

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**FARE PREİMLANTİF EMBRİYO GELİŞİM SÜRECİNDE
FOXO1, FOXO3 VE FOXO4 EKSPRESYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nilay KUŞCU

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2014

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**FARE PREİMLANTİF EMBRİYO GELİŞİM SÜRECİNDE
FOXO1, FOXO3 VE FOXO4 EKSPRESYONLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nilay KUŞCU

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Tarafından
Desteklenmiştir. (Proje No: 2012.02.0122.008)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2014

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 02 Ocak 2014

Tez Danışmanı

: Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye

: Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye

: Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye

: Prof. Dr. Münire ERMAN AKAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

Üye

: Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2014 tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Embriyo fallop tüplerinden uterusu doğru yol alırken implantasyona hazırlanır ve endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç preimplantasyon dönem embriyo gelişimi olarak tanımlanır. Preimplantif dönemdeki embriyo, yarıklanma bölünmelerine başladığında; fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyo oluşur. Preimplantif embriyo gelişim süreci, maternal çevrede bulunan büyüme faktörleri tarafından üretilen sinyallere bağlı olarak pek çok farklı hücreyel olay tarafından etkilenmektedir. PI3K/Akt sinyal yolağı, büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağından birisidir. FoxO transkripsiyon faktörleri, nükleusta görev yaparlar ve aktiviteleri PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenir. Memelilerde, FoxO1, FoxO3a, FoxO4 ve FoxO6 olmak üzere dört adet FoxO ailesi üyesi tanımlanmıştır. FoxO'lar; glikoz metabolizması, enerji homeostazı, hücreyel farklılaşma, oksidatif strese karşı dayanıklılık, hücre siklusunun duraklaması, DNA tamiri ve apoptozun düzenlenmesi, gibi süreçlerde önemli roller oynarlar. Büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada lokalize olan FoxO'lar, oksidatif stres ya da genotoksik stres gibi koşullarda nükleusa göç ederler ve hedef genlerin transkripsiyonunu sağlarlar. FoxO moleküllerinin dişi ve erkek üreme sisteminde ve fertilitenin korunup devamlılığının sağlanmasındaki önemli rolleri ve FoxO transkripsiyon faktörlerini düzenleyen PI3K/Akt sinyal yolağının, oosit matürasyonunda ve preimplantif embriyo gelişim sürecinde varlığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Tüm bu bilgiler, bir yandan çoğalırken diğeryandan farklılaşan ve mikroçevresi sürekli değişirken ortama adapte olmaya çalışan preimplantif gelişim sürecindeki embriyoda, FoxO transkripsiyon faktörlerinin de ekspre olabileceği sorusunu akla getirmektedir. Bu çalışmanın amacı, preimplantasyon embriyo gelişim sürecinde FoxO transkripsiyon faktörlerinin ekspre olup olmadığının, eğer oluyor ise hücredeki lokalizasyonlarının belirlenmesidir. Çalışmamızda 5-6 haftalık Balb/C ırkı dişi fareler kullanılarak hormonal indüksiyon (PMSG ve hCG) ile; profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositler ve erişkin Balb/C ırkı erkek fareler ile çiftleşme sonucunda elde edilen fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolar fallop tüpleri ve uteruslarından toplanmıştır. İmmünfloresan yöntemi kullanılarak; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları ve lokalizasyonları ortaya konmuştur. Çalışmamız; profaz I, metafaz I ve metafaz II oositlerinde ve fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda, FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin farklı düzeylerde ekspre edildiğini gösteren literatürdeki ilk çalışmadır. Sonuçlarımız, *in vivo* embriyo gelişimi sürecinde sitoplazmada ekspre olduğu belirlenen FoxO transkripsiyon faktörlerinin özellikle *in vitro* embriyo gelişimi sırasında veya stres koşullarında (pH, oksijen düzeyi, ısı değişimleri gibi) ekspresyonlarının ne şekilde olabileceği ile ilgili yapılabilecek çalışmalar için temel oluşturmuştur. Özellikle yardımcı üreme tekniklerinde embriyo gelişim süreçlerinde FoxO transkripsiyon faktörlerinin araştırılması ile ilgili ileri çalışmalar laboratuvarımızda devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fare, Oosit, Preimplantif embriyo gelişimi, FoxO,

İmmünfloresan.

ABSTRACT

After fertilization, while passing through the fallopian tubes to enter the uterus, embryo gets prepared for implantation. The period between fertilization and implantation is defined as preimplantation embryo development. Fertilized oocyte starts to cleave and develops into 2 cell, 4 cell, 8 cell embryo, morula, and blastocyst. Preimplantation embryo developmental period is affected by various cellular events that depend on signals generated by growth factors present in the maternal environment. The PI3K/Akt pathway is one of these pathways that support growth and development. FoxO transcription factors are members of a subgroup of Forkhead family which are characterized by a conserved DNA-binding domain and function in the nucleus. Their activities are regulated by PI3K/Akt signalling pathway. In mammals, there are four FoxO genes, FoxO1, 3, 4, and 6. FoxO transcription factors are at the interface of crucial cellular processes, orchestrating programs of gene expression that regulate apoptosis, cell-cycle arrest, and oxidative stress resistance, DNA repair, glucose metabolism, energy homeostasis and differentiation. In the presence of growth factors, FoxO transcription factors are localized in the cytoplasm. Under stress conditions such as oxidative stress and genotoxic stress, FoxO transcription factors move to the nucleus and trigger transcriptional activities of their target genes. Studies have shown that FoxO molecules play important roles and protect fertility in male and female reproduction. Additionally, it has been shown that the PI3K/Akt signaling pathway, the main regulator of FoxOs', is present both in the oocyte and in the preimplantation embryo. Thus, the aim of the present study is to investigate whether FoxO transcription factors are present during oocyte maturation and preimplantation embryo development. Female Balb/C mice were superovulated with PMSG and hCG and then prophase I, metaphase I, metaphase II oocytes, fertilized oocyte, 2 cell embryo, 4 cell embryo, 8 cell embryo, morula and blastocyst were collected from their fallopian tubes and uterus. Presence and localizations of FoxO1, FoxO3 and FoxO4 proteins have been determined with immunofluorescence staining. Our results have confirmed that FoxO1, FoxO3 and FoxO4 proteins are differentially expressed in prophase I, metaphase I, metaphase II oocytes and in fertilized oocyte, 2 cell embryo, 4 cell embryo, 8 cell embryo, morula and blastocyst. Our findings are the first results in the literature showing that FoxO transcription factors are present during both oocyte and embryo *in vivo* maturation. These findings may provide basic information for planning future studies which investigate whether these factors are affected or not when the embryo faces stress conditions (such as pH, oxygen level or temperature changes) during *in vitro* maturation, especially in the IVF laboratories. Based on the findings of the present study, new studies are in progress in our laboratory.

Keywords: Mouse, Oocyte, Preimplantation embryo development, FoxO, Immunofluorescence.

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin ilk aşaması olan yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tez projemin planlanması, projelendirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi aşamalarında önemli katkılarda bulunan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalışanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan anneme, babama ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü ve Oogonyumlara Farklanması	3
2.2. Folikülogenez	3
2.3. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci	4
2.3.1. Fertilizasyon	4
2.3.2. Preimplantif Embriyo Gelişim Süreci	6
2.3.3. Yarıklanma Evreleri	6
2.3.4. Embriyonik Genom Aktivasyonu (EGA)	8
2.3.5. Kompaksiyon	9
2.3.6. Kavitasyon	10
2.3.7. Blastosist Oluşumu	10
2.4. Preimplantif Embriyo Gelişim Sürecinde Büyüme Faktörlerinin Etkisi	11
2.4.1. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ Protein Kinaz B (PKB/ Akt) Yolağı	11
2.5. FoxO Transkripsiyon Faktörleri	12

2.5.1.	FoxO Ailesi Üyeleri	13
2.5.2.	FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkisi	13
2.5.3	FoxO Moleküllerini Kontrol Eden Mekanizmalar	14
2.5.3.1.	Fosforilasyon mekanizması	14
2.5.3.2.	Asetilasyon mekanizması	15
2.5.3.3.	Übikütilasyon mekanizması	16
2.5.4.	FoxO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Roller	17
2.5.5.	FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve Stres Arasındaki İlişki	18
2.5.6.	FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Üreme Sistemindeki Rolleri	21
2.6.	Çalışmanın Hipotezi	22
GEREÇ VE YÖNTEM		23
3.1.	Süperovulasyon Protokolü	23
3.1.1.	Gonadotropinlerin Hazırlanışı	23
3.1.2.	Gonadotropinlerin Uygulanması	23
3.2.	Oositlerin Toplanması	23
3.3.	Embriyoların Toplanması	24
3.4.	İmmünfloresan Boyama	26
3.4.1.	Kullanılan Solüsyonlar	26
3.4.2.	Oositlerde ve Preimplantif Dönem Embriyolarda FoxO Proteinlerinin Gösterilmesi	27
3.4.3.	İmmünfloresan Boyama Yöntem Basamakları	27
BULGULAR		29
4.1.	İmmünfloresan Bulguları	29
4.1.1.	Oositlerde FoxO1, FoxO3, FoxO4 Proteinlerinin Ekspresyonları	29

4.1.2.	Preimplantif Dönem Embriyolarda FoxO1, FoxO3, FoxO4 Proteinlerinin Ekspresyonları	33
TARTIŞMA		42
SONUÇLAR		45
KAYNAKLAR		46
ÖZGEÇMİŞ		54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Akt	:	Protein Kinaz B (Pkb)
BTG1	:	B Hücresi Translokasyon Gen 1
CBP	:	CREB- Bağlayıcı Protein
CK1	:	Kazein Kinaz 1
DAPI	:	4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
DDB1	:	Hasar Spesifik DNA Bağlayıcı Protein1
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
DYRK	:	Çift özgün tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz
EGA	:	Embriyonik Genom Aktivasyonu
E-kaderin	:	Epitelyal Kaderin
FAT	:	Transkripsiyon Faktör Asetil Transferaz
FH	:	Forkhead Domain
FOX	:	Fork Head Box
GADD45	:	DNA Hasarı İle İndüklenebilen Protein 45
G6Paz	:	Glikoz 6 Fofataz
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
HAUSP/USP7:		Übikütin Spesifik Proteaz Deübikütilasyon Enzimi
HAT	:	Histon Asetil Transferaz
hCG	:	İnsan Koryonik Gonadotropini
IGF-1	:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
IKK	:	I Kappa B Kinaz B
IRS	:	İnsülin Reseptör Substrat Proteini
I.U.	:	International Unit
JNK	:	Jun N-Terminal Kinaz
LH	:	Luteinizan Hormon
MGA	:	Mid-Preimplantasyon Gen Aktivasyonu
MnSOD	:	Manganez Süperoksit Dismutaz
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
NAD	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
Na, K-ATPaz:		Sodyum-Potasyum ATPaz
NES	:	Nüklear Eksport Sekansı
NLS	:	Nüklear Lokalizasyon Sinyalleri
OMI	:	Oosit Olgunlaşma İnhibitörü
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PCAF	:	CBP ilişkili Faktör
PDK1	:	3-Fosfoinositide Bağımlı Protein Kinaz 1
PEPCK	:	Fosfofenolpüriyat Karboksikinaz
PFA	:	Paraformaldehit

PGC-1	:	Proliferatif Aktive Edilmiş Reseptör- Γ Koaktivatör 1
PGH	:	Primordiyal Germ Hücreleri
PIP2	:	Fosfatidilinositol (3,4)-Bisfosfat
PI3K	:	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PIP3	:	Fosfatidilinositol (3,4,5)-Trisfosfata
Pml	:	Promiyelositik Lösemi Protein
PMSG	:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
ROS	:	Reaktif Oksijen Türleri
RTK	:	Reseptör Tirozin Kinazlar
SCF	:	Skp1/Cul1/F-box
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
SGK	:	Serum ve Glukokortikoid İndüklenebilir Kinaz
Ser	:	Serin
SİRT1	:	Sirtuin1 (Silent Mating Type Information Regulation 2 Homolog)
Thr	:	Treonin
ZGA	:	Zigotik Gen Aktivasyonu
ZO-1	:	Zonula Okludens -1
ZP	:	Zona Pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü	3
2.2.	Fertilizasyonu gösteren şekil	5
2.3.	Fare preimplantif embriyo gelişim süreci	6
2.4.	Zigotun yarıklanmasını ve blastosist oluşumunu gösteren çizim	7
2.5.	Fare preimplantasyon gelişiminde embriyonik genom aktivasyonunu gösteren çizim	8
2.6.	Kompaksiyon SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri	9
2.7.	Kompaksiyon ve farklanma sürecini gösteren çizim	9
2.8.	Trofektoderm hücrelerindeki su ve iyon transportu	10
2.9.	Blastosist aşamasındaki embriyo	11
2.10.	PI3K tarafından reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılı Akt aktivasyonu	12
2.11.	İnsülin/ Büyüme Faktörleri tarafından FoxO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini gösteren çizim	14
2.12.	FoxO ailesi üyelerinin asetilasyon ve fosforilasyon alanlarının gösterildiği çizim	15
2.13.	İnsülin/büyüme faktörleri olmadığında nükleusta bulunan FoxO ve düzenlediği hücrel olayları gösteren çizim	18
2.14.	Büyüme faktörleri ve stres uyarımı tarafından FoxO düzenlenmesi	19
2.15.	SİRT1 (Sirtuin 1) molekülünün FoxO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek FoxO transkripsiyonunu aktive ettiğini gösteren çizim	20

2.16.	Sirtuin1'in FoxO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek, hücre yanıtını apoptozdan, stres dayanıklılığı yönünde değiştirdiğini ve yaşam süresinin uzamasına neden olduğunu gösteren çizim	21
4.1.	Profaz I aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	30
4.2.	Metafaz I aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	31
4.3.	Metafaz II aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	32
4.4.	Bir hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	34
4.5.	İki hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	35
4.6.	Dört hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	37
4.7.	Sekiz hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	38
4.8.	Morula aşamasındaki embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	39
4.9.	Blastosist aşamasındaki embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1.	Fare oositlerinin ve embriolarının elde edilmesini özetleyen şema	25
3.2.	İmmünfloresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve dilüsyon oranları	28
4.1.	İmmünfloresan sonuçlarına göre oosit ve preimplantif dönem embriolarda yapılan semikantitatif değerlendirme sonuçları	41

GİRİŞ

1.1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Erkek üreme hücresi sperm ve dişi üreme hücresi olan oosit, primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri, vitellüs kesesinden gelişmekte olan gonadlara doğru göç ederler ve göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayılarını arttıırırlar, gonada ulaştıktan sonra da mitotik bölünmelerle sayı artışı devam eder. Genetik olarak dişi olan gonada ulaşan primordiyal germ hücreleri, oogonyumlara farklanırlar ve oogonyumların çoğu mitoz bölünme ile bölünmelerini sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında duraklatarak primer oositlere farklanırlar. Doğuma kadar hayatta kalan primer oositler ve etrafındaki tek katlı yassı epitel hücreleri birlikte primordiyal folikül adını alırlar. Primer oositler, puberteye kadar I. mayoz bölünmenin profaz evresinde kalırlar. Bu süreçten sonra foliküller, folikülogenez sürecine girerler ve yalnızca bir folikül gelişimini tamamlar, diğer foliküller atrezi denilen olay sonucunda dejenere olurlar. Folikülogenez sürecinde oluşan en büyük ve olgun folikül, Graaf ya da preovulatuvar olarak adlandırılan foliküldür ve bu folikülde ovulasyondan hemen önce primer oosit eksentrik bir konum alır. Ovulasyondan birkaç saat önce I. mayoz bölünme tamamlanır ve sonucunda sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Yani ovule olan oosit, II. mayoz bölünmenin metafaz evresinde duraklamıştır. Ovule olan oositin, fallop tüplerinin ampulla bölgesinde sperm ile birleşmesi olayı fertilizasyon olarak adlandırılır ve bu olay sonucunda fertilize oosit meydana gelir [1, 2].

Fertilizasyonun ardından oluşan embriyo, fallop tüplerinden uterusu doğru yol alırken bir yandan implantasyona hazırlanır ve endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç preimplantasyon gelişimi olarak tanımlanır [3]. Preimplantasyon embriyo gelişim süreci, fertilize oositin yarıklanma bölünmelerine başlaması, embriyonik genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist oluşumu ile karakterize olup tüm memelilerde özdeştir [4]. Preimplantif dönem embriyolar, yarıklanma bölünmelerine başladıklarında sırasıyla; fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolar oluşur.

Embriyo, preimplantif gelişim sürecinin başlangıcında maternal kaynakları kullanır ve kendisi transkripsiyonel olarak sessizdir ve oosit olgunlaşıp II. mayoz bölünmenin metafaz aşamasında durakladığında transkripsiyon durur ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) translasyonu azalır. Farede embriyonik genom aktivasyonu (EGA), 2 hücreli embriyo aşamasında gerçekleşir. Bu aşamadan sonra embriyo, proteinlerinin sentezi için artık kendi mRNA'larını kullanacaktır [5-8]. Sekiz hücre aşamasındaki embriyo blastomerleri, birbirleriyle daha sıkı temas kurarak birbirlerine sağlam bağlarla tutunan kompakt bir hücre topu haline gelirler ve bu olay kompaksiyon olarak adlandırılır [1]. Kompaksiyonun ardından trofektodermal

hücreler, embriyo 32 hücreli aşamaya geldiğinde hücre içi ve hücre dışı alanlara sıvı pompalayarak blastosist kavitesini oluşturmaya başlar ve bu olay da kavitasyon olarak adlandırılır [9].

Preimplantif embriyo gelişim süreci, maternal çevrede bulunan büyüme faktörleri tarafından üretilen sinyallere bağlı olarak pek çok farklı hücreyel olay tarafından etkilenmektedir. PI3K/Akt sinyal yolağı, büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağından birisidir [10]. PI3K/Akt sinyal yolağının, oosit matürasyonunda ve preimplantif embriyo gelişim sürecinde varlığı ve rolleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [11, 12].

“Forkhead” ailesinin üyelerinden olan FoxO transkripsiyon faktörleri, korunmuş DNA bağlanma bölgeleri ile karakterize olup nükleusta görev yapmaktadırlar ve aktiviteleri PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenmektedir. Memelilerde, FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) ve FoxO6 olmak üzere dört çeşit FoxO ailesi üyesi bulunmaktadır [13-15].

FoxO transkripsiyon faktörleri; apoptozun düzenlenmesi, hücre siklusunun duraklaması, oksidatif strese karşı dayanıklılık, DNA tamiri, glikoz metabolizması, enerji homeostazı ve hücreyel farklılaşma gibi pek çok farklı süreçlerde önemli roller oynarlar [13, 16-19]. Büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada lokalize olan FoxO transkripsiyon faktörleri, oksidatif stres ya da genotoksik stres gibi stres koşulları altında büyüme faktörlerinin varlığında dahi nükleusta kalırlar ve hedef genlerin transkripsiyonel aktivitesine neden olurlar [20-22].

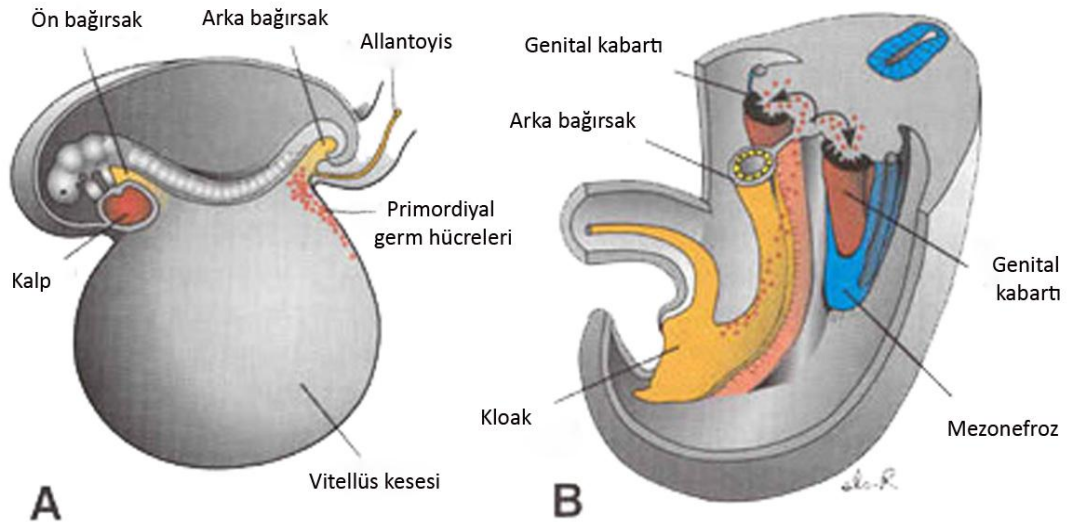
Çalışmanın Hipotezi: Özellikle stres koşulları altında pek çok farklı yaşamsal olayda ve hücrenin hayatta kalması ya da ölmesi gibi önemli bir kararda rol oynayan FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücreyel süreçteki görevleri ve önemi yapılan pek çok farklı çalışmalarla gösterilmiştir [13, 16-19, 21, 22]. Ayrıca FoxO moleküllerinin dişi ve erkek üreme sisteminde ve fertilitenin korunup devamlılığının sağlanmasındaki önemli rolleri ve PI3K/Akt sinyal yolağının, oosit matürasyonunda ve preimplantif embriyo gelişim sürecinde varlığı ve rolleri yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [11, 12, 23-27]. Tüm bu bilgiler, bir yandan çoğalırken diğer yandan farklılaşan ve mikroçevresi sürekli değişirken ortama adapte olmaya çalışan preimplantif gelişim sürecindeki embriyoda, FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli rollerinin olabileceği sorusunu akla gelmektedir. Literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin preimplantif embriyo gelişim sürecindeki ekspresyonları bilinmemektedir. Tüm bu literatür bilgisi ışığında, FoxO transkripsiyon faktörlerinin profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositlerden başlayarak preimplantif dönem embriyo gelişiminde ekspre oluyor olabilir.

