

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

**SİRKADİYEN RİTMİN FAREDE OVARYUMDA
FOLİKÜL GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
HİPPO SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARMİN ASADOVA

İSTANBUL-2023

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

**SİRKADİYEN RİTMİN FAREDE OVARYUMDA
FOLİKÜL GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN
HİPPO SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNDEN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NARMİN ASADOVA

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. AYLİN YABA UÇAR

İSTANBUL-2023

TEZ ONAYI FORMU

Enstitü : Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program : Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans Programı
Tez Başlığı : Sirkadiyen Ritmin Farede Ovaryumda Folikül Gelişimi Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi
Tez Sahibi : Narmin Asadova
Sınav Tarihi : 27/07/2023

Bu çalışma jürimiz tarafından kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı-Soyadı (Kurumu)
Tez danışmanı:	Prof. Dr. Aylin Yaba Uçar
Üye:	Prof. Dr. Gökhan Akkoyunlu
Üye:	Doç. Dr. Alev Cumbul

ONAY

Bu tez Yeditepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bayram Yılmaz

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Narmin Asadova



İTHAF

Benim için dünyanın en değerli insanı olan anneme ithaf ediyorum...



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmamın tüm aşamalarında bilgi ve tecrübeleri ile yanımda olan, desteğini esirgmeden sabır ve inançla yol gösteren, akademik duruşu ve karakteri ile örnek olan, bana kattığı hayat tecrübelerinden dolayı danışman hocam Prof. Dr. Aylin Yaba Uçar'a,

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca, tecrübelerinden, bilgilerinden, faydalandığım, güler yüzleri ile her sorumuza ve sorunumuza yürekten destek olan hem hoca hem arkadaş gibi yardımlarını hiç esirgemiyen değerli Ecem Yıldırım ve Dr. Tuğçe Önel hocalarıma,

Tezimin deneysel sürecinde verdikleri destek için Zeynep Alkan Öztürk ve Dr. Cihan Süleyman Erdoğan'a,

Tez yazımımın tüm aşamalarında bana destek olan, Türkçemin yetmediği zamanlarda her zaman yardım edip, destek olan arkadaşım Serra Nur Ersoy'a,

Çalışma sürecim boyunca yanımda olan ekip arkadaşlarım Ezgi Şahin ve İlayda Kaya'ya,

Akademik hayatımızda beraber adımladığımız, her zorluk ve güzelliklerden beraber geçtiğimiz hiç bir zaman manevi maddi yardımını sevgisini esirgemiyen elinden gelenin ötesini yapan ailem gibi olan yol ve ev arkadaşım Elaza Aliyeva'ya,

Bu zorlu yolda mesafelere rağmen gösterdiği anlayış ve desteği için, sevgili nişanlım Eltun Gojayeva'a,

Hayal ve hedeflerimi gerçekleştirmemde her zaman yanımda olan, koşulsuzca sevgilerini, yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen, eğitim gördüğüm süre boyunca da maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan sevgili aile üyelerime, başta hayatım boyunca yanımda olan beni sevgiyle, özveriyle büyüten annem Lamie Mikayılova'ya, her türlü desteği sağlayan babam Vuqar Asadov'a ve her zaman sevgi, ilgi ve desteğini esirgemeyen canım küçük kardeşim Bahruz Asadova'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI FORMU	iii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLolar LİSTESİ	ix
KISALTMALAR VE SEMBOLLER	x
ABSTRACT.....	xi
ÖZET	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi ve Ovaryumlar	3
2.1.1 Ovaryumun Anatomisi	3
2.1.2. Ovaryum Histolojisi.....	4
2.1.3. Ovaryumun Embriyolojisi	5
2.1.4. Folikülogenez.....	6
2.2. Sirkadiyen Ritim	7
2.2.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizması	8

2.2.2. Sirkadiyen Ritim ve Ovaryum	10
2.3. Hippo Sinyal Yolağı	11
2.3.1. Hippo Sinyal Yolağı ve Folikül Gelişimi	13
2.3.2. Hippo Sinyal Yolağı ve Oosit	14
2.3.3. Hippo Sinyal Yolağı ve Granüloza Hücreleri	15
2.4. Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) Transkripsiyonu	15
2.4.1 mTERT ve Sirkadiyen Ritim	17
3.MATERYAL VE METOD	19
3.1. Deney Modeli	19
3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirmeler	20
3.3. İmmüno Floresan boyama	21
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR).....	21
3.4.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi	21
4. BULGULAR.....	25

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı.....	3
Şekil 2.2 (A) İnsan ve (B) farede dişi üreme sistemini karşılaştırılması.....	4
Şekil 2.3 Ovaryumun histolojisi.....	5
Şekil 2.4 Foliküler gelişim (Folikülogenez).....	7
Şekil 2.5 Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması.....	9
Şekil 2.6 Memelilerde Hippo yolağı.....	12
Şekil 3.1 Deney modelinin şematik tasarımı.....	19
Şekil 3.2 Çalışma dizaynı.....	20
Şekil 4.1 Fare kontrol grubu ovaryum dokularının morfolojik ve histolojik değerlendirilmesi.....	25
Şekil 4.2 Fare deney grubu ovaryum dokularının morfolojik ve histolojik değerlendirilmesi.....	26
Şekil 4.3 Kontrol grubu ovaryum dokularında PER2 immüno Floresan boyama.....	28
Şekil 4.4 Deney grubu ovaryum dokularında PER2 immüno Floresan boyama.....	29
Şekil 4.5 Kontrol ve Deney gruplarında PER2 ekspresyonunun istatistiksel analizi.....	30
Şekil 4.6 Kontrol grubu ovaryum dokularında YAP1'ün immüno Floresan boyama.....	31
Şekil 4.7 Deney grubu ovaryum dokularında YAP1'ün immüno Floresan boyama.....	32
Şekil 4.8 Kontrol ve Deney gruplarında YAP1 ekspresyonunun istatistiksel analizi.....	33
Şekil 4.9 Kontrol grubu ovaryum dokularında TEAD4'ün immüno Floresan boyama.....	34
Şekil 4.10 Deney grubu ovaryum dokularında TEAD4'ün immüno Floresan boyama.....	35
Şekil 4.12 Kontrol ve Deney gruplarında TEAD4 ekspresyonunun istatistiksel analizi.....	36
Şekil 4.13 Kontrol grubu ovaryum dokularında mTERT immüno Floresan boyama.....	37
Şekil 4.14 Deney grubu ovaryum dokularında mTERT immüno Floresan boyama.....	38
Şekil 4.15 Kontrol ve Deney gruplarında mTERT ekspresyonunun istatistiksel analizi.....	39
Şekil 4.16 Ovaryum dokularında Sirkadiyen ritim genlerinin mRNA analizi.....	40
Şekil 4.17 Ovaryum dokularında Hippo sinyal yolağı genlerinin mRNA analizi.....	41
Şekil 4.16 Ovaryum dokularında mTERT ekspresyonunun mRNA analizi.....	42
Şekil 5.1 Sirkadiyen ritmin bozulduğu fare ovaryumunda, Hippo sinyal yolağı ve mTERT ilişkisi.....	47

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği.....	22
Tablo 2. qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği.....	22
Tablo 3. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri.....	23
Tablo 4. qRT-PZR deneyinde kullanılan primerler.....	23



KISALTMALAR VE SEMBOLLER

CRY1:	Kriptokrom 1
TEAD4 :	TEA Domain 4
YAP1 :	Yes İlişkili Protein 1
mTERT:	Telomeraz Ters Transkriptaz Transkripsiyonu
BMAL1:	Beyin ve Kas ARNT benzeri Protein 1
PER2:	Periodik Sirkadien Ritim Geni 2
TAZ :	PDZ'ye Bağlanan Motifli Transkripsiyonel Koaktivatör
Era:	Östrojen reseptörü alfa
ERE:	Östrojen tepki elemanı
E2:	Estradiol (17 β -estradiol)
H3K27ac:	Histon H3 proteininin 27. lizin kalıntısında asetilasyon

ABSTRACT

Asadova,N. (2023). Determination of the Effect of Circadian Rhythm Disruption on Follicular Development in the Ovary in Mice via the Hippo Signaling Pathway,Yeditepe University, Institute of Health Sciences, Department of Histology and Embryology, Master Thesis, Istanbul.

The circadian rhythm serves to control many physiological and biological cycles in humans and mammals. The circadian rhythm system consists of two parts: the central clock (SCN) and the peripheral clock. The rhythmic functioning of the central circadian clock is important for the development of the female reproductive system and the regulation of events that occur there. In the female reproductive system this rhythmicity is very tightly linked to the light-dark cycle. In the ovary, circadian clock function is often associated with steroidogenesis, folliculogenesis, cellular differentiation, response to gonadotropins and ovulation. In our study, we hypothesized that the effect of circadian rhythm disruption on ovarian and follicle development may be related to the hippo signaling pathway and mTERT. We aimed to show the effect of circadian rhythm disruption on follicular development in the ovary through the hippo signaling pathway and to show mTERT expression in mice. In our thesis study, 20 female Balb/c mice of 6-8 weeks of age entering the estrous cycle were used. We designed two experimental groups: The control group (n=10) with 12:12 h light/dark cycle and in the experimental group (n=10) with 12:12 h light/dark cycle. At the end of the experimental period, the mice were dissected and ovarian tissues were isolated. The left ovaries of the subjects were placed in fixative for morphological analysis and immunofluorescence staining, while the left ovarian tissue was isolated for quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The localization of PER2, YAP1, TEAD4 and mTERT was determined by immunofluorescence staining, while the expression of *YAP1*, *TEAD4* and *mTERT* and the expression of circadian rhythm genes *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* and *CRY* were determined at mRNA level by qRT-PCR. All evaluations between 12:12 h light/dark cycle control and 12:12 h light/dark cycle experimental groups were performed using ImageJ and GraphPad programs. The data obtained were statistically evaluated by Student's t test ($p<0.05$). Immunofluorescence results showed that PER2 expression was decreased, indicating that the circadian rhythm was disrupted. Hippo signaling pathway proteins YAP1 expression was decreased and TEAD4 expression was increased in the experimental group compared to the control group. We also showed that mTERT expression was increased. When the expressions of *YAP1*, *TEAD4*, *mTERT*, *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* and *CRY1* were evaluated at the mRNA level, no significant change was found. In conclusion, we demonstrated that the effect of circadian rhythm disruption on ovarian and follicle development in mice may be mediated through the Hippo signaling pathway at the translational level, suggesting that there may be an inverse relationship between circadian rhythm disruption and mTERT. In conclusion, we suggested that the Hippo signaling pathway and its relationship with mTERT may have important role to understanding ovarian pathologies depend on the circadian clock changes.

Key words: Circadian Rhythm, Ovary, Hippo Signaling Pathway, mTERT,

ÖZET

Asadova, N. (2023). Farede Sirkadiyen Ritmin Bozulmasının Ovaryumda Folikül Gelişimi Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi. Yeditepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embryoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Sirkadiyen ritim insanlarda ve memeli hayvanlarda birçok fizyolojik, biyolojik döngüleri kontrol etmeye yarar. Sirkadiyen ritim sistemi, merkezi saat (SCN) ve periferik saat şeklinde iki kısımdan oluşmaktadır. Dişi üreme sisteminin gelişimi ve burada olan olayların düzenlenmesi için merkezi sirkadiyen saatin ritmik olarak işleyişi önemlidir. Dişi üreme sisteminde bu ritmiklik ışık-karanlık döngüsüne çok sıkı bir şekilde bağlıdır. Ovaryumda sirkadiyen ritim fonksiyonu genellikle steroidogenez, folikülogenez, hücrel farklılaşma, gonadotropinlere yanıt ve ovulasyon ile ilişkilidir. Yaptığımız çalışmada sirkadiyen ritim bozulmasının ovaryum ve folikül gelişimi üzerinde etkisini, hippo sinyal yolağı ve mTERT etkisinin olabileceğini hipotez ettik. Farede sirkadiyen ritim bozulmasının ovaryumda foliküler gelişim üzerindeki etkisinin hippo sinyal yolağı üzerinden göstermeyi ve mTERT ekspresyonunu göstermeyi amaçladık. Tez çalışmamızda östrus siklusuna giren 6-8 haftalık 20 adet dişi Balb/c fareler kullanılmıştır. Kontrol grubu (n=10) adet olmakla 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olmakla ve 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan, deney grubu (n=10) olmakla sirkadiyen ritim bozulması sağlanmıştır. Deney süresinin sonunda fareler dişe edilerek ovaryum dokuları izole edildi. Deneklerin sol ovaryumları morfolojik analiz ve immüno Floresan boyama yapmak üzere doku takibi için fiksatif içerisine alınırken, sol ovaryum dokusu kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) yönteminde kullanılmak üzere izole edildi. PER2, YAP1, TEAD4 ve mTERT lokalizasyonu immüno Floresan yöntem kullanılarak belirlenirken, qRT-PCR yöntemi ile *YAP1*, *TEAD4* ve *mTERT* ekspresyonları ile sirkadiyen ritim genleri *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1*'in ekspresyonları mRNA düzeyinde gösterildi. 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol ve 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grupları arasındaki tüm değerlendirmeler, ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Elde edilen veriler, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($p < 0.05$). İmmüno Floresan sonuçlarımıza göre; PER2 ekspresyonunun azaldığı ve bununla da sirkadiyen ritmin bozulmuş olduğu gösterildi. Hippo sinyal yolağı proteinleri YAP1 ekspresyonunun azaldığını ve TEAD4 ekspresyonunun deney grubunda kontrole kıyasla arttığını değerlendirdik. Aynı şekilde mTERT ekspresyonunun da arttığını gösterdik. *YAP1*, *TEAD4*, *mTERT*, *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1*'in ekspresyonları mRNA düzeyinde değerlendirildiğinde anlamlı bir değişime rastlanmadı. Sonuç olarak, sirkadiyen ritim bozulmasının farede ovaryum ve folikül gelişimi üzerindeki etkisinin, transkripsiyonel seviyede Hippo sinyal yolağı üzerinden gerçekleşebileceğini gösterdik. Bununla birlikte sirkadiyen ritim bozulması ile mTERT arasında ters orantılı bir ilişkinin olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, Hippo sinyal yolağının ve mTERT ile ilişkisinin, sirkadiyen saat değişikliklerine bağlı ovaryum patolojilerini belirlemek için önemli bir role sahip olabileceğini öne sürdük.

Anahtar kelimeler: Sirkadiyen Ritim, Ovaryum, Hippo Sinyal Yolağı, mTERT.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dişilerdeki üreme sistemi, oositin olgunlaşması, ovulasyon, seks hormonlarının üretilmesi, fertilizasyondan sonra gelişen embriyo ve fetusun korunarak doğuma hazır hale gelmesinden sorumludur. Dişi genital sistemi; iç ve dış genital yapılardan oluşmaktadır (1). Ovaryumlar; oogenezin, folikülogenezin, ovulasyonun gerçekleştiği ve seks hormonlarının salgılandığı dişi gonadlardır. Ovaryumlar, korteks ve medulla olarak adlandırılan iki kısımdan oluşmaktadır. Kortekste gelişimin farklı aşamalarında bulunan foliküller izlenirken, içteki medullada ise kan damarları ve bağ dokusu bulunur (2).

Sirkadiyen ritim dünyanın dönüşüne uyum sağlamak için geçerli bir yoldur (3). Sirkadiyen ritim, sadece dünyanın dış ortamında meydana gelen 24 saatlik değişimlere bir tepki değil, aynı zamanda organizmalarda bulunan zamanlama sisteminin bir parçasıdır (4). Bu zamanlama sistemi, organizmaların hayatta kalması için çok önemlidir, çünkü organizmaların çevrelerindeki gündüz ve gece ile ilişkili olası fiziksel değişikliklere adapte olmalarına yardımcı olur (3). Bunun yanı sıra, sirkadiyen saat disfonksiyonu uyku, iştah ve duygusal kontrolde anormalliklere neden olur (5, 6).

Ovaryumların birbiriyle ilişkili iki önemli işlevi vardır: olgun oositlerin üretilmesi, döllenme ve ardından implantasyonun gerçekleşebileceği bir iç ortam yaratan hormonların üretilmesidir. Son çalışmalarda ovaryumlarda, özellikle granüloza hücreleri, teka hücreleri ve oositler dahil olmak üzere folikül hücrelerinde sirkadiyen saat genlerinin günlük salınımları gösterilmiştir (7, 8). Diğer sistemlerde olduğu gibi, sirkadiyen saat, üreme sisteminin kontrol ve düzenleme mekanizması için çok önemlidir (9). Memelilerde üreme başarısı için sirkadiyen ritmin döngüleri, ovulasyon zamanı eş bulmayı ve cinsel duyarlılığı etkiler (10).

Hippo sinyal yolağı gelişmekte olan organlarda hücre çoğalmasını, hücre göçünü, farklılaşmasını ve doku büyüme süreçlerini sınırlandırır. Bu işlevlere ek olarak, Hippo sinyal yolağındaki düzensizlik, anormal hücre büyümesi ve neoplaziye neden olarak tümör oluşumuna yol açmaktadır (11).

Memelilerde, Hippo sinyal yolağı ana unsuru bir kinaz kaskadıdır. Bu kinaz kaskadında, büyük tümör baskılayıcı 1/2 (LATS 1/2: Drosophila Wts homologu), memeli Ste20 benzeri kinazlar 1/2 (MST1/2) tarafından fosforillenir ve aktive edilir. İki transkripsiyonel koaktivatör YAP ve PDZ-bağlayıcı motifli transkripsiyonel koaktivatör TAZ (Drosophila Yki'nin iki homoloğu) inhibe edilmiştir. YAP ve TAZ aktive olduklarında birbirleriyle etkileşime girerek TEAD (TEA domain family member)

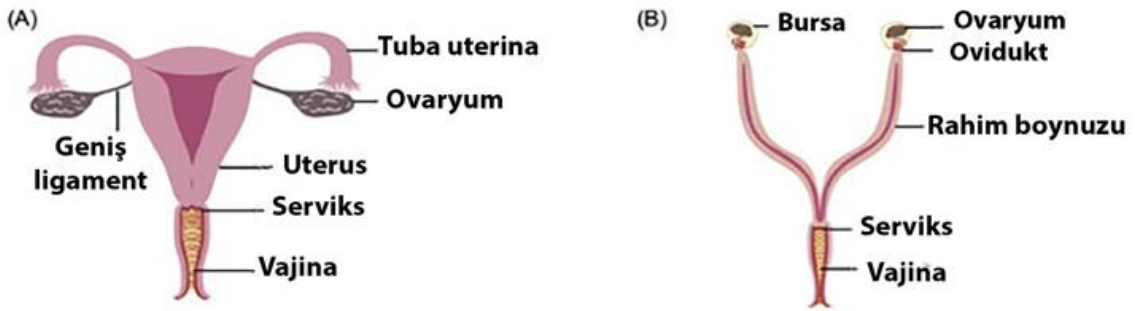
transkripsiyon faktörü ile bir kompleks oluşturur ve hücre çoğalması, göçü ve hayatta kalmasında rol oynayan birçok genin ekspresyonunu uyarır (12).

Telomerler, kromozomal stabilite ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan kromozomal uçlardaki koruyucu başlıklardır. Telomerler, bir katalitik alt birim (TERT), bir RNA şablonu (TERC) ve diğer ilişkili proteinleri içeren bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz tarafından yenilenir (13). Telomeraz, kromozomların 3' ucuna hekzametrik TTAGGG tekrarlarını ekleyerek telomer uzunluğunu korur (14). Çoğu doku ve hücrede TERT, telomeraz kompleksinin sınırlayıcı bir bileşenidir ve telomeraz aktivitesi TERT mRNA ve protein seviyeleri ile ilişkilidir. İnsanlarda telomerler bir yaşlanma saati görevi görür çünkü somatik hücrelerin çoğunda telomeraz ekspresyonu yoktur ve telomerleri birbirini izleyen hücre bölünmelerinde giderek kısalır.

Araştırdığımız tüm literatür bilgilerine dayanarak çalışmamızda, farede sirkadiyen ritim bir hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulmasının ovaryumda foliküler gelişim üzerindeki etkisini Hippo sinyal yolağı ve mTERT ekspresyonunu ile göstermeyi amaçladık.

Ovaryumlar, endokrin ve ekzokrin salgı yapabilmektedir ve salgıladıkları hormonlar menstrual siklusun düzenlemesinde rol oynarlar. Ovaryumlar gametogenez-gamet üretmi ve steroidogenez-steroid üretimi olmak üzere iki önemli görevi yapmaktadırlar ve bu görevler birbiriyle yakından ilişkilidir (19).

Biyolojik sistemleri insanlara çok benzer olan farelerin ovaryumları, tüp şeklindeki uterus boynuzlarının sonunda, fallop tüplerinin hemen üzerinde sağ ve sol olmak üzere yerleşim gösterirler (Şekil 2.2) (20).



Şekil 2.2 (A) İnsan ve (B) farede dişi üreme sistemini karşılaştırılması (21-23).

2.1.2. Ovaryum Histolojisi

Memeli ovaryumunun yüzeyi germinal epitel adı verilen tek katlı yassı ya da kübik epitel hücre tabakası ile örtülüdür ve altında bulunan tunika albuginea tabakası yoğun düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Ovaryum histolojik olarak korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşur. Korteks ve medulla stroması birbirinin devamıdır ve görünüm olarak benzediğinden aralarında belirgin bir sınır görülmemektedir. Korteks, tunika albugineanın hemen altında bulunmaktadır. Korteks stroması, retiküler lif ağını ve iğ biçimli fibroblasta benzer hücreleri içerir. Kortikal bölgede oositleri içeren gelişmekte olan farklı aşamalıdaki çok sayıda ovaryum folikülleri yer almaktadır (17, 18, 24).

Medullar bölge kortikal bölgenin altında, ovaryumun merkezinde yer alır. Medulla stroması elastik liflerden, fibroblastlardan ve düz kas hücrelerinden oluşmaktadır. Bu bölge, fibroelastik bağ dokusu içinde kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içerir (25, 26) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Ovaryumun histolojisi.

2.1.3. Ovaryumun Embriyolojisi

Cinsiyetin belirlenmesi genetik açıdan fertilizasyon süreci ile başlasa da, erkek ve dişi embriyodaki gonadların embriyonik hayatın 6-7. haftalarına kadar ayrımı ultrasonografik olarak yapılamaz (27). XX cinsiyet kromozomlarına sahip dişi embriyolarda östrojen varlığı nedeniyle, ovaryum ve diğer dişi genital organların gelişimi başlar (28).

