunlaşması boyunca kromatin yapısının ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli roller oynar (Pan ve ark., 2012).

2.4. Histon Metilasyonu

İlk olarak 1940 yılının başlarında Conrad Waddington tarafından epigenetik terimi, “fenotipi ortaya çıkaran genler ve ürünleri arasındaki nedensel etkileşimleri inceleyen biyoloji dalı” olarak tanımlanmıştır (Waddington, 1942). Histon modifikasyonları, gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli rollere sahip olan epigenetik mekanizmalardan birisidir (Kouzarides, 2007). H2A, H2B, H3 ve H4 olarak adlandırılan kor histon proteinleri, her birinden ikişer tane olması nedeniyle oktamer (sekizli) yapısını oluştururlar ve DNA paketlenmesinin ilk basamağı olan nükleozom yapısına katılırlar. Nükleozomdan çıkıntı yapan histon proteinlerinin N-terminal uçları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon, adenosin difosfat (ADP) ribozilasyonu ve deaminasyon gibi modifikasyonlara uğrayabilirler (Bannister ve Kouzarides, 2011). Bu modifikasyonlar, kromatin yapısı ve gen ifadesinin düzenlenmesinin (Stillman, 2018) yanı sıra, DNA onarımı (Huertas ve ark., 2009), replikasyon (Bar-Ziv ve ark., 2016), alternatif birleştirme (Luco ve ark., 2010) ve rekombinasyon (Szekvolgyi ve ark., 2015) gibi süreçlerde de önemli rollere sahiptirler.

Histon metilasyonu, S-adenozil-metiyoninden (SAM) sağlanan metil gruplarının histon N-terminal uçlarında yer alan belirli amino asit rezidülerine eklendiği geri dönüşümlü bir süreçtir. Bu süreç, histon metiltransferaz (HMT) enzimleri tarafından gerçekleştirilmektedir (Murray, 1964; Greer ve Shi, 2012). Metil grupları, histon demetilazlar (HDM’ler) tarafından geri dönüşümlü olarak kaldırılabilir (Şekil 2.5). Histon metilasyonu, genellikle lizin (K) ve arjinin (R) (Schreiber ve Bernstein, 2002), nadiren de histidin (H) (Fischle ve ark., 2008) rezidülerinde gerçekleşmektedir. Lizinlerin epsilon (ϵ)-amino gruplarına bir, iki veya üç metil grubu eklenebilirken (me1, tekli metilasyon; me2, ikili metilasyon; me3, üçlü metilasyon olarak gösterilmektedir.) (Martin ve Zhang, 2005); arjinin rezidüleri ise guanidil gruplarından tekli metilasyon (me1) veya ikili metilasyona [simetrik (me2s) veya asimetrik (me2a) şeklinde] uğrayabilmektedirler (Di Lorenzo ve Bedford, 2011). Histidinin ise sadece tekli metilasyona (me1) uğrayabildiği rapor edilmiştir (Gershey ve ark., 1969).



Şekil 2.5. Histon metilasyonu ve demetilasyonu. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Gong ve Miller, 2019) değiştirilerek alınmıştır. Histon metiltransferazlar (HMT'ler), metil grubunun (-CH₃; me) histonların lizin (K) ve arjinin (R) rezidülerine transfer edilmesini katalizlerken; histon demetilazlar (HDM'ler), eklenen metil gruplarının kaldırılmasını geri dönüşümlü olarak sağlar. Me, metilasyon.

Histon metilasyonunu gerçekleştiren enzimler, genel olarak HMT ailesi adı altında toplanmaktadır. Metilasyonun gerçekleştiği aminoasit rezidüsüne bağlı olarak lizin, arjinin veya histidin metiltransferazlar olarak isimlendirilebilmektedirler. Histidini metile eden SET domainin içeren protein 3 (SETD3)'ün tek histidin metiltransferaz olduğu bilinmekle birlikte katalitik aktivitesi tam olarak açıklanamamıştır (Wilkinson ve ark., 2019).

2.4.1. Histon Arjinin Metilasyonu

Histon arjinin metilasyonu, protein arjinin metiltransferazlar (PRMT'ler) tarafından katalizlenir ve SAM'dan sağlanan metil grubu arjinin rezidülerine aktarılır (Bedford ve Clarke, 2009). Memelilerde, tip I, II ve III olmak üzere 3 farklı PRMT ailesi tanımlanmaktadır: tip I ailesi PRMT1, 2, 3, 4, 6, 8; tip II ailesi PRMT5 ve 9; tip III ailesi ise PRMT7'yi içermektedir (Yang ve Bedford, 2013). Bilinen memeli PRMT'lerin tamamı korunmuş bir metiltransferaz (MTaz) domaini içermektedir; ayrıca, PRMT'lerin bazıları Src-homoloji 3 (SH3) (PRMT2), çinko parmak (Zn) (PRMT3 ve 9), miristolasyon (Myr) (PRMT8) ve F-kutusu (PRMT9) gibi domainleri de bulundurmaktadır (Bachand, 2007).

Histon arjinin metilasyonu, gerçekleştiği bölgeye ve eklenen metil grubunun sayısı ve tipine (simetrik veya asimetrik) bağlı olarak transkripsiyonel baskılama veya aktivasyon yapabilmektedir (Litt ve ark., 2009). Örneğin, histon 3 arjinin 2'de meydana gelen simetrik ikili metilasyon (H3R2me2s) transkripsiyonel aktivasyon ile ilişkiliyken (Migliori ve ark., 2012), bu rezidünün asimetrik ikili metilasyonu (H3R2me2a) transkripsiyonel baskılamaya neden olmaktadır (Guccione ve ark., 2007; Kirmizis ve ark., 2007). Bununla birlikte, H4R3 metilasyonu asimetrik durumdayken transkripsiyonel aktivasyonu sağlarken (Balint ve ark., 2005; X. Li ve ark., 2010); simetrik durumda ise transkripsiyonel baskılamaya sebep olmaktadır (Dhar ve ark., 2012).

Sonuç olarak, PRMT'ler ve bunların yaptığı arjinin metilasyonu RNA işlenmesi, ribozom biyosentezi, DNA onarımı, sinyal iletimi ve transkripsiyonel düzenlenim gibi pek çok hücresel süreçte görev almaktadırlar (Bedford ve Richard, 2005).

2.4.2. Histon Lizin Metilasyonu

Histon lizin metilasyonu, KMT'ler tarafından gerçekleştirilmekte olup, bir metil vericisi olan SAM'dan elde edilen metil gruplarının lizin rezidülerine aktarımı olarak tanımlanmaktadır (Cui ve ark., 2019). KMT'lerin büyük bir çoğunluğu evrimsel olarak korunmuş olup, yaklaşık 130 amino asit uzunluğundaki katalitik aktiviteyi sağlayan çeşitliliğin baskılayıcısı, zeste ve tritoraksın ilerleticisi (SET) domaini içermektedir (Feng ve ark., 2002; Dillon ve ark., 2005). KMT'ler SET domaini haricinde, SET-ncesi (pre-SET), SET-sonrası (post-SET), bitki homeodomain (PHD), C2H2 ve sistein veya lizin amino asitleri açısından zengin domainleri de bulundurmaktadırlar. SET domainini çevreleyen SET-ncesi ve SET-sonrası domainler, 9 sistein ve 3 çinko bölgesi içermektedir (Dillon ve ark., 2005). Sistein amino asidince zengin bölgelerin görevi tam olarak bilinmemekle birlikte (Scheer ve Zaph, 2017), PHD domaininin metillenmiş lizin rezidülerine bağlanmaya katkısı olduğu belirtilmektedir (Hyun ve ark., 2017). C2H2 domaini, çinko parmak bağlanma domaini olarak işlev görürken (Dillon ve ark., 2005); lizin amino asidince zengin bölgelerin, ubikitin ile bir etkileşim kurmak ve nkleozoma bağlanmak için önemli alanlar olduğu rapor edilmiştir (Oh ve ark., 2010). SET domaini içeren KMT'ler SUV39, SET1, SET2, EZ, RIZ, SMYD ve SUV4-20 olmak üzere yedi alt sınıfa ayrılmaktadır (Dillon ve ark., 2005). SET7/9 ve SET8 gibi bazı metiltransferazlar, SET domaini içermelerine rağmen alt sınıf

KMT'lerle ortak domainleri paylaşmadıkları için bu sınıflandırmada yer almazlar (Dillon ve ark., 2005). Bir başka KMT ailesi olan telomerik susturmayı engelleyen protein 1 benzeri (DOT1L), SET domaini içermez ve kendi katalitik domaini aracılığıyla histon 3 lizin 79 (H3K79) metilasyonunu gerçekleştirebilir (Feng ve ark., 2002).

Farklı KMT'ler, aynı lizin rezidüleri üzerindeki metilasyonu katalizleyebilirler veya belirli bir lizin rezidüsü üzerindeki metilasyonu sadece bir KMT gerçekleştirebilmektedir. Örneğin; somatik hücrelerde, histon 3 lizin 36 ikili metilasyonu (H3K36me₂), nüklear reseptör bağlanma SET domain protein 1, 2 ve 3 (NSD1, NSD2 ve NSD3 olarak kısaltılmaktadır.) ve yok, küçük veya homeotik 1 benzeri (absent, small veya homeotic-like 1; ASH1L) tarafından gerçekleştirilebilirken; H3K36me₃ sadece SET domaini içeren 2 (SETD2) tarafından katalizlenmektedir (Husmann ve Gozani, 2019). Bunun yanı sıra, H3K4'ü metile edebilen 6 farklı KMT vardır: SET domaini içeren 1A (SETD1A), SETD1B, karışık soy lösemi proteini-1 (MLL1), MLL2, MLL3 ve MLL4 (Eissenberg ve Shilatifard, 2010). KMT'ler, lizin rezidüsü ve metilasyon sayısı açısından yüksek derecede özgünlük gösterir. Örneğin, çeşitliliğin baskılayıcısı 3-9 homolog 1 (SUV39H1; lizin metiltransferaz 1A (KMT1A) olarak da bilinir) ve SUV39H2 (KMT1B olarak da bilinir), H3K9me₁'i H3K9me₃'e çevirebilir (Peters ve ark., 2001; Peters ve ark., 2003); başka bir H3K9 metiltransferaz olan G9a, H3K9me₁'i H3K9me₂ durumuna metile edebilmektedir (Tachibana ve ark., 2002). Ayrıca, MLL1, H3K4'ün H3K4me₂'ye metilasyonunu katalizler (Milne ve ark., 2002); kendi endojen etkileşim proteinleri ile ilişkili olduğu durumlarda ise H3K4'ü üçlü metile edebilir (Schneider ve ark., 2005; Dou ve ark., 2006). Sonuç olarak, KMT'ler belirli düzeyde özgünlük göstermekle birlikte etkileşimde bulundukları proteinler onların hedef lizin rezidüsünü veya derecesini değiştirebilmektedir.

İnsan ve fare SUV39H1 proteini, ilk KMT olarak tanımlanmıştır ve bu enzimin mayadan insana kadar evrimsel olarak korunduğu rapor edilmiştir (Rea ve ark., 2000). Daha sonraki yıllarda, SET katalitik aktivitesini içeren pek çok histon KMT tanımlanmıştır. Tablo 2.1'de bazı memeli KMT'leri ve hedef etkileri sunulmuştur.

Tablo 2.1. Memeli lizin metiltransferazlar

KMT	Sinonim	Hedef Etki	Kaynak
SUV39H1	KMT1A, SUV39H	H3K9me2/3	(Rea ve ark., 2000; Wang ve ark., 2012)
SUV39H2	KMT1B	H3K9me3	(Frontelo ve ark., 2004)
GLP	EHMT1, KMT1C	H3K9me1/2	(Collins ve ark., 2008)
G9a	EHMT2, KMT1D	H3K9me1/2 H3K27me1/2	(Collins ve ark., 2008; Wu ve ark., 2011)
SETDB1	ESET, KMT1E	H3K9me3	(Schultz ve ark., 2002)
SETDB2	KMT1F, CLLD8	H3K9me3	(Falandry ve ark., 2010)
MLL	KMT2A, MLL1	H3K4me1	(Southall ve ark., 2009)
MLL2	KMT2B, CXXC10,	H3K4me3	(Demers ve ark., 2007)
MLL3	KMT2C, HALR	H3K4me1	(Chen ve ark., 2010)
MLL4	KMT2D	H3K4me1	(Chen ve ark., 2010)
SETD1A	KMT2F, SET1A	H3K4me1/2/3	(Lee ve ark., 2007)
SETD1B	KMT2G, SET1B	H3K4me1/2/3	(Lee ve ark., 2007)
ASH1L	KMT2H	H3K4me3 H3K36me2/3	(Gregory ve ark., 2007)
SETD2	KMT3A, SET2	H3K36me3	(Sun ve ark., 2005)
SETD3	C14orf154	H3K36me1/2	(Eom ve ark., 2011)
NSD1	KMT3B, SOTOS	H3K36me1/2/3	(Qiao ve ark., 2011)
NSD2	KMT3F	H3K4me1/2/3 H3K20me1/2/3 H3K27me1/2/3 H3K36me1/2 H4K20me3	(Wagner ve Carpenter, 2012)
NSD3	KMT3G	H3K4me2 H3K27me2/3 H3K36me1/2	(Rahman ve ark., 2011)
DOT1L	KMT4	H3K79me1/2/3	(Feng ve ark., 2002)
EZH1	KMT6B	H3K27me1/2/3	(Margueron ve ark., 2008)
EZH2	KMT6A	H3K27me1/2/3	(Margueron ve ark., 2008)

Histon lizin metilasyonu, kromatinin yeniden düzenlenmesini sağlayarak metilasyonun gerçekleştiği lizin rezidüsüne bağlı olarak genin transkripsiyonunu aktive eder veya baskılar (Black ve ark., 2012). Genellikle, H3K9, H3K27 ve H4K20 metilasyonları transkripsiyonel baskılama ile ilişkiliyken H3K4, H3K36 ve H3K79 metilasyonları transkripsiyonel aktivite ile ilişkilidir (Black ve ark., 2012). Ayrıca, eklenen metil gruplarının sayısına bağlı olarak da gen transkripsiyonu düzenlenmektedir. Örneğin; H3K79me1 transkripsiyonel aktivasyonu sağlarken, H3K79me3, transkripsiyonun baskılanmasına neden olmaktadır (Barski ve ark., 2007).

Özet olarak, histon metilasyonu kromatinin yeniden şekillenmesi aracılığıyla transkripsiyon faktörlerinin hedef genlere erişilebilirliğini düzenleyerek, transkripsiyonel aktivasyon veya baskılamayı kontrol etmektedir (Cui ve ark., 2019). Bu transkripsiyonel aktivitenin dinamik bir şekilde kontrolü ise metilasyona uğrayan histon rezidülerindeki metil gruplarının uzaklaştırılması (demetilasyonu) ile gerçekleştirilmektedir (Horton ve ark., 2017).

2.5. Histon Demetilasyonu

Histon metilasyonu geri dönüşümlü bir süreç olup, eklenen metil grupları HDM'ler tarafından kaldırılabilir (Şekil 2.5). Katalizledikleri reaksiyonunun kimyasına bağlı olarak iki tip HDM vardır (Mosammaparast ve Shi, 2010). Lizine özgü demetilazlar (LSD veya KDM olarak kısaltılmaktadır.) flavin adenin dinükleotid (FAD)-bağımlı amin oksidazlardır; FADH₂ ve hidrojen peroksit (H₂O₂) üreterek lizinlerin demetilasyonunu katalizler (DesJarlais ve Tummino, 2016). Jumonji C (JmJC) demetilazlar da, JmJC katalitik domaini ve amin oksidazlardan faydalanarak demetilasyonu gerçekleştirirler (Black ve ark., 2012).

2.6. Histon Lizin Metiltransferazlar

Oogenez boyunca, oositler mayotik olgunlaşmayı ve preimplantasyon gelişimi destekleyen transkript ve proteinleri biriktirirler. KMT'ler, oosit ve erken dönem embriyolarda histonların metilasyon durumlarındaki dinamik değişimleri düzenleyerek gen ekspresyonunu kontrol ederler. Bu düzenlemeler, prenatal gelişimin uygun bir şekilde meydana gelmesini sağlamak için oosit olgunlaşması, embriyonik

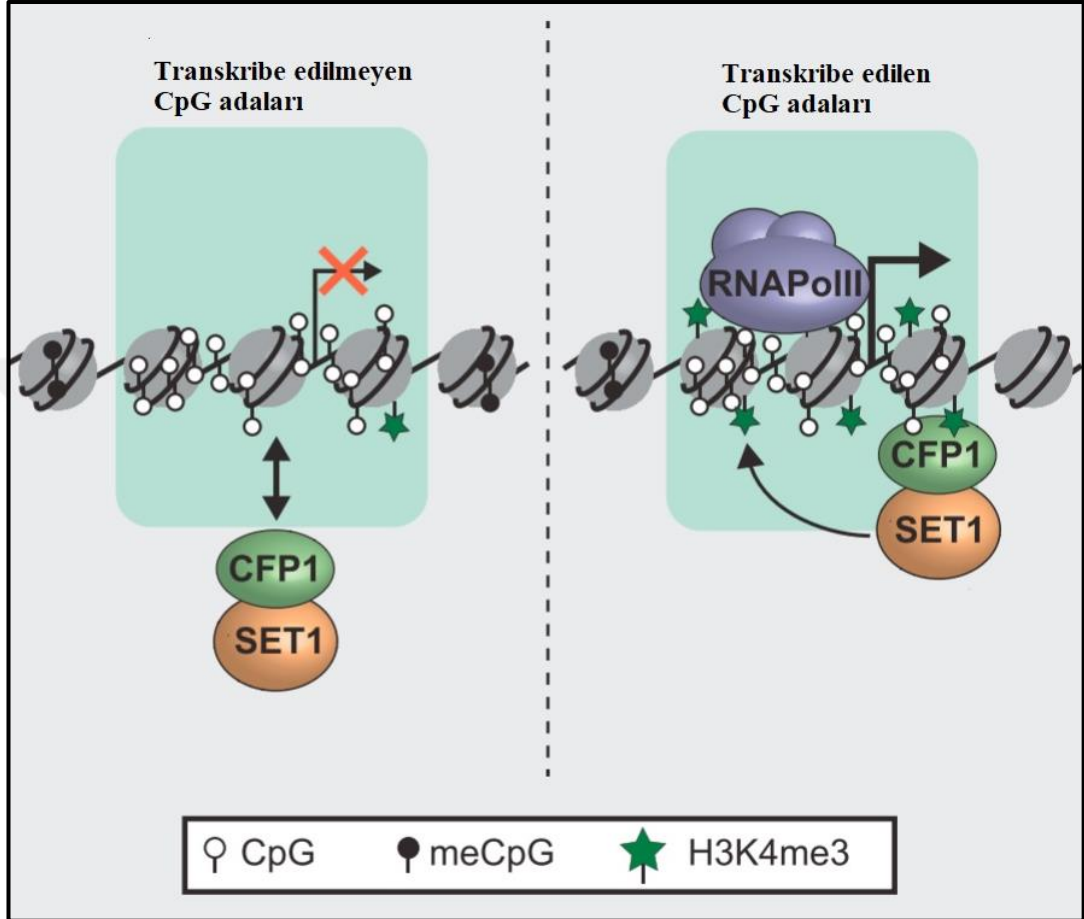
genom aktivasyonu (EGA) ve preimplantasyon gelişim gibi süreçler boyunca kritik öneme sahiptir.

2.6.1. SET1 (SET domaini içeren 1) Kompleksi

SET1/COMPASS kompleksi, ilk defa *S. cerevisiae*'de tanımlanmış bir H3K4 metiltransferazdır (Miller ve ark., 2001). SET1/COMPASS kompleksinin yedi bileşeninin memeli homologu olan altı tanesini içeren SET1/CFP1 kompleksi, yaklaşık 450 kilo dalton (kDa) ağırlığındadır ve H3K4'ü tekli, ikili veya üçlü metile edebilmektedir (Lee ve Skalnik, 2005). SET1 kompleksi, çoklu bir protein kompleksidir ve SET domaini içeren 1B (SETD1B, KMT2G olarak da bilinir.) proteininin, bu kompleksin H3K4 metilasyonunu katalizleyen bir bileşeni olduğu rapor edilmiştir (Lee ve ark., 2007). Bununla birlikte, bu kompleksi SETD1A, MLL1, MLL2, MLL3 veya MLL4 öz proteinleri de oluşturabilmektedir (Shinsky ve ark., 2015). SET1 kompleksi, metillenmemiş DNA'yı ve önceden oluşturulmuş olan H3K4me3 alanlarını CXXC (sisteince zengin bölge) parmak proteini 1 (CFP1) aracılığıyla tanır. Bu kompleks, aktif olarak transkribe edilen gen bölgelerindeki transkripsiyonel aktivite ilişkili H3K4me3 işaretlerinin oluşturulmasını sağlar (Şekil 2.6) (Brown ve ark., 2017). CFP1 proteininin yokluğunda SET1 kompleksi sadece sitozin-fosfat-guanin (CpG) adacıklarıyla sınırlı kalmaz; normal olarak hedeflediği aktif olarak transkribe edilen gen bölgeleri dışındaki genleri de metile eder ve gen ekspresyonunun bozulmasına neden olur (Skalnik, 2010).

Bu kompleksin öz proteinlerinden biri olan SETD1B'nin oosit olgunlaşması boyunca gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Sha ve ark., 2020). SETD1B'yi kodlayan *Setd1b* geninin oositten blastosist aşamasına kadar olan tüm aşamalarda eksprese edildiği bilinmektedir (Bledau ve ark., 2014). Bu çalışmada, *Setd1b*'nin zigota özgü delesyonu fare preimplantasyon gelişimi etkilememiştir. Brici ve ark. (2017)'nin yaptığı bir çalışmada *Setd1b*'nin, farelerde oogenez için gerekli olduğu gösterilmiştir (Brici ve ark., 2017). *Setd1b*'nin oosite özgü delesyonu, preimplantasyon gelişimin 1-hücreli aşamasında tutuluma neden olarak preimplantasyon gelişimi etkilemiştir. Bununla birlikte, transkripsiyon ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde rolleri olan oosit olgunlaşması, alfa (*Omt2a*), oosit olgunlaşması, beta (*Omt2b*), oositten salgılanan protein 1 (*Oosp1*) ve oogenezin 3 (*Oog3*) gibi oosite özgü genlerin ekspresyonlarında azalmaya yol açmıştır. SETD1B

eksikliği olan oositlerde, NSN tip kromatin düzeninden transkripsiyonel aktivitenin baskılandığını gösteren SN tipe geçişte sorunlar; ayrıca, zona pellusidada bozukluklar, normal olmayan sitoplazmik olgunlaşma, polispermi (çoklu sperm) gibi yapısal bozulmaların da olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 2.6. SET1/CFP1 kompleksi. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Brown ve ark., 2017) değiştirilerek alınmıştır. CFP1, DNA bağlanma domaini olan CXXC domainini kullanarak DNA'ya bağlanır ve metillenmemiş olan sitozin-fosfat-guanin (CpG) adacıklarını tanır. Böylelikle, SET1 kompleksi aktif olarak transkribe edilen gen bölgelerinde H3K4me3 işaretlerini oluşturur. meCpG: Metillenmiş CpG adacıkları, RNA PolII: RNA polimeraz II.