Çalışmada hormonal indüksiyon ile 5-6 haftalık Balb/C ırkı dişi fareler kullanılarak profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositler ve erişkin Balb/C ırkı erkek fareler ile çiftleşme sonucunda fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki preimplantif dönem embriyolar toplanmıştır. İmmünfloresan yöntemi kullanılarak; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonlarının varlığı ve lokalizasyonları ortaya konmuştur.

GENEL BİLGİLER

2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü ve Oogonyumlara Farklanması

Gametler, epiblast hücre tabakasından farklı olan ve daha sonra vitellüs kesesine göç eden primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken alır. Primordiyal germ hücreleri, vitellüs kesesinden gelişmekte olan gonadlara doğru göç ederler (Şekil 2.1). Göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayılarını oldukça arttıran germ hücreleri, bu durumu gonada ulaştıktan sonra da devam ettirirler.



Şekil 2.1. Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü [1].

Primordiyal germ hücreleri, genetik olarak dişi olan gonada ulaşır ulaşmaz oogonyumlara farklılıklar. Geçirdikleri mitotik bölünmelerle çoğalan oogonyumlar, yassı epitel hücreleri ile çevrelenirler. Oogonyumların çoğu mitoz bölünme ile bölünmelerini sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında duraklatarak primer oositlere farklılıklar [1]. Doğuma kadar hayatta kalan primer oositler ve etrafındaki tek katlı yassı epitel hücreleri birlikte primordiyal folikül adını alırlar. Primer oositler, puberteye kadar I. mayoz bölünmenin profaz evresinde kalırlar. Bu süreçte oositlerin olgunlaşması, folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden bir madde (OMI, oocyte maturation inhibitor) tarafından baskılanır.

2.2. Folikülogenez

Puberteye gelindiğinde, dişi gonad belirli bir primordiyal folikül havuzuna sahiptir ve her ovaryal siklusta seçilen 5 ile 15 arasında değişen sayıda primordiyal foliküller olgunlaşarak folikülogenez adı verilen bir süreç girerler. Bekleme

evresinden çıkan primordiyal foliküller, primer folikül adını alırlar ve kübik folikül hücreleriyle çevrilidirler. Bu evredeki primer oosit etrafında, zona pellusida (ZP) denilen bir glikoprotein kılıf sentezlenmeye başlanır. Daha sonraki evrede oluşan folikül, sekonder foliküldür. Sekonder folikül, sürekli bölünen folikül hücreleri ve kalınlaşan zona pellusida ile karakterizedir. Sekonder folikülde, folikül hücreleri arasında foliküler sıvı içeren antral boşluklar oluşmaya başlar. Folikülogenez aşamasının en büyük ve olgun folikülü, Graaf ya da preovulatuvar olarak adlandırılan foliküldür. Antral boşlukların birleşerek oluşturduğu tek bir antrum ile karakterize olan bu folikülde, ovulasyondan hemen önce primer oosit eksentrik bir konum alır. Ovulasyondan birkaç saat önce I. mayoz bölünme tamamlanır ve sonucunda sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Yani ovule olan oosit, II. mayoz bölünmenin metafaz evresinde duraklamıştır.

Folikülogenez sürecinde çok sayıda primer folikül olgunlaşma evresine girer. Ancak, yalnızca bir folikül gelişimini tamamlar, diğer foliküller atrezi denilen bir olay sonucunda dejenere olurlar [2].

2.3. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci

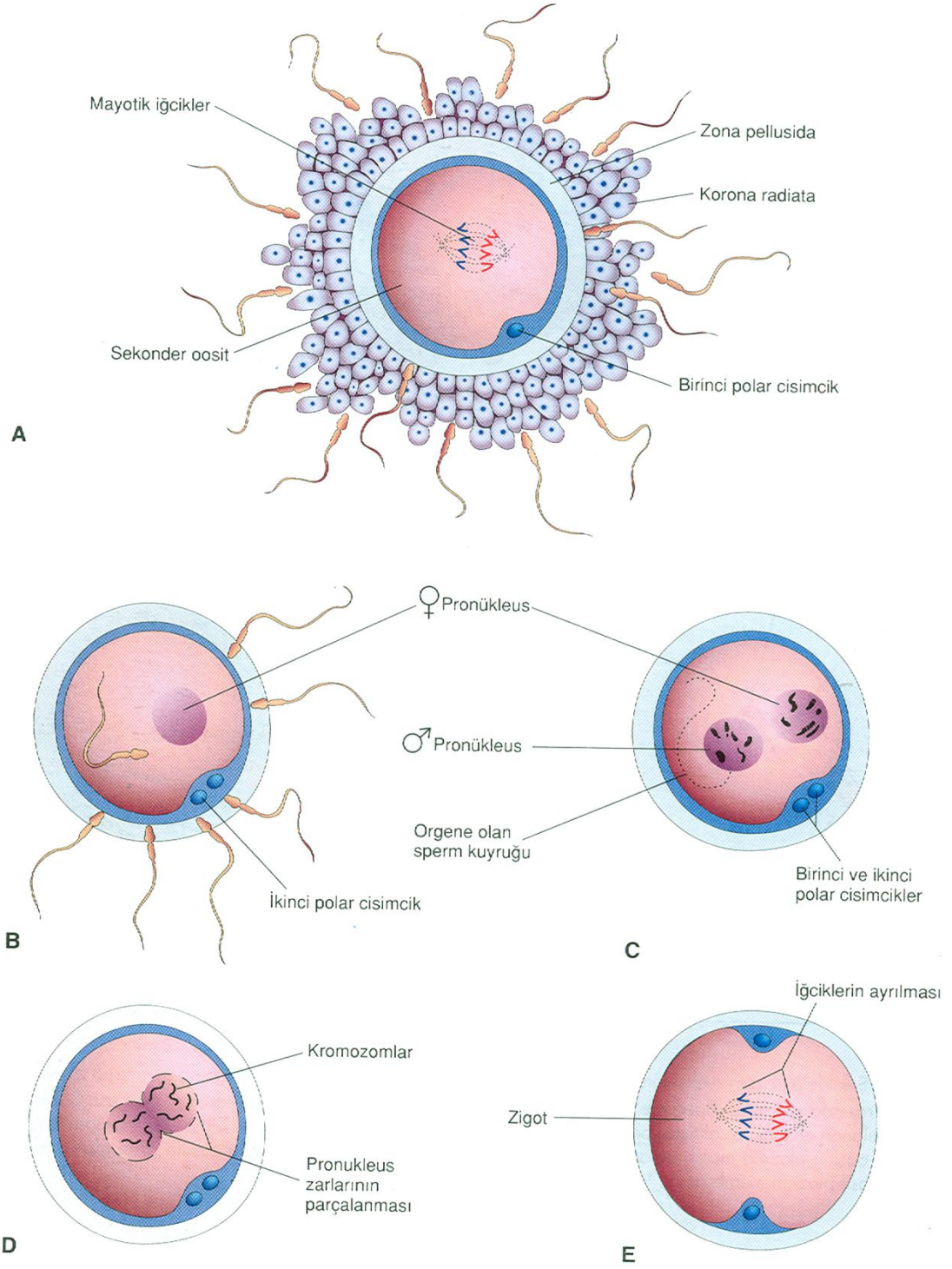
2.3.1. Fertilizasyon

Ovulasyondan hemen önce, fallop tüpleri ritmik şekilde kasılmaya ve uçlarındaki fimbrialar da overin yüzeyini süpürmeye başlarlar. Fallop tüpleri içerisine ulaşan oosit, kas kontraksiyonları ve epitel hücrelerinin silyalarının itmesi ile birlikte uterusu doğru ilerler. Dişi gamet oositin ve erkek gamet spermin birbiriyle birleşip kaynaşmasına fertilizasyon (döllenme) adı verilir. Fertilizasyon, fallop tüplerinin ampulla bölgesinde gerçekleşir. Döllenme sonucunda oluşan yeni canlının taslağını oluşturan hücre “fertilize oosit” olarak adlandırılır.

Fertilizasyonun 3 evresi vardır. Bunlardan ilki korona radiatanın delinip geçilmesi, ikincisi zona pellusidanın delinip geçilmesi ve üçüncüsü oosit ve sperm hücre zarlarının füzyonudur.

Oosit, spermin sitoplazmasına girmesinin hemen ardından II. mayoz bölünmesini tamamlar. Bölünme sonucunda ikinci polar cisim atılır. Bu hücrenin kromozomları dişi pronükleus adı verilen veziküler bir çekirdek içinde yeniden düzenlenirler. Bu olaylar gerçekleşirken, sperm pronükleusu da dişi pronükleusunun yakınına gelene kadar ilerlemesini sürdürür. Her ikiside haploid sayıda kromozom içeren erkek ve dişi pronükleusları, büyümeleri sırasında kendi deoksiribonükleik asit (DNA) ‘lerini replike ederler (Şekil 2.2).

Döllenmenin temel sonuçları şu şekildedir: yarısı anneden yarısı babadan gelen kromozomların diploid sayısının yeniden kurulması, yeni bireyin kromozomal cinsiyetinin belirlenmesi ve hücre yarıklanmalarının (klevaj) başlatılması [1].

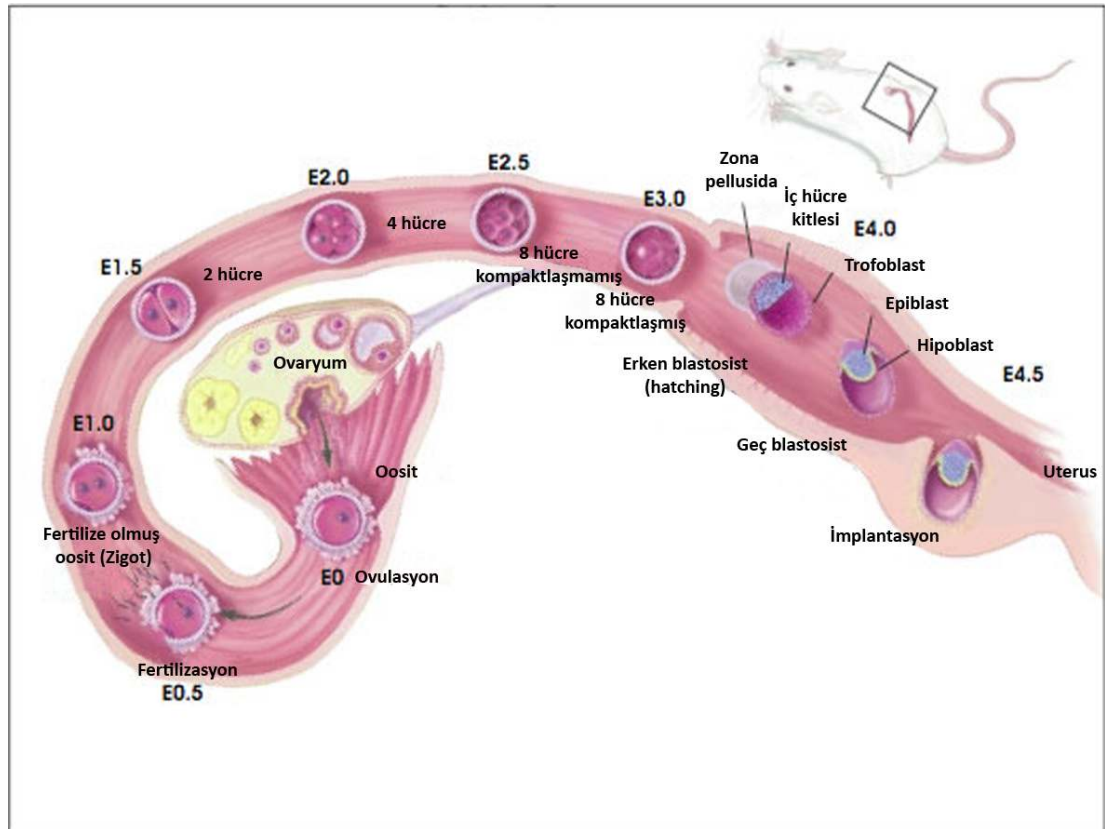


Şekil 2.2. Fertilizasyonu gösteren şekil. Burada olaylar spermin sekonder oositin plazma membranına teması ile başlar, anne- babadan gelen kromozomların fertilize oositin birinci mayoz bölünmesinin metafazında biraraya gelmesi ile son bulur. A: Sekonder oosit birkaç sperm ile çevrelenmiş. B: Korona radiata kaybolmuş, bir sperm oosite girmiş ve olgun oositi oluşturmak için ikinci mayoz bölünme olmuştur. Ovumdaki nükleus, dişi pronükleustur. C: Spermin başı erkek pronükleusunu oluşturmak için genişler. D: Pronükleuslar birleşir. E: Diploid sayıda fertilize oosit oluşur [28].

2.3.2. Preimplantif Embriyo Gelişim Süreci

Fertilizasyonun ardından oluşan embriyo, fallop tüplerinden uterusu doğru yol alır ve bu süreçte implantasyona hazırlanır. Fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan fertilize oositin endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç preimplantasyon gelişimi olarak tanımlanır (Şekil 2.3) [3].

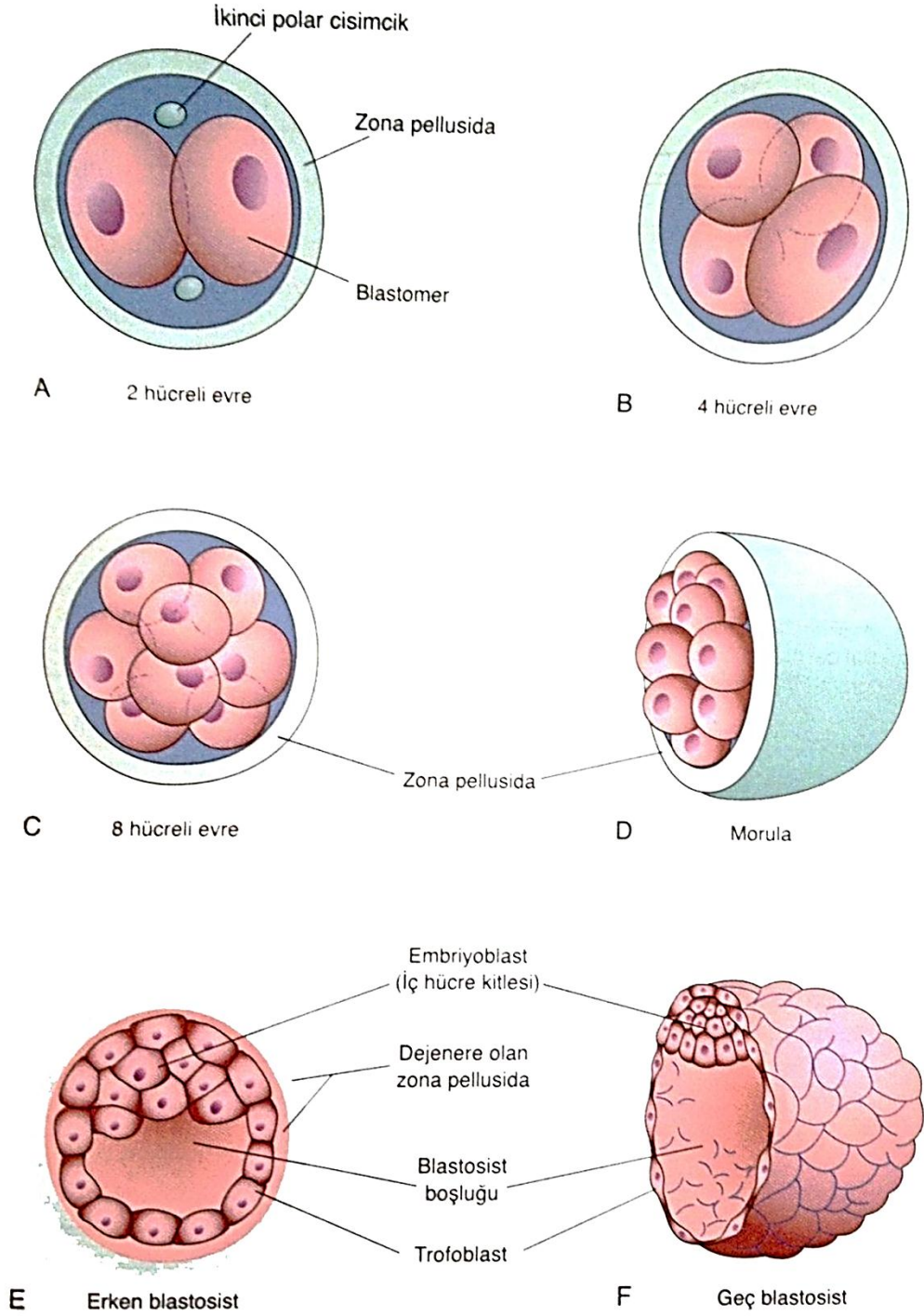
Preimplantasyon embriyo gelişim süreci, fertilize oositin yarıklanma bölünmelerine başlaması, embriyonik genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist oluşumu ile karakterize olup tüm memelilerde özdeştir [4].



Şekil 2.3. Fare preimplantif embriyo gelişim süreci [4].

2.3.3. Yarıklanma Evreleri

Yarıklanma; fertilize oositin tekrarlayan mitoz bölünmeler geçirmesi sonucunda hücre sayısında hızlı bir artış olmasıdır ve fallop tüplerinden uterusu doğru ilerlerken gerçekleşir [28]. Farede birinci yarıklanma, fertilizasyondan 1 gün sonra gerçekleşir. İlk yarıklanma sonucunda fertilize oosit, iki hücreli evreye ulaşır ve peşpeşe bir seri mitotik bölünmeler geçirerek hücre sayısını artırır. İlk bölünme ve onu takip eden bölünmeler sonucu oluşan yeni hücrelerin her biri blastomer olarak adlandırılır. Her yarıklanma bölünmesi sonucunda, blastomer hacmi küçülür ve embriyo sekiz hücre evresine kadar gevşek bir hücre kümesi halindedir (Şekil 2.4) [1].



Şekil 2.4. Fertilize oositin yarıklanmasını ve blastosist oluşumunu gösteren çizim [28].

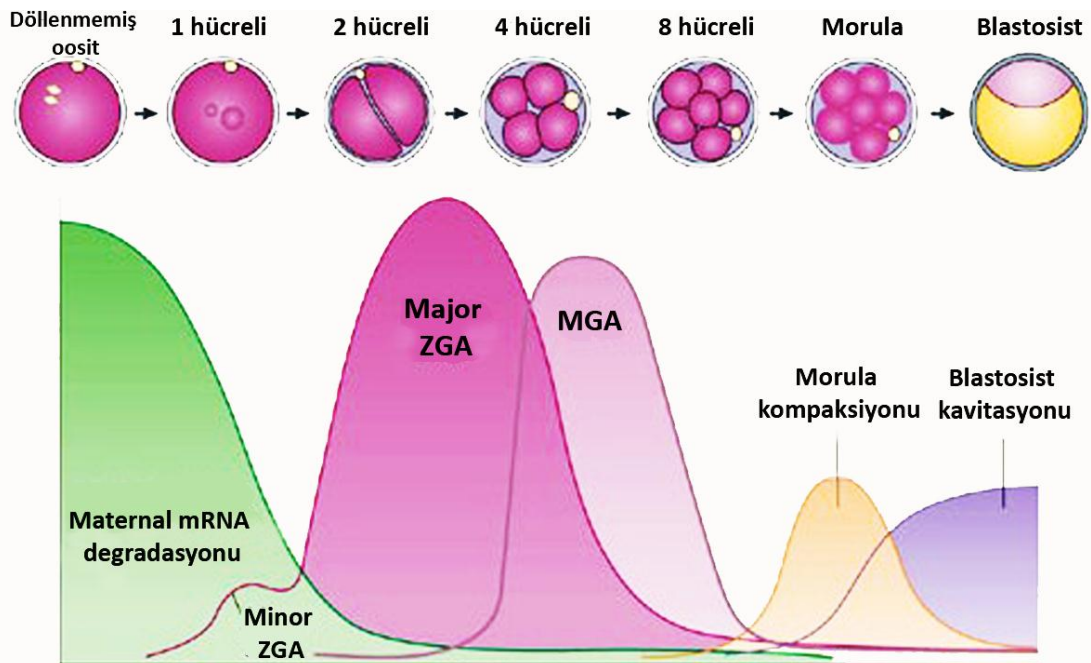
Fare embriyolarının fertilize oosit evresinden, 32 veya daha fazla hücre içeren blastosist evresine gelişimi yaklaşık 3,5. günde tamamlanır. Fare embriyolarının birinci yarıklanması (2 hücreli aşamaya geçiş) yaklaşık 16-20 saatte, ikinci yarıklanması (4 hücreli aşamaya geçiş) yaklaşık 18-22 saatte gerçekleşir [29-31].

Yarıklanma sürelerinin genetik faktörlerle ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [32].

Birinci yarıklanma ekseninin pozisyonu hakkında öne sürülmüş birkaç model ve farklı fikirler bulunsa da [33-35], kabul edilen tanımlama, ilk yarıklanma ekseninin kutup cisimlerinin pozisyonu ile ilişkili olduğudur. Plazma membranı ile zona pellusida arasında yer alan birinci ve ikinci kutup cisimlerinin bulunduğu noktada plazma membranı hafifçe çöker ve ilk bölünme buradan başlayarak karşı tarafa kadar devam eder [3, 4].

