

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

FSH'NİN FARE GRANÜLOZA HÜCRELERİNE ETKİSİNİN
HİPPO SİNYAL YOLAĞI PROTEİNLERİ (YAP, TEAD VE P73) VE
MİKRORNA'LARI (MİR129-5P VE MİR145-5P) İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
GÜLSEN ZÜBEYDE KARAMAN

PROF. DR. MAHMUT KEMAL ÖZBİLGİN

MANİSA, 2021

ÖNSÖZ

Tezimde ihtiyaç duyduğum her zaman akademik desteğini hissettiğim, yoluma ışık tutan danışman hocam Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'e,

Başta ana bilim dalı başkanımız Prof. Dr. Seda VATANSEVER olmak üzere asistanlık sürecimde bilgileri ve deneyimleri ile eğitimimde katkıları büyük olan ve her konuda yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya, Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e ve Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a;

Laboratuvar deneylerimde ve çalışmalarımnda katkılarını esirgemeyen başta Hilal KABADAYI, Mustafa ÖZTATLICI, Fatih ÇÖLLÜ, Tuna ÖNAL, Muhammed Yusuf PEKMEZCİ, Meltem ÜÇÖZ, Sema GENCÜR, Pınar KILIÇASLAN ve Damla AKOĞULLARI olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma,

Varlıklarını her zaman hissettiğim, ömür boyu en büyük destekçim olan aileme, sevgi ve saygısıyla her koşulda yanımda olan yol arkadaşım eşime ve tezimin her aşamasında her an benimle olan, hayatımın anlamını katlayan en değerli varlığım oğluma,

En içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2019-028 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Gülsen Zübeyde KARAMAN

Manisa, 2021

KISALTMALAR	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
RESİMLER DİZİNİ	VIII
TABLO DİZİNİ	IX
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dişi Genital Sistemine Giriş	4
2.1.1. Ovaryum Anatomisi	4
2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi	5
2.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar	6
2.1.2.2. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü	6
2.1.2.3. Ovaryumların Farklılaşması	7
2.1.3. Ovaryum Histolojisi	8
2.1.3.1. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (Folikülogenez)	9
2.1.3.1.1. Primordiyal Follikül	9
2.1.3.1.2. Primer (Preantral) Follikül	11
2.1.3.1.2.1. Granüloza Hücreleri	12
2.1.3.1.3. Sekonder (Antral) Follikül	15
2.1.3.1.4. Preovulatuvar (Graafian) Follikül	17
2.1.3.2. Ovulasyon	18
2.1.3.2.1. Korpus Luteum	19
2.1.3.2.2. Foliküler Atrezi	22
2.1.4. Ovaryum Fizyolojisi	23
2.1.4.1. Ovaryan Siklusun Hormonal Düzenlenmesi (FSH'nın Etkisi)	23
2.1.4.2. Östrus Siklusu	26
2.1.4.2.1. Proöstrus	26
2.1.4.2.2. Östrus	26
2.1.4.2.3. Metöstrus	26
2.1.4.2.4. Diöstrus	27
2.2. Yardımlı Üreme Tekniklerinde FSH'nın Kullanımı	28
2.3. Hippo Sinyal Yolağı	29
2.3.1. YAP1	31
2.3.2. TEAD3	33
2.3.3. TP73	35
2.4. MikroRNA'lar	36
2.4.1. MikroRNA'ların Keşfi	36
2.4.2. MikroRNA Biyogenezi	37
2.4.3. MikroRNA'ların Etki Mekanizması	38
2.4.4. MikroRNA'ların Fonksiyonu	39
2.4.4.1. MikroRNA'ların Ovulasyondaki Rollerini	39
2.4.5. Mir-129-5P	40
2.4.6. MiR-145-5P	44

III. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Farelerde Östrusun Belirlenmesi	47
3.2. Kan ve Dokuların Eldesi	48
3.3. Histolojik Analiz	48
3.3.1. Doku Takibi	48
3.3.2. Hematoksilen & Eozin Boyaması	50
3.3.3. İmmunohistokimya	52
3.4. RNA İzolasyonu	55
3.4.1. Kandan miRNA İzolasyonu	55
3.4.2. Ovaryum Dokusundan miRNA İzolasyonu	55
3.4.3. cDNA Sentezi	57
3.4.4. Kandan ve Ovaryum Dokusundan Elde Edilen miRNA ifadelerinin tespiti	59
3.5. İstatistiksel Analiz	60
IV. BULGULAR	61
4.1. Histolojik Bulgular	61
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	63
4.2.1. YAP1	63
4.2.2. P73	63
4.2.3. TEAD3	63
4.2.4. Kaspaz-3	64
4.2.5. Bax	64
4.2.6. İmmunohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması	70
4.3. PCR Bulguları	74
4.3.1. Ovaryum Dokularının qRT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	74
4.3.1.1. miRNA 129-5p	75
4.3.1.2. miRNA 145-5p	75
4.3.2. Serum qRT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
4.3.2.1. miRNA 145-5p	76
V. TARTIŞMA	78
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	85
VII. ÖZET	87
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	88
IX. KAYNAKLAR	88

KISALTMALAR

AGO	Argonat
AMOT	Angiomotin
BAX	Bcl-2 ilişkili protein X
BCL2	B hücre / lenfoma ailesi 2
BMP	Kemik morfogenetik protein
BIRC	Bakuloviral IAP tekrar içeren protein3
CASP3	Kaspaz 3
CCN	Hücresel iletişim ağı faktörü
CYBR1	Sitokrom B redüktaz 1
CTGF	Bağ dokusu büyüme faktörü
Dax-1	X kromozomunda konjenital adrenal hipoplazi kritik bölge,gen 1
DGCR8	Di George Sendromu kritik bölge 8
E₂	Östradiol
ERBB4	Reseptör tirozin kinaz 4
ERK1/2	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FSH	Folikül Stimulan Hormon
GDF	Büyüme / farklılaşma faktörü
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GPCR	G Protein Kenetli Reseptörler
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
HIF-1α	Hipoksi ile indüklenen faktör alfa
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
KOS	Kontrollü Over Stimülasyonu
KLF4	Kruppel benzeri faktör 4
LATS1/2	Büyük tümör baskılayıcı kinaz 1/2
LH	Luteinizan Hormon

MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MIF	Maturasyon İnhibe Edici Faktör
MIF/AMH	Mülleriye İnhibe Edici Faktör/Anti-Mülleriye Hormon
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
MPF	Maturasyon İlerletici Faktör
MST1/2	Makrofaj uyarıcı protein 1/2
NAIP	Nötral apoptoz inhibitör proteini
NOV	Aşırı eksprese olan Nefroblastoma
OCT4	Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4
OMI	Oosit Maturasyon İnhibitörü
PKA	Protein Kinaz A
PKB	Protein Kinaz B
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PCOS	Polikistik Over Sendromu
Pre-MiRNA	Prekürsör MiRNA
Pri-MiRNA	Primer MiRNA
P38-MAPK	p38 mitojenle aktive olan protein kinazlar
P53 (TP53)	Tümör protein 53
P73 (TP73)	Tümör protein P73
RNA	Ribonükleik asit
RAN-GTP	GTP'ye bağlanan nükleer protein
RISC	RNA kaynaklı susturma kompleksi
RUNX2	Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2
SAV1	Salvador 1
SCF	Kök hücre faktörü
SF1	Steroidogenaz Faktör 1
SOX	Cinsiyet belirleyici Y bölgesi transkripsiyon faktörü-2
YAP	Yes ilişkili protein
TAZ (WWTR1)	WW alanı içeren transkripsiyon regülatörü proteini 1
TDF	Testis Belirleyici Faktör

TEAD (TEF)	Transkripsiyonu arttırıcı faktör
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü- β
TRAIL	Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand
TRBP	Transaktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein
WNT-4	Kanat oluşumuyla bağlantılı MMTV entegrasyon bölgesi 4
XIAP	X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü
ZO	Sıkı Bağlantı (Zonula Okludens)
ZP	Zona Pellusida



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Ovaryumun anatomik lokalizasyonu.....	5
Şekil 2. Ovaryum Histolojisi	8
Şekil 3. Primordial Folikül	10
Şekil 4. Primer folikül.....	12
Şekil 5. Geç primer folikül.....	13
Şekil 6. Sekonder folikül	16
Şekil 7. Tersiyer folikül	17
Şekil 8. Korpus Luteum.....	20
Şekil 9. Korpus Albicans.....	21
Şekil 10. Atrezik Folikül.....	23
Şekil 12. Folikülogenez.....	25
Şekil 13. Östrus döngüsünde yer alan hücre tipleri	27
Şekil 14. Hippo sinyal yolağı ve bağlantılı olduğu yollar	30
Şekil 15. YAP'ın apoptoz ve proliferasyonda anahtar rolü.....	31
Şekil 16. miRNA biyogenez.....	38
Şekil 18. miR129-5p sekansı	40
Şekil 17. Matür mir-129'un sekansları	41
Şekil 19. miR129-5p sekansının halkasal yapısı-1	41
Şekil 20. miR129-5p sekansının halkasal yapısı-2	42
Şekil 21. miR-129'un moleküler etkileşimleri.....	43
Şekil 22. miR-145-5p sekansı.....	44
Şekil 23. miR-145-5p sekansının halkasal yapısı.....	44
Şekil 24. Granüloza hücrelerindeki immunreaktivitelerin karşılaştırması	70
Şekil 25. Stromal alandaki hücrelerin immunreaktivitelerinin karşılaştırması.....	72
Şekil 26. Ovaryum dokusunda mir-129-5p ifadesi	74
Şekil 27. Ovaryum dokusunda mir-145-5p ifadesi	75
Şekil 28. Serumda mir-145-5p ifadesi	77

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Ovaryum H&E boyaması.....	62
Resim 2. Ovaryum YAP1 immunreaktivitesi.....	65
Resim 3. Ovaryum P73 immunreaktivitesi.....	66
Resim 4. Ovaryum TEAD3 immunreaktivitesi.....	67
Resim 5. Ovaryum kaspaz-3 immunreaktivitesi.....	68
Resim 6. Ovaryum Bax immunreaktivitesi.....	69



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Doku takibi protokolü	49
Tablo 2. Hematoksilen & Eozin Boyaması Protokolü	51
Tablo 3. İmmunohistokimya protokolü.....	53
Tablo 4. cDNA sentezi.....	57
Tablo 5. miRNA lokasyonları	58
Tablo 6. qRT-PCR.....	59
Tablo 7. Granüloza hücrelerindeki immunreaktivitelerin istatistiksel olarak karşılaştırılması	71
Tablo 8. Stromal alandaki hücrelerin immunreaktivitelerin istatistiksel olarak karşılaştırılması	73
Tablo 9. Gruplara ait relatif mir-129-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	75
Tablo 10. Gruplara ait relatif mir-145-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	76
Tablo 11. Gruplara ait serum relatif mir-145-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	77

I. GİRİŞ

Folikül stimulan hormon (FSH), hipotalamustan pulsatil salınan gonadotropin salgılatıcı hormona (GnRH) cevap olarak, ön hipofizde gonadotrop hücreler tarafından sentezlenip salınan ve foliküler gelişimde, granüloza hücrelerinin proliferasyonunda ve reproduktif süreçlerde majör rol oynayan bir hormondur. Gelişmekte olan foliküllerin hayatta kalmasında ve seçilmesinde önemlidir. FSH'nın granüloza hücreleri üzerindeki fizyolojik fonksiyonları protein kinaz A (PKA), protein Kinaz B (PKB), p38 mitojenle aktive olan protein kinazlar (p38-MAPK) ve Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2 (ERK1/2) gibi çeşitli sinyal molekülleri tarafından gerçekleşir (1).

Granüloza hücreleri büyümekte olan foliküllerdeki somatik hücrelerdir. Over folikül atrezisi, ovaryan siklüsün foliküler fazı sırasında periyodik olarak immatür foliküllerin, dejenerasyona uğrayıp absorbe olması ile gerçekleşir. Bu karmaşık süreç granüloza hücrelerinin apoptozu ile tetiklenir (2,3). Dişi fertilité potansiyeli ovaryan foliküllerin gelişim ve büyümesine dayanmaktadır. Granüloza hücre apoptozunu ve folikül atrezisini önlemesi nedeniyle, matür foliküllerin gelişimini uyarmak için, yardımcı üreme protokollerinde, FSH sıklıkla yer almaktadır. FSH, granüloza hücrelerindeki reseptörüne (FSHR) bağlanarak onu aktive eder ve bu hücrelerde steroidogenezi kontrol eder. Bu nedenle folikülün gelişimi, büyümesi ve matürasyonunda hayati öneme sahiptir (4,5). Yine de yüksek doz FSH ile HIF-1 α üzerinden granüloza hücrelerinde otofajinin tetiklendiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (6,7). Bu sebeple FSH ile aralarındaki ilişki tartışmalıdır.

Hippo sinyal yolağı farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu ve differansiasyonunu düzenlemede önemli rolü olan, büyümeyi kontrol eden bir yolaktır (8,9). Yolağın komponentleri ilk olarak meyve sineği olarak bilinen *Drosophila melanogaster* türünde tanımlanmıştır. Sinyal yolağı, bir transkripsiyonel koaktivatör olan Yes ilişkili protein (YAP) ve onunla oldukça benzer paraloğı olan WW alanı içeren transkripsiyon regülatörü proteini 1 (TAZ)'in aktivitesini düzenleyen bir grup Serin / Threonin kinazı içerir (9–11).

Hippo yolağı aktif olduğıunda YAP/TAZ aktivitesi fosforile olarak inaktif hale gelir ve sitoplazmada degrade olur(11). Aksine, yolak inaktif olduğıunda YAP/TAZ, transkripsiyonel olarak aktif hale gelir ve gen ekspresyonunu düzenlemek üzere çekirdeğıe transloke olur (11). Çekirdekte YAP, apoptozu inhibe ederek proliferasyonu uyarmak için gerekli genlerin ekspresyonunu Transkripsiyonu arttırıcı faktör (TEAD) yoluyla sağlarken, apoptotik sürecin başlaması için ilgili genlerin ekspresyonunu tümör protein P73 (P73) üzerinden gerçekleştirir. Bu nedenle hücrelerin gelişim ve büyüme aşamalarında apoptotik ve survival mekanizmalar arasında anahtar rol oynayan bir koaktivatördür (10,12).

Yolağın düzenleyicilerinden büyük tümör baskılayıcı kinaz (Lats kinaz) aktive olduğıunda fosforile olarak YAP'ı inaktive eder. Fosforile olan YAP ya 14-3-3 proteinine bağlanarak sitoplazmada sekestre olur ya da ubiquitin aracılı proteozomal degradasyon aracılığıyla parçalanır (11). Hippo sinyal yolağının birçok organ ve hücre tipinin gelişiminde önemli role sahip olduğı gösterilmiştir (10). Yinede, bu yolağın, memeli ovaryumlarındaki düzenleyici rolü, hücre bölünmesinin ve germ hücre farklılaşmasının aktif olarak görüldüğü bir organ olmasına rağmen tam bilinmemektedir.

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenleyen, 18-24 baz uzunluğunda kısa kodlanmayan tek zincirli Ribonükleik asit (RNA) molekülleridir. mesajcı RNA'lar (mRNA) gibi miRNA'lar da yüzlerce kilobaz uzunluğundaki kodlayıcı genlerden transkribe olurlar ve genomun %1-3'lük kısmını temsil ederler (13). miRNA kodlayıcı genler kromozomun aynı segmenti üzerinde kısa bir mesafede tek tek ya da kümeler halinde dağılırlar. Bu nedenle aynı segment üzerinde yerleşen miRNA kümeleri genellikle benzer transkripsiyon paterni ve fonksiyonları gösterirler(14).

Yakın geçmişte overlerde miRNA'lar üzerine yapılan çalışmalar ovaryan gelişimde ve fonksiyonlarda anahtar rollerinin olduğunu göstermiştir. Memeli overlerinde folikülogenez ve atrezi süreçleri genler arası karmaşık etkileşim tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu nedenle hem hücreSEL hem de hücre dışı miRNA'lar, mRNA düzenlenmesine post-transkripsiyonel

katılımları ile aracılık ederler. Böylelikle, hormonları, büyüme faktörlerini ve diğer kodlanmayan RNA'ları içeren bu düzenleyici ağın bir parçası olarak hizmet ederler. Daha önceki çalışmalarda overin normal fonksiyonlarında (15,16), foliküler ve luteal gelişimde (17), foliküler atrezide ve granüloza hücre apoptozunda (18), ovaryan hastalıklarda(19,20) rol oynadığı düşünülen bir takım miRNA'lar incelenmiştir. Ancak daha pek çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Bu çalışmada yüksek doz FSH uygulaması sonrası fare overinde, hippo sinyal yolağı elemanlarından YAP1, TEAD3 ve P73'ün immunreaktiviteleri ile over ve plazmadaki miR-129-5p ve miR-145-5p düzeylerinin değerlendirilmesi ve bu süreçteki rollerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. Dış Genital Sistemine Giriş

Kadın genital organları iç ve dış genital organlar olarak ikiye ayrılır. İç genital organları ovaryum, tuba uterina, uterus ve vagina oluştururken, dış genital organlar mons pubis, labium majus, labium minus, clitoris, vestibulum vagina, bulbus vestibuli, glandula vestibularis majör ve glandula vestibulares minoristir.

2.1.1. Ovaryum Anatomisi

Grimsi pembe renkte, uzunluğu yaklaşık 3 cm, genişliği 1,5 cm, ovoid şekilli ve yaklaşık ağırlığı 4-6 gr olan, sağ ve sol fossa ovarii'de birer tane yer almakta olan bir çift organdır. Bulunduğu bu çukurun sınırlarını ön tarafta arteria (a.) umbilicalis, arkada üreter ve arteria iliaca interna oluşturur (21).

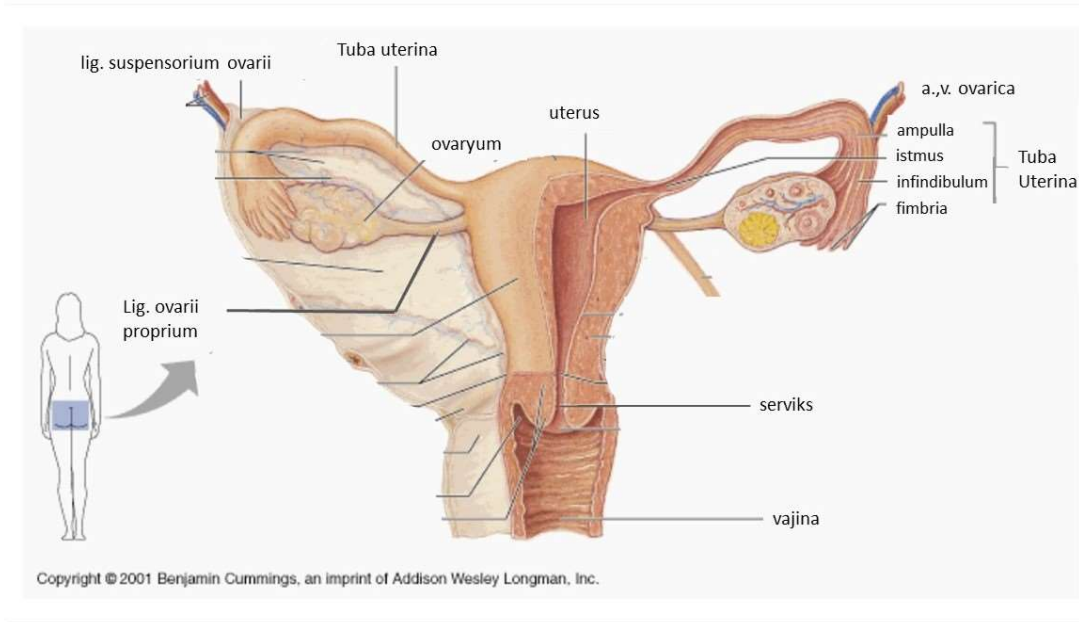
Ovaryumların medial yüzleri pelvis boşluğuna bakar, ince barsak kıvrımları ve sigmoid kolon ile komşudur. Dış yüzü fossa ovarii'yi örten pariyetal periton ile komşuluk yapar. Ovaryumlar intraperitoneal organlar olup yüzeyi periton ile örtülü değildir. Üst ucuna fimbria ovarica ve ligamentum (lig.) suspensorium ovarii tutunur. Bu ligamentin içinde a., vena (v.) ovarica ve plexus ovaricus'tan ayrılan dallar bulunur. Ovaryumun alt ucundan başlayan lig. ovarii proprium uterus'un dış köşesine tutunur. Ön kenarı ise lig. mesovarium ile lig. latum uteri'nin arka-üst yüzüne bağlanır. Bu kenarda yer alan damar ve sinirlerin girip çıktıkları yere hilum ovarii denir (21).

Ovaryum, aorta abdominalisten ikinci lumbal vertebra seviyesinde ayrılan a. ovarica'lar ile beslenir. İntrauterin yaşamda ovaryumlar karın boşluğu içinden pelvise inerler. Bu nedenle a. ovarica'lar da aorta abdominalis'ten ayrılarak pelvise doğru seyredip ovaryumlara ulaşmaktadırlar (22).

Hilum ovarii'den çıkan plexus pampiniformis vena ovarica'yı oluşturur. Sağ v. ovarica, vena cava inferior'a; sol v. ovarica vena renalis'e dökülmektedir. Ovaryumların lenf damarları ise nodi preaortici ve aortici

laterales'e drene olmaktadır (21).