Ovaryumlar primitif gonadların kortikal bölgesinden gelişir. Gonadlara ulaşmış primordiyal germ hücreleri farklılaşarak oogonyumları oluştururlar (29, 30). Oogonyumların mayoz bölünme geçirmesiyle primer oositler oluşur. Primitif cinsiyet kordonlarından farklılaşmış hücreler tek katlı yassı epitel hücreleri ile oositlerin etrafını sarar ve primordiyal folliküller oluşur (31). Doğumda yaklaşık 1 milyon, pubertede ise yaklaşık 300-400 bin primordiyal follikül bulunur ve bunlardan sadece 500 kadarı ovulasyon yoluyla ovaryum dışına atılmaktadır (32).

2.1.4. Folikülogenez

Folikülogenez, foliküllerin primordial folikül popülasyonundan ayrılıp gelişme ve farklılaşmasına denir (33). Folikülogenez fetal dönemde başlar ve menopoza sonlanır (34).

Her folikül bir oosit, onu çevreleyen granüloza hücreleri ve mezenkimde bulunan teka hücrelerinden oluşur. Folikülogenez olayı ovaryumun korteks tabakasında gerçekleşir.

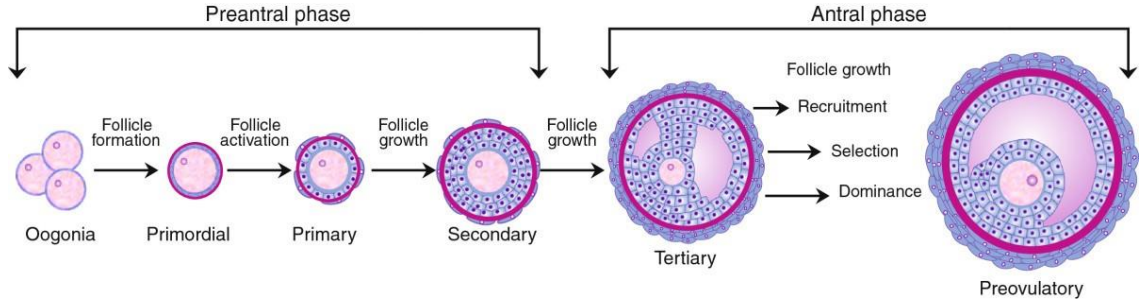
Pubertede GnRH salınımı, hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle eder. Bu hormonların etkisi ile ovaryumda 28-30 gün süren ovaryal siklus gerçekleşir. Her siklusta FSH etkisiyle 5-15 adet primer folikül gelişir ve bir tanesi olgun hale gelip, ovulasyon için seçilir, bu folikül dominant folikül olarak adlandırılır. Geri kalan foliküller ise atreziye giderler (35, 36).

Primordiyal foliküller ovaryum korteksinde tunika albugineanın hemen altında yerleşmişlerdir. Bunlar mitotik olarak inaktif olup, tek katlı yassı hücreler ile çevrili, primer oosit barındıran foliküllerdir (37).

Primer folikül, primordiyal folikül içerisinde bulunan oositin büyümesi ve oositin etrafındaki yassı hücrelerin kübikleşmesiyle oluşur. Bu kübik hücreler artık granüloza hücreleri olarak bilinmektedir (38, 39). Bu folikülde zona pelusida belirgin olarak ayırt edilebilir. Zona pelusida, oosit ve granüloza hücreleri tarafından salgılanan glikoprotein yapıdaki membrandır. Bu tabaka oosit ve granüloza hücrelerini birbirinden ayırır (28). Sekonder folikülün oluşumu ile granüloza hücreleri sayıca artış göstermektedir. Daha sonra bazal lamina etrafında stromal hücre benzeri hücreler ortaya çıkar ve bu hücreler teka hücreleri olarak adlandırılır. Teka hücreleri, folikülün gelişimi ile teka interna ve teka eksterna olmak üzere ikiye ayrılır. Bu iki tabaka arasındaki sınır belirgin değildir (40). Sekonder folikülün gelişim sürecinde granüloza hücreleri arasında içi hiyaluronik asitten zengin sıvı dolu boşluklar ortaya çıkar. Bu boşluklar birbirleriyle birleşerek antrum boşluğunu oluştururlar ve bu foliküle antral folikül denir (41) (Şekil 4).

Bu dönemde oosit yaklaşık olarak 125 mikrondur. Granüloza hücrelerinden bu dönemde salgılanan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) sayesinde oositin daha fazla büyümesi engellenir (25). Bu dönemde oositi ve oositi çevreleyen granüloza hücreleri şekillerini değiştirmeden kalarak kümülüs ooforus kompleksini oluştururlar. Kümülüs ooforus hücrelerinin bir kısmı korona radiatayı oluşturmak için zona pellusidayı sarmaktadır (28) (Şekil 2.4).

Dominant olan Graff folikülün boyutu yaklaşık 10 mm çapındadır. Folikül ovaryum yüzeyine doğru oositin bulunduğu bölgeden çıkıntı yapar ve bu çıkıntıya stigma adı verilir (25, 42).



Şekil 2.4 Foliküler gelişim (Folikülogenez) (43).

2.2. Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen kelimesi “circa” (yaklaşık) ve “dies” (gün) kelimelerinden meydana gelerek yaklaşık bir gün anlamını taşımaktadır (44). Sirkadiyen ritim kavramı ise kendi eksenini etrafında dönen dünyanın 24 saate yakın süren dönüşünün meydana getirdiği aydınlık ve karanlık döngüsünün canlılar üzerinde oluşturduğu döngüsel, fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal etkilerdir (45). Sirkadiyen ritimler, neredeyse tüm yaşam formlarında çok çeşitli davranışsal, metabolik ve fizyolojik işlevleri yönetir (46). Bu ritimler, uyku-uyanıklık döngüsünden, hücresele seviyedeki metabolik süreçlere kadar vücuttaki her organizasyon düzeyinde önemli fizyolojik aktiviteleri dış ortamdaki değişikliklerle senkronize eder (47, 48). Sirkadiyen ritim, dünyanın dönüşüne uyum sağlamak için geçerli bir yoldur (3).

Sirkadiyen ritim, sadece dünyanın dış ortamında meydana gelen 24 saatlik değişimlere bir tepki değil, aynı zamanda organizmalarda bulunan zamanlama sisteminin bir parçasıdır (4). Bu zamanlama sistemi, organizmaların hayatta kalması için çok önemlidir, çünkü organizmaların çevrelerindeki gündüz ve gece ile ilişkili olası fiziksel değişikliklere adapte olmalarına yardımcı olur (3). Bunun yanı sıra, sirkadiyen saat disfonksiyonu uyku, iştah ve duygusal kontrolde anormalliklere neden olur (5, 6).

Gece vardiyasında çalışmak, sirkadiyen sistem ile dış dünya arasındaki senkronizasyonun bozulmasına neden olur ve hem gerçek hem de simüle edilmiş gece çalışması esnasında geceleri parlak ışığa maruz kalmak, merkezi ve periferik saatlerin belirteçlerini değiştirir (49).

Uyku-uyanıklık döngüsü temel olarak sirkadiyen ritmi düzenler. Ancak modern dünyada 7/24 çalışan aktivitelerin artması, televizyon, internet ve cep telefonlarının neredeyse günün 24 saati yaygın olarak kullanılması yeterli uyku süresinin giderek azalmasına yol açmaktadır (50). Birçok çalışma insan fizyolojisi, belirli hastalıklar ve sirkadiyen ritim arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır. Yapılan epidemiolojik bir çalışmada, gece uyku süresinin son 30 yılda 18 dakika azaldığı belirtilmiştir (51). Uyku-uyanıklık döngüsünün bozulması, özellikle sağlıklı bireylerde erken ölüm, obezite, bozulmuş glikoz toleransı, diyabet, psikiyatrik bozukluklar, anksiyete, depresyon, kanserin ilerlemesi, yorgunluk ve konsantrasyon kaybı gibi birçok hastalığın ana nedeni olabilir (52, 53). Bir başka epidemiyolojik çalışma, 15 veya daha fazla yıl boyunca ayda en az 3 gece çalışmanın kadınlarda kolorektal kanser riskini artırabileceğini göstermiştir (54).

İnsanlarda optimal uygunluk, iç sirkadiyen ritim ve dış çevresel döngüler arasında senkronize salınım gerektirir. Bu döngüde meydana gelen bozulma sonrası, ritim kaybolur ve sonunda hastalıklar ortaya çıkar. Bu nedenle, hastalık tedavisinde zaman kavramını kullanmak için "kronoterapi" olarak adlandırılan yeni bir tedavi seçeneği ortaya konulmuştur ve sirkadiyen ritimlerin önemi daha da vurgulanmaktadır (55).

Sirkadiyen ritimin gen ekspresyonu; davranışların düzenlenmesi, hormon salgılanması ve metabolizma için çok önemlidir. Sirkadiyen zamanlama sistemi aynı zamanda endokrin ve üreme sistemleri ile ilgili organlarda da rol oynamaktadır (56).

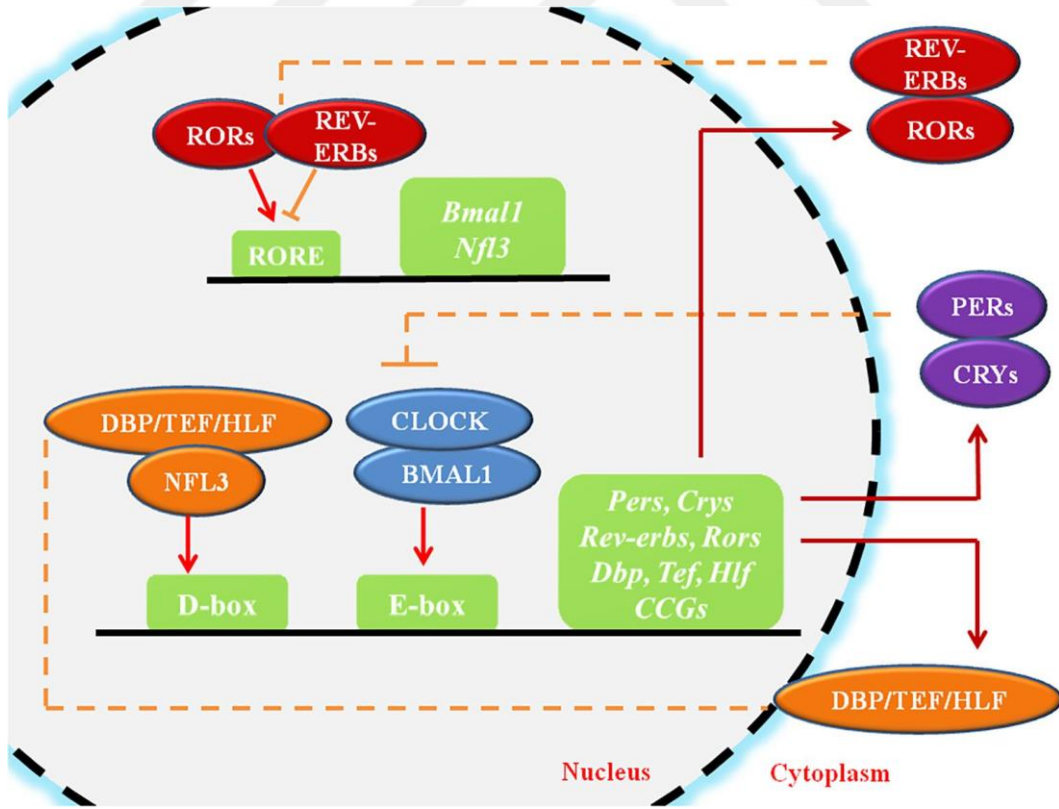
“Zeitgeber” olarak adlandırılan günlük dış sinyaller olmasa bile sirkadiyen saatin otonom kalabildiği ve yaklaşık 24 saatlik ritimler üretebildiği de bilinmektedir (57). Zeitgeber Almancadan ‘zaman bildirici’ manasına gelir (58). Her sirkadiyen ritmin fazları hem iç hem de dış faktörlerin yardımıyla belirlenmektedir (59).

2.2.1. Sirkadiyen Ritmin Moleküler Mekanizması

Moleküler saatler memelilerdeki çoğu organ ve dokuda bulunurken, hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdek (SCN) ana sirkadiyen işlevi görür ve periferik dokulardaki osilatörlerin fazını koordine eder (60). Sirkadiyen saat sistemi, organizmalardaki farklı fizyolojik olaylara bağlanan tüm osilatörlerin toplamı olarak bilinir (61). Memelilerde sirkadiyen ritim sistemi, merkezi saat (SCN) ve periferik saat şeklinde iki kısımdan oluşmaktadır (62). Merkezi saat hipotalamustaki suprakiazmatik çekirdekte (SCN) bulunurken periferik saatlerse pankreas, iskelet kasları, karaciğer, gastrointestinal sistem, adipoz doku gibi vücuttaki geriye kalan dokuların neredeyse hepsinde bulunmaktadır (63).

En temel düzeyde, moleküler sirkadiyen saat bir transkripsiyon-translasyon döngüsünden oluşur. Sirkadiyen ritimde görev alan iki protein, CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) ve BMAL1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1), diğer dört genin, *Per1/2/3* (Period), *Cry1/2*'nin (Cryptochrome) transkripsiyonunu indükler, bunlar translasyondan sonra dimerize olur, çekirdeğe yeniden girer ve kendi transkripsiyonlarını inhibe ederler (64, 65) (Şekil 2.5). Yapılan son çalışmalara göre tüm genlerin neredeyse %10'u sirkadiyen saat tarafından kontrol edilmektedir (66). Sirkadiyen saat genlerinden herhangi birinde mutasyon ortaya çıkarsa veya herhangi bir gen inhibe edilirse sirkadiyen fenotipte değişiklikler görülmektedir (67). CLOCK geni memelilerde ilk tanımlanmış olan sirkadiyen saat genidir (68).

Suprakiazmatik çekirdek, optik kiazma yakınında yerleşir ve sirkadiyan ritimi düzenleyen endojen bir başlatıcı gibi görev yapan nöron ağını içermektedir. Bu nöronlar retinanın özelleşmiş gangliyon hücrelerine bağlanmış sirkadiyan osilatörlerdir. Gangliyon hücreleri, sirkadiyan osilatörleri etkisiz hale getiren ışık detektörü olarak fonksiyon görürler. Işığın suprakiazmatik çekirdekteki sirkadiyan etkisine aracılık eden primer nörotransmitter madde, amino asit formda bulunan glutamik asittir.



Şekil 2.5 Sirkadiyen ritmin moleküler mekanizması (69).

Suprakaryamatik çekirdek, nükleusu hasar görmüş bir alıcıya transplante edildiğinde, konağın yerine, vericinin sirkadiyen başlatıcı özelliklerini göstermektedir. Suprakaryamatik çekirdekteki her bir nöronun organize bir şekilde, nasıl bir araya geldiği ve bütün sirkadiyan ritmi nasıl düzenlediğinin tam mekanizması bilinmemektedir (53).

2.2.2. Sirkadiyen Ritim ve Ovaryum

Hipotalamik-hipofizer-gonadal (HPG) eksenindeki sirkadiyen osilatörler, kadın üreme ritimlerinin düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır (70, 71).

Ovaryumların birbiriyle ilişkili iki önemli işlevi vardır: olgun oositlerin üretilmesi, döllenme ve ardından implantasyonun gerçekleşebileceği bir iç ortam yaratan hormonların üretilmesidir. Son çalışmalarda ovaryumlarda, özellikle granüloza hücreleri, teka hücreleri ve oositler dahil olmak üzere folikül hücrelerinde sirkadiyen saat genlerinin günlük salınımları gösterilmiştir (7, 8).

Diğer sistemlerde olduğu gibi, sirkadiyen saat, üreme sisteminin kontrol ve düzenleme mekanizması için çok önemlidir (9). Memelilerde üreme başarısı için sirkadiyen ritmin döngüleri, ovulasyon zamanı eş bulmayı ve cinsel duyarlılığı etkiler (10).

Dişi üreme sisteminde ritmiklik gözlenir ve bu ritmiklik ışık-karanlık döngüsüne çok sıkı bir şekilde bağlıdır. Ovaryum ritmikliği ile ışık-karanlık döngüsü arasındaki ilişkiye SCN'den kaynaklanan fotoperiyodik ipuçları aracılık eder (72). Ovaryumda sirkadiyen saat fonksiyonu genellikle steroidogenez, folikülogenez, hücresel farklılaşma, gonadotropinlere yanıt ve ovulasyon ile ilişkilidir (73).

İnsanlar da dahil olmak üzere tüm memeli türlerinde, başarılı dişi üremesi için sirkadiyen zamanlama esastır. Örneğin, düzensiz uyku veya çalışma programlarına sahip kadınların doğurganlığı daha düşük ve düşük yapma riski daha yüksektir (74). Jetlag ve gece vardiyasına bağlı sirkadiyen ritimlerdeki bozukluklar, adet döngüsü anormalliklerinde artış, değişen serum gonadotropin seviyeleri ve azalmış doğurganlık ile ilişkilidir (75).

Memelilerde, LH ve FSH seviyeleri salınım gösterir ve bu salınım, ovulasyon zamanında önemli "dalgalanmalar" ile işaretlenen günlük ritim ile gerçekleşir (9, 76). Kemirgenlerde; pro-östrus sırasında LH dalgalanması öğleden sonra geç saatlerde/akşam erken saatlerde meydana gelir (77). Hem memelilerde hem de kemirgenlerde; öğleden sonraki LH artışının ovulasyon, luteinizasyon ve ayrıca korpus luteum oluşumu için çok

önemli olduğu düşünülmektedir (78). Başka bir deyişle, ovulasyon zamanının LH dalgalanmasına bağlı olduğu söylenebilir (79). Dolayısıyla, LH dalgasının etkili olabilmesi için günün uygun saatinde meydana gelmesi gerekmektedir. LH dalgalanmasına karşılık gelen ovulatuvar yanıtın sürekli karanlıkta devam ettiği düşünülmekte ve bunun bir zamanlama sistemi olduğu öne sürülmektedir. Bu da bize ovaryumun, ovulatuvar yanıt yolundaki kilit faktörlerin ritmik ekspresyonunu gösteren sirkadiyen bir osilatöre sahip olduğunu göstermektedir (10).

Ovaryumun gonadotropinlere ritmik duyarlılığına bağlı olan ovaryum zamanlamasının yanı sıra, hem farelerde hem de sıçanlarda ovaryumda ve izole granüloza hücrelerinde çekirdek saat geni ekspresyonları da bildirilmiştir (7, 80). Granüloza hücrelerine benzer şekilde, saat genlerinin ekspresyonları farelerden, tavşanlardan ve sığırlardan elde edilen oositlerde ve preimplantasyon dönemi embriyolarında da gözlenmiştir (81). Ovaryumda bulunan bu çekirdek *Clock* genlerinin foliküler gelişim ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (7). Ovaryumda *Clock* ekspresyonunun inhibisyonu, yavru büyüklüğü ve oosit sayısında azalmaya neden olmaktadır (82). Ayrıca; *Bmal1* ve *Per2* mRNA'sı döngüsel ekspresyonlarının, hipofiz bezinin çıkarılması durumunda prepuberte zamanı sıçanların ovaryumlarında gonadotropin maruziyeti ile indüklendiği bilinmektedir (7). Ayrıca, *Per1* ve *Per2* ekspresyon günlük ritimlerinin sıçanlarda 4 ila 5 günlük östrus döngüsü boyunca kalıcı olduğu da bildirilmiştir (83). Büyük ve küçük preantral foliküllerde, Graaf foliküllerde ve korpus luteumda sirkadiyen ritim genlerinin ekspresyonları da bildirilmiştir (84). Böylece ovaryum, gonadotropin reseptör ekspresyonları ile steroid ve peptid hormon salgılanmasının zamanlamasını modüle ederek ovulasyon zamanını düzenleyebilir (85).

2.3. Hippo Sinyal Yolağı

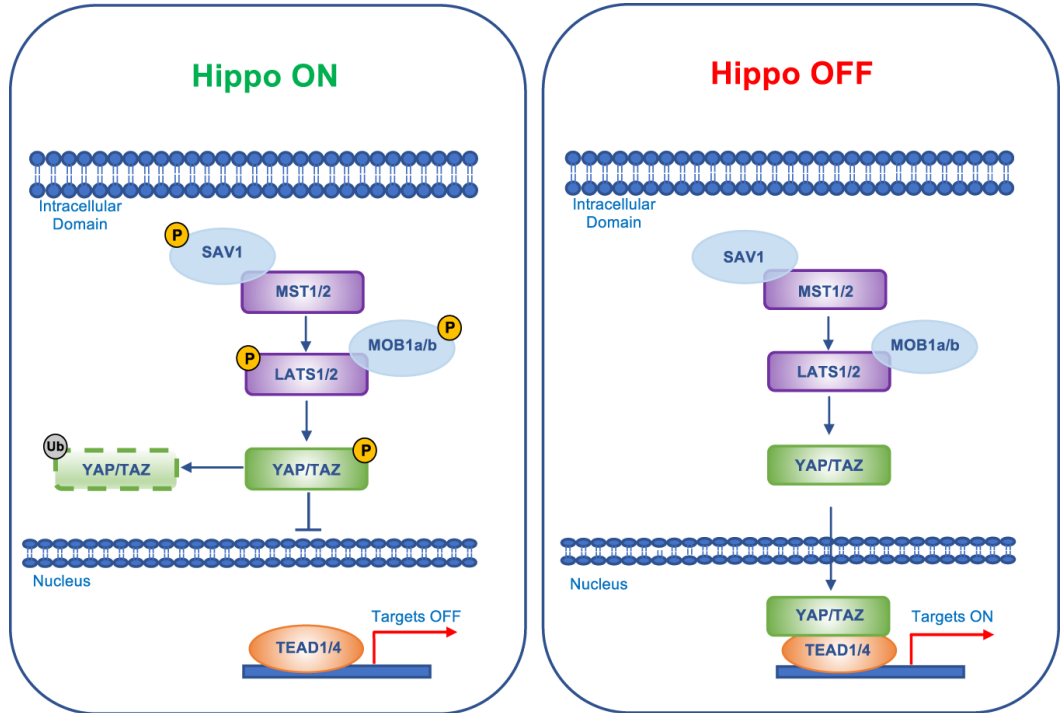
Doku büyümesi ile ilişkilendirilen ve ilk olarak yirmi yıl önce *Drosophila melanogaster*'de ortaya çıkan bu sinyal yolağı Hippo sinyal yolağı olarak adlandırılmaktadır. Özellikle son yıllarda *Drosophila melanogaster* dışında memelilerde de detaylı olarak çalışılmaya başlanan bir sinyal yolağı haline gelmiştir (11).