2.3.4. Embriyonik Genom Aktivasyonu (EGA)

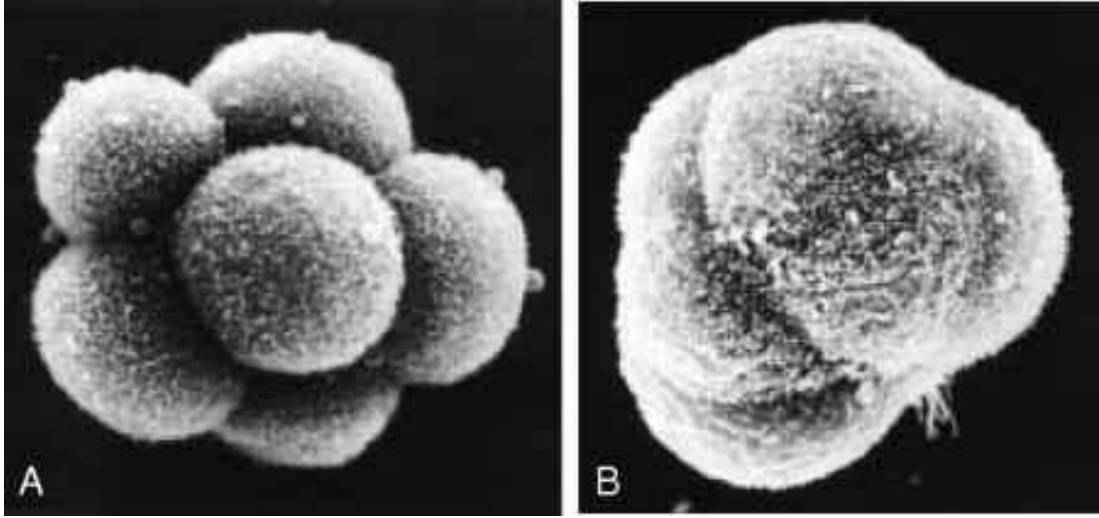
Fertilizasyondan sonra oluşan embriyo, başlangıçta maternal kaynakları kullanır ve kendisi transkripsiyonel olarak sessizdir. Oosit büyürken, kendi genlerinin pek çoğunun transkripsiyonunu ve translasyonunu yapmaktadır. Oositte önceden üretilen bu protein deposu, embriyonik gelişimi 8 hücreli aşamaya kadar desteklemek için yeterlidir [5]. Oosit olgunlaşıp II. mayoz bölünmenin metafaz aşamasında durakladığında transkripsiyon durur ve mesajcı ribonükleik asit (mRNA) translasyonu azalır [6]. Maternal mRNA degradasyonu, mayotik matürasyon tarafından tetiklenir ve 8 hücreli aşamaya kadar maternal mRNA translasyonu devam eder, ancak 2 hücreli aşamada büyük ölçüde tamamlanır. Farede EGA, 2 hücreli embriyo aşamasında gerçekleşir [7]. Bu aşamadan sonra embriyo, proteinlerinin sentezi için artık kendi mRNA'larını kullanacaktır. Embriyonik genom aktivasyonu, yeni proteinlerin sentezi ve gerçekleşecek olan ileri yarıklanma evreleri için gereklidir [5] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Fare preimplantasyon gelişiminde embriyonik genom aktivasyonunu gösteren çizim. (Minor ve major ZGA (zigotik gen aktivasyonu), MGA (mid-preimplantasyon gen aktivasyonu) [8].

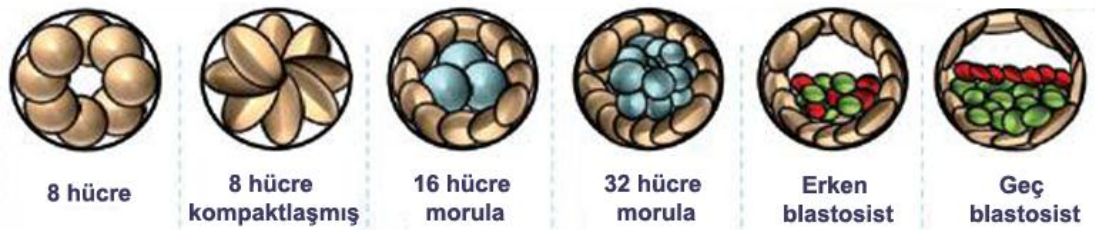
2.3.5. Kompaksiyon

Üçüncü yarıklanma bölünmesinden sonra oluşan 8 hücreli embriyo blastomerleri, birbirleriyle daha sıkı temas kurarak birbirlerine sağlam bağlarla tutunan kompakt bir hücre topu haline gelirler (Şekil 2.6) [1].



Şekil 2.6. Kompaksiyon SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri. **A)** Kompaktlaşmamış 8 hücreli embriyo, **B)** Kompakt morula [1].

Kompaksiyon olarak bilinen bu süreçle, iç hücreler dış hücrelerden ayrılırlar. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra, kompakt haldeki embriyo yeniden bölünerek 16 hücreli (morula) haline dönüşür. Blastosist aşamasına gelen embriyoda, morula aşamasında oluşan iç hücreler iç hücre kitlesini, dış hücreler de dış hücre kitlesini oluştururlar (Şekil 2.7). İç hücre kitlesinden embriyonik tabakalar, dış hücre kitlesinden de daha sonra plasentayı oluşturacak ve ekstraembriyonik membranların oluşumuna katılacak olan trofoblast gelişir [1].



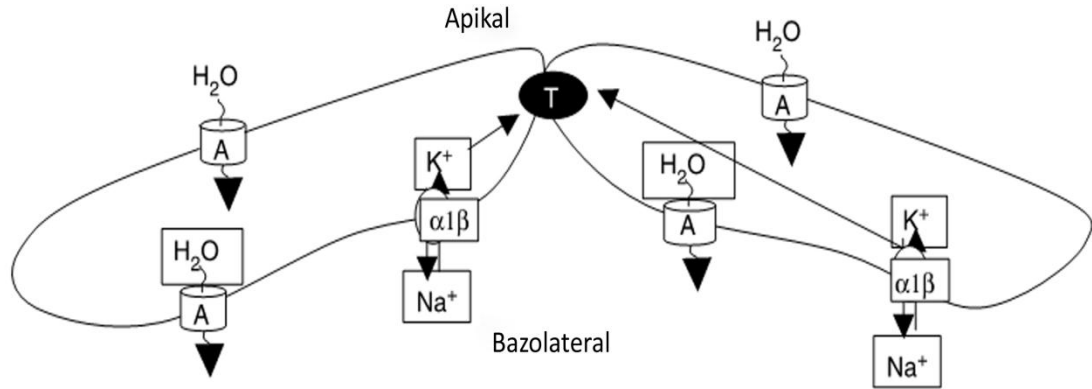
Şekil 2.7. Kompaksiyon ve farklanma sürecini gösteren çizim. Trofektoderm hücreleri bej rengi, iç hücre kitlesi hücreleri mavi ile gösterilmiştir [36].

Kompaktlaşma süreci başta Epitelyal kaderin (E-kaderin) molekülünün fosforile olması olmak üzere, hücre yüzeyi adezyon glikoproteinlerince gerçekleştirilir. Ayrıca Zonula Okludens-1 (ZO-1), laminin, cingulin gibi hücre bağlantı moleküllerinin de miktarında artış meydana gelerek hücreler arası etkileşimin arttırılması sağlanır [37-40].

2.3.6. Kaviteasyon

Kompaksiyonun ardından sıkı bağlantı komplekslerini bir araya getiren ve yassılaşıp epitelial hücre karakteri kazanan trofektodermal hücreler, embriyo 32 hücreli aşamaya geldiğinde hücre içi ve hücre dışı alanlara sıvı pompalayarak blastosist kavitesini oluşturmaya başlar [9].

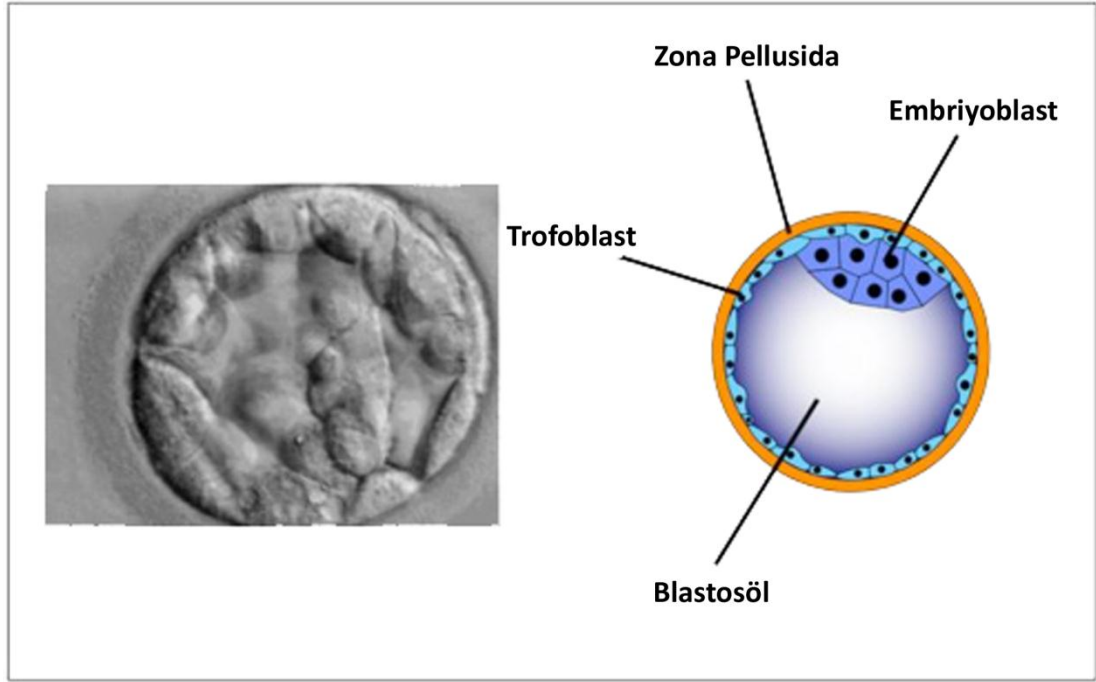
Trofektoderm iyon transport sistemi, epitelium boyunca iyon konsantrasyon gradientinin oluşturulmasında ve böylece suyun blastosöl sıvısına akışının sağlanmasında önemli rol oynar. Elektron-prob mikro analizleri Na^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} iyonlarının blastosöl sıvısı içerisinde yoğunlaştığını göstermiştir [41]. Bu iyonların konsantrasyon gradiyentlerine göre taşınması, aktif bir transport mekanizmasına sahip olmayı gerektirir. Bu süreç trofektodermin bazolatreal kısmında yerleşik bulunan sodyum-potasyum ATPaz (Na, K-ATPaz) sistemi ile başlar. Ayrıca, sıkı bağlantı komplekslerinin varlığı da bu süreçte önemlidir. Bu kompleksler, hücreler arasında geçirgen olmayan bir yapı sağlayarak sıvı toplanmasına ve paraselüler transportun düzenlenmesine izin verirken, Na, K-ATPaz dağılımının polarizasyonuna katkıda bulunur (Şekil 2.8) [42, 43].



Şekil 2.8. Trofektoderm hücrelerindeki su ve iyon transportu. Trofektoderm hücreleri blastosist oluşumunu kontrol eden sıvı dinamiğini kontrol eder. Trofektoderm hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar embriyo dışına sıvı kaybını önler [42].

2.3.7. Blastosist Oluşumu

Morula aşamasındaki embriyo uterusu ulaştığında, uterus boşluğundaki sıvı zona pellusidayı geçip iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna sızarak orada toplanmaya başlar. Giderek genişleyen bu boşluklar birleşerek blastosöl denilen tek bir boşluk oluşturur. Bu dönemdeki embriyo, blastosist adını alır. Bu aşamadan sonra blastosistin iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi de trofoblast olarak adlandırılır (Şekil 2.9). Trofoblastlar yassılaşıp blastosistin epitelial duvarını meydana getirirler [1]. Oluşan blastosistin uterus duvarına implantasyonu için zona pellusidasından kurtulması gerekir ve bu olaya zona hatching adı verilir. Bu aşamada zona pellusidasından ayrılmış blastosist, uterus endometriyumuna implante olmak için hazırdır.



Şekil 2.9. Blastosist aşamasındaki embriyo. A) Faz kontrast görüntü. B) Blastosist yapısı ve elemanlarını gösteren şematik resim [44].

2.4. Preimplantif Embriyo Gelişim Sürecinde Büyüme Faktörlerinin Etkisi

İmplantasyondan önce embriyo gelişmesi, maternal çevrede bulunan büyüme faktörleri tarafından üretilen sinyallere bağlıdır [12]. Bu büyüme faktörleri preimplantasyon gelişim sürecinde, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını kontrol ederler [45, 46]. Embriyolar bu büyüme faktörlerine, maternal bölgede bulunan ligandlara karşılık olarak ürettiği reseptörleri sayesinde cevap verebilmektedirler [47].

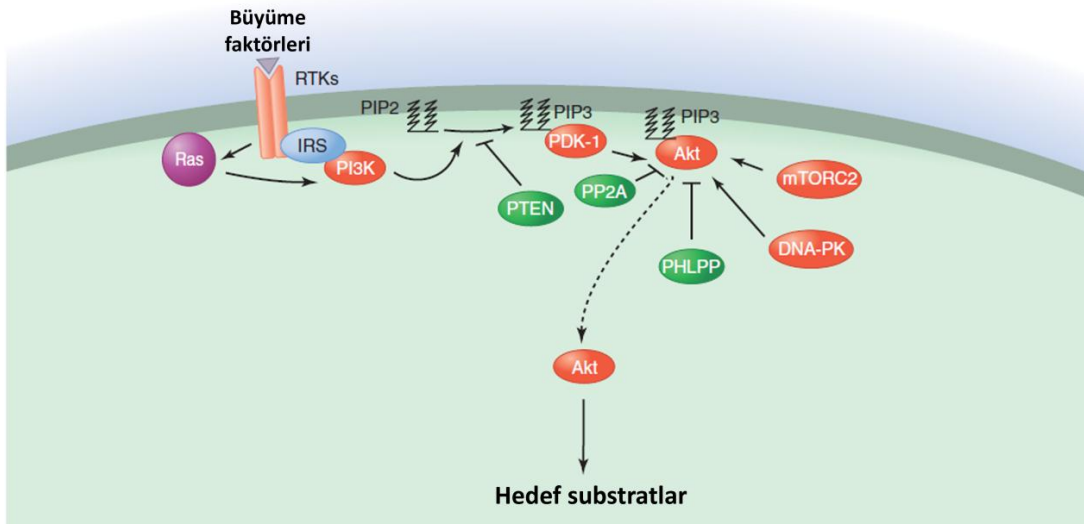
2.4.1 Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ Protein Kinaz B (PKB/ Akt) Yolağı

Büyümeyi ve gelişmeyi destekleyen pek çok sinyal yolağından birisi PI3K/ Akt sinyal yolağıdır [10].

Son yıllarda yapılan çalışmalar PI3K/Akt yolağına; hücresel göç, mitoz bölünmeler, farklılaşma ve hücrelerin hayatta kalma süreçlerini içeren hücre fonksiyonlarında anahtar düzenleyici olduğunu göstermiştir [48]. Ayrıca, PI3K/Akt yolağına fare oosit matürasyonunda da önemli rolü olduğu gösterilmiştir [11].

Embriyonun, preimplantasyon gelişim sürecinde PI3K/Akt yolağını aktive eden çok sayıda reseptör ekspre ettiği bilinmektedir. Özellikle insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve insülin reseptörlerinin fertilize oosit aşamasından itibaren ekspre edildiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [49, 50].

PI3K/Akt yolağı, büyüme faktörleri tarafından aktive edilir. Büyüme faktörlerinin uyarımı ile aktive olan reseptörler, düzenleyici alt ünitelerine ya da adaptör moleküllerine (insülin reseptör substrat proteini gibi (IRS)) bağlanarak PI3K'ı aktive ederler. PI3K'ın aktivasyonu ile birlikte, fosfatidilinositol (3,4)-bisfosfat (PIP2) fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfata (PIP3) dönüşür. Sonucunda 3-fosfoinositide bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) aktive olur. PDK1, PIP3 ve Akt'nin plazma membranında bağlanmasını ve sonucunda Akt aktivasyon ilmeğindeki T308 fosforilasyonu ile Akt'nin aktivasyonunu sağlar (Şekil 2.10) [51, 52].



Şekil 2.10. PI3K tarafından reseptör tirozin kinazlar (RTK) aracılı Akt aktivasyonu [51].

2.5. FoxO Transkripsiyon Faktörleri

FoxO transkripsiyon faktörleri, büyük bir protein ailesi olan “Forkhead” ailesinin üyelerindendir. Aile bu ismi, *Drosophila*’daki bu genin mutasyonu sonucunda oluşan çatal benzeri ektopik baş yapısı oluşumundan dolayı almıştır [13]. FoxO proteinleri nükleusta görev yapan transkripsiyon faktörleridir ve monomer olarak aynı türdeki hedef DNA sekanslarına bağlanırlar [14].

Transkripsiyonel düzenleyiciler olan bu aile “fork head box (FOX)” olarak isimlendirilirler ve korunmuş DNA bağlanma bölgeleri ile karakterizedirler [15]. Bu aile proteinlerinin korunmuş DNA bağlanma bölgeleri, forkhead (FKH/ FH) domeyni olarak adlandırılır. FoxO ailesi diğer üyelere göre, DNA bağlanma bölgesinde bazı farklılıklar gösterdiği için İngilizce’de “diğeri, öteki” anlamına gelen “other” kelimesinin ilk harfi kullanılarak adlandırılmıştır. FoxO proteinlerinin bir diğer ayırt edici özelliği ise, oldukça korunmuş Akt fosforilasyon bölgelerinin bulunmasıdır [14].

2.5.1. FoxO Ailesi Üyeleri

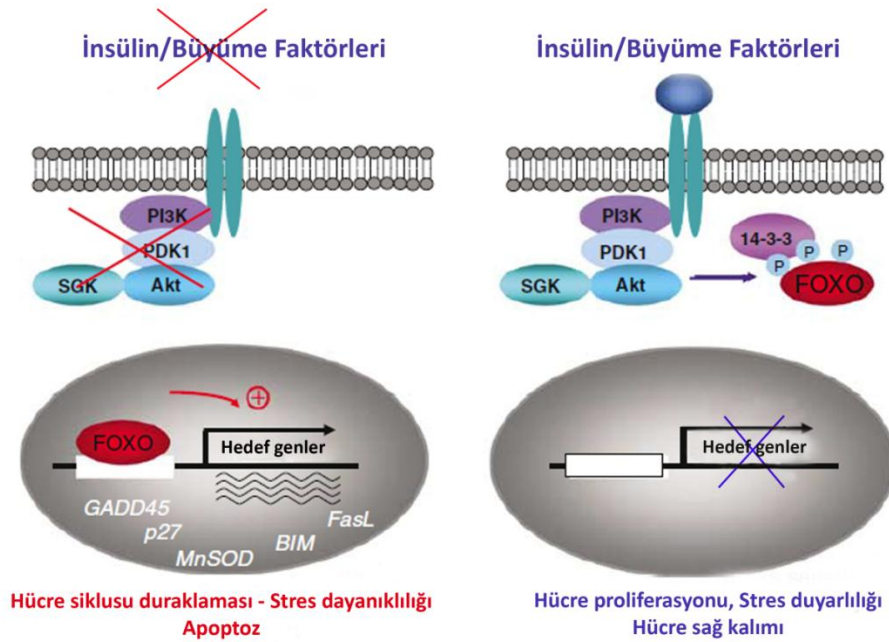
Forkhead ailesi, tüm ökaryotlarda bulunmaktadır. İnsanda, Forkhead ailesinin 39 üyesi vardır ve 19 alt gruba ayrılır. Bu alt grupların FoxA' dan S'ye kadar farklı tipleri mevcuttur [53].

FoxO ailesinin memelilerde dört adet üyesi bulunur: FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) ve FoxO6 [54]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar, ailenin bulunan en son üyesi olan FoxO6'da diğer grup üyelerinde ortak bir şekilde bulunan C terminalindeki Akt fosforillenme bölgesinin olmadığını göstermektedir ve bu nedenle FoxO6 hücrede esasen nükleusta lokalize olur [55]. FoxO6 hakkındaki bilgiler literatürde henüz iyi tanımlanabilmiş değildir.

2.5.2. FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve PI3K/Akt Sinyal Yolağı İlişkisi

FoxO ailesini FOX ailesinden ayırt eden önemli bir diğer özelliği, insülin-PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlenmeleridir [56]. FoxO proteinleri, insülin/büyüme faktörleri stimülasyonu ile Akt tarafından doğrudan fosforillenirler ve sonucunda inhibe edilirler [13].

FoxO proteinleri, transkripsiyonel gen aktivasyonu görevlerini nükleusta gerçekleştirebilen moleküllerdir. Önemli olarak Akt, FoxO proteinlerine 14-3-3 şaperon proteinlerini bağlayarak fosforile eder ve FoxO proteinlerinin nükleustan sitoplazmaya taşınmasına ve inaktivasyonuna neden olur. Bunun sonucunda FoxO hedefindeki ve kontrolündeki gen ekspresyonları gerçekleşmez [14]. PI3K/Akt yolağı çalışmadığında ise, FoxO proteinleri nükleusta lokalize olurlar ve transkripsiyonel aktivasyonlarını gerçekleştirebilirler (Şekil 2.11.) [13].



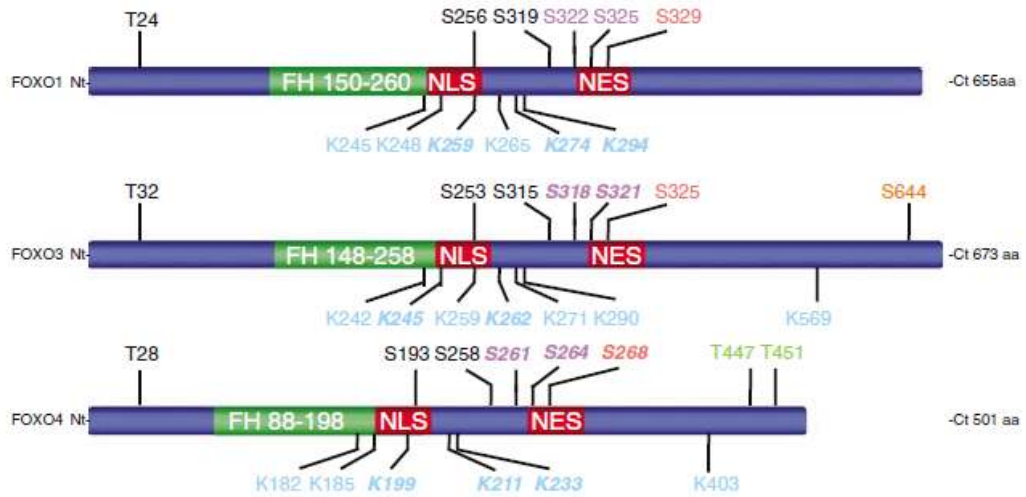
Şekil 2.11. İnsülin/ Büyüme Faktörleri tarafından FoxO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesini gösteren çizim [53].