SET1 kompleksinin alt bileşeni olan CFP1 proteinini kodlayan *Cxxc1* geninin gelişmekte olan fare oositlerindeki delesyonu, GV ve MII oositlerde H3K4me3 seviyelerinin azalmasına neden olmuştur (Yu ve ark., 2017). Bununla birlikte, maternal mRNA'ların ortadan kaldırılmasını değiştirerek EGA'nın bozulması ile 1- ve 2-hücreli embriyo aşamalarında tutulmalara neden olarak preimplantasyon gelişimi etkilemiştir. CFP1 protein seviyeleri, GV ve MII oositten erken dönem embriyolara (1-, 2-, 4- ve 8-hücreli embriyolar) kadar analiz edilmiş ve CFP1'in bu oosit ve embriyoların sitoplazma ve çekirdeklerinde yerleşim gösterdiği bildirilmiştir (Sha ve

ark., 2018). CFP1 protein seviyesi, GV oositlerin sitoplazma ve çekirdeğinde yüksekken MII oositlerin sitoplazmasında belirlenemeyecek kadar azalmış; fertilizasyondan sonra farklı gelişim aşamalarındaki 1-hücreli embriyoların sitoplazma ve çekirdeğinde yeniden yükselmiştir. İki hücreli aşamada artan sitoplazmik CFP1 seviyesi bu aşamadan 8-hücreli aşamaya kadar kademeli bir şekilde azalmıştır. Aynı çalışmada *Cxxc1*'in oosite özgü delesyonu, oosit mayotik olgunlaşmasının MI aşamasında tutuluma, iğ iplikleri oluşumunda bozulmalara ve kromozomların yanlış hizalanmasına neden olduğu bildirilmiştir (Sha ve ark., 2018).

2.6.2. SETD2 (SET domaini içeren 2)

SETD2 (KMT3A olarak da bilinir.), gen transkripsiyonu ile ilişkili H3K36 metilasyonunu katalizleyen bir histon lizin metiltransferazdır (Edmunds ve ark., 2008). SETD2 proteini, SET domaini bulunduran KMT'lerle içerdiği ortak domainlerin haricinde, protein-protein etkileşimlerine aracılık eden kıvrımlı-kıvrımlı (CC) ve triptofan-triptofan (WW) domainlerini de içermektedir (Hacker ve ark., 2016).

SETD2 protein seviyesinin, NSN tip domuz oositlerinin çekirdeğinde yüksek düzeyde olduğu belirtilirken; SN, MI ve MII oositlerin çekirdeklerinde bu seviyede olmadığı belirlenmiştir (Diao ve ark., 2018). Ayrıca, SETD2 SN, MI ve MII oositlerde sitoplazmik bir yerleşim de göstermiştir. *Setd2* gen ekspresyonunun siRNA ile azaltılması sonucunda, fare oositlerin mayotik olgunlaşmasında bozulmalar meydana gelmiştir (Li ve ark., 2018). *Setd2* gen ekspresyonunun azaltıldığı oositler, yanlış kinetokor-mikrotübül bağlantıları, düzensiz kromozom hizalanmaları ve artmış anöploidi oranı da sergilemişlerdir. Xu ve ark. (2019)'nın yaptığı bir çalışmada ise maternal SETD2 eksikliği, fare oositlerinde H3K36me3 seviyesinin azalmasına, MII oosit sayısının düşmesine ve DNA metilomunda bozulmaya neden olmuştur (Xu ve ark., 2019).

2.6.3. SETDB1 (SET domaini çatallı histon lizin metiltransferaz 1)

SETDB1 (KMT1E ve ESET olarak da bilinir.), SET domaini içeren bir H3K9 metiltransferazdır. SETDB1'in SET domaininde 347 amino asitlik bir ekleme söz konusudur; bundan dolayı da çatallı (bifürkat) olarak isimlendirilmektedir (Harte ve ark., 1999). SETDB1-aracılı H3K9 metilasyonu, heterokromatin oluşumuna ve gen ekspresyonunun baskılanmasına katkıda bulunmaktadır (Ichimura ve ark., 2005).

Setdb1 mRNA ve protein seviyelerinin, büyümekte olan GV oositlerde var olduğu ve genel (global) H3K9me2 seviyelerini kontrol ettiği bildirilmiştir (Kim ve ark., 2016). Bu çalışmada, *Setdb1*'in oosite özgü delesyonu; DNA çift zincir kırıklarının artmasına, GV ve MI aşamalarında tutuluma, MII oosit sayısının azalmasına; ayrıca, bu oositlerden elde edilen embriyolarda, hücre döngüsündeki bozulmalara bağlı olarak preimplantasyon gelişimde gecikmelere neden olmuştur. Bunlara ek olarak, SETDB1'in oositlerde uzun uç tekrarları (LTR'ler) gibi retrotranspozonların susturulması için gerekli olduğu vurgulanmıştır. Eymery ve ark. (2016)'nın yaptığı benzer bir çalışmada, *Setdb1* eksikliği olan fare oositleri gecikmeli bir şekilde GVBD'ye uğramış ve bu oositlerin büyük çoğunluğu, muhtemelen hücre döngüsü ve kromozom yoğunlaşması ile ilişkili gen ekspresyonlarının değişmesinden dolayı mayotik olgunlaşmayı tamamlayamamıştır (Eymery ve ark., 2016). Mayotik olgunlaşmayı tamamlayan olgun oositlerde ise iğ ipliklerinin oluşumu, kinetokor-mikrotübül etkileşimleri ve kromozom ayrılmaları bozulmuştur.

KMT'ler ve histon lizin metilasyon işaretleri, memeli oosit olgunlaşması sürecinde meydana gelen çeşitli hücresel olayları kontrol eden genlerin ekspresyonel düzenlenmesinde rol oynarlar (Gu ve ark., 2010). Yaşlanma süreci, oositlerdeki *Kmt* gen ekspresyonunu ve histon lizin metilasyon işaretlerini etkileyebilmektedir (Kageyama ve ark., 2007; Manosalva ve Gonzalez, 2010). Ovaryal yaşlanma oosit kalitesinin azalmasına neden olabilmektedir (Rambags ve ark., 2014) ve bu azalmanın, değişen *Kmt* gen ekspresyonlarından ve histon lizin metilasyonu seviyelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

2.7. Ovaryal Yaşlanma ve Histon Lizin Metilasyonu

Biyolojik yaşlanma ile birlikte üreme fonksiyonlarında kademeli bir azalma görülmektedir. Bu azalmanın temel nedenleri arasında, ovaryum korteksinde yer alan foliküllerin ve içlerinde bulunan oositlerin hem sayı hem de kalitelerindeki düşme yer almaktadır (te Velde ve Pearson, 2002). Folikül havuzunun giderek azalması, menstrual döngü sıklığında artış veya döngülerin atlanması gibi durumlara yol açmaktadır; nihayetinde ovaryum yaşlanmasının son basamağı olan menopoza meydana gelmektedir (Treloar ve ark., 1967; Soules ve ark., 2001). Ovaryumdaki primordiyal folikül sayısının, tüm yaş gruplarından elde edilen antral folikül sayıları ile uyum gösterdiği histolojik analizler ile belirtilmiştir. Dişi yaşlanmasıyla birlikte,

primordiyal folikül sayılarındaki düşüş FSH'a duyarlı antral folikül gruplarındaki azalmayla paraleldir (Scheffer ve ark., 1999). Antral foliküllerin boyut ve sayısındaki yaşlanma ile birlikte görülen azalma; inhibin B salınımının azalması, FSH seviyesinin yükselmesi ile oosit kalitesi ve fertilite potansiyellerinin azalması ile ilişkilidir (Hall ve ark., 1999). Bununla birlikte, yaşlanmayla birlikte antral folikül sayısının azalması, anti-müllerian hormon (AMH) serum seviyelerinin de azalmasına neden olur (van Rooij ve ark., 2005). Ovaryum yaşlanmasına DNA dizisinde meydana gelen değişimler, mitokondriyal DNA mutasyonları, telomeraz aktivitesinin azalması, oksidatif stres, ilaç ve sigara kullanımı, beslenme tarzı gibi birçok çevresel ile genetik ve epigenetik faktörler sebep olabilmektedir (Li ve ark., 2012; Ge ve ark., 2015). Yapılmış olan birçok araştırmaya rağmen, ovaryum yaşlanmasının temelinde yatan moleküler mekanizmalar henüz tam anlamıyla aydınlatılamamıştır.

Ovaryal yaşlanmaya bağlı fertilite kaybında, oosit gelişimi ve folikülogenez süreçlerinde kritik rolleri olan, histon metilasyon işaretlerinin başarılı bir şekilde kurulamamasından kaynaklanabileceğine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Kageyama ve ark. (2007), H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 ve H3K9me3 metilasyon seviyelerinin farklı yaş grubundan elde edilen fare GV oositlerinde değişiklik gösterdiğini bildirdi (Kageyama ve ark., 2007). Bu çalışmada, 15 günlük farelerden elde edilen büyümekte olan oositlerdeki H3K4me2, H3K4me3, H3K9me2 ve H3K9me3 seviyelerinin 5 ve 10 günlük farelerden elde edilen oositlere kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, bu hedef metilasyonları oluşturan; sırasıyla *Set7*, *Mll* ve *G9a* genlerinin ekspresyonu 15 günlük farelerin oositlerinde beklenildiği gibi daha yüksek bulunmuştur. Farklı bir çalışmada ise 2 aylık genç ve 11 aylık yaşlı farelerden elde edilen GV oositlerde, histon lizin metilasyon seviyeleri değerlendirilmiştir (Manosalva ve Gonzalez, 2010). Yaşlı farelerin GV ve MII oositlerindeki H3K9me3, H3K36me2, H3K79me2 ve H4K20me2 seviyeleri genç oositlere göre daha düşük bulunmuştur. Ayrıca, genç farelerin GV ve MII oositlerine kıyasla yaşlı farelerin MII oositlerindeki H3K4me2 ve H3K9me2 seviyeleri daha düşüktü. Bunlara ek olarak, NSN tipi oositlerin sayısının yaşlı farelerde daha düşük olduğu da rapor edilmiştir. Bu alandaki başka bir çalışma, 42-44 haftalık yaşlı farelerin GV oositlerinde H3K4me2 ve H3K4me3 seviyelerinin azaldığını, ancak yaşlı farelerin MII oositlerindeki H3K4me2 seviyesinin 6-8 haftalık genç fare MII oositlerine kıyasla önemli ölçüde arttığını rapor etmiştir (Shao ve ark., 2015). Bu bulgular, oosit

olgunlaşması boyunca GV'den MII aşamasına kadar histon lizin metilasyon seviyelerinin biyolojik yaşlanmaya bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Histon lizin metilasyon seviyelerindeki dinamik değişimler ve KMT'lerin yokluğunda oosit olgunlaşması ve preimplantasyon gelişimde meydana gelen bozulmalar; histon metilasyonunun ovaryum yaşlanmasını etkileyen bir epigenetik mekanizma olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmamızda, postnatal hayatın farklı yaşlarındaki farelerden oluşan genç grup (3. hafta), ergin grup (7. hafta), geç ergin grup (18. hafta) ve yaşlı gruplardan (52, 60. haftalar) elde edilen ovaryumlar kullanılmıştır. Yeni doğan bir fare ovaryumu yaşlanma sürecine kadar oosit/folikül büyümesinde ve teka ile stroma hücrelerinde belirli morfolojik ve fizyolojik değişimler sergilemektedir (Ozturk ve ark., 2015). Yenidoğan bir fare ovaryumu, sadece oosit ve stromal hücrelerden oluşurken, postnatal gelişimin ilk haftasında folikülogenez başlar ve bu süreçte tipik bir veya iki tabakalı granuloza hücreleri ile çevrili sırasıyla primer ve sekonder foliküller meydana gelmektedir. Bu dönemde, tek katlı düzleşmiş teka hücreleri de oluşmaya başlar. Erken genç dönem olarak tanımlanan postnatal gelişimin ikinci haftasında foliküller büyümeye devam eder ve bu aşamada teka tabakası tamamen oluşur. Bu dönemin sonunda granuloza hücrelerin arasında boşlukların oluşmaya başladığı preantral foliküller gözlenmektedir (Ben-Or, 1963).

Postnatal gelişimin üçüncü haftası genç dönem (Ergenlik öncesi veya prepuberte olarak da bilinir.) olarak tanımlanmakta ve ovaryumda belirli morfolojik değişimler göze çarpmaktadır. Bu dönemde ovaryumda, gelişmekte ve farklı boyutta olan pek çok folikül bulunmaktadır. Bu foliküller, granuloza hücrelerinin yüksek mitotik aktivitesi ve teka internadaki kılcal kan damarlarındaki artıştan dolayı teka tabakasının daha da kalınlaşması ile karakterizedir. Bu dönemde piknotik çekirdekli granuloza hücrelerini içeren bazı foliküllerin atreziye uğradığı gözlemlenir (Ben-Or, 1963).

Yaşlı fare ovaryumlarında ise folikül rezervinin azalması ve atreziye uğrayan foliküllerin artmasından dolayı ovaryum foliküllerinin toplam sayısı azalmaktadır. Bu dönemde, folikül sayısının azalmasına bağlı olarak oosit sayısı ve kalitesi de düşmektedir. Yaşa bağlı olarak oosit kalitesinin azalmasının en önemli nedenlerinden birisi anöploidi ve mayoz sırasındaki yanlış kromozom ayrılmalarıdır (Webster ve Schuh, 2017). Ayrıca, yaşlanan fare ovaryumlarında, reaktif oksijen türleri (ROS)

artışına ve antioksidan sorumlu gen ekspresyonlarındaki azalışa bağlı olarak oksidatif hasar artmaktadır (Lim ve Luderer, 2011). Yaşlanma döneminde ovaryumda meydana gelen bu tip bozukluklar, oosit sayı ve kalitesini etkileyerek üreme fonksiyonunun azalmasına ve sonuçta fertilité özelliklerinde belirgin bir düşüşe neden olabilmektedir.

Bu bilgiler ışığında, ovaryal yaşlanmaya bağlı olarak gelişen fertilité kaybında histon metiltransferaz genlerinden olan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1*'nin ekspresyon durumlarını farklı yaşlardaki postnatal fare ovaryum dokularında değerlendirmeyi amaçladık. Postnatal fare ovaryumlarındaki oosit ve folikül gelişimi, stromal alan ve germinal epiteldeki değişimler gibi fizyolojik ve morfolojik özellikler göz önüne alınarak genç grup (3. hafta), ergin grup (7. hafta), geç ergin grup (18. hafta) ve yaşlı grup (52. ve 60. haftalar) grupları oluşturuldu. İlk olarak oluşturulan gruplardan alınan ovaryum dokularının histolojik değerlendirmelerinin yapılabilmesi amacıyla hematoksilin-eozin boyama yapıldı. Daha sonra, *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA ekspresyonlarının belirlenmesi için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR); protein seviyelerinin belirlenmesi için de immünohistokimya yöntemi kullanıldı ve elde edilen veriler tek-yönlü varyans analizi (tek-yönlü ANOVA) parametrik testi kullanılarak değerlendirildi.

Çalışmanın Hipotezi

Mevcut literatür bilgilerinden yola çıkılarak bu çalışmanın hipotezi, “Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryumlarında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genleri mRNA ve protein düzeyinde değişimler gösterir.” şeklinde oluşturulmuştur. Bu hipotez doğrultusunda, postnatal hayatın farklı yaşlarındaki fare ovaryumlarında, oosit olgunlaşması için kritik bir öneme sahip olan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin mRNA ve protein düzeyindeki ekspresyonel durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilebilecek sonuçlar, yaşla birlikte meydana gelen fertilité kaybında, *Kmt* genlerinin ekspresyonel değişimlerinin bir etkisi olup olmadığını ortaya koyacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen ve standart laboratuvar koşullarında tutulan (su ve besin kısıtlaması olmaksızın; 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü) 34 adet Balb/C ırkı dişi fare kullanıldı. Deney grupları şu şekilde oluşturulmuştur:

1. Genç grup (3. hafta; n=6)
2. Ergin grup (7. hafta; n=7)
3. Geç Ergin grup (18. hafta; n=7)
4. Yaşlı grup (52. ve 60. hafta; her bir haftadan n=7)

Bu proje kapsamında, postnatal fare ovaryum dokularında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, *Setdb1* mRNA düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR); SETD1B, SETD2, CFP1 (*Cxxc1* geni tarafından kodlanmaktadır.) ve SETDB1 proteinlerinin düzeyi ise immünohistokimya yöntemi ile belirlenmiştir.

3.2. Postnatal Fare Ovaryumlarında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA Düzeylerinin qRT-PCR ile Belirlenmesi

Çalışmada, postnatal hayatın genç grup (3. hafta; n=6), ergin grup (7. hafta; n=7), geç ergin grup (18. hafta; n=7) ve yaşlı grup (52. ve 60.haftalar; n=7 her bir haftadan) Balb/C ırkı dişi farelerden steril koşullarda ve diseksiyon mikroskobu yardımıyla ovaryumlar alındı. Her grup için her fareden alınan iki ovaryumdan biri qRT-PCR uygulamaları; diğeri ise rutin parafin takibi için kullanıldı.

Postnatal fare ovaryum dokularında, oosit olgunlaşması için kritik öneme sahip olan KMT'leri kodlayan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin mRNA düzeyleri sırasıyla RNA izolasyonu, DNaz uygulaması ve cDNA eldesinden sonra qRT-PCR ile belirlendi.

3.2.1. Postnatal Fare Ovaryumlarından Trizol Yöntemi ile Total RNA İzolasyonu

1. Postnatal ovaryumlar, steril 1.5 ml'lik tüplere alınarak üzerlerine birer ml Trizol reaktifi konulup; manyetik boncuklar yardımıyla MagNA Lyser cihazında (Roche) 6500 rpm'de 30, 30 ve 15 saniyelerde iyice parçalandı.

2. Tüpler, oda ısısında beş dakika inkübe edildikten sonra üzerlerine 200 µl kloroform eklenip; elle yavaş yavaş karıştırıldıktan sonra 3 dakika oda ısısında bekletildi.
3. Süre sonunda tüpler, 15 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra tüpün üstünde RNA’nın bulunduğu şeffaf kısım, mikropipet ile steril 1.5 ml’lik yeni tüplere alındı.
5. Tüplere, 500 µl izopropanol eklenip; yavaşça alt-üst edildi ve oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
6. Süre sonunda, tüpler 10 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi.
7. Santrifüj sonrası tüplerin süpernatantları atılıp, geriye kalan pelet üzerine %70’lik etanolden 1 ml konuldu.
8. Tüpler 10 dakika, +4 °C’de, 13200 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatantları mikropipet yardımıyla atıldı.
9. Oda ısısında 20 dakika bekletildikten sonra, RNA’ı içeren pelet 25 µl steril distile su ile çözüldü. İzole edilen RNA’ların konsantrasyon ve saflık oranları nanodrop (Epoch) ile ölçüldü (Tablo 3.1).
10. Ölçüm sonrası, çözülen RNA’ları içeren tüpler -80°C’de saklandı.

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

Postnatal Yaş	Konsantrasyon (µg/µl)	Saflık (OD260/OD280)
3. hafta	0.64	1.93
7. hafta	1.82	1.95
18. hafta	2.69	1.74
52. hafta	2.87	1.26
60. hafta	2.23	1.94

3.2.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması

1. Genomik DNA'nın uzaklaştırılması amacıyla DNaz uygulaması gerçekleştirildi.

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

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

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

3. Tüpler, 13200 rpm'de, +4 °C'de, 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası RNA'yı içeren süpernatantlar yeni steril tüplere alındı. Nanodrop ile DNaz uygulanan RNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri ölçüldü (Tablo 3.2).

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

Postnatal Yaş	Konsantrasyon (µg/µl)	Saflık (OD260/OD280)
3. hafta	0.37	1.94
7. hafta	0.36	1.96
18. hafta	0.35	1.97
52. hafta	0.64	1.98
60. hafta	0.42	1.98

3.2.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

Fare ovaryumlarından izole edilen RNA'lar, DNaz uygulandıktan sonra cDNA'ya çevrildi.

1. DNaz uygulaması yapılmış olan tüplerin her birine homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Ana karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu.

İçerik	Hacim (µl)	Son konsantrasyon (20 µl'de)
10X Tampon RT	2	1x
dNTP (2.5 mM)	4	0.5 mM
Rnaz inhibitör (10 ünite/µl)	1	10 ünite
MMLV-geri transkriptaz	1	100 ünite
Toplam	8	

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

3. Daha sonra, her bir tüpe 8 µl ana karışımdan eklendi ve 44 °C'de 60 dakika inkübe edildi. Sonrasında, 92 °C'de 10 dakika inkübasyon sonucunda elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.2.4. qRT-PCR Uygulama Basamakları

Kantitatif gerçek zamanlı PCR, görel ve kesin mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir ve gen ekspresyon çalışmalarında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir tekniktir. Bu çalışmada, her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen *Beta Aktin* gen ekspresyonu temel alınarak postnatal ovaryumlarda *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA'larının görel düzeyleri belirlendi. Postnatal ovaryumlardan elde edilen cDNA'lar, bu aşamada da kullandı. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'te verilmiştir.

1. Aşağıda belirtilen içerikler eklenerek reaksiyon karışımı oluşturuldu.

İçerik	Miktar (µl)
2X SybrGreen süper karışımı	12.5
Primer ileri (10 µM)	0.5
Primer geri (10 µM)	0.5
Nükleaz içermeyen su	10.5
cDNA	1

Tablo 3.3. qRT-PCR aşamasında kullanılan primerler. P_i, primer ileri; P_G, primer geri; bç, baz çifti.