Hippo sinyali, çekirdek transkripsiyon koaktivatörleri, kinaz kaskadı ve DNA bağlanma komplekslerinden oluşur. Bununla birlikte, zaman içinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki Hippo sinyal yolağının 30'dan fazla bileşeni vardır (86). Bu sinyal yolağı çok çeşitli sinyaller tarafından organize edilir. Hücreden hücreye temas, hücre polarizasyonu ve aktin hücre iskeleti gibi içsel hücre mekanizmaları bu yolun

düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca hücresel enerji durumu, mekanik stres ve G-proteinine bağlı reseptörler gibi sinyaller de bu yolağın düzenlenmesinde etkilidir (87).

Hippo sinyal yolağı gelişmekte olan organlarda hücre çoğalmasını, hücre göçünü, farklılaşmasını ve doku büyüme süreçlerini sınırlandırır. Bu işlevlere ek olarak, Hippo sinyal yolağındaki düzensizlik, anormal hücre büyümesi ve neoplaziye neden olarak tümör oluşumuna yol açmaktadır (11).

Memelilerde, Hippo sinyal yolağı ana unsuru bir kinaz kaskadıdır. Bu kinaz kaskadında, büyük tümör baskılayıcı 1/2 (LATS 1/2: Drosophila Wts homologu), memeli Ste20 benzeri kinazlar 1/2 (MST1/2) tarafından fosforillenir ve aktive edilir (Şekil 2.6). İki transkripsiyonel koaktivatör YAP ve PDZ-bağlayıcı motifli transkripsiyonel koaktivatör TAZ (Drosophila Yki'nin iki homologu) inhibe edilmiştir. YAP ve TAZ aktive olduklarında birbirleriyle etkileşime girerek TEAD (TEA domain family member) transkripsiyon faktörü ile bir kompleks oluşturur ve hücre çoğalması, göçü ve hayatta kalmasında rol oynayan birçok genin ekspresyonunu uyarır (12) (Şekil 2.6). TAO kinazlar (TAOK1/2/3) Hippo kinaz kaskadını başlatabilir. MST1/2'nin aktivasyon döngüsü bu kinazlar tarafından fosforile edilir (88). Aktivasyon döngüsünün fosforilasyonu MST1/2'nin otofosforilasyonu ile gerçekleştirilebilir (89). Bununla tutarlı olarak, dimerizasyon, MST1/2'nin aktivasyon döngüsü fosforilasyonunu artırır (90). MST1/2 aktive edildiğinde, SAV1 ve MOB1A/B aktive olmaktadır (91). LATS1/2'nin fosforilas-



Şekil 2.6 Memelilerde Hippo yolağı (92).

yonu ve aktifleştirilmesinde, bu proteinler MST1/2'ye yardımcı olur. T1079 LATS1'in hidrofobik motifi ve T1041 ise LATS2 için hidrofobik motiftir. LATS1/2 de otofosforilasyon ile aktive edilir (93). Daha sonra YAP ve TAZ'ın fosforilasyonu bunların inaktivasyonuna yol açar (94).

LATS1/2'nin düzenlenmesinde hem MST1/2 hem de MAP4K'ların önemli rolleri vardır. YAP ve TAZ fosforile edildiğinde, 14-3-3 ile bağlantı kurarlar (95). Bu şekilde YAP/TAZ'ın sitoplazmik segregasyonu gerçekleşir (96). YAP ve TAZ DNA-bağlayıcı domainlere sahip değildir (97). YAP ve TAZ nükleusa yerleştiğinde, gen ekspresyonu YAP/TAZ ve TEAD1-4 arasındaki etkileşim ile düzenlenir. YAP/TAZ ile etkileşime girdiğinde, VGLL4 TEAD1-4'ten ayrılır. Bu şekilde, TEAD-indüklü transkripsiyon doku büyümesini desteklemek ve apoptozu engellemek için aktive edilir (98). MST1/2, SAV1, MOB1A/B, NF2 inhibe edilir veya LATS1/2 veya YAP aşırı eksprese edilirse, TEAD hedef gen ekspresyonu fare modellerinde yukarı yönde düzenlenir. Buna ek olarak, progenitör hücrelerin genişlemesi artar ve dokuların büyümesi devam eder. Tüm bu olaylar, bu genlerin Hippo sinyal yolağındaki kritik rollerini desteklemektedir (99) (Şekil 2.6).

Hippo sinyal yolağı ve bileşenleri hücre canlılığı, hücre çoğalması, hücre rekabeti, kök hücre özelliklerinin korunması, rejenerasyon ve metastaz gibi çok önemli süreçleri düzenler (100). Bu sinyal yolağı memelilerde korunmuştur ve kanser gelişiminin sınırlandırılmasında önemli bir role sahiptir (101).

2.3.1. Hippo Sinyal Yolağı ve Folikül Gelişimi

Hippo sinyali, kinaz kompleksleri aracılığıyla hücre kaderini ve organ büyümesini kontrol eden evrimsel olarak korunmuş bir yolaktır (102). Aşağı akış çekirdek efektörü YAP ve transkripsiyonel ko-aktivatör PDZ-bağlayıcı motif (TAZ), bu kinaz komplekslerinin fosforilasyonu ile inhibe edilir. Sitoplazmik ubiquitin ve degradasyon ile fosforile olmuş YAP/TAZ kompleksi nükleer transkripsiyon başarısızlığına yol açar (103). Buna karşılık, Hippo sinyalizasyonunun bozulması, fosforile edilmemiş YAP/TAZ'ın çekirdeğe yerleşmesini teşvik eder ve folikül gelişimi için öncelikle transkripsiyonel gelişmiş ortak alan (TEAD) transkripsiyon faktörlerine bağlanarak CCN ailesi büyüme faktörlerinin ve apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonunu indükler (104).

Yapılan çalışmalar, folikül aktivasyonu ve büyümesinde Hippo sinyal yolağının önemli rolünü desteklemektedir. MST1/2, LATS1/2 ve YAP/TAZ, fare ve insan ovaryumlarında folikül gelişiminin farklı aşamalarında eksprese edilir (105-107). İn vitro

araştırmalar, folikül gelişimi sırasında LATS1'in, folikül olgunlaşmasına katılan granüloza hücrelerinde eksprese edilen önemli bir düzenleyici olan Forkhead L2'yi (FOXL2) doğrudan fosforile edebildiğini ve böylece transkripsiyonel aktivitesini kontrol ettiğini bildirmiştir (108). LATS1 mutant fare ovaryumlarında azalmış ve aktive edilmiş primordiyal foliküller gözlenmiştir, bu da ovaryum rezervinin korunmasındaki önemini göstermektedir (109). YAP/TAZ sinyal yolağı *in vivo* olarak aktiftir ve uygun folikül büyümesini destekler (110, 111). Foxl2 aracılı Yap eksikliğı olan farelerde folikül gelişimin ve oosit olgunlaşmasının bozulduğı gözlenmiştir (112, 113). Ayrıca, *YAP* geni polikistik over sendromlu (PKOS) kadınların ovaryumlarında yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bunun nedeni, PKOS hastalarında YAP promotörünün hipometilasyonunun neden olduğı artmış YAP mRNA ve protein seviyeleri olabilir. Özetle, kompleks Hippo sinyal yolağı foliküler gelişim için önemli bir faktördür (114).

2.3.2. Hippo Sinyal Yolağı ve Oosit

Üremenin başarılı bir şekilde gerçekteşmesi, oosit gelişimi ve olgunlaşmasına bağılıdır. Oosit gelişimi için gen ekspresyonu ve bu ekspresyonların germ hücrelerinde karşılık gelen hücresel lokalizasyonu gereklidir. İnsan *in vitro* fertilizasyon (IVF) hastalarından toplanan oositlerin tek hücreli transkriptom analizi, olgun oositlerde YAP1'i tanımlamıştır (115).

Fare kümülüs oosit kompleksleri (KOK) kullanılarak yapılan çalışmalar, oositin ve KOK genişlemesini kontrol eden diğerk faktörlerin Hippo sinyal yolağı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Olgunlaşmamış farelerin KOK'larından oositlerin izole edilmesi, kümülüs hücrelerinde Sav1, Mob1b ve Lats1/2 transkriptlerinde artışa neden olmuş ve daha sonra kümülüs hücrelerine oositlerin yeniden transplante edilmesi, ekspresyonu sağılıklı KOK'lerde gözlenen seviyelere getirmiştir (116). GDF9 ve BMP15 gibi oositte salgılanan büyüme faktörlerinin kümülüs hücresi içindeki Hippo sinyalinin düzenlenmesine katkıda bulunup bulunmadığını belirlemek için, KOK'ler oosit tarafından başlatılan GDF9/BMP15 aracılı SMAD2/3 sinyalini inhibe etmek üzere SB431542 ile muamele edilmiştir. Oosit izolasyonuna benzer şekilde, inhibitör uygulaması Sav1 ve Lats2 mRNA'sını artırmış, ancak Lats1 veya Mob1b'de anlamlı bir artış gözlenmemiştir. YAP1/TEAD etkileşimini bozmak için KOK'lerin verteporfin ile muamele edilmesi, *in vitro* granüloza hücre proliferasyonu ve oosit stimölasyonunu inhibe etmiş ve ovulatuarsinyallerin eksikliğinde progesteron sekresyonunu destekleyen transkriptlerin ekspresyonunu artırmıştır. Bu durum, YAP1/TEAD ilişkisinin inhibe

edilmesi ile kümülüs hücrelerinin erken farklılaşmasına yol açabileceğini düşündürmektedir (116).

2.3.3. Hippo Sinyal Yolağı ve Granüloza Hücreleri

Ovaryumda, Hippo sinyal yolağı inaktivasyonunun granüloza hücrelerinin proliferasyonu için gerekli olduğu gösterilmiştir. Ovaryum fragmantasyonu YAP1'e bağlı foliküler gelişim aktivasyonuna yol açar (117). İnsan granüloza hücre tümöründe ve sığır granüloza hücrelerinde, YAP1 ve/veya TAZ ekspresyonunun bulunmaması proliferasyonu ve steroidogenezi olumsuz etkiler (118, 119). Benzer şekilde, farelerde folikülogenezin tüm aşamalarında granüloza hücrelerinde YAP1'in koşullu inaktivasyonu, daha az korpus luteum ve doğurganlığın azalmasıyla sonuçlanmıştır (112). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Hippo sinyal yolağının LH dalgalanmasına yanıt olarak granüloza hücrelerinde aktive olduğu gösterilmiştir. Ovulasyon sinyalini takiben YAP1 fosforile olur ve granüloza hücrelerinin çekirdeğinden dışarı salgılanır (116, 120). Ek olarak, granüloza hücrelerinde YAP1 aşırı ekspresyonunun LH hedef genlerinin ve progesteron üretiminin yeterli indüksiyonunu önlediği gösterilmiştir. Bu nedenle Hippo sinyal yolağı folikül büyümesinin negatif bir düzenleyicisi gibi görünmektedir, ancak LH tarafından aktivasyonu, LH'nın terminal folikül farklılaşması sırasında etkilerini göstermesi için gerekli olabilir (120).

2.4. Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) Transkripsiyonu

Telomerler, kromozomal stabilite ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan kromozomal uçlardaki koruyucu başlıklardır. Telomerler, bir katalitik alt birim (TERT), bir RNA şablonu (TERC) ve diğer ilişkili proteinleri içeren bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz tarafından yenilenir (13). Telomeraz, kromozomların 3' ucuna heksametrik TTAGGG tekrarlarını ekleyerek telomer uzunluğunu korur (14). Çoğu doku ve hücrede TERT, telomeraz kompleksinin sınırlayıcı bileşenidir ve telomeraz aktivitesi TERT mRNA ve protein seviyeleri ile ilişkilidir. İnsanlarda telomerler bir yaşlanma saati görevi görür çünkü somatik hücrelerin çoğunda telomeraz ekspresyonu yoktur ve telomerleri birbirini izleyen hücre bölünmelerinde giderek kısalır. Yapılan çalışmalarda, telomer kısalmasının insan yaşlanmasının kritik bir faktörü olduğunu ve stabilizasyonunun çoğu insan kanserinin gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir (14).

İnsan TERT (hTERT) ekspresyonu, kanser hücrelerinin artan proliferatif potansiyeli ile ilişkili olarak tümör genez sırasında önemli ölçüde artar (121).

Telomer uzunluğu düzenlemesi ve proliferatif yaşlanma mekanizmaları, memeliler arasında evrimsel olarak korunmamıştır. Gomes ve ark., 60'tan fazla memeli hücresinde telomer uzunluğu ve telomeraz ekspresyonunun karşılaştırmalı bir analizinde, atasal memelilerin insan benzeri kısa telomerlere sahip olduğu ve telomeraz ekspresyonunu inhibe ettiği sonucuna varmıştır (122). Bu hayvanlardaki hücreler replikatif yaşlanmaya uğrayarak tümör ilerlemesi için bir bariyer oluşturmaktadır. Öte yandan, diğer birçok memelide, özellikle de kemirgenler gibi daha küçük ve daha kısa ömürlü hayvanlarda telomerler çok daha uzundur ve telomeraz çoğu somatik dokuda bulunur. Bu çalışmalar, memelilerdeki farklı telomer homeostazını anlamak için kavramsal bir çerçeve sağlamış ve telomerin insan kanseri ve yaşlanmasındaki rolünü incelemek için uygun modeller kullanma ihtiyacını belirlemiştir.

Deney fareleri; insan gelişimi, yaşlanması ve hastalıkları için en yaygın kullanılan hayvan modelleridir. Telomer uzunluğu insan hücrelerinde hücre yaşlanma için kritik önemde iken, fareler telomer aracılı replikatif yaşlanma göstermez. İnsanlarla karşılaştırıldığında, farelerdeki telomer homeostazı iki yönden farklıdır: Laboratuvar fareleri somatik dokularda bulunan telomeraz aktivitelerini regüle eder ve uzun heterojen telomerlere sahiptir (123, 124). İnsanlar ve fareler arasında telomeraz ekspresyonunda önemli farklılıklar vardır (125). İnsan somatik doku ve hücrelerinin çoğunda eksprese edilmeyen veya son derece düşük seviyelerde eksprese edilen hTERT'in aksine, fare TERT ifadesi çoğu yetişkin doku ve organında bulunur (126, 127). Bu fark muhtemelen laboratuvar farelerinde insan telomerine (5-15 kb) kıyasla çok daha uzun telomerlere (50-100 kb) neden olur veya en azından bu duruma katkıda bulunur (128). Telomer uzunluğu fare hücrelerinde hücre yaşlanma süresi için bir sınır değildir.

Telomeraz aktivitesi germ, embriyonik ve kanser hücrelerinde yüksektir. Bunların hepsi telomeraz pozitif olarak kabul edilir (129, 130). Telomeraz negatif hücrelerde, örneğin çoğu somatik hücrede enzim eksiktir. Ölümsüz kanser hücreleri kontrolsüz bir şekilde bölünür ve telomeraz pozitifdir. Somatik hücreleri kanser hücrelerine dönüştüren mekanizma bilinmemektedir. Telomeraz düzenlemesi için olası yeni bir düşünce, telomerazın kromozom uçlarına erişimini engelleyen proteinleri ortadan kaldırarak telomerazın işlevselliğini kontrol eden tankiraz adlı bir insan proteindir (131).

Telomerlerin fertilizasyondan önce ve erken embriyoda zigotik transkripsiyon ve blastosist oluşumunu başlamasından önce kromozomlara eklenmesi gerektiğinden, oosit

bir telomerik saatin başlangıcı için en olası yer gibi görünmektedir. Hem spermatozoa hem de oositler, tam uzunluktaki kromozomların nesillere aktarılmasını sağlamak için en uzun telomerlere sahip olmalıdır. Germ hattı ve embriyonik hücrelerdeki, özellikle de insandaki telomeraz aktivitesi hakkında çok az bilgi vardır. Telomeraz aktivitesi ilk olarak *Xenopus* oositleri ve embriyolarında tespit edilmiştir (132). Telomeraz aktivitesi insan testislerinde ve tüm aşamalarındaki ovaryumlarda tespit edilmiştir. Ayrıca insan blastosistlerinde de gösterilmiştir, ancak olgun spermatozoa veya oositlerde belirlenmemiştir (130). Telomeraz aktivitesi ayrıca erken antral ve ovulasyon öncesi foliküllerden elde edilen sıçan oositlerinin yanı sıra ovulasyon ile atılımı gerçekleşmiş oositlerde ve 4 hücreli embriyolarda da gösterilmiştir (133).

2.4.1 mTERT ve Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ritim bozulmasının, obezite ve stres telomer uzunluğunu kısalttığı ve reaktif oksijen seviyelerini yükselttiği bilinmektedir (134). Hem aşırı hem de yetersiz elektron taşınması, telomer DNA'sı içindeki GGG üçlüsünü kolayca oksitleyen ROS birikimine yol açar (134).

Nikotinamid adenin dinukleotid, apoptozu ve dolaylı olarak telomer kısalmasını önlemek için proteinlerin asetilasyonunu gideren sessiz bilgi düzenleyici T1 (SIRT1) için bir substrattır (135). Ayrıca SIRT1, immünopresipitasyon deneyleri ile gösterildiği gibi spesifik olarak telomerik tekrarlarla bağlanır ve telomeri kısaltmaya karşı doğrudan korur. SIRT1 farelerde SIRT1 işlevinin kazanılması daha uzun telomerlere yol açarken, SIRT1 -/- farelerde SIRT1 işlevinin kaybı telomer kısalmasıyla sonuçlanmıştır. Sonuçta, SIRT1, telomer uzunluğunun pozitif düzenleyicisidir ve yaşlanmayla ilişkili telomer kısalmasını azaltır. Örneğin, SIRT1'in yaşlanma karşıtı bir ajan olan resveratrol tarafından aktivasyonu, telomer kısalmasını azaltmaktadır (136).

SIRT1 doğrudan CLOCK ile etkileşime girer, BMAL1 ve PER2'yi deasetile eder. CLOCK/BMAL1, sirkadiyen bir şekilde CCG promotörlerine alınan bir kromatin kompleksi içinde SIRT1 ile birleşir. E-kutusuna bağlandıktan sonra CLOCK, histon H3, PER2 ve BMAL1'i asetile eder. SIRT1 daha sonra aktive olur ve BMAL1, PER2 ve histonları deasetillemektedir. Deasetillenmiş PER2 daha fazla fosforile edilir ve bozulur, ve yeni bir döngü başlar. Böylece SIRT1, sirkadiyen ritim mekanizması ile metabolik aktivite arasında doğrudan bir bağlantı oluşturur (135, 137).

Ortaya çıkan bulgular, sirkadiyen ritimlerin yaşlanma sürecinde kilit bir rol oynadığını ve saatin bozulmasının, telomer kısalması tarafından yansıtılan hızlandırılmış

yaşlanma ile sonuçlandığını göstermektedir (137). Örneğin uyku bozukluğu telomer kısalmasına neden olur (138). *BMALI* nakavt farelerin yanı sıra *BMALI* nakavt hücrelerde de sirkadiyen ritmin bozulması gözlemlenir, burada yüksek düzeyde ROS üretilir ve kısalmış bir yaşam süresi görülmektedir. Bu bulgular *CLOCK* genleri ve telomer uzunluğu arasındaki karşılıklı ilişkiyi göstermektedir (138-140).