Ovaryumların sinir uyarımı plexus ovaricus tarafından sağlanır. Sempatik lifler medulla spinalis'in torakal 10-11 segmentlerinden gelirken, parasempatik lifler ise nervus vagus'tan gelmektedir (21).



Şekil 1. Ovaryumun anatomik lokalizasyonu (23)

2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Genetik cinsiyet fertilizasyon sırasında belirlenmesine rağmen embriyonun erkek veya dişi gonada sahip olup olmadığı intrauterin dönemin yedinci haftasına kadar tespit edilemez. Gonadlar, abdomen arka duvarını döşeyen sölom epiteli, altındaki mezenşim ve primordial germ hücreleri (PGH)(oogonyumlar) olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar(24). Embriyoda genital organların gelişiminin, farklılaşmamış gonad evresi, PGH'nin oluşumu-göçü ve ovaryumların farklılaşması olmak üzere üç aşaması vardır (24).

2.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar

İntrauterin yaşamın beşinci haftasında mezonefrozun mediyalinden gelişen gonadların gelişimleri sırasında sağ ve sol sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla iki adet genital kabartı oluşur. Kalınlaşan sölom epiteli, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ailesinden kemotaktik bir faktör salgılayarak PGH'ni bu genital kabartı bölgesine çeker. Bu şekilde bu hücrelerin aynı zamanda çoğalabilmesini sağlar. PGH'ler primitif gonadlara ulaşmadan önce genital kabartının sölom epiteli çoğalır ve altında bulunan mezenşime gömülür. Daha sonra bu yapılar primer cinsiyet kordonlarını oluşturur (24).

Bu epitelyal kordonlar parmak şeklindedir ve altındaki mezenşimin içerisine doğru uzanırlar. Eğer embriyonun cinsiyet kromozomu XX ise, dışta korteks içte medulla yapısındaki farklılaşmamış gonadların medullası gerilerken korteksi farklılaşır. Eğer embriyonun cinsiyet kromozomu XY ise korteksi gerilerken medullası testise farklılaşır. Bu yapılarda primordial germ hücreleri gelişimin altıncı haftasına kadar görülmez. Yedinci haftadan önce her iki cinsiyete ait gonadların görünümü birbirine benzediği için farklılaşmamış gonad adını alırlar (24).

2.1.2.2. Primordial Germ Hücrelerinin Göçü

Primordial germ hücreleri erişkin gametlerin embriyonik dönemdeki öncülleridir. Şekilleri oval veya yuvarlak olabilen PGH, 15-20 μm çapındadır. Ekzantrik yerleşimli çekirdekleri vardır, kromatinleri belirgindir ve 1-2 adet büyük nükleolus içerirler. Büyük mitokondrileri vardır ve ribozomları çok sayıdadır. Sitoplazmalarında yaygın olarak glikojen ve lipit içerirler. Buna rağmen golgi'ye ait veziküller ve endoplazmik retikulum (ER) sisternaları nadirdir. İntrauterin yaşamın dördüncü haftasında PGH allantois kesesinin başlangıç yerine yakın vitellüs kesesinin endodermal hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Embriyonun katlanması esnasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyo içerisine dahil olur. Bu esnada bağırsağın dorsal mezenterî boyunca PGH, gonadal kabartılara göç ederler. Bu göçleri

sırasında çoğalarak sayılarını 100'den 1000'e kadar çıkarırlar. Altıncı haftada altlarındaki mezenşime girerek primer seks kordonlarına katılırlar. Eğer göç gerçekleşemezse testis ve ovaryum gelişimi gözlenemez. Göç eğer gonadların dışına olursa gonadlar ya ölür ya da teratom oluşumu gerçekleşir (24).

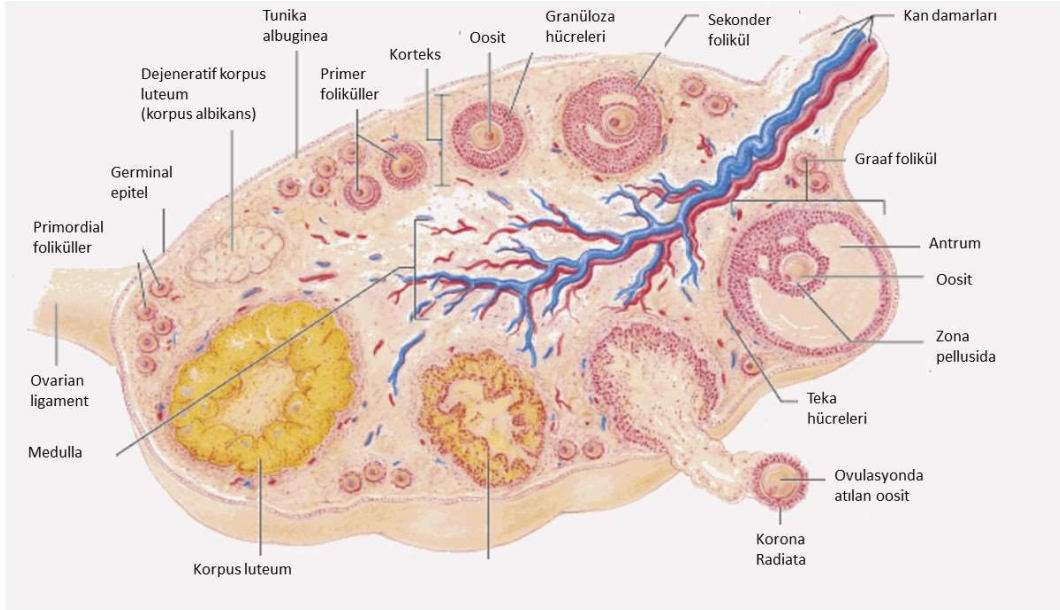
2.1.2.3. Ovaryumların Farklılaşması

Y kromozomunun kısa kolunda bulunan SRY geni ve testis belirleyici faktör (TDF) varlığında primer cinsiyet kordonları seminifer tübüllere farklılaşmaktadır. Bu genin yokluğu dişi cinsiyet gelişimi için esas olsa da primitif gonadların ovaryuma farklılaşabilmesi için X kromozomunda bulunan bazı genlere de ihtiyaç vardır. X kromozomunun kısa kolundaki konjenital adrenal hipoplazide X kromozomunda kopyalanmış protein [X *kromozomunda konjenital adrenal hipoplazi kritik bölge, gen 1 (DAX-1)*]’ın varlığında steroidogenaz faktör 1’in (SF1) aktivitesi düzenlenerek Leydig ve Sertoli hücrelerinin farklılaşması engellenir. Sertoli hücrelerinin varlığında salınan Mülleriyen inhibe edici faktör/anti-Mülleriyen hormon (MIF/AMH), paramезonefrik kanallardan tuba uterina, uterus, serviks ve vajinanın üst kısmının oluşumunu engeller. Bunun dışında kanat oluşumuyla bağlantılı MMTV entegrasyon bölgesi 4 [Wingless-related MMTV integration site 4 (WNT-4)] büyüme faktörü de ovaryuma farklılaşmada gereklidir (22).

Ovaryum içinde toplanan PGH mitozla bölünerek üçüncü ayın sonunda hücre grupları meydana getirirler. Bu hücre gruplarını ovaryumun yüzey epitelinden köken alan yassı folliküler hücreler sarar. Fötal hayatın 5. ayına kadar devam eden mitoz bölünmelerden sonra oogonyumlar ölmeye başlar. Bu şekilde oogonyumlar ve bu hücrelerden meydana gelen primer oositlerin çoğu yok olduktan sonra 7. ayda oogonyumların bir kısmı mayoza girer ve primer oosit adını alır. Bölünme bu aşamada duraklar ve primer oositler I. mayozun profazının diploten safhasında ovulasyondan hemen öncesine kadar 12-50 yıl kalabilirler (25).

2.1.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum'un yüzeyi germinal epitel olarak da adlandırılan, mezotelin devamı olan, tek katlı kübik ve yer yer yassı hücrelerden oluşan yüzey epiteli ile örtülüdür. Epitelin altında sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea bulunmaktadır. Bu tabakanın altında bulunan korteks kısmında oosit içeren foliküller yer alırken, iç kısımdaki medulla gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medullada büyük kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri, kollajen lif demetleri, elastik lifler ve düz kas lifleri bulunur. Elastik ve kollajen liflerin sayısı burada kortekse göre daha fazladır. Bunun dışında medullada intersitisyel hücreler ve hilus hücreleri de bulunmaktadır (26). Ovaryum korteksinde gelişiminin farklı evrelerinde olan foliküller; foliküllerden gelişen korpus luteum, korpus albicans ve atretik foliküller yer almaktadır.



Şekil 2. Ovaryum Histolojisi (23)

2.1.3.1. Ovaryum Folliküllerinin Gelişimi (Folikülogenez)

Foliküllerin primordial folikül aşamasından itibaren gelişip farklılaşarak olgun folikül gelişimine kadar olan sürece follikülogenez denir. Çeşitli endokrin, parakrin ve otokrin faktörlerin dominant folikülün seçimi için koordineli olarak çalıştığı bir süreçtir. Folikülogenez dönemi içerisinde, folikülü çevreleyen bağ dokusu hücrelerinde proliferasyon, hormon sekresyonu, oositin büyümesi ve mayoz bölünme geçirmesi gerçekleşmektedir. Bu foliküller farklılaşma dönemine girmeden önceki süreçte sessizdirler.

Folikülün gelişimi, granuloza, teka, interstisyel hücreler ile oositlerden salınan büyüme faktörlerinin otokrin ve parakrin sinyallerine bağlıdır. Bunlardan başlıcaları epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF, Kemik Morfogenetik Protein-4 (BMP4), B hücre / lenfoma ailesi 2 (Bcl2) , fibroblast büyüme faktörü (FGF), Homebox kodlayan genler (NOBOX), survivin, X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü (XIAP), Büyüme / farklılaşma faktörü-9 (GDF-9), Nötral apoptoz inhibitör proteini (NAIP), kök hücre faktörü (SCF), integrin, gonadotropin, Tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) olmak üzere çeşitli moleküllerdir. FSH ve kalsiyum iyonları da folikül gelişiminde etkisi olan diğer faktörlerdir (22).

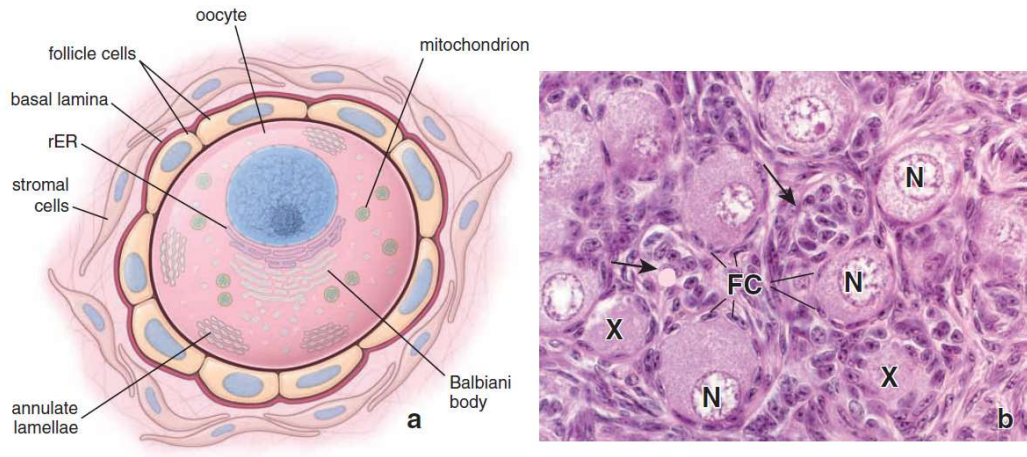
Gelişim evrelerine göre ovaryumlarda 4 tip folikül bulunmaktadır (22,24).

1. Primordiyal follikül
2. Primer (Preantral) follikül
3. Sekonder (Antral) follikül
4. Preovulatuvar (Graafian) follikül

2.1.3.1.1. Primordiyal Folikül

Foliküler gelişimin ilk safhasındaki folliküllerdir. Puberteden önceki dönemde sadece primordiyal folliküller görülmektedirler. Primordial germ hücrelerinden dişi bireylerde, gelişimin 25. haftasında mitoz bölünmeyle 7 milyona yakın sayıda oogonyum meydana gelir. Bu dönemde oogonyumların

çevresi tek katlı yassı epitel ile çevrilerek primordial foliküller oluşur. Ovaryumun korteksinde, tunika albuginea'nın hemen altında yer alırlar. İçerisinde primer oosit adı verilen immatür bir oosit yer almaktadır. Primer oositlerin çapı yaklaşık olarak 30 μ olup, çekirdekleri bir veya birden çok nükleoluslu ve veziküler yapıdadır. Ooplazma, bol mitokondri, lizozom ve annuler lameller içerir. Elektron mikroskopik olarak belirgin golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumu vardır. Bu organellerin yoğun olarak yer aldığı sitoplazma kısımları ışık mikroskopisinde Balbiani cisimleri olarak adlandırılır. Folliküler gelişim puberteden sonra oositin büyüyüp olgunlaşması, folikül epitel hücrelerinin proliferasyonu ve folikülü çevreleyen stromal hücrelerin değişmesi ile devam etmektedir.



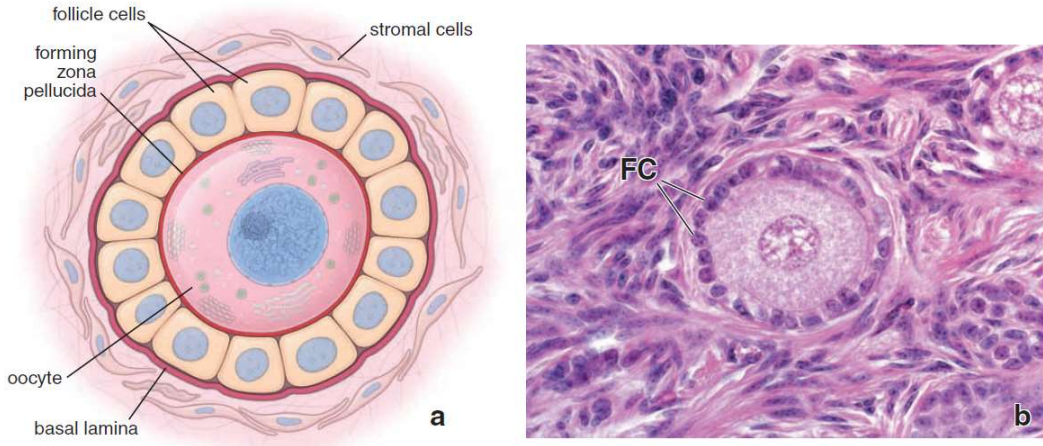
Şekil 3. Primordial Folikül (26).

a. Primordial folikülün şematik gösterimi. b. Primordial folikülleri gösteren bir fotomikrograf. FC: Foliküler hücreler, N: Oosit çekirdeği, X: Çekirdeği kesit düzleminde bulunmayan oositler. Oklar: Foliküle teğet geçen kesitte görünen foliküler hücreler.

2.1.3.1.2. Primer (Preantral) Follikül

Oositin büyümesiyle birlikte foliküllerdeki yassı epitel hücrelerinin değişikliğe uğrayıp kübik şekle dönüştüğü aşamada foliküle primer folikül denmektedir (27). Primer foliküllerin gelişimi sırasında, primer oositin çapı büyür ve oositin çevresini tek katlı kübik epitel ve epitelin altında bazal lamina çevreler. Primer oosit büyürken çevresine glikoprotein ve glikozaminoglikan salgılar, oositin etrafındaki bu alana zona pellusida denir. Oluşumuna foliküler hücrelerinin de katkıda bulunduğu zona pellusida oosit çapı yaklaşık olarak 50-80 μ ' a ulaştığında görünür hale gelmektedir ve ışık mikroskopunda asidofilik boya ile ve periyodik asit-Schiff (PAS) reaktifi ile boyanarak da gözlemlenebilir.

Foliküler hücreler ile oositi birbirinden ayıran zona pellusida 6-7 μ kalınlığındadır ve insanda ZP1 (200 kDa ağırlığında), ZP2 (120 kDa ağırlığında) ve ZP3 (83 kDa ağırlığında) olmak üzere 3 glikoproteinden oluşur. İnsanda akrozomal reaksiyona girmiş sperm ZP3'e bağlanır. Oosit ve folikül epitel hücrelerinin yüzeyinde bulunan mikrovilluslar, zona pellusida hizasında, oosit ve granüloza hücreleri arasında bulunan perivitellin aralığa uzanmaktadır. Gap junctionlar ile folikül epitel hücreleri ile oosit arasındaki bağlantı sağlanır. Oositin beslenmesi folikül hücreleri tarafından bu şekilde sağlanmış olur. Ayrıca gap junctionlar aracılığıyla folikül hücrelerinden oosite, maturasyon inhibe edici faktör (MIF) iletimi ile oositin bölünmesinin duraklaması sağlanırken oositin salınan BMP, GDF gibi moleküller sayesinde folikül epitelinin proliferasyonu sağlanır. Folikül epiteli çoğalıp çok katlı bir epitel halini alır. Tek katlı bir epitel içeren foliküle unilaminar primer folikül adı verilirken, stratum granulozum olarak da isimlendirilen çok katlı bir epitel içeren foliküle multilaminar primer folikül denir. Bu aşamada folikül hücreleri artık granüloza hücreleri olarak isimlendirilirler. Folikülün büyümesi sırasında, granüloza hücreleri arasında da yaygın gap junctionlar oluşur. Granüloza hücrelerinin bazal tabakasında zonula okludens tipi bağlantılar bulunmamaktadır, bu kan-folikül bariyerinin olmadığına göstergesidir (26,28).



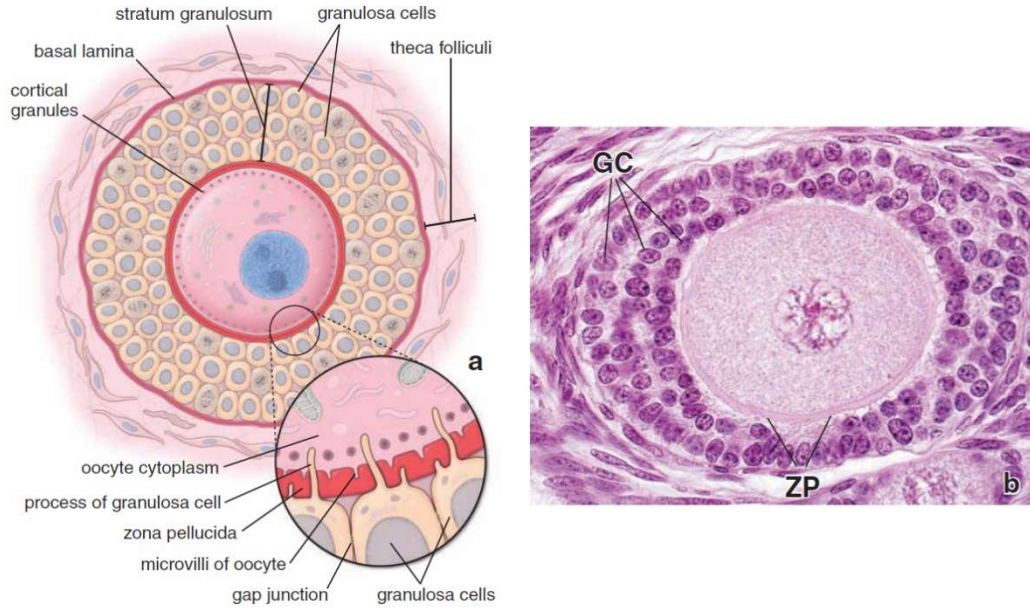
Şekil 4. Primer folikül (26)

a. Primer folikülün şematik gösterimi. Oosit ile komşu foliküler hücreler arasında zona pellucida oluşmuştur. Foliküler hücreler tek katlı kübik hale gelmiştir. b. Primer folikül fotomikrografı. FC: foliküler hücreler.

Primer folikülün gelişimi sırasında oosit de büyüyerek olgunlaşır. Golgi kompleksinin elemanları Balbiani cisimciğinden sitoplazmaya dağılır. Mitokondriyonların, serbest ribozomların, vezikül ve multiveziküler cisimlerin sayısı artar. Granüllü endoplazmik retikulumun (GER) miktarı artar. Memelilerde oolemma denilen oosit plazma membranının altında kortikal granüller adı verilen özelleşmiş salgı vezikülleri belirir.

2.1.3.1.2.1. Granüloza Hücreleri

Granüloza hücreleri, oositi çevreleyen, avasküler yapıda steroidogenik hücrelerdir. Overin somatik kısmını oluştururlar. Folikülün atreziye gidip gitmemesi veya dominant folikül olup seçilmesinde önemli rolü vardır. Granüloza hücrelerinden salgılanan gonadal steroidler, büyüme faktörleri ve sitokinler granüloza hücrelerinin canlılığında ve folikülün nihai büyüklüğe ulaşmasında önem taşımaktadır (29). Geç primer folikül evresinden itibaren foliküler hücreler granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar.