2.5.3. FoxO Moleküllerini Kontrol Eden Mekanizmalar

FoxO'ların aktivitesi; fosforilasyon, asetilasyon ve übikütilasyon içeren posttranslasyonel modifikasyon mekanizmaları tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir [56].

2.5.3.1. Fosforilasyon mekanizması

FoxO transkripsiyon faktörleri, pek çok farklı molekül ile farklı bölgelerinden fosforile olabilmektedirler (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. FoxO ailesi üyelerinin asetilasyon ve fosforilasyon alanlarının gösterildiği çizim [53]. Akt alanları (siyah); serum ve glukokortikoid indüklenabilir kinaz (SGK, (siyah)); IκB kinaz β (IKKb, (turuncu)); Jun N-terminal kinaz (JNK, (yeşil)); çift özgün tirozin fosforillenmiş ve Düzenlenmiş kinaz (DYRK, (kırmızı)); kazein kinaz 1 (CK1, (mor)); asetilasyon alanları (mavi); FH, Forkhead domain; NLS, nükleer lokalizasyon sinyalleri; NES, nükleer export sekansı.

FoxO1, treonin (Thr) 24, serin (Ser) 256 ve Ser319; FoxO3, Thr32, Ser253 ve Ser315; FoxO4, Thr28, Ser193 ve Ser258 olmak üzere Akt tarafından üç bölgeden fosforillenirler [53]. Fosforile olan FoxO proteinleri, 14-3-3 şaperon proteinlerine bağlanarak sitoplazmada tutulurlar ve transkripsiyonel olarak inaktif halde kalırlar. FoxO proteinlerinin sitoplazmada kalması, kısmen 14-3-3 şaperon proteinlerinin nükleer lokalizasyon sinyallerini (NLS) maskeleyesi sayesinde olur [57, 58].

FoxO proteinleri, serum ve glukokortikoid indüklenabilir kinazlar (SGK) tarafından da fosforile edilirler [59]. SGK'lar, serin/treonin kinazlardırlar ve Akt ile ilişkilidirler. Bu proteinler Akt ile ortak olarak, hayatta kalma faktörlerinin stimülasyonları sonucunda PI3K yolağı tarafından aktive edilirler ve hücrelerde nükleusa göç ederler. SGK, FoxO proteinlerini Akt'nin fosforilasyon bölgeleri ile benzer bölgelerden fosforile eder ve inaktivasyonlarına neden olur [14]. Ancak Akt, FoxO3'ü tercihen serin 253 bölgesinden; SGK1, serin 315 bölgesinden fosforile eder [53].

Çift özgün tirozin fosforillenmiş ve düzenlenmiş kinaz (DYRK), MAP kinaz ailesi üyesidir ve FoxO1'i Ser329; FoxO3'ü Ser325 ve FoxO4'ü Ser268 bölgelerinden fosforile ederek nükleustan sitoplazmaya taşınmalarına ve inaktivasyonlarına neden olur [14].

Kazein kinaz 1 (CK1); FoxO1'i, Ser322 ve Ser325 bölgelerinden; FoxO3'ü Ser318 ve Ser321 bölgelerinden ve FoxO4'ü, Ser261 ve Ser264 bölgelerinden fosforile edebilir [60].

I kappa B kinaz β (IKK), FoxO3'ü Ser644 bölgesinden Akt bağımsız bir şekilde fosforile ederek sitoplazmaya taşınmasına ve inhibe olmasına neden olur [61]. Bu mekanizma, insan ve faredeki FoxO3a'ya spesifiktir, çünkü bu fosforillenme alanı FoxO ailesinin diğer üyelerinde korunmamaktadır [14].

FoxO proteinlerinin Akt tarafından fosforile edilmesi, bu transkripsiyon faktörlerinin sadece sitoplazmada kalmasına neden olmaz. Ayrıca, 26S proteazom aracılığı ile ubiquitinasyonuna ve degradasyonuna da yol açar [62].

2.5.3.2. Asetilasyon mekanizması

FoxO transkripsiyon faktörlerinin bir diğer regülasyon mekanizması olan asetilasyon, FoxO moleküllerinin nükleusta iken koaktivatör ya da korepresör komplekslerine bağlanmasıyla gerçekleşir [53]. FoxO molekülleri, transkripsiyonel koaktivatör CBP (CREB- bağlayıcı protein)'e ya da p300'e bağlanır ve böylece bu transkripsiyonel düzenleyiciler ve temel transkripsiyonel sistem arasındaki ilişki sağlanır [63-65].

Nüklear proteinler olan CBP ve p300 ile p300 ve CBP ilişkili faktör (PCAF) gibi ilişkili oldukları proteinler, intrinsik histon asetil transferaz (HAT) aktivitesine sahiptirler. Bu proteinler histonları asetile ederek ve sinyalleri fazlaştıran ve ilerleten bölgelerinden entegre ederek, transkripsiyonu ilerletmede önemli rol oynar [14]. Ayrıca, transkripsiyon faktörlerini doğrudan transkripsiyon faktör asetil transferaz (FAT) aktivitesi aracılığı ile asetile ederler [66].

Farelerde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucunda, CBP ve FoxO1'in fiziksel olarak etkileşim halinde olduğu ve CBP'nin FoxO1'in asetilasyonunu gerçekleştirdiği bilinmektedir. CBP ekspresyonu, FoxO1'in transkripsiyonel aktivitesini artırır [67]. Yani esasen CBP, FoxO aracılı gen transkripsiyonuna iki şekilde etki eder. Bunlardan birincisi, kromozomal histonları asetile etmesi; ikincisi ise FoxO proteinlerinin kendilerini asetile etmesi ve düzenlemesidir [14]. Ayrıca FoxO1, nüklear reseptörleri düzenleyen transkripsiyonel koaktivatör olan peroksizom proliferatif aktive edilmiş reseptör- γ koaktivatör 1 (PGC-1)'e bağlanır ve sonucunda FoxO bağımlı transkripsiyonda artış olur [68]. CBP, p300 ve PCAF, FoxO transkripsiyon faktörlerini pek çok korunmuş lizin rezidülerinden de doğrudan asetile eder [64, 65, 69, 70]. Örneğin; CBP, farelerde FoxO4'ün asetilasyonunu K186, K189 ve K408 bölgelerinden gerçekleştirir [64].

FoxO moleküllerinin koaktivatörlere bağlanması ve bu aktivatörler tarafından FoxO moleküllerinin asetilasyonu, FoxO fonksiyonu üzerinde zıt etki gösterebilmektedir. FoxO moleküllerinin koaktivatörlere bağlanması, FoxO bağımlı transkripsiyonu artırırken, CBP tarafından FoxO1 ve FoxO4'ün asetilasyonu CBP'nin kromatin üzerindeki etkisinden bağımsız bir şekilde transkripsiyon faktör aktivitesini baskılamaktadır [64, 67]. FoxO asetilasyon alanlarının pek çoğu, molekülün DNA bağlanma domeyninde bulunduğu için, FoxO asetilasyonu sonucunda FoxO'nun DNA'ya bağlanması ve bu nedenle de FoxO bağımlı transkripsiyon engellenebilmektedir. Yani asetilasyon, FoxO proteinlerinin fonksiyonlarını farklı şekillerde etkileyebilmektedir [53].

2.5.3.3. Übikütilasyon mekanizması

FoxO proteinlerinin düzenlenmeleri geri dönüşümlü şekilde kontrol edilmesine rağmen, yıkımları geri dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşir. FoxO proteinlerinin yıkımı, übikülin- proteazom sistemleri tarafından gerçekleştirilir [71-74].

Akt aktivitesi, FoxO1 ve FoxO3 proteinlerinin übikülin aracılı degradasyonu için gereklidir [72, 73]. Üç adet Akt fosforilasyon alanlarının arasında Ser256 fosforilasyonu, FoxO1 übikütilasyonunu tetikleyen temel olaydır [73].

FoxO proteinlerinin degradasyonu sadece Akt tarafından fosforile edilmelerine değil, doğru yerde lokalize olmalarına da bağlıdır. Yapılan çalışmalar, FoxO1'in E3 übikülin ligaz tarafından başarılı übikütilasyonu ve bunun sonucunda da degradasyonu için sitoplazmada bulunması gerektiğini göstermiştir [73]. E3 übikülin ligaz kompleksi, FoxO1 übikütilasyonunu katalizler. FoxO1, Skp1/Cul1/F-box (SCF) E3 übikülin ligaz protein kompleksinin alt ünitesi olan F-box protein Skp2'ye bağlanır ve bu etkileşim FoxO1 degradasyonuna neden olur. İlginç olarak, Skp2 FoxO1 ile etkileşimde bulunurken, FoxO3 ve FoxO4 ile etkileşimde bulunmamaktadır. Skp2 bağımlı FoxO1 poliübikütilasyonu için, Akt tarafından Ser256 bölgesinden fosforile edilmesi gerekir [73].

IKK β , FoxO3'ü Ser644 bölgesinden fosforile ederek übikütilasyonuna ve sonucunda degradasyonuna neden olur [61]. Ancak, E3 ligazın bu olaydan sorumlu olup olmadığı bilinmemektedir [14].

FoxO1 ve FoxO3 moleküllerinin poliübikütilasyonları, degradasyonları ile sonuçlanırken, FoxO4 monoübikütile olmaktadır. Oksidatif strese yanıt olarak FoxO4 monoübikütilasyonu artırılır ve bu olay FoxO4'ün nüklear lokalizasyonuna ve transkripsiyonel aktivitesinin artmasına neden olur [75]. FoxO4'ün FKH domainin C-terminalindeki NLS'de bulunan iki adet korunmuş lizin rezidüleri olan K199 ve K211, monoübikütilasyonunun hedef bölgeleridir [14]. E3 ligazın bu süreçte rol oynayıp oynamadığı bilinmemesine rağmen, FoxO4 deübikütilasyonunun herpes virüs ilişkili übikülin spesifik proteaz deübikütilasyon enzimi (HAUSP/USP7) tarafından katalizlendiği bilinmektedir [75]. USP7 aracılı FoxO4 deübikütilasyonu, FoxO4'ün nükleustan sitoplazmaya tekrar lokalizasyonu ile sonuçlanır [14].

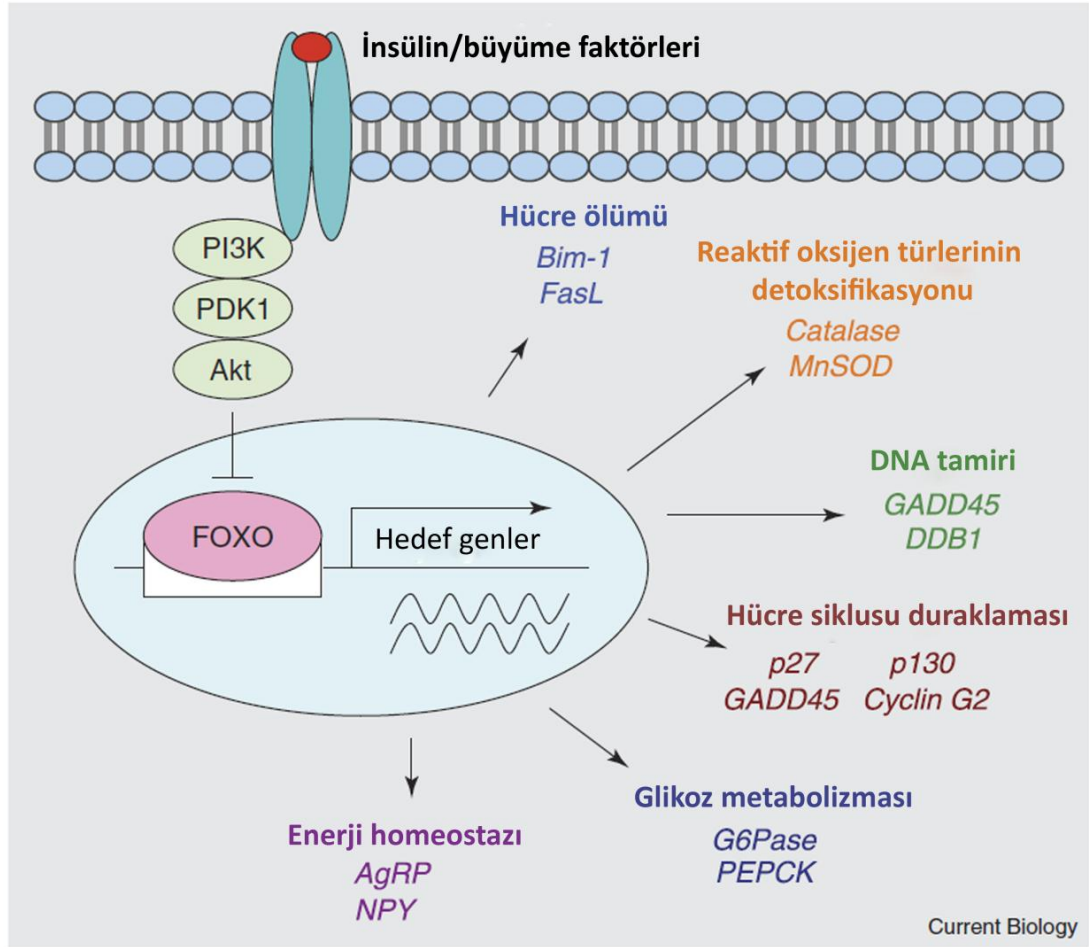
2.5.4. FoxO Moleküllerinin Hücresel Süreçlerdeki Roller

FoxO transkripsiyon faktörleri; apoptozun düzenlenmesi, hücre siklusunun duraklaması, oksidatif strese karşı dayanıklılık, DNA tamiri, glikoz metabolizması, enerji homeostazı ve hücresel farklılaşma gibi pek çok farklı süreçlerde önemli roller oynarlar (Şekil 2.13) [13, 16-19].

FoxO, FasL ve TRAIL gibi ölüm sitokinlerinin transkripsiyonunu ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bim molekülünü aktive ederek apoptozu başlatabilir [76-78]. Hücre siklus inhibitörü olan p27kip1 molekülünün uyarılmasını sağlayarak, hücre siklusunun durmasına neden olabilir. Ayrıca, reaktif oksijen türlerinin (ROS) detoksifikasyonunu sağlayan iki enzim olan katalaz ve manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) aktivasyonu ile de strese dayanıklılıkta; büyüme durdurucu ve DNA hasarı ile indüklenebilen protein 45 (GADD45) ve hasar spesifik DNA bağlayıcı protein 1 (DDB1) genlerinin upregülasyonu ile de DNA hasarının tamirinde rol alır [13].

Hücresel farklılaşma sürecinde FoxO ailesinin izoformlarına ve hücre tipine bağlı olarak, farklılaşmayı inhibe edici ve destekleyici fonksiyonları bulunmaktadır [53]. Örneğin adiposit ve miyoblastlarda aktif olan FoxO1 farklılaşmayı inhibe ederken [79, 80] ; FoxO3 eritrositlerde B hücresi translokasyon gen 1 (BTG1)'i indükleyerek farklılaşmayı destekleyici şekilde çalışmaktadır [81].

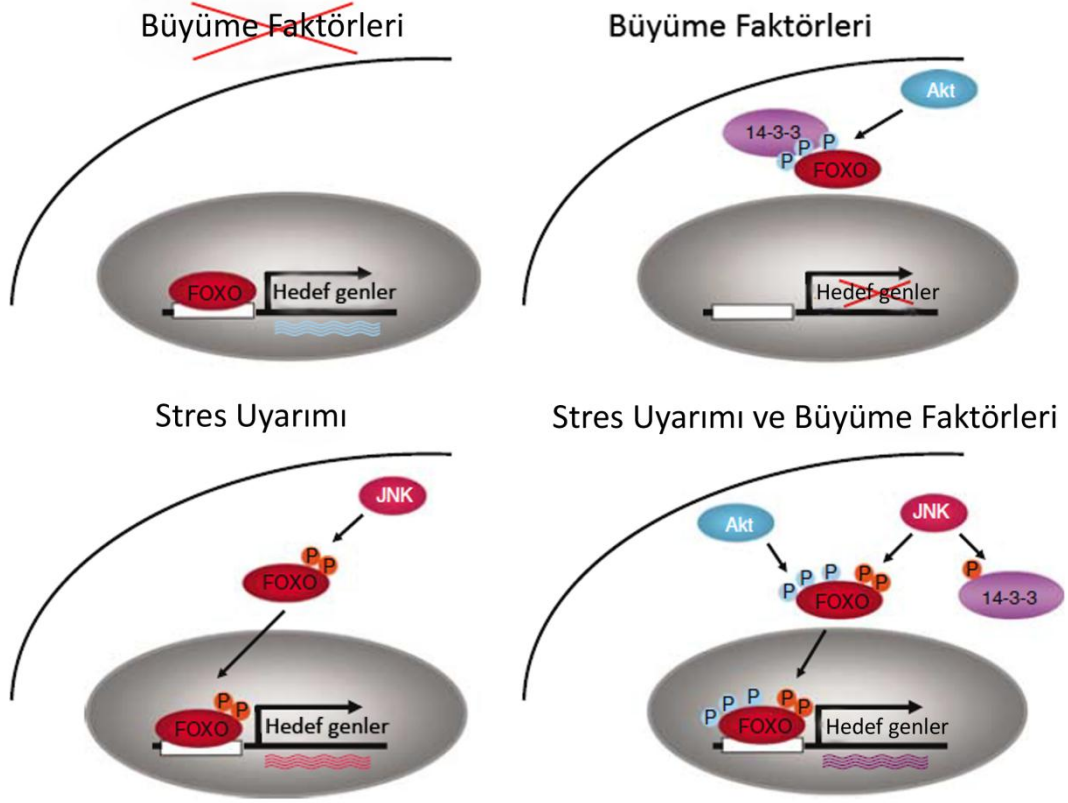
FoxO moleküllerinin glikoz metabolizması üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır. Bu etkisini, glikoz 6 fosfatı glikoza dönüştüren glikoz 6 fosfataz (G6Paz) enzim aktivitesini artırarak glukoneogenezi gerçekleştirerek yapar. Ayrıca glukoneogenezi, oksaloasetatı fosfofenolpürivata dönüştüren fosfofenolpürivat karboksikinaz (PEPCK) enzimi upregülasyonu ile de destekler [82-84].



Şekil 2.13. İnsülin/büyüme faktörleri olmadığında nükleusta bulunan FoxO ve düzenlediği hücresel olayları gösteren çizim [13].

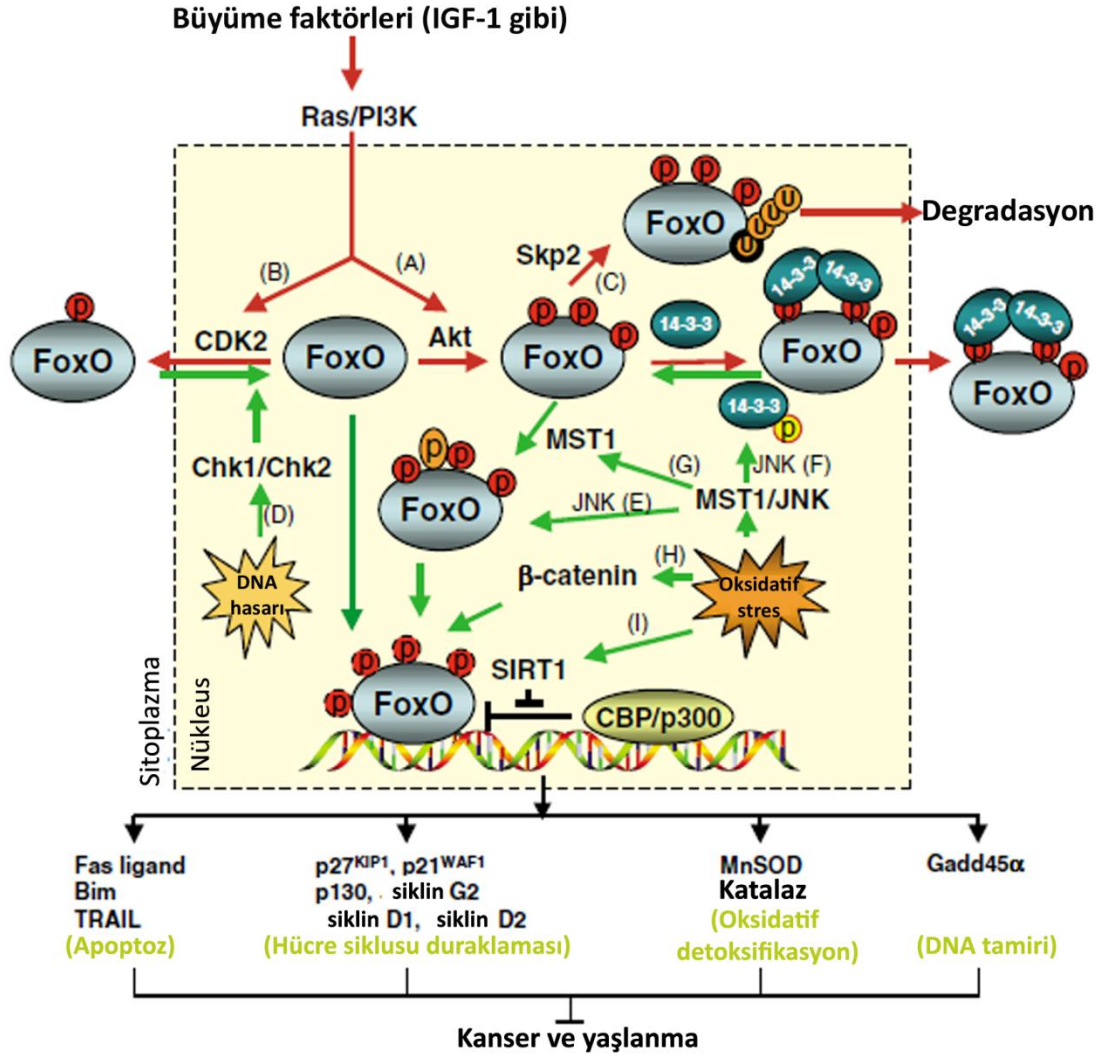
2.5.5. FoxO Transkripsiyon Faktörleri ve Stres Arasındaki İlişki

FoxO proteinleri büyüme faktörleri varlığında sitoplazmada lokalize olurken, oksidatif stres ya da genotoksik stres gibi stres koşulları altında büyüme faktörlerinin varlığında dahi nükleusta kalırlar [20-22]. Oksidatif stres, FoxO proteinlerinin Jun N terminal kinaz (JNK) yolağı aracılığı ile nüklear lokalizasyonuna neden olur [56]. JNK'nın, FoxO4'ü treonin447 ve treonin451 bölgelerinden fosforilleyerek nükleusta kalmasını sağladığı bilinmektedir [21]. Ayrıca JNK aktivasyonu, 14-3-3 proteinin Ser184 bölgesinden fosforilasyonuna ve sonucunda sitoplazmada FoxO proteinlerinin 14-3-3 proteininden ayrılmasına ve serbest kalmasına neden olur. Bu olay, FoxO proteinlerinin nüklear lokalizasyonu ve hedef genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanır (Şekil 2.14.) [85].