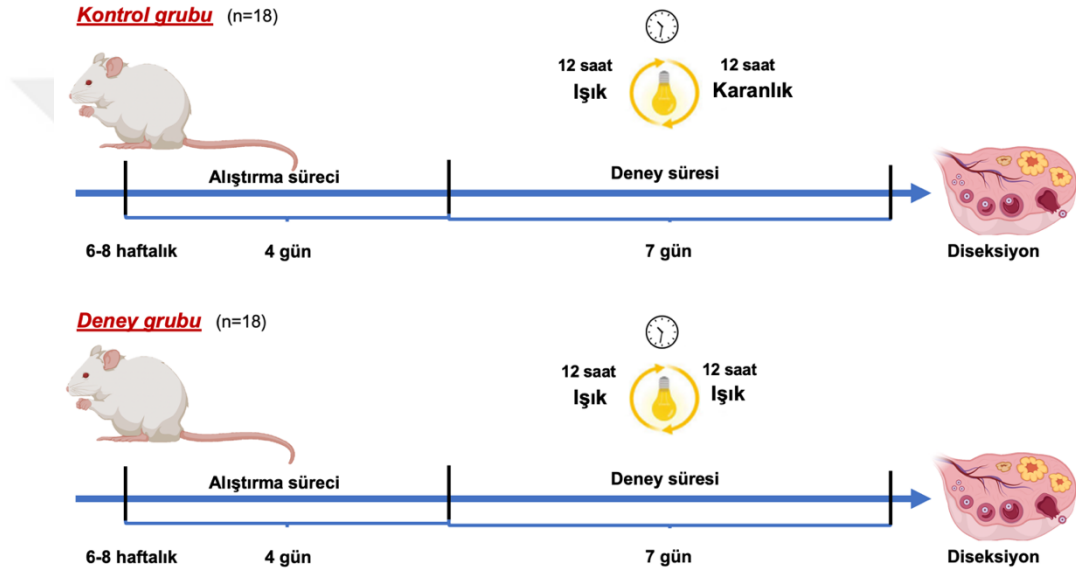
Son olarak telomeraz ve Hippo sinyal yolağı ilişkisini gösteren bir çalışmada, Hippo sinyal yolağı bileşeni olan YAP ile insan telomeraz ters transkriptazının (hTERT) ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir. hTERT ekspresyonunun insan karaciğer kanseri dokularında YAP aktivasyonu ile pozitif olarak ilişkili olduğu gösterilmiş ve YAP'ın tümörün prognozuna katkıda bulunabilecek hTERT ekspresyonunu desteklediği rapor edilmiştir. (141)



3.MATERYAL VE METOD

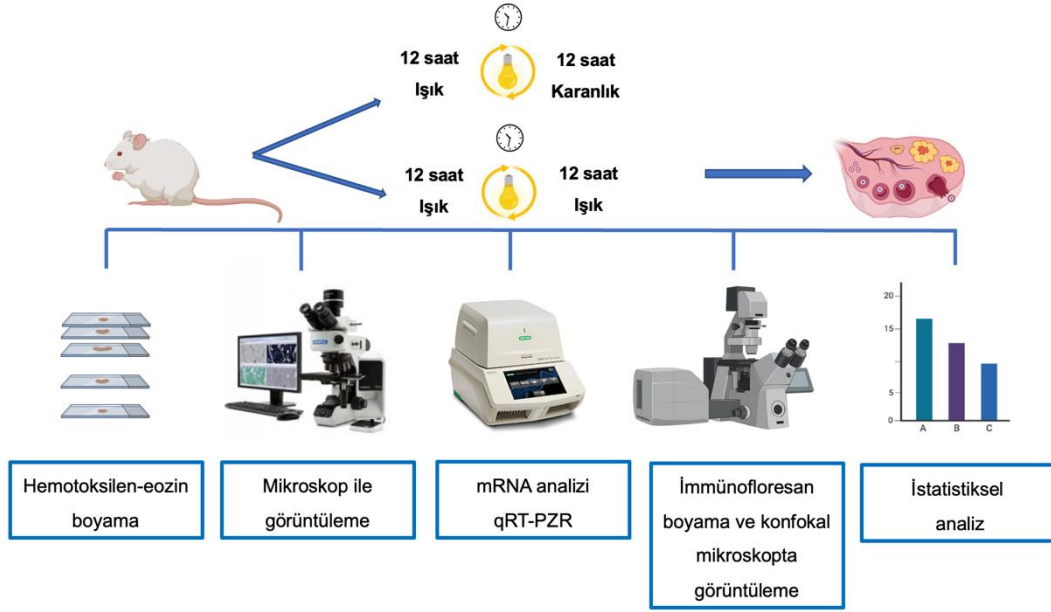
3.1. Deney Modeli

Tez çalışmamızda östrus siklusuna giren 6-8 haftalık 20 adet dişi Balb/C türü fareler Yeditepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile YÜDETAM'dan temin edilmiştir. Hayvanlar 4 günlük alışma sürecinin sonunda rastgele olarak kontrol ve deney olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu (n=10) 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde barındırılmıştır. Deney grubu (n=10) 1 hafta boyunca sabit ışık koşullarında barındırılmıştır (Şekil 3.1). Yiyecek ve su ad libitum olarak uygulanmıştır. Sıcaklık 21-23°C'de tutulmuştur.



Şekil 3.1 Deney modelinin şematik tasarımı.

1 hafta deney süresinin ardından fareler servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edilmiştir. Sağ ovaryum dokuları histolojik analiz ve immüno Floresan boyama yapmak için fiksatif içerisine alınmıştır. Sol ovaryum ise Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) deneyinde kullanılmak üzere izole edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Çalışma dizaynı.

3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirmeler

Farelerin ovaryum dokuları, 12 saat boyunca nötral formalin solüsyonunda (Formalin, Buffered, Fisher Scientific, SF100-4) bekletilerek fiksasyon işlemi sağlandı. Fiksasyonu takiben uterus dokuları akan çeşme suyunda yıkandı. Dokular dehidratasyon için artan alkol serilerinden (%70, %80, %90 ve %100) geçirilerek 3 kez 10'ar dakika ksilen içerisinde şeffaflaştırıldı ve en son aşama olan etüvde olan erimiş parafin içerisinde dokular aktarılacak doku takibi işlemi tamamlandı. Etüvden çıkarılan ovaryum dokuları doku gömme cihazı (Leica, EG 1160) kullanılarak parafin içerisinde gömüldü. Daha sonra parafine gömülmüş dokulardan mikrotom (Leica, RM 2245) yardımıyla poli-lizin lamlara 5 µm'lik histolojik kesitler alındı.

Morfolojik değerlendirmeler için kesitler hematoksilen ve eozin ile boyandı. Kesitlerden parafini uzaklaştırmak için 60°C'de 40 dakika inkübe edildi ve parafinin tamamen uzaklaştırılması için ksilen içerisinde 2 kez 20 dakika bekletildi. Daha sonra kesitler azalan alkol serilerinden 10'ar dakika (%100, %96, %90, %80 ve %70) süre ile geçilerek rehidrasyon gerçekleştirildi. Rehidrasyondan sonra kesitler distile su ile yıkandı ve hematoksilen (Gill's hematoxylin No.3, Bio-Optica, 05-06015/L) ile 2 dakika boyama yapıldı. Daha sonra akan musluk suyunda yıkandı. Ardından eozin (Eosin Y Alkol Solüsyonu, Bio-Optica, 05-10003/L) boyaması 1 dakika süre ile gerçekleştirildi. Kesitler distile su ile 2 dakika yıkandı. Sonrasında artan alkol serileri ile dehidratasyon gerçekleştirildi ve 40 dakika boyunca ksilen içerisinde tutuldu. Son olarak, kesitler ksilen

bazlı kapama solüsyonu (Bio Mount HM, Bio-Optica, 05-BM500) kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.3. Immüno Floresan Boyama

Mikrotom (Leica, RM 2245) ile poli-L-lizin lamalar üzerine alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler inkübatörde (60°C) 30 dakika boyunca deparafinize edildi. Parafini uzaklaşmasının ardından kesitler ksilen ile 2 kez 20 dakika boyunca muamele edildi. Kesitler azalan alkol serileri (%100, %90, %80 ve %70) ile rehidrate edildi, distile su ile 5 dakika yıkandı daha sonra 5 dakika boyunca PBS'te (Phosphate Buffer Saline, pH:7.2-7.4) inkübe edildi. Antijen alımı için, kesitler sitrat tamponunda (10 mM, pH 6.0) mikrodalgada (yaklaşık 600 Watt) kaynama işlemine tabi tutuldu. Ardından oda ısısında soğumaya bırakıldı. Kesitler 10 dakika Hidrojen Peroksidaz enzimi içerisinde bekletilerek antijen geri kazanımı gerçekleştirildi. Ardından kesitlerin çevresi hidrofobik bariyer kalemi (Liquid Blocker, Super Pap Pen) ile çizildi. Sonra lamalar PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. %5 Normal Keçi Serum (0.1% Triton-X-PBS) (Normal Keçi Serum, Chemicon International, S26-100mL) kullanılarak kesitler oda sıcaklığında 1 saat süre ile bloke edildi. Ardından kesitler bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan primer antikolar ile YAP (Cell Signalling, #1A12-12395, Dilüsyon 1:100), TEAD4 (Abcam, #ab97460, Dilüsyon 1:100) ve anti-TERT (ThermoFisher Scientific, #PA5-11446; Dilüsyon 1:100)) antikoları ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kesitler TBS-T (1L TBS içinde 1000µl Tween) ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı. Daha sonra bloklama solüsyonunda hazırlanan Sekonder anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488) (Abcam, #150077, 1:750) ile oda ısısında 1,5 saat inkübe edildi. Son olarak, çekirdek boyaması için DAPI'li kapama solüsyonu (Sigma, F6057) ile kapatılarak konfokal mikroskopta görüntülendi (Zeiss, LSM780).

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Sirkadiyen ritm genlerinin mRNA seviyelerini göstermek için qRT-PZR yöntemi uygulandı.

3.4.1. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

qRT-PZR yöntemi için, ovaryum dokularına 300 µL lizis tamponu eklendi. Ependorflar 100 µL aktivasyon buffer ile 30 saniye yıkandı ve 10,000xg'de santrifüj edildi. Ardından örnek süpernatantını içeren ependorfa 300 µL izopropanol eklendi. Filtreli ependorfun dibine çöken aktivasyon bufferi boşaltıldıktan sonra, izopropanol ilave edilen

örnekler eppendorfa aktarıldı ve 30 saniye 10.000 g'de santrifüj edildi. Filtreli eppendorfun altında kalan kısım atıldı, örnek RNA'lar bu aşamada filtrede kaldı. RNA içeren filtreli eppendorflar 700 µL birinci tampon yıkama solüsyonu ile 30 saniye yıkandı. Ardından 10.000 g'de santrifüj edildi. Filtrenin altında bulunan eppendorf boşaltıldı. Filtrenin üzerine 700 µl sekonder tampon yıkama solüsyonu eklendi ve 30 saniye beklendi. Ardından 10.000 g'de santrifüj edildi. Filtrenin altında bulunan kısım boşaltıldı. Filtrede kalan kısım yeni bir otoklavlanmış tüpe aktarıldı ve eppendorfun tam merkezine gelecek şekilde 40 µl elüsyon bufferi aktarıldı ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından 10.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Örnek RNA'lar tüp içerisinde toplandı ve elde edilen RNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Örneklerden izole edilen RNA'lardan RNA ölçümü yapıldı, belirlenen/hesaplanan miktarda RNA-template, 0.5 µL Oligo-DT ve su karışımı hazırlandı. 70°C'de 5-10 dakika denatürasyon işlemine tabi tutuldu. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği Tablo 1'de verilmiştir. qRT-PZR reaksiyonu için kullanılan solüsyonlar ve miktarları Tablo 2'de verilmiştir. PZR reaksiyon döngüleri Tablo 3'te verilmiştir. Reaksiyonlarda kullanılan primer dizileri Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 1. cDNA eldesi için hazırlanan karışımın içeriği.

Bileşen	Reaksiyon başına hacim (µL)
SCRIPT RT Buffer	4
dNTP Mix	1
DTT Stock Solution	1
RNase inhibitor	1
SCRIPT Reverse Transcriptase	0.5
RNase-free Water	2.5
Toplam hacim	10 µl mix

Tablo 2. qRT-PZR reaksiyonunda kullanılan sıcaklık değerleri ve süreleri.

Adımlar	Derece (Duration (sec))	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95°C (30)	1
Denatürasyon	95°C (15)	45
Annealing	53°C (20)	
Extension (Uzama)	60°C (20)	

Bu işlem sonucunda elde edilen mix solüsyonunun 10 µL'si ile 10 µL örnek RNA ile karıştırıldı. Ardından örnekler 50°C'de 45 dakika, 42°C'de 10 dakika PZR cihazında inkübe edildi. cDNA sentezi işlemi tamamlandıktan sonra örnekler -20°C'de saklandı.

Tablo 3. qRT-PZR deneylerinde kullanılan karışımın içeriği.

Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	5 µl
PCR Grade Water	3.5 µl
Forward Primer	0.5 µl
Reverse Primer	0.5 µl
Örnek DNA	1 µl

Tablo 4. qRT-PZR deneylerinde kullanılan primerler.

Gen	Primer	Primer dizileri
CLOCK	Forward	CTTCCTGGTAACGCGAGAAAG
	Reverse	GTCGAATCTCACTAGCATCTGAC
	Forward	CTGGCGTGGAAGTCATCGT

CRY1

Reverse

CTGTCCGCCATTGAGTTCTATG

BMAL1

Forward

CCAAGAAAGTATGGACACAGACAAA

Reverse

GCATTCTTGATCCTTCCTTGGT

PER2

Forward

GAAAGCTGTCACCACCATAGAA

Reverse

AACTCGCACTTCCTTTTCAGG

YAP1

Forward

CGCTCTTCAACGCCGTCA

Reverse

AGTACTGGCCTGTCGGGAGT

TEAD4

Forward

GGACACTACTCTTACCGCATCC

Reverse

TCAAAGACATAGGCAATGCACA

β -ACTIN

Forward

ATAGCACAGCCTGGATAGCAACGTAC

Reverse

CACCTTCTACAATGAGCTGCGTGTG

mTERT

Forward

CCTGCGGCCCATTGTGAAC

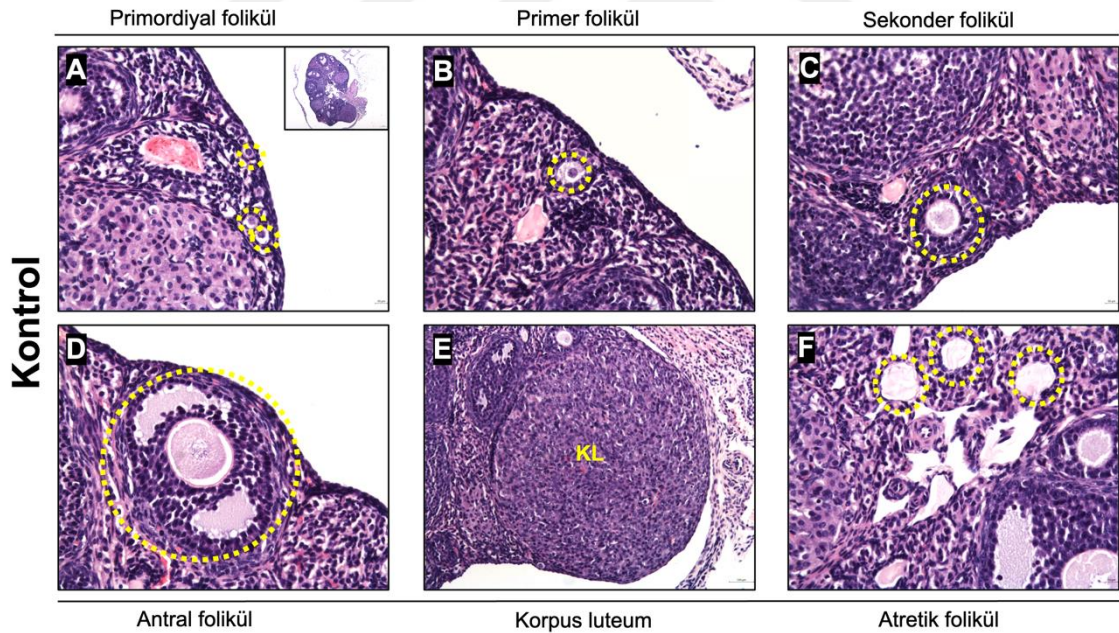
Reverse

GTGGACTTGGCCTTGGCTATCTCT

4. BULGULAR

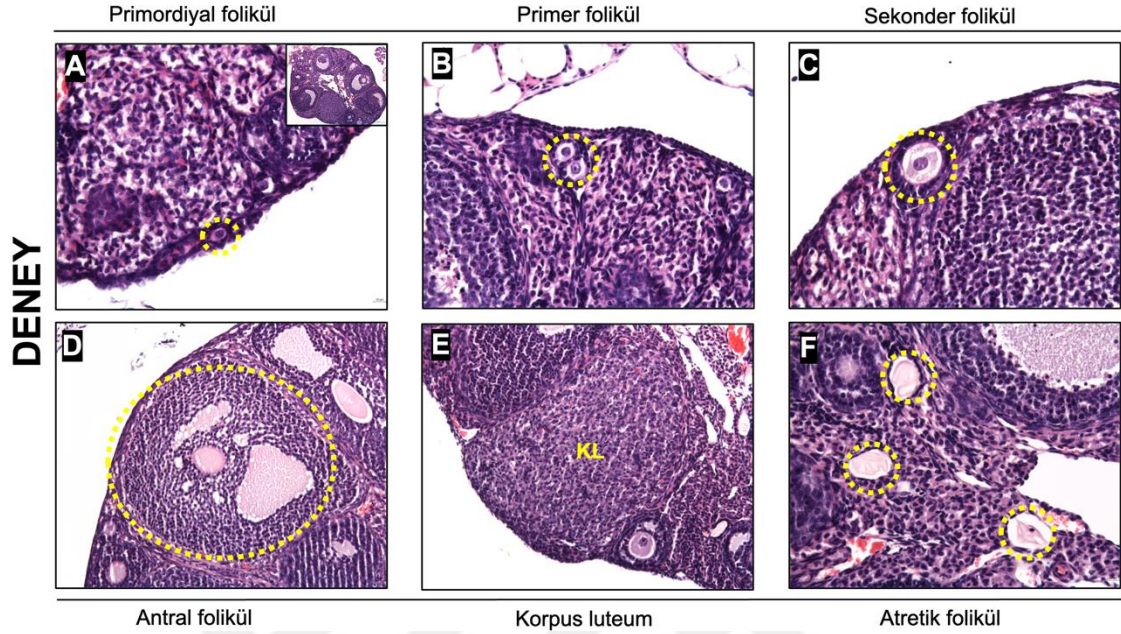
4.1. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında Fare Ovaryumlarının Morfolojik ve Histolojik Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ve deney grubu ovaryum dokularına morfolojik değerlendirme için hematoksilen ve eozin boyama yapıldı. Ardından ışık mikroskopunda görüntülendi. Ovaryum dokusunda korteks ve medulla kısımları değerlendirildi. Korteks kısmında gelişmekte olan foliküller görüldü. 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol ve sirkadiyen ritim bozulmuş 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan gruplar için primordiyal, primer, sekonder, antral ve atretik foliküller ile korpus luteum yapısı değerlendirildi (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Değerlendirilen foliküllerde kontrol ve deney grupları arasında morfolojik olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Ovaryum medullası gruplar arasında karşılaştırıldığında yapısal olarak bir farklılık görülmedi. Sirkadiyen ritim bozulmuş gruplarda kontrol grubuna kıyasla granüloza hücreleri arasında boşluklar olduğu değerlendirildi. Oosit yapısında ise morfolojik olarak bozulmalar görülmedi. Her iki grupta da bağ doku yapısının ve bütünlüğün korunduğu görüldü.



Şekil 4.1 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubu ovaryum kesitlerinin hematoksilen ve eozin boyanmalarının ışık mikroskobu görüntüleri. Gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin ve korpus luteumun morfolojisi; primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül (D), korpus luteum (E) ve atretik folikül (F). Ovaryum kesitleri için ovaryumun merkezinden geçen kesitlerden görüntüler alınarak standardizasyon sağlanmıştır. Sarı kesikli daire çizgileri folikülleri

göstermektedir. KL: Korpus Luteum. Primordiyal, primer, sekonder, antral ve atretik foliküller için görüntüler 40x objektif, korpus luteum 20x objektif ile çekilmiştir.



Şekil 4.2 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grup ovaryum kesitlerinin hematoksilin ve eozin boyanmalarının ışık mikroskobu görüntüleri. Gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin ve korpus luteumun morfolojisi; primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül (D), korpus luteum (E) ve atretik folikül (F). Ovaryum kesitleri için ovaryumun merkezinden geçen kesitlerden görüntüler alınarak standardizasyon sağlanmıştır. Sarı kesikli daire çizgileri folikülleri göstermektedir. KL: Korpus Luteum. Primordiyal, primer, sekonder, antral ve atretik foliküller için görüntüler 40x objektif, korpus luteum 20x objektif ile çekilmiştir.

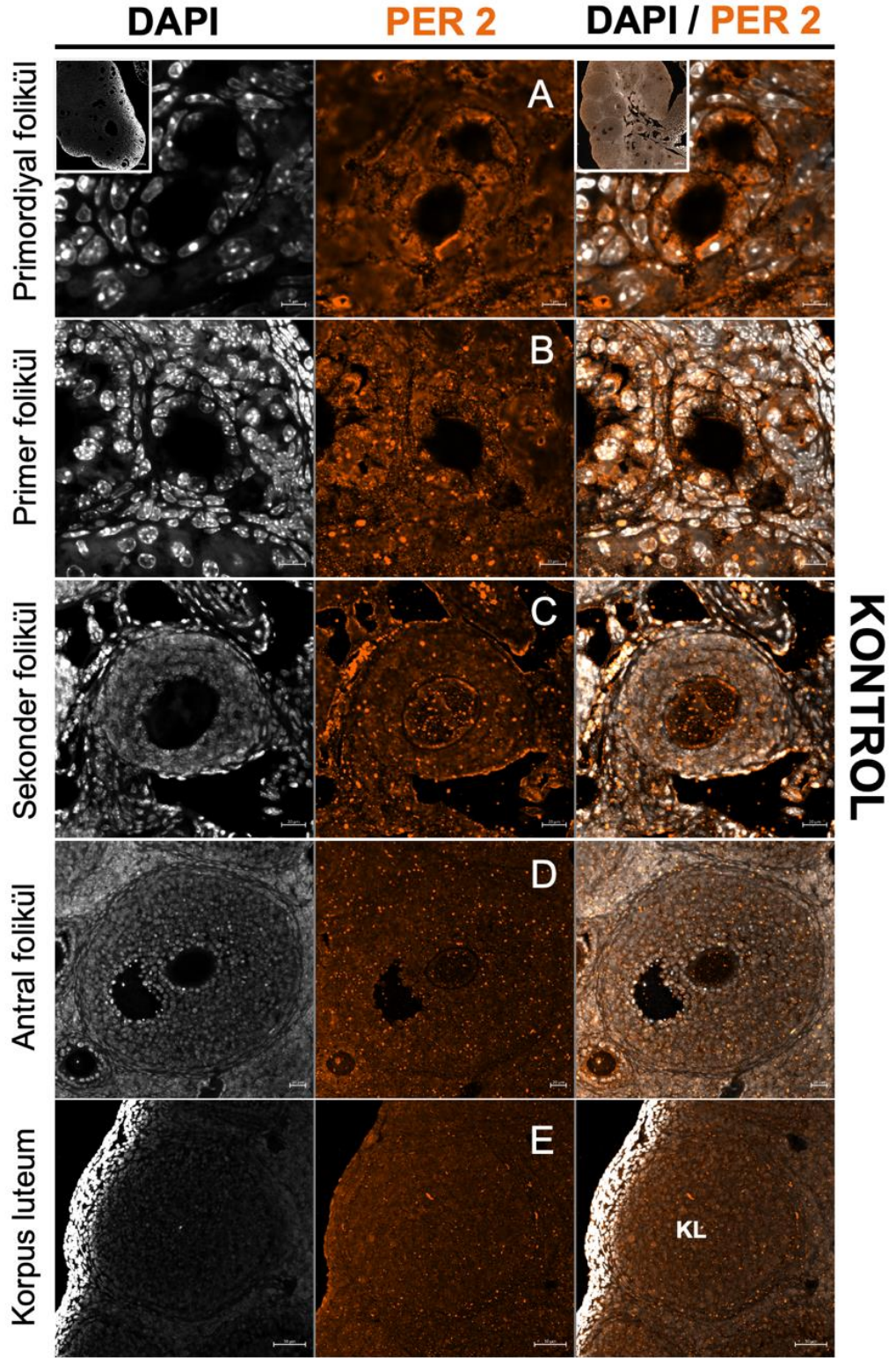
4.2. Sirkadiyen Ritim Geni Olan PER2 Ekspresyonunun İmmünofloresan Yöntemi ile Gösterilmesi

12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol ve sirkadiyen ritim bozulmuş 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan grupları değerlendirmek için alınmış kesitlerden sirkadiyen ritim geni olan PER2 (Period Circadian Regulator 2) ekspresyonunu değerlendirdik. Sirkadiyen ritmin bozulduğunu göstermek için PER2 antikoru kullanılırken çekirdek boyaması için DAPI kullanıldı ve elde edilen görüntüler konfokal mikroskop ile görüntülendi.