Şekil 5. Geç primer folikül (26)

a. Geç primer folikülün şematik gösterimi. Foliküler hücrelerden farklılaşan çok tabakalı granüloza hücreleri tarafından çevrelenen oosit gösterilmektedir. Granüloza hücreleri iç tarafta zona pellusidaya komşudur. Dış tarafta bulunan bazal lamina üzerinde oturmaktadırlar. Bazal lamina dış tarafta teka foliküli olarak adlandırılan stromal hücelere komşudur. Bu evrede sitoplazmada kortikal granüller ortaya çıkar. Oositten uzanan çok sayıda mikrovillus ve granüloza hücrelerinden çıkan ince uzantılar zona pellusidanın içine uzanmaktadır. Granüloza hücrelerinin uzantıları ooplazma membranına temas etmektedir. b. Geç folikül mikrografı. GC: Granüloza hücreleri, ZP: Zona pellusida

Büyümekte olan folikülün granüloza hücreleri, intersellüler ortamda görülen, PAS+ boyanan, hiyaluronik asit ve proteoglikanlardan zengin sıvıyı yapmaktadırlar. Folikül büyüklükleri, granüloza hücreleri tarafından üretilen ve antruma salgılanan inhibitör faktörler (OMI) tarafından kontrol edilir. Granüloza hücreleri ovulasyon öncesi dönemde protein salgısı yapan hücreler gibi görünmektedirler (25).

Antrum oluştuktan sonraki antral folikül aşamasında granüloza hücreleri kümülüs granüloza ve mural granüloza hücreleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Oosit ile folikül duvarı arasında kalan granüloza hücrelerine kümülüs granüloza hücreleri adı verilirken, antrum ile folikül duvarı arasında kalan diğer granüloza hücrelerine ise mural granüloza hücreleri adı verilir (30).

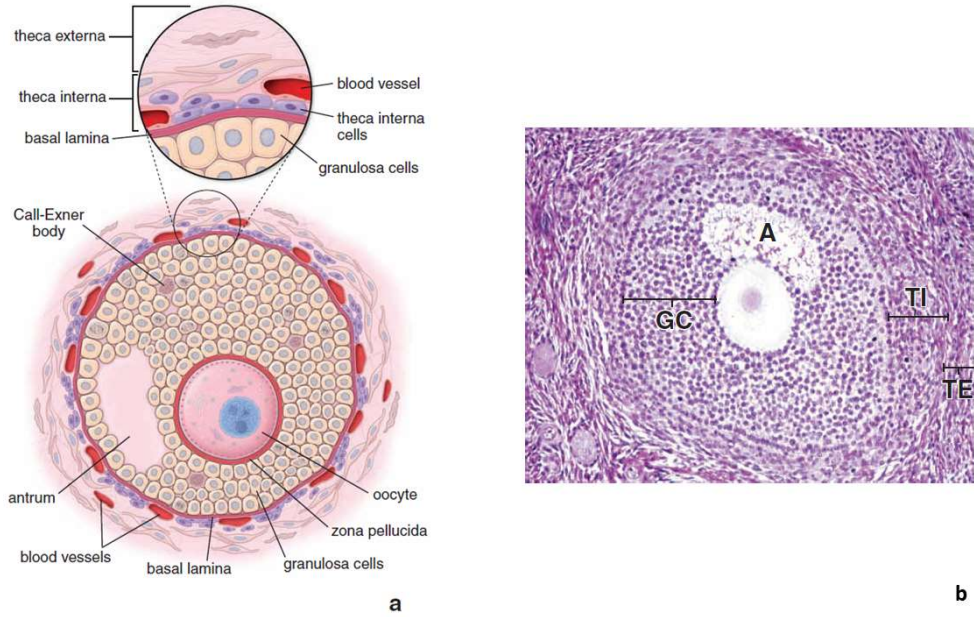
Folikülogenez aşamasındaki foliküllerin büyük çoğunluğu preovulatuvar aşamaya ulaşamaz ve atreziye gider. Gelişim esnasında antral evredeki foliküller gonadotropin bağımlı iken preantral foliküler gelişim gonadotropinden bağımsızdır. Hipotalamustan salgılanan GnRH uyarısıyla hipofizden salgılanan FSH ve LH folikül seçimindeki ana mekanizmayı oluşturur. FSH, foliküler büyümeyi kontrol eden ana hormondur ve dominant foliküldeki granüloza hücrelerinin inhibin ve östradiol (teka hücreleri tarafından üretilen androjeni kullanarak) üretmesine neden olur. Üretilen östradiol ve inhibin hipotalamo-hipofizer sistemi feedback mekanizmasıyla etkileyerek FSH sentezini inhibe eder. Bu şekilde diğer foliküllerin gelişimi baskılanır. Bunun yanında dominant foliküldeki granüloza hücreleri LH reseptörlerine sahiptir. Bu şekilde LH tetığının çekilmesi ile ovulasyon gerçekleşebilmektedir (25,26).

Granüloza hücreleri tarafından salgılanan östradiol ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) foliküler gelişim için hayati önem taşımaktadır. Bu faktörlerin yokluğunda granüloza hücrelerinin ölümü gerçekleşir. Granüloza tabakası foliküler bazal lamina üzerinde yer almaktadır ve büyüyen sağlıklı foliküllerde apoptotik hücreler gözlenmez. Apoptotik granüloza hücreleri erken atretik foliküllerde görülmeye başlarlar ve sayıları giderek artar. İlerlemiş atretik foliküllerdeki apoptotik granüloza hücre sayısı çok artınca granüloza tabakası hasarlanır ve bu foliküller daha sonra elimine edilir. Morfolojik olarak, apoptoz ilk olarak granüloza tabakasının iç tarafından başlar. Kümülüs hücrelerinden, oositten ya da teka hücrelerinden başlamaz. Bu da foliküler atreziyi başlatmada granüloza hücrelerinin apoptozunun rolünün olduğunu gösterir (3,31).

2.1.3.1.3. Sekonder (Antral) Folikül

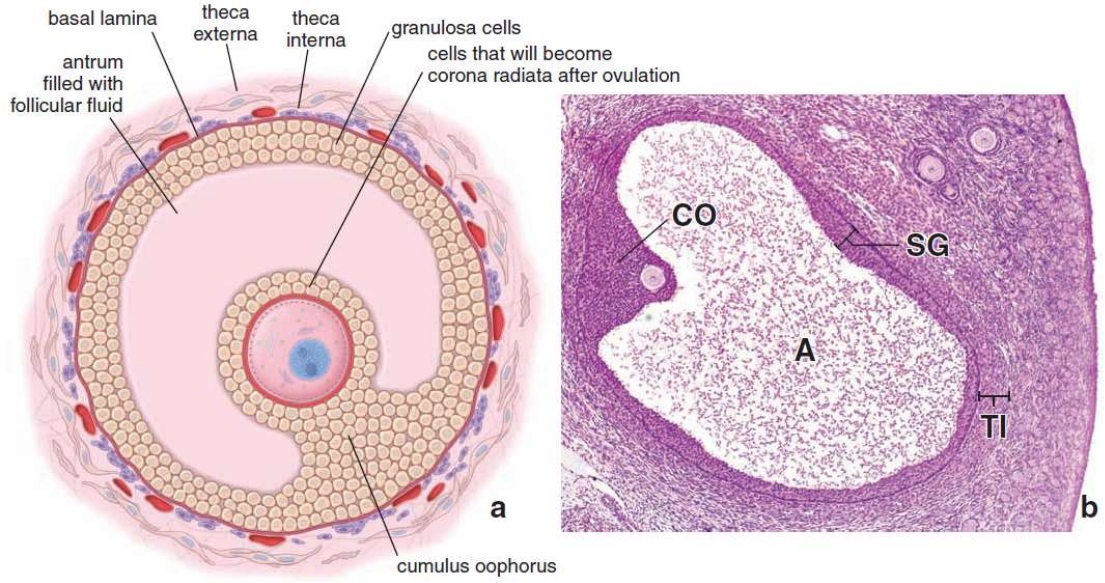
Stratum granülozum 8-12 hücre katına ulaştığında granüloza hücreleri arasında, içinde sıvı bulunan boşluklar oluşmaya başlar. Antrum denilen bu boşlukların varlığında folikül artık sekonder folikül (antral folikül) olarak isimlendirilmektedir. Antrumda bulunan, hyaluronik asitten zengin bu folikül sıvısı başlangıçta granüloza hücreleri tarafından sentezlenirken, daha sonra plazma kaynaklıdır. Bu dönemde oositin çapı yaklaşık olarak 125 μ ' dur. Granüloza hücrelerinden bu dönemde antral sıvıya salgılanan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) sayesinde oositin daha fazla büyümesi engellenir. OMI konsantrasyonu ile sekonder folikülün boyutu arasında zıt yönde korelasyon vardır (26).

Folikülün büyümesi esnasında, folikülün etrafındaki bağ dokusunda da birtakım değişiklikler meydana gelir. Stromal hücreler, folikül etrafında teka foliküli denen bağ dokusu tabakasını oluştururlar. Teka hücrelerinden angiogenik faktör salınımı ile damarlanma artırılarak büyüyen oositin ve granüloza hücrelerinin beslenmesi desteklenir. Teka ile stratum granülozum arasında camsı membran olarak da isimlendirilen bazal lamina yer almaktadır. Bazal lamina, avasküler olan stratum granülozum ile teka interna olarak isimlendirilen kapillerden zengin iç tabakayı birbirinden ayırmaktadır. Teka internanın dış tarafında ise düz kas hücreleri ve kollajen liflerinden oluşan teka eksterna yer alır. Teka interna kübik yapıda salgı hücrelerinden, fibroblast ve kollajen liflerden oluşur. Damardan zengindir, küçük kan damarları teka internaya girer ve salgısal hücrelerin çevresinde zengin bir damar ağı oluşturur. Steroid sentezleyen bu hücreler luteinize hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile bu hücrelerden östrojen prekürsörü androjenler (androstenedion) sentezlenir. FSH varlığında granüloza hücrelerinde üretilen aromataz enzimi ile teka internada sentezlenen bu androjenler östrojene dönüştürülür. Daha sonra teka tabakasına dönen östrojenler dolaşıma verilir. Östrojen etkisi altında granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin sayısı artar. Foliküler büyüme sırasında granüloza tabakasında kan damarı bulunmaz (25,26).



Şekil 6. Sekonder folikül (26)

a. Sekonder folikülün şematik gösterimi. Granüloza hücrelerinin arasındaki küçük sıvı dolu boşlukların birleşmesiyle oluşan sıvı dolu antrum görülmektedir. Call-Exner cisimcikleri bu evrede ortaya çıkar. Küçük yuvarlakta granüloza hücreleri, bazal lamina, teka interna ve teka eksterna arasındaki ilişki gösterilmektedir. b. Sekonder folikül mikrofrafı. Granüloza hücreleri (GC) arasında oluşan içi sıvı dolu antrum (A) görülmektedir. Sekonder folikülün bazal laminasının dışında teka interna (TI) ve onun dışında teka eksterna (TE) tabakaları görülmektedir.



Şekil 7. Tersiyer folikül (Graaf folikülü) (26)

a. Geniş antrumlu matür (Graaf) folikülün şematik gösterimi. b. Graaf folikülün fotomikrografı. A: Antrum, CO: Kümülüs ooforus, SG: Stratum granülozum, TI: Teka interna. Sağda ovaryumun yüzeyi görünmektedir. Sağ üst tarafta yer alan iki folikül primer foliküldür.

2.1.3.1.4. Preovulatuvar (Graafian) Folikül

Tersiyer folikülün çapı follikül boşluğundaki sıvı artışı nedeniyle artmıştır ve yaklaşık 10 mm'dir, içerisinde matür sekonder oosit bulunmaktadır. Büyük boyutundan dolayı ovaryumun yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Ultrasonografik inceleme ile saptanabilir. Antrum boyutu arttıkça stratum granülozum tabakası incelirken, folikül maksimum boyutuna yaklaştığında granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum genişlemeye devam ettikçe granüloza hücreleri ve oosit arasındaki aralık artarak ovulasyona hazırlanılır.

Folikül gelişimi sırasında antrumun büyümesi ile oosit folikülün kenarına doğru itilir. Granüloza hücreleri folikülün büyümesiyle doğru orantılı çoğalmadığından granüloza tabakası incelmıştır. Granüloza hücreleri, oosit ile ilişkili olduğu bölgede antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluştururlar. Burada yer alan granüloza hücrelerine kumulus ooforus ismi verilir. Oositin

etrafını saran granüloza hücrelerine ise korona radyata denmektedir. Korona radyata hücreleri ovulasyon sırasında oositle birlikte atılırlar. Primordiyal folikülden olgun folikül oluşana kadar geçen süre yaklaşık 90 gündür.

Foliküler maturasyonun bu aşamasında teka tabakaları daha belirgin hale gelmektedir. Teka interna hücre sitoplazmalarında lipid damlacıkları oluşur ve hücreler ultrastrüktürel olarak steroid üreten hücrelere benzerler.

2.1.3.2. Ovulasyon

Ovulasyon, olgun folikül duvarının yırtılarak oositin serbest kalmasıdır. Atılan oosit tuba uterinaların fimbriaları tarafından yakalanarak uterusu doğru taşınır. Bu olay 28 gün süren menstrual siklusun yaklaşık 14. gününde gerçekleşmektedir. İnsanlarda genellikle, her siklüste bir oosit atılırken bazen de iki veya daha fazla oosit serbest bırakılabilir ya da ovulasyon hiç gerçekleşmeyebilir (32–35).

Ovulasyonu tetikleyen büyüyen folikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeyine cevap olarak hipofizden üretilen LH düzeyindeki ani artıştır. Kandaki LH seviyesinin artmasından sonra birkaç dakika içinde ovaryuma giden kan akımında bir artış görülür. Kapiller ve postkapiller venüllerden sızan plazma proteinleri ödeme yol açar. Dokuda lokal olarak prostaglandin, histamin, vazopressin ve kollajenaz salınımı olur. Granüloza hücrelerinden hyaluronik asit üretimi artar ve aralarındaki bağlantı zayıflar. Folikül duvarının küçük bir alanı tunika albugineada meydana gelen kollajen yıkımı, iskemi ve hücre ölümü nedeniyle zayıflar. Foliküler sıvıdaki artış ve düz kas hücrelerinin kasılmasıyla birlikte bu zayıf kısımdan folikül duvarı yırtılır ve ovulasyon meydana gelir. İskemiye bağlı folikül duvarında görülen bu renk ve saydamlık değişimine stigma denir ve ovulasyonun yaklaştığının göstergesidir (32–35).

Fetal yaşamda I. Mayoz'un profazında duraklayan oositler, puberte döneminde, ovulasyondan hemen önce I. Mayoz'u tamamlarlar. I. Mayoz tamamlandığında primer oositlerden oluşan iki hücreden sitoplazmanın büyük bölümünü alan hücre sekonder oosit adını alırken az miktarda sitoplazma içeren diğer hücreye birinci kutup cismi denir. Sekonder oosit, I.

Mayoz'un hemen ardından II. Mayoz'a girer (32–35).

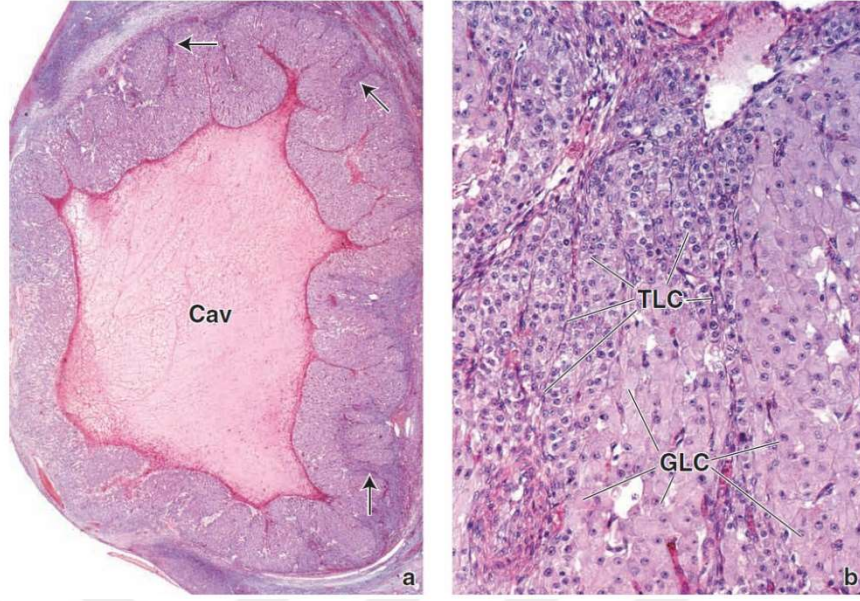
Folikül duvarının yırtılmasıyla II. Mayoz'un metafaz safhasında olan oosit, birinci kutup cismi, zona pellusida, korona radiyata ve bir miktar folikül sıvısıyla birlikte atılır ve tuba uterinanın açık ucundan içeri girer. Oosit ancak bir spermatozoon ile döllenirse II. Mayoz bölünme tamamlanır ve ikinci kutup cismi oluşur. Daha sonra bu kutup cisimleri dejenerasyona uğrayarak yok olurlar. Ovulasyondan sonraki ilk 24 saat içinde döllenme gerçekleşmezse oosit bozulur ve ortadan kaldırılır (32–35).

Oositler folliküller içerisinde bulunurlar ve gelişimleri için gereken mikroçevre foliküller tarafından sağlanır. Puberte sonrası normal bir genç kadının ovaryumlarında yaklaşık 400.000 follikül bulunmaktadır. Bu folliküllerden yaklaşık 500 tanesi tersiyer follikül safhasına ulaşırken geri kalanı atreziye uğrayarak dejenere olurlar. Menopozla birlikte ovaryumlarda kalan tüm oositler dejenere olarak ortadan kalkarlar (32–35).

2.1.3.2.1. Korpus Luteum

Ovaryumun korteks bölgesinde, ovulasyon sonrasında oositin atıldığı foliküldeki granüloza ve teka interna hücreleri korpus luteumu oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Folikül duvarı, folikül sıvısı boşaldıktan sonra kıvrımlı bir şekil alır. Folikül boşluğuna bir miktar dolarak burada koagüle olur, sonrasında yerini bağ dokusuna bırakır. Bu kısım korpus luteumun en iç kısmını oluşturur.

Ovulasyondan sonra granüloza hücrelerinin boyutunda büyük bir artış görülür ve granüloza lutein hücreleri adını alırlar. Bu hücreler korpus luteumun parankiminin yaklaşık %80'ini oluştururlar ve steroid salgılayan hücre özelliklerine sahiptirler. Teka internadaki hücreler de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu hücreler granüloza lutein hücrelerine benzemekle birlikte boyutları daha küçüktür, daha koyu boyanırlar ve korpus luteum duvarının kıvrımlarında lokalize olmaktadır. Teka internanın kapiller ve lenfatikleri iç kısma doğru gelişerek korpus luteumun zengin damar ağını oluşturur.



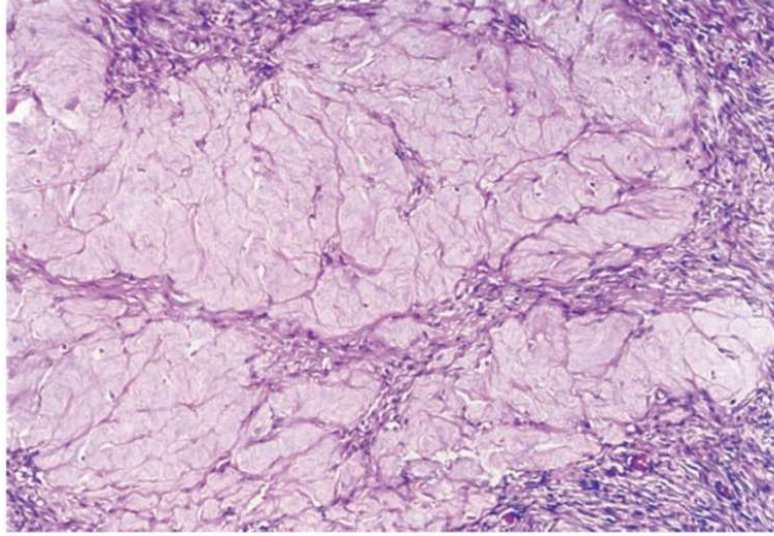
Şekil 8. Korpus Luteum (26)

İnsan ovaryumuna ait korpus luteumun fotomikrografı. a. Korpus luteum, granüloza ve teka hücrelerinin içeren kollabe olmuş folikül duvarından oluşur. Granüloza lutein hücreleri foliküler kavitenin (Cav) etrafında kalın, katlantılı bir tabaka oluştururlar. Katlantıların içinde teka internaya ait hücreler bulunur (oklar). x12. b. Bu fotomikrograf korpus luteum duvarını daha büyük büyütmede göstermektedir. Granüloza lutein hücreleri (GLC) ana hücre kütesini oluşturmaktadır. Granüloza lutein hücrelerinden oldukça küçük teka lutein hücreleri (TLC) görülmektedir.

Korpus luteumun oluşumu, ovulasyon öncesi dönemdeki LH stimülasyonu neticesinde gerçekleşir ve yine bu uyarı sayesinde korpus luteum progesteron ve östrojen salgılamaya başlar. Gebeliğin oluşmaması durumunda korpus luteum bu görevini 10-12 gün boyunca devam ettirir, sonrasında korpus luteum hücreleri apoptoza uğrayarak dejenere olur. Progesteron salgısında meydana gelen bu azalma neticesinde menstruasyon görülür. Korpus luteumun bozulması ile azalan östrojenin hipofiz üzerindeki baskılayıcı etkisi kalkar ve hipofizden FSH salgılanır. FSH'ın başka foliküllerin büyümesini uyarması ile bir sonraki siklus başlamış olur.