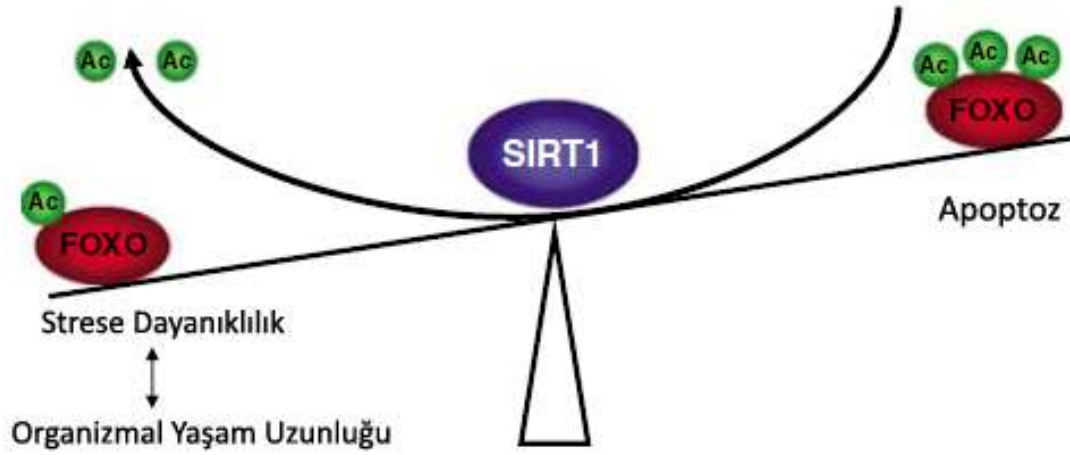
Şekil 2.14. Büyüme faktörleri ve stres uyarımı tarafından FoxO düzenlenmesi [53].

FoxO proteinlerinin CBP ve p300 gibi asetilazlar tarafından asetilasyonu, oksidatif strese yanıt olarak artmaktadır [69, 86, 87]. Asetillenmiş FoxO proteinleri nükleusta birikir ve aktivitelerini engelleyen promiyelositik lösemi protein (Pml) cisimleri ile ilişkide bulunur [87]. Nükleusta artan FoxO asetilasyonunun seviyesi, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD) bağımlı histon deasetilaz olan Sirtuin1 (SİRT1 (silent mating type information regulation 2 homolog)'in katıldığı ek bir diğer yolak tarafından düzenlemeyi gerektirir. SİRT1, hücrelerde büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile nükleusta lokalize olur [88, 89]. Stres uyarımı ile, SİRT1 nükleusta, FoxO proteinleri ile kompleks oluşturur ve FoxO proteinlerini deasetile eder [14, 69, 87] (Şekil 2.15). SİRT1 tarafından deasetile olan FoxO proteinleri, stres dayanıklılık genlerinin de dahil olduğu hedef genlerini aktive edebilecek duruma gelirler [65, 69].



Şekil 2.15. SIRT1 (Sirtuin 1) molekülünün FoxO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek FoxO transkripsiyonunu aktive ettiğini gösteren çizim [14].

Sirtuinler FoxO bağımlı cevapları; apoptozdan, hücre siklusu duraklaması ve stres dayanıklılığı yönünde değiştirirler [90, 91] (Şekil 2.16). Stres dayanıklılığı organizmal yaşam uzunluğu ile ilgili olduğundan [92], Sirtuinlerin FoxO faktörlerini etkileyerek ve stres dayanıklılığını sağlayarak yaşam süresini uzatabileceği düşünülmektedir [53].



Şekil 2.16. Sirtuin1'in FoxO transkripsiyon faktörlerini deasetile ederek, hücre yanıtını apoptozdan, stres dayanıklılığı yönünde değiştirdiğini ve yaşam süresinin uzamasına neden olduğunu gösteren çizim [53].

2.5.6. FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Üreme Sistemindeki Roller

Son yıllarda yapılan çalışmalar, FoxO transkripsiyon faktörlerinin spermatogenez ve oogeneiz süreçlerinde ve fertilitenin korunmasında önemli rollerinin olduğunu göstermiştir [23, 24].

Spermatogenez sürecinin başlaması ve spermatogonyal kök hücre homeostazı için FoxO proteinlerinin gerekli olduğu, FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 eksikliğinde spermatogonyal kök hücrelerin kendini yenileme özelliklerinin bozulduğu ve farklılaşmalarının da bloke olduğu, bunun sonucunda da spermatogenez sürecinde bozukluklar olduğu gösterilmiştir [23].

Yapılan diğer çalışmalar sonucunda, özellikle FoxO3a'nın oogeneiz sürecinde foliküler aktivasyonun baskılanması için gerekli olduğu bildirilmiştir. Eksikliği sonucunda; oosit büyümesi ve foliküler gelişme bozuklukları, fonksiyonel ovaryan foliküllerinin kaybı ve anovulasyon ile karakterize sekonder infertilitenin ortaya çıktığı gösterilmiştir [24-27].

FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli bir düzenleyicisi olan PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif fare embriyo gelişim sürecindeki varlığı ve embriyo gelişiminde önemli rolleri olduğu da yapılan bir çalışma sonucunda bildirilmiştir [12].

PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif embriyo gelişim sürecindeki varlığı ve önemi, kendisinin alt basamağında olan ve doğrudan düzenleyerek fonksiyonunu kontrol ettiği FoxO transkripsiyon faktörlerinin de embriyo gelişiminin farklı aşamalarında olabileceğini akla getirmektedir. Tüm bu sonuçlar, preimplantif gelişim sürecindeki embriyo gibi bir yandan hücre sayısını artırıp hızla farklılaşırken diğer yandan hayatta kalmak için hücrel mekanizmalarını çalıştıran, pek çok farklı koşullar altında canlılığını sürdürmeye ve koşullara adapte olmaya çalışan

embriyoda, böylesine önemli transkripsiyon faktörlerinin de bu süreçte önemli rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

2.6. Çalışmanın Hipotezi

Pek çok farklı yaşamsal olayda ve özellikle stres koşulları altında hücrenin hayatta kalması ya da ölmesi gibi önemli bir kararda rol oynayan FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücresel süreçteki görevleri ve önemi yapılan pek çok farklı çalışmalarla gösterilmiştir [13, 16-19, 21, 22]. Ayrıca FoxO moleküllerinin dişi ve erkek üreme sisteminde ve fertilitenin korunup devamlılığının sağlanmasındaki önemli rolleri de çalışmalar tarafından ortaya konmuştur [23-27]. Yapılan bir çalışmada FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli bir düzenleyicisi olan PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif fare embriyo gelişim sürecindeki varlığı ve embriyo gelişiminde önemli rollerinin varlığı belirlenmiştir [12]. Preimplantif gelişim sürecindeki bir yandan çoğalırken diğer yandan farklılaşan embriyonun, hayatta kalmaya ve sürekli değişen çevre koşullarına adapte olmaya çalışan bir hücre topluluğu olduğu düşünüldüğünde, FoxO transkripsiyon faktörlerinin bu süreçte de önemli rolleri olabilir. Literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin preimplantif embriyo gelişim sürecindeki ekspresyonları bilinmemektedir. Tüm bu literatür bilgisi ışığında, FoxO transkripsiyon faktörlerinin profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositlerden başlayarak preimplantif dönem embriyo gelişiminde ekspresyon alıyor olabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Süperovulasyon Protokolü

Süperovulasyon, dışarıdan hormon uygulaması ile genital döngüyü kontrol altına alarak, normal fizyolojik koşullarda elde edilebilen kaliteye en yakın, ancak çok daha fazla sayıda ve eş zamanlı olarak oosit ve embriyo elde etmek amacıyla kullanılan bir yöntemdir [93, 94]. Bu çalışmada dişi farelerde folikülogenezi stimüle etmek için bir Folikül uyarıcı hormon (FSH) analogu olan Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Sigma G-4877); ve ovulasyonu indüklemek için bir Luteinizing Hormon (LH) analogu olan Human Chorionic Gonadotropin (hCG, Sigma CG-10) kullanıldı.

3.1.1. Gonadotropinlerin Hazırlanışı

Farelerde uygulanan süperovulasyon protokollerinde PMSG ve hCG'nin önerilen çözeltisinde dozu, intraperitoneal 5 International Unit (I.U.)' dir. Bu çalışmada, uygulamadan önce PMSG ve hCG steril enjeksiyonluk su içerisinde 50 I.U./ml olacak şekilde sulandırıldı. Stok solüsyonlar alikuatlar şeklinde ayrılarak -80°C'de kullanıma kadar muhafaza edildi. Enjeksiyonun yapılacağı gün, hazırlanan bu alikuatlardan her hayvana 0,1 ml intraperitoneal yolla enjekte edildi.

3.1.2. Gonadotropinlerin Uygulanması

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nden elde edilen 5-6 haftalık BALB/C ırkı dişi ve çiftleştirme için 12-18 haftalık BALB/C ırkı erkek fareler kullanıldı. Balb/C ırkı dişi ve erkek fareler su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12'şer saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldular. Folikülogenezi stimüle etmek için her bir dişi fareye intraperitoneal yolla 0,1 ml'sinde 5 I.U. doz olacak şekilde PMSG enjeksiyonu yapıldı. Toplanacak embriyolar için, PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra ovulasyonu indüklemek amacıyla intraperitoneal yolla 0,1 ml'sinde 5 I.U. doz olacak şekilde hCG enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonunun yapıldığı günün akşamında dişi fareler, erkek fareler ile çiftleştirme kafesi içinde 2 dişi 1 erkek olacak şekilde gece boyunca çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi sabah vajinal plak kontrolü yapıldı ve vajinal plak varlığı belirlenen dişi fareler fertilizasyonun 0,5. gününde kabul edildi.

3.2. Oositlerin Toplanması

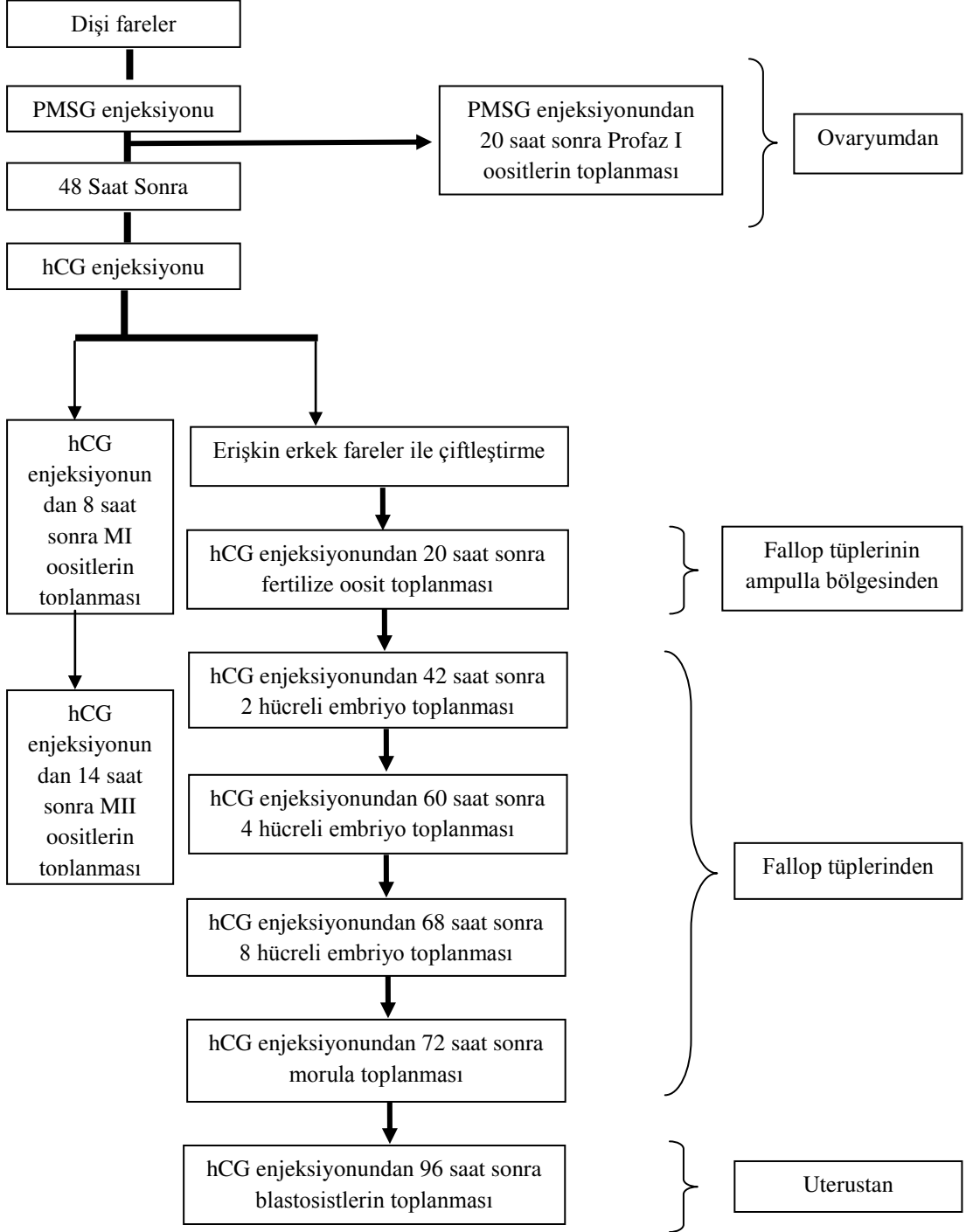
Dişi fareler PMSG enjeksiyonu yapıldıktan 20 saat sonra profaz I, hCG enjeksiyonu yapıldıktan 8 saat sonra metafaz I (MI) ve 14 saat sonra metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerin toplanabilmesi için servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Profaz I aşamasındaki oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin ovaryumları, MI ve MII aşamasındaki oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin fallop tüpleri alınarak G-MOPS (Vitrolife, 10129) medyumunun içerisine konuldu. Stereo

mikroskop (Zeiss Stemi SV 11) altında ovaryumların parçalanması ile profaz I aşamasındaki oositler, fallop tüplerinin parçalanması ile de MI ve MII aşamasındaki oositler toplandı. Ovaryum ve fallop tüplerinin penset ile bir tarafından sabitlenmesi sağlanarak diğer kısımlarının enjektör iğnesi ile parçalanması gerçekleştirildi ve oositlerin medyum içerisine çıkması sağlandı. Daha sonra medyum içerisindeki oositler stereo mikroskop altında toplandı ve 3 kez G-MOPS medyumundan geçirilerek yıkandıktan sonra, hyalüronidaz solüsyonu (Sigma H-4272) içerisine alındı ve böylece oositlerin etrafındaki kumulus hücreleri uzaklaştırıldı. Bu basamağın ardından elde edilen oositler fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu içerisine alındı. Oositlerin manipülasyonları oosit soyma pipeti kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3. Embriyoların Toplanması

Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu kabul edilen dişi fareler hCG enjeksiyonundan 20, 42, 60, 68, 72 ve 96 saat sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. 20. saatte farelerin fallop tüpleri çıkartılarak G-MOPS medyumuna içerisine alındı ve stereo mikroskop altında fallop tüpünün ampulla bölgesi bir tarafından sabitlenerek diğer kısımları enjektör iğnesi ile patlatıldı ve fertilize oositlerin medyum içerisine çıkması sağlandı. Medyum içerisindeki embriyolar soyma pipeti ile toplandı. 42. saatte 2 hücreli, 60. saatte 4 hücreli, 68. saatte 8 hücreli, 72. saatte morula aşamasındaki embriyolar yine fallop tüplerinin mikroskop altında patlatılması ile elde edildi. Doksan altıncı saatte farelerin uteruslarının yıkanması sonucunda blastosist aşamadaki embriyolar benzer şekilde elde edildi. Elde edilen tüm embriyolar PBS solüsyonu içerisine alındı. Yapılan işlemler Tablo 3.1’de özetlenmiştir.

Tablo 3.1. Fare oositlerinin ve embriyolarının elde edilmesini özetleyen şema.



3.4. İmmünfloresan Boyama

Çalışmada toplanan profaz I, metafaz I ve metafaz II aşamasındaki oositlerde ve preimplantif dönem embriyolarında (fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist) araştırılan FoxO1, FoxO3 ve Foxo4 proteinlerinin lokalizasyonlarının ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla immünfloresan yöntemi kullanılmıştır.

3.4.1. Kullanılan Solüsyonlar

- **%3 Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu**

6 gr paraformaldehit 200 ml bidistile suya konuldu ve içerisine NaOH eklenip manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica F20520162) tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Berrak çözelti oluşmasının ardından 1 tablet PBS karışıma eklendi (1X PBS, Sigma P4417). Solüsyonun pH'ı 6.4 olacak şekilde pH metre ile ölçülerek ayarlandı ve daha sonra solüsyon eşit hacimlere bölünerek -20°C' de kullanıma kadar saklandı.

- **PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat Tamponlu Tuz) Solüsyonu**

Bir tablet PBS 200 ml bisdistile su içerisinde çözülerek kullanılacak olan 1X PBS solüsyonu hazırlandı.

- **Permeabilizasyon Solüsyonu**

İki buçuk µl Triton X 100 (Sigma T8787) 1 ml PBS içerisinde % 0,25 oranında olacak şekilde çözüldü.

- **Antikor Dilüent Solüsyonu**

%0,1' lik Tween-20 içeren PBS solüsyonu, antikor dilüe edici solüsyonu olarak kullanıldı.

- **DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride)**

Nüklear boyanma için DAPI (Sigma D8417) 1:500 konsantrasyonunda 1X PBS içerisinde hazırlandı.

- **Kapatma Solüsyonu**

1ml gliserole (Sigma G5516) 1ml PBS eklenmesiyle oluşan solüsyon kapatma işlemi için kullanılmıştır.

Gözlem:

Tüm immünfloresan boyanma basamakları Zeiss Stemi SV11 marka stereo mikroskop altında yapıldı. İmmün boyama sonrasında floresan işaretli proteinlerin gözlemi ve değerlendirilmesi ise, Olympus BX61 marka motorize floresan mikroskop ve uygun filtreler kullanılarak yapıldı ve fotoğraflandı.

3.4.2. Oositlerde ve Preimplantif Dönem Embriyolarda FoxO Proteinlerinin Gösterilmesi

Çalışmada FoxO protein ailesinden FoxO1 (Cell Signalling 2880S), FoxO3 (Cell Signalling 2497S) ve FoxO4 (Santa Cruz SC-25359) 'ün profaz I, metafaz I, metafaz II oositlerdeki ve fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamalarındaki preimplantif dönem embriyolarındaki ekspresyonu immünfloresan boyama yöntemi ile belirlendi.

3.4.3. İmmünfloresan Boyama Yöntem Basamakları

Çalışmada uygulanan immünfloresan yöntemi aşağıdaki basamaklardan oluştu:

1. Oositler ve embriyolar, %3 PFA ile 20 dk oda ısısında tespit edildi.
2. Tespit işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3 kez 10' ar dakika PBS' den geçirilerek yıkama yapıldı.
3. Yıkamanın ardından oositler ve embriyolar, % 0,25'lik Triton X 100 solüsyonunun içerisinde 15 dk boyunca oda ısısında bekletilerek permeabilize edildi.
4. Permeabilizasyon işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3 kez 10'ar dakika PBS' den geçirilerek yıkama yapıldı.
5. Yıkama işleminin ardından oositler ve embriyolar, antikor dilüe edici solüsyon içerisinde hazırlanmış olan primer antikorların içerisine aktarıldılar ve gece boyu +4°C' de inkübe edildiler.
6. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3 kez 10' ar dakika PBS' den geçirilerek yıkama yapıldı.
7. Yıkama işleminin ardından oositler ve embriyolar, antikor dilüe edici solüsyon içerisinde hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor içerisine aktarıldılar ve 60 dk oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Sekonder antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3 kez 10'ar dakika PBS' den geçirilerek yıkama yapıldı.

9. Oositler ve embriyolar, nükleer DNA boyanması için DAPI solüsyonunun içine alınarak 1 dk boyunca inkübe edildi.
10. DAPI solüsyonu ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 1 kez PBS'den geçirilerek yıkama yapıldı.
11. Son olarak oositler ve embriyolar, floresan ışımının solmasını engelleyen 5 µl'lik kapatma solüsyonun bulunduğu lam üzerine alındı ve lamel ile hava boşluğu kalmayacak şekilde kapatma işlemi yapıldı.

Kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Tablo 3.2' de verilmiştir.

Tablo 3.2 İmmü floresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve dilüsyon oranları.