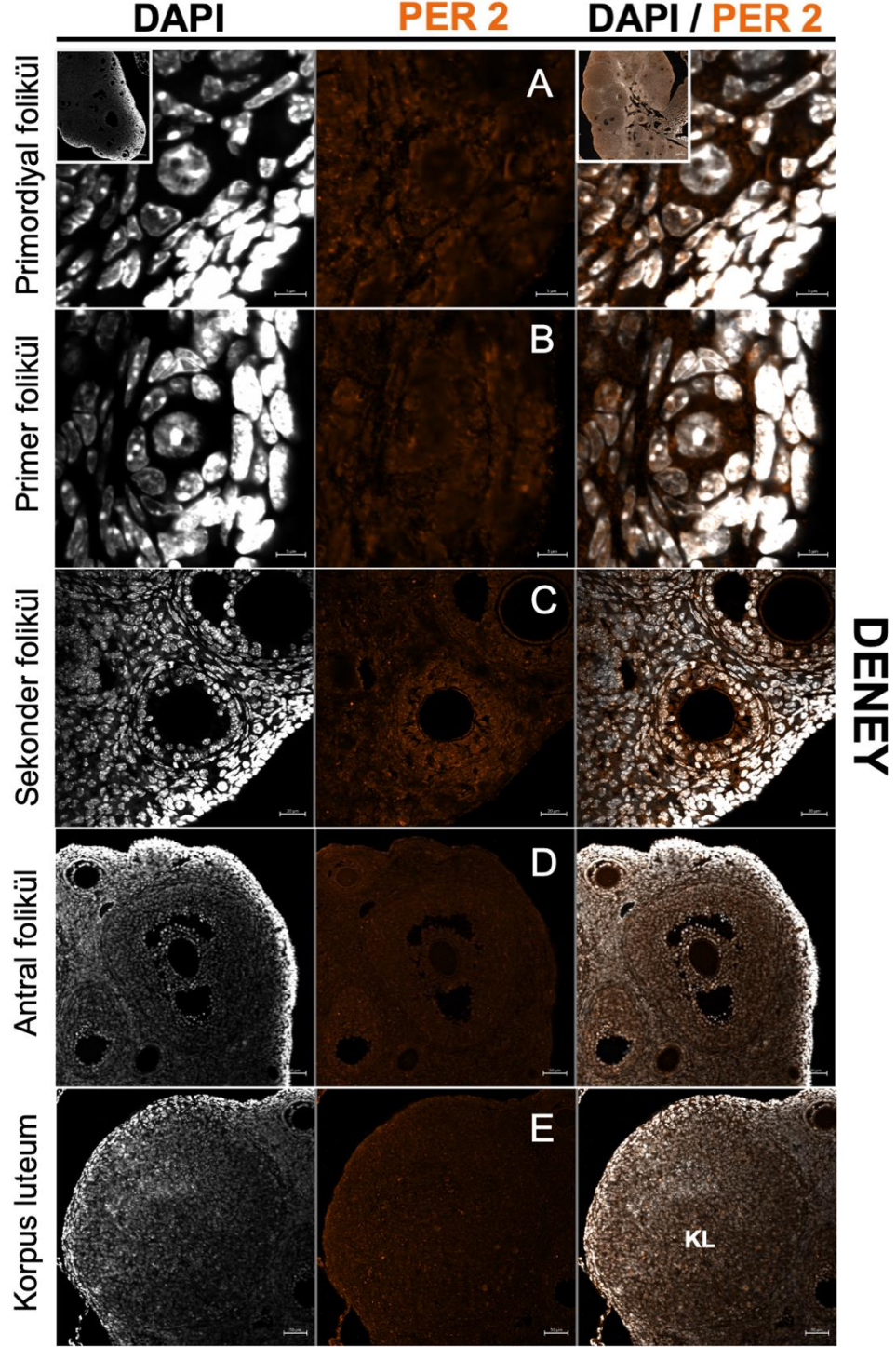
Ovaryum dokularında korteks ve medulla kısımları değerlendirildi. Ayrıca kontrol ve deney gruplarındaki dokularda için primordiyal, primer, sekonder, antral ve atretik foliküller ile korpus luteum yapısı incelendi. Deney grubunda kontrol grubuna kıyasla PER2 immüno Floresan yoğunluğunda anlamlı bir şekilde azalma görmekteyiz ($p<0.05$) (Şekil 4.3, 4.4).

Sirkadiyen ritmin en önemli genlerinden bir olan PER2 ekspresyonunu incelediğimizde, PER2 immüno Floresan yoğunluğundaki azalma, deney grubunda sirkadiyen ritmin bozulduğunu doğrulamaktadır. Daha sonrasında PER2 immüno Floresan yoğunluğunu grafiksel olarak da gösterdik (Şekil 4.5).

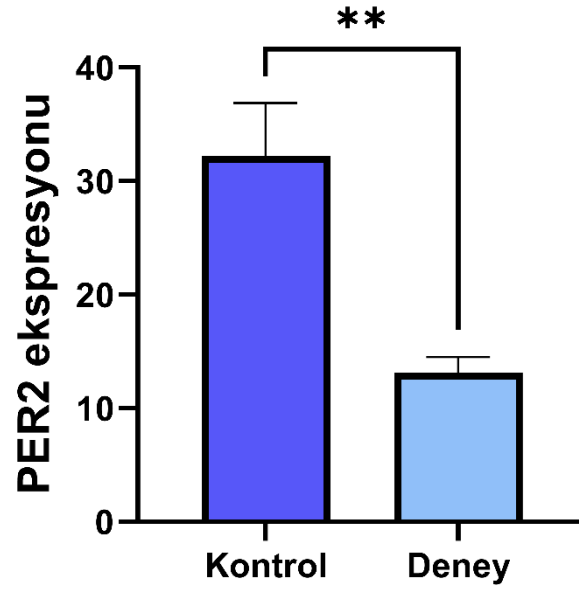




Şekil 4.3 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki PER2 lokalizasyonu. İmmüno Floresan yöntem ile primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül (D) ve korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



Şekil 4.4 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki PER2 lokalizasyonu. İmmüno Floresan yöntem ile PER2 lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteum'da (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.

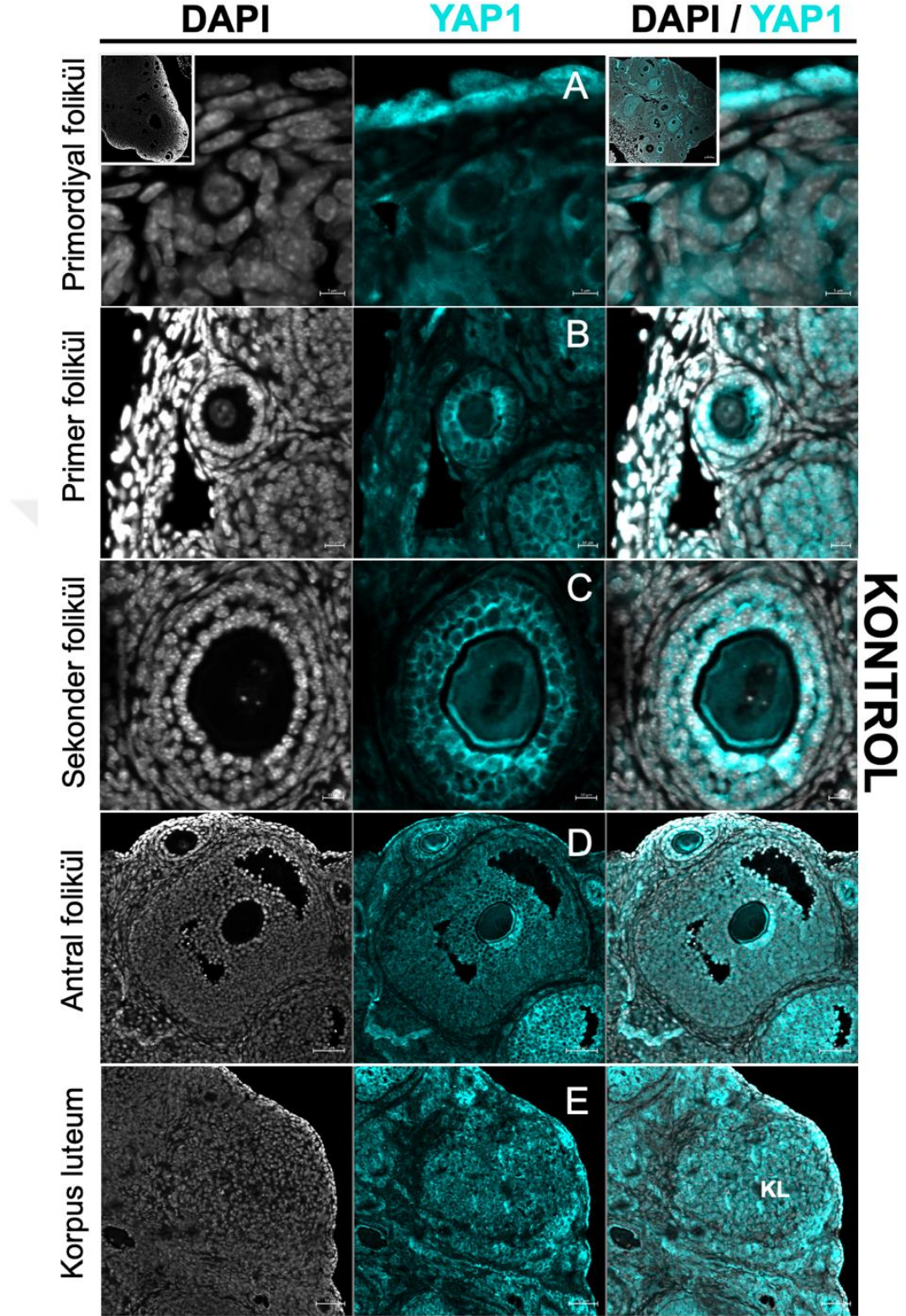


Şekil 4.5 İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney grupları ovaryum dokuları arasında PER2 immünofloresan yoğunluğunun karşılaştırılması. İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki total ovaryum kesitinden elde edilen PER2 ekspresyon yoğunluk seviyeleri karşılaştırılmıştır. Deney grubunda PER2 ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$).

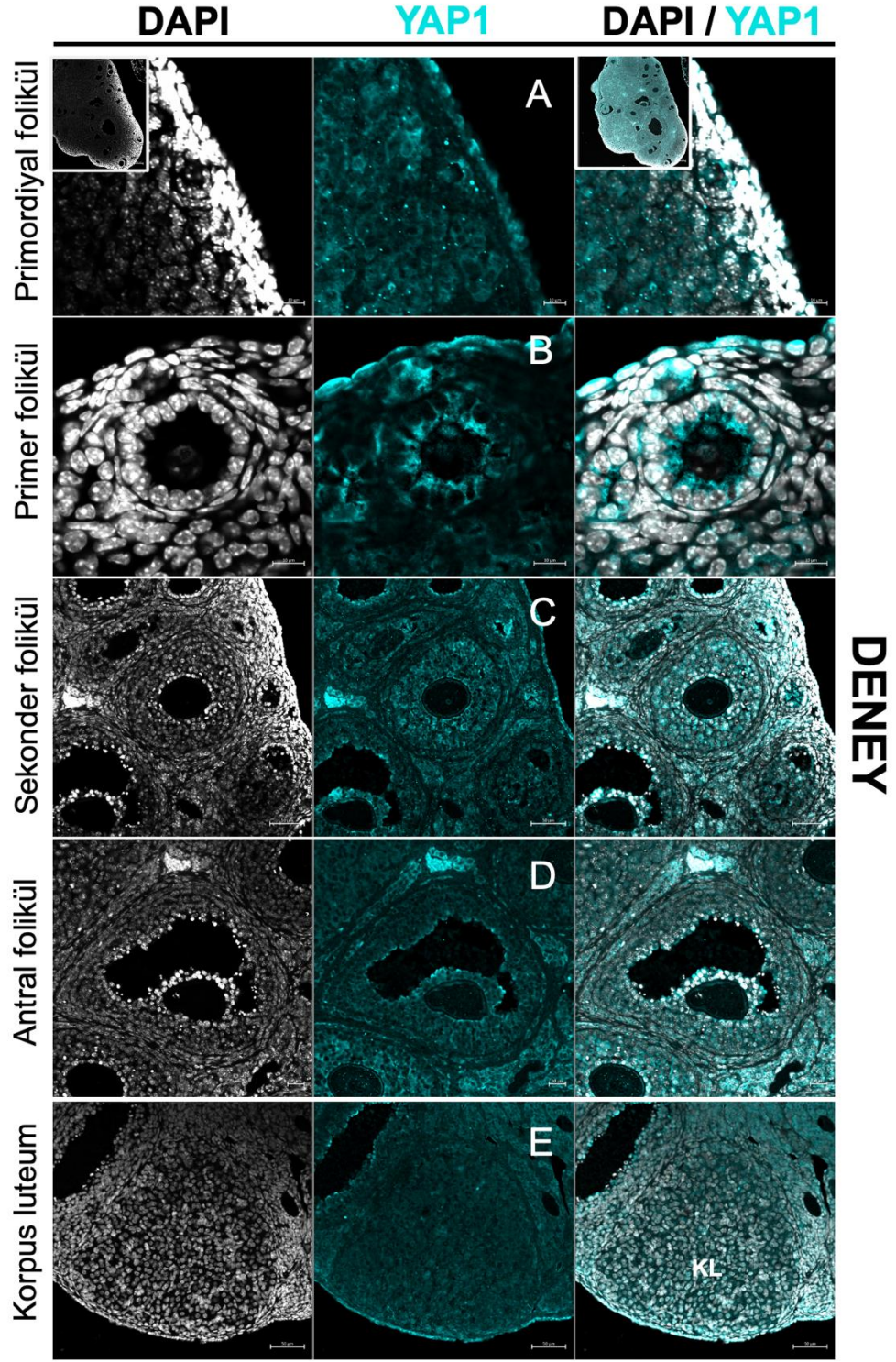
4.3 Sirkadiyen Ritim Bozulmasında Hippo Sinyal Yolağı Proteinlerinden YAP1 ve TEAD4'ün Lokalizasyonunun İmmünofloresan Yöntem ile Belirlenmesi

Sirkadiyen ritim bozulduğunda ovaryum dokusundaki Hippo sinyal yolağı proteinleri olan YAP1 ve TEAD4 ekspresyonunu 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol ve sirkadiyen ritim bozulmuş 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan gruplar için değerlendirdik. Ovaryumun tüm foliküllerinde ve korpus luteumda bu proteinlerin lokalizasyonunu gösterdik.

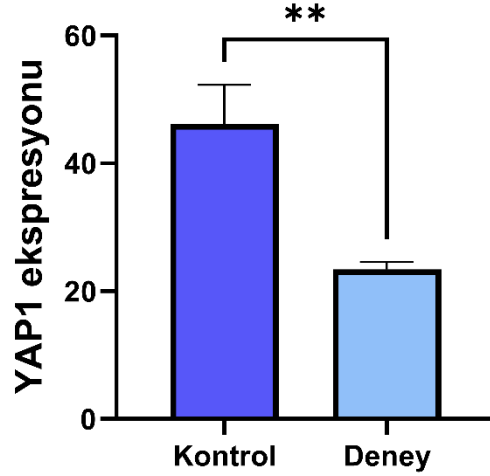
İlk olarak YAP1 ekspresyonu değerlendirildiğinde, Sirkadiyen ritmin 1 hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu deney grubunda kontrole kıyasla YAP1 ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü ($p < 0.05$). YAP1 ekspresyonu primordiyel, primer, sekonder, antral ve aterik foliküllerde hem oositte hem de folikül hücrelerinde görüldü. (Şekil 4.6, Şekil 4.7) Korpus luteumun luteal hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmalarında YAP1 lokalizasyonu değerlendirildi. (Şekil 4.8) Ardından tüm değerlendirmeler grafiksel olarak gösterildi.



Şekil 4.6 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki YAP1 lokalizasyonu. İmmüno Floresan yöntem ile YAP1 lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



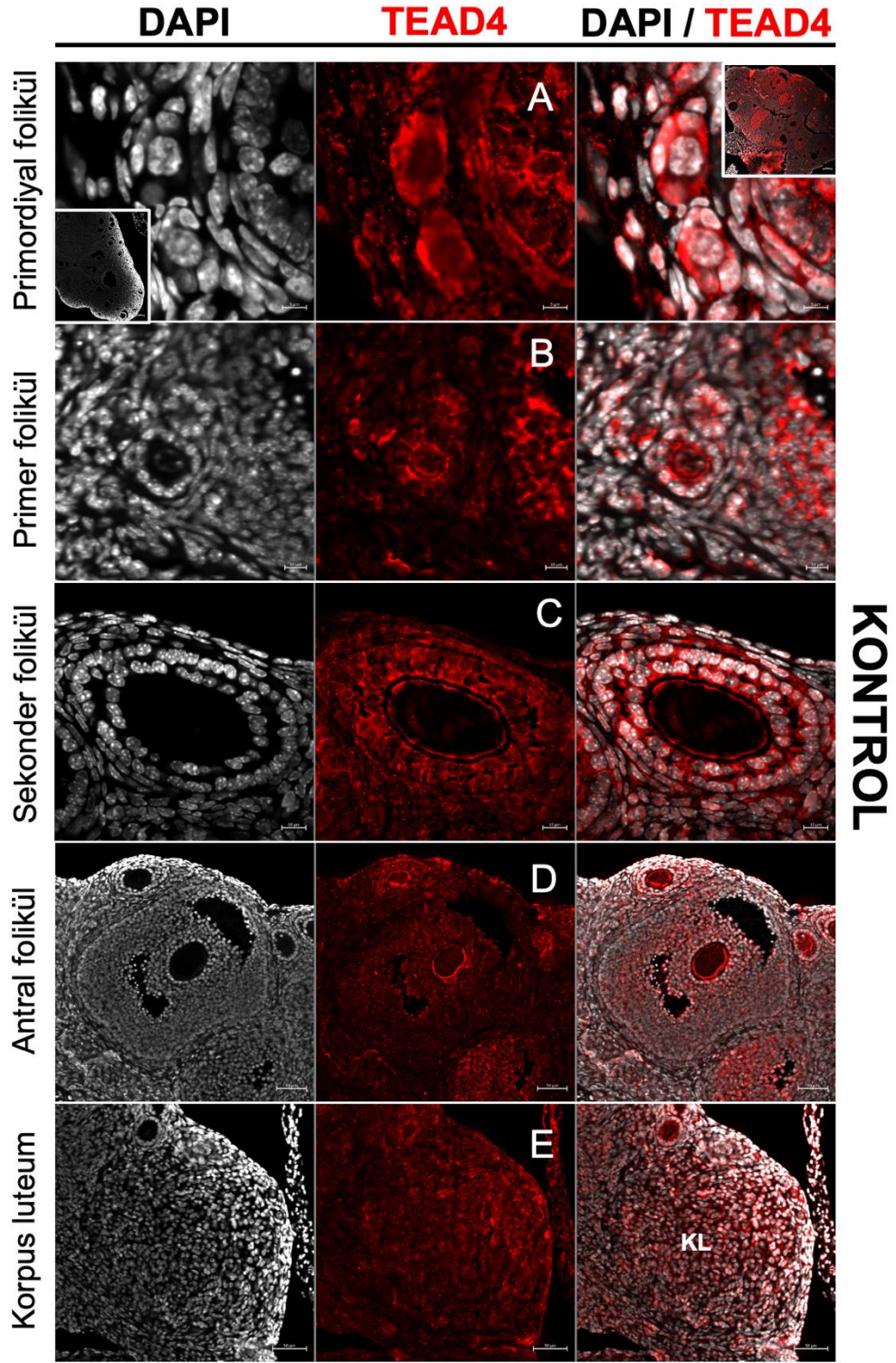
Şekil 4.7 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki YAP1 lokalizasyonu. İmmüno Floresan yöntemi ile YAP1 lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



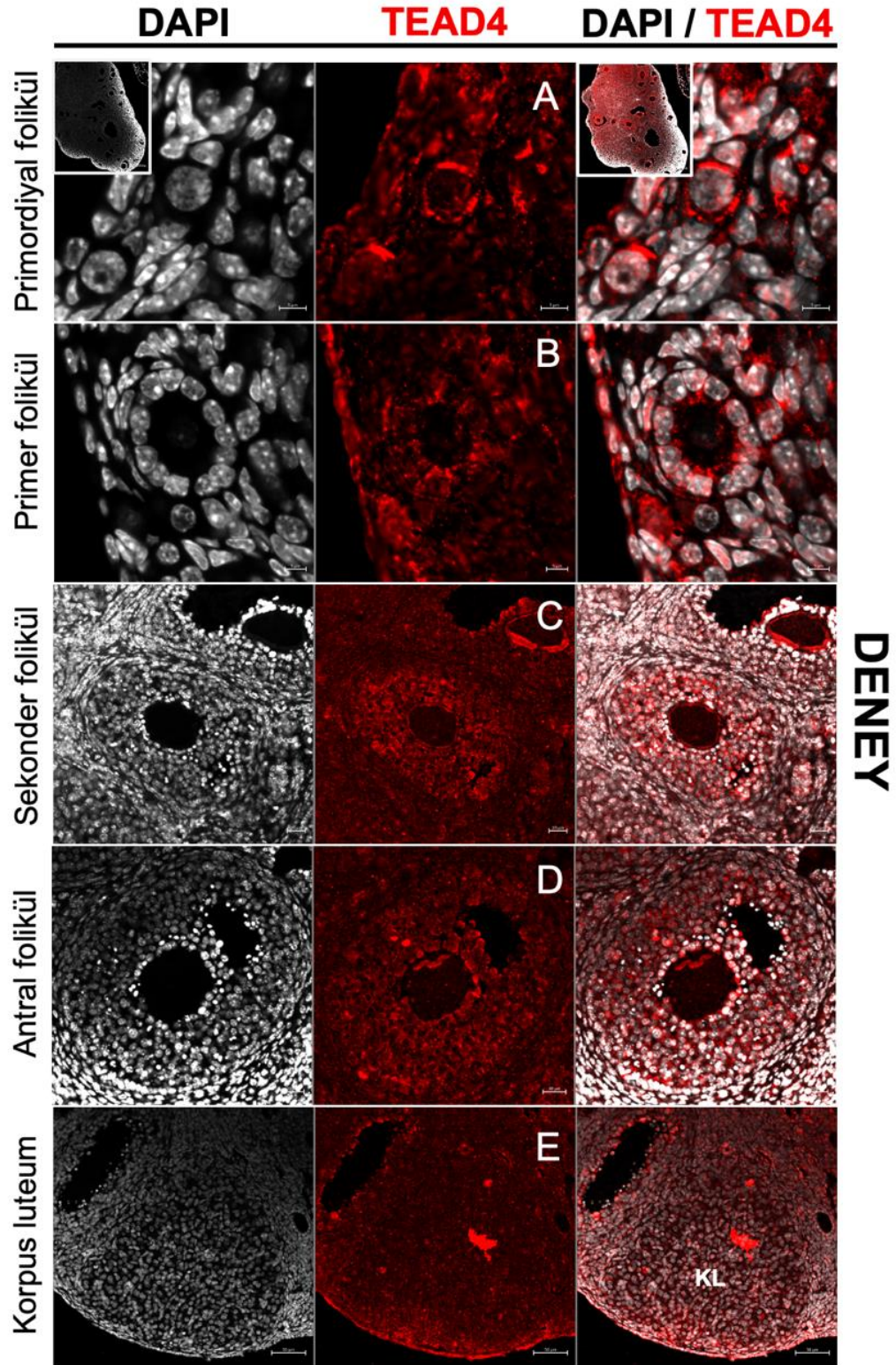
Şekil 4.8 İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney grupları ovaryum dokuları arasında YAP1 ekspresyonundaki yoğunluğun karşılaştırılması. İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki total ovaryum kesidinden elde edilen YAP1 ekspresyon yoğunluk seviyeleri karşılaştırılmıştır. Deney grubunda YAP1 ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0.05$).