Gen adı	Marka	İleri ve Geri primer dizileri (5' → 3')	PCR ürün boyutu (bç)
<i>Beta Aktin</i>	Invitrogen	P _i : TCGGTGACATCAAAGAGAAG	244
		P _G : CGGATGTCAACGTCACACTT	
<i>Setd1b</i>	Sentegen	P _i : CTGTTGGTGAGCTGGATGCTA	172
		P _G : CTGGAGTAAGCTGTGTCTTGG	
<i>Setd2</i>	Sentegen	P _i : TAAGGGCTGCTAAGGATCTTCC	163
		P _G : GTGGCATCTATTATCTCGTCATTTT	
<i>Cxxc1</i>	Sentegen	P _i : GAACGACAGTGATGACACAGATCT	219
		P _G : ACCTGGAGCCGCTTACAATA	
<i>Setdb1</i>	Sentegen	P _i : AGGAACTTCGTCAGTACATTG	216
		P _G : TGTCATGATACTGTAGTCCCA	

2. *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, *Setdb1* ve *Beta Aktin* için qRT-PCR uygulaması üç kuyucuklu (triplicate) olarak gerçekleştirildi. *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1*, *Setdb1* ve *Beta Aktin* için hazırlanan örnekler qRT-PCR cihazında (Rotor Gene Q Series Software, Corbett Research) analiz edildi. Amplifikasyon, 40 siklуста gerçekleştirildi. Ayrıca, erime eğrisi analizi ile PCR ürünlerinin beklenen ve gözlenen erime sıcaklıkları (T_m) karşılaştırılarak, özgüllükleri değerlendirildi.

qRT-PCR programı:

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

10 siklus (Touch-down uygulandı.) (-1 °C/siklus): 92 °C → 20 saniye; 65 °C → 20 saniye; 72 °C → 30 saniye

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

Erime eğrisi: 1 siklus: 95 °C → 1 dakika; 55 °C → 1 dakika; 80 siklus (her siklуста 0.5 °C artmakta); 55 °C → 10 saniye

3. qRT-PCR cihazının vermiş olduğu eşik döngü değeri olan Ct değerlerine göre *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* gen ekspresyonlarının görelî değışimleri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile hesaplandı.

$\Delta Ct = \text{Setd1b geni Ct değeri} - \text{Beta Aktin Ct değeri}$ formülü ile normalize değerler bulundu. Diğér hedef genler içinde ayrı ayrı bu formül kullanıldı. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ postnatal gün} - \Delta Ct \text{ en büyük değér}$. Bu yolla hesaplanan $\Delta\Delta Ct$ değeri, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünde yerine konularak; görelî *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA düzeyleri belirlendi. Elde edilen görelî değışimler için parametrik bir test olan tek yönlü ANOVA istatistiksel analizi kullanılarak; postnatal ovaryum gelişim dönemlerinde bu genlerin kantitatif değışimleri belirlendi.

3.3. Postnatal Fare Ovaryumlarında SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 Protein Düzeylerinin İmmünohistokimya ile Belirlenmesi

Postnatal fare ovaryum dokularında, SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 proteinlerinin görelî ekspresyon düzeyleri ve hücreşel yerleşimleri immünohistokimya yöntemi ile belirlendi.

3.3.1. Postnatal Hayatın Farklı Yaşlarındaki Farelerden Ovaryumların Toplanması ve Rutin Parafin Takibi

Rutin parafin takibi gerçekleştirilen ovaryumların parafin bloklarından alınan kesitler, hematoksilin-eozin (HE) boyama ve immünohistokimya için kullanıldı. Rutin parafin takibi aşğıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Farelerden alınan ovaryumlar, Bouin fiksativi içerisinde +4 °C’de 12 saat boyunca fikse edildi.
2. Fikse olan ovaryumlar, süre sonunda dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100’lük etanolden) geçirildi. Alkol serilerindeki bekletme süreleri %70, %80 ve %90’lık etanollerde birer gün; %100’lük etanolde ise 3 saat olarak gerçekleştirildi.
3. Dehidratasyondan sonra, ksilol uygulaması ile ovaryumların şeffaflaştırılmaları ksilol I’de 1 dakika, ksilol II’de 1 dakika ve ksilol III’de ise 1 dakika olmak üzere toplamda 3 dakika bekletilerek yapıldı.

4. Şeffaflaştırmadan sonra parafinizasyon işlemi için ovaryumlar, parafin I, parafin II ve parafin III aşamalarında, birer saat 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra temiz parafin içine uygun oryantasyonda gömülüp, parafin bloklar oluşturuldu.

5. Parafin takibinden sonra 5 µm kalınlığında kesitler alınıp, HE boyama ile fare ovaryum dokularının histolojik yapılarının genel olarak değerlendirmesini yapıldı; ayrıca, dokuların immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu da değerlendirildi.

3.3.2. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerinde Hematoksilen-Eozin (HE) Boyama

Postnatal fare ovaryum kesitlerinin, HE boyaması aşağıda anlatılan basamaklar uygulanarak gerçekleştirildi:

1. Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60 °C'lik fırında 1 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı.

2. Daha sonra, preparatlar ksilol I ve ksilol II'de 10'ar dakika bekletildi.

3. Suyu indirme (rehidratasyon) için preparatlar, azalan etanol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanol) beşer dakika tutuldu.

4. Süre sonunda preparatlar, çeşme suyunda 3x5 dakika yıkandı.

5. Süzölmüş hematoksilen boyasında 2 dakika bekletildikten sonra preparatlar çeşme suyunda yıkandı ve süre sonunda, eozin boyasında 15 saniye tutulduktan sonra tekrar çeşme suyunda yıkandılar.

6. HE boyamasından sonra, preparatlar %70, %80, %90 ve %100'lük artan etanol serilerinde birer dakika tutularak, dehidratasyonları sağlandı.

7. Son olarak ksilol I ve II'de onar dakika tutulan preparatlar, Entellan ile kapatılıp; ışık mikroskobunda (Zeiss) ovaryum dokularının genel histolojik yapıları ve immünohistokimyasal boyamalar için uygunluğu değerlendirildi.

3.3.3. Postnatal Fare Ovaryum Kesitlerinde İmmünohistokimya Uygulaması

Postnatal fare ovaryumlarından alınan kesitlerde SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 proteinlerinin immünohistokimyasal boyaması gerçekleştirildi. Böylece, postnatal fare ovaryum dokularında bu proteinlerin göreceli düzeyleri ve hücreyel yerleşimleri değerlendirildi.

İmmünohistokimya uygulaması aşağıda anlatılan basamaklarda gerçekleştirildi.

1. Parafin bloklardan alınan kesitleri içeren preparatlar, 60 °C'lik fırında 1 saat bekletilerek; dokuların lam yüzeyine iyi bir şekilde yapışması sağlandı. Daha sonra, preparatlar 1x10 dakika ksilol I ve ksilol II aşamalarından geçirildi.
2. Preparatlar, azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80 ve %70'lik etanolde) 1x5 dakika bekletildikten sonra, 5 dakika distile suda yıkandı.
3. Antijen bölgelerinin açılması için preparatlar, Tris-EDTA (10 mM Tris ve 1 mM EDTA) içerisinde 665 watt'a ayarlı mikrodalgada 1x5 dakika kaynatıldı ve soğuması için aynı solüsyon içinde oda ısısında 25 dakika bekletildi.
4. Süre sonunda, preparatlar 1XPBS içinde 3x5 dakika yıkandı.
5. Daha sonra, preparatlar metanol içinde hazırlanan %3'lük H₂O₂ içinde oda ısısında 25 dakika bekletilerek, endojen peroksidaz aktivitesi bloklandı.
6. Bloklama sonrasında preparatlar, 1XPBS içinde 3x5 dakika yıkandı ve kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle çizildi.
7. Yıkama sonrası, preparatlar sekonder antikorun özgül olmayan bağlanmalarını önlemek için UV bloklama solüsyonunda (Thermo Scientific, TP-125-HL), SETD1B ve SETDB1 primer antikor damlatılacak kesitler için 20 dakika; SETD2 ve CFP1 primer antikorları için de 7 dakika inkübe edildi.
8. Bloklama sonrasında, yıkama yapılmadan kesitlerin üzerindeki UV bloklama solüsyonları dökülüp; primer antikorlar mikropipetle preparatlardaki kesitlerin üzerine damlatıldı. Tavşanda üretilmiş olan primer antikorlar, antikor dilüyen solüsyonu (Life Technologies, 003118) içerisinde Tablo 3.4'te sunulan seyreltme oranlarında hazırlandı.
9. Primer antikor damlatılan preparatlar, gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Her immünohistokimya boyamasında kesitlerden birisi negatif kontrol için kullanıldı ve negatif kontrol olarak izotip kontrol (Sigma-Aldrich, katalog no: I5006) kullanıldı.
10. Süre sonunda, preparatların üzerindeki primer antikor damlaları döküldü ve 1XPBS'de 3x10 dakika yıkandı.

11. Daha sonra kesitlerin üzerine, 1:750 ve 1:500 dilüsyon oranlarında antikor dilüent solüsyonunda hazırlanan sekonder antikor (Vector lab, katalog no: BA-1000; keçide üretilmiş, tavşana karşı ve biyotin işaretli) damlatıldı ve preparatlar oda ısısında 1 saat inkübe edildi.

12. Preparatlar, sekonder antikor aşamasından sonra 1XPBS içinde 3x5 dakika yıkandı.

Tablo 3.4. İmmünohistokimya uygulamasında kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları.

Protein	Primer antikor		Sekonder antikor	
	Marka/Katalog numarası	Seyreltme oranları	Marka/Katalog numarası	Seyreltme oranları
SETD1B	Proteintech 55005-1-AP	1:1000	Vector BA-1000	1:750
CFP1	Abcam ab198977	1:1750		1:500
SETD2	LifeSpan Biosciences LS-C81092	1:500		1:500
SETDB1	Bioss bs-11670R	1:500		1:750

13. Yıkamadan sonra kesitlerin üzerinde streptavidin peroksidaz (Thermo, katalog no: TS-125-HR) damlatılıp, oda ısında 30 dakika inkübasyonu gerçekleştirildi.

14. Süre sonunda preparatlar, 1XPBS içinde 3x5 dakika yıkandı.

15. Yıkama sonrasında, kesitlerin üzerine DAB (Sigma, katalog no: D4168) damlatıldı ve reaksiyon gelişimi ışık mikroskopunda kontrol edildi. Reaksiyon gelişimi yeterli düzeye ulaştığında, preparatlar 1XPBS içine alınarak reaksiyon durduruldu ve ardından hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.

17. Son olarak preparatlar, artan alkol serilerinde (%70, %80, %90 ve %100 etanolde) dehidrate edilip; ksilolden geçirildikten sonra Entellan ile lamel kullanılarak kapatıldı. Kapatılan preparatlar, ışık mikroskopunda analiz edilerek; SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 proteinlerinin fare ovaryum dokularındaki hücresel yerleşimleri ve göreceli ekspresyon düzeyleri belirlendi. Ayrıca, ImageJ programı ile kesitlerde analizler yapıldı ve elde edilen sayısal veriler, parametrik bir test olan tek yönlü ANOVA ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.

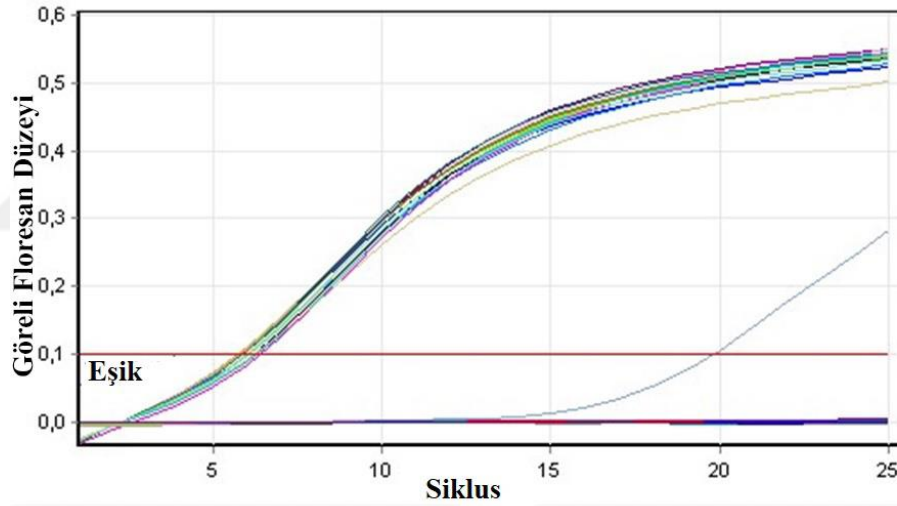


4. BULGULAR

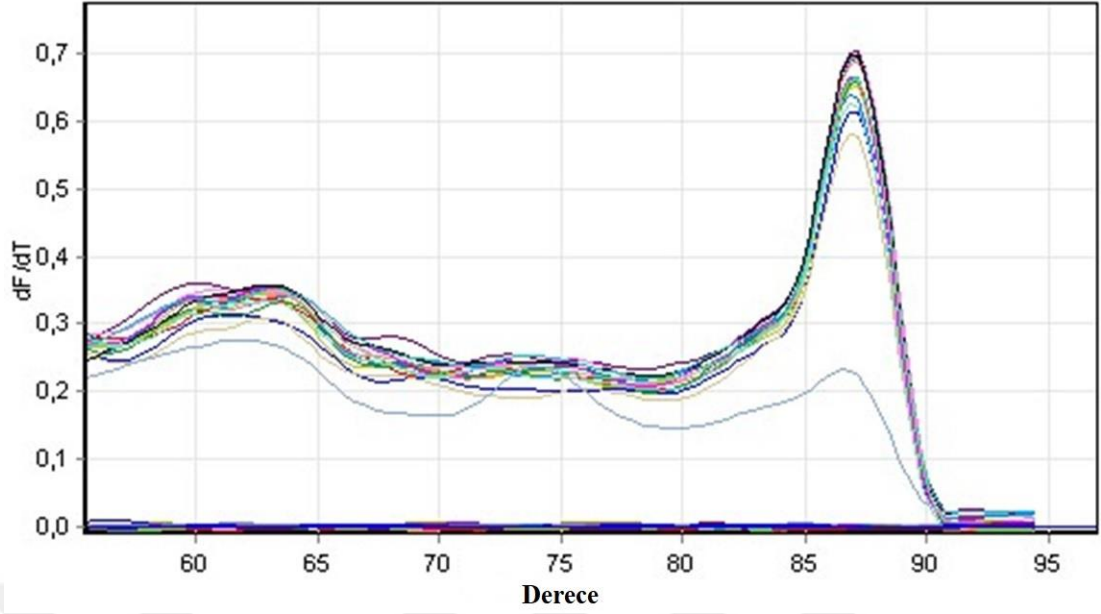
Bu çalışmada, postnatal hayatın genç (3. hafta), ergin (7. hafta), geç ergin (18. hafta) ve yaşlı (52 ve 60. haftalar) dönemlerindeki dişi farelerden alınan ovaryum dokularında *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin qRT-PCR ile analizleri yapılarak; görel mRNA seviyeleri belirlendi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA testi ile istatistiksel açıdan karşılaştırıldı.

4.1. Postnatal Ovaryum Dokularında qRT-PCR Sonuçları

qRT-PCR uygulaması ile *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Bu kapsamda, her hücrede eşit düzeyde eksprese edildiği bilinen *Beta Aktin* ekspresyonu, normalizasyon için kullanıldı. *Beta Aktin* geni için elde edilen sigmoidal ve erime eğrisi (melting curve) sonuçları sırasıyla Şekil 4.1 ve 4.2’de verildi.



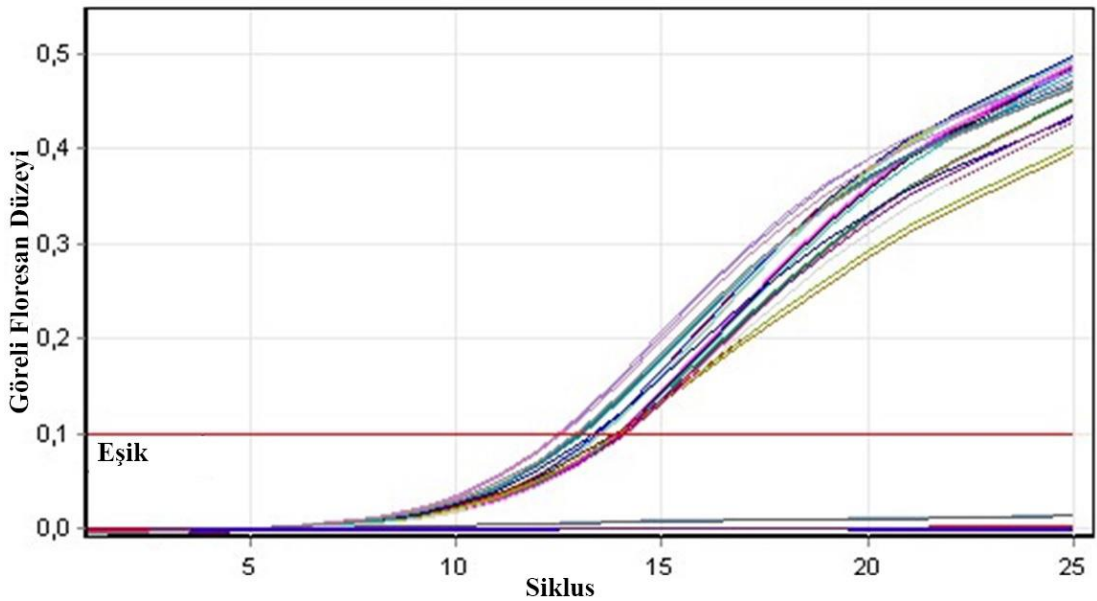
Şekil 4.1. Postnatal fare ovaryum dokularına *Beta Aktin* için uygulanan qRT-PCR reaksiyon sonucu. Beklenildiği gibi sigmoidal eğriler oluşmuştur. Bu uygulama sonucunda, negatif kontrolde 20. siklusta bir eğri oluştuğu görüldü; bu örneğin %1.5'lik agaroz jelde yürütülmesi sonucunda özgül bir bant görülmemiştir. Böylece, bu eğrinin primer dimerine bağlı olarak oluştuğu tespit edildi.



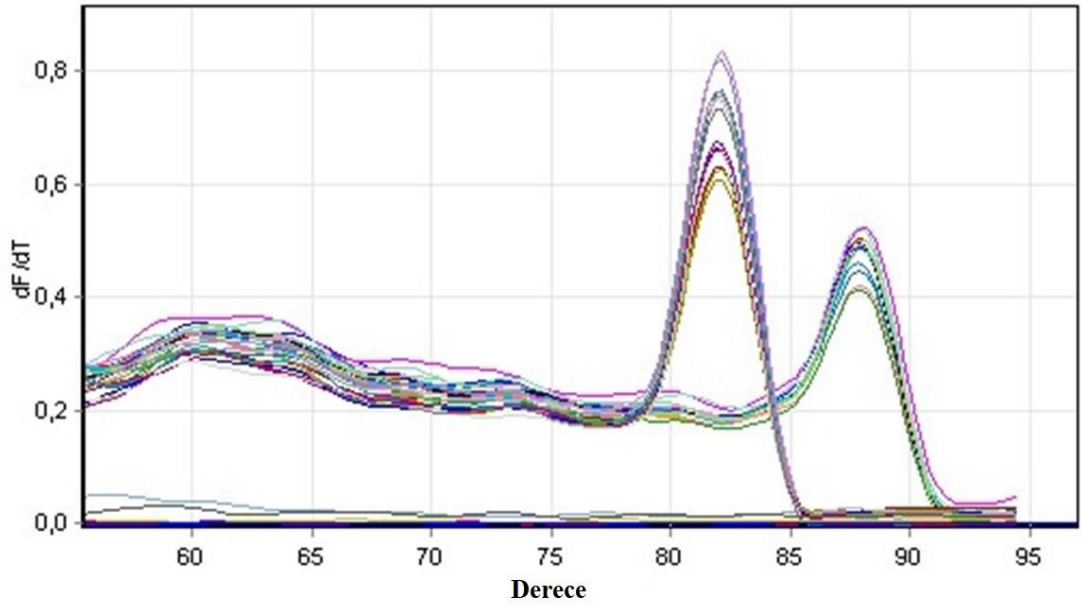
Şekil 4.2. Postnatal fare ovaryum dokularına *Beta Aktin* için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu. Bu analiz sonucunda eğrilerin tek bir bölgede oluştuğu görülmektedir. Bu durumda qRT-PCR uygulaması, özgül ürünlerin oluştuğunu göstermektedir. En içte gözükten eğri de primer dimerine bağlı olarak oluşmuştur.

4.1.1. Postnatal Ovaryumlarda Görelî *Setd1b* ve *Setd2* mRNA Ekspresyonları

Setd1b ve *Setd2* mRNA düzeylerini belirlemek için yapılan qRT-PCR uygulaması sonucunda elde edilen sigmoidal ve erime eğrileri sırasıyla Şekil 4.3 ve 4.4'te sunuldu. qRT-PCR eğrilerinin sigmoidal olması ve erime eğrisinin sadece tek bölgede pik vermesi sonuçların güvenilir ve özgül olduğunu göstermektedir.

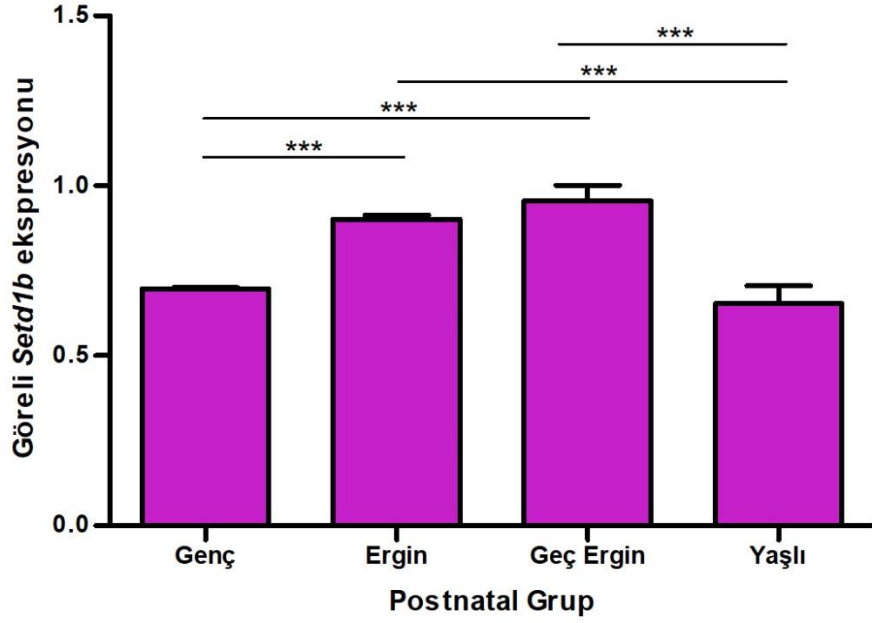


Şekil 4.3. Postnatal fare ovaryum dokularına *Setd1b* ve *Setd2* genleri için uygulanan qRT-PCR sonucu. Beklenildiği gibi sigmoidal eğriler oluşmuştur. Bu uygulama sonucunda, negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon görülmedi.