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NUMARASI	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	KATALOG NUMARASI	DİLÜSYON
FoxO1	CELL SIGNALLING 2880S	1/50	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1/300
FoxO3	CELL SIGNALLING 2497S	1/50	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1/300
FoxO4	SANTA CRUZ SC-25359	1/50	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1/300

BULGULAR

4.1. İmmünfloresan Bulguları

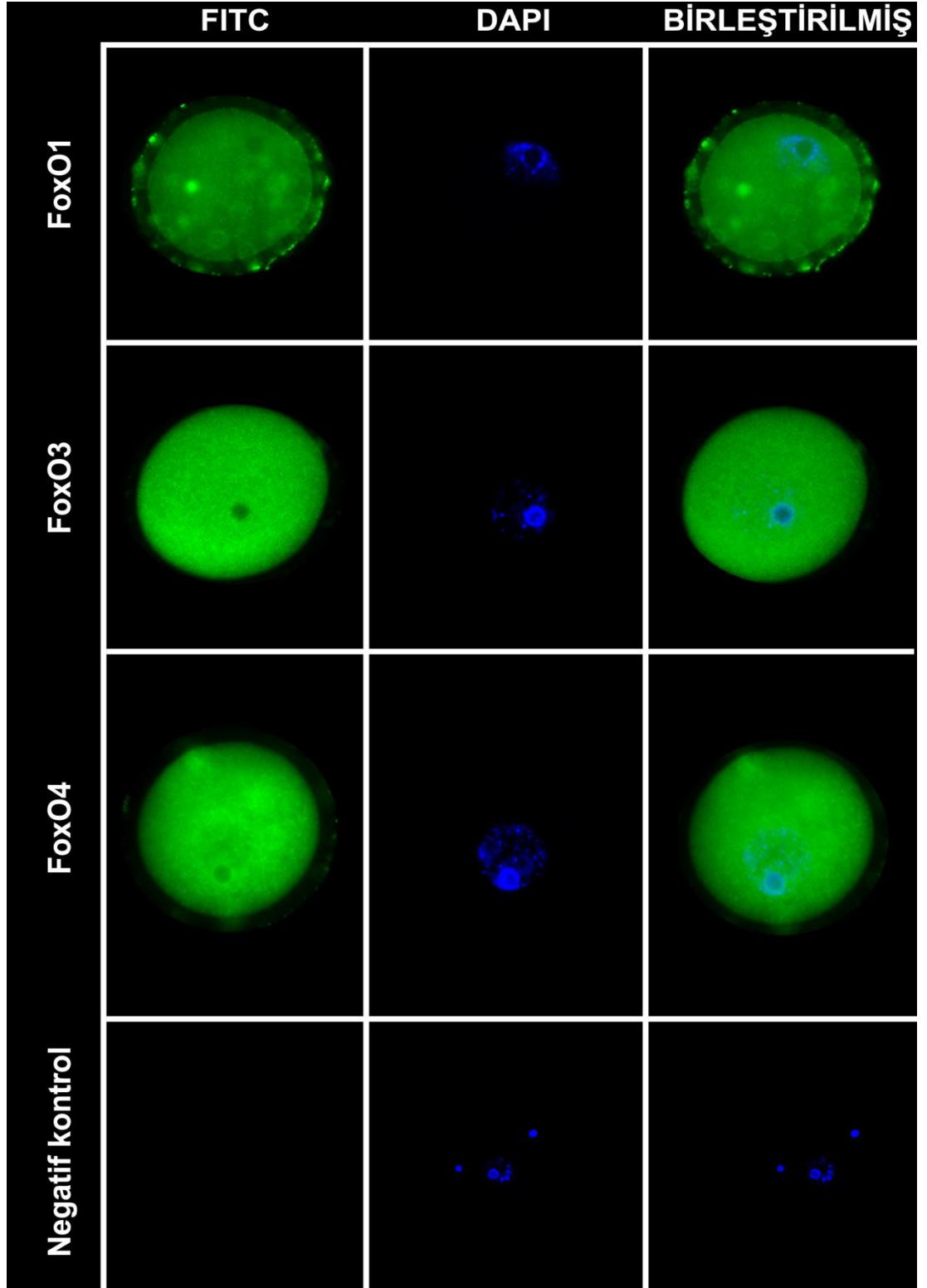
Yapılan bu çalışmada oosit ve preimplantif dönem embriyolardaki FoxO1, FoxO3, FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları ve yerleşim yerleri immünfloresan yöntemi kullanılarak belirlendi.

4.1.1. Oositlerde FoxO1, FoxO3, FoxO4 Proteinlerinin Ekspresyonları

Çalışmada profaz I, metafaz I ve metafaz II aşamalarındaki oositlerde FoxO1, FoxO3, FoxO4 proteinlerinin varlığı ve lokalizasyonları belirlendi. FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, oosit grupları ve proteinler düzeyinde karşılaştırıldı.

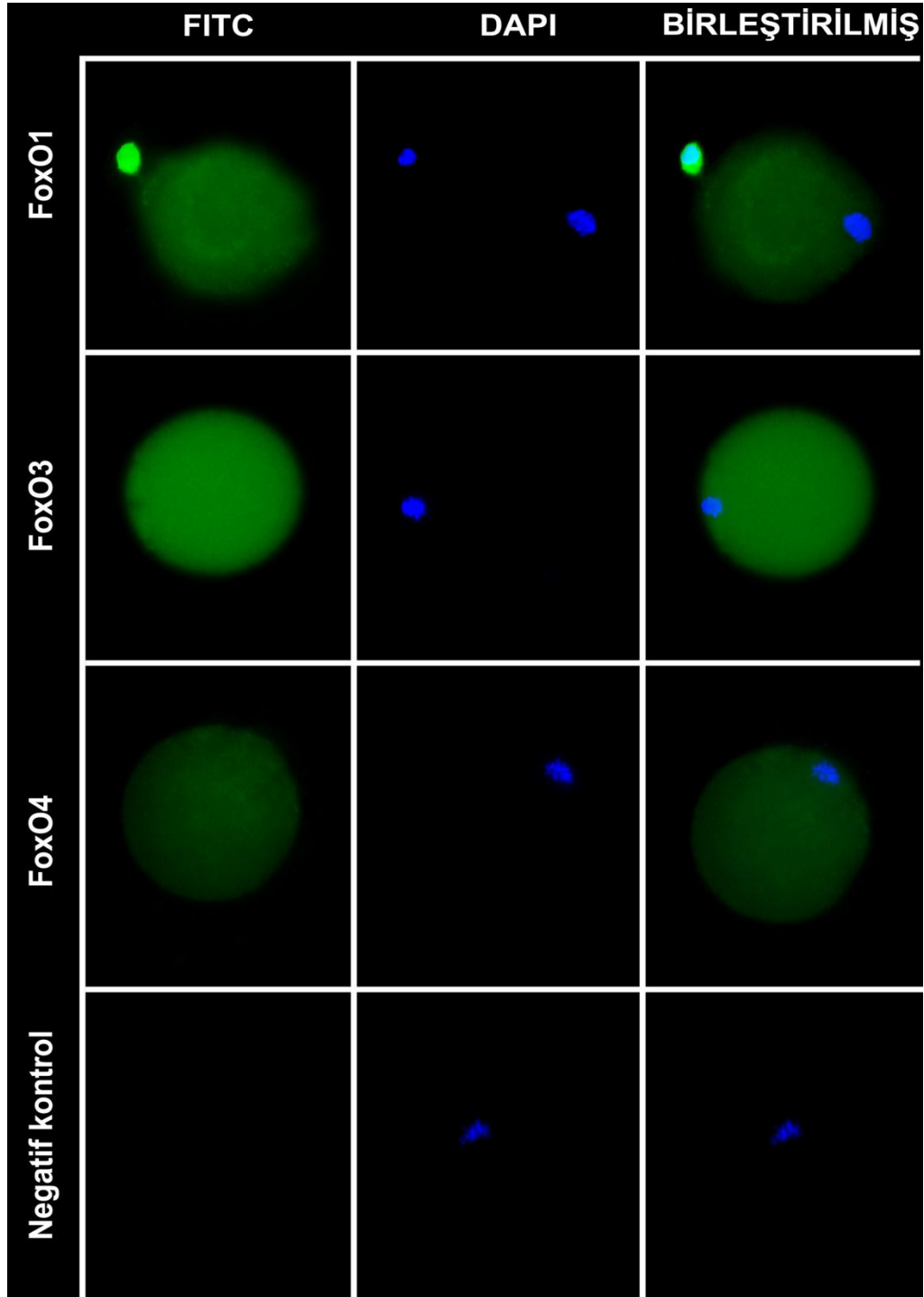
İmmünfloresan sonuçlarına göre; profaz I, metafaz I ve metafaz II aşamalarındaki oositlerde her üç proteinin de genel olarak sitoplazmada ekspres edildiği gözlemlendi.

Profaz I aşamasındaki oositlerde; FoxO1 proteininin ekspresyonunun zayıf şiddette olduğu, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonlarının ise benzer şekilde ve ekspresyon şiddetlerinin oldukça fazla ve yoğun olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



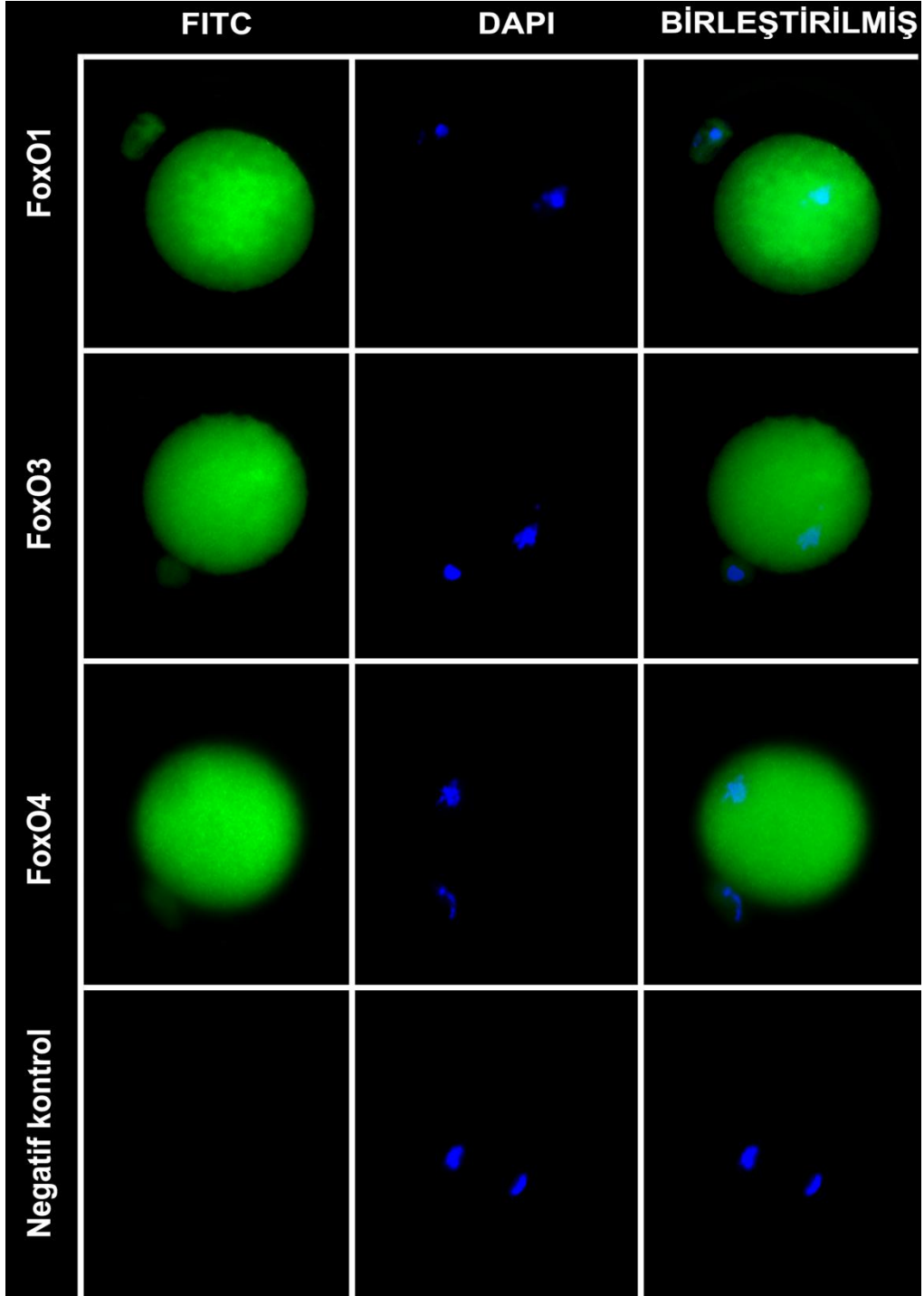
Şekil 4.1. Profaz I aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Metafaz I aşamasındaki oositlerde; FoxO1 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonlarının zayıf şiddette olduğu, FoxO3 proteininin ekspresyonunun ise daha yoğun olduğu görüldü. Ayrıca FoxO1 sonucunun gösterildiği panelde, oositin yanında bulunan granuloza hücredeki şiddetli sitoplazmik FoxO1 ekspresyonu da görülmektedir. (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Metafaz I aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Metafaz II aşamasındaki oositlerde; FoxO1 ve FoxO3 proteinlerinin ekspresyonlarının benzer ve yoğun şiddette olduğu, FoxO4 proteinin ekspresyonunun ise sitoplazmik olarak oldukça şiddetli şekilde ekspre edildiği gözlemlendi. Ayrıca her üç proteinin de polar cisim sitoplazmasındaki zayıf ekspresyonu dikkat çekti (Şekil 4.3).

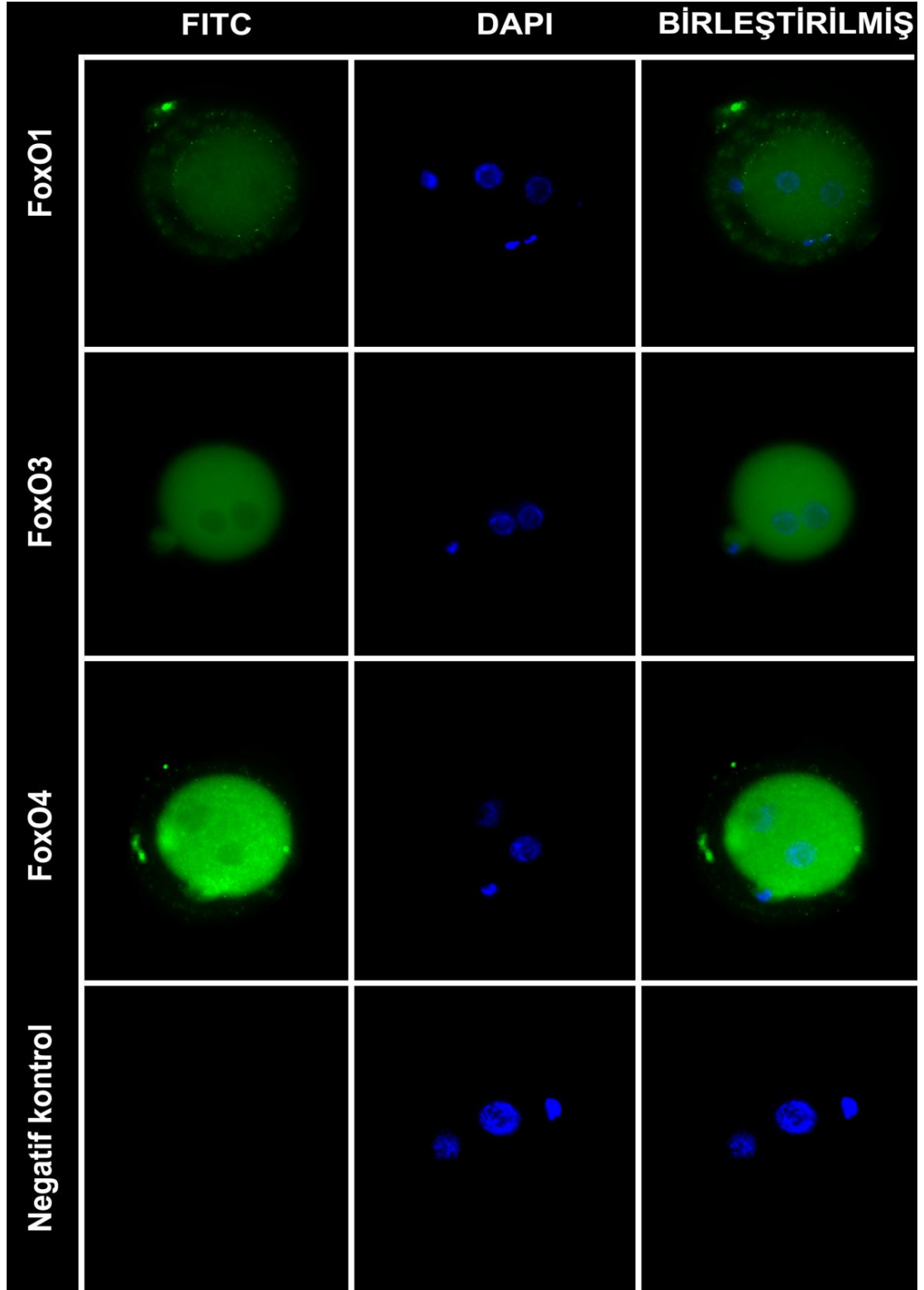


Şekil 4.3. Metafaz II aşamasındaki oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.2. Preimplantif Dönem Embriyolarda FoxO1, FoxO3, FoxO4 Proteinlerinin Ekspresyonları

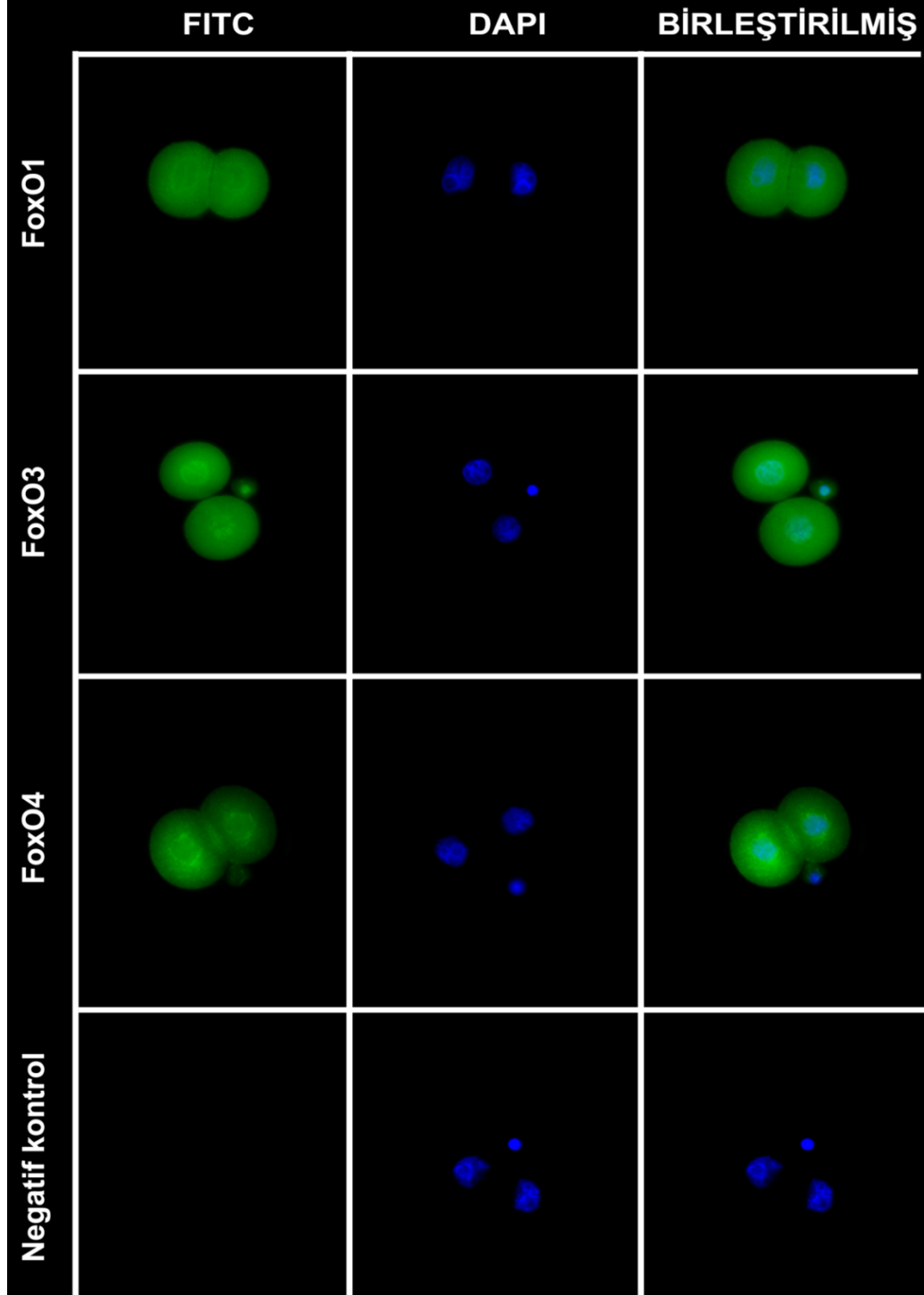
Çalışmada preimplantif dönem embriyoları; fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist evreleri olmak üzere 6 grup olarak ele alındı. Tüm grupların her birinde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin varlığının ve lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla immünfloresan yöntemi kullanıldı ve elde edilen sonuçlara göre gruplar arasında ve proteinler düzeyinde karşılaştırmalar yapıldı.

Fertilize oositlerde; FoxO1 proteininin ekspresyon şiddetlerinin zayıf ve sitoplazmik olduğu, FoxO3 proteininin FoxO1'e göre biraz daha ekspresyon şiddetinin fazla olduğu gözlemlendi. FoxO4 proteinin ekspresyon şiddetinin FoxO1 ve FoxO3 proteinlerine göre oldukça fazla şiddette ve yoğun olarak sitoplazmik olduğu belirlendi (Şekil 4.4).