Hippo sinyal yolağı proteinlerinden olan YAP1 ekspresyonu incelendikten sonra ovaryum foliküllerinde ve korpus luteum yapısında TEAD4 ekspresyonunu değerlendirdik. Sirkadiyen ritmin 1 hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney gruplarında TEAD4 ekspresyonu 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol gruplarına kıyasla ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapısı için arttığı gözlemlendi. Primordiyel, primer, sekonder, antral ve atretik foliküller de olan bu lokalizasyon oosit ve folikül hücrelerinde değerlendirildi (Şekil 4.9, Şekil 4.10). TEAD4 ekspresyonu YAP1 ekspresyonu gibi folikül hücrelerinin ve korpus luteumun luteal hücrelerinin hem çekirdeklerinde hem de sitoplazmasında gözlemlendi.

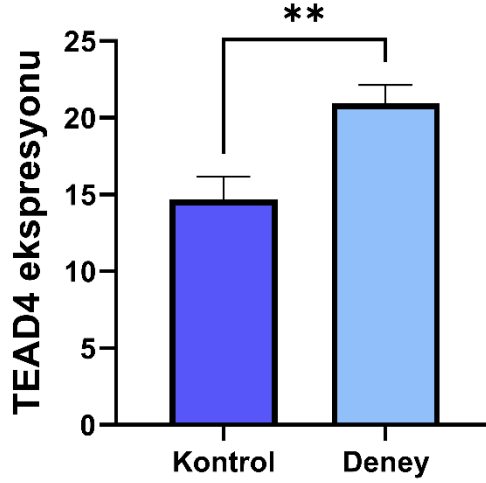
TEAD4 ekspresyonu kontrol ve sirkadiyen ritmin bozulduğu gruplar arasında farklılık gösterdi ($p < 0.05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.9 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki TEAD4 lokalizasyonu. İmmüno Floresan yöntem ile TEAD4 lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



Şekil 4.10 Sirkadiyen ritim bozulmuş 12:12 saat aydınlık/aydınlık deney grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki TEAD4 lokalizasyonu. İmmünofloresan boyanma ile TEAD4 lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.

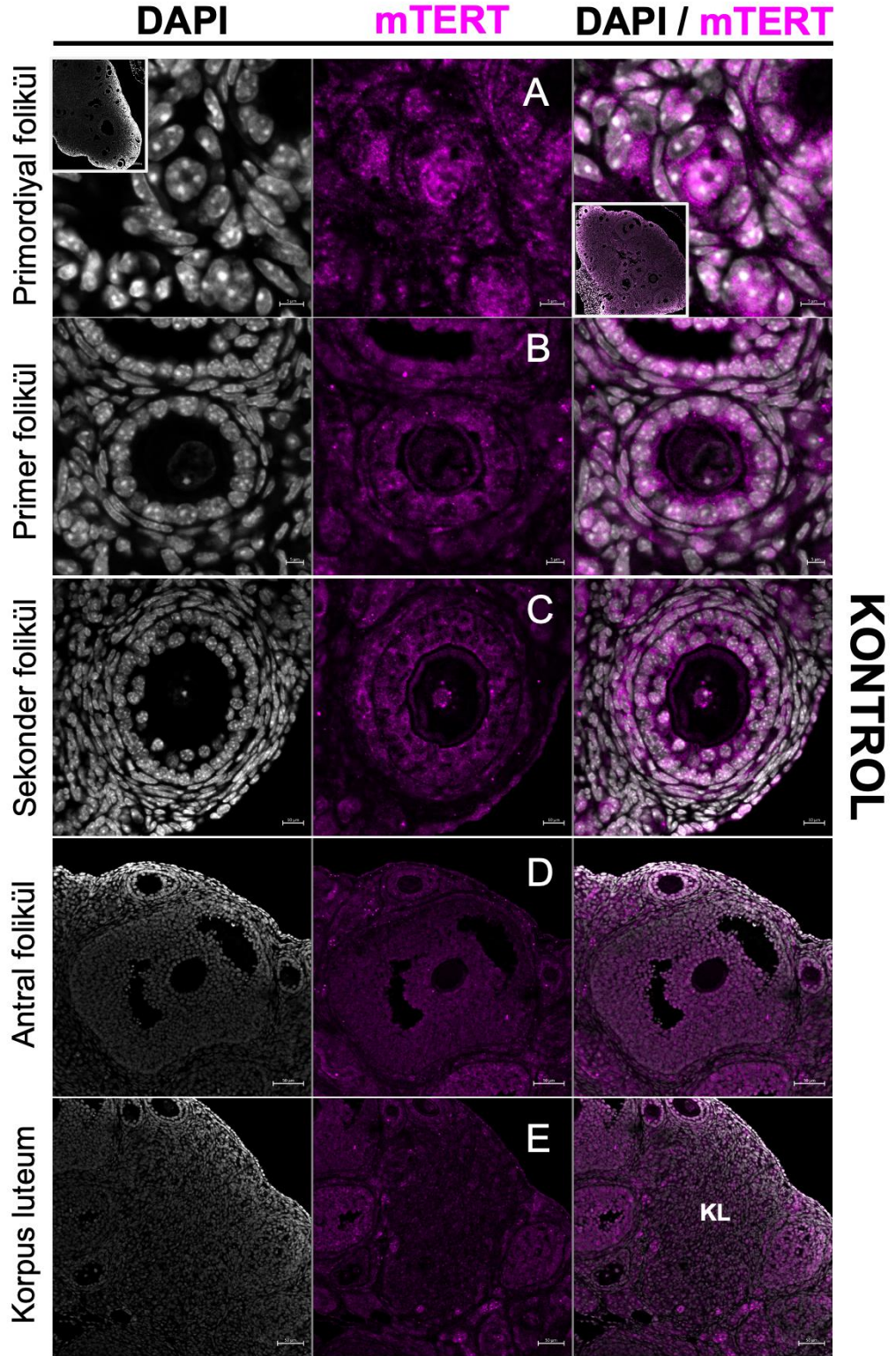


Şekil 4.11 İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney grupları ovaryum dokuları arasında TEAD4 ekspresyonundaki yoğunluğun karşılaştırılması. İmmünofloresan boyanma sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki total ovaryum kesidinden elde edilen TEAD4 ekspresyon yoğunluk seviyeleri karşılaştırılmıştır. Deney grubunda TEAD4 ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

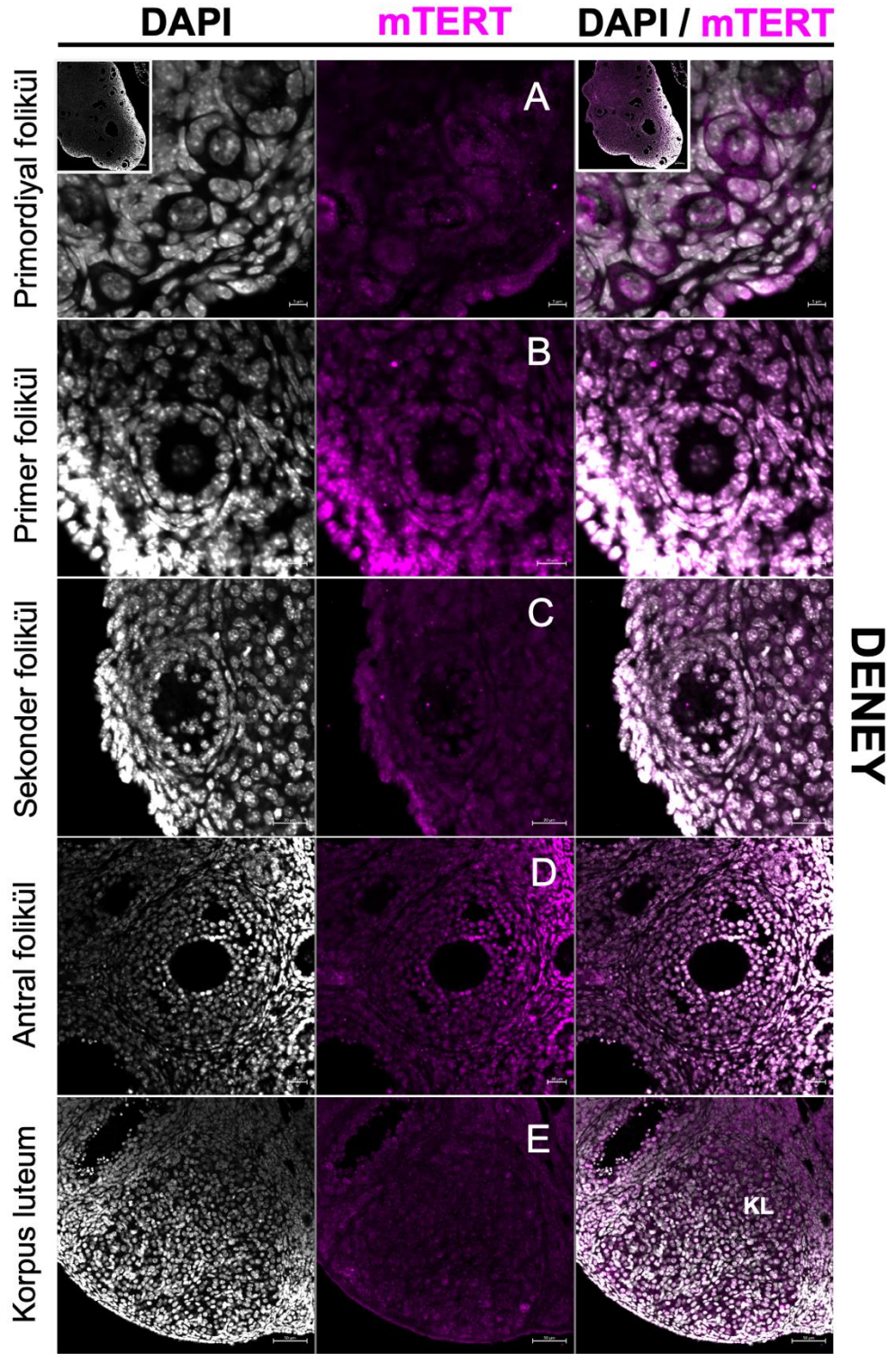
4.4. Sirkadiyen Ritim Bozulmasında mTERT Ekspresyonun İmmünofloresan Yöntem ile Gösterilmesi

Telomerler, kromozomal stabilite ve hücrenin hayatta kalması için gerekli olan kromozomal uçlardaki koruyucu başlıklardır. Sirkadiyen ritim bozulması, obezite ve stres telomer uzunluğunu kısalttığı ve reaktif oksijen seviyelerini yükselttiği bilinir. Bu hipotezlere dayanarak sirkadiyen ritim bozulmasında mTERT ekspresyonunu inceledik.

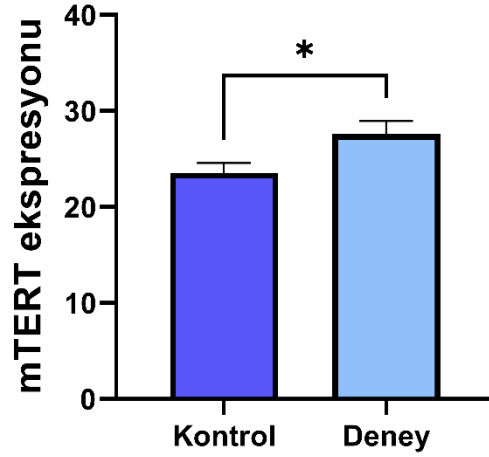
İmmünofloresan boyama ile mTERT'i incelediğimizde sirkadiyen ritmin 1 hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grubunda 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubuna kıyasla ekspresyonunun arttığını belirledik (Şekil 4.12, Şekil 4.13). Deney ve kontrol gruplarında primordiyal, primer, sekonder, antral, atretik foliküller ve korpus luteum yapısını incelediğimizde oosit, granüloza ve teka hücrelerinde mTERT lokalizasyonunu belirledik. Teka hücrelerinde ve korpus luteumun luteal hücrelerinde mTERT ekspresyonunu sitoplazma ve çekirdekte görüntüledik. Elde ettiğimiz tüm sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılarak grafik olarak gösterilmiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.12 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki mTERT lokalizasyonu. İmmünofloresan boyanma ile mTERT lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



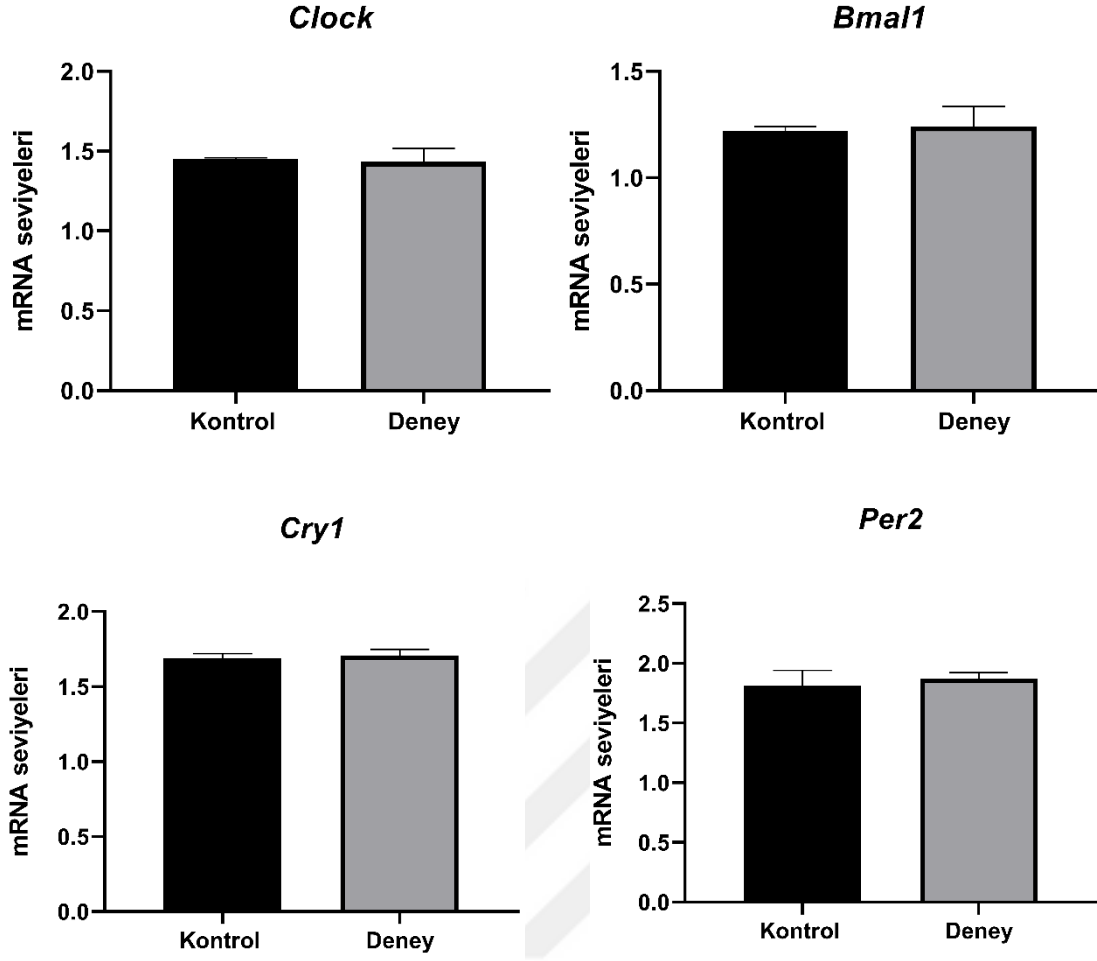
Şekil 4.13 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grubu ovaryumunda gelişimin farklı evrelerinde bulunan foliküllerdeki mTERT lokalizasyonu. İmmüno Floresan boyanma ile mTERT lokalizasyonu primordiyal folikül (A), primer folikül (B), sekonder folikül (C), antral folikül aşamalarında ve (D), korpus luteumda (E) belirlenmiştir. Çekirdek boyanması DAPI ile gerçekleştirilmiştir. KL: Korpus Luteum.



Şekil 4.14 İmmüno Floresan boyanma sonucunda kontrol ve deney grupları ovaryum dokuları arasında mTERT ekspresyonundaki yoğunluğun karşılaştırılması. İmmüno Floresan boyanma sonucunda kontrol ve deney gruplarındaki total ovaryum kesidinden elde edilen mTERT ekspresyon yoğunluk seviyeleri karşılaştırılmıştır. Deney grubunda mTERT ekspresyon yoğunluğu kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

4.5. *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1* Ekspresyonlarının Ovaryum Dokularında mRNA Seviyesinde Gösterilmesi

Sirkadiyen ritim genleri olan *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1* ekspresyonlarını 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsü olan kontrol grubu ve sirkadiyen ritmin 1 hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsü olan deney grubunda qRT-PZR yöntemi ile mRNA düzeyinde belirledik. Bu değerlendirilmeler her bir sirkadiyen ritim geni için yapılarak değerlendirildi. Yapılan değerlendirilmelerde 1 haftalık sürekli ışık uygulanan deney grubu ve kontrol grubu arasında sirkadiyen ritim genlerinin mRNA seviyesinde herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi. Yapılan tüm istatistiksel analizler grafiksel olarak gösterildi (Şekil 4.15).

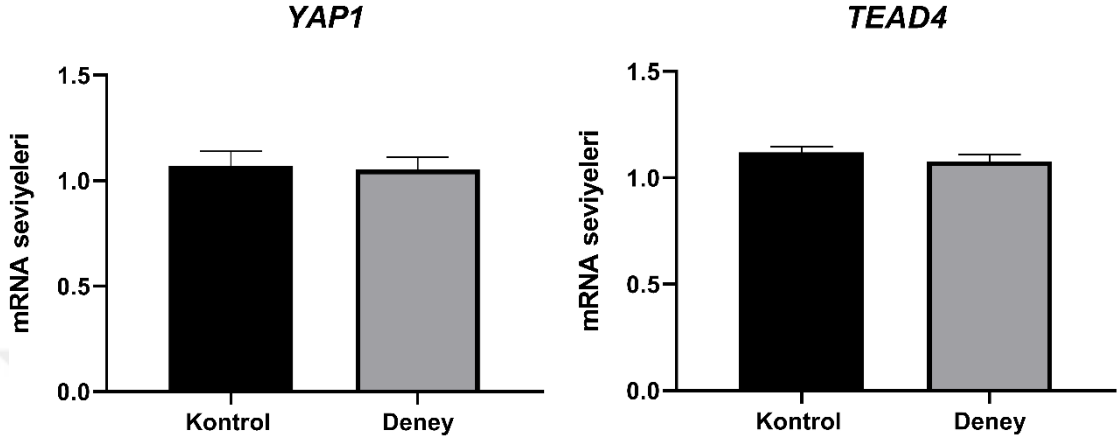


Şekil 4.15 Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen ovaryum dokularında *BMAL1*, *CLOCK*, *PER2* ve *CRY1* gen ekspresyonları qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterilmesi. (A) *CLOCK*, (B) *BMAL1*, (C) *CRY1* ve (D) *PER2* genlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonunun belirlenmesi. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.6. Hippo Sinyal Yolağı Bileşenlerinden *YAPI* ve *TEAD4* Ekspresyonunun Ovaryum dokularında mRNA Düzeyinde Gösterilmesi

Hippo sinyal yolağı komponentlerinden *YAPI* ve *TEAD4* ekspresyonunun, 1 hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu

deney grubunda değerlendirdiğimizde, *YAP1* ve *TEAD4* ekspresyonlarında anlamlı bir farklılık görölmedi. Yapılan değerlendirilmeler *Beta-aktin* ekspresyonuna oranlanlanarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak grafikte gösterilmiştir (şekil 4.16).