Menstrual siklusün bir kısmı boyunca bulunan menstrual korpus luteum makrofajlar tarafından fagosite edilerek yerini fibroblastlara bırakır. Bu süreç sonunda sıkı bağ dokusundan oluşan yapıya korpus albicans adı verilir.

Gebelik oluşması halinde, oluşan embriyonun trofoblastik hücreleri tarafından sentezlenen insan koryonik gonadotropin hormonu (HCG) etkisi ile korpus luteumun bozulması engellenir ve daha da büyümesine neden olarak progesteron salgısının devamı sağlanmış olur. Progesteron uterus mukozasının gebelik boyunca korunması görevini üstlenmektedir. Gebelik korpus luteumu 4-5 ay sonra bozulur ve yerini menstruasyon korpus albicansından çok daha büyük bir korpus albicans alır.



Şekil 9. Korpus Albicans (26)

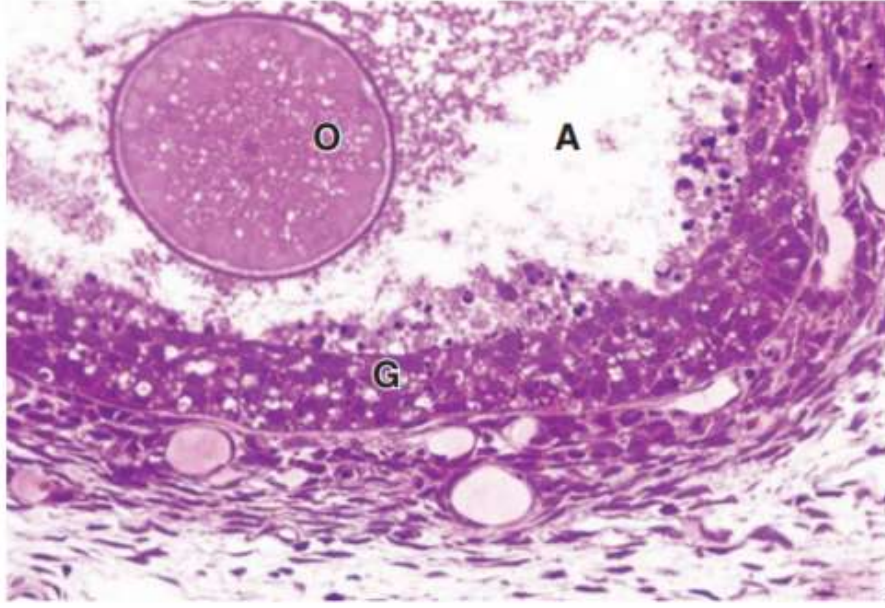
İnsan ovaryumuna ait korpus albicansın fotomikrografı. Önceki sıklüse ait korpus luteumun dejenerasyona uğramakta olan hücrelerinin arasında büyük miktarda hyalin materyal görülmektedir. Korpus albicans, ovaryumun stroması tarafından çevrelenmektedir. x125.

2.1.3.2.2. Foliküler Atrezi

Her menstrual siklüste, genellikle bir folikül diğerlerinden daha fazla büyür ve baskın hale gelirken diğerleri yıkıma uğrar. Baskın olan folikül, tersiyer folikül aşamasına ulaşabilir ve ovulasyonu gerçekleştirebilir. Ovaryum foliküllerinin çoğu atreziye uğrarken folikül hücreleri ile oositler apoptoza uğrayarak fagositler tarafından ortadan kaldırılırlar. Sonrasında fibroblastların gelişimiyle kollajen içeren nedbe dokusu oluşur. Gelişimin herhangi bir aşamasındaki folikül atreziye uğrayabilir. Bu granüloza hücrelerinde mitoz bölünmenin durması, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve oositin ölmesi gibi nedenlerle olabilmektedir. Folikül atrezisinin fetal hayatta başlayıp menopoza birkaç yıl sonrasına kadar görüldüğü dönem içerisinde yoğun olduğu bazı zamanlar vardır. Özellikle doğum sonrası dönem (anneden gelen hormonların etkisinin ortadan kalkmasıyla) ile puberte ve gebelik sırasında oldukça belirginleşmektedir (26,28,36,37).

Folikül atrezisi sırasında çoğu zaman teka interna hücreleri korteks stromasında tek ya da küçük gruplar halinde kalmaktadır. İntersitisyel hücreler olarak adlandırılan bu hücreler çocukluk döneminden menopoza dek izlenirler ve LH uyarısı ile steroid salgırlar (38).

Survival faktörlerin eksikliği veya ölüm ligandlarının uyarılması apoptozun esas sebebidir ve granüloza hücrelerinin apoptozuna yol açar, apoptozun artışı folikülün atrezisiyle sonuçlanır (39). Östradiol, IGF1, FSH, EGF ve IL6 anti-apoptotik faktörlerdir ve AKT sinyal yolağını aktive ederler (3,40–42). Diğer taraftan, FAS (CD95), FASL, tümör nekroz faktör alfa (TNF α) ve reseptörü TNFR, BCL2 ailesi üyeleri [Bax(Bcl2 ilişkili protein X)], TRAIL ve TRAIL reseptörleri gibi hücre ölüm ligand-reseptörleri ise foliküler atrezide etkilidir (3). Bu sinyallerin hücre içi farklı pro-apoptotik yolları uyarması sonucunda kaspaz 3 ile apoptoz gerçekleşir (3).



Şekil 10. Atrezik Folikül (36)

Folikül atrezisi gelişiminin herhangi bir evresinde başlayabilir. Atrezi, granüloza hücrelerinin (G) apoptozu ve oositin (O) otolizi ile karakterize edilir. Makrofajlar, debris temizlemek için dejenere olan yapının içine girerler. Antrumda (A) gevşemeyle beraber, içerisinde birçok apoptotik cisimcik gözlenir. Korona radyata hücreleri kaybolmuştur, oositin çevresi boştur. (X200)

2.1.4. Ovaryum Fizyolojisi

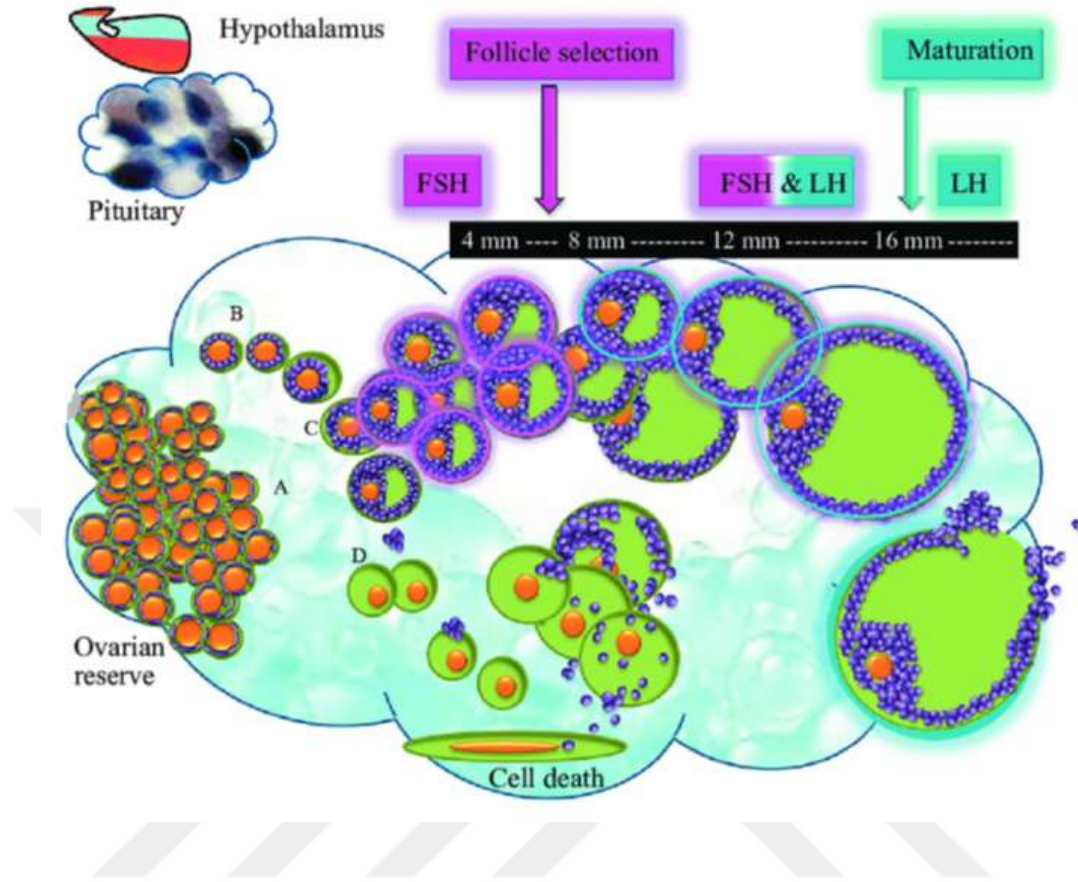
2.1.4.1. Ovaryan Siklusun Hormonal Düzenlenmesi

Folikül kaynaklı aktivin, gonadotropin hormonu üreten hücreleri aktive ederken hipofizden FSH üretimini sağlar. Salgılanan FSH, granüloza hücrelerini FSH reseptörleri yoluyla uyarır, folikül gelişimine ve antrumun genişlemesine neden olur. Foliküler gelişim antral dönemden itibaren FSH'a bağımlıdır (43). Hipofizin anterior lobunun pars distalis kısmından salınan FSH menstrual siklusun ilk yarısında etkilidir. Proliferatif (ya da foliküler) faz denilen bu dönemde FSH, granüloza ve kümülüs hücrelerinde, estradiol-17b (E₂) sentezinden sorumlu Cyp19a1 enziminin ekspresyonunu uyarır.

Granüloza ve kümülüs hücrelerinde E₂ sentezi başlaması ile E₂'nin granüloza hücreleri üzerine parakrin ve otokrin etkisi sonucu granüloza hücre proliferasyonu ve LH Reseptörü ekspresyonu gerçekleşir. Granüloza hücrelerinden salınan E₂, oogenezi ve foliküler gelişimi uyarır (25,26).

Ovulasyon için uyarıyı oluşturan, büyüyen folikül tarafından üretilen dolaşımdaki yüksek östrojen düzeyine yanıt olarak ön hipofizden salgılanan LH düzeyindeki ani artıştır. Siklusun ortasında FSH ve LH'nin aniden yükselmesi ile LH'nin ani artışına yanıt olarak granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri desensitize olur. Bunun neticesinde granüloza hücreleri LH'a yanıt olarak östrojen üretemezler. Primer oositin birinci mayotik bölünmesi ani artış tarafından tetiklenerek, maturasyon ilerletici faktör (MPF) etkisi ile kaldığı yerden devam eder. LH'un ani artışından 12-24 saat sonra gerçekleşen bu olay sekonder oosit ve birinci polar cismin oluşumu ile sonuçlanır ve ovulasyon meydana gelir. Siklusun luteal faz adı verilen ikinci yarısında granüloza ve teka hücreleri lüteinizasyona uğrarlar ve oluşan korpus luteumdan progesteron üretilir. Atılan oositin eğer sperm ile döllenmesi gerçekleşmezse hormon seviyeleri düşer, endometriyumun stratum fonksiyonale tabakası dejenere olarak menstruasyon ile atılır ve korpus luteum dejenere olarak korpus albicans adını alır. Bu döngü menopoza kadar her ay tekrarlanmaktadır (26).

Östrus siklüsü sırasında dominant folikül preantral foliküle dönüşürken, diğer foliküller atreziye gider. Bu süreç içerisinde hücre proliferasyonu ve apoptoz aynı anda gerçekleşmektedir. FSH ve LH'nin granüloza hücrelerinin apoptozunu inhibe ettiği, FSH reseptörü knockout edilen ve hipofizi çıkarılan farelerde, folliküler gelişimin preantral evrede durduğu ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (44). FSH'nin follikül gelişimini kontrol ettiği, granüloza hücrelerinin apoptozunu azalttığı ve folikülleri atreziden koruduğu rapor edilmiştir (45). Yapılan başka bir çalışmada ise FSH'nin atretik foliküllerin erken evresinde granüloza hücrelerinin apoptozunu önlediği ancak ilerlemiş atretik foliküllerdeki granüloza hücrelerinin apoptozunu engelleyemediği, bunun mitokondrial apoptozun gerçekleşmiş olmasından kaynaklanıyor olabileceği paylaşılmıştır (46).



Şekil 11. Folikülogenez (47)

Primordial folikül aktivasyonu, dominant folikül seçimi, ovulasyon öncesi gelişimi ve olgunlaşması. A: Primordial foliküller, B: Primer foliküller, C: Sekonder foliküller, D: Preantral foliküllerin atrezisi. FSHR ekspresyonu (mor halkalar) ve FSH sekresyonu antral folikül oluşumunu uyarır. LHR ekspresyonu (yeşil halkalar) neticesinde dominant folikül seçimi (mor ok) ile devam eder. Proliferasyon gerçekleştikçe folikül çapı artar. Folikülün olgunlaşması ve LH piki foliküler hücrelerde farklılaşmaya neden olur. Foliküllerin çapı, folikülogenez sırasındaki evrelerini gösterir.

2.1.4.2. Östrus Siklusu

İnsanlarda menstrual siklus olarak adlandırılan ortalama 28 gün süren üreme döngüsü, rodentlerde östrus siklusü olarak adlandırılır ve ortalama 4-5 gün sürer. Vajinal açılma apoptoz aracılığıyla gerçekleşen bir olaydır ve pubertenin başlayıp başlamadığını anlamak için kullanılır. Östradiol salınımindaki artışın sonucu olarak meydana gelir. Farelerde vajinal açılma ortalama 26 günlükken gerçekleşir (48).

Üreme sistemiyle ilgili çalışmalarda ve östrus siklusünün evresini belirlemede vajinal sürüntü sitolojisi kullanılır. Bu yöntem vajinal sürüntüde görülen üç hücre tipinin dağılımına göre yapılır: epitelyal hücreler, kornifiye hücreler ve lökositler. Bu hücrelerin dağılımına göre östrus siklusü fare ve sıçanlarda proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 evreye ayrılır (49).

2.1.4.2.1. Proöstrus

Bu evrede çekirdekli epitelyal hücreler hakim olarak gözlenmektedir. Kümeler halinde ya da tek tek görülebilirler. Kornifiye hücreler de az da olsa gözlenebilir. Bu evre östradiol atışının olduğu ovulasyon öncesi güne denk gelir ve gecesi sırasında LH ve FSH'ta dalgalanma gerçekleşerek ovulasyon meydana gelir (50,51).

2.1.4.2.2. Östrus

Bu evre kümeler halinde bulunan kornifiye skuamöz epitelyal hücrelerle karakterize edilir. Çekirdekleri görünmez; sitopazmaları granüler yapıda ve şekilleri düzensizdir. Östradiol seviyesi sabah boyunca yüksek seviyede kalır, öğleden sonra bazal seviyelere iner (48,51).

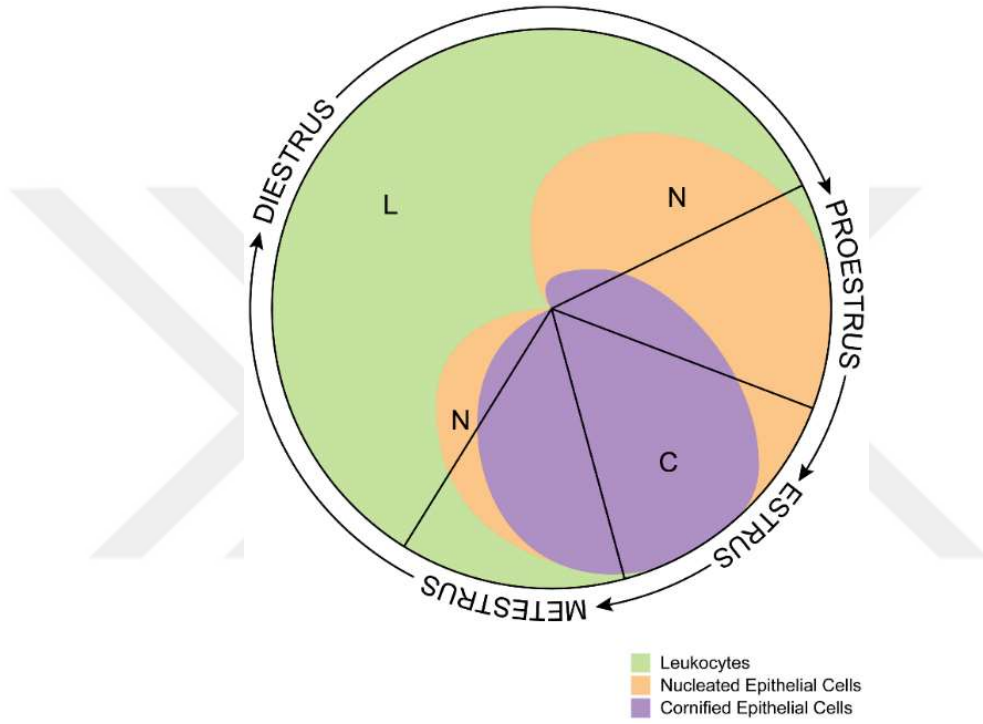
2.1.4.2.3. Metöstrus

Bu evrede lökositler baskın olarak görülmekle birlikte bütün hücre tipleri gözlenebilir. Az miktarda çekirdekli epitelyal ve/veya kornifiye skuamöz epitelyal hücreler bulunur. Plazma östradiol seviyesi düşüktür (48,51).

2.1.4.2.4. Diöstrus

Bu evrede lökositler baskın olarak görülür. Plazma östradiol seviyesi artmaya başlar (48,51).

Östrus, metöstrus ve diöstrus sırasında plazma LH ve FSH seviyeleri düşüktür. (50).



Şekil 12. Östrus döngüsünde yer alan hücre tipleri (52)

2.2. Yardımlı Üreme Tekniklerinde FSH'nın Kullanımı

FSH, glikoprotein hormon ailesine ait gonadotropinlerden biridir ve bir α ve bir β subunitten oluşan heterodimer bir yapıya sahiptir. FSH reseptörü G Protein Kenetli Reseptörler (GPCR) ailesine ait yedi transmembran sarmalı yapısındadır. Heterotrimerik G-protein subunitlerinden biri olan G_α yoluyla sinyalini ilgili moleküllere iletir. FSH'nın, foliküler büyüme, maturasyon, dominant folikül seçimi ve östradiol üretiminde rolü vardır. Folikülogenez sırasında foliküllerin sağ kalımlarında önemli bir faktördür. İn vitro ortamda granüloza hücrelerinin apoptozunu azaltırken in vivo ortamda antral folikülleri, preovulatuvar aşamadaki folikülleri ve dominant folikülleri atreziden korur (1,30,53). FSH'nın inhibisyonu atreziiyi indükleyerek ovaryan fonksiyonlara zarar verir. Ayrıca FSH reseptörlerinin delesyonu da folikül kaybıyla sonuçlanır. Apoptozun intrinsik yolağı FSH tarafından ekstrinsik yolağına göre daha fazla baskılanmaktadır (30). Bu fonksiyonları nedeniyle yardımcı üreme tekniklerinde FSH'dan faydalanılmaktadır.

Ovulasyon bozuklukları ve over foliküllerin zamanla azalması, normal fizyolojik süreçleri bozabilir ve infertilite ile sonuçlanabilir. Luteinizan hormon (LH) ve FSH anovulatuvar siklusu olan kadınlarda, polikistik over sendromlu (PKOS) kadınlarda ve hipotalamik anovulasyonlu kadınlarda ovulasyon indüksiyonu için kullanılmaktadır.