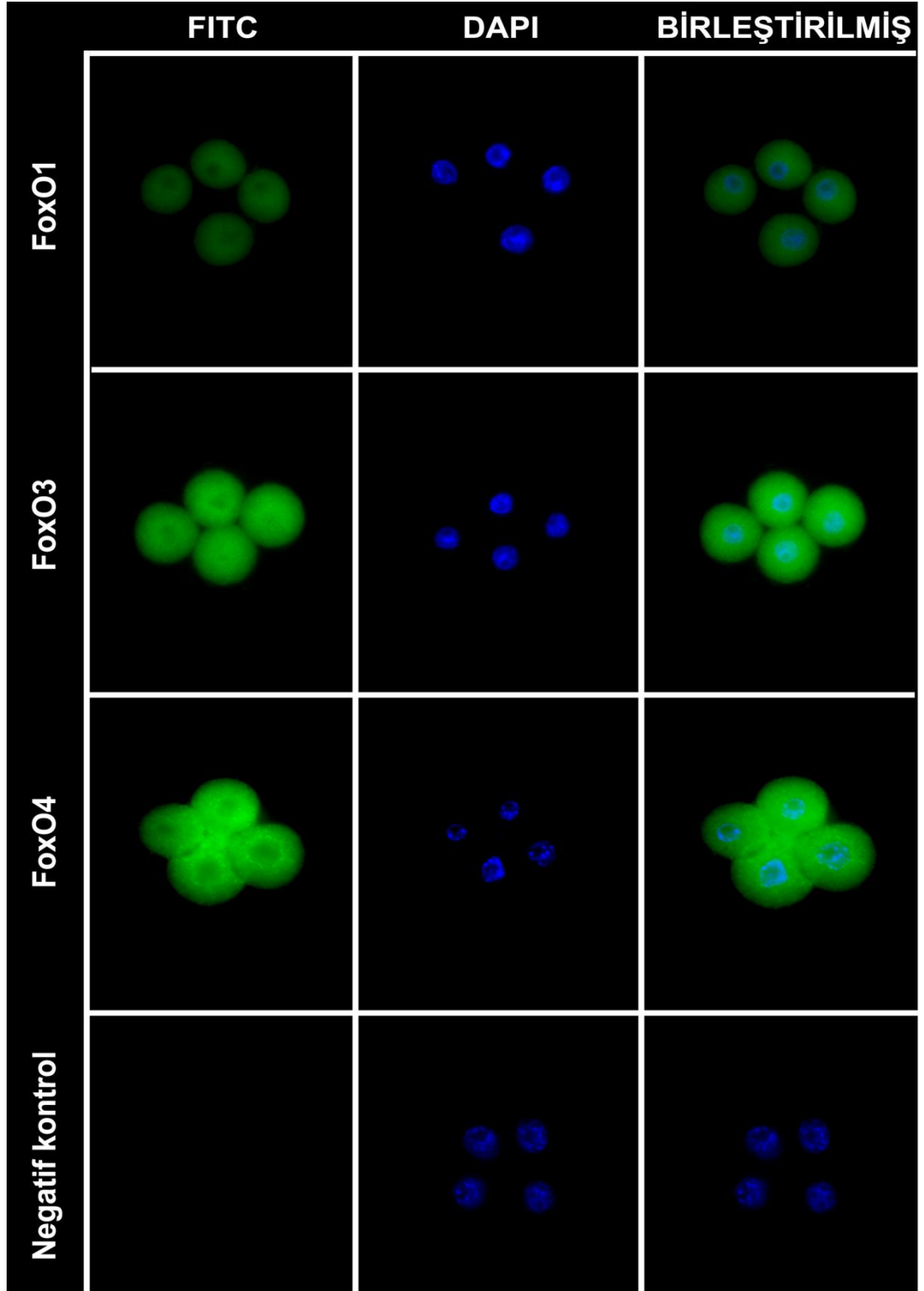
Şekil 4.4. Fertilize oositlerde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

İki hücreli embriyolarda; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin birbirlerine benzer şekilde yoğun şiddette ve sitoplazmik olarak ekspre edildiği belirlendi. Ancak 2 hücreli embriyolardaki her üç proteinin farklı şiddetlerde de olsa perinükleer ekspresyonu dikkat çekiciydi. (Şekil 4.5).



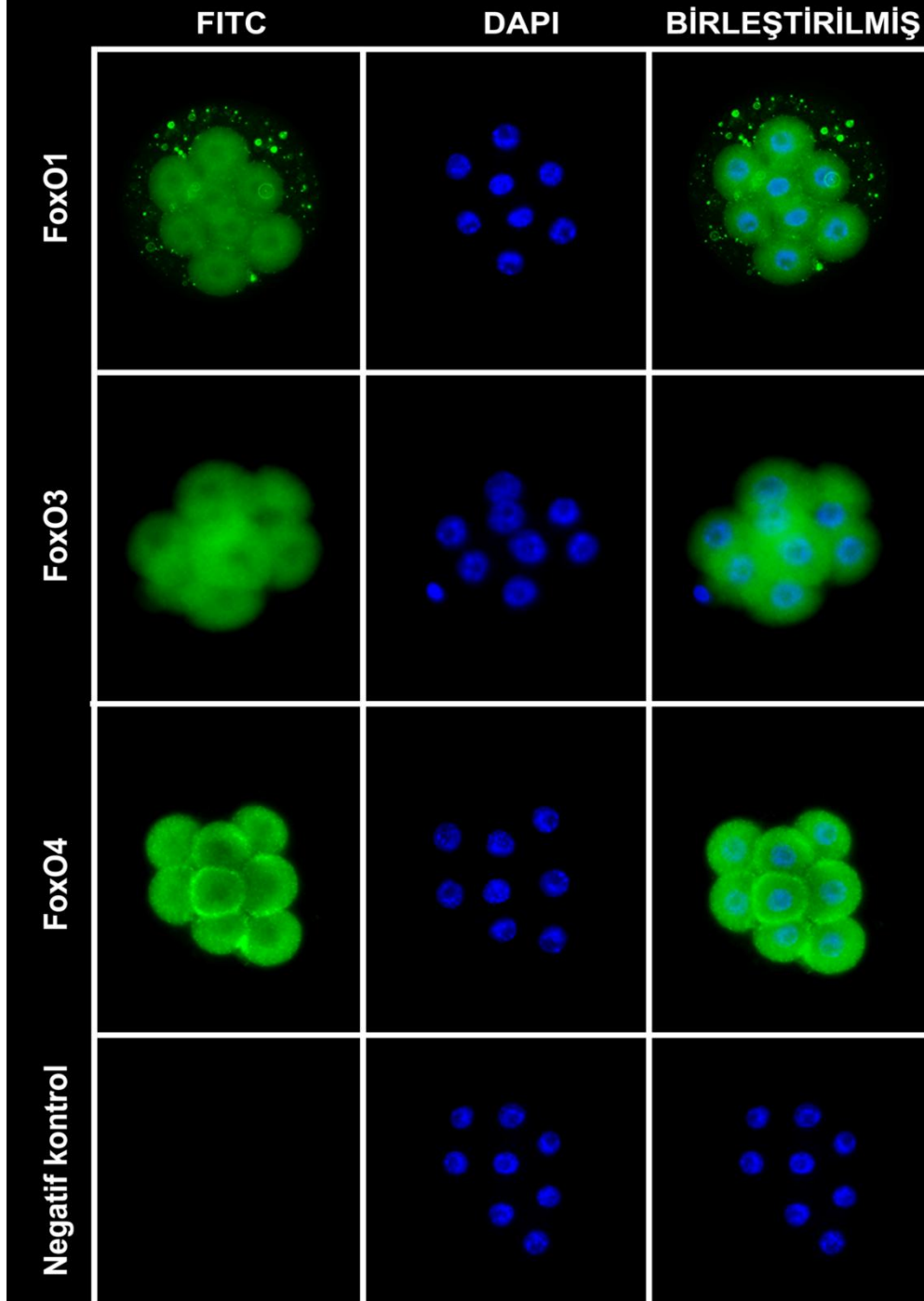
Şekil 4.5. İki hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Dört hücreli embriyolarda; FoxO1 proteininin ekspresyonunun zayıf ve sitoplazmik olduğu, FoxO3 proteininin ekspresyonunun FoxO1'e göre daha yoğun şekilde sitoplazmik olduğu ve FoxO4 proteininin ise, FoxO1 ve FoxO3 proteinlerine göre oldukça şiddetli ve yoğun şekilde sitoplazmik olarak ekspre edildiği gözlemlendi. Özetle, 4 hücreli embriyolarda; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonunun sırasıyla artan şekilde ekspresyon paterni gösterdiği belirlendi. Ayrıca 2 hücreli embriyo aşamasında görülen FoxO proteinlerinin perinükleer ekspresyonunun, 4 hücreli embriyo aşamasında sadece FoxO4 proteininde devam ettiği belirlendi (Şekil 4.6).



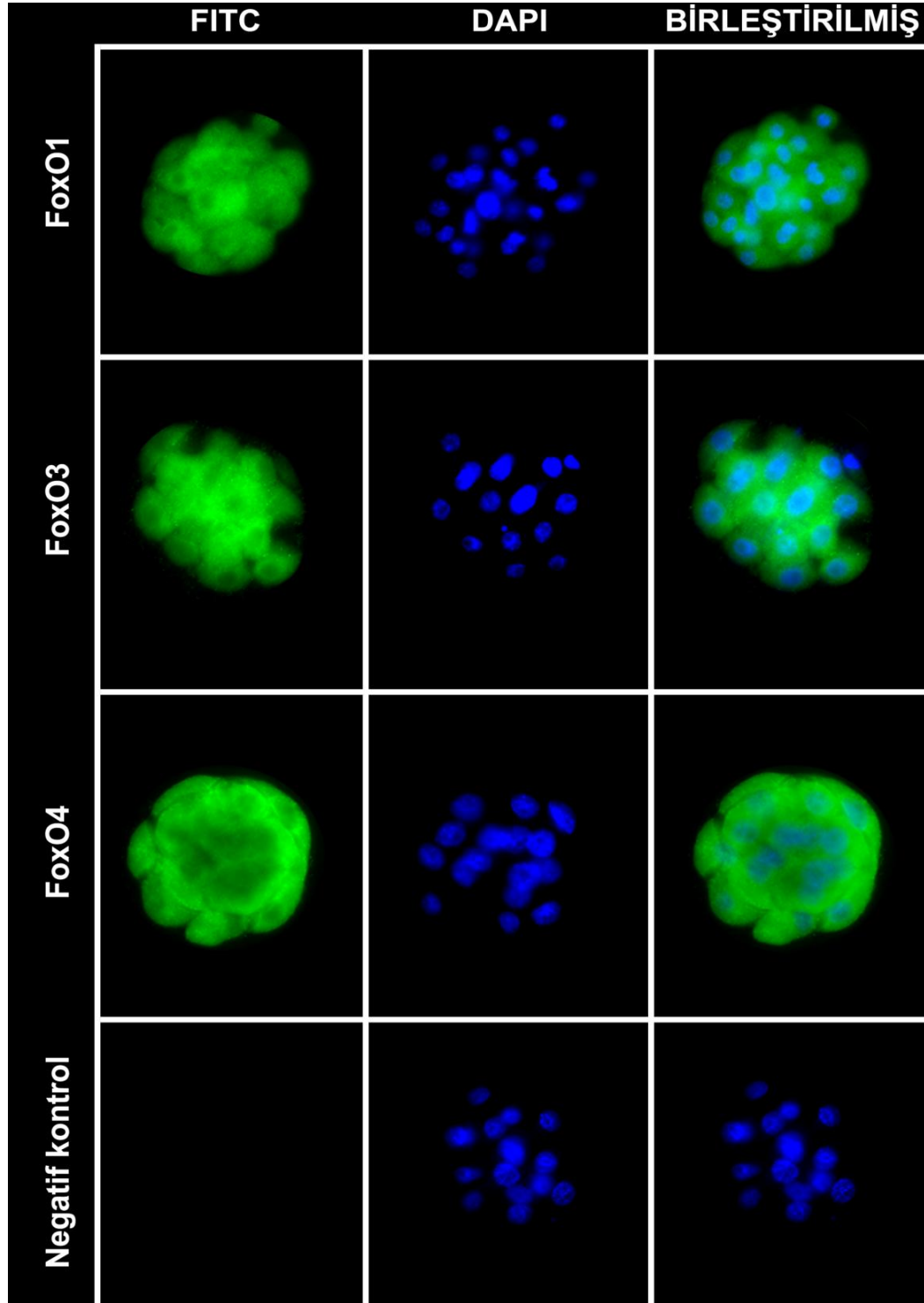
Şekil 4.6. Dört hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyüme 400X'dir.

Sekiz hücreli embriyolarda; FoxO1 ve FoxO3 proteinlerinin ekspresyon şiddetlerinin benzer şekilde orta şiddette ve sitoplazmik olduğu, FoxO4 proteininin ise, FoxO1 ve FoxO3 proteinlerine kıyasla ekspresyon şiddetinin daha fazla olduğu belirlendi. Ayrıca FoxO4 proteinin, 8 hücreli embriyoda blastomerlerin birbirlerine temas ettiği bölgelerde oldukça yoğun şekilde lokalize olması ve buradaki şiddetli ekspresyonu ise dikkat çekiciydi (Şekil 4.7).



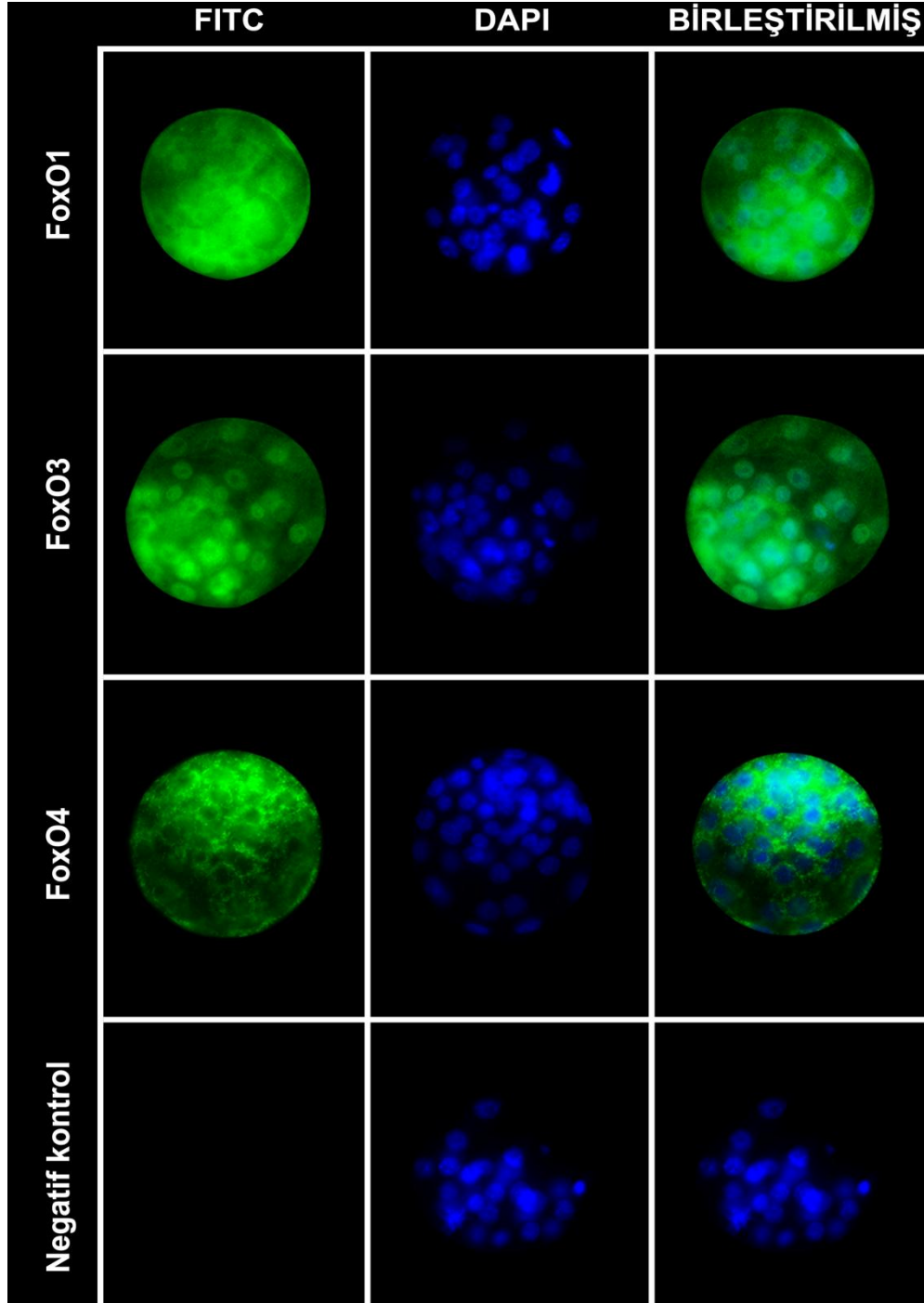
Şekil 4.7. Sekiz hücreli embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Morula aşamasındaki embriyolarda; FoxO1 ve FoxO3 proteinlerinin ekspresyonlarının orta şiddette ve sitoplazmik olduğu gözlenirken, FoxO4 proteininin blastomerlerin temas ettiği bölgelerdeki yoğun ekspresyonunun devam ediyor olması ise göze çarpan noktalardandı (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Morula aşamasındaki embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Blastosist aşamasındaki embriyolarda; FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonlarının yoğun olarak esasen iç hücre kitlesinde sitoplazmik ve bazı hücrelerde ise nüklear olarak ekspre edildiği belirlendi. Her üç proteinin trofoblastlarda zayıf da olsa sitoplazmik ekspre oldukları gözlemlendi. Ayrıca FoxO4 proteininin, hücre membranlarında oldukça yoğun bir şekilde ekspre olmaya devam ediyor olduğu görüldü (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Blastosist aşamasındaki embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

Yapılan immünfloresan sonuçlarına göre, oosit ve preimplantif dönem embriyolardaki FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin yoğunlukları semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucu Tablo 4.1’ de verilmiştir.

Tablo 4.1 İmmünfloresan sonuçlarına göre oosit ve preimplantif dönem embriyolarda yapılan semikantitatif değerlendirme sonuçları (+ : zayıf pozitif , ++ : pozitif, +++ : kuvvetli pozitif).

	FoxO1	FoxO3	FoxO4
Profaz I oosit	++	+++	+++
Metafaz I oosit	+	++	+
Metafaz II oosit	+++	+++	+++
Fertilize oosit	+	+	+++
2 hücreli embriyo	++	++	++
4 hücreli embriyo	+	++	+++
8 hücreli embriyo	++	++	+++
Morula	++	++	+++
Blastosist	++	++	+++

TARTIŞMA

Preimplantif embriyo gelişim süreci, başarılı bir implantasyonun olabilmesi ve oluşan gebeliğin sürdürülebilmesi açısından oldukça önemlidir. Bu dönemdeki embriyo fallop tüplerinden uterusu doğru implante olabilmek için ilerlemektedir ve bu süreçte bir yandan çoğalırken diğer yandan farklılaşan embriyo, hayatta kalmaya ve sürekli değişen çevre koşullarına adapte olmaya çalışan bir hücre topluluğudur. FoxO transkripsiyon faktörlerinin pek çok farklı yaşamsal olayda ve özellikle stres koşulları altında hücrenin hayatta kalması ya da ölmesi gibi önemli kararlarda rol oynadığı bilinmektedir ve hücresel süreçteki görevleri ve önemi yapılan pek çok farklı çalışmalarla gösterilmiştir [13, 16-19, 21, 22]. Ayrıca FoxO moleküllerinin dişi ve erkek üreme sisteminde ve fertilitenin korunup devamlılığının sağlanmasındaki önemli rolleri de çalışmalar tarafından ortaya konmuştur [23-27].

FoxO transkripsiyon faktörlerinin önemli bir düzenleyicisi olan PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif dönem fare embriyolarında varlığı ve embriyo gelişiminde önemli rolleri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [12]. PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif embriyo gelişim sürecindeki varlığı ve önemi, kendisinin alt basamağında doğrudan düzenleyerek fonksiyonunu kontrol ettiği FoxO transkripsiyon faktörlerinin de embriyo gelişiminin farklı aşamalarında olabileceğini akla getirmektedir ve literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin preimplantif embriyo gelişim sürecindeki ekspresyonları bilinmemektedir. Bu bilgiler doğrultusunda; FoxO transkripsiyon faktörlerinin profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositlerden başlayarak preimplantif dönem embriyo gelişim sürecinde varolabileceğini ve bazı koşullarda nükleusta aktive olabileceğini düşündük ve bu amaçla çalışmamızı planladık. Çalışmamızda, hücresel süreçte pek çok farklı ve hayati derecede önemli rolleri bulunan ve üreme sistemi üzerindeki etkileri ortaya konmuş olan FoxO transkripsiyon faktörlerinin, oositlerde ve preimplantif embriyo gelişim sürecindeki ekspresyonlarının var olup olmadığını, varsa lokalizasyonlarının nasıl olduğunu *in vivo* olarak araştırdık. Çalışmamız literatürde FoxO transkripsiyon faktörlerinin *in vivo* olarak profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki fare oositlerinde ve fare preimplantif embriyo gelişim sürecinde ekspresyonlarını gösteren ilk çalışmadır.

Çalışmamızda kullanılan immünfloresan yöntemi sonuçlarına göre, profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki fare oositlerinde ve fare preimplantif dönem embriyolarında (fertilize oosit, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula) FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları genel olarak sitoplazmik olarak izlenmiştir. Bu sonuç; profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki fare oositlerinde ve fare preimplantif dönem embriyolarında FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin

ekspresyonların sitoplazmik olarak ekspre edildiğini ve var olduklarını ancak nükleusta olmadıklarından dolayı nükleusta gösterdikleri rollerini yerine getirmek üzere aktif olmadıklarını göstermektedir. Blastosist iç hücre kitlesinde, FoxO1 ve FoxO3'ün nüklear lokalizasyonu ise bu durumdan farklı görünmektedir. Buna ek olarak, preimplantif embriyo gelişim süresince özellikle 8 hücre aşamasında FoxO4 proteininin ekspresyonunun blastomerlerin temas bölgelerinde yoğun olarak gözlenmesi ve blastomerlerin temas etmediği bölgelerde daha zayıf ekspresyonu, 8 hücreli embriyo aşamasında gerçekleşen kompaksiyon sürecinde FoxO4 proteinin rol oynuyor olabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgilerin daha detaylı olarak incelenmesi için ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Ayrıca, her üç proteinin de blastosist aşamasında yoğun olarak iç hücre kitlesinde ekspre edilmesi, iç hücre kitlesi ve trofoblast farklanma aşamasından itibaren, bu hücrelerde farklı rolleri olabileceğini düşündürmektedir. Deneyler sırasında bazı blastosistlerde iç hücre kitlesinde nüklear ekspresyon da izlenmiştir. Ancak, iç hücre kitlesindeki nüklear olarak düşünülen bu ekspresyonun, daha detaylı bir şekilde üç boyutlu olarak incelenmesi ve netleştirilmesi için konfokal mikroskopu çalışması gerekmektedir. Diğer yandan tam farklanma aşamasındaki bu ekspresyonu, hücre farklanması açısından önemli olabilir.