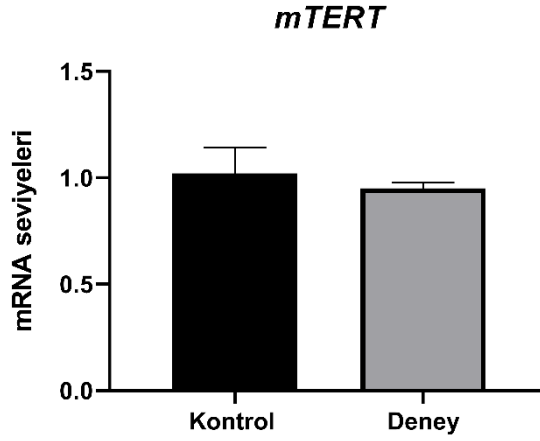


şekil 4.16. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen ovaryum dokularında *YAP1* ve *TEAD4* gen ekspresyonları qRT-PZR yöntemi kullanılarak mRNA düzeyinde gösterilmesi. (A) *YAP1*, (B) *TEAD4* genlerinin mRNA seviyesinde ekspresyonunun belirlenmesi. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.7. *mTERT* Ekspresyonunun Ovaryum dokularında mRNA Düzeyinde Gösterilmesi

12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen ovaryum dokularında *mTERT* ekspresyonu belirlendi.

Değerlendirilmeler sonucunda *mTERT* ekspresyonun sirkadiyen ritim bozulmuş ve kontrol gruplarında mRNA seviyesinde anlamlı bir şekilde değişmediği göröldü. Yapılan analizler istatistiksel olarak gösterildi (şekil 4.17).



Şekil 4.17. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney grubundan elde edilen ovaryum dokularında *mTERT* gen ekspresyonunun qRT-PZR yöntemi ile mRNA düzeyinde gösterilmesi. *mTERT* ekspresyonu deney grubunda kontrol grubuna kıyasla farklılık görülmemiştir. Hesaplamalar ImageJ ve GraphPad programları kullanılarak yapıldı. Gruplar, student's t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

5.TARTIŞMA

Sirkadiyen ritim, memeliler üzerinde hücresel, fizyolojik ve davranışsal süreçleri moleküler düzeyde transkripsiyonel ve translasyonel geri bildirim döngüleri aracılığıyla koordine eden bir sistemdir (142). Sirkadiyen ritim uyku-uyanıklık döngüsünü düzenleyerek özellikle endokrin sistem ve üreme sistemi üzerinde moleküler düzeyde etkilidir (143). Dişi üreme sisteminde sirkadiyen ritim, foliküler gelişim ve ovulasyon mekanizmalarında oldukça önemlidir ve merkezi sirkadiyen sistem tarafından düzenlenir. Yapılan araştırmalar ile saat genlerinin senkronizasyonunun üreme başarısı için kritik olduğu gösterilmiştir (144-146). Gece vardiyasında çalışan kadınlar üzerinde yapılan çalışmalarda, ekstra maruz kalınan yapay ışığın sirkadiyen ritmi bozarak üreme fonksiyonunu azalttığı, gebelik oranlarını düşürdüğü, doğan yavrularda düşük doğum ağırlığına sebep olduğu ve tekrarlayan düşüklere yol açtığı gösterilmiştir (147, 148).

Per1/Per2 çift mutasyonlu dişi farelerin doğurganlığında erken başlayan bir azalma olduğunu gösterilmiştir. Bununla birlikte, mutant farelerde ovaryum folikülleri ile ilişkili vasküler büyümede ve incelenen diğer dokularda belirgin bir değişiklik olmamıştır. İlginç bir şekilde, *Per1/Per2* mutantlarında orta yaş evresinden itibaren ovaryumda folikül sayısında kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Ovaryumda folikül gelişimi süreci birçok faktör tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. *Per1/Per2* işlev kaybı mutasyonlarının foliküler gelişimde rol oynayan gen ifadesini değiştirerek ovaryumda folikül rezervinin tükenmesine ve üreme kapasitesinin azalmasına yol açabileceği gösterilmiştir (149). Tez çalışmamızda ilk olarak sirkadiyen ritim geni olan *PER2* ekspresyonunu değerlendirdik. İmmünofloresan işaretleme yöntemi ile bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney gruplarından aldığımız kesitlerde *PER2* ekspresyonunu değerlendirdik. *PER2* protein ekspresyonunun bir hafta sürekli ışık maruziyeti ile sirkadiyen ritmin bozulduğu grupta kontrole göre anlamlı olarak azaldığını belirledik. Ovaryum dokularını morfolojik olarak analiz ettiğimizde, genel olarak foliküler gelişimin açısından iki grup arasında morfolojik bir fark olmadığı belirlendi. Ancak, bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu ovaryum dokularında kortekste bulunan foliküllerde granüloza hücrelerinin birbirleri ile olan organizasyonunun bozulduğunu ve hücrelerin düzensiz bir şekilde folikül duvarında yer aldıklarını gözlemledik.

Hippo sinyal yolağı bileşenleri, hücre proliferasyonu, hücre göçü, farklılaşması ve hücre kaderinin belirlenmesi mekanizmaları aracılığıyla temel biyolojik süreçleri düzenleyerek folikül büyümesinde ve aktivasyonunda ve ayrıca steroidogeneizde önemli roller oynamaktadır. Bu süreçlerin önemi göz önüne alındığında, Hippo sinyal yolağı bileşenlerinde meydana gelebilecek değişiklikler, foliküler homeostazın kaybına ve polikistik over sendromu (PKOS), prematüre over yetmezliği ve ovaryum kanseri gibi üreme sorunlarına neden olmaktadır (150). Hippo sinyal yolağı, YAP1 aktivitesini düzenleyerek organ boyutunu kontrol eder. Büyüme sinyalleri varlığında Hippo yolağı baskılanır ve YAP1'in sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonu uyarılarak proliferatif genlerin ekspresyonu tetiklenir. Hippo yolağının majör efektörü olan YAP1 farede ovaryumda granüloza hücrelerinde eksprese edilmektedir ve hem ovulasyonda hem de folikül gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Yapılan bir çalışmada, sıgır kümülüs-oosit kompleksinde YAP ve TAZ ekspresyonunun olduğu belirlenmiştir (151). Bir başka çalışmada, Hippo sinyal yolağının ovaryumda foliküllerde aktif olduğu ve LATS1'in germ hücreleri ve primordiyal folikül havuzunun korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir (152). YAP1'in aktif formu olan nükleer YAP1 çoğalmakta olan granüloza hücrelerinde eksprese olurken YAP1'in anaktif formu olan sitoplazmik YAP1 luteal hücrelerde eksprese olmaktadır. YAP1'in dengeli ekspresyonu ve aktivasyonu folikül gelişimi ve üremenin gerçekleşmesi için hayatidir (112). YAP1 aktivitesinin inhibe edilmesi durumunda farede *in vitro* ve *in vivo*'da foliküler gelişimin bozulduğu, bu nedenle YAP1'in ekspresyonu ve aktivasyonu arasındaki dengenin foliküler gelişim ve üreme başarısı için önemli olduğu ileri sürülmüştür (153). Başka bir çalışmada, YAP1 aracılı mekanizmanın ovulasyon sırasında hücre sağkalımını ve granüloza hücrelerinin farklılaşmasını kontrol ettiği belirlenmiştir (154). Ovaryumun parçalanması ile Hippo sinyal yolağı genlerinin ekspresyonunun aktive olarak, oluşturulan mekanik stresin ovaryumda foliküllerin aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle ovaryum kaynaklı infertilitenin tedavisinde Hippo sinyal yolağının hedef olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmüştür (155). Tüm bu literatür bilgileri ışığında tez çalışmamızda, bir hafta sürekli ışık maruziyeti ile sitrkadiyen ritim bozulmasının fare ovaryum dokusunda foliküler gelişim üzerindeki etkisini Hippo sinyal yolağı üzerinden göstermeyi amaçladık. Biz tez çalışmamızda, bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadyen ritmin bozulduğu deney gruplarında ovaryum dokusunda Hippo sinyal yolağı bileşenlerini immünofloresan ve qRT-PZR

yöntemi kullanarak inceledik. Yaptığımız değerlendirilmelerde sirkadiyen ritmin bozulduğu ovaryumda, YAP1 ekspresyonunun deney grubuna kıyasla azaldığını gözlemledik. Bunun yanı sıra TEAD4 ekspresyonu ise anlamlı bir şekilde arttığını belirledik. Elde ettiğimiz veriler, Hippo sinyal yolağı komponentlerinden YAP1 ve TEAD4'ün ovarial sirkadiyen ritim ile ilişkili olabileceğini gösterdi.

Memeli hücreleri ile yapılan çalışmalarda Periyot 1 (PER1), Periyot 2 (PER2), Periyot 3 (PER3), Cryptochrome 1 (CRY1), Cryptochrome 2 (CRY2), Sirkadiyen lokomotor çıktı döngüleri bozuk (CLOCK) ve Beyin ve Kas ARNTbenzeri 1 (BMAL1) genlerinin sirkadiyen ritim düzenleyicileri olarak rol aldığı gösterilmiştir. Sirkadiyen ritmin 1 hafta aydınlık maruziyeti ile bozulduğu farelerin ovaryumları incelendiğinde total folikül sayısında anlamlı derecede azalma ve mTOR protein ekspresyonu seviyesinde de benzer şekilde anlamlı derecede azalma olduğu görülmüştür (156, 157). Sirkadiyen ritimde görev alan tüm bu genler, hücrede bir çok farklı genler ile iletişim kurarak farklı mekanizmalar ile çalışırlar. Yapılan çalışmalarda sirkadiyen ritim ile yaşlanma ile meydana gelen fizyolojik değişiklikler arasında bağlantı kurulmuştur. Sineklerde aydınlık/karanlık döngüsünün bozulması veya sirkadiyen ritim genlerinde rol alan genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucunda yaşam süresinin kısaldığı gösterilmiştir (158). BMAL1, CLOCK ve PER1/2 gen eksikliği olan fareler ile yapılan çalışmalarda erken yaşlanma görülmüştür (159). Fibroblastlar hücreli ile yapılan bir çalışmada, YAP/TAZ'ın hedeflenen mutasyonları ve aşırı ekspresyonu ile sirkadiyen saatin temel bileşenlerinden olan Bmal1 ve Cry1'i etkileyebileceği gösterilmiştir. Memeli sirkadiyen saatinin mekanobiyojik düzenlenmesinde, YAP/TAZ ve transkripsiyonel efektörü TEAD'ın önemli bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Belirlenen bu mekanizma, kanser ve yaşlanmada olduğu gibi YAP/TAZ aktivitesinin regülasyonunun sirkadiyen ritimdeki bozulma ile ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır (160). Tez çalışmamızda qRT-PZR yöntemi ile *YAP1* ve *TEAD4* ekspresyonlarının mRNA seviyelerinin değişmediğini belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlara dayanarak sirkadiyen ritim bozulmasının Hippo sinyal yolağı bileşenleri üzerinde translasyonel düzeyde etkili olabileceğini, transkripsiyonel seviyede bir değişim için bir haftalık sürecin yeterli olmayaabileceğini söyleyebiliriz. Buna ek olarak *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1* ve *PER2* sirkadiyen ritim genlerinin de ekspresyonlarının mRNA seviyelerinin değişmediğini gösterdik. Bir hafta sürekli ışık maruziyetinin *BMAL1*, *CLOCK*, *CRY1* ve *PER2* genlerini transkripsiyonel seviyede etkilemediğini belirledik.

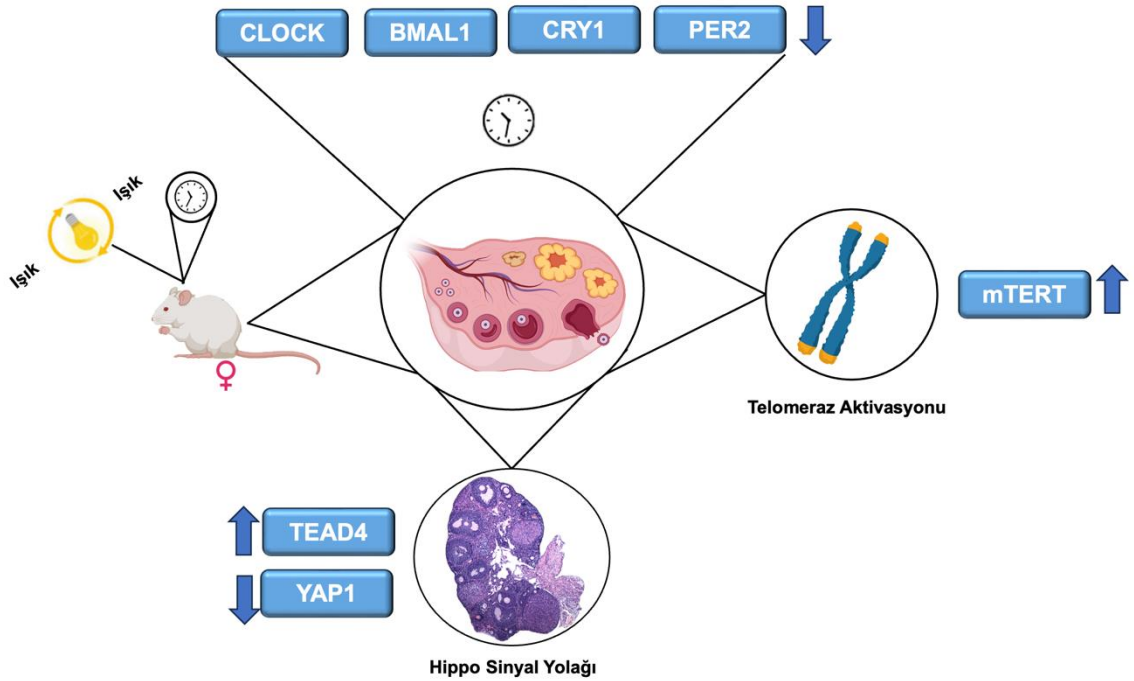
Telomer uzunluğu düzenlemesi ve proliferatif yaşlanma mekanizmaları, memeliler arasında bile evrimsel olarak korunmamıştır. Gomes ve ark., 60'tan fazla memeli türü hücrelerinde telomer uzunluğu ve telomeraz ekspresyonunun karřılařtırılmalđ bir analizinde, atasal memelilerin insan benzeri kısa telomerlere sahip olduğu ve telomeraz ekspresyonunu inhibe ettiği sonucuna varmıştır (122). YAP'ın hiperaktivasyonunun, artan hTERT ekspresyonu ile telomeraz aktivitesini desteklediği ve telomer uzunluğunu uzattığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, insan karaciğer kanseri dokularında hTERT ekspresyonunun YAP aktivasyonu ile pozitif bir ilişkili içerisinde olduğu belirlenmiştir. Tüm bu sonuçlar, YAP'ın tümörün ilerlemesine katkıda bulunabilecek hTERT ekspresyonunu desteklediğini göstermektedir (161). Ayrıca, bir başka çalışmada da Hippo yolağı ile TERT sinyal yolağı arasında önemli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (162).

TERT, stres yanıtı, apoptoz ve mitokondride mitokondriyal uygunluğun sürdürölmesinde rol oynar, bu nedenle mitokondriyal bütönlüğün korunmasında rol oynayabileceği tanımlanmıştır (163). TERT ifadesi, sırasıyla pro-proliferatif ve anti-proliferatif genlerin ifadesini indükleyerek veya inhibe ederek telomer uzamasından bağımsız olarak hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik edebilir (164). Daha önceki bir çalışmamızda farede granuloza hücrelerinde ve ovaryumda foliküler gelişimde mTERT ekspresyonunun önemli bir role sahip olduğunu gösterdik (165). Çalışmamızda bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutulan kontrol grubu ve bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu deney gruplarında mTERT ekspresyonunu inceledik. İmmünofloresan boyama ile elde ettiğimiz veriler, sirkadiyen ritmin bir hafta sürekli ışık maruziyeti ile bozulduğu ovaryumda mTERT ekspresyonunun kontrole kıyasla anlamlı bir şekilde arttığını gösterdi.

Hippo sinyal yolağı, başta birçok kanser türü olmak üzere bileşenini tanımlanarak, sinyal iletiminin mekanik olarak anlaşılmasına ve bu yolağı farklı hücre tipleri, organlar ve türlerdeki sayısız fonksiyonlarının anlaşılmasına yol açmıştır. Birçok kanser türünde Hippo sinyal yolağının merkezi bir rolünün olduğu keşfedilmiştir ve bu nedenle Hippo yolağı son yıllarda terapötik stratejilerin geliştirilmesinde hedef sinyal yolaklarından biri haline gelmiştir.

Evrimsel olarak korunmuş bir sinyal yolağı olan Hippo sinyal yolağı çok sayıda biyolojik sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır Bununla birlikte, Hippo

yolağında meydana gelebilecek düzensizlikler, başta çeşitli kanser türleri olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabilir. Bu nedenle, Hippo bileşenlerini hedef alan terapötik stratejiler, geniş bir hastalık yelpazesinin tedavisi için umut verici yaklaşımlar olabilir. Biz tez çalışmamızda, Hippo sinyal yolağı komponentlerinden YAP1 ve TEAD4'ün mTERT telomeraz katalitik alt ünitesi ile ilişkide olabileceğini, bir hafta sürekli ışıklı maruziyeti ile sirkadiyen ritmin bozulduğu fare ovaryum dokularında foliküler gelişimde ve gelişen foliküllerin yaşlanmasında rol alabileceğini ileri sürmekteyiz. Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin, ovaryumun fizyolojik süreçleri olan ovaryumun gelişimi, foliküler gelişim ve oosit maturasyonunda Hippo sinyal yolağının çok fonksiyonlu görevlerinin açıklanmasına ve Hippo bileşenlerini hedef alan potansiyel tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlamasını hedeflemekteyiz (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Bir hafta boyunca 12:12 saat aydınlık/aydınlık döngüsünde tutulan sirkadiyen ritmin bozulduğu fare ovaryumunda, Hippo sinyal yolağı bileşenleri YAP1 ve TEAD4 ve telomeraz katalitik alt ünitesi mTERT arasındaki ilişkinin gösterilmesi.

6. KAYNAKÇA

1. Gartner L, Hiatt J. Female reproductive system. Color Textbook of Histology 3rd ed Philadelphia, PA: Saunders. 2007:485-8.
2. Richardson GS. Ovarian physiology. New England Journal of Medicine. 1966;274(20):1121-34.
3. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. Alcohol research & health. 2001;25(2):85.
4. Gerhart-Hines Z, Lazar MA. Circadian metabolism in the light of evolution. Endocrine reviews. 2015;36(3):289-304.
5. Mieda M, Okamoto H, Sakurai T. Manipulating the cellular circadian period of arginine vasopressin neurons alters the behavioral circadian period. Current Biology. 2016;26(18):2535-42.
6. Sun W, Li SX, Wang G, Dong S, Jiang Y, Spruyt K, et al. Association of sleep and circadian activity rhythm with emotional face processing among 12-month-old infants. Scientific Reports. 2018;8(1):1-11.
7. Karman BN, Tischkau SA. Circadian clock gene expression in the ovary: effects of luteinizing hormone. Biology of reproduction. 2006;75(4):624-32.
8. Gräs S, Georg B, Jørgensen HL, Fahrenkrug J. Expression of the clock genes *Per1* and *Bmal1* during follicle development in the rat ovary. Effects of gonadotropin stimulation and hypophysectomy. Cell and tissue research. 2012;350(3):539-48.
9. Goldman BD. The circadian timing system and reproduction in mammals. Steroids. 1999;64(9):679-85.
10. Sellix MT, Murphy ZC, Menaker M. Excess androgen during puberty disrupts circadian organization in female rats. Endocrinology. 2013;154(4):1636-47.
11. Meng Z, Moroishi T, Guan K-L. Mechanisms of Hippo pathway regulation. Genes & development. 2016;30(1):1-17.
12. Poon CL, Lin JI, Zhang X, Harvey KF. The sterile 20-like kinase Tao-1 controls tissue growth by regulating the Salvador-Warts-Hippo pathway. Developmental cell. 2011;21(5):896-906.
13. Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. Science. 2009;323(5914):644-8.
14. Cong Y-S, Wright WE, Shay JW. Human telomerase and its regulation. Microbiology and molecular biology reviews. 2002;66(3):407-25.

15. Young AN, Moyle-Heyrman G, Kim JJ, Burdette JE. Microphysiologic systems in female reproductive biology. *Experimental Biology and Medicine*. 2017;242(17):1690-700.
16. Chapin R, Harris M, Davis B, Ward S, Wilson R, Mauney M, et al. The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Toxicological Sciences*. 1997;40(1):138-57.
17. Clement PB. Histology of the ovary. *The American journal of surgical pathology*. 1987;11(4):277-303.
18. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas: New York: McGraw Hill; 2018.
19. Tanriverdi G, Denir S, Ayla S, Bilir A, Oktar H, Cepni I, et al. Notch signaling pathway in cumulus cells can be a novel marker to identify poor and normal responder IVF patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30:1319-26.
20. Spencer TE, editor *Biological roles of uterine glands in pregnancy*. *Seminars in reproductive medicine*; 2014: Thieme Medical Publishers.
21. Vue Z, Mullen RD, Yen ST, Ontiveros AE, Stewart AC, Behringer RR. Fetal and postnatal female tract development. *Encyclopedia of Reproduction*: Elsevier; 2018. p. 261-8.
22. Elvis-Offiah UB, Isuman S, Johnson MO, Ikeh VG, Agbontaen S. Our Clear-Cut Improvement to the Impact of Mouse and Rat Models in the Research Involving Female Reproduction. *Animal Models and Experimental Research in Medicine*: IntechOpen; 2022.
23. Chumduri C, Turco MY. Organoids of the female reproductive tract. *Journal of molecular medicine*. 2021;99(4):531-53.
24. Andolf E, Jörgensen C, Svalenius E, Sundén B, Andolf E. Ultrasound measurement of the ovarian volume. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 1987;66(5):387-9.
25. Ross MH, Pawlina W. *Histology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
26. Snell RS. *Clinical anatomy by systems*: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
27. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The developing human-e-book: clinically oriented embryology*: Elsevier Health Sciences; 2018.
28. Sadler TW. *Langman's medical embryology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2022.