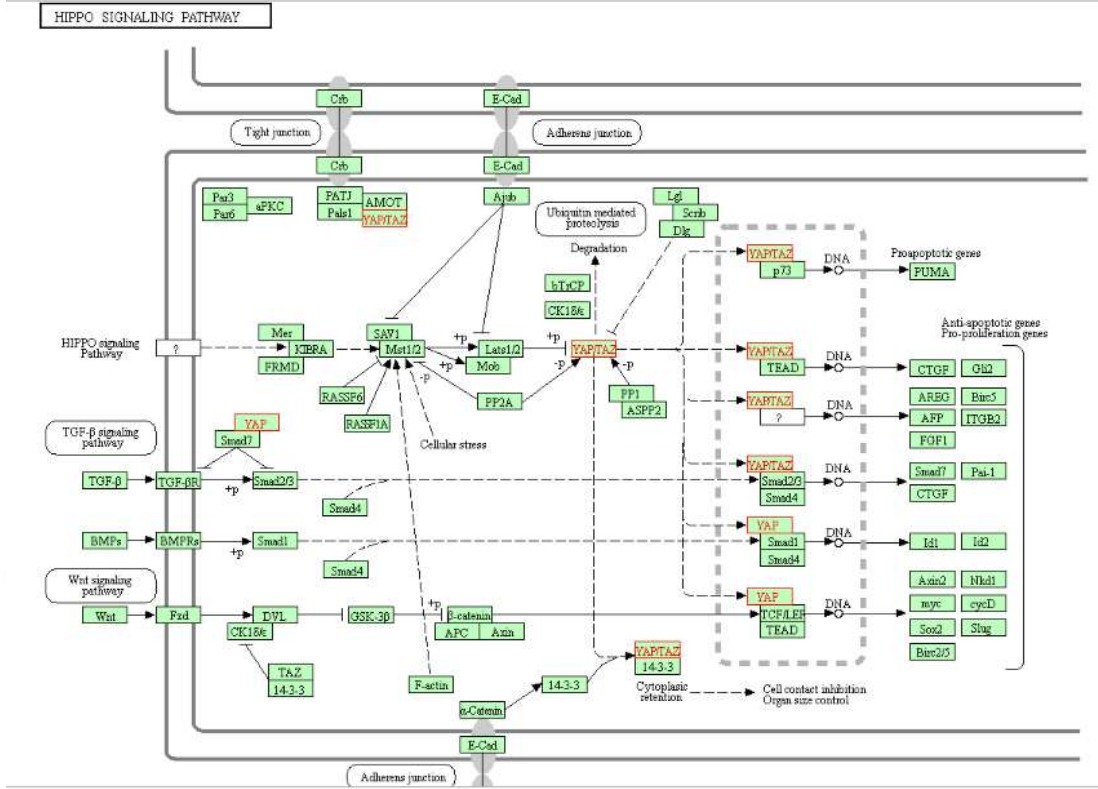
Overlere hiperstimülasyon uygulamaları, aynı anda çok sayıda folikülün gelişmesini sağlamaktadır. İnsan menapozal gonadotropinler, pürifiye üriner FSH uygulamaları ve rekombinant FSH uygulamaları, kontrollü over stimülasyonu (KOS) için en yaygın kullanılan uygulamalar arasındadır. FSH, KOS sırasında tek başına foliküler maturasyon için kullanılabilir. FSH, KOS sırasında tek başına foliküler maturasyon için kullanılabilir.

Yardımlı üreme tekniklerinde yaygın olarak kullanılmasına rağmen yüksek doz FSH'nın ovarian stimülasyon sırasında, granüloza hücrelerinde HIF-1 α yoluyla otofaji sinyalini indüklediği ve in-vitro ortamda granüloza hücreleri üzerinde otofajik etki gösterdiği ileri sürülmektedir (6,7).

2.3. Hippo Sinyal Yolağı

İnsan ve hayvanların organ boyutları, gelişimleri sırasında belirli bir aşamaya gelince durur ve daha fazla büyümeye devam etmez. Bu büyüme mekanizmalarının *Drosophila* üzerinde incelenmesiyle Hippo sinyal yolağının varlığı anlaşılmıştır (54). Bu yolakta varlığı ilk ortaya konan genler *warts* (*wts*) (55), *Salvador* (*sav*) (56) ve *hippo*'dur (*hpo*) (57–59). Bu genler memelilerde sırasıyla büyük tümör baskılayıcı kinaz 1/2 (*LATS1/2*), *Salvador 1* (*SAV1*) ve makrofaj uyarıcı protein (*MST1/2*) olarak adlandırılır ve mutasyonları organın ulaşması gereken nihai boyutlardan daha büyük boyutlara erişmesine neden olmuştur. Bu genlerde mutasyon hücrelerin aşırı proliferasyonuna ve apoptoza karşı direnç kazanmasına neden olur. Aynı şekilde daha sonra bulunan Hippo yolağına ait genlerdeki mutasyonlar da farelerde aşırı doku büyümesine neden olmuştur. Bu nedenle Hippo sinyal yolağı elemanları hücre proliferasyonunda ve apoptozda, dokulardaki yapısal değişiklikleri ve organın normal büyüklüğe ulaşmasını düzenlemede görev almaktadır (12). Aynı zamanda folikül aktivasyonunda, büyümesinde ve folikül gelişiminin düzenlenmesinde de rolleri bulunmaktadır (60).

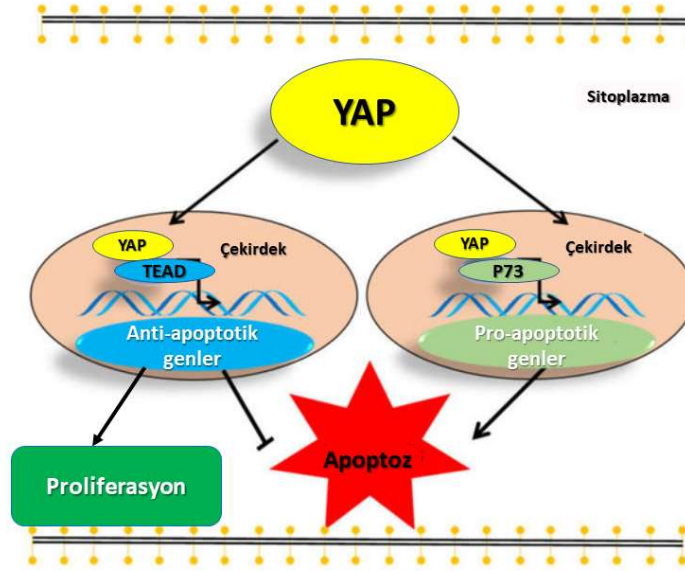
Yolağın merkezi elemanı olan *LATS1/2* aktif hale geldiğinde, transkripsiyonel koaktivatörleri olan *YAP/TAZ*' a bağlanarak onları fosforile eder ve inaktivasyonlarına neden olarak çekirdeğe girmelerini engeller ve sitoplazmada proteozomal yıkımları gerçekleşir (61–63). Eğer *LATS1/2* aktif değilse, *YAP/TAZ* çekirdekte birikir ve *TEAD* ailesine bağlanır. Azalmış Hippo yolağı aktivitesi *YAP/TAZ* aktivitesinde artışa neden olarak apoptozun azalmasına ve sonuçta hiperproliferasyona ve dokunun aşırı büyümesine neden olur. Hippo yolağının kontrolünü sağlayan primer düzenleyiciler GPCR'ler ve MAPK sinyalleridir. Bununla birlikte hücre iskeletinde meydana gelen değişiklikler, hücre-hücre, hücre-matriks elemanları arası etkileşimler ve ekstraselüler matriksin fiziksel içeriği Hippo yolu aktivitesi üzerinde etkilidir (64–69).



Şekil 13. Hippo sinyal yolağı ve bağlantılı olduğu yollar (70)

YAP ve TAZ, Hippo sinyal yolağının anahtar molekülleridir. Hippo sinyali serin/threonin kinaz kaskadında görev alan negatif büyüme düzenleyicilerini içerir ve bunlar yolaktaki ana transkripsiyonel koaktivatörler olan YAP ve TAZ moleküllerini fosforile ve inaktive eder. Hippo sinyali bozulduğunda sitoplazmadaki YAP veya TAZ çekirdeğe girerek, TEAD ile bağlanıp hedef gen transkripsiyonunu aktive etmektedir. Bunun neticesinde büyüme faktörlerinin hücrel iletişim ağı faktörü (CCN) [CCN1(CYBR1-sitokrom B redüktaz1), CCN2(CTGF-bağ dokusu büyüme faktörü), CCN3(NOV-Aşırı ekspres olan Nefroblastoma)] ve apoptoz inhibitörlerinin (BIRC-Bakuloviral IAP tekrar içeren protein3) ekspresyonu artmaktadır. CCN büyüme faktörü ailesinin üyesi olan CTGF, Hippo yolağında yer alan proproliferatif bir moleküldür, BIRC ise antiapoptotiktir. Bu moleküllerin ekspresyonlarının artması hücrenin büyümesini, yaşamasını ve proliferasyonunu uyarmaktadır. YAP ve TAZ, çok sayıda proteinle etkileşim halindedir ve aktivitelerini kontrol eden birçok süreç vardır. YAP'ın transkripsiyonel aktivasyon bölgesindeki

fosforilasyonu YAP'ın etkileşim kurduğu proteinleri değiştirir. DNA hasarı durumunda YAP-P73'e bağlanıp proapoptotik gen (BAX, p53) transkripsiyonunu arttırarak hücre ölümüne neden olur (12,67,68).



Şekil 14. YAP'ın apoptoz ve proliferasyonda anahtar rolü (71)

2.3.1. YAP1

YAP insanlarda 11q22 kromozom bölgesinde bulunan bir onkogendir (72). YAP1, çeşitli transkripsiyon faktörleriyle reseptör tirozin kinaz4 (ErbB4), Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2), TEAD ve p73 etkileşime girerek onların aktivitelerini düzenleyen, Hippo yolağının önemli bir transkripsiyonel koaktivatörüdür, tek başına transkripsiyonel aktivitesi yoktur. Over de dahil olmak üzere kemik iliği dışında bütün dokularda eksprese olmaktadır (61).

Transgenik farelerde YAP, geri dönüşümlü olarak karaciğerin aşırı büyümesine neden olmuştur. Buradan Hippo yolağının organ boyutunu düzenlemesindeki rolü açığa çıkmaktadır (73). Bunun yanında YAP'ın devamlı ekspresyonu hiperplaziye ve tümör gelişimine neden olmaktadır (61).

YAP1 aşırı eksprese olduğunda, tümör büyümesine ve kanserlerde sağ kalımın azalmasına yol açarak bir onkogen gibi görev alırken, apoptozu indüklemesiyle aynı zamanda tümör baskılayıcı rolü de vardır. Kanserlerde dual rol oynamaktadır; epitelyal kanserlerde onkogenken, hematolojik kanserlerde tümör süpressördür. Bunun nedeni YAP1'in değişen hücresel içeriğe bağlı olarak farklı komponentlerle kompleks oluşturmasıdır. Örneğin DNA hasarı olmadığında YAP1, RUNX (onkogenik transkripsiyon düzenleyicisi) ile etkileşime girerek p73'ün degradasyonunda artışa neden olur. Böylece transkripsiyon modülatörleri YAP1'i p73'ten uzaklaştırarak diğer komponentlere (partnerlerine) yönlendirip ve YAP1'in proliferatif ve antiapoptotik rolüne bürünmesine yol açabilmektedir (74).

Bir takım GPCR'ler ve onların agonistleri Hippo yolağı'nın düzenleyicileri olarak görev yapmaktadır. G_s bağlı reseptörlerin epinefrin veya glukagonla aktivasyonu, LATS1/2 kinaz aktivitesini arttırarak YAP'ın inhibisyonuna neden olurken $G_{12/13}$ veya $G_{q/11}$ bağlı reseptörlerin lizofosfatidik asit (LPA) veya sfingozin 1-fosfat (S1P) ile aktivasyonu LATS1/2 kinaz aktivitesini inhibe ederek YAP'ın aktivasyonuna neden olur. YAP ve TAZ yapısal olarak birbirine çok benzeyen iki moleküldür. YAP veya TAZ'ın fosforilasyonu aktivasyon-inhibisyon dengesinde kritik basamaktır. Memelilerde Hippo yolağı aktive olduğunda, YAP1 ve TAZ'ın, LATS 1/2 tarafından fosforilasyonu ile çekirdeğe girişleri engellenir. Bu onların 14-3-3'e bağlanarak sitoplazmada birikmelerine ve YAP'ın inaktivasyonuna neden olur (62,75). Hippo yolağına ek olarak, fosforilasyondan bağımsız sitoplazmada kalmasına neden olarak, YAP1'in fonksiyonunu ve lokalizasyonunu düzenleyen angiomotin (AMOT) ve sıkı bağlantı proteini-2 (ZO-2) gibi bir takım proteinler de sıkı bağlantılarda bulunmaktadır (76,77). Adherens ve zonula okludens tipi bağlantıların Hippo yolağının normal fonksiyonunu göstermesinde hayati rolleri vardır. Bu bağlantılar ile epitelyal dokudaki mekanik stresin etkileri Hippo yoluna aktarılabilir (78,79).

Hippo sinyalinin kaybı veya YAP1'in anormal aktivasyonu (örneğin 127A mutasyonu), fosforile edilmemiş YAP1'in nüklear birikimine neden olur ve onun RUNX, TEAD, promiyelositik lösemi proteini (PML) veya p73 gibi farklı

transkripsiyon faktörlerine bağlanarak ilgili genlerin ekspresyonuna neden olur. Bu şekilde bir onkogen/tümör süpresör gen gibi davranır. YAP1'in bağlandığı bu farklı transkripsiyon faktörlerinden belki de en önemlisi TEAD ailesi transkripsiyon faktörleridir. TEAD'ın susturulması veya YAP1-TEAD ilişkisinin bozulması YAP1'e bağlı gen transkripsiyonunu ortadan kaldırır ve YAP1 nedenli hücre proliferasyonunu, onkogenik transformasyonu ve epitelyal-mezenkimal geçişi azaltır (80).

Yap1'in, granüloza hücrelerinde *Foxl2* aracılı susturulması granüloza hücrelerinin apoptozuna yol açar ve korpus luteum sayısını, ovaryumun boyutunu azaltır ve transgenik farelerin fertilitesinde bozulmaya neden olur. Buna rağmen preovulatuvar foliküllerdeki farklılaşmış granüloza hücrelerinde ve korpus luteumlardaki luteal hücrelerde *Yap1*'in, *Cyp19a1* aracılı susturulması over morfolojisine ve fertiliteye etki etmez. Bazı çalışmalar göstermiştir ki YAP1, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), gonadotropin ve TGF- β sinyal yollarıyla etkileşime girerek granüloza hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve canlılığını düzenler. YAP1 granüloza hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında kritik bir düzenleyicidir (81).

2.3.2. TEAD3

Transkripsiyon arttırıcı faktörler (TEF) olarak bilinen TEAD transkripsiyon faktörleri ilk olarak 1987 yılında Xiao ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Başlangıçta SV40'a ait B1 alanına bağlanabilen ve geçiş pozitif etki eden güçlendiriciler olarak görev yapan nüklear proteinler olarak açıklanmışlardır (57). Daha sonra TEAD1'in, insan papilloma virüsü (HPV-16)'ya bağlandığı ve HPV-16'nın E6 ve E7 isimli onkogenlerini aktive ettiği belirlenmiştir (58). TEAD ailesi evrim sırasında yüksek düzeyde korunmuş olan ve neredeyse tüm ökaryotlarda homologları bulunan transkripsiyon faktörleridir (59). Yine de TEAD ailesi üyelerinin her birinin farklı ekspresyon paterni göstermesi her bir üyenin eşsiz bir görevinin olduğuna işaret eder (60,61).

Gelişimsel dönemde TEAD proteinleri iki hücreli embriyo evresinden itibaren eksprese olmaktadır (82). İnsan genomu dört farklı TEAD

transkripsiyon faktörü içermektedir (TEAD1,2,3,4). TEAD genlerinin fizyolojik fonksiyonları, fareler üzerinde yapılan gen inaktivasyon çalışmalarıyla aydınlatılmıştır. TEAD1'in tamamen mutasyonu embriyolarda ölümcül kalp defektlerine yol açmıştır. Bu nedenle TEAD1'in bir kısım kardiyak genin ekspresyonunu uyardığı ve miyokardın oluşumu için gerekli olduğu söylenebilir. Ayrıca TEAD1 kardiyak kasların farklılaşmasını değil sadece büyümesini etkilemiştir. Bu nedenle TEAD1 embriyonik kalbin maturasyonunda görev almaktadır (83). TEAD2 inaktivasyonu sonrası bir kısım araştırmacı nöral tüp kapanma bozukluklarının artmış oranda görüldüğünü bildirmiştir (84).

TEAD3 ya da diğer adıyla TEF5, siklin ve siklin bağımlı kinazlar gibi proliferasyon ilişkili genlerin transkripsiyonunu tetikleyen transkripsiyon artırıcı faktör ailesinin üyelerinden biridir. Hücre siklüsünün ilerlemesinde, DNA metilasyonunda, kanser gelişiminde ve ilaç direnci gelişmesinde rolü bulunmaktadır (85,86). Plasentada baskın olmak üzere hemen hemen her dokuda eksprese olmaktadır. TEAD3'ün, insanlarda, karaciğerde androstenedionun yıkımında görevli olan 3 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz'ın regülasyonunda görev aldığı bildirilmiştir (87).

TEAD4, trofoektodermin oluşumunda rolü bulunur, plasantanın bir prekürsörüdür. Bu nedenle TEAD4'ün susturulması ile embriyonun endometriuma tutunması bozulur. Fakat implantasyon sonrası dönemde embriyonun gelişimi normal olarak devam eder. Bu da TEAD4'ün trofoektoderme spesifik olduğunu göstermektedir (88,89).

TEAD proteinleri tek başına gen ekspresyonunu uyarmada yetersizdir ve transkripsiyonel potansiyellerini açığa çıkarmalarına yardım eden ek koaktivatörlere ihtiyaç duyarlar. Koaktivatörler, DNA'ya doğrudan bağlanamazlar fakat transkripsiyon süreçlerini aktive etmek için transkripsiyon faktörlerine bağlanabilirler. TEAD ailesi üyelerini aktive eden YAP ve onun paralogu TAZ, Vestigial benzeri aile üyesi 4 (vgll) proteinleri ve p160 ailesi gibi nüklear reseptör koaktivatörleri tanımlanmıştır (90). Hippo sinyal yolağının devamı açısından TEAD, YAP ile birleşen anahtar transkripsiyon faktörü olup N-terminali ile DNA'ya bağlanırken, C-terminali ile

YAP'a bağlanmaktadır (91). YAP, apoptozu inhibe ederek proliferasyonu uyarmak için ilgili genlerin ekspresyonunu TEAD yoluyla sağlar (92). TEAD proteinleri, YAP ve TAZ'ın kontakt inhibisyon, epitelyal-mezenkimal transizyon, transformasyon, apoptoz inhibisyonu ve trofoektoderm gelişimi gibi birçok aktivitesi için gereklidir (80,93).

2.3.3. TP73

p53 ailesinin üyeleri hücre siklus regülasyonu, transaktivasyon ve DNA hasarına cevaben apoptozun gerçekleştirilmesi gibi pek çok önemli süreçte rol oynamaktadırlar (94). Bu önemli görevlerinin yanında insan üremesiyle ilişkili de birtakım görevleri bulunmaktadır (95,96). p73, p53 ailesinin üyelerinden biridir. Kromozom 1p36'da lokalize olmaktadır. Diğer üyeler olan p53 ve p63 ile birlikte hücre siklusu kontrolünde, DNA onarımında, apoptozda, adezyonda, organ gelişiminde ve hücre farklılaşmasında görev alırlar (97–99). Transaktivasyon ve DNA bağlanma alanlarında yüksek oranda yapısal benzerlik gösterirler (100). P53'ün aksine, p63 ve p73 farklı varyantları kodlayan iki ayrı promoterden transkribe olur.

p73 delesyonlu farelerde, cücelik, kısırlık, erken yaşlanma, tümör insidansında artış, hipokampal bozukluk ve hidrosefali, sil oluşumunda bozukluk, akciğerlerde, sinüs ve kulaklarda kronik enfeksiyon ve inflamasyon görülmektedir (101,102). p73 delesyonlu erkek farelerde DNA hasarı ve spermatogonial hücrelerde apoptoz artışı görülürken, p73 delesyonlu dişi farelerde oosit maturasyonu sırasında mayotik içcik oluşumu ve ovulasyonda bozulma görülmektedir (103,104). Bunların yanı sıra p73'ün folikül havuzunun büyüklüğünün korunmasında, ovulasyon hızı ve oosit kalitesi üzerinde önemli etkisinin bulunduğu belirtilmiştir (96,104). p73'ün kaybı defektif folikül gelişimine, ovulasyon hızında ve korpus luteum oluşumunda azalmaya yol açarak dolaşımdaki progesteron seviyelerinin düşmesine neden olmaktadır. p73, folikül maturasyonunu uyaran granüloza hücreleri arasındaki bazal lamina yapısında ve hücre adezyonu ve migrasyonunda görev alan anahtar genlerden biridir. p73 granüloza hücrelerinde eksprese olurken teka hücrelerinde eksprese olmaz (105).

TAp73^{-/-} delesyonlu oositlerin kromozomal iplikçiklerinde, çok kutuplu olma, iplikçikler arası gevşeme ve yanlış hizalanma gibi ciddi düzeyde anormallikler görülmüştür. TAp73^{+/+} ve TAp73^{-/-} olan oositlerin gelişimsel yeterlilikleri karşılaştırıldığında fertilizasyon hızları aynı bulunurken, TAp73^{-/-} oositlerden oluşan zigotların sadece %28'i blastosist aşamasına gelebilmiştir. TAp73^{+/+} oositlerden gelişen zigotlarda ise bu oran %75 olarak bulunmuştur. TAp73^{-/-} oositlerden elde edilen embriyoların çoğunluğu klevaj sırasında arreste uğramış bu nedenle çok çekirdekli blastomerlerin ve anormal hücre sayısına sahip düşük kaliteli blastosistlerin oluşması ile sonuçlanmıştır. Eksikliğinde implantasyon öncesi dönemde olan embriyonun gelişiminde yetersizliğe yol açtığı için p73, anneden gelen öldürücü etkisi olabilen bir gendir. İnfertiliteye ek olarak TAp73^{-/-} farelerin beyinlerinde hipokampal disjenezi, nöral doku kaybı ve ventrikül genişlemesi tespit edilmiştir (104).

p73, çekirdekte YAP ile birleşerek *puma* ve *p53* gibi hücrenin ölümünü uyarır. YAP'ın proapoptotik ve antiapoptotik etkilerinin ikisi de Hippo sinyal yolağı'nın esas düzenleyici elemanlarının kontrolü altındadır (106).