Riley ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışma [12], immünfloresan ve western blot yöntemleri kullanılarak preimplantif dönem fare embriyolarındaki PI3K/Akt sinyal yolağının varlığını ve fonksiyonelliğini gösteren ilk çalışmadır. Çalışmada, bu proteinlerin ekspresyonlarının fertilize oosit aşamasından morula aşamasına kadar olan embriyolarda hücre yüzeyinde lokalize olduğu, blastosist aşamasındaki embriyoda her iki proteinin de trofektoderm hücrelerinde apikal boyanma paterni gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmamız sonuçlarına göre de, blastosist aşamasındaki embriyoda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin ekspresyonları özellikle iç hücre kitlesinde yoğun olarak izlenirken, trofoblastlardaki ekspresyonları zayıf olarak izlenmiştir. Yapılan çalışma sonuçlarında trofektoderm hücrelerinde PI3K/Akt sinyal yolağının aktif olması, bu durumda FoxO proteinlerinin trofektoderm hücrelerinde zayıf ve sitoplazmik olarak beklenen ekspresyonu ile bizim sonuçlarımız ile uyumlu görülmektedir. Aynı şekilde blastosist iç hücre kitlesinde, PI3K/Akt sinyal yolağının bulunmaması nedeni ile sonuçlarımızda iç hücre kitlesinde FoxO proteinlerinin yoğun ve bazen nüklear olarak gözlenen ekspresyonları, yapılan çalışma sonuçları ile paralellik göstermektedir. Ayrıca çalışmada, Akt aktivasyonunun baskılanmasının blastosistin normal fizyolojisine önemli derecede etkileri olduğu görülmüştür. Özellikle insülin ile stimüle olan glikoz alımındaki azalma ve gelişimsel süreçte implantasyonu etkileyen blastosist hatching olayındaki önemli derecedeki gecikme, Akt aktivasyonun baskılanmasının önemli sonuçları olarak ortaya konmuştur. FoxO transkripsiyon faktörlerinin, PI3K/Akt sinyal yolağı tarafından düzenlendiği ve bu yolağın çalışması ile FoxO proteinlerinin fosforillenmesi ile nükleustan sitoplazmaya taşındığı ve bu olay sonucunda FoxO transkripsiyon faktörlerinin inaktivasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda, fizyolojik koşullar altında PI3K/Akt sinyal yolağının profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositlerde ve preimplantif dönem embriyolarda ekspre edilmesi ve FoxO proteinlerinin inaktif halde kalarak sitoplazmada ekspresyon göstermesi beklenen bir sonuçtur ve çalışmamızın sonuçları da bu bilgilerle paralellik göstermektedir.

Bulgularımızda yer verilmemiş olmakla birlikte, deneyler sırasında blastosist aşamasında olması beklenen ancak 4-8 hücreli gibi aşamalarda duraklamış olan bazı embriyolarda, FoxO proteinlerinin nüklear olarak ekspre edildiği gözlenmiştir. Bu sonuç doğrultusunda, FoxO proteinlerinin intrinsek (hücre içi) faktörler nedeniyle oluşan stres koşulları altında gerekli mekanizmaların transkripsiyonunu sağlamak ve hücre için gerekli mekanizmaları çalıştırmak amacıyla nükleusa taşınıyor olabileceği fikri desteklenmektedir. Nükleusta olan FoxO transkripsiyon faktörleri, apoptozun düzenlenmesi, hücre siklusunun duraklaması, reaktif oksijen türlerinin detoksifikasyonu, DNA tamiri, glikoz metabolizması, enerji homeostazı ve hücrel farklılaşma gibi pek çok farklı süreçlerde rol oynayan hedef genlerin transkripsiyonunu sağlayarak hayati rol oynamaktadır [13, 16-19].

Ayrıca, oositin ve embriyonunun intrinsek faktörler tarafından olumsuz yönde etkilenmesi ve stres koşulları altına girmesinin yanı sıra, oosit ve embriyonun içinde bulunduğu mikroçevresinden kaynaklanan ekstrinsek (hücre dışı) faktörlerin de hücreler için olumsuz koşullar yaratıp strese neden olabileceği düşünülmektedir. Oosit ve embriyo gibi tüm hücreler, böyle durumlar karşısında özellikle stresle başa çıkabilmesi için gerekli olan ve hücrenin ölümü ya da hayatta kalıp sağlıklı bir şekilde gelişimine devam edebilmesi gibi önemli kararları veren FoxO transkripsiyon faktörleri gibi moleküllere ve yollara ihtiyaç duymaktadır. FoxO transkripsiyon faktörlerinin hücrel süreçteki rolleri göz önünde tutulduğunda, stres koşulları altında FoxO transkripsiyon faktörlerinin nükleusa giderek aktive olması ve oosit ya da embriyoyu duraklatıp tamir mekanizmaları ile hücreyi kurtarmaya çalışması ve yeterli cevap alınamadığı takdirde de apoptozla ilgili genleri çalıştırarak hücre ölümünü sağlaması gibi olası fonksiyonlarının araştırılması gerekmektedir. Bu sonuçlar doğrultusunda elde edilen bilgiler, FoxO transkripsiyon faktörlerinin üreme sistemi ve fertilite açısından önemli olabileceği ihtimaline cevap verebilecektir.

Özellikle günümüzde yardımcı üreme teknikleri ile gebelik elde edilmesi amaçlanan kliniklerde, oosit ve preimplantif embriyo gelişimde bazı sorunlar yaşanmakta ve kaliteli embriyo ve/veya başarılı gebelik elde edilememektedir. Bu uygulamalarda kullanılan *in vitro* çalışma koşullarının oositi, embriyoyu ve FoxO transkripsiyon faktörlerini nasıl etkilediği bilinmemektedir. Özellikle *in vitro* çalışma koşullarında; oksidatif stresin, medyumların inkübasyon sürelerinin ya da içeriklerinin, oksijen konsantrasyonlarının, embriyo dondurma ve çözme işlemlerinin oosit ya da embriyolarda strese neden olup olmadığı ve bu koşullar altında FoxO transkripsiyon faktörlerinin aktive olup olmayacağı bilinmemektedir. Bizim çalışmamızın sonuçları ile literatürde ilk kez profaz I, metafaz I ve metafaz II evresindeki oositlerde ve preimplantif dönem embriyolarda FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 ekspresyonları gösterilmiştir ve bu bilgiler üzerine konuyla ilgili ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir. Bu çalışmalardan elde edilecek olan sonuçların kliniğe yansıtılmasının ise oldukça önemli olduğunu düşünmekteyiz. Bu sorulara cevaben ilgili araştırmaları planlayarak, FoxO transkripsiyon faktörlerinin preimplantif embriyo gelişim sürecindeki rollerini araştırmaya devam etmekteyiz.

SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada; fare profaz I, metafaz I ve metafaz II oostilerinde ve preimplantif dönem embriyolarında, FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin var olup olmadığı ve varsa lokalizasyonlarının nerede olduğu immünfloresan yöntemi ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde özetlenmiştir:

1. Fare profaz I, metafaz I ve metafaz II oostilerinde ve preimplantif dönem embriyolarında, FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin ekspre edildiğini ve lokalizasyon alanlarını *in vivo* olarak gösteren literatürdeki ilk çalışmadır.
2. FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 proteinlerinin genel olarak tüm oosit ve embriyo gruplarında, farklı ekspresyon şiddetlerinde, sitoplazmik olarak ekspre edildiği ve buna bağlı olarak da *in vivo* şartlarda sitoplazmada inaktif halde tutulduğu ortaya konmuştur.
3. Bulgularımız, PI3K/Akt sinyal yolağının preimplantif embriyo gelişim sürecindeki varlığını ve fonksiyonlarını ortaya koyan çalışma sonuçları [12] ile paralellik göstermektedir. PI3K/Akt sinyal yolağı varlığında negatif regüle olan ve sitoplazmada tutulması ile inaktif halde kalan FoxO transkripsiyon faktörlerinin, çalışmamız sonuçlarında da sitoplazmada gözlenen ekspresyonu, çalışmamızı ve hipotezimi doğrulamaktadır.
4. Çalışmamız bulgularında yer verilmemekle birlikte, deneyler sırasında blastosist aşamasında olması beklenirken 4-8 hücreli gibi aşamalarda duraklamış olan bazı embriyolarda, FoxO proteinlerinin nüklear olarak ekspre edildiği gözlenmiştir. Bu sonuç, intrinsek ortamda stres koşullarında FoxO transkripsiyon faktörlerinin nüklusta kalarak hücre için gerekli olan hedef gen transkripsiyonlarını sağlayabileceğini gösteren bir bulgudur. Ancak bu verilerin doğrulanması için ileri çalışmaların planlanarak yapılması gerekmektedir ve intrinsek faktörlerin yanı sıra ekstrinsek faktörlerin de oosit ve embriyo üzerindeki etkileri sonucunda FoxO transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonlarının nasıl değiştiği araştırılmalıdır.
5. Çalışmamız sonuçları, FoxO transkripsiyon faktörlerinin lokalizasyonlarının intrinsek ve ekstrinsek koşullara bağlı değişimlerinin esas alındığı çalışmaların sonuçları ile birlikte özellikle yardımcı üreme tekniklerine ışık tutacak olan bir çalışmadır ve ileride yapılacak olan çalışmalar için temel oluşturmuştur.

KAYNAKLAR

1. Sadler, T.W., Medikal Embriyoloji, 2005, Palme Yayıncılık.
2. Kierszenbaum, A.L., Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş, 2006, Palme Yayıncılık
3. Demir, R., İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi, 1995, Palme Yayıncılık
4. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>.
5. <http://www.fastbleep.com/biology-notes/32/159/865>.
6. http://depamphilislab.nichd.nih.gov/current_research_gene.html.
7. Schultz, R.M., Regulation of zygotic gene activation in the mouse. Bioessays, 1993. **15**(8): p. 531-8.
8. Wang, H. and S.K. Dey, Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. Nat Rev Genet, 2006. **7**(3): p. 185-99.
9. Ducibella, T. and E. Anderson, Cell shape and membrane changes in the eight-cell mouse embryo: prerequisites for morphogenesis of the blastocyst. Dev Biol, 1975. **47**(1): p. 45-58.
10. Manning, B.D. and L.C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
11. Hoshino, Y., et al., Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. Mol Reprod Dev, 2004. **69**(1): p. 77-86.
12. Riley, J.K., et al., The PI3K/Akt pathway is present and functional in the preimplantation mouse embryo. Dev Biol, 2005. **284**(2): p. 377-386.

13. Carter, M.E. and A. Brunet, FOXO transcription factors. *Curr Biol*, 2007. **17**(4): p. R113-4.
14. Huang, H. and D.J. Tindall, Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 15): p. 2479-87.
15. Kaestner, K.H., W. Knochel, and D.E. Martinez, Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev*, 2000. **14**(2): p. 142-6.
16. Medema, R.H. and M. Jaattela, Cytosolic FoxO1: alive and killing. *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(7): p. 642-643.
17. Lam, E.W.F., R.E. Francis, and M. Petkovic, FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**: p. 722-726.
18. Miyamoto, K., et al., Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(1): p. 101-112.
19. Neufeld, T.P., Shrinkage control: regulation of insulin-mediated growth by FOXO transcription factors. *J Biol*, 2003. **2**(3): p. 18.
20. Brunet, A., et al., Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004. **303**(5666): p. 2011-5.
21. Essers, M.A., et al., FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J*, 2004. **23**(24): p. 4802-12.
22. Huang, H., et al., CDK2-dependent phosphorylation of FOXO1 as an apoptotic response to DNA damage. *Science*, 2006. **314**(5797): p. 294-7.
23. Goertz, M.J., et al., Foxo1 is required in mouse spermatogonial stem cells for their maintenance and the initiation of spermatogenesis. *Journal of Clinical Investigation*, 2011. **121**(9): p. 3456-3466.
24. Liu, L., et al., Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development*, 2007. **134**(1): p. 199-209.
25. Castrillon, D.H., et al., Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, 2003. **301**(5630): p. 215-8.

26. John, G.B., et al., Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction*, 2007. **133**(5): p. 855-63.
27. John, G.B., et al., Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol*, 2008. **321**(1): p. 197-204.
28. PERSAUD, K.L.M.v.T.V.N., *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi*, 2009, Nobel Tıp Kitapevleri.
29. Bowman, P. and A. McLaren, Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morphol*, 1970. **24**(1): p. 203-7.
30. Harlow, G.M. and P. Quinn, Development of preimplantation mouse embryos in vivo and in vitro. *Aust J Biol Sci*, 1982. **35**(2): p. 187-93.
31. Streffer, C., et al., Kinetics of cell proliferation in the pre-implanted mouse embryo in vivo and in vitro. *Cell Tissue Kinet*, 1980. **13**(2): p. 135-43.
32. Brownell, M.S. and C.M. Warner, Ped gene expression by embryos cultured in vitro. *Biol Reprod*, 1988. **39**(4): p. 806-11.
33. Piotrowska, K. and M. Zernicka-Goetz, Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo. *Nature*, 2001. **409**(6819): p. 517-21.
34. Davies, T.J. and R.L. Gardner, The plane of first cleavage is not related to the distribution of sperm components in the mouse. *Hum Reprod*, 2002. **17**(9): p. 2368-79.
35. Plusa, B., K. Piotrowska, and M. Zernicka-Goetz, Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote. *Genesis*, 2002. **32**(3): p. 193-8.
36. Oron, E. and N. Ivanova, Cell fate regulation in early mammalian development. *Physical Biology*, 2012. **9**(4).
37. Gilbert, SF., *Developmental Biology*, 2013, Sinauer Associates, Inc.
38. Larue, L., et al., E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(17): p. 8263-7.
39. Leivo, I., et al., Appearance and distribution of collagens and laminin in the early mouse embryo. *Dev Biol*, 1980. **76**(1): p. 100-14.

40. Wang, H., et al., Zonula occludens-1 (ZO-1) is involved in morula to blastocyst transformation in the mouse. *Dev Biol*, 2008. **318**(1): p. 112-25.
41. Borland, R.M., J.D. Biggers, and C.P. Lechene, Studies on the composition and formation of mouse blastocoele fluid using electron probe microanalysis. *Dev Biol*, 1977. **55**(1): p. 1-8.
42. Watson, A.J., C.H. Damsky, and G.M. Kidder, Differentiation of an epithelium: factors affecting the polarized distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in mouse trophectoderm. *Dev Biol*, 1990. **141**(1): p. 104-14.
43. Wiley, L.M., Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. *Dev Biol*, 1984. **105**(2): p. 330-42.
44. <http://kinderwunsch.aim-hamburg.de/hizmetlerimiz/para-casais/ozel-hizmetler/blastosist-transferi/?lang=tr>.
45. Raff, M.C., Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992. **356**(6368): p. 397-400.
46. Weil, M., et al., Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *Journal of Cell Biology*, 1996. **133**(5): p. 1053-1059.
47. Dardik, A., R.M. Smith, and R.M. Schultz, Colocalization of transforming growth factor- α and a functional epidermal growth factor receptor (EGFR) to the inner cell mass and preferential localization of the EGFR on the basolateral surface of the trophectoderm in the mouse blastocyst. *Dev Biol*, 1992. **154**(2): p. 396-409.
48. Franke, T.F., D.R. Kaplan, and L.C. Cantley, PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, 1997. **88**(4): p. 435-7.
49. Lighten, A.D., et al., Expression of mRNA for the insulin-like growth factors and their receptors in human preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev*, 1997. **47**(2): p. 134-9.
50. Smotrich, D.B., et al., Immunocytochemical localization of growth factors and their receptors in human pre-embryos and Fallopian tubes. *Hum Reprod*, 1996. **11**(1): p. 184-90.
51. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, PI3K-PKB/Akt pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(9): p. a011189.

52. Alessi, D.R., et al., Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balph. *Curr Biol*, 1997. **7**(4): p. 261-9.
53. Greer, E.L. and A. Brunet, FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 2005. **24**(50): p. 7410-25.
54. Biggs, W.H., 3rd, W.K. Cavenee, and K.C. Arden, Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome*, 2001. **12**(6): p. 416-25.
55. Van Der Heide, L.P., M.F. Hoekman, and M.P. Smidt, The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem J*, 2004. **380**(Pt 2): p. 297-309.
56. Sedding, D.G., FoxO transcription factors in oxidative stress response and ageing--a new fork on the way to longevity? *Biol Chem*, 2008. **389**(3): p. 279-83.
57. Brunet, A., et al., 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *Journal of Cell Biology*, 2002. **156**(5): p. 817-28.
58. Zhao, X., et al., Multiple elements regulate nuclear/cytoplasmic shuttling of FOXO1: characterization of phosphorylation- and 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *Biochem J*, 2004. **378**(Pt 3): p. 839-49.
59. Brunet, A., et al., Protein kinase SGK mediates survival signals by phosphorylating the forkhead transcription factor FKHL1 (FOXO3a). *Mol Cell Biol*, 2001. **21**(3): p. 952-65.
60. Rena, G., et al., Roles of the forkhead in rhabdomyosarcoma (FKHR) phosphorylation sites in regulating 14-3-3 binding, transactivation and nuclear targeting. *Biochem J*, 2001. **354**(Pt 3): p. 605-12.
61. Hu, M.C., et al., IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*, 2004. **117**(2): p. 225-37.
62. Maiese, K., et al., The "O" Class: Crafting Clinical Care with FoxO Transcription Factors. *Forkhead Transcription Factors: Vital Elements in Biology and Medicine*, 2009. **665**: p. 242-260.

63. Nasrin, N., et al., DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(19): p. 10412-7.
64. Fukuoka, M., et al., Negative regulation of forkhead transcription factor AFX (Foxo4) by CBP-induced acetylation. *Int J Mol Med*, 2003. **12**(4): p. 503-8.
65. van der Horst, A., et al., FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(28): p. 28873-28879.
66. Li, M.Y., et al., Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(52): p. 50607-50611.
67. Daitoku, H., et al., Silent information regulator 2 potentiates Foxo1-mediated transcription through its deacetylase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(27): p. 10042-10047.
68. Puigserver, P., et al., Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 alpha interaction. *Nature*, 2003. **423**(6939): p. 550-555.
69. Brunet, A., et al., Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 2004. **303**(5666): p. 2011-2015.
70. Motta, M.C., et al., Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, 2004. **116**(4): p. 551-563.
71. Matsuzaki, H., et al., Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(20): p. 11285-90.
72. Plas, D.R. and C.B. Thompson, Akt activation promotes degradation of tuberlin and FOXO3a via the proteasome. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12361-6.
73. Huang, H., et al., Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(5): p. 1649-54.
74. Aoki, M., H. Jiang, and P.K. Vogt, Proteasomal degradation of the FoxO1 transcriptional regulator in cells transformed by the P3k and Akt oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(37): p. 13613-7.

75. van der Horst, A., et al., FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol*, 2006. **8**(10): p. 1064-U40.
76. Brunet, A., et al., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999. **96**(6): p. 857-68.
77. Dijkers, P.F., et al., FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *Journal of Cell Biology*, 2002. **156**(3): p. 531-542.
78. Gilley, J., P.J. Coffey, and J. Ham, FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *Journal of Cell Biology*, 2003. **162**(4): p. 613-22.
79. Hribal, M.L., et al., Regulation of insulin-like growth factor-dependent myoblast differentiation by Foxo forkhead transcription factors. *Journal of Cell Biology*, 2003. **162**(4): p. 535-41.
80. Nakae, J., et al., The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell*, 2003. **4**(1): p. 119-29.
81. Bakker, W.J., et al., FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *Journal of Cell Biology*, 2004. **164**(2): p. 175-84.
82. Schmoll, D., et al., Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balph and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
83. Nakae, J., et al., The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest*, 2001. **108**(9): p. 1359-67.
84. Yeagley, D., et al., Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription. Roles of forkhead and insulin response sequences. *J Biol Chem*, 2001. **276**(36): p. 33705-10.
85. Sunayama, J., et al., JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *Journal of Cell Biology*, 2005. **170**(2): p. 295-304.

86. Frescas, D., L. Valenti, and D. Accili, Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(21): p. 20589-20595.
87. Kitamura, Y.I., et al., FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metabolism*, 2005. **2**(3): p. 153-163.
88. Langley, E., et al., Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *Embo Journal*, 2002. **21**(10): p. 2383-2396.
89. Vaziri, H., et al., hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 2001. **107**(2): p. 149-159.
90. Furukawa-Hibi, Y., et al., FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. **277**(30): p. 26729-26732.
91. Tran, H., et al., DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*, 2002. **296**(5567): p. 530-534.
92. Kirkwood, T.B. and S.N. Austad, Why do we age? *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 233-8.
93. Gates, A.H., Viability and developmental capacity of eggs from immature mice treated with gonadotrophins. *Nature*, 1956. **177**(4512): p. 754-5.
94. GATES, A.H., Maximizing yield and developmental uniformity of eggs., in *Methods in mammalian embryology* 1971, San Francisco: W. H. Freeman & Co. p. 64-75.

ÖZGEÇMİŞ

Nilay KUŞCU 1988 yılında Ankara’da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini 2002 yılında Kurtuluş İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini 2005 yılında Kurtuluş Lisesi’nde tamamladı. Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2010 yılında 2.’lik ve onur derecesi ile mezun oldu. 2011 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda “Üreme Biyoloji” programında yüksek lisansa başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.