29. Devine P, Payne C, McCuskey M, Hoyer P. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biology of Reproduction*. 2000;63(5):1245-52.
30. Motta PM, Makabe S, Nottola S. The ultrastructure of human reproduction. 1. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human reproduction update*. 1997;3(3):281-97.
31. Krohmer RW. *The reproductive system*: Infobase Publishing; 2009.
32. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PloS one*. 2010;5(1):e8772.
33. Monniaux D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*. 2016;86(1):41-53.
34. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*. 2000;21(2):200-14.
35. Yung Y, Maman E, Konopnicki S, Cohen B, Brengauz M, Lojkin I, et al. ADAMTS-1: a new human ovulatory gene and a cumulus marker for fertilization capacity. *Molecular and cellular endocrinology*. 2010;328(1-2):104-8.
36. Lindeberg M. *Molecular and morphological studies of folliculogenesis, oocyte maturation and embryogenesis in humans*: Karolinska Institutet (Sweden); 2008.
37. EROSCHENKO V. DiFiore" nin Histoloji Atlası. 12. Baskıdan Çeviri Palme Yayıncılık. 2016.
38. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reproduction*. 1968;17(3):555-7.
39. Delilbaşı L. İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. İn: Delilbaşı L(eds) Ankara: Öncü Basımevi. 2008:1-31.
40. Magoffin DA. Ovarian theca cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(7):1344-9.
41. Rimón-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Molecular mechanisms of cell differentiation in gonad development*. 2016:167-90.
42. Tekelioğlu M. Özel histoloji ince yapı ve gelişme. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ANTİP AŞ Yayınları. 2002.
43. Araújo VR, Gastal MO, Figueiredo JR, Gastal EL. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology*. 2014;12(1):1-14.

44. Sukumaran S, Almon RR, DuBois DC, Jusko WJ. Circadian rhythms in gene expression: Relationship to physiology, disease, drug disposition and drug action. *Advanced drug delivery reviews*. 2010;62(9-10):904-17.
45. Roenneberg T, Merrow M. The circadian clock and human health. *Current biology*. 2016;26(10):R432-R43.
46. Tahara Y, Shibata S. Chronobiology and nutrition. *Neuroscience*. 2013;253:78-88.
47. Sollars PJ, Pickard GE. The neurobiology of circadian rhythms. *Psychiatric Clinics*. 2015;38(4):645-65.
48. Buttgerit F, Smolen JS, Coogan AN, Cajochen C. Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nature Reviews Rheumatology*. 2015;11(6):349-56.
49. Cuesta M, Cermakian N, Boivin DB. Glucocorticoids entrain molecular clock components in human peripheral cells. *The FASEB Journal*. 2015;29(4):1360-70.
50. Ferrie JE, Kumari M, Salo P, Singh-Manoux A, Kivimäki M. Sleep epidemiology—a rapidly growing field. Oxford University Press; 2011. p. 1431-7.
51. Kronholm E, Partonen T, Laatikainen T, Peltonen M, Härmä M, Hublin C, et al. Trends in self-reported sleep duration and insomnia-related symptoms in Finland from 1972 to 2005: a comparative review and re-analysis of Finnish population samples. *Journal of sleep research*. 2008;17(1):54-62.
52. Zhu L, Zee PC. Circadian rhythm sleep disorders. *Neurologic clinics*. 2012;30(4):1167-91.
53. Abraham F. An overview on functional causes of infertility in cows. *JFIV Reprod Med Genet*. 2017;5(2):203.
54. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, et al. Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(11):825-8.
55. Cederroth CR, Albrecht U, Bass J, Brown SA, Dyhrfeld-Johnsen J, Gachon F, et al. Medicine in the fourth dimension. *Cell metabolism*. 2019;30(2):238-50.
56. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 2012;74(2):246-60.
57. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
58. Gumz ML. Circadian clocks: role in health and disease: Springer; 2016.
59. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P. Metabolism and the circadian clock converge. *Physiological reviews*. 2013;93(1):107-35.

60. Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annual review of neuroscience*. 2012;35:445-62.
61. Xie Y, Tang Q, Chen G, Xie M, Yu S, Zhao J, et al. New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Frontiers in physiology*. 2019:682.
62. Aoyama S, Shibata S. The role of circadian rhythms in muscular and osseous physiology and their regulation by nutrition and exercise. *Frontiers in neuroscience*. 2017;11:63.
63. Müller MJ, Olschinski C, Kundermann B, Cabanel N. Patterns of self-reported depressive symptoms in relation to morningness-eveningness in inpatients with a depressive disorder. *Psychiatry research*. 2016;239:163-8.
64. King DP, Takahashi JS. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual review of neuroscience*. 2000;23(1):713-42.
65. Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms. *Advances in genetics*. 2011;74:175-230.
66. Kelleher FC, Rao A, Maguire A. Circadian molecular clocks and cancer. *Cancer letters*. 2014;342(1):9-18.
67. Rosenwasser AM, Turek FW. Neurobiology of circadian rhythm regulation. *Sleep medicine clinics*. 2015;10(4):403-12.
68. Kalsbeek A, la Fleur S, Fliers E. Circadian control of glucose metabolism. *Molecular metabolism*. 2014;3(4):372-83.
69. Xie Y, Tang Q, Chen G, Xie M, Yu S, Zhao J, et al. New insights into the circadian rhythm and its related diseases. *Frontiers in physiology*. 2019;10:682.
70. Simonneaux V, Bahougne T. A multi-oscillatory circadian system times female reproduction. *Frontiers in Endocrinology*. 2015;6:157.
71. Miller BH, Takahashi JS. Central circadian control of female reproductive function. *Frontiers in endocrinology*. 2014;4:195.
72. Kennaway DJ. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Human reproduction update*. 2005;11(1):91-101.
73. Hastings M, O'Neill JS, Maywood ES. Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *Journal of Endocrinology*. 2007;195(2):187-98.
74. Mahoney MM. Shift work, jet lag, and female reproduction. *International journal of endocrinology*. 2010;2010.
75. Baker FC, Driver HS. Circadian rhythms, sleep, and the menstrual cycle. *Sleep medicine*. 2007;8(6):613-22.

76. Legan SJ, Karsch FJ. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology*. 1975;96(1):57-62.
77. Everett JW, Sawyer CH. A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*. 1950;47(3):198-218.
78. Moenter SM, DeFazio RA, Pitts GR, Nunemaker CS. Mechanisms underlying episodic gonadotropin-releasing hormone secretion. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2003;24(2):79-93.
79. Kriegsfeld LJ, Silver R. The regulation of neuroendocrine function: timing is everything. *Hormones and behavior*. 2006;49(5):557-74.
80. Chen H, Zhao L, Chu G, Kito G, Yamauchi N, Shigeyoshi Y, et al. FSH induces the development of circadian clockwork in rat granulosa cells via a gap junction protein Cx43-dependent pathway. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;304(6):E566-E75.
81. Amano T, Tokunaga K, Kakegawa R, Yanagisawa A, Takemoto A, Tatemizo A, et al. Expression analysis of circadian genes in oocytes and preimplantation embryos of cattle and rabbits. *Animal reproduction science*. 2010;121(3-4):225-35.
82. Li R, Cheng S, Wang Z. Circadian clock gene plays a key role on ovarian cycle and spontaneous abortion. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;37(3):911-20.
83. Fahrenkrug J, Georg B, Hannibal J, Hindersson P, Gräs S. Diurnal rhythmicity of the clock genes *Per1* and *Per2* in the rat ovary. *Endocrinology*. 2006;147(8):3769-76.
84. Sellix MT. Circadian clock function in the mammalian ovary. *Journal of biological rhythms*. 2015;30(1):7-19.
85. Sellix MT, Menaker M. Circadian clocks in the ovary. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2010;21(10):628-36.
86. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development*. 2014;141(8):1614-26.
87. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports*. 2014;15(6):642-56.
88. Boggiano JC, Vanderzalm PJ, Fehon RG. Tao-1 phosphorylates Hippo/MST kinases to regulate the Hippo-Salvador-Warts tumor suppressor pathway. *Developmental cell*. 2011;21(5):888-95.
89. Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J. Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *Biochemical Journal*. 2004;381(2):453-62.

90. Glantschnig H, Rodan GA, Reszka AA. Mapping of MST1 kinase sites of phosphorylation: activation and autophosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(45):42987-96.
91. Callus BA, Verhagen AM, Vaux DL. Association of mammalian sterile twenty kinases, Mst1 and Mst2, with hSalvador via C-terminal coiled-coil domains, leads to its stabilization and phosphorylation. *The FEBS journal*. 2006;273(18):4264-76.
92. Messina B, Lo Sardo F, Scalera S, Memeo L, Colarossi C, Mare M, et al. Hippo pathway dysregulation in gastric cancer: from *Helicobacter pylori* infection to tumor promotion and progression. *Cell Death & Disease*. 2023;14(1):21.
93. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell*. 2013;154(6):1342-55.
94. Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schäfer A, Nigg EA, Sillje HH. The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene*. 2005;24(12):2076-86.
95. Zheng Y, Wang W, Liu B, Deng H, Uster E, Pan D. Identification of Happyhour/MAP4K as alternative Hpo/Mst-like kinases in the Hippo kinase cascade. *Developmental cell*. 2015;34(6):642-55.
96. Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & development*. 2007;21(21):2747-61.
97. Liang N, Zhang C, Dill P, Panasyuk G, Pion D, Koka V, et al. Regulation of YAP by mTOR and autophagy reveals a therapeutic target of tuberous sclerosis complex. *Journal of Experimental Medicine*. 2014;211(11):2249-63.
98. Koontz LM, Liu-Chittenden Y, Yin F, Zheng Y, Yu J, Huang B, et al. The Hippo effector Yorkie controls normal tissue growth by antagonizing scalloped-mediated default repression. *Developmental cell*. 2013;25(4):388-401.
99. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Current biology*. 2007;17(23):2054-60.
100. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2013;13(4):246-57.

101. Liu AM, Wong K-F, Jiang X, Qiao Y, Luk JM. Regulators of mammalian Hippo pathway in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2012;1826(2):357-64.
102. Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiological reviews*. 2014.
103. Vo KCT, Kawamura K. In vitro activation early follicles: from the basic science to the clinical perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(7):3785.
104. Hsueh AJ, Kawamura K. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. *Fertility and sterility*. 2020;114(3):458-64.
105. Abbassi L, Malki S, Cockburn K, Macaulay A, Robert C, Rossant J, et al. Multiple mechanisms cooperate to constitutively exclude the transcriptional co-activator YAP from the nucleus during murine oogenesis. *Biology of reproduction*. 2016;94(5):102, 1-12.
106. Xiang C, Li J, Hu L, Huang J, Luo T, Zhong Z, et al. Hippo signaling pathway reveals a spatio-temporal correlation with the size of primordial follicle pool in mice. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2015;35(3):957-68.
107. Hu LL, Su T, Luo RC, Zheng YH, Huang J, Zhong ZS, et al. Hippo pathway functions as a downstream effector of AKT signaling to regulate the activation of primordial follicles in mice. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(2):1578-87.
108. Pisarska MD, Kuo F-T, Bentsi-Barnes IK, Khan S, Barlow GM. LATS1 phosphorylates forkhead L2 and regulates its transcriptional activity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010;299(1):E101-E9.
109. Sun T, Pepling ME, Diaz FJ. Lats1 deletion causes increased germ cell apoptosis and follicular cysts in mouse ovaries. *Biology of reproduction*. 2015;93(1):22, 1-11.
110. Bernabé BP, Woodruff T, Broadbelt LJ, Shea LD. Ligands, receptors, and transcription factors that mediate inter-cellular and intra-cellular communication during ovarian follicle development. *Reproductive Sciences*. 2020;27:690-703.
111. Clark KL, George JW, Przygodzka E, Plewes MR, Hua G, Wang C, et al. Hippo Signaling in the Ovary: Emerging roles in development, fertility, and disease. *Endocrine Reviews*. 2022;43(6):1074-96.
112. Lv X, He C, Huang C, Wang H, Hua G, Wang Z, et al. Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. *The FASEB Journal*. 2019;33(9):10049.

113. Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nature genetics*. 2012;44(9):1020-5.
114. Jiang L-L, Xie J-K, Cui J-Q, Wei D, Yin B-L, Zhang Y-N, et al. Promoter methylation of yes-associated protein (YAP1) gene in polycystic ovary syndrome. *Medicine*. 2017;96(2).
115. Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(9):1131-9.
116. Sun T, Diaz FJ. Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2019;17:1-14.
117. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):17474-9.
118. Fu D, Lv X, Hua G, He C, Dong J, Lele SM, et al. YAP regulates cell proliferation, migration, and steroidogenesis in adult granulosa cell tumors. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(2):297.
119. Plewes MR, Hou X, Zhang P, Liang A, Hua G, Wood JR, et al. Yes-associated protein 1 is required for proliferation and function of bovine granulosa cells in vitro. *Biology of reproduction*. 2019;101(5):1001-17.
120. Ji S-Y, Liu X-M, Li B-T, Zhang Y-L, Liu H-B, Zhang Y-C, et al. The polycystic ovary syndrome-associated gene *Yap1* is regulated by gonadotropins and sex steroid hormones in hyperandrogenism-induced oligo-ovulation in mouse. *MHR: Basic science of reproductive medicine*. 2017;23(10):698-707.
121. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73:1659-70.
122. Gomes NM, Ryder OA, Houck ML, Charter SJ, Walker W, Forsyth NR, et al. Comparative biology of mammalian telomeres: hypotheses on ancestral states and the roles of telomeres in longevity determination. *Aging cell*. 2011;10(5):761-8.
123. Horikawa I, Chiang YJ, Patterson T, Feigenbaum L, Leem S-H, Michishita E, et al. Differential cis-regulation of human versus mouse TERT gene expression in vivo: identification of a human-specific repressive element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005;102(51):18437-42.

124. Jia W, Wang S, Horner JW, Wang N, Wang H, Gunther EJ, et al. A BAC transgenic reporter recapitulates in vivo regulation of human telomerase reverse transcriptase in development and tumorigenesis. *The FASEB Journal*. 2011;25(3):979.
125. Martín-Rivera L, Herrera E, Albar JP, Blasco MA. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(18):10471-6.
126. Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(11):4818-22.
127. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. 1998;16(13):1723-30.
128. Kipling D, Cooke HJ. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*. 1990;347(6291):400-2.
129. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;266(5193):2011-5.
130. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996;18(2):173-9.
131. Smith S, Giriat I, Schmitt A, De Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science*. 1998;282(5393):1484-7.
132. Mantell L, Greider C. Telomerase activity in germline and embryonic cells of *Xenopus*. *The EMBO journal*. 1994;13(13):3211-7.
133. Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu C-P, Conti M, Hsueh AJ. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biology of reproduction*. 1997;56(5):1120-5.
134. Hüttemann M, Lee I, Pecinova A, Pecina P, Przyklenk K, Doan JW. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2008;40:445-56.
135. Bellet MM, Sassone-Corsi P. Mammalian circadian clock and metabolism—the epigenetic link. *Journal of cell science*. 2010;123(22):3837-48.

136. Palacios JA, Herranz D, De Bonis ML, Velasco S, Serrano M, Blasco MA. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *Journal of Cell Biology*. 2010;191(7):1299-313.
137. Froy O, Miskin R. Effect of feeding regimens on circadian rhythms: implications for aging and longevity. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(1):7.
138. Oeseburg H, de Boer RA, Van Gilst WH, van der Harst P. Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2010;459:259-68.
139. Barceló A, Piérola J, López-Escribano H, de la Peña M, Soriano JB, Alonso-Fernández A, et al. Telomere shortening in sleep apnea syndrome. *Respiratory Medicine*. 2010;104(8):1225-9.
140. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & development*. 2006;20(14):1868-73.
141. Zhang Q, Liu N, Bai J, Zhou Q, Mao J, Xu L, et al. Human telomerase reverse transcriptase is a novel target of Hippo-YAP pathway. *The FASEB Journal*. 2020;34(3):4178-88.
142. Wu R, Dang F, Li P, Wang P, Xu Q, Liu Z, et al. The circadian protein Period2 suppresses mTORC1 activity via recruiting Tsc1 to mTORC1 complex. *Cell metabolism*. 2019;29(3):653-67. e6.
143. Richards J, Gumz ML. Mechanism of the circadian clock in physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2013;304(12):R1053-R64.
144. Hsu CN, Tain YL. Light and Circadian Signaling Pathway in Pregnancy: Programming of Adult Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6).
145. Dolatshad H, Campbell EA, O'Hara L, Maywood ES, Hastings MH, Johnson MH. Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod*. 2006;21(1):68-79.
146. Miller BH, Olson SL, Turek FW, Levine JE, Horton TH, Takahashi JS. Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol*. 2004;14(15):1367-73.
147. Zhu JL, Hjollund NH, Andersen AM, Olsen J. Shift work, job stress, and late fetal loss: The National Birth Cohort in Denmark. *J Occup Environ Med*. 2004;46(11):1144-9.

148. Kaneshi Y, Ohta H, Morioka K, Hayasaka I, Uzuki Y, Akimoto T, et al. Influence of light exposure at nighttime on sleep development and body growth of preterm infants. *Sci Rep.* 2016;6:21680.
149. Zheng Y, Liu C, Li Y, Jiang H, Yang P, Tang J, et al. Loss-of-function mutations with circadian rhythm regulator *Per1/Per2* lead to premature ovarian insufficiency. *Biology of reproduction.* 2019;100(4):1066-72.
150. Zhu M, Xu M, Zhang J, Zheng C. The role of Hippo pathway in ovarian development. *Front Physiol.* 2023;14:1198873.
151. Koch J, Portela VM, Dos Santos EC, Missio D, de Andrade LG, da Silva Z, et al. The Hippo pathway effectors YAP and TAZ interact with EGF-like signaling to regulate expansion-related events in bovine cumulus cells in vitro. *Journal of assisted reproduction and genetics.* 2022;39(2):481-92.
152. Sun T, Pepling ME, Diaz FJ. *Lats1* Deletion Causes Increased Germ Cell Apoptosis and Follicular Cysts in Mouse Ovaries. *Biology of reproduction.* 2015;93(1):22.
153. Lv X, He C, Huang C, Wang H, Hua G, Wang Z, et al. Timely expression and activation of YAP1 in granulosa cells is essential for ovarian follicle development. *Faseb j.* 2019;33(9):10049-64.
154. Sun T, Diaz FJ. Ovulatory signals alter granulosa cell behavior through YAP1 signaling. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):113.
155. Hsueh AJW, Kawamura K. Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. *Fertility and sterility.* 2020;114(3):458-64.
156. Brainard J, Gobel M, Scott B, Koeppen M, Eckle T. Health implications of disrupted circadian rhythms and the potential for daylight as therapy. *Anesthesiology.* 2015;122(5):1170-5.
157. Bora G, Önel T, Yıldırım E, Yaba A. Circadian regulation of mTORC1 signaling via *Per2* dependent mechanism disrupts folliculogenesis and oocyte maturation in female mice. *J Mol Histol.* 2023;54(3):217-29.
158. Kumar S, Mohan A, Sharma VK. Circadian dysfunction reduces lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Chronobiol Int.* 2005;22(4):641-53.
159. Kondratov RV. A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev.* 2007;6(1):12-27.

160. Abenza JF, Rossetti L, Mouelhi M, Burgués J, Andreu I, Kennedy K, et al. Mechanical control of the mammalian circadian clock via YAP/TAZ and TEAD. *J Cell Biol.* 2023;222(9).
161. Zhang Q, Liu N, Bai J, Zhou Q, Mao J, Xu L, et al. Human telomerase reverse transcriptase is a novel target of Hippo-YAP pathway. *Faseb j.* 2020;34(3):4178-88.
162. Suzuki K, Tange M, Yamagishi R, Hanada H, Mukai S, Sato T, et al. SMG6 regulates DNA damage and cell survival in Hippo pathway kinase LATS2-inactivated malignant mesothelioma. *Cell Death Discov.* 2022;8(1):446.
163. Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Frontiers in oncology.* 2012;2:133.
164. Stampfer MR, Garbe J, Levine G, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Yaswen P. Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor β growth inhibition in p16INK4A (-) human mammary epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(8):4498-503.
165. Yaba A, Agus S, Yildirim E, Erdogan CS, Yilmaz B. Interaction of the mTERT telomerase catalytic subunit with the c-Abl tyrosine kinase in mouse granulosa cells. *Journal of Receptors and Signal Transduction.* 2020;40(4):365-73.

7. EKLER

7.1. ETİK KURUL KARARI

 YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU	Doküman No : FR83
		Yayın Tarihi : 06.12.2022
		Revizyon No : 00
		Revizyon Tarihi : 00.00.0000
		Sayfa : 1 / 1

ETİK KURUL KARARI				
Protokol No	Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No	Proje Yürütücüsü
2023-27	18.05.2023	2023/05	2023/05-06	Prof.Dr.Aylin Yaba Uçar
Farede Sirkadyen Ritim Bozulmasının Ovaryumda Foliküler Gelişim Üzerindeki Etkisinin Hippo Sinyal Yolağı Üzerinden Belirlenmesi isimli proje oy birliğiyle etik açıdan uygun görülmüştür.				
Hayvan Türü / Irkı		Toplam Hayvan Sayısı		Hayvan Cinsiyeti

Görevi	Adı Soyadı	Onay/Ret Durumu	Katılım Durumu
Başkan	Prof. Dr. Bayram YILMAZ	☐ Onay ☐ Ret	
Başkan Vekili	Prof. Dr. Erdem YEŞİLADA	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Dr. Engin SÜMER	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. M. Ece GENÇ	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Rukset ATTAR	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Gamze TORUN KÖSE	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Özlem MALKONDU	☒ Onay ☐ Ret	
Üye	Prof. Dr. Aylin YABA UÇAR	☐ Onay ☐ Ret	KATILMADI
Üye	Prof. Dr. Burcu GEMİCİ BAŞOL	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Atakan Mücahit YAVUZ	☐ Onay ☐ Ret	
Üye	Ahmet ŞENKARDEŞLER	☐ Onay ☐ Ret	

Hazırlayan YÜDETAM SORUMLU YÖNETİCİ	Sistem Onayı YÜDETAM MÜDÜRÜ	Yürürlük Onayı YÜDETAM MÜDÜRÜ
--	--------------------------------	----------------------------------

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Narmin	Soyadı	Asadova
-----	--------	--------	---------

Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Biyoloji	Bakü Devlet Üniversitesi	2021

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
GraphPad Prism	Çok iyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Bilimsel Çalışmaları

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer (Görev Aldığı Projeler/Sertifika/Ödülleri)

--