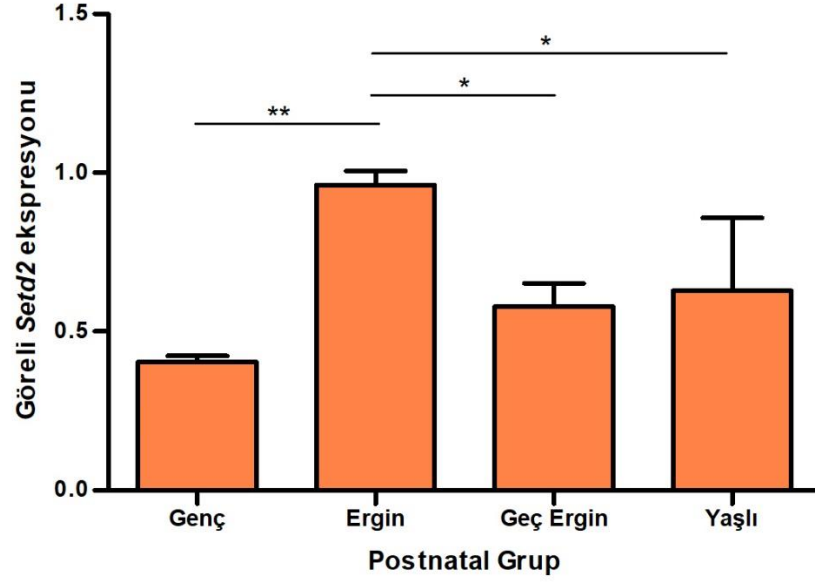
Şekil 4.4. Postnatal fare ovaryum dokularına *Setd1b* (ilk pik) ve *Setd2* (ikinci pik) için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu. Bu analiz sonucunda eğrilerin her gen için de tek bir bölgede oluştuğu görülmektedir. Bu durum, qRT-PCR ile özgül ürünlerin oluştuğunu göstermektedir.

Setd1b için uygulanan qRT-PCR analizleri sonucunda, elde edilen Ct (siklus eşik değeri) değerleri kullanılarak kat değişimleri hesaplandı ve tüm gruplarda *Setd1b* mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.5). *Setd1b* mRNA düzeyinin, genç gruptan geç ergin gruba doğru kademeli bir artış gösterdiği tespit edildi ($P<0.001$). Geç ergin grupta en yüksek seviyeye ulaşan *Setd1b* mRNA düzeyi, yaşlı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.5; $P<0.001$).



Şekil 4.5. Postnatal fare ovaryumlarında görelî *Setd1b* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Görelî *Setd1b* mRNA seviyesi, genç gruptan geç ergin gruba doğru kademeli ve anlamlı olarak artarken; yaşlı grupta belirgin bir düşüş göstermiştir ($P<0.001$). ***, $P<0.001$.

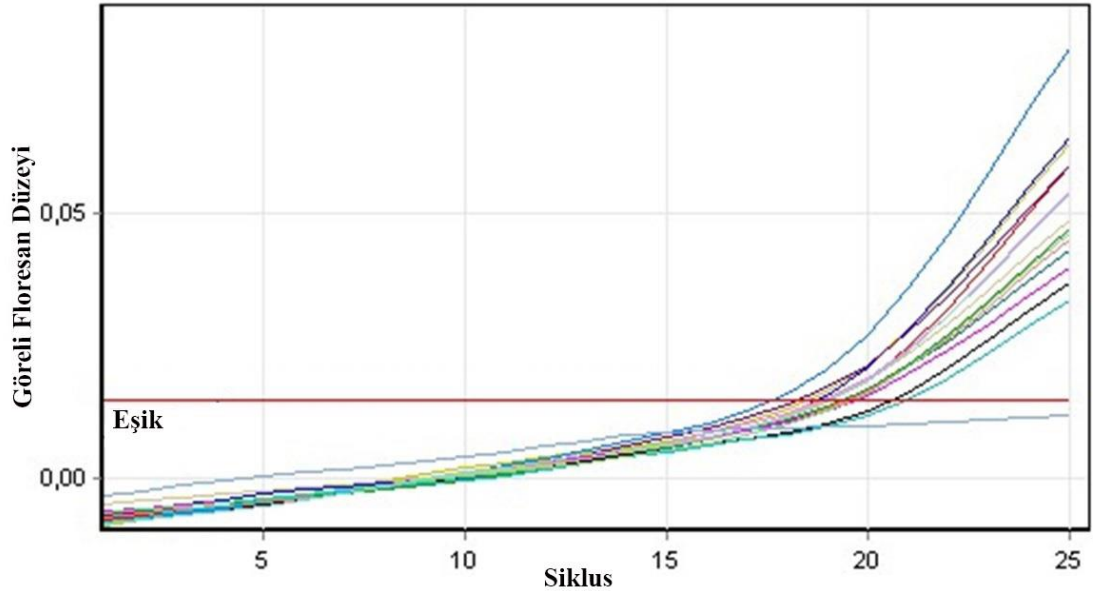
Setd2 için uygulanan qRT-PCR analizleri sonucunda, tüm gruplarda *Setd2* mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.6). Görelî *Setd2* mRNA düzeyinin genç grupta en düşük düzeyde olduğu, ergin grupta anlamlı bir şekilde yükseldiği gözlemlendi ($P<0.01$). Ergin grupta en yüksek düzeye ulaşan görelî *Setd2* mRNA ekspresyonu, geç ergin ve yaşlı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.6; $P<0.05$).



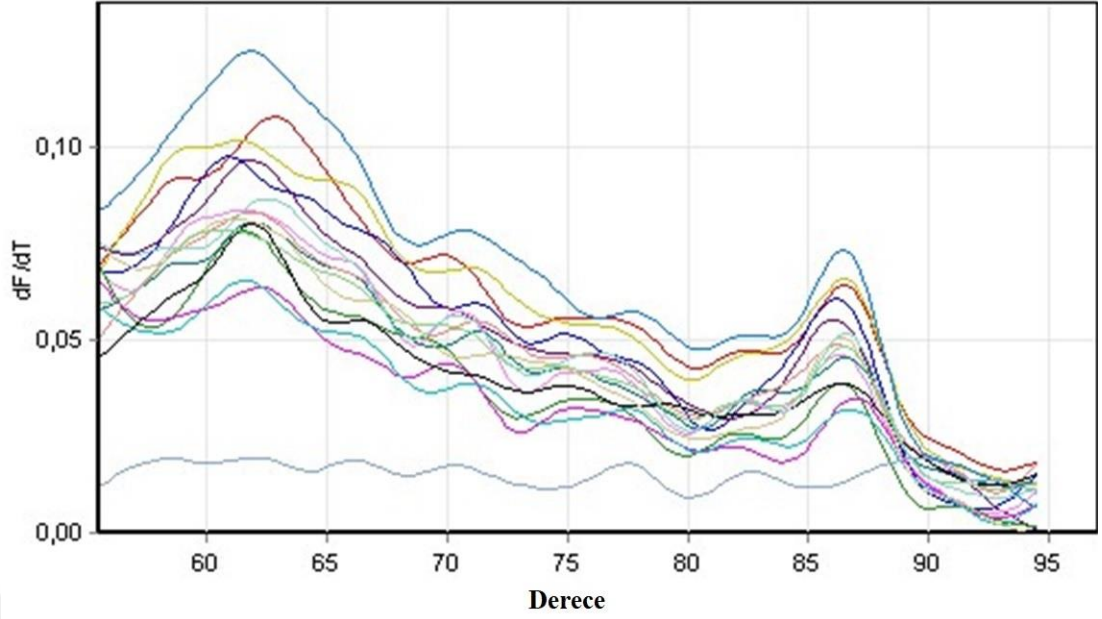
Şekil 4.6. Postnatal fare ovaryumlarında görel *Setd2* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler tek yönlü ANOVA ve Newman-Keuls post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Görel *Setd2* mRNA seviyeleri, genç gruptan yaşlı gruba kadar dalgalı bir dağılım göstermiştir ($P<0.05$). *, $P<0.05$; **, $P<0.01$.

4.1.2. Postnatal Ovaryumlarda Görel *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA Ekspresyonları

Cxxc1 mRNA ekspresyonunu belirlemek için yapılan qRT-PCR uygulaması sonucunda elde edilen sigmoidal ve erime eğrileri sırasıyla Şekil 4.7 ve 4.8’de sunuldu.

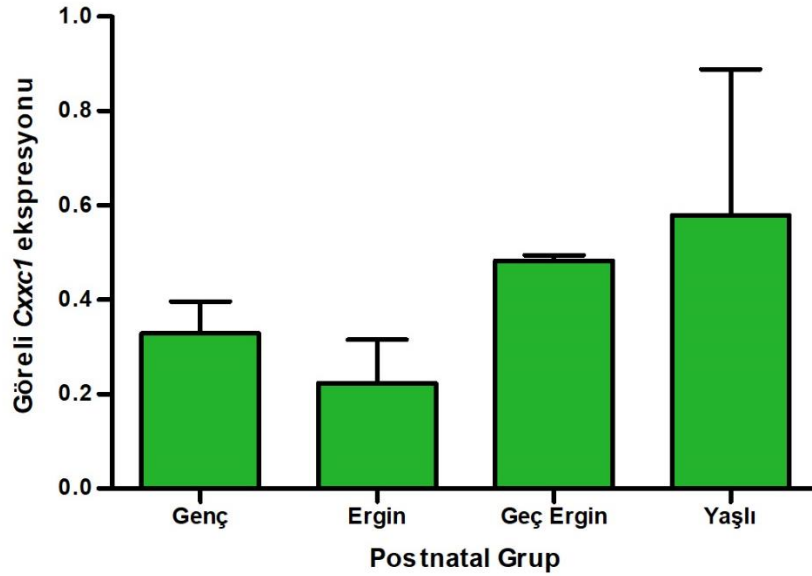


Şekil 4.7. Postnatal fare ovaryum dokularına *Cxxc1* geni için uygulanan qRT-PCR sonucu. Beklenildiği gibi, sigmoidal eğriler oluşmuştur. Bu uygulama sonucunda negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon görülmedi.



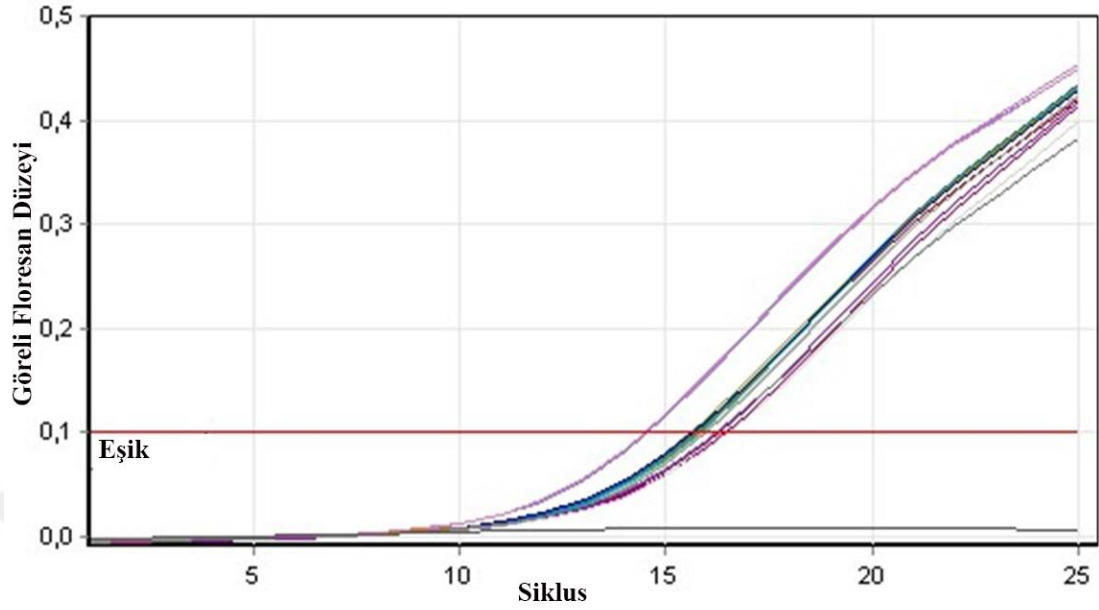
Şekil 4.8. Postnatal fare ovaryum dokularına *Cxxc1* geni için uygulanan qRT-PCR'ın erime eğrisi sonucu. Bu analiz sonucunda, qRT-PCR uygulamasında özgül ürünler oluştuğu tek bir alanda pik alınması ile tespit edildi.

Tüm gruplarda *Cxxc1* mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.9). Göreli *Cxxc1* mRNA düzeyi, ergin grupta genç gruba göre kısmen azalmış; ergin gruptan yaşlı gruba doğru ise kademeli bir artış göstermiştir. Bu değişimler, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($P>0.05$).

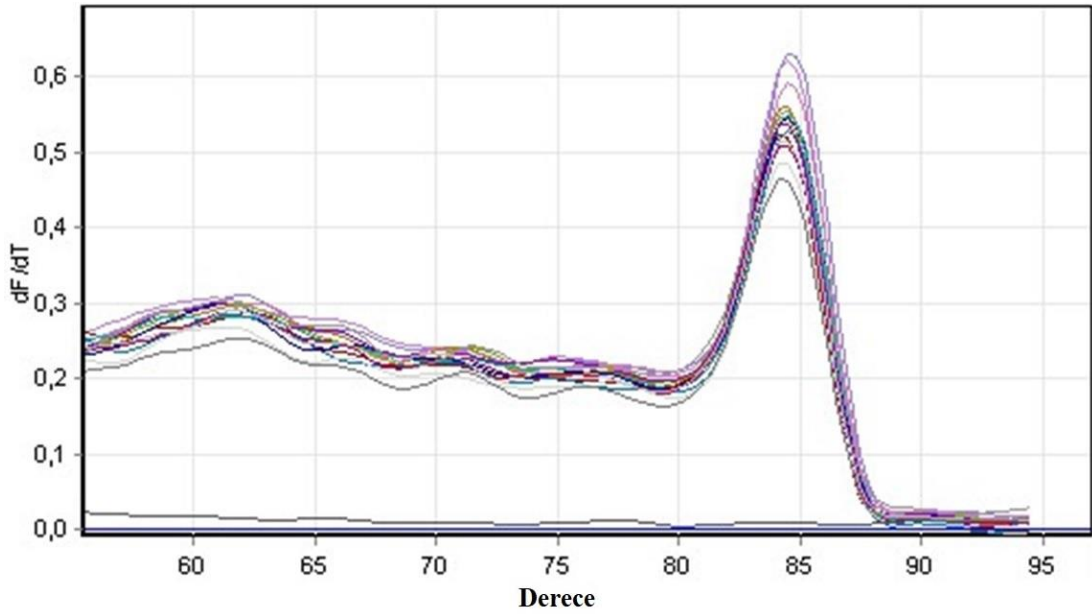


Şekil 4.9. Postnatal fare ovaryumlarında göreli *Cxxc1* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Göreli *Cxxc1* mRNA düzeyinin, gruplar arasında farklı olmadığı gözlemlendi ($P>0.05$).

Setdb1 mRNA düzeyini belirlemek için yapılan qRT-PCR uygulaması sonucunda elde edilen sigmoidal ve erime eğrileri sırasıyla Şekil 4.10 ve 4.11’de sunuldu.



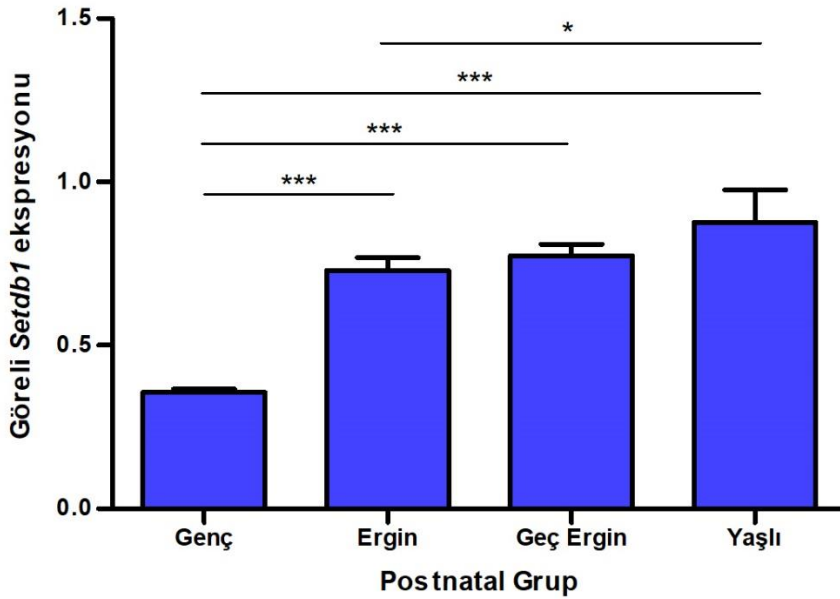
Şekil 4.10. Postnatal fare ovaryum dokularına *Setdb1* geni için uygulanan qRT-PCR sonucu. Beklenildiği gibi sigmoidal eğriler oluşmuştur. Bu uygulama sonucunda, negatif kontrolde herhangi bir reaksiyon görülmemiştir.



Şekil 4.11. Postnatal fare ovaryum dokularına *Setdb1* geni için uygulanan qRT-PCR erime eğrisi sonucu. Bu analiz sonucunda, qRT-PCR uygulamasında özgül ürünler oluştuğu görülmektedir.

Setdb1 için uygulanan qRT-PCR analizleri sonucunda, tüm gruplarda *Setdb1* mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.12). Genç grupta en düşük düzeyde olan

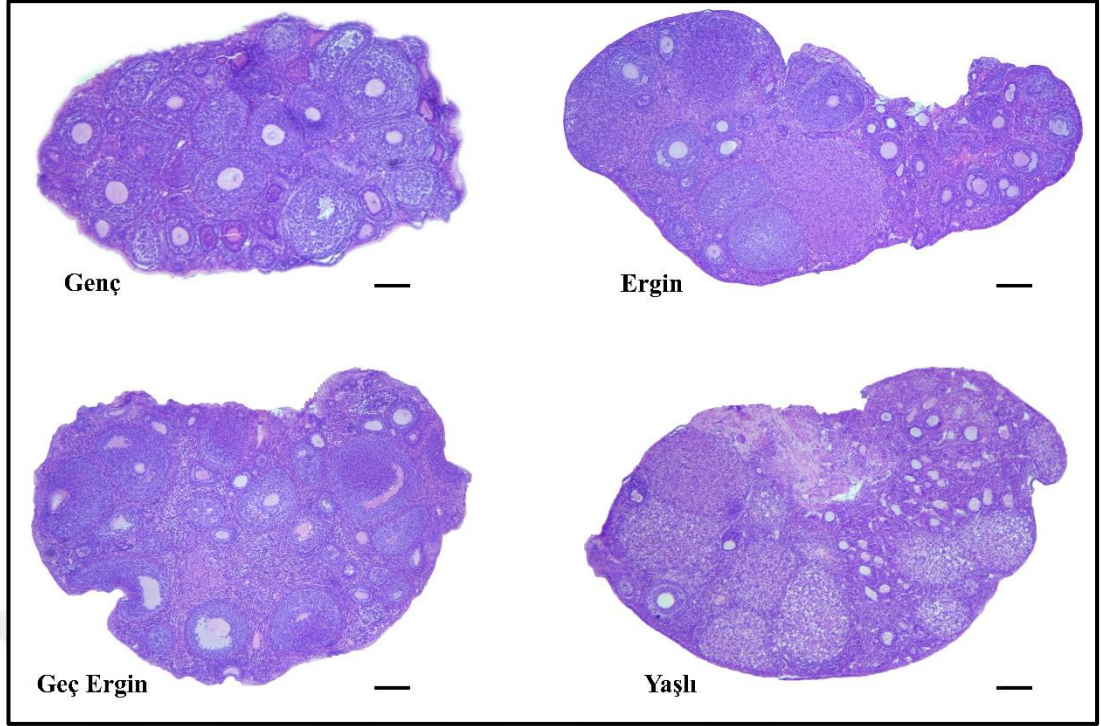
görel *Setdb1* mRNA düzeyi, ergin ve geç ergin gruplarda yükselmiş ($P<0.001$); yaşlı grupta da en yüksek düzeye ulaşmıştır (Şekil 4.12; $P<0.001$).



Şekil 4.12. Postnatal fare ovaryumlarında görel *Setdb1* mRNA ekspresyonu. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Newman-Keuls post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı ifade etmektedir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. Görel *Setdb1* mRNA seviyesinin genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı tespit edildi ($P<0.001$). *, $P<0.05$; ***, $P<0.001$.

4.2. Postnatal Ovaryum Dokularında SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, immünohistokimyasal boyamalar için fare ovaryum dokularının uygunluğunu değerlendirmek amacıyla öncelikle hematoxilen-eozin (HE) boyama yapıldı (Şekil 4.13). HE boyama ile ovaryumların histolojik yapısı ve morfolojileri incelendi. Yapılan değerlendirmeler neticesinde, ovaryumların genel histolojik yapılarının immünohistokimyasal boyanma için uygun olduğu görüldü. Genç grup ovaryumlarda, antral folikül hariç tüm folikül tiplerinin var olduğu belirlendi. Ergin ve geç ergin grup ovaryumlarda ise antral folikül de dahil olmak üzere tüm folikül tipleri ve korpus luteum ve korpus albicans gibi yapılar da gözlemlendi. Yaşlı grupta ise (52. haftada), korpus luteum yapılarında artış; folikül sayısında azalmalar göze çarpmıştır. Diğer bir yaşlı grup olan 60. haftalık ovaryumda folikül sayılarında düşüş, azalan korpus luteum ve artmış korpus albicans yapıları eşlik etmiştir (Şekil 4.13).