2.4. MikroRNA'lar

MikroRNA'lar (miRNA) 18-24 baz uzunluğunda, protein kodlamayan ancak mRNA'ların degradasyonunu veya translasyonunu baskılayarak gen regülasyonunda görev alan küçük endojen RNA molekülleridir (107). Hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizması ve apoptozis gibi birçok biyolojik süreçte görevleri vardır. Memeli genomlarında, kodlayıcı genlerin intron kısımlarından kaynaklanırlar ve mRNA translasyonunu inhibe ederek ya da mRNA degradasyonunu post-transkripsiyonel aşamada düzenleyerek gen ekspresyonunu modüle ederler (108,109).

2.4.1. MikroRNA'ların Keşfi

MiRNA'lar ilk olarak 1993 yılında, *Ceanorhabditis elegans* adlı nematod larvasında, gelişimsel öneme sahip lin-4 geninin larval dönemin gelişimini düzenleyen başka bir gen olan lin-14'ün ekspresyonunu baskılayıcı rolünün gösterilmesi ile bulunmuştur (110). Bu keşiften 7 yıl sonra, *C. elegans*'ta ,

gelişimin zamansal kontrolünde etkili kısa RNA kodlayan, lin-41 geninin 3' UTR bölgesinde iki farklı yere komplementer olan let-7 geni bulunmuştur (111). Zaman içerisinde let-7 geninin farklı türlerde de tespit edilmesiyle kodlanmayan RNA'lar aracılığıyla gerçekleşen gen ekspresyon regülasyonunun diğer organizmalarda da önemli olabileceği yönünde çalışmalara başlanmıştır (109,112).

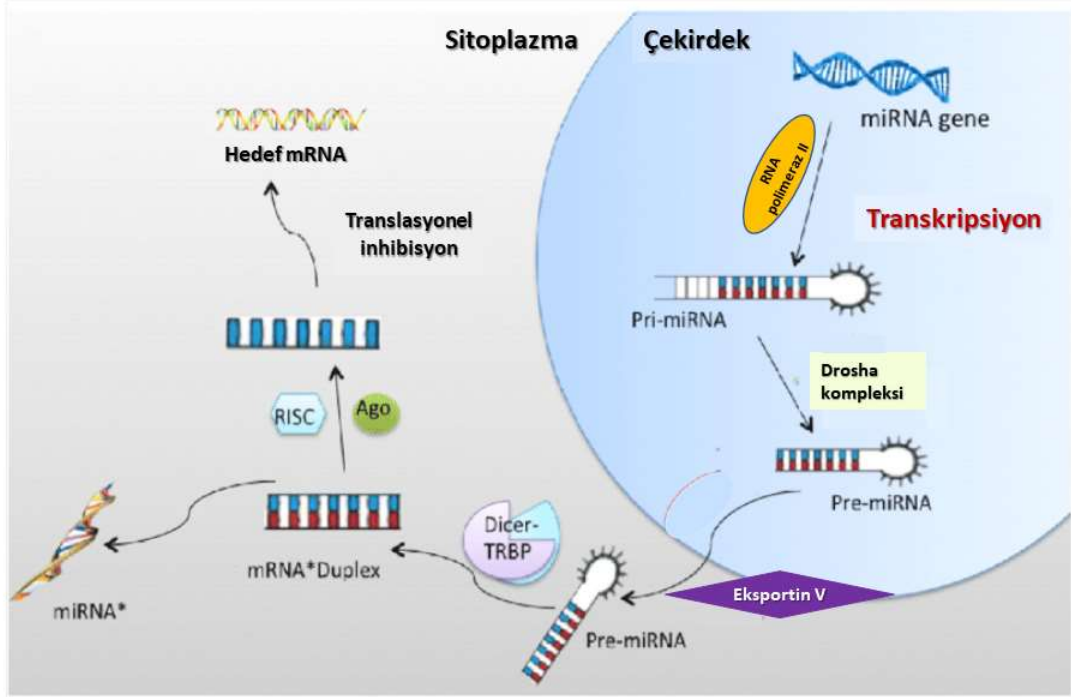
2.4.2. MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'ların biyosentezi 3 aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)'ların transkripsiyonu, oluşan pri-miRNA'ların çekirdekte prekürsör miRNA'lara (pre-miRNA) dönüşümü ve son olarak da olgun miRNA'ların sitoplazmada oluşturulması şeklindedir (113).

500-3000 baz uzunluğunda olan, bir şapka (cap) ve kuyruk'tan (poli A) oluşan pri-miRNA'lar RNA polimeraz II tarafından sentezlenir. Drosha adı verilen RNAaz III enzim ailesine ait bir endonükleaz ve kofaktörü Di George sendromu kritik bölge 8 (DGCR8), mikroişlemci kompleks adı verilen bir yapı oluşturur. Bu kompleks tarafından pri-miRNA çekirdekte pre-miRNA'ya dönüştürülür. Pre-miRNA'lar yaklaşık 70 baz uzunluğundadır. Drosha ve DGCR8'den bağımsız olarak sentezlenen miRNA'lar da bulunmaktadır ve mirtronlar ismini almaktadırlar. Bunlar, kodlayan genlerin intronlarında lokalizedirler ve splicing ile pre-miRNA'ların oluşumunu sağlarlar (114–116).

Pre-miRNA'lar, Eksportin 5 ve GTP'ye bağlanan nükleer protein (RAN-GTP) aracılığıyla sitoplazmaya taşındıktan sonra, burada Dicer adı verilen RNAaz III enzim ailesine ait bir endonükleaz ve kofaktörü transaktivasyon yanıt elemanı RNA bağlayıcı protein (TRBP) ile yaklaşık 18-24 baz uzunluğunda kesilerek çift zincirli miRNA'lara dönüştürülür. Bu sırada Dicer tarafından RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) oluşumu da başlatılır. RISC içerisinde yer alan argonat (AGO) isimindeki RNAaz ile çift iplikli miRNA'ların daha kararlı olan ipliği seçilerek komplekse dahil edilir. Bu iplik kılavuz iplik adını alırken diğerine anti-kılavuz ya da yolcu iplik adı verilir ve substrat olarak kullanılır. RISC kompleksine katılan mikroRNA'lar, AGO

proteinleri aracılığıyla mRNA'ların degradasyonunda ve translasyonun baskılanmasında görev alırlar (117–120).



Şekil 15. miRNA biyogenezi (121)

Çekirdekte ilgili genden RNA polimeraz II ile pri-miRNA transkribe edilir. Drosha ribonükleaz III enzimi pri-miRNA'yı keserek sap-ilmik yapısındaki pre-miRNA'ya dönüştürür. Daha sonra Dicer ribonükleaz tarafından sitoplazmada ilmik kısmı uzaklaştırılarak matür miRNA oluşturulur. Elde edilen miRNA, Ago ve RISC kompleksine dahil olarak hedef mRNA'nın translasyonel inhibisyonuna neden olur.

2.4.3. MikroRNA'ların Etki Mekanizması

MiRNA'ların mRNA degradasyonunu gerçekleştirmesi ya da mRNA'ları translasyonel baskılaması birkaç yolla olmaktadır:

- * mRNA'nın 3' ucundaki poli A kuyruğu miRISC'in bağlanması ile deadenile olur ve işlemci cisimler (p-body) içinde depolanır veya yıkılır.
- * miRISC ile bağlanan mRNA'nın şapka yapısı değişerek

translasyonun başlaması engellenir.

* miRISC'in mRNA'ya bağlanması sonrası protein sentezi esnasında oluşmuş olan polipeptid zinciri yıkılır.

* miRISC'in mRNA'ya bağlanması sonrası ribozomların mRNA'dan ayrılmasına ve protein sentezinin yavaşlamasına neden olur (122,123).

2.4.4. MikroRNA'ların Fonksiyonu

MiRNA'lar organizmaların gelişimi, hücre farklılaşması, proliferasyonu, apoptozu, hormon sekresyonu, nörotransmitter sentezi, sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, immün cevap, üremenin kontrolü gibi hücresel olaylarda rol almaktadırlar. Yine miRNA'ların kanser de dahil pek çok hastalığın patogeneğinde yer aldıkları ve hedefledikleri gene göre onkogen veya tümör süpresör olarak görev aldıkları gösterilmiştir. Farklı kanser türlerinde farklı ekspresyon profiline sahip olmaları miRNA'ların tanı ve tedavi takibi amacıyla kullanılabileceğini göstermektedir (124).

MiRNA'lar hücre bölünmesi, farklılaşması, mayoz ve apoptoz gibi çeşitli hücresel olayların düzenleyicisidirler (125). Over dokularında, gonadal gelişim, steroidogenez, ovulasyon ve korpus luteum oluşumunda görevlidirler (126).

2.4.4.1. MikroRNA'ların Ovulasyondaki Roller

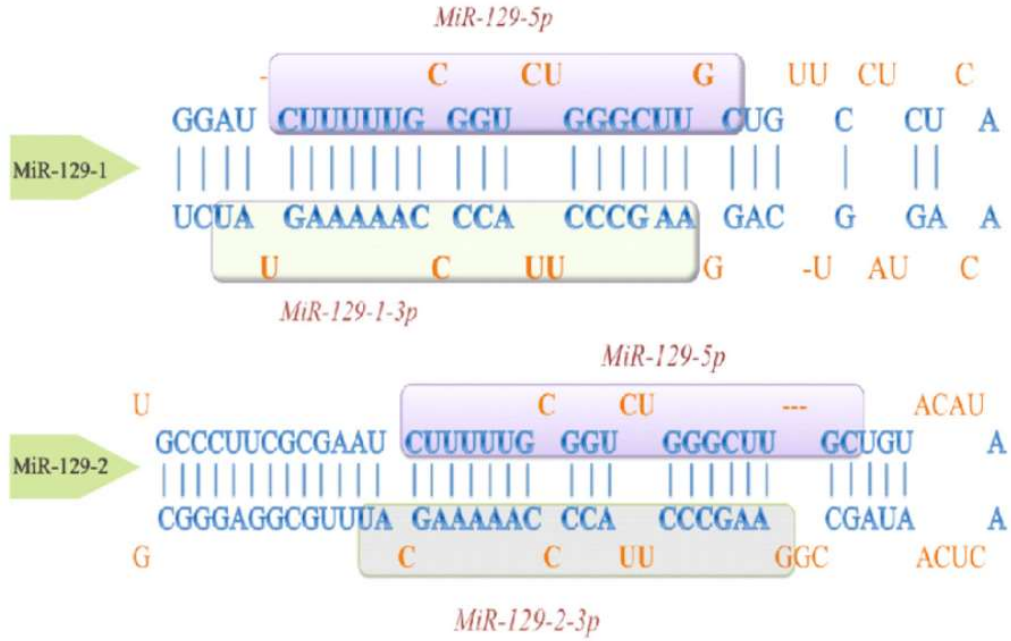
MiRNA'ların ekspresyonu steroidogenez, folikülogenez ve oosit maturasyonu gibi over fonksiyonlarla yakından ilişkilidir. miRNA'ların over dokusundaki rolü ilk olarak Dicer1'i olmayan farelerle normal farelerin karşılaştırıldığı bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada deney grubu farelerin korpus luteumlarında anjiyonenez azalmış ve bu da infertiliteye neden olmuştur (127). Daha sonra yapılan bir çalışmada McBride ve arkadaşları koyun östrus siklusunun farklı dönemlerinde farklı küçük RNA'ların eksprese göstermişler ve foliküler-luteal geçişteki miRNA'ları tanımlamışlardır (128).

2.4.5. Mir-129-5P

MiRNA'lar, çok hücreli organizmalarda mRNA-miRNA tranlasyonunu ve stabilitesini etkileyerek gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel olarak düzenlenmesini sağlayan küçük kodlayıcı olmayan RNA molekülü ailesinin bir üyesidir. Mir-129, mir-129-1 ve mir-129-2 olmak üzere iki genden köken almaktadır. Matür mir-129; mir-129-5p, mir-129-1-3p ve mir-129-2-3p'yi içermektedir. Mir129-1 kromozom 7q32.1'de bulunurken; mir-129-2, kromozom 11p11.2'de yer almaktadır ve her ikisi de aynı "UUUUUGC" sekansını paylaşırlar (129). Mir-129-1, matür olan mir-129-5p ve mir-129-1-3p'nin; mir-129-2 ise matür olan mir-129-5p ve mir-129-2-3p'nin öncülüdür. Pre-miRNA'nın hangi zincirinden köken alıyorsa o şekilde isimlendirilirler. Mir-129-5p, mir-129'un ana ürünü ve fonksiyonel formudur (130).

Accession number	MIMAT0000209
ID	mmu-miR-129-5p
Previous IDs	mmu-miR-129
Stem-Loop	mmu-mir-129-1 mmu-mir-129-2
Sequence	cuuuuugcggucugggcuugc

Şekil 16. miR129-5p sekansı (131)

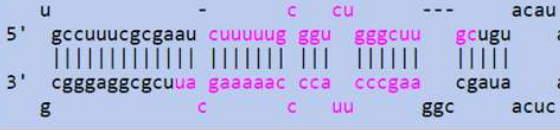


Şekil 17. Matür mir-129'un sekansları (121)

Matür mir-129 zincirin yapıldığı kısma göre isimlendirilir. 5' ucundan sentezlenen mir-129-5p'ler aynı sekansa sahiptir.

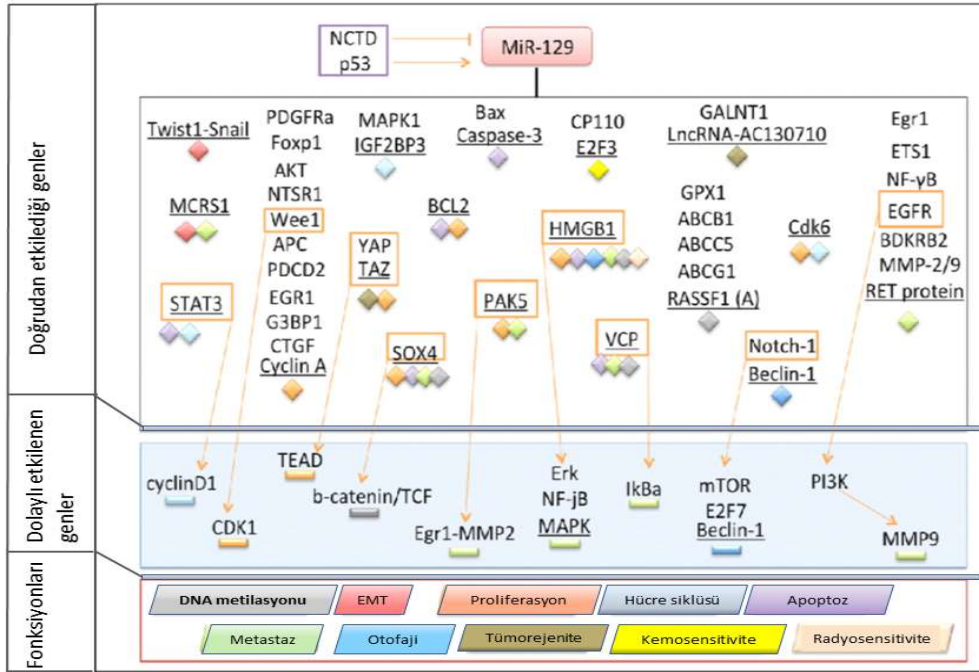
Accession	MI0000222 (change log)
Previous IDs	mmu-mir-129b
Symbol	MGI:Mir129-1
Description	<i>Mus musculus</i> miR-129-1 stem-loop
Gene family	MIPF0000073; mir-129
Literature search	52 open access papers mention mmu-mir-129-1 (511 sentences)
Stem-loop	

Şekil 18. miR129-5p sekansının halkasal yapısı-1 (131)

Accession	MI0000585 (change log)
Symbol	MGI:Mir129-2
Description	Mus musculus miR-129-2 stem-loop
Gene family	MIPF0000073; mir-129
Literature search	 58 open access papers mention mmu-mir-129-2 (610 sentences)
Stem-loop	

Şekil 19. miR129-5p sekansının halkasal yapısı-2 (131)

Çeşitli kanserlerde mir129'un yer aldığı kromozom olan 7q32'nin delesyonunun bulunması oldukça dikkat çekicidir. Nitekim yapılan çalışmalarda mir-129'un azalmış seviyeleri gastrik kanser, kolorektal kanser, özefagusun squamöz hücreli kanseri, mesane kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, glioma, meme kanseri, hepatosellüler karsinom ve osteosarkom gibi kanserin birçok tipi ile ilişkili bulunmuştur (132–137). Bu anlamda 129-5p önemli bir tümör süpresördür ve ekspresyonundaki artış kanser hücrelerinin proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu ciddi ölçüde azaltır (132). Mir-129-5p aynı zamanda, kanser patogenezinde de rolü bulunan hippo yolağı elemanlarından YAP ve TAZ ekspresyonunu, TEAD transkripsiyonunun inaktivasyonu yoluyla baskılamaktadır (138). Yine aynı yolağın elemanlarından CTGF ve siklin D1'i APC üzerinden downregüle etmektedir (139).



Şekil 20. MiR-129'un moleküler etkileşimleri (121)

MiR-129'un direkt ve dolaylı olarak etkilediği genler ve fonksiyonları şematize edilmiştir (Her bir renk, bir fonksiyona karşılık gelmektedir).

Hücre proliferasyonunda rol alır ve hücre büyümesindeki etkileşimler arasında dengenin sağlanmasında önemlidir (121). MiR-129-5p'nin ekspresyonundaki artış, Bcl-2'in downregülasyonunu, Bax'ın upregülasyonunu ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu uyarak apoptozu ve aynı zamanda da otofajiyi indükler (140–142). Y. Zhang ve arkadaşları ilk defa akciğer kanseri dokularında ve hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda mir-129-5p'nin, kanser hücrelerinin invazyonunu ve proliferasyonunu vimentin ve MCRS1 ekspresyonunu azaltıp, E-kaderin ekspresyonunu arttırarak sınırladığını bulmuşlardır (143). MiR-129-5p, nükleer laminanın ana bileşenlerinden olan ve çekirdeğin mekanik olarak stabilitesini sağlayan Lamin A'nın ekspresyonunu bozarak onkogen olarak rol almaktadır (144).

Yakın tarihte Sirotkin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada mir-129'un granüloza hücrelerinden progesteron, östradiol ve testosteron üretimini inhibe ettiğini bulmuşlardır. Bu anlamda mir-129'un reproduktif süreci baskılayan ve atreziyi tetikleyen bir rolünün olabileceği öne sürülmüştür (145).

2.4.6. MiR-145-5P

Mir-145'in lokalizasyonu kromozom 5q32'de bulunmakta olup tümör gelişimi, metastazı ve anjiyogenezi ile ilgili onkogenleri hedefler. İnsanlarda, mezoderm kaynaklı olan uterus, over, testis, prostat ve kalp gibi dokularda bulunmaktadır (146).

Accession number	MIMAT0000437
ID	hsa-miR-145-5p
Previous IDs	hsa-miR-145
Stem-Loop	hsa-mir-145
Sequence	guccaguuuuuccaggaaucccu

Şekil 21. miR-145-5p sekansı (147)

Accession	MI0000461 (change log)
Symbol	HGNC:MIR145
Description	<i>Homo sapiens</i> miR-145 stem-loop
Gene family	MIPF0000079; mir-145
Literature search	 668 open access papers mention hsa-mir-145 (4188 sentences)
Stem-loop	<pre> c u u c uc u c uagau 5' acc ug ccuca gg cagu uu ccaggaaucccu g 3' ugg ac ggagu uc guca aa gguccuuagggg u u u u - uu u a uagaa</pre>

Şekil 22. miR-145-5p sekansının halkasal yapısı (147)

Mir-145'in, p73'ün transkripsiyonel hedefi olduğu ve tümör progresyonunda, anjiyogenezde, metastazda, epitelyomezenkimal geçişte rolü olduğu bilinmektedir (148).

Mir-145-5p'nin hücre büyümesi, proliferasyonu ve apoptozu üzerinde etkileri vardır ve birçok kanserde tümör süpresör gen olarak görev almaktadır (149). Gastrik kanserli dokularla normal mide dokularındaki mir-145-5p düzeylerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, kanserli dokuda daha az seviyede bulunduğu ve düşük ekspresyon seviyelerinin lenf nodu metastazı, uzak organ metastazı dolayısıyla da yaşam surveyi üzerine etkisinin bulunduğu gözlenmiştir (150). Başka bir çalışmada ekspresyonundaki artışın küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçişi baskıladığı gösterilmiştir (151). Mir-145'in artmış ekspresyon düzeyinin endo-ektoserviksteki azalmış hücre sayısı, intrinsik apoptoz yolağının aktivasyonu, hücre siklusunda arrest ile ve adherens junction proteinlerindeki azalma ile ilişkisi bulunmaktadır (152).

Mir-145, onkojenik özellikleri de bulunan pluripotensi faktörleri Oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4), cinsiyet belirleyici Y bölgesi transkripsiyon faktörü-2 (SOX2), SOX9 ve Kruppel benzeri faktör 4 (KLF4)'ün ekspresyonlarını düzenler (153). Mir-145-5p artışı, hippo yolağı elemanlarından olan SOX2 ekspresyonunu baskılayarak prostat kanseri hücrelerinde proliferasyonu inhibe eder (154). Ayrıca mir-145-5p'nin düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskılayabildiği ve hücre farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir (155).