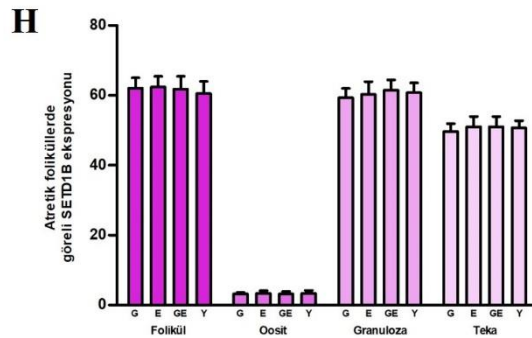
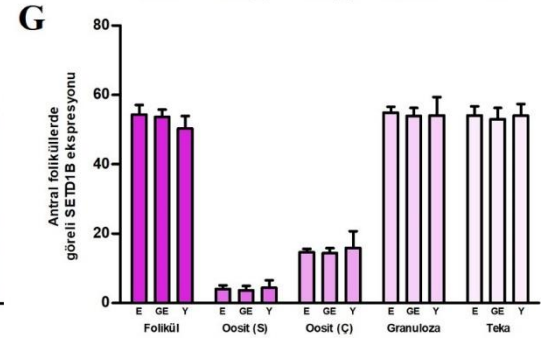
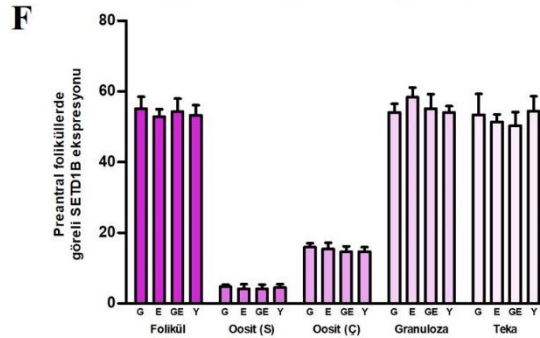
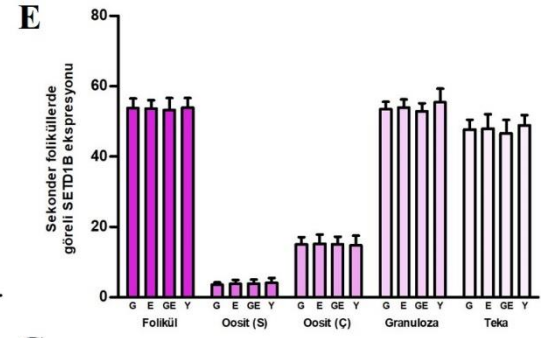
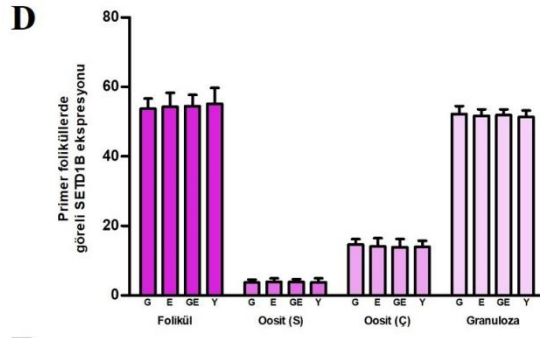
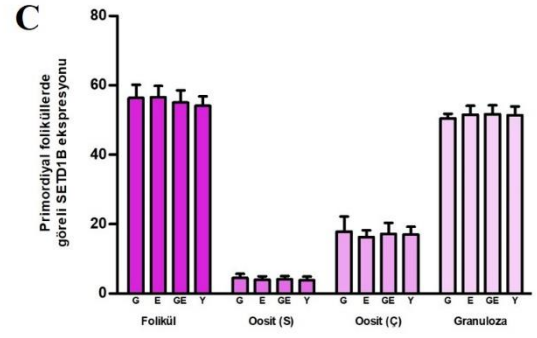
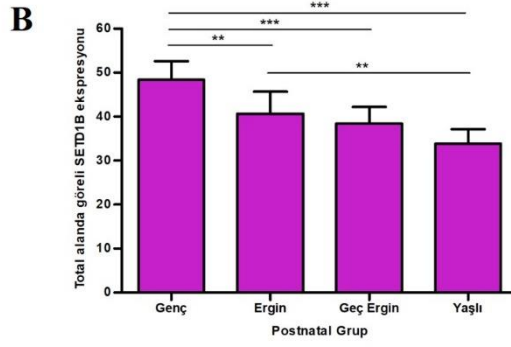
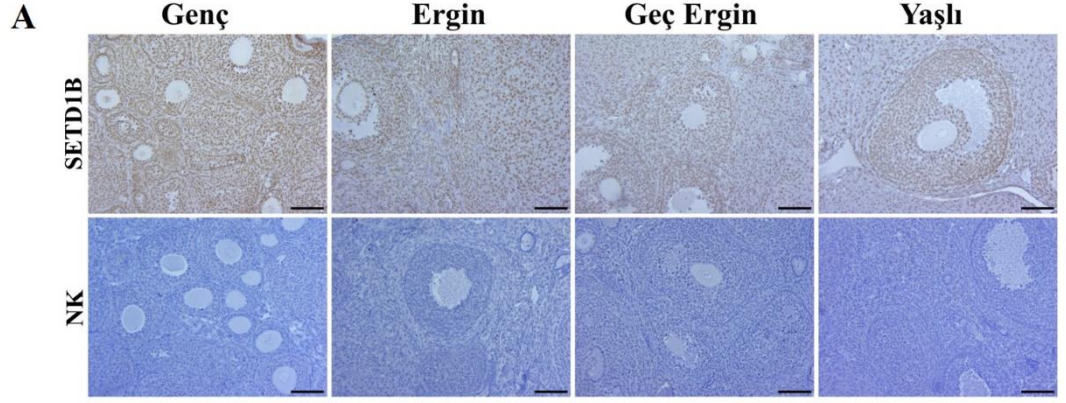


Şekil 4.13. Postnatal genç grup (3. hafta), ergin grup (7. hafta), geç ergin grup (18. hafta) ve yaşlı grup (52. ve 60. haftalar) fare ovaryum dokularının hematoksilin-eozin ile boyanmış örnek görüntüleri. Ovaryumların, normal histolojik yapıda oldukları tespit edildi. Görüntüler, 40X orijinal büyütmede çekilmiştir ve skala bar 100 µm uzunluğundadır.

4.2.1. Postnatal Ovaryumlarda Göreli SETD1B Ekspresyonu

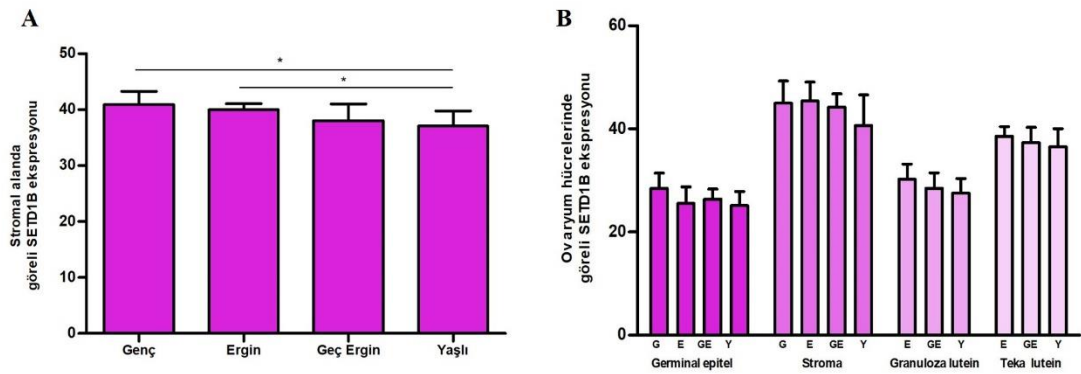
Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki ovaryum dokularında yapılan SETD1B immünohistokimya boyaması neticesinde, bu proteinin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin tamamında (primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral), korpus luteum ve korpus albicans gibi ovaryum yapılarında eksprese edildiği gözlenmiştir (Şekil 4.14A). Hücresel açıdan değerlendirme yapıldığı zaman; SETD1B proteininin, germinal epitel hücrelerinde, stromal alandaki bazı hücrelerde, granuloza ve teka hücrelerinde, korpus luteum hücrelerinde (teka lutein ve granuloza lutein) ve farklı foliküllerde yerleşik olan oositlerin çekirdeklerinde yoğun bir ekspresyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.14A).

SETD1B'ye ait immünohistokimyasal boyanmalar, ImageJ programı ile analiz edilip tek yönlü ANOVA, Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Genç gruptan yaşlı gruba doğru total alandaki SETD1B ekspresyonu, kademeli bir şekilde azalmaktadır (Şekil 4.14B; $P < 0.001$). SETD1B proteininin genç grupta en yüksek seviyede, yaşlı grupta en düşük seviyede olduğu belirlendi.



Şekil 4.14. Postnatal fare ovaryumlarında SETD1B ekspresyonu. **A.** SETD1B proteininin genç, ergin, geç ergin ve yaşlı grup ovaryumlarda hücresel yerleşimi. **B.** Total alanda SETD1B göreceli ekspresyon düzey analizi. **C.** Primordiyal foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETD1B ekspresyon düzey analizi. **D.** Primer foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETD1B ekspresyon düzey analizi. **E.** Sekonder foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETD1B ekspresyon düzey analizi. **F.** Preantral foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETD1B ekspresyon düzey analizi. **G.** Antral foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETD1B ekspresyon düzey analizi. Elde edilen veriler total alan, primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral foliküllerde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. $P<0.05$ anlamlı kabul edildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ 'i ifade etmektedir. NK, negatif kontrol; G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup; S, sitoplazma; Ç, çekirdek. Görüntüler, 200X orijinal büyütmede çekilmiştir ve skala bar 50 μm uzunluğundadır.

SETD1B protein seviyesi, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküller (primordiyalden antral aşamaya kadar), oositler, granuloza ve teka hücrelerinde ayrı ayrı değerlendirildi. Genç gruptan yaşlı gruba kadar tüm gruplarda primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar foliküller, oositler (sitoplazma ve çekirdek değerlendirmeleri de dahil), granuloza ve teka hücrelerindeki SETD1B ekspresyonları arasında herhangi bir fark belirlenmemiştir (Şekil 4.14C-G; $P>0.05$). SETD1B protein ekspresyonu stromal alan ile ovaryumun temel bileşenlerinden olan germinal epitel, stromal ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) hücrelerde de değerlendirildi (Şekil 4.15). Yaşlı grubun stromal alanındaki SETD1B seviyesinin, genç ve ergin gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.15A; $P<0.05$). Bununla birlikte, stromal hücreler ile granuloza ve teka lutein hücrelerinde SETD1B protein düzeyi açısından bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.15B; $P>0.05$).

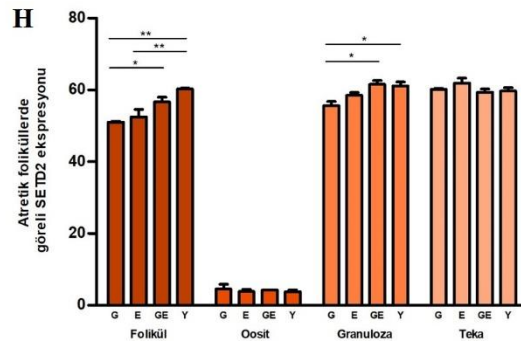
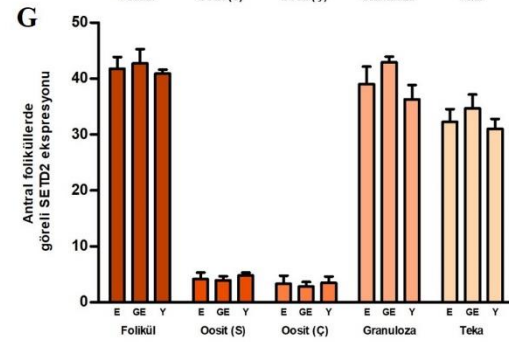
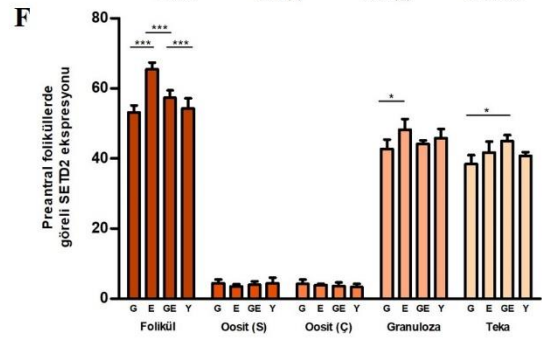
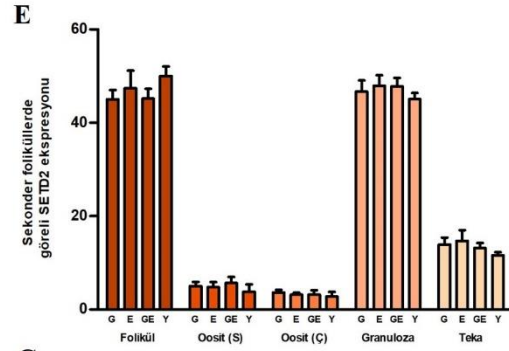
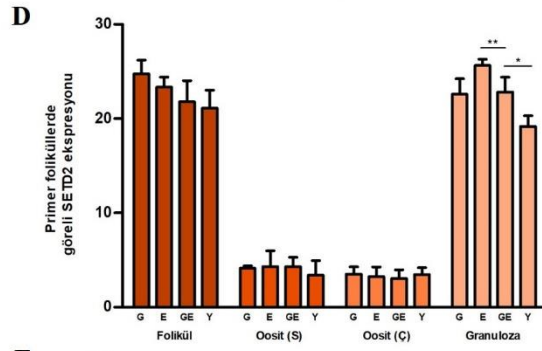
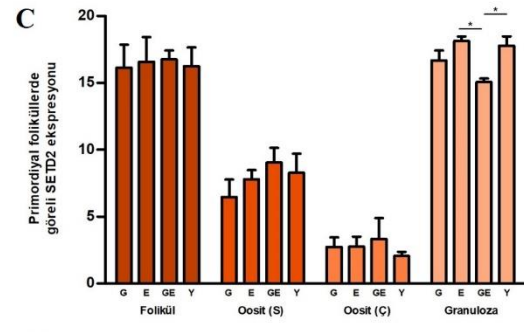
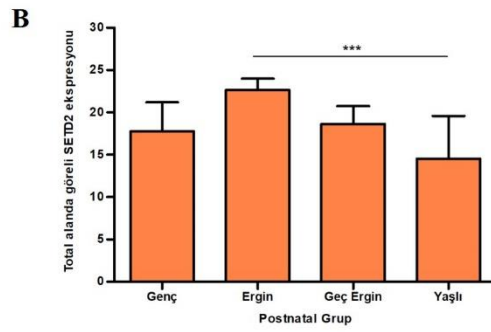
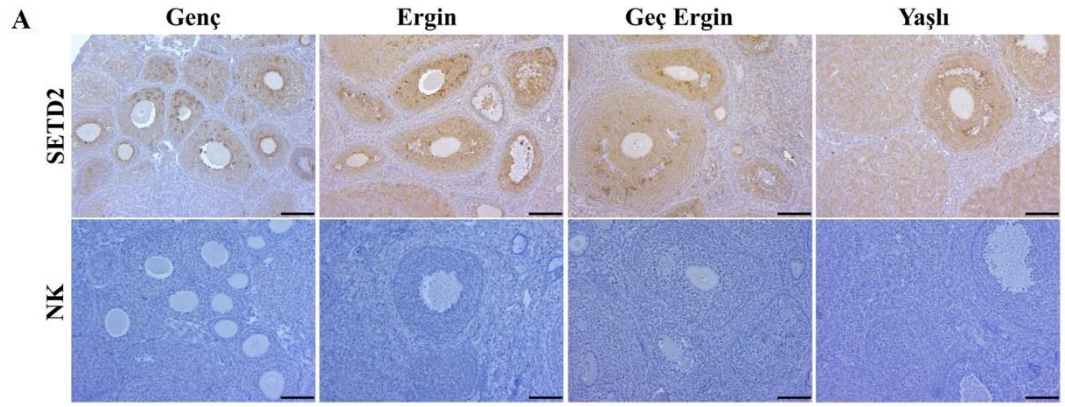


Şekil 4.15. Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde göreceli SETD1B ekspresyon analizi. **A.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar, stromal alandaki SETD1B ekspresyon analizi. **B.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar germinal epitel, stromal hücreler, granuloza lutein ve teka lutein hücrelerindeki SETD1B ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA, Newman-Keuls post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. *, $P<0.05$ 'i ifade etmektedir. G, genç grup; Er, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup.

4.2.2. Postnatal Ovaryumlarda Görelî SETD2 Ekspresyonu

Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki ovaryum dokularında yaptığımız SETD2 immünohistokimya boyamalarında: bu proteininin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin tamamında (primordiyalden antral aşamaya kadar), korpus luteum ve korpus albicans yapılarında eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4.16A). Hücresel açıdan değerlendirme yapıldığı zaman: SETD2'nin, germinal epitel hücrelerinde, stromal alandaki hücrelerde ve oositlerde sitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlendi. Granuloza ve teka hücrelerinde, luteal (teka lutein ve granuloza lutein) hücrelerinde de sitoplazmik bir yoğunluk görüldü. Bu bilgilere ek olarak, SETD2'in ovaryum hücrelerinde genel olarak zayıf bir çekirdek boyanması da vardı (Şekil 4.16A).

Total alandaki SETD2 düzeyi, genç gruptan ergin gruba doğru artmış, sonrasında ise yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.16B). Ayrıca, ergin gruptaki SETD2 protein seviyesi yaşlı grup ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha yüksek bulundu (Şekil 4.16B; $P<0.001$).



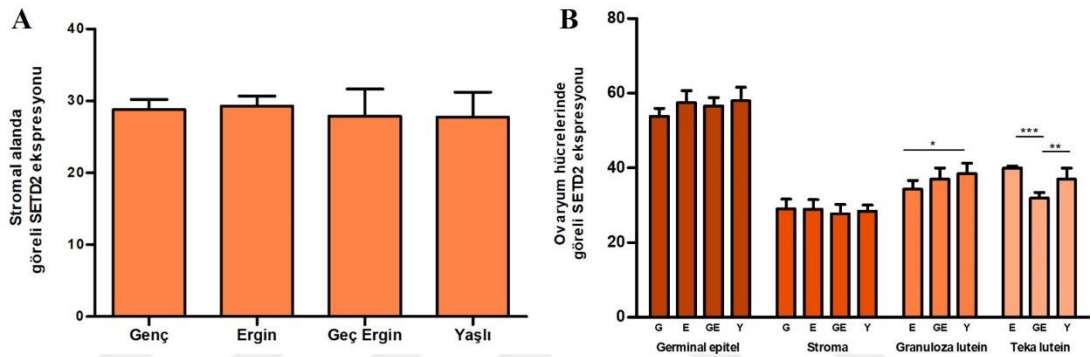
Şekil 4.16. Postnatal fare ovaryumlarında SETD2 ekspresyonu. **A.** SETD2 proteininin genç, ergin, geç ergin ve yaşlı grup fare ovaryumlarında hücresel yerleşimi. **B.** Total alanda görel SETD2 ekspresyon analizi. **C.** Primordiyal foliküllerde, oosit sitoplazma ve çekirdeği ile granuloza hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi. **D.** Primer foliküllerde, oosit sitoplazma ve çekirdeği ile granuloza hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi. **E.** Sekonder foliküllerde, oosit sitoplazma ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi. **F.** Preantral foliküllerde, oosit sitoplazma ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi. **G.** Antral foliküllerde, oosit sitoplazma ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde görel SETD2 ekspresyon analizi. Total alan, primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerden elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi; preantral foliküllerden elde edilen veriler ise Newman-Keuls post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işaretli istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$ 'i ifade etmektedir. G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup; S, sitoplazma; Ç, çekirdek. Görüntüler 200X orijinal büyütmede çekilmiştir ve skala bar 50 µm uzunluğundadır.

Primordiyal foliküller ve oositlerindeki SETD2 protein seviyeleri, genç gruptan yaşlı gruba kadar dalgalanmalar gösterse de bunlar anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.16C; $P>0.05$). Aynı foliküllerin granuloza hücrelerinde SETD2 düzeyi, ergin ve yaşlı gruplarda geç ergin gruba göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.16C; $P<0.05$). Primer foliküller ve oositlerindeki SETD2 protein seviyelerinde de genç gruptan yaşlı gruba kadar anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.16D; $P>0.05$). Granuloza hücrelerindeki SETD2 düzeyinin ise ergin gruptan ($P<0.01$) yaşlı gruba ($P<0.05$) doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.16D; $P>0.05$). Benzer olarak; sekonder foliküller, oosit, granuloza ve teka hücrelerindeki SETD2 protein ekspresyonu, dalgalanmalar gösterse de istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 4.16E; $P>0.05$).

Preantral foliküllerde en yüksek SETD2 ekspresyonu ergin grupta, en düşük ise genç grupta gözlemlendi (Şekil 4.16F). Preantral foliküllerdeki SETD2 protein seviyesi genç gruba kıyasla ergin grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış gösterdikten sonra yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.16F; $P<0.001$). Bununla birlikte, oositteki SETD2 protein seviyelerinin genç gruptan yaşlı gruba kadar neredeyse benzer seviyelerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.16F; $P>0.05$). Ayrıca, ergin grup granuloza hücrelerinin, genç gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek SETD2 ekspresyonu gösterdiği belirlendi ($P<0.05$). Teka hücrelerinde ise geç ergin grubun genç gruba göre daha yüksek SETD2 ekspresyonu ettiği ortaya konulmuştur (Şekil 4.16F; $P<0.05$). Antral foliküllerdeki SETD2 protein ekspresyonu ile ilgili yaptığımız analizler sonucunda: folikül, oositler, granuloza ve teka hücrelerinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 4.16G).

Atretik foliküllerdeki SETD2 protein seviyesinin ise genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde arttığı gözlemlendi (Şekil 4.16H; $P<0.01$). Oosit ve teka hücrelerinde ise genç gruptan yaşlı gruba kadar belirgin bir değişim belirlenmemiştir. Granuloza hücrelerinde yapılan değerlendirmeler sonucunda, SETD2 protein seviyesinin genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde arttığı belirlendi (Şekil 4.16H). Ayrıca, yaşlı ve geç ergin gruplara ait granuloza hücrelerinin, genç gruba göre daha yüksek SETD2 eksprese ettiği gözlemlendi ($P<0.05$).

SETD2 protein ekspresyonu, stromal alan ile germinal epitel, stromal ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) hücrelerde ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görece SETD2 ekspresyonu. **A.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar, stromal alandaki görece SETD2 ekspresyon analizi. **B.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar, germinal epitel, stroma, granuloza lutein ve teka lutein hücrelerindeki görece SETD2 ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA, Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ 'i ifade etmektedir. G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup.

Genç gruptan yaşlı gruba kadar stromal alan ile germinal epiteldeki SETD2 protein seviyelerinde önemli değişimler gözlenmemiştir (Şekil 4.17A ve B). Granuloza lutein hücrelerindeki SETD2 protein seviyeleri değerlendirildiği zaman: yaşlı grupta ergin gruba göre daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.17B; $P<0.05$). Teka lutein hücrelerinde ise ergin ($P<0.001$) ve yaşlı ($P<0.01$) gruplarda geç ergin gruba göre daha yüksek SETD2 ekspresyonu olduğu belirlendi (Şekil 4.17B; $P<0.01$).

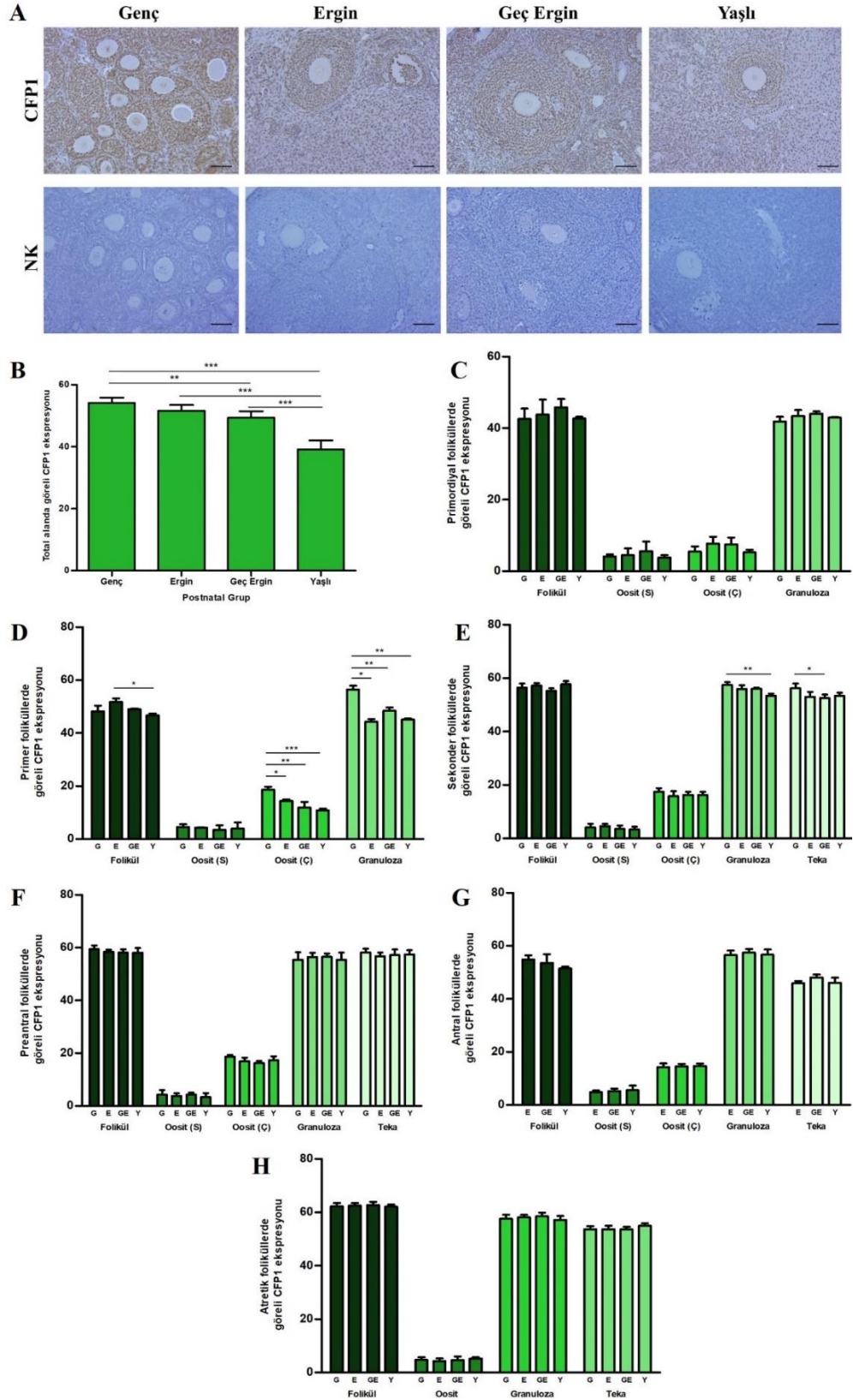
4.2.3. Postnatal Ovaryumlarda Görece CFP1 Ekspresyonu

Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki ovaryum dokularında yaptığımız CFP1 immünohistokimya boyamaları neticesinde, bu proteininin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin tamamında (primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral), korpus luteum ve korpus albicans yapılarında eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4.18A). Hücresel açıdan değerlendirme yapıldığı zaman: CFP1'in, germinal epitel

hücrelerinde, stromal alandaki hücrelerde ve oositlerde çekirdekte yerleşim gösterdiği belirlendi. Aynı şekilde, granuloza, teka ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) hücrelerinde de çekirdek ağırlıklı bir yerleşim göstermiştir (Şekil 4.18A).

Total alandaki CFP1 ekspresyon seviyesinin, genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.18B; $P<0.01$ ve $P<0.001$). Ayrıca, SETD2 protein düzeyi genç grupta en yüksekken, yaşlı grupta en düşük düzeyde olduğu belirlendi. Primordiyal foliküllerde, oositler ve granuloza hücrelerinde CFP1 protein seviyeleri, genç gruptan yaşlı gruba kadar belirgin bir fark göstermemiştir (Şekil 4.18C; $P>0.05$). Primer foliküllerdeki CFP1 protein düzeyi genç gruptan ergin gruba kısmen yükselmiş ve sonrasında yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalmıştır (Şekil 4.18D). Ayrıca, yaşlı grup primer foliküllerde ergin gruba göre daha düşük CFP1 ekspresyonu olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Primer foliküllerin oosit çekirdeğindeki göreceli CFP1 seviyesi genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalmış ($P<0.05$); yaşlı grupta ise en düşük seviyeye ulaşmıştır ($P<0.05$). Gruplar arasında oosit sitopazması için önemli bir fark belirlenmemişken; genç gruptaki granuloza hücrelerinin ergin ($P<0.05$), geç ergin ($P<0.01$) ve yaşlı ($P<0.01$) gruplara göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.18D).

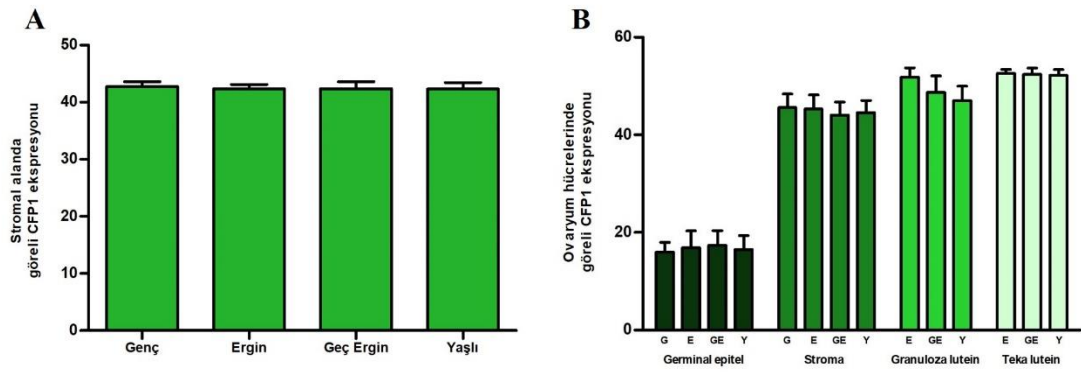
Sekonder folikül ve oositlerindeki CFP1 seviyelerinde, genç gruptan yaşlı gruba kadar önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.18E). Bununla birlikte, granuloza hücrelerindeki CFP1 seviyelerinin genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı ve genç grubun yaşlı gruba göre daha yüksek ekspresyona sahip olduğu ortaya konuldu ($P<0.01$). Teka hücrelerinde yapılan analizlerde ise genç grubun geç ergin gruba göre daha yüksek CFP1 seviyesine sahip olduğu görüldü (Şekil 4.18E; $P<0.05$). Preantral, antral ve atretik foliküllerdeki CFP1 protein ekspresyonu, foliküller, oositler, granuloza ve teka hücrelerinde ekspresyonel dalgalanmalar gösterse de bu değişimler anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.18F-H).



Şekil 4.18. Postnatal fare ovaryumlarında CFP1 ekspresyonu. **A.** CFP1 proteininin genç, ergin, geç ergin ve yaşlı grup fare ovaryumlarında hücresel yerleşimi. **B.** Total alanda CFP1 görelli ekspresyon analizi. **C.** Primordiyal foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeği ile granuloza hücrelerinde CFP1 görelli ekspresyon analizi. **D.** Primer foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeği ile granuloza hücrelerinde CFP1 görelli ekspresyon analizi. **E.** Sekonder foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde CFP1 görelli ekspresyon analizi. **F.** Preantral foliküllerde, oosit

sitoplazması ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde CFP1 görel ekspresyon analizi. **G.** Antral foliküllerde, oosit sitoplazması ve çekirdeği ile granuloza ve teka hücrelerinde CFP1 görel ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, tüm foliküllerde tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ 'i ifade etmektedir. G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup; S, sitoplazma; Ç, çekirdek. Görüntüler 200X orijinal büyütmede çekilmiştir ve skala bar 50 µm uzunluğundadır.

CFP1 protein ekspresyonu, germinal epitel, stromal, luteal (granuloza lutein ve teka lutein) ovaryal hücrelerinde ve stromal alanda da ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.19). Elde edilen veriler, One-way ANOVA, Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi.



Şekil 4.19. Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel CFP1 ekspresyonu. **A.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar, stromal alandaki CFP1 ekspresyon analizi. **B.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar germinal epitel, stromal ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) hücrelerdeki CFP1 ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA, Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P>0.05$). G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup.

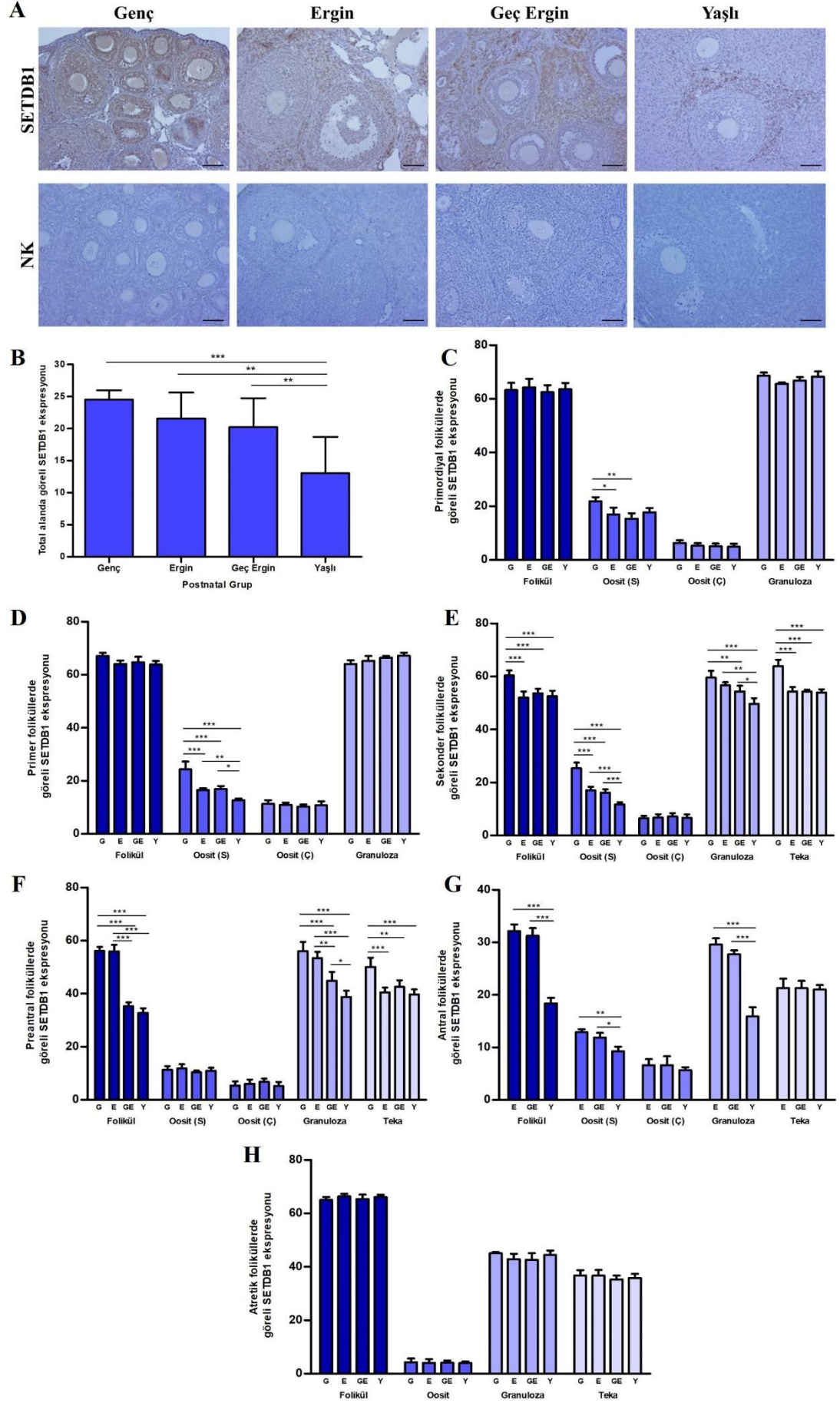
CFP1 protein ekspresyonu stromal alanda, germinal epitel, stromal ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) ovaryum hücrelerinde ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.19). Gerek stromal alanda gerekse hücre analizler sonucunda, gruplar arasında CFP1 protein düzeyleri bakımından önemli bir fark belirlenmedi (Şekil 4.19A ve B).

4.2.4. Postnatal Ovaryumlarda Görel SETDB1 Ekspresyonu

Postnatal hayatın farklı yaşlarındaki ovaryum dokularında yaptığımız SETDB1 immünohistokimya boyama neticesinde, bu proteininin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde (primordiyalden antral aşamaya kadar), korpus luteum ve korpus albicans yapılarında eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4.20A). Hücre analizi yapıldığı zaman; SETDB1'in, germinal epitel hücrelerinde, stromal alandaki bazı hücrelerde çekirdek ve sitoplazma yerleşimli olduğu belirlendi. Oositlerde ise sitoplazmada yoğunluk gösterdiği tespit edildi. SETDB1 proteinini

granuloza ve teka hücrelerinde, luteal (teka lutein ve granuloza lutein) hücrelerinde ise genellikle çekirdek ağırlıklı bir yerleşim gösterdiği izlendi (Şekil 4.20A).

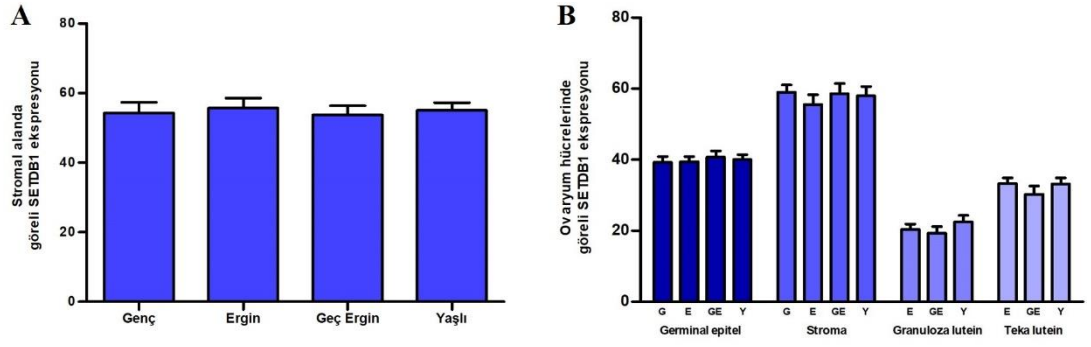
Genç gruptan yaşlı gruba doğru görelî total SETDB1 seviyesinin kademeli bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 4.20B; $P<0.001$). SETDB1 protein seviyesinin genç grupta en yüksek, yaşlı grupta en düşük seviyede olduğu görüldü (Şekil 4.20B). Primordiyal foliküllerde, oositlerin çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETDB1 protein ekspresyonu, genç gruptan yaşlı gruba kadar belirgin bir fark göstermemiştir (Şekil 4.20C). Fakat, oositlerin sitoplazmalarındaki SETDB1 düzeyi genç grupta ergin ($P<0.01$) ve geç ergin ($P<0.05$) gruplara göre daha yüksek bulundu. Benzer olarak, primer foliküllerde, oositlerin çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETDB1 ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir değişim belirlenmedi (Şekil 4.20D). Fakat, oositlerin sitoplazmalarındaki SETDB1 seviyesi genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldı ($P<0.05$).



Şekil 4.20. Postnatal fare ovaryumlarında SETDB1 ekspresyonu. **A.** SETDB1 proteininin genç, ergin, geç ergin ve yaşlı grup ovaryumlarda hücresel yerleşimi. **B.** Total alanda SETDB1 göreceli ekspresyon analizi. **C.** Primordiyal foliküllerde, oosit sitoplazması ile çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETDB1 ekspresyon analizi. **D.** Primer foliküllerde, oosit sitoplazması ile çekirdeğinde ve granuloza hücrelerinde SETDB1 ekspresyon analizi. **E.** Sekonder foliküllerde, oosit sitoplazması ile çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETDB1 ekspresyon analizi. **F.** Preantral foliküllerde, oosit sitoplazması ile çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETDB1 ekspresyon analizi. **G.** Antral foliküllerde, oosit sitoplazması ile çekirdeğinde, granuloza ve teka hücrelerinde SETDB1 ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, total alanda, primordiyal, primer ve antral foliküllerde, tek yönlü ANOVA, Tukey post hoc testi; sekonder foliküllerde Newman-Keuls post hoc testi; preantral foliküllerde ise Bonferroni post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. * işareti istatistiksel anlamlılığı göstermektedir. *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$ 'i ifade etmektedir. G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup; S, sitoplazma; Ç, çekirdek. Görüntüler, 200X orijinal büyütmede çekilmiştir ve skala bar 50 μm uzunluğundadır.

Sekonder foliküllerde SETDB1 protein ekspresyonunun genç gruba kıyasla ergin, geç ergin ve yaşlı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük olduğu görüldü (Şekil 4.20E; $P<0.001$). Oositlerin sitoplazmalarındaki SETDB1 seviyesi, genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalmıştır ($P<0.05$). Oositlerin çekirdeğinde belirgin bir fark gözlenmezken; granuloza hücrelerindeki SETDB1 protein seviyesinin genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlendi ($P<0.05$). Teka hücrelerinde ise genç grupta SETDB1'in en yüksek seviyede olduğu tespit edildi (Şekil 4.20E; $P<0.001$). Preantral foliküllerde ve granuloza hücrelerinde bu proteinin düzeyi genç gruptan yaşlı gruba doğru genel olarak azalmıştır (Şekil 4.20F; $P<0.05$). Teka hücrelerinde SETDB1 ekspresyonunun genç grupta en yüksek seviyede olduğu belirlenirken ($P<0.01$) oositlerin sitoplazma ve çekirdeğinde gruplar arasında belirgin bir değişim izlenmemiştir (Şekil 4.20F). Antral foliküllerdeki SETDB1 seviyelerinin ergin ve geç ergin gruba kıyasla yaşlı grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi (Şekil 4.20G; $P<0.001$). Oositlerdeki sitoplazmik SETDB1 seviyesinin ergin gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlenirken ($P<0.05$); oositlerin çekirdeği ile teka hücrelerinde gruplar arasında bir fark tespit edilmedi. Bununla birlikte, yaşlı grup granuloza hücrelerinin ergin ve geç ergin gruplara kıyasla daha düşük SETDB1 seviyesine sahip olduğu belirlendi (Şekil 4.20G; $P<0.001$). Atretik foliküller, oositler, granuloza ve teka hücrelerinde gruplar arasında anlamlı bir değişim bulunmamıştır (Şekil 4.20H; $P>0.05$).

SETDB1 protein ekspresyonu stromal alan ile germinal epitel, stromal ve luteal (granuloza lutein ve teka lutein) hücrelerde ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 4.21A ve B). Bu değerlendirmeler sonucunda gruplar arasında dalgalanmalar gözlenirse de bu değişimler anlamlı bulunmadı ($P>0.05$).



Şekil 4.21. Stromal alan ile ovaryum hücrelerinde görel SETDB1 ekspresyonu. **A.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar, stromal alandaki SETDB1 ekspresyon analizi. **B.** Genç gruptan yaşlı gruba kadar germinal epitel, stromal hücreler ile granuloza lutein ve teka lutein hücrelerindeki SETDB1 ekspresyon analizi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA, Tukey post hoc testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. $P < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir. G, genç grup; E, ergin grup; GE, geç ergin grup; Y, yaşlı grup.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, oosit olgunlaşmasında önemli görevleri olan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* genlerinin mRNA ve protein düzeyleri postnatal fare ovaryum dokularında ilk defa detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir. *Setd1b*, *Setd2* ve *Setdb1* genlerinin mRNA düzeylerinin genel olarak postnatal genç grupta belirgin bir şekilde az olduğu gözlemlenmiştir. Genç grupta bu genlerin mRNA düzeylerinin az olmasının temel nedenlerinden birinin bu genleri eksprese eden ovaryum hücrelerinin genç grupta daha düşük sayıda olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Genç grup ovaryumlar (3 haftalık), diğer postnatal gruplara göre folikül sayısı (Antral foliküller bulunmamaktadır.) ve hücresel içerik bakımından farklılıklar gösterebilmektedir (de Bruin ve ark., 2004; Tatone ve ark., 2008). Bu nedenle, genç grup ovaryumlarda granuloza, teka ve stromal hücrelerin diğer gruplara göre göreceli olarak daha az sayıda olduğu öngörülmektedir. Ergin, geç ergin ve yaşlı gruplarda; genç ovaryumlarda görülmeyen, antral folikül ve korpus luteuma özgü olan granuloza lutein ve teka lutein hücrelerinin varlığı gözlemlenmektedir. Bu durumlar dikkate alındığında; bu genlerin mRNA düzeylerinin azlığının temelinde, bu genleri eksprese eden hücre sayı ve çeşitliğinin azlığının ve folikül içerik farklılığından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Ayrıca, *Setd1b*, *Setd2* ve *Setdb1* genlerinin mRNA düzeylerinin postnatal genç grupta az olmasının nedenlerinden birinin de sırasıyla SETD1B, SETD2 ve SETDB1 protein seviyelerinin genel olarak artışından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği gibi, yüksek protein seviyesi daha fazla mRNA'ya ihtiyaç olmadığı anlamına gelmektedir (Maier ve ark., 2009; Liu ve ark., 2016). Bu durum ise translasyonel kontrol mekanizmaları ile gerçekleştirilmektedir. Benzer olarak, *Cxxc1* geninin mRNA düzeyinin ise ergin grupta en düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu düşüşün de CFP1 protein miktarının aynı grupta yüksek düzeyde olmasından kaynaklı olabileceği kanısındayız.

Postnatal genç gruptan geç ergin gruba kadar *Setd1b* mRNA düzeyinin kademeli bir şekilde arttığı, yaşlı grupta ise belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi. Benzer şekilde, *Setd2* mRNA düzeyinin ergin grupta en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra yaşlı grupta dikkate değer bir azalma gösterdiği belirlendi. Bu azalmaların olası nedenlerinden

birisi, ovaryal yaşlanma ile birlikte artan folikül atrezisi ve folikül sayısının azalması (Banerjee ve ark., 2014; Urzua ve ark., 2020) kaynaklı olabileceği kanısına varıldı. Yaşlanmayla birlikte folikül sayısının azalmasına bağlı olarak bu genleri eksprese eden foliküllerin, dolayısıyla granuloza ve teka hücreleri gibi belirli hücrelerin azalması, *Setd1b* ve *Setd2* mRNA düzeylerinin yaşlı grupta düşmesine etki etmiş olabilir. *Setd1b*'nin transkripsiyonel aktivite ilişkili H3K4me3'ü oluşturduğu (Hanna ve ark., 2021) ve benzer şekilde, *Setd2*'nin de transkripsiyonel aktivite ilişkili H3K36me3 işaretlerini oluşturduğu (Carvalho ve ark., 2013) göz önüne alındığında; yaşlanmayla birlikte genel gen ekspresyonunun azalması (Stegeman ve Weake, 2017), transkripsiyonel aktivite ilişkili bu genlerin yaşlanma döneminde azalmasının nedenlerinden biri olabilir.