Over kanser hücreleri ile normal over yüzey epitelindeki miRNA'ların karşılaştırıldığı bir çalışmada kanserli hücrelerde mir-145-5p'nin downregüle olduğu ve hippo yolağı elemanlarından CTGF üzerinde negatif düzenleyici etki göstererek, over kanserinde prognoz göstergesi olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (156). Yine hippo yolağı elemanlarından ve intrinsik apoptoz yolağı inhibitörlerinden olan BIRC5'in ekspresyonu mir-145'in artışı ile inhibe olmakta bu da apoptozu aktive etmektedir (152). Daha önce yapılan bir çalışmada kümülüs hücrelerindeki mir-145-5p ekspresyonunun oosit maturasyonu ile negatif korelasyon gösterdiği ve ovaryan fonksiyonların

düzenlenmesinde görevli olabileceği belirtilmiştir (157). Aynı çalışmada mir-145-5p ekspresyon seviyesindeki azalmanın kümülüs hücrelerinde apoptozu azaltarak oositin gelişimine katkı sağlıyor olabileceğine vurgu yapmışlardır (157). Yapılan başka bir çalışmada da mir-145-5p'nin foliküler-luteal geçişte önemli rol oynadığı düşünülmüştür (158).



III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 29.01.2019 tarihli, 77.637.435 no'lu onayı alındı. Çalışmada kullanılan incelemeler için gerekli malzemeler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2019-028 no'lu proje'den temin edilen gelir ile desteklendi.

Çalışmada Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 18 adet 6-8 haftalık genç-erişkin Balb/c cinsi fareler kullanıldı. Fareler 24 ± 1 °C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık/karanlık siklusü gözetilerek, günde 1 kez temizlenen kafesler içerisinde, ad libitum beslenmeye bırakıldı. Karantina uygulanmadı.

3.1. Farelerde Östrusun Belirlenmesi

Çalışmamızda 6-8 haftalık Balb/c cinsi dişi fareler kullanıldı. FSH enjeksiyonu öncesi östrus siklusünde bulunan hayvanların tespiti için vajinal sürüntü örnekleri alındı. Bunun için öncesinde handling yapılarak hayvanların minimal strese maruz kalması amaçlandı. Sürüntü almak amacıyla fareler baş ve işaret parmaklarıyla ensesinden kavranarak kuyruğu dördüncü ve beşinci parmağın arasından geçirilip tek elle uygun pozisyonda tutuldu. Vajinal sürüntü almak için fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile nemlendirilmiş pamuklu kulak temizleme çubukları kullanıldı. Nemli çubuk, vajinadan yaklaşık 5 mm kadar içeriye sokularak nazikçe 3-5 kere yıkandı. Sonrasında elde edilen materyal rhodajlı lamlara sürüldü ve havada kurumaya bırakıldı. Her hayvan için ayrı pamuklu çubuk ve lam kullanıldı. 10x ve 40x objektifler kullanılarak ışık mikroskopunda hücreler incelendi. Hücre tiplerine göre proöstrus evresinde olan fareler (no:18) deneyde kullanılmak üzere ayrıldı.

3.2. Kan ve Dokuların Eldesi

Proöstrus dönemindeki fareler deney, sham ve kontrol olmak üzere rastgele 3 gruba ayrılarak, deney grubuna (n:6) her 12 saatte bir toplamda 4 doz olmak üzere sırasıyla 10 IU/ml, 10 IU/ml, 5 IU/ml, 5 IU/ml FSH intraperitoneal olarak enjekte edilirken; sham grubu farelere (n:6) aynı saat aralıklarında ve aynı miktarlarda sadece serum fizyolojik (SF) enjekte edildi. Kontrol grubuna (n:6) ait farelere hiçbir işlem uygulanmadı. İlk enjeksiyondan 48 saat sonra farelerin 10 mg/kg ksilazin ve 75 mg/kg Ketamin ile genel anestezileri sağlandı. Klemple ayak içlerine bastırarak ağrı refleksi kontrol edildi, refleks kaybolduğunda anestezinin derinliğinden emin olundu. Deney levhasına sabitlenen deneklerin göğüs boşluğu açıldı. Steril insülin enjektörü ile kardiyak kanları alınarak ötenazileri gerçekleştirilen farelerin kanları (500 µl-1 cc) mor kapaklı hemogram tüplerine aktarıldı. Sonrasında batin bölgesi cilt, cilt altı geçilerek açıldı. Uterin hornlar takip edilerek ovaryumlar bulundu. Doku takibi amacıyla her deneğin sağ ovaryumu alındıktan hemen sonra %10'luk formalin bulunan kaplar içerisine aktarıldı. PCR amacıyla her deneğin sol ovaryumu alındıktan hemen sonra, içerisine HEPES konulan platelere aktarılarak, mezovaryumu 37 °C'de ısıtmalı tabla üzerinde diseksiyon mikroskobu (Olympus mikroskop, SZX7) altında insülin enjektörü yardımıyla sıyrılarak temizlendi ve içerisinde PBS bulunan 1,5 ml.'lik steril ependorflara konuldu. Dokular 2000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Daha sonra analiz edilmek üzere bekletmeden -80 °C'ye kaldırıldı.

Alınan kanları içeren tüpler 2000 RPM'de beş dakika santrifüj edilerek üstte kalan plazma kısmı mikropipet ile steril 1,5 ml.'lik ependorflara aktarılarak daha sonra analiz edilmek üzere -80 C'ye kaldırıldı.

3.3. Histolojik Analiz

3.3.1. Doku Takibi

Dokuların bulunduğu kaplar içerisindeki formalin 24 saat sonra yenilenerek toplam 48 saat süresince tespit edildi. Akarsuda formalinden kurtarıldıktan sonra örnekler, derecesi artan alkol (Sigma-Aldrich, St Louis,

USA) serilerinden geçirilip dehidratasyon süreci tamamlandıktan sonra ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) içerisinde şeffaflaştırıldı. Takiben parafine (Surgipath, Cambridgeshire, UK) gömülerek blok haline getirildi (tablo). Parafin bloklardan mikrotom (RM 2135, Leica) ile yaklaşık beş µm kalınlığında kesitler alınarak her bir lizimli lama 2-3 tane olacak şekilde aktarıldı.

Tablo 1. Doku takibi protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
A. FİKSASYON	%10 FORMALİN	24-48 SAAT
B. DEHİDRATASYON	%60 ALKOL	30 DAKİKA
	%70 ALKOL	30 DAKİKA
	%80 ALKOL	30 DAKİKA
	%100 ALKOL	60 DAKİKA
	%100 ALKOL	60 DAKİKA
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL: KSİLEN (1:1)	30 DAKİKA
	KSİLEN I	60 DAKİKA
	KSİLEN II	60 DAKİKA
D. İNFİLTRASYON	KSİLEN: PARAFİN (1:1)	30 DAKİKA
	PARAFİN I	60 DAKİKA
	PARAFİN II	60 DAKİKA
E. GÖMME	PARAFİN	

3.3.2. Hematoksilen & Eozin Boyaması

Alınan beş µm'lik parafin kesitler, bir gece 60°C'lik etüvde bekletildikten sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ile kimyasal deparafinizasyon yapıldı. Ardından rehidratasyon işlemi için kesitler %95'den %60'a azalan alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) serilerinden geçirildikten sonra beş dakika akan su altında bekletildi. Kesitler beş dakika hematoksilen (Invitrogen, Paisley, UK) ile boyadıktan sonra, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için beş dakika akan suda bekletildi. Asit-alkole batır çıkar yapıldıktan sonra beş dakika akar su altında yıkandı. Üç dakika eozin (Surgipath, Cambridgeshire, UK) ile boyandıktan sonra beş dakika akan su altında yıkama yapıldı. Sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilerek havada kurutuldu. Son olarak 30 dakika ksilende bekletildikten sonra kesitler entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany) kullanılarak lamel ile kapatıldı (tablo). Işık mikroskopunda (Olympus X-40) incelenip gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 2. Hematoksilen & Eozin Boyaması Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
%80 ALKOL		2 DAKİKA
%70 ALKOL		2 DAKİKA
%60 ALKOL		2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
%80 ALKOL		1 DAKİKA
%95 ALKOL		1 DAKİKA
	HAVADA	1-2 DAKİKA
KURUTMA		
KSİLEN		30 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

3.3.3. İmmunohistokimya

Alınan beş µm'lik parafin kesitler, bir gece 60°C'lik etüvde bekletilip, 30'ar dakika iki değişim ksilen (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ile kimyasal deparafinizasyon yapıldıktan sonra indirekt avidin-biyotin yöntemi ile immunohistokimya protokolüne başlandı. Ardından rehidratasyon işlemi için kesitler %95'den %60'a azalan alkol (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) serilerinden geçirilip rehidrate edilerek 10 dakika distile suda bekletildi. Etrafı hidrofobik özellikli doku kalemi (pappen) ile sınırlandırılan dokular üzerine pipetle tripsin (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) damlatılarak 37 °C sıcaklığındaki etüvde 10 dakika bekletildi. PBS ile üç defa beşer dakika yıkanan dokulara endojen peroksidazı inhibe etmek amacıyla %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) (Merck, Darmstadt, Germany) beş dakika uygulandı. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkanan dokular, bloklama amacıyla bir saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar anti-YAP1 (dilüsyon oranı:1/50) (PA1-46189; ThermoFisher Scientific), anti-TEAD3 (dilüsyon oranı:1/500) (PA5-41447; ThermoFisher Scientific), anti-p73 (dilüsyon oranı:1/500) (PA5-80175; ThermoFisher Scientific), anti-Bax (dilüsyon oranı:1/100) (NBP1-28566, NovusBio), anti-kaspaz3 (dilüsyon oranı:1/100) (SC-7148, Santa Cruz) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile üç defa beşer dakika yıkanan kesitler, biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz poliklonal sekonder antikor (kat.no:85-9043, Histostain Plus Bulk Kit; Invitrogen, Paisley, UK) ile 30'ar dakika muamele edildi. Üç defa beşer dakika PBS ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB Plus Substrate Kit; Invitrogen, Paisley, UK) ile beş dakika boyandı. Ardından Mayer's hematoksilen (ScyTek Laboratories, Logan, Utah, USA) ile bir dakika muamele edilip art alan boyaması yapıldıktan sonra distile su ile üç defa beşer dakika yıkanan dokuların üzeri entellan (10-20/21; Merck, Darmstadt, Germany) kullanılarak lamelle kapatıldı (Tablo 3). Dokular ışık mikroskopunda (Olympus X-40) incelenip, her bir grup için rastgele seçilen 10 alandan 100'er hücre sayılarak, hücrelerin boyanma şiddetlerine göre 0-3 arası (0-boyanma yok, 1-az, 2-

orta, 3-çok) skorlamaları yapıldı (H-skor). Değerler istatistiksel olarak analiz edildi, fotoğrafları çekildi.

Tablo 3. İmmunohistokimya protokolü.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%95 ALKOL	2 DAKİKA
%80 ALKOL		2 DAKİKA
%70 ALKOL		2 DAKİKA
%60 ALKOL		2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA

Hidrofobik kalemle dokuların etrafının çizilmesi

TRİPSİN		37°C ETÜVDE 10 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
%3'LÜK HİDROJEN PEROKSİT		5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3x5 DAKİKA
BLOKLAMA	NON-İMMUN BLOKLAMA SOLÜSYONU	60 DAKİKA
PRİMER ANTİKOR		+4°C'de NEMLİ ORTAMDA

18 SAAT

YIKAMA PBS 3x5 DAKİKA

BİOTİNLENMİŞ SEKONDER ANTİKOR 30 DAKİKA

YIKAMA PBS 3x5 DAKİKA

STREPTAVİDİN 30 DAKİKA

YIKAMA PBS 3x5 DAKİKA

BOYAMA DAB 5 DAKİKA

YIKAMA PBS 1x5 DAKİKA

YIKAMA DİSTİLE SU 3x5 DAKİKA

ART-ALAN BOYAMA MAYER'S
HEMATOKSİLEN 1 DAKİKA

YIKAMA DİSTİLE SU 3x5 DAKİKA

%80 ALKOL 1 DAKİKA

%90 ALKOL 1 DAKİKA

KURUTMA HAVADA 1-2 DAKİKA

KSİLEN 30 DAKİKA

KAPAMA ENTELLAN

3.4. RNA İzolasyonu

3.4.1. Kandan miRNA İzolasyonu

Elde edilen plazmaların miRNA izolasyonu miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Kat no-217204) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda şu şekilde yapıldı: 2 ml.'lik mikrosantrifüj tüplerine her bir örnekten 200'er µl plazma aktarıldıktan sonra üzerlerine 60'ar µl buffer RPL eklenerek tüplerin kapakları kapatıldı ve altı dakika vorteks ile karıştırıldı. Oda ısısında 3 dakika beklendikten sonra üzerlerine 20'şer µl RPP buffer eklenerek, 30 saniye vorteks ile karıştırıldı ve tekrar oda ısısında 3 dakika inkübe edildi. Sonrasında oda ısısında 12000 g.'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı (~230 µl) mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı üzerine 1 birim isopropanol eklenerek vortekslendi. Örnek Rneasy UCP MinElute spin kolona aktarıldı. 8 000 g.'de 15 saniye santrifüjlenerek membrandan alta geçen sıvı kısım atıldı. Spin kolona 700 µl Buffer RWT eklenerek 8 000 g.'de 15 saniye santrifüjlendi. Membrandan alta geçen sıvı kısım atıldı. Spin kolona 500 µl Buffer RPE eklenerek 8 000 g.'de 15 saniye santrifüjlendi. Membrandan alta geçen sıvı kısım atıldı. Spin kolona 500 µl %80 etanol eklenerek 8 000 g.'de 2 dakika santrifüjlendi. Membrandan alta geçen sıvı kısım atıldı. Spin kolonun kapağı açılarak 2ml.'lik yeni toplama tüplerine yerleştirildi. 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu şekilde spin kolonun membranının kuruması sağlandı. Toplama tüpü ve içindeki sıvı atıldı. Spin kolonu 1,5 ml.'lik toplama tüplerine yerleştirilerek, membranının merkezine 20 µl Rnaz içermeyen distile su konularak 1 dakika inkübe edildi. Kapağı kapatılarak 1 dakika santrifüj edildi, membrandan aşağıya geçen sıvı kısma RNA içeriği toplandı.

3.4.2. Ovaryum Dokusundan miRNA İzolasyonu

-80°C'den alınan örnekler buz üzerine alınarak Invitrogen mirVana mikroRNA izolasyon kiti (Kat no-AM1560) ile mikroRNA izolasyonu şu şekilde gerçekleştirildi: her bir dokuya ayrı ayrı lizis solüsyonu eklendi ve dokular mekanik olarak homojenize edildi. Ekstraksiyon amacıyla elde edilen

homojenata 1/10 hacminde mikroRNA Homojenat Additive solüsyonu eklenerek vortekslendi. Elde edilen karışım buz üzerinde 10 dakika bırakıldı. miRNA Homogenate Additive solüsyonu eklenmeden önceki homojenat hacmine eşit miktarda asit-fenol:kloroform karışımı eklendi ve 30 saniye vortekslendi. Oda sıcaklığında, 10 000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant yeni bir ependorfa aktarıldı.

Oda ısısında, aktarılan süpernatant hacminin 1/3'ü kadar %100'lük etanol üzerine eklendi. Her bir örnek için toplama tüplerinin içerisine filtre kartuşu yerleştirilerek hazırlanan bu karışım kartuşun üzerine aktarıldı. 10 000 RPM'de 15 saniye santrifüj edilerek karışımın süzülmesi sağlandı. Filtrat yeni bir ependorfa aktarılacak hacminin 2/3'ü kadar %100 etanol eklendi, pipetaj yaparak karıştırıldı. Her bir örnek için toplama tüplerinin içerisine yeni filtre kartuşu yerleştirilerek bir önceki basamakta hazırlanan filtrat etanol karışımı üzerine pipet yardımıyla dikkatlice aktarıldı. 15 saniye 10 000 RPM'de santrifüj edilerek karışımın filtreden geçmesi sağlandı. Filtreden geçen sıvı kısım atıldı. Filtre kartuşları aynı toplama tüplerine yerleştirildi. Kit içerisinde bulunan miRNA yıkama solüsyonu 1'den her bir örnek için 700'er µl alınarak filtre kartuşunun üzerine aktarıldı, 10 sn santrifüj edildi. Filtreden geçip toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldı. miRNA yıkama solüsyonu 2/3'den her bir örnek için 500'er µl alınarak filtre kartuşunun üzerine aktarıldı, 10 sn santrifüj edildi. Filtreden geçip toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldı. Bu basamak 500'er µl miRNA yıkama solüsyonu 2/3 ile tekrar edildi. Filtreden geçip toplama tüpünde biriken sıvı kısım atıldıktan sonra filtre kartuşu aynı toplama tüpüne yerleştirilerek kalan sıvının da tüpte toplanması için 1 dk tekrar santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında toplama tüpleri atılarak yenisiyle değiştirildi. Kit içerisinde bulunan Elüsyon çözeltisinden 50'şer µl 95 °C'ye ısıtılarak filtre kartuşunun merkezine gelecek şekilde aktarıldı. 30 saniye santrifüj edildikten sonra tüpte biriken mikroRNA'lar toplanarak -80 °C'ye kaldırıldı.

3.4.3. cDNA Sentezi

Tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (4366596) kullanıldı ve bu kitin standart protokolü takip edilerek cDNA sentezi yapıldı. Kalıp olarak miR-129-5p ve miR-145-5p için miRNA'lara özgü stem-loop primerleri kullanılarak üretilmiştir (Applied biosystems). Ayrıca kontrol olarak dokuda miR-192-5p, serumda miR-16-5p stem-loop primerleri kullanılmıştır (Applied biosystems).

Her bir örnek ve miRNA için toplamda 15 µl master mix reaksiyon hacmi, 100 mM dNTPs'den 0.15 µl, MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U / µl'den 1 µl, 10X Reverse Transcriptase Buffer'dan 1.5 µl, RNase inhibitor 20U / µl'den 0.19 µl, Nükleaz içermeyen su'dan 4.16 µl, 5X RT primer 'den 3 µl ve RNA'dan 5 µl alınarak hazırlandı. Reverse transkripsiyon, Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR cihazında Tablo'daki sıcaklık ve zaman değerleri kullanılarak yapılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. cDNA sentezi

	1.aşama- Primer Bağlanması	2. Aşama- cDNA sentezi	3. Aşama- Denatürasyon	4. Aşama
Sıcaklık (°C)	16 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Süre	30 dk.	30 dk.	5 dk.	∞

Bu çalışmada kullanılan mikroRNA'ların kromozom lokasyonları ve sıraları aşağıdaki tabloda yer almaktadır (Tablo 5).

Tablo 5. miRNA lokasyonları

miRNA adı	Assay No	Kromozomal lokasyon	miRNA sekansı
		1-	
mmu-miR-129-5p	00059 0	chr6: 2902261 9-29022691 [+]	5'- CUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC
		2-	
		chr2: 9424136 4-94241453 [-]	
mmu-miR-145-5p	00227 8	chr18: 616478 25-61647894 [-]	5'- GUCCAGUUUUUCCCAGGAAUCCC U
mmu-miR-192-5p	00049 1	Chr. 11 - 64891137 - 64891246 [-]	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC
mmu-miR-16-5p	00039 1	Chr.13: 50048973 - 50049061 [-]	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG

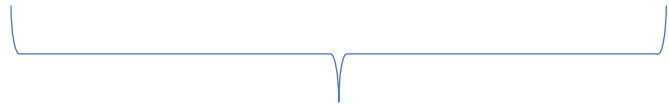
3.4.4. Kandan ve Ovaryum Dokusundan Elde Edilen miRNA ifadelerinin tespiti

Aşağıdaki protokol uygulanarak qRT-PCR yapıldı:

Reaksiyon, 1 µl TaqMan® Small RNA Assay, 10 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix II with UNG (Kat. No: 4440038), 2 µl cDNA ve 7 µl distile su'dan oluşan toplam 20 µl hacim içinde yürütüldü. Karışım, 96 gözlü platelerde, StepOnePlus™ Real-Time PCR cihazı'nda (Kat. No: 4376600) sırasıyla 50 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 10 dakika, 95 °C'de 15 saniye ve 60 °C'de 1 dakika inkübe edilerek toplam 40 döngü çalışıldı. İşlem her örnek için üç kez tekrarlandı. Her örnek için negatif kontrol olarak distile su, pozitif kontrol olarak serum için miR-16-5p, doku için miR-192-5p kullanıldı (Tablo 6).

Tablo 6. qRT-PCR

	Denatürasyon	Denatürasyon	Primerlerin Bağlanması	Uzama
Sıcaklık	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Süre	2 dakika	10 dakika	15 saniye	1 dakika



40 döngü

Her gruptaki miRNA'ların ifadesi StepOne™ and StepOnePlus™ Software v2.3 yazılımı yardımı ile 2-ΔΔCt yöntemi kullanılarak tespit edildi.

$$\Delta Ct = [(E_{Hedef})^{\Delta Ct_{Hedef} (kontrol-örnek)} / (E_{Referans})^{\Delta Ct_{Referans} (kontrol-örnek)}]$$

$$E=2^{(-1/eğim)}$$

3.5. İstatistiksel Analiz

İmmunohistokimyasal boyama sonuçları H-skor ile incelenerek değerlendirilmiştir. H SCORE= $\sum P_i (I+1)$. Burada, I boyama yoğunluğunu göstermektedir (0= immunreaktivite yok, 1=hafif, 2=orta, and 3=yoğun) ve P_i her yoğunluk için boyanan hücre yüzdesidir.