Cxxc1 mRNA düzeyinin postnatal ergin gruptan yaşlı gruba kadar kademeli bir şekilde arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir artış olmadığı belirlendi. *Cxxc1* mRNA düzeyindeki bu kısmi artışın, proteindeki azalmadan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *Setdb1* mRNA düzeyinin ise genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde artarak yaşlı grupta dikkate değer bir artış gösterdiği gözlemlendi. Bu artışın, SETDB1'in heterokromatin oluşumunda ve transkripsiyonun baskılanmasında görev aldığı bilgisi (Ichimura ve ark., 2005) göz önünde bulundurulduğunda yaşla birlikte genel gen ekspresyonunun azalmasının (Stegeman ve Weake, 2017) nedenlerinden biri olabileceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, postnatal yaşlı grupta *Setdb1* mRNA düzeyindeki bu artışın nedenlerinden birinin de azalan protein düzeyini yükseltmek için transkripsiyonel aktivitenin artırılmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmada, postnatal ovaryum dokularında, stromal alanda, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde, oositlerde, granuloza ve luteal hücrelerde (granuloza lutein ve teka lutein) SETD1B, SETD2, CFP1 ve SETDB1 proteinlerinin hücre içi dağılımı ve görelî düzeyleri de değerlendirildi. İlk olarak transkripsiyonel aktivite ile ilişkili H3K4me3 metilasyonunu gerçekleştiren SETD1B proteini analiz edildi. Yapılan literatür taramalarına göre, SETD1B proteininin ovaryum dokularında analiz edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada, SETD1B proteininin ovaryum dokularında total alanda, postnatal genç gruptan yaşlı gruba kadar kademeli bir şekilde azaldığı; genç grupta en yüksek, yaşlı grupta en düşük seviyede olduğu belirlendi.

SETD1B aracılığı ile gerçekleştirilen H3K4me3 işaretlerinin, fare oosit olgunlaşması için gerekli belirli gen ekspresyonlarının gerçekleşmesi için gerekli olduğu belirtilmiştir (Hanna ve ark., 2021). Brici ve ark. (2017), *Setd1b*'nin nakavt edildiği fare oositlerinde; kısa iğ ipliklerinin oluşumu, NSN-tip kromatinden SN-tip kromatine geçişte düzensizlikler, organel dağılımının bozulduğunu gösteren sitoplazmik granüllerin varlığı, zona pellusidadaki düzensizlikler ve oositin nüklear ve sitoplazmik olgunlaşmasında bozulmalar meydana geldiğini rapor etmişlerdir (Brici ve ark., 2017). Bu doğrultuda, yaşlanmayla birlikte oogenez boyunca oositte meydana gelen olgunlaşma bozukluklarına (Miao ve ark., 2009), KMT'lerden biri olan SETD1B'nin postnatal yaşlı grupta protein düzeyinde azalma göstermesinin etkisi olabileceği düşünülmektedir. SETD1B, total alanda yaşlı grupta belirgin bir azalma gösterirken; folikül ve hücre düzeyinde bir değişiklik olmamasının genç gruptan yaşlı gruba kadar ovaryumlardaki foliküler ve luteal içeriğin sayısal olarak farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Ergin gruba kıyasla, geç ergin ve yaşlı gruplarda korpus luteum yapılarının fazlalığı ve bu yapılarda boyanmayan birtakım granuloza ve teka lutein hücrelerinin bulunması bu düşüncüyü desteklemektedir. Bununla birlikte, SETD1B için stromal hücre düzeyinde gruplar arasında bir fark yokken; stromal alanda bu proteininin genç ve ergin gruba kıyasla, yaşlı grupta belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi. Total alandaki azalmaya stromal alandaki ekspresyonel azalmanın da katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

SETD2, fare oositlerinde bazı genlerin transkripsiyonel aktivasyonu için H3K36me3 metilasyonu katalizler ve mayotik olgunlaşmanın gerçekleşmesine katkı sağlar (Li ve ark., 2018). Diao ve ark. (2018) SETD2'nin, NSN-tip domuz oosit çekirdeğinde yoğun bir ekspresyon gösterdiğini; SN, MI ve MII oositlerin çekirdeklerinde ise bu yoğunluğun olmadığını rapor etmişlerdir (Diao ve ark., 2018). SETD2 SN, MI ve MII oositlerde sitoplazmik bir dağılım da göstermiştir. Bu dağılım, bu proteinin oosit olgunlaşmasının belirli aşamalarında transkripsiyonel süreci düzenlediğini göstermektedir. Fare oositlerinde *Setd2* mRNA düzeyinin siRNA kullanılarak azaltılması; iğ iplikleri oluşumunda düzensizlikler, yanlış kinetokor-mikrotübül bağlanması, kromozomların yanlış hizalanması ve polar cisim atılım oranında azalma gibi olumsuzluklara sebep olarak oosit olgunlaşmasının bozulduğu gözlenmiştir (Li ve ark., 2018). Xu ve ark. (2019), maternal SETD2 eksikliğinin fare oositlerinde H3K36me3 seviyesinin azalmasına, MII oosit sayısının düşmesine ve oositlerde

normal olmayan DNA metilom kurulmasına neden olduğunu belirtmişlerdir (Xu ve ark., 2019). Diao ve ark. (Diao ve ark., 2018)'nın bulgularıyla uyumlu olarak, çalışmamızda da SETD2 proteininin oositlerde ağırlıklı olarak sitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlendi. Bununla birlikte total alanda SETD2 protein seviyesinin, ergin gruba kıyasla yaşlı grupta anlamlı bir şekilde azaldığını gözlemledik. Ayrıca, primer foliküllerin granuloza hücrelerinde SETD2 protein seviyelerinin yaşlı grupta belirgin bir şekilde azaldığı, primordiyal foliküllerin granuloza hücrelerinde ise geç ergin grubunda azalma gösterdikten sonra yaşlı grupta anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Preantral foliküllerde ise ergin gruptaki belirgin artıştan sonra yaşlı grupta anlamlı bir azalma göstermesi dikkati çekmiştir. İlginç bir şekilde, atretik foliküllerde ve granuloza hücrelerinde SETD2 seviyeleri, genç gruptan yaşlı gruba kadar kademeli bir şekilde artmaktadır. SETD2'nin transkripsiyonel aktivasyon ilişkili rol oynadığı ve atretik foliküllerde pek çok genin ekspresyonunun arttığı (Hatzirodos ve ark., 2014) göz önüne alındığında; atretik foliküllerdeki bu artışın, ölüme giden hücrelerin tüm hücrel yolaklarını aktive etmek istemesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. SETD2, granuloza lutein hücrelerinde genç gruptan yaşlı gruba doğru belirgin bir şekilde artmış, teka lutein hücrelerinde ise ergin ve yaşlı gruplara kıyasla geç ergin grupta anlamlı düzeyde azalmıştır. Bu bulgular, SETD2 düzeyinin postnatal hayatın farklı dönemlerinde dinamik bir ekspresyon dağılımı gösterdiği ve bu dağılımın farklı hücre içi yolaklarla düzenlendiğini göstermektedir. Yaşlı gruptaki SETD2 düzeyinin azalması ya da artmasının fizyolojik öneminin belirlenmesine yönelik yeni ve detaylı çalışmalara gereksinim olduğu düşüncesindeyiz. Bu çalışmaların her hücre tipi için ayrı ayrı yapılması; SETD2'nin yaşlanma sürecindeki değişimler üzerinde olumlu ya da olumsuz etkilerinin ortaya konulması için önemli olacaktır.

CFP1, memeli SET1 kompleksinin bir bileşenidir ve gelişmekte olan fare oositlerinde H3K4me3 metilasyonunu düzenler (Yu ve ark., 2017; Sha ve ark., 2018). Yu ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada, maternal CFP1 eksikliği; H3K4me3 işaretlerinin azalmasına ve oositlerin sitoplazmik olgunlaşmasında, maternal mRNA temizliği ve DNA (de)metilasyonu ile ilişkili bazı genlerin ekspresyonlarında bozulmalara neden olmuştur (Yu ve ark., 2017). Aynı çalışmada, CFP1 eksikliği olan fare oositlerinde transkripsiyonun büyük ölçüde azaldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada, CFP1 proteininin postnatal genç gruptan yaşlı gruba kadar kademeli bir şekilde azalarak yaşlı

grupta en düşük seviyeye ulaştığı belirlendi. CFP1 proteinin yaşlı grupta belirgin bir şekilde azalması, ovaryumdaki transkripsiyonel aktiviteyi etkileyebileceği ve bu durumda biyolojik yaşlanma ile ovaryum hücrelerinin fonksiyonlarında ortaya çıkan düşüşün alt yapısında yer alabileceğini göstermektedir.

Farklı bir çalışmada, oosite özgü CFP1 eksikliği; iğ iplikleri oluşumu ve kromozom hizalanmasında bozulmalara ve MI aşamasında mayotik tutulumu neden olmuştur (Sha ve ark., 2018). Bizim çalışmamızda, primordiyal, preantral, antral ve atretik foliküllerde bir fark bulunmazken; primer foliküllerde, granuloza hücrelerinde ve oosit çekirdeğindeki CFP1 düzeyi yaşlı grupta belirgin bir şekilde azalmıştır. Ayrıca, sekonder foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde yaşlı gruptaki CFP1 seviyelerinin belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi. Yaşla birlikte oosit kalitesinin azaldığı dikkate alındığında (Simsek-Duran ve ark., 2013); belirli foliküllerde, granuloza hücreleri ve oositteki CFP1 protein seviyelerinin azalmasının oosit kalitesindeki düşüş ile ilişkili olabileceği tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, Sha ve ark. (2018)'nın yaptığı çalışmada, CFP1 proteininin oositlerde sitoplazma ve yoğun olarak da çekirdekte yerleşim gösterdiği izlenmiştir (Sha ve ark., 2018). Bu çalışma ile uyumlu olarak, bizim bulgularımızda da CFP1 proteininin oositlerde zayıf bir sitoplazmik yerleşim, çekirdekte ise yoğun bir ekspresyon gösterdiği belirlendi.

SETDB1, transkripsiyonu baskılayan H3K9 metilasyonunu katalizler ve fare oosit mayotik olgunlaşması için gerekli maternal bir faktördür (Kim ve ark., 2016). SETDB1, gelişmekte olan oositlerde yüksek düzeyde eksprese edilir ve mayotik ilerlemeyi inhibe eden bir fosfataz olan hücre bölünme döngüsü 14B (CDC14B) ekspresyonunu doğrudan baskılar (Kim ve ark., 2016). Bu çalışmada, SETDB1'in oosite özgü nakavtı, GV ve MI aşamasında mayotik tutulumlara neden olmuştur ve bu mayotik tutulumların CDC14B ekspresyonundaki artıştan kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, SETDB1 eksikliği olan oositlerde genel H3K9me2 seviyesi azalmış ve bu oositler artmış DNA hasarı, normal olmayan iğ iplikleri oluşumu ve yanlış kromozom hizalanması sergilemişlerdir. Benzer şekilde, SETDB1 eksikliğin, fare oositlerinde genel H3K9me2 seviyesinin azalmasına ve mayotik olgunlaşmanın bozulmasına neden olduğu da rapor edilmiştir (Eymery ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda, total alandaki SETDB1 protein seviyesi yaşlı grupta belirgin bir azalma gösterdi. Bu azalmanın, yaşlanmayla birlikte gelişen oositlerin mayotik

olgunlaşmasının bozulmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, sekonder, preantral, antral foliküller ile primordiyal ve primer foliküllerin oosit sitoplazmasında; sekonder foliküllerin oosit sitoplazması, granuloza ve teka hücrelerinde; preantral foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde; antral foliküllerin oosit sitoplazması ve granuloza hücrelerindeki SETDB1 protein seviyeleri yaşlı grupta önemli derecede azalma göstermiştir. Bu bulgular ve oosit ile granuloza hücreleri arasındaki yakın iletişim de göz önüne alındığında; oosit yaşlanmasının nedenlerinden birisinin, oosit ve diğer ovaryum hücrelerindeki SETDB1 seviyelerinin yaşlanmayla birlikte azalması olabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak, oosit olgunlaşması, folikül gelişimi ve erken embriyogeneizde önemli görevleri olan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA ve proteinlerinin farklı yaşlardaki postnatal fare ovaryumlarındaki uzamsal ve zamansal ekspresyon dağılımları ilk defa detaylı bir şekilde ortaya konulmuştur. Ovaryal yaşlanmada, bu genlerin ekspresyonel değişimlerinin (artış ve azalışlar) etkisi olabileceği düşünülmektedir. Bu ekspresyonel değişimlerin moleküler alt yapısının aydınlatılması, yaşlanma süreciyle birlikte gelişen fertilite kaybının önlenmesine ya da yavaşlatılmasına yönelik yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkılar sağlayabilecektir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, postnatal ovaryum dokularında oosit mayotik olgunlaşmasında kritik görevlere sahip histon KMT'lerden olan *Setd1b*, *Setd2*, *Cxxc1* ve *Setdb1* mRNA ve protein seviyeleri detaylı bir şekilde incelenerek; zamansal ve uzamsal ekspresyon dağılımları detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ve öneriler, maddeler halinde aşağıda sunulmuştur.

1. *Setd1b* gen ekspresyonu, genç gruptan ergin gruba doğru kademeli bir şekilde artarak, ergin grupta en yüksek seviyeye ulaştı ve yaşlı grupta belirgin bir azalma gösterdi.

2. SETD1B proteininin tüm gruplarda: gelişimin farklı aşamasındaki foliküllerin oositleri, granuloza ve teka hücrelerinde, ayrıca stromal ve luteal hücrelerde (granuloza lutein ve teka lutein) ağırlıklı olarak çekirdekte; zayıf bir şekilde de sitoplazmada yerleşim gösterdiği tespit edildi.

3. SETD1B proteini total alanda, genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalarak yaşlı grupta en düşük seviyeye ulaşmıştır. Primordiyal, primer, sekonder, preantral ve antral foliküller ile bu foliküllerin oositleri, granuloza ve teka hücrelerinde, ayrıca germinal epitel, stromal ve luteal hücrelerde (granuloza lutein ve teka lutein) SETD1B protein seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadı. Stromal alandaki SETD1B protein seviyesinin, genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı belirlendi. Bu proteininin, ovaryum hücrelerinde histon lizin metilasyonundaki görevinin tam olarak aydınlatılmasına ve olası diğer fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4. *Setd2* mRNA seviyesinin genç grupta en düşük, ergin grupta en yüksek; geç ergin ve yaşlı gruplarda ergin gruba kıyasla belirgin bir azalma gösterdiği ortaya konuldu.

5. SETD2 proteininin tüm gruplarda, gelişimin farklı aşamasındaki foliküllerin oositleri, granuloza ve teka hücrelerinde, ayrıca stromal ve luteal hücrelerde (granuloza lutein ve teka lutein) yoğun olarak sitoplazmik yerleşim gösterdiği tespit edildi.

6. SETD2 proteininin total alanda, ergin grupta en yüksek seviyede olduğu; yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azaldığı gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde SETD2

protein seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte; primordiyal foliküllerin granuloza hücrelerinde, genç, ergin ve yaşlı gruplara kıyasla geç ergin grupta belirgin bir azalma vardı. Benzer şekilde, primer foliküllerde SETD2 protein seviyeleri açısından belirgin bir fark bulunmamakla birlikte; bu foliküllerin granuloza hücrelerinde yaşlı grupta ergin ve geç ergin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküllerde ve bu foliküllerin oositleri, granuloza ve teka hücrelerinde anlamlı bir değişim bulunmamıştır. SETD2 proteini, ergin gruba ait preantral foliküllerde en yüksek seviyede iken, yaşlı grupta aynı folikül tipinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma göstermiştir; bu foliküllerin granuloza hücrelerinde ergin grupta, teka hücrelerinde ise geç ergin grupta önemli bir artış dikkati çekmiştir. Atretik foliküller ve granuloza hücrelerindeki SETD2 protein seviyesinin genç gruptan yaşlı gruba doğru belirgin bir şekilde arttığı tespit edildi.

7. SETD2 proteininin genç grup granuloza lutein hücrelerinde en düşük, yaşlı grupta en yüksek seviyede olduğu; geç ergin grup teka lutein hücrelerinde ise en yüksek seviyede olduğu belirlendi. SETD2 proteini tarafından gerçekleştirilen H3K36me3 işaretinin, postnatal gelişimin farklı yaşlarındaki ovaryum hücrelerinde tanımlanması: bu proteinin ilgili hücrelerdeki fonksiyonel önemini ortaya koyacağı düşüncesindeyiz.

8. CFP1 proteininin, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin tamamında (primordiyalden antral aşamaya kadar), korpus luteum ve korpus albicans yapılarında eksprese edildiği gözlemlendi. CFP1'in ovaryum hücrelerinde yoğun olarak çekirdekte yerleşim gösterdiği belirlendi.

9. CFP1 proteini total alanda, genç gruptan yaşlı gruba doğru kademeli bir şekilde azalarak yaşlı grupta en düşük seviyeye ulaşmıştır. Primer foliküller ve bu foliküllerin oosit çekirdeğindeki ve granuloza hücrelerindeki CFP1 seviyelerinin ergin gruptan yaşlı gruba doğru belirgin bir azalma gösterdiği tespit edildi. Sekonder foliküllerin granuloza ve teka hücrelerindeki CFP1 seviyeleri, genç grupta en yüksek düzeydedir. CFP1 proteininin histon lizin metilasyonunda DNA bağlanma domaini olarak işlev gördüğü göz önüne alındığında, bu proteinin ovaryum hücrelerinde etkileşimde olduğu proteinlerin tanımlanmasına yönelik yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Bu çalışmaların, CFP1'in bu hücrelerdeki fonksiyonunun ayrıntılı bir şekilde tanımlanmasına katkı sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

10. *Setdb1* ekspresyonunun, genç grupta en düşük seviyedeysen yaşı gruba doğru kademeli bir şekilde artarak yaşı grupta en yüksek seviyeye ulaştığı belirlendi.

11. SETDB1 proteininin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde (primordiyalden antral aşamaya kadar), korpus luteum ve korpus albicans yapılarında eksprese edildiği gözlemlendi. Bu proteinin, ovaryum hücrelerinde sitoplazma ve çekirdekte yerleşim gösterdiği ortaya konuldu.

12. SETDB1 proteini total alanda, genç gruptan yaşı gruba doğru azalma göstermiştir. Primordiyal foliküllerin oosit sitoplazmasındaki SETDB1 seviyesi, yaşı grupta belirgin bir düşüş göstermiştir. Benzer şekilde, primer foliküllerin oosit sitoplazmasındaki SETDB1 seviyeleri genç gruptan yaşı gruba doğru kademeli bir şekilde azalarak, yaşı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır. Sekonder foliküller ve bu foliküllerin oosit sitoplazması ile granuloza ve teka hücrelerindeki SETDB1 seviyeleri yaşı grupta belirgin bir azalma gösterdi. SETDB1 proteini, preantral foliküller ve bu foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde yaşı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gösterdi. Antral foliküller ile bu foliküllerin oosit sitoplazması ve granuloza hücrelerinde ise SETDB1 proteininin yaşı grupta belirgin bir azalma gösterdiği tespit edildi. SETDB1'in, postnatal ovaryum dokularındaki ekspresyon durumu bu çalışmayla ortaya konulmakla birlikte; bu proteinin hücre içi yerleşimi ve translasyonel kontrolünün hangi hücre içi yollarla gerçekleştirildiğini tanımlamaya yönelik yeni araştırmaların gerekli olduğu kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Adhikari, D., & Liu, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev.* 2009; 30 (5): 438-464.
- Allegucci, C., Thurston, A., Lucas, E., & Young, L. Epigenetics and the germline. *Reproduction.* 2005; 129 (2): 137-149.
- Araujo, V. R., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., & Gastal, E. L. In vitro culture of bovine preantral follicles: A review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014; 12: 78.
- Bachand, F. Protein arginine methyltransferases: From unicellular eukaryotes to humans. *Eukaryot Cell.* 2007; 6 (6): 889-898.
- Balint, B. L., Gabor, P., & Nagy, L. Genome-wide localization of histone 4 arginine 3 methylation in a differentiation primed myeloid leukemia cell line. *Immunobiology.* 2005; 210 (2-4): 141-152.
- Banerjee, S., Banerjee, S., Saraswat, G., Bandyopadhyay, S. A., & Kabir, S. N. Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary. *PLoS One.* 2014; 9 (5): e96210.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011; 21 (3): 381-395.
- Bar-Ziv, R., Voichkek, Y., & Barkai, N. J. G. r. Chromatin dynamics during DNA replication. *Genome Res.* 2016; 26 (9): 1245-1256.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., Zhao, K. J. C. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007; 129 (4): 823-837.
- Bedford, M. T., & Clarke, S. G. Protein arginine methylation in mammals: Who, what, and why. *Mol Cell.* 2009; 33 (1): 1-13.
- Bedford, M. T., & Richard, S. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell.* 2005; 18 (3): 263-272.
- Ben-Or, S. J. D. Morphological and functional development of the ovary of the mouse: I. Morphology and histochemistry of the developing ovary in normal conditions and after fsh treatment. *Development.* 1963; 11 (1): 1-11.
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. Histone lysine methylation dynamics: Establishment, regulation, and biological impact. *Mol Cell.* 2012; 48 (4): 491-507.
- Bledau, A. S., Schmidt, K., Neumann, K., Hill, U., Ciotta, G., Gupta, A., Anastassiadis, K. The h3k4 methyltransferase setd1a is first required at the epiblast stage, whereas setd1b becomes essential after gastrulation. *Development.* 2014; 141 (5): 1022-1035.

- Brici, D., Zhang, Q., Reinhardt, S., Dahl, A., Hartmann, H., Schmidt, K., Kranz, A. Setd1b, encoding a histone 3 lysine 4 methyltransferase, is a maternal effect gene required for the oogenic gene expression program. *Development*. 2017; 144 (14): 2606-2617.
- Bromfield, J., Messamore, W., & Albertini, D. F. Epigenetic regulation during mammalian oogenesis. *Reprod Fertil Dev*. 2008; 20 (1): 74-80.
- Brown, D. A., Di Cerbo, V., Feldmann, A., Ahn, J., Ito, S., Blackledge, N. P., Turberfield, A. H. J. C. r. The set1 complex selects actively transcribed target genes via multivalent interaction with cpG island chromatin. *Cell Rep*. 2017; 20 (10): 2313-2327.
- Carvalho, S., Raposo, A. C., Martins, F. B., Grosso, A. R., Sridhara, S. C., Rino, J., de Almeida, S. F. Histone methyltransferase setd2 coordinates fact recruitment with nucleosome dynamics during transcription. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41 (5): 2881-2893.
- Chen, L., Li, Z., Zwolinska, A. K., Smith, M. A., Cross, B., Koomen, J., Wright, K. L. J. T. E. j. Mdm2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output. *EMBO J*. 2010; 29 (15): 2538-2552.
- Collins, R. E., Northrop, J. P., Horton, J. R., Lee, D. Y., Zhang, X., Stallcup, M. R., The ankyrin repeats of g9a and glp histone methyltransferases are mono-and dimethyllysine binding modules. *Nature*. 2008; 15 (3): 245.
- Cui, J. Y., Fu, Z. D., & Dempsey, J. (2019). The role of histone methylation and methyltransferases in gene regulation. In *Toxicoepigenetics* (pp. 31-84): Elsevier.
- de Bruin, J. P., Dorland, M., Spek, E. R., Posthuma, G., van Haaften, M., Looman, C. W. N., & te Velde, E. R. Age-related changes in the ultrastructure of the resting follicle pool in human ovaries1. *Biology of Reproduction*. 2004; 70 (2): 419-424.
- Demers, C., Chaturvedi, C.-P., Ranish, J. A., Juban, G., Lai, P., Morle, F., Brand, M. J. M. c. Activator-mediated recruitment of the mll2 methyltransferase complex to the β -globin locus. *Molecular Cell*. 2007; 27 (4): 573-584.
- DesJarlais, R., & Tummino, P. J. J. B. Role of histone-modifying enzymes and their complexes in regulation of chromatin biology. *Biochemistry*. 2016; 55 (11): 1584-1599.
- Dhar, S. S., Lee, S.-H., Kan, P.-Y., Voigt, P., Ma, L., Shi, X. Trans-tail regulation of mll4-catalyzed h3k4 methylation by h4r3 symmetric dimethylation is mediated by a tandem phd of mll4. *Genes Dev*. 2012; 26 (24): 2749-2762.
- Di Lorenzo, A., & Bedford, M. T. J. F. I. Histone arginine methylation. *FEBS Lett*. 2011; 585 (13): 2024-2031.

- Diao, Y. F., Lin, T., Li, X., Oqani, R. K., Lee, J. E., Kim, S. Y., & Jin, D. I. Dynamic changes of setd2, a histone h3k36 methyltransferase, in porcine oocytes, ivf and scnt embryos. *PLoS One*. 2018; 13 (2): e0191816.
- Dillon, S. C., Zhang, X., Trievel, R. C., & Cheng, X. The set-domain protein superfamily: Protein lysine methyltransferases. *Genome Biol*. 2005; 6 (8): 227.
- Dou, Y., Milne, T. A., Ruthenburg, A. J., Lee, S., Lee, J. W., Verdine, G. L., Roeder, R. G. Regulation of mll1 h3k4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*. 2006; 13 (8): 713-719.
- Edmunds, J. W., Mahadevan, L. C., & Clayton, A. L. Dynamic histone h3 methylation during gene induction: Hyph/setd2 mediates all h3k36 trimethylation. *EMBO J*. 2008; 27 (2): 406-420.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev*. 2009; 30 (6): 624-712.
- Eissenberg, J. C., & Shilatifard, A. Histone h3 lysine 4 (h3k4) methylation in development and differentiation. *Dev Biol*. 2010; 339 (2): 240-249.
- Eom, G. H., Kim, K.-B., Kim, J. H., Kim, J.-Y., Kim, J.-R., Kee, H. J., Son, H.-J. J. J. o. B. C. Histone methyltransferase setd3 regulates muscle differentiation. *J Biol Chem*. 2011; 286 (40): 34733-34742.
- Eymery, A., Liu, Z., Ozonov, E. A., Stadler, M. B., & Peters, A. H. The methyltransferase setdb1 is essential for meiosis and mitosis in mouse oocytes and early embryos. *Development*. 2016; 143 (15): 2767-2779.
- Falandry, C., Fourel, G., Galy, V., Ristriani, T., Horard, B., Bensimon, E., Magdinier, F. J. J. o. B. C. Clld8/kmt1f is a lysine methyltransferase that is important for chromosome segregation. *J Biol Chem*. 2010; 285 (26): 20234-20241.
- Fan, H.-Y., & Sun, Q.-Y. (2019). Oocyte meiotic maturation. In *The ovary* (Thirth ed., pp. 182).
- Feng, Q., Wang, H., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., & Zhang, Y. Methylation of h3-lysine 79 is mediated by a new family of hmtases without a set domain. *Curr Biol*. 2002; 12 (12): 1052-1058.
- Fischle, W., Franz, H., Jacobs, S. A., Allis, C. D., & Khorasanizadeh, S. Specificity of the chromodomain y chromosome family of chromodomains for lysine-methylated ark(s/t) motifs. *J Biol Chem*. 2008; 283 (28): 19626-19635.
- Frontelo, P., Leader, J. E., Yoo, N., Potocki, A. C., Crawford, M., Kulik, M., & Lechleider, R. J. J. O. Suv39h histone methyltransferases interact with smads and cooperate in bmp-induced repression. *Oncogene*. 2004; 23 (30): 5242-5251.
- Ge, Z. J., Schatten, H., Zhang, C. L., & Sun, Q. Y. Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*. 2015; 149 (3): R103-114.

- Gershey, E. L., Haslett, G. W., Vidali, G., & Allfrey, V. G. Chemical studies of histone methylation. Evidence for the occurrence of 3-methylhistidine in avian erythrocyte histone fractions. *J Biol Chem.* 1969; 244 (18): 4871-4877.
- Gong, F., & Miller, K. M. Histone methylation and the DNA damage response. *Mutat Res.* 2019; 780: 37-47.
- Greer, E. L., & Shi, Y. J. N. R. G. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Review Genetics.* 2012; 13 (5): 343-357.
- Gregory, G. D., Vakoc, C. R., Rozovskaia, T., Zheng, X., Patel, S., Nakamura, T. Mammalian ash1l is a histone methyltransferase that occupies the transcribed region of active genes. *Mol Cell Biol.* 2007; 27 (24): 8466-8479.
- Gu, L., Wang, Q., & Sun, Q. Y. Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle.* 2010; 9 (10): 1942-1950.
- Guccione, E., Bassi, C., Casadio, F., Martinato, F., Cesaroni, M., Schuchlantz, H., Amati, B. Methylation of histone h3r2 by prmt6 and h3k4 by an mll complex are mutually exclusive. *Nature.* 2007; 449 (7164): 933-937.
- Hacker, K. E., Fahey, C. C., Shinsky, S. A., Chiang, Y. J., DiFiore, J. V., Jha, D. K., Rathmell, W. K. Structure/function analysis of recurrent mutations in setd2 protein reveals a critical and conserved role for a set domain residue in maintaining protein stability and histone h3 lys-36 trimethylation. *J Biol Chem.* 2016; 291 (40): 21283-21295.
- Hall, J. E., Welt, C. K., & Cramer, D. W. Inhibin a and inhibin b reflect ovarian function in assisted reproduction but are less useful at predicting outcome. *Hum Reprod.* 1999; 14 (2): 409-415.
- Hanna, C. W., Huang, J., Belton, C., Reinhardt, S., Dahl, A., Andrews, S., Kelsey, G. J. b. Loss of setd1b results in the redistribution of genomic h3k4me3 in the oocyte. *BioRxiv.* 2021.
- Harte, P. J., Wu, W., Carrasquillo, M. M., & Matera, A. G. Assignment of a novel bifurcated set domain gene, setdb1, to human chromosome band 1q21 by in situ hybridization and radiation hybrids. *Cytogenet Cell Genet.* 1999; 84 (1-2): 83-86.
- Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Irving-Rodgers, H. F., Harland, M. L., Morris, S. E., & Rodgers, R. J. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. *BMC Genomics.* 2014; 15: 40.
- Horton, J. R., Gale, M., Yan, Q., & Cheng, X. (2017). The molecular basis of histone demethylation. In *DNA and histone methylation as cancer targets* (pp. 151-219): Springer.
- Huertas, D., Sendra, R., & Munoz, P. Chromatin dynamics coupled to DNA repair. *Epigenetics.* 2009; 4 (1): 31-42.

- Husmann, D., & Gozani, O. Histone lysine methyltransferases in biology and disease. *Nat Struct Mol Biol.* 2019; 26 (10): 880-889.
- Hyun, K., Jeon, J., Park, K., & Kim, J. Writing, erasing and reading histone lysine methylations. *Exp Mol Med.* 2017; 49 (4): e324.
- Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., & Nakao, M. J. J. o. B. C. Transcriptional repression and heterochromatin formation by mbd1 and mcaf/am family proteins. *J Biol Chem.* 2005; 280 (14): 13928-13935.
- Kageyama, S.-i., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., & Aoki, F. J. R. Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction.* 2007; 133 (1): 85-94.
- Kim, J., Zhao, H., Dan, J., Kim, S., Hardikar, S., Hollowell, D., Chen, T. Maternal setdb1 is required for meiotic progression and preimplantation development in mouse. *PLoS Genet.* 2016; 12 (4): e1005970.
- Kirmizis, A., Santos-Rosa, H., Penkett, C. J., Singer, M. A., Vermeulen, M., Mann, M., Kouzarides, T. Arginine methylation at histone h3r2 controls deposition of h3k4 trimethylation. *Nature.* 2007; 449 (7164): 928-932.
- Klein, C. E. (2003). The hypothalamic-pituitary-gonadal axis. In *Holland-frei cancer medicine* (6th edition ed.).
- Kota, S. K., & Feil, R. Epigenetic transitions in germ cell development and meiosis. *Dev Cell.* 2010; 19 (5): 675-686.
- Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell.* 2007; 128 (4): 693-705.
- Lee, J.-H., & Skalnik, D. G. J. J. o. B. C. Cpg-binding protein (cxxc finger protein 1) is a component of the mammalian set1 histone h3-lys4 methyltransferase complex, the analogue of the yeast set1/compass complex. *J Biol Chem.* 2005; 280 (50): 41725-41731.
- Lee, J.-H., Tate, C. M., You, J.-S., & Skalnik, D. G. J. J. o. B. C. Identification and characterization of the human set1b histone h3-lys4 methyltransferase complex. *J Biol Chem.* 2007; 282 (18): 13419-13428.
- Li, C., Diao, F., Qiu, D., Jiang, M., Li, X., Han, L., Wang, Q. Histone methyltransferase setd2 is required for meiotic maturation in mouse oocyte. *J Cell Physiol.* 2018; 234 (1): 661-668.
- Li, Q., Geng, X., Zheng, W., Tang, J., Xu, B., & Shi, Q. Current understanding of ovarian aging. *Sci China Life Sci.* 2012; 55 (8): 659-669.
- Li, X., Hu, X., Patel, B., Zhou, Z., Liang, S., Ybarra, R., Huang, S. J. B., The Journal of the American Society of Hematology. H4r3 methylation facilitates β -globin transcription by regulating histone acetyltransferase binding and h3 acetylation. *Blood.* 2010; 115 (10): 2028-2037.

- Lim, J., & Luderer, U. Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biol Reprod.* 2011; 84 (4): 775-782.
- Litt, M., Qiu, Y., & Huang, S. Histone arginine methylations: Their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep.* 2009; 29 (2): 131-141.
- Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. J. C. On the dependency of cellular protein levels on mrna abundance. *Cell.* 2016; 165 (3): 535-550.
- Luco, R. F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B. J., Pereira-Smith, O. M., & Misteli, T. Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science.* 2010; 327 (5968): 996-1000.
- Maier, T., Güell, M., & Serrano, L. J. F. I. Correlation of mrna and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 2009; 583 (24): 3966-3973.
- Makela, J. A., Koskeniemi, J. J., Virtanen, H. E., & Toppari, J. Testis development. *Endocr Rev.* 2019; 40 (4): 857-905.
- Manosalva, I., & Gonzalez, A. Aging changes the chromatin configuration and histone methylation of mouse oocytes at germinal vesicle stage. *Theriogenology.* 2010; 74 (9): 1539-1547.
- Margueron, R., Li, G., Sarma, K., Blais, A., Zavadil, J., Woodcock, C. L., Reinberg, D. J. M. c. Ezh1 and ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 2008; 32 (4): 503-518.
- Martin, C., & Zhang, Y. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6 (11): 838-849.
- 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; 15 (5): 573-585.
- Migliori, V., Muller, J., Phalke, S., Low, D., Bezzi, M., Mok, W. C., Guccione, E. Symmetric dimethylation of h3r2 is a newly identified histone mark that supports euchromatin maintenance. *Nat Struct Mol Biol.* 2012; 19 (2): 136-144.
- Miller, T., Krogan, N. J., Dover, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Johnston, M., Shilatifard, A. Compass: A complex of proteins associated with a trithorax-related set domain protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98 (23): 12902-12907.
- Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., & Hess, J. L. Mll targets set domain methyltransferase activity to hox gene promoters. *Mol Cell.* 2002; 10 (5): 1107-1117.
- Moore, K.-L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M.-G. (2016). In *The developing human: Clinically oriented embryology* (Tenth ed., pp. 17, 21, 260, 261, 262, 263).

- Mosammaparast, N., & Shi, Y. Reversal of histone methylation: Biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annu Rev Biochem.* 2010; 79: 155-179.
- Murray, K. The occurrence of epsilon-n-methyl lysine in histones. *Biochemistry.* 1964; 3: 10-15.
- Nahum, R., Thong, K. J., & Hillier, S. G. Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum Reprod.* 1995; 10 (1): 75-81.
- Oh, S., Jeong, K., Kim, H., Kwon, C. S., & Lee, D. A lysine-rich region in dot1p is crucial for direct interaction with h2b ubiquitylation and high level methylation of h3k79. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 399 (4): 512-517.
- 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; 82 (11): 3748-3751.
- Oktay, K., Newton, H., Mullan, J., & Gosden, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in scid/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1998; 13 (5): 1133-1138.
- Ozturk, S., Sozen, B., & Demir, N. Epab and pabpc1 are differentially expressed in the postnatal mouse ovaries. *J Assist Reprod Genet.* 2015; 32 (1): 137-146.
- Pan, Z., Zhang, J., Li, Q., Li, Y., Shi, F., Xie, Z., & Liu, H. Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *J Genet Genomics.* 2012; 39 (3): 111-123.
- Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Jenuwein, T. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell.* 2003; 12 (6): 1577-1589.
- Peters, A. H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Jenuwein, T. Loss of the suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell.* 2001; 107 (3): 323-337.
- Pinkerton, J. H., McKaY, D. G., Adams, E. C., Hertig, A. T. J. O., & Gynecology. Development of the human ovary—a study using histochemical technics. 1961; 18 (2): 152-181.
- Qiao, Q., Li, Y., Chen, Z., Wang, M., Reinberg, D., & Xu, R. M. The structure of nsd1 reveals an autoregulatory mechanism underlying histone h3k36 methylation. *J Biol Chem.* 2011; 286 (10): 8361-8368.
- Rahman, S., Sowa, M. E., Ottinger, M., Smith, J. A., Shi, Y., Harper, J. W., & Howley, P. M. The brd4 extraterminal domain confers transcription activation independent of ptefb by recruiting multiple proteins, including nsd3. *Mol Cell Biol.* 2011; 31 (13): 2641-2652.

- Rambags, B. P., van Boxtel, D. C., Tharasanit, T., Lenstra, J. A., Colenbrander, B., & Stout, T. A. Advancing maternal age predisposes to mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. *Theriogenology*. 2014; 81 (7): 959-965.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Jenuwein, T. Regulation of chromatin structure by site-specific histone h3 methyltransferases. *Nature*. 2000; 406 (6796): 593-599.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. *Histology with correlated cell and molecular biology* (Sixth ed.); 2017, p: 832, 833.
- Sadler, T. W. *Langman's medical embryology*; 2017, p: 337-345.
- Scheer, S., & Zaph, C. The lysine methyltransferase g9a in immune cell differentiation and function. *Front Immunol*. 2017; 8: 429.
- Scheffer, G. J., Broekmans, F. J., Dorland, M., Habbema, J. D., Looman, C. W., & te Velde, E. R. Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*. 1999; 72 (5): 845-851.
- Schneider, J., Wood, A., Lee, J. S., Schuster, R., Dueker, J., Maguire, C., Shilatifard, A. Molecular regulation of histone h3 trimethylation by compass and the regulation of gene expression. *Mol Cell*. 2005; 19 (6): 849-856.
- Schreiber, S. L., & Bernstein, B. E. Signaling network model of chromatin. *Cell*. 2002; 111 (6): 771-778.
- Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., & Rauscher, F. J., 3rd. Setdb1: A novel kap-1-associated histone h3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to hp1-mediated silencing of euchromatic genes by krab zinc-finger proteins. *Genes Dev*. 2002; 16 (8): 919-932.
- Senapati, S. Infertility: A marker of future health risk in women? *Fertil Steril*. 2018; 110 (5): 783-789.
- Seneda, M. M., Godmann, M., Murphy, B. D., Kimmins, S., & Bordinon, V. Developmental regulation of histone h3 methylation at lysine 4 in the porcine ovary. *Reproduction*. 2008; 135 (6): 829-838.
- Sha, Q. Q., Dai, X. X., Jiang, J. C., Yu, C., Jiang, Y., Liu, J., Fan, H. Y. Cfp1 coordinates histone h3 lysine-4 trimethylation and meiotic cell cycle progression in mouse oocytes. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 3477.
- Sha, Q. Q., Zhang, J., & Fan, H. Y. Function and regulation of histone h3 lysine-4 methylation during oocyte meiosis and maternal-to-zygotic transition. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 597498.
- Shao, G. B., Wang, J., Zhang, L. P., Wu, C. Y., Jin, J., Sang, J. R., Peng, W. X. Aging alters histone h3 lysine 4 methylation in mouse germinal vesicle stage oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2015; 27 (2): 419-426.

- Shinsky, S. A., Monteith, K. E., Viggiano, S., & Cosgrove, M. S. Biochemical reconstitution and phylogenetic comparison of human set1 family core complexes involved in histone methylation. *J Biol Chem.* 2015; 290 (10): 6361-6375.
- Shirasuna, K., & Iwata, H. Effect of aging on the female reproductive function. *Contracept Reprod Med.* 2017; 2: 23.
- Simsek-Duran, F., Li, F., Ford, W., Swanson, R. J., Jones, H. W., Jr., & Castora, F. J. Age-associated metabolic and morphologic changes in mitochondria of individual mouse and hamster oocytes. *PLoS One.* 2013; 8 (5): e64955.
- Skalnik, D. G. The epigenetic regulator cfp1. *Biomol Concepts.* 2010; 1 (5-6): 325-334.
- Soules, M. R., Sherman, S., Parrott, E., Rebar, R., Santoro, N., Utian, W., & Woods, N. Executive summary: Stages of reproductive aging workshop (straw). *Fertil Steril.* 2001; 76 (5): 874-878.
- Southall, S. M., Wong, P. S., Odho, Z., Roe, S. M., & Wilson, J. R. Structural basis for the requirement of additional factors for mll1 set domain activity and recognition of epigenetic marks. *Mol Cell.* 2009; 33 (2): 181-191.
- Stegeman, R., & Weake, V. M. Transcriptional signatures of aging. *J Mol Biol.* 2017; 429 (16): 2427-2437.
- Stillman, B. Histone modifications: Insights into their influence on gene expression. *Cell.* 2018; 175 (1): 6-9.
- Sullivan, M. W., Stewart-Akers, A., Krasnow, J. S., Berga, S. L., & Zeleznik, A. J. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (lh): A role for lh in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84 (1): 228-232.
- Sun, X. J., Wei, J., Wu, X. Y., Hu, M., Wang, L., Wang, H. H., Chen, Z. Identification and characterization of a novel human histone h3 lysine 36-specific methyltransferase. *J Biol Chem.* 2005; 280 (42): 35261-35271.
- Szekvolgyi, L., Ohta, K., & Nicolas, A. Initiation of meiotic homologous recombination: Flexibility, impact of histone modifications, and chromatin remodeling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015; 7 (5).
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Shinkai, Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone h3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev.* 2002; 16 (14): 1779-1791.
- Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., & Zhang, J. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15 (1): 1-9.

- Tatone, C., Amicarelli, F., Carbone, M. C., Monteleone, P., Caserta, D., Marci, R., Focarelli, R. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*. 2008; 14 (2): 131-142.
- te Velde, E. R., & Pearson, P. L. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*. 2002; 8 (2): 141-154.
- Treloar, A. E., Boynton, R. E., Behn, B. G., & Brown, B. W. Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil*. 1967; 12 (1 Pt 2): 77-126.
- Urzua, U., Chacon, C., Norambuena, M., Lizama, L., Sarmiento, S., Asaki, E., Ampuero, S. The ovarian transcriptome of reproductively aged multiparous mice: Candidate genes for ovarian cancer protection. *Biomolecules*. 2020; 10 (1).
- van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., Scheffer, G. J., Looman, C. W., Habbema, J. D., de Jong, F. H., te Velde, E. R. Serum antimullerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: A longitudinal study. *Fertil Steril*. 2005; 83 (4): 979-987.
- Waddington, C. H. J. E. The epigenotype. 1942; 1: 18-20.
- Wagner, E. J., & Carpenter, P. B. Understanding the language of lys36 methylation at histone h3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13 (2): 115-126.
- Wang, T., Xu, C., Liu, Y., Fan, K., Li, Z., Sun, X., Tu, X. Crystal structure of the human suv39h1 chromodomain and its recognition of histone h3k9me2/3. *PLoS One*. 2012; 7 (12): e52977.
- Webster, A., & Schuh, M. Mechanisms of aneuploidy in human eggs. *Trends Cell Biol*. 2017; 27 (1): 55-68.
- Wilkinson, A. W., Diep, J., Dai, S., Liu, S., Ooi, Y. S., Song, D., Gozani, O. Setd3 is an actin histidine methyltransferase that prevents primary dystocia. *Nature*. 2019; 565 (7739): 372-376.
- Williams, C. J., & Erickson, G. F. Morphology and physiology of the ovary. *Europe PMC*. 2015.
- Wu, H., Chen, X., Xiong, J., Li, Y., Li, H., Ding, X., Zhu, B. Histone methyltransferase g9a contributes to h3k27 methylation in vivo. *Cell Res*. 2011; 21 (2): 365-367.
- Xu, Q., Xiang, Y., Wang, Q., Wang, L., Brind'Amour, J., Bogutz, A. B., Xie, W. Setd2 regulates the maternal epigenome, genomic imprinting and embryonic development. *Nat Genet*. 2019; 51 (5): 844-856.
- Yang, Y., & Bedford, M. T. Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13 (1): 37-50.

Yu, C., Fan, X., Sha, Q. Q., Wang, H. H., Li, B. T., Dai, X. X., Fan, H. Y. Cfp1 regulates histone h3k4 trimethylation and developmental potential in mouse oocytes. *Cell Rep.* 2017; 20 (5): 1161-1172.



ÖZGEÇMİŞ

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antakya Atatürk Lisesi	2013
Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik	2018
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2021

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	77.50

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Fare oosit ve erken dönem embriyolarda Epab proteininin ilişkili olduğu translasyonel mekanizmaların ve fosforilasyon durumunun belirlenmesi	TÜBİTAK-1001	2018-Devam Ediyor