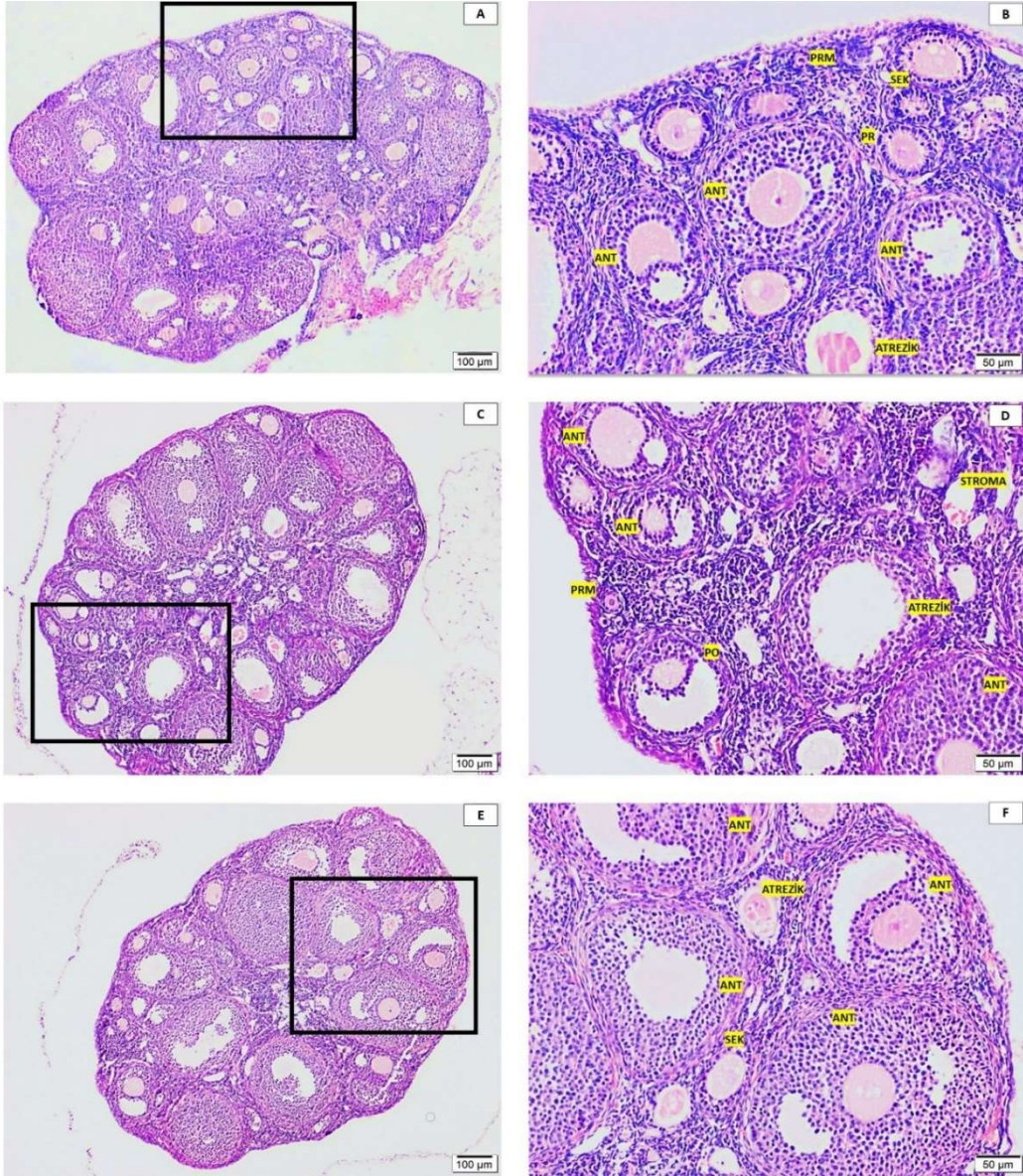
Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık Graph-Pad Prism 8 programı (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA) kullanılarak nonparametrik Kruskal-Wallis testi ile saptanmıştır ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farkın gözlemlendiği verilerde bu farkın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti post-hoc test Mann Whitney U ile yapılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar ortanca (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

qRT-PCR işleminin sonunda gen ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı (159). Grupların değer dağılımlarının normal olup olmadığını belirlemek için Shapiro-Wilk normalizasyon testi yapılmıştır. Değerler normal dağılım gösterdiğinden gruplar arası miRNA seviyeleri parametrik test olan tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi kullanılarak (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA) karşılaştırıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Post-hoc test olarak Tukey Testi kullanılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

IV. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Rutin doku takibi sonrası hazırlanan parafin bloklardan alınan 5'er mikronluk kesitlerden rastgele üçer preparat seçilerek histolojik analiz için H&E boyaması gerçekleştirildi. İncelenen tüm örneklerde ovaryum dokusuna ait tek katlı kübik epitel ve altında bağ dokusu yapısı olan tunika albuginea izlenmiş olup normal görünümdeydi. Kontrol grubuna ait ovaryum dokularının korteks ve medullası normal histolojik görünümde olup kortekste primordiyal foliküller, primer foliküller, sekonder foliküller ve tersiyer foliküller gözlemlendi. Medulla gevşek bağ dokusu yapısında olup kan damarları izlendi (Resim 1). SF uygulanan gruptaki ovaryum dokusuna ait foliküller kontrol grubu ile benzer histolojik görünümdeydi (Resim 1-C,D). Deney grubuna ait ovaryum dokularının H&E boyamasında, ovaryumun korteksinde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküller gözlemlendi. Yer yer atrezik foliküller izlenmiş olup kontrol grubu ile benzerdi (Resim 1-E,F). Histolojik incelemelerde deney grubuna ait örneklerde folikül büyüklüklerinin artmış olması dışında belirgin bir fark gözlemlenmedi.



Resim 1. Ovaryum H&E boyaması. Resimde her üç gruba ait ovaryum dokusu korteksinde primordial, primer, sekonder (antral) foliküller ve yer yer atrezik foliküller görülmektedir. Ovaryum yüzey epiteli izlenmekte olup tek katlı kübik epitel yapısındadır. Deney grubuna ait antral folikül büyüklüklerinde artış görülmektedir (E,F). Foliküller arasında stromal hücreler doğal olarak izlenmektedir. PO: Preovulatuvar folikül, PRIM: Primordial folikül, PR: Primer folikül, SEK: Sekonder folikül, ANT: Antral folikül, Atrezik: Atrezik folikül. A-B: Kontrol grubu, C-D SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-E: 50 µm

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.2.1. YAP1

Kontrol ve sham grubunda YAP1 immunreaktivitesi var olmakla birlikte oldukça az idi (+/-) (Resim 2-A,B,C,D). En yüksek YAP1 immunreaktivitesi FSH yapılan deney grubunda (++) izlendi (Resim 2-E,F). FSH uygulanan gruptaki antral foliküllerde, genel olarak bazal membrana komşu granüloza hücrelerinde ve orta şiddette (++) immunreaktivite izlenirken, antruma yakın olan granüloza hücrelerinde hafif şiddette (+) izlendi (Resim 2-F).

Ayrıca stromada YAP1 immunreaktivitesi incelendiğinde deney grubunda en yüksek (+++) immunreaktivite belirlenirken kontrol ve sham grubunda hafif (+) düzeyde immunreaktivite tespit edildi (Resim 2).

4.2.2. P73

P73 immunreaktivitesi tüm grup granüloza hücrelerinde izlenmekle birlikte gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi (+). Stromal alanda, en yüksek p73 immunreaktivitesi kontrol grubunda (+++) (Resim 3-A,B) gözlenirken kontrol ve sham grubunda benzer seviyede immunreaktivite belirlendi (Resim 3-C, D). Deney grubunda, stromal alandaki immunreaktivite kontrol ve sham grubuna göre azalmış (+) olarak tespit edildi (Resim 3-E,F).

4.2.3. TEAD3

Tüm gruplara ait granüloza hücrelerinde TEAD3 immunreaktivitesi değerlendirildiğinde SF uygulanan sham grubunun ve kontrol grubunun immunreaktivitesi benzerdi (++) (Resim 4-A,C). En yüksek immunreaktivitenin deney grubunda (+++) olduğu belirlendi (Resim 4-E,F).

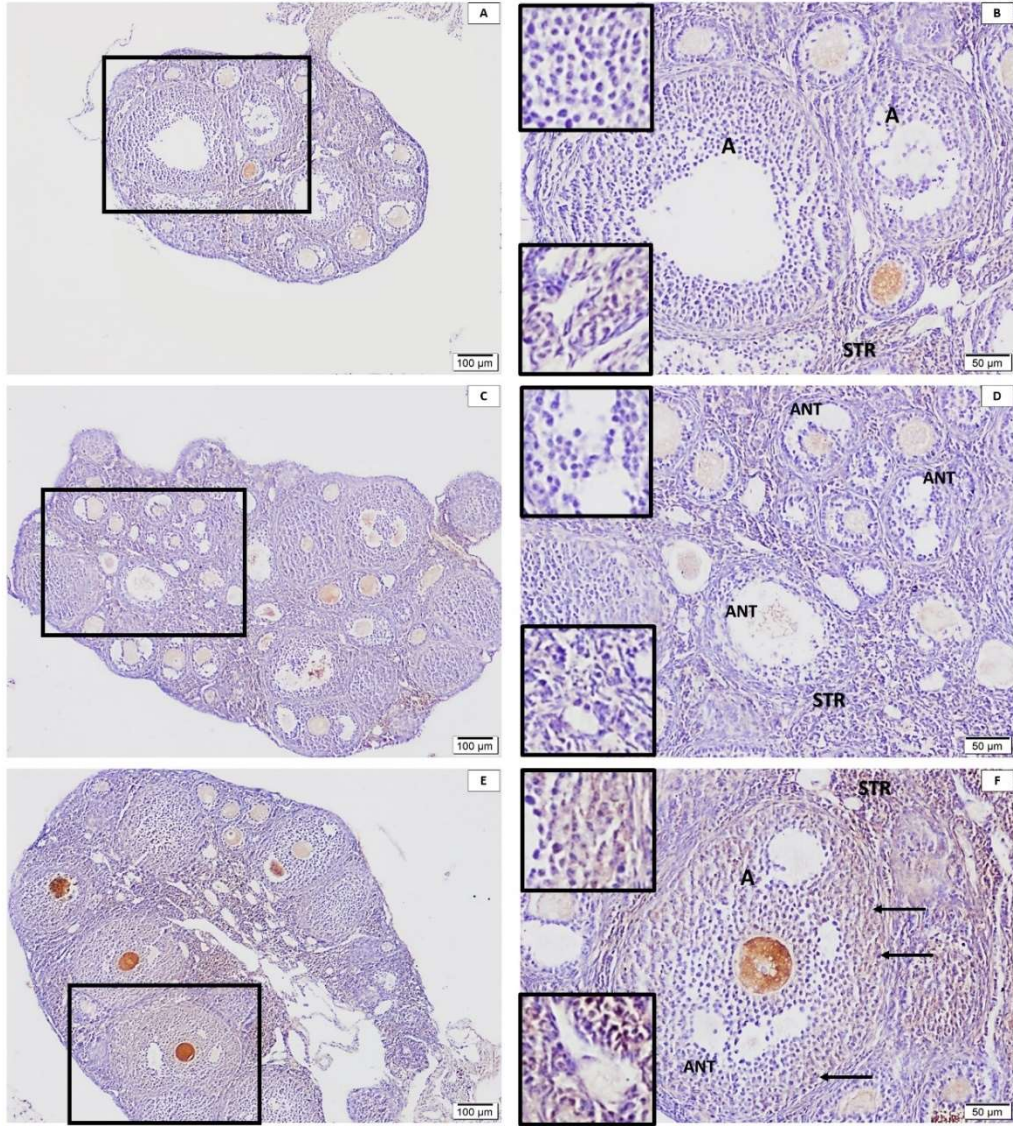
Stromal alanda TEAD3 immunreaktivitesi kontrol ve sham grubunda benzer (++) (Resim 4-B,D) iken en yüksek immunreaktivite FSH uygulanan deney grubunda (+++) (Resim 4-E,F) izlendi. TEAD3 immunreaktivitesi yer yer sitoplazmada izlenmekle birlikte, genel olarak TEAD3 immunreaktivitesi çekirdekte gözlemlendi.

4.2.4. Kaspaz3

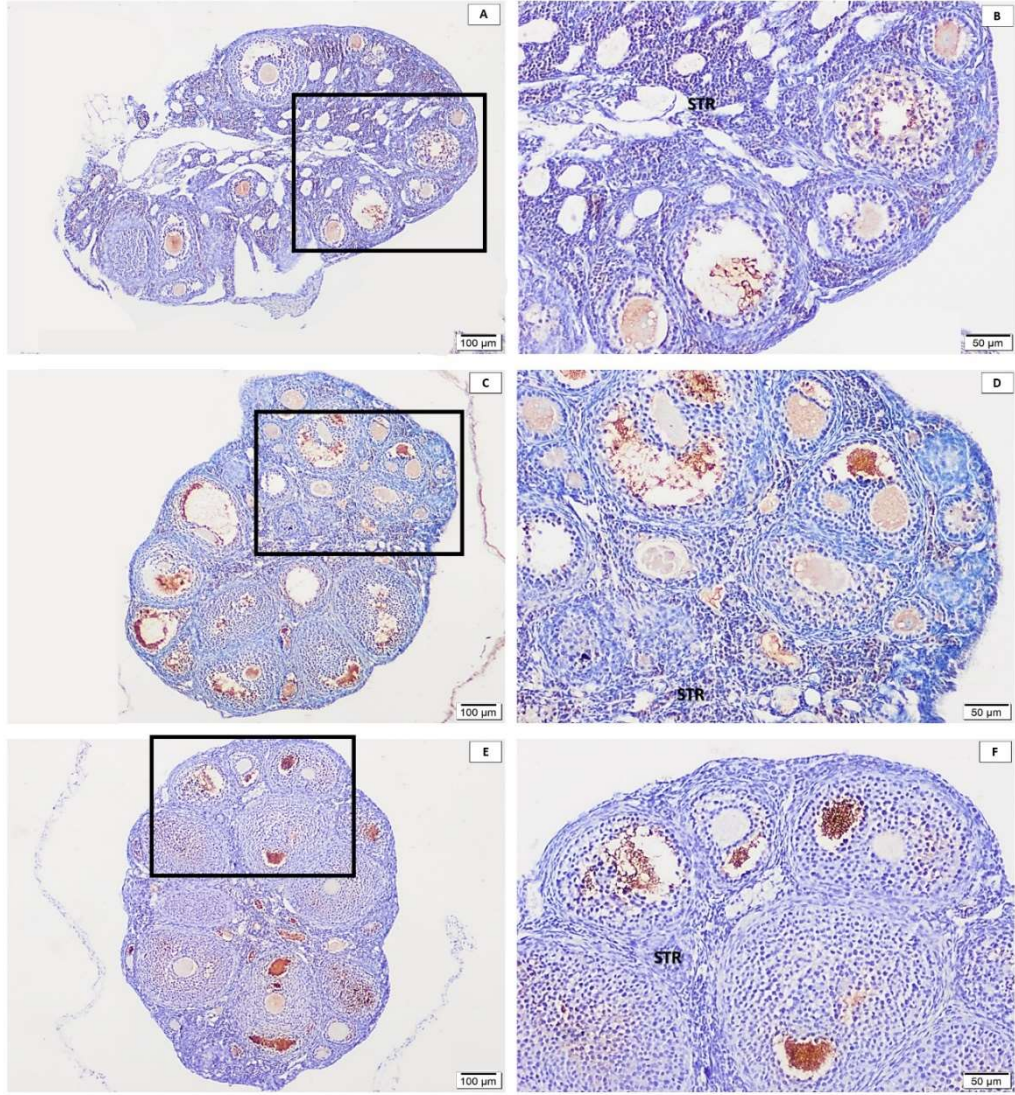
Kaspaz3 immunreaktivitesi tüm gruplardaki granüloza hücrelerinde izlenmekle birlikte gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi (+) (Resim 5). Stromal alandaki kaspaz3 immunreaktivitesi incelendiğinde en yüksek immunreaktivite kontrol grubunda (++) gözlenirken kontrol ve sham grubunda benzer seviyede immunreaktivite belirlendi (Resim 5-B,D). Deney grubuna ait örneklerde, stromal alandaki immunreaktivite kontrol ve sham grubuna göre azalmış (+) olarak tespit edildi (Resim 5-F).

4.2.5. Bax

Tüm gruplardaki granüloza hücrelerinde hafif şiddette (+) Bax immunreaktivitesi izlenmekle birlikte gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi (Resim 6). Stromal alandaki Bax immunreaktivitesi incelendiğinde de tüm gruplarda benzer şiddette (+) immunreaktivite izlendi (Resim 6-B,D,F).

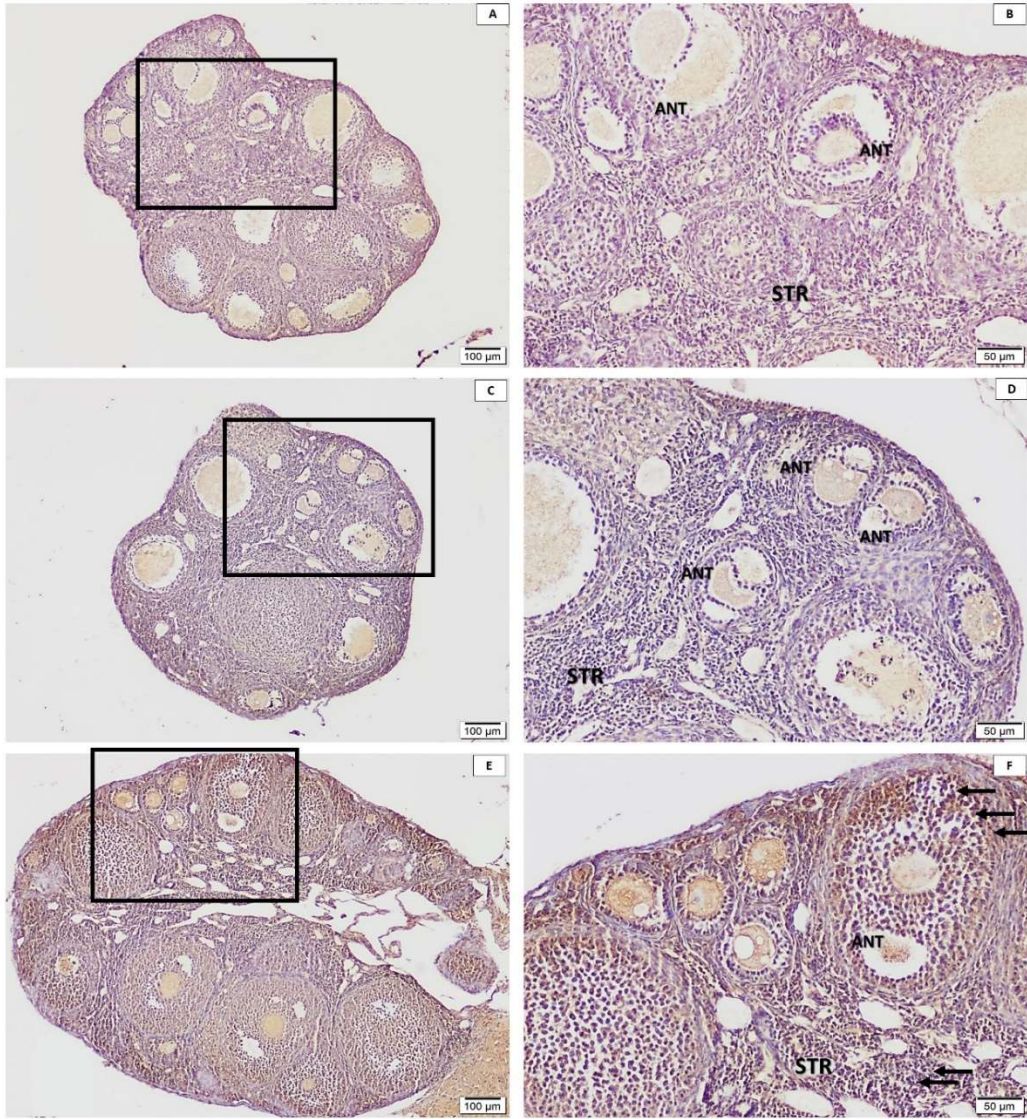


Resim 2. Ovaryum YAP1 immunreaktivitesi. Anti-YAP1 poliklonal primer antikor ile boyanan parafin doku kesitlerinde, deney grubuna ait kesitlerde boyanma farklılıkları gözlenmektedir. Resimde deney grubuna ait foliküllerde, bazal membrana komşu granüloza hücrelerinde orta şiddette (oklar), antruma yakın olan granüloza hücrelerinde hafif şiddette (A) immunreaktivite izlenmektedir. Stromada (STR) şiddetli immunreaktivite görülmektedir (F). ANT: Antral folikül, STR: Stroma. Sağ taraftaki her bir resmin, üst kısmında yerleşen kare: Antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinin; alt kısmında yerleşen kare: Stromal hücrelerin boyanmasını göstermektedir. A-B: Kontrol grubu, C-D: SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-E: 50 µm, sağ taraftaki resim içi küçük karelerin kenarları:50 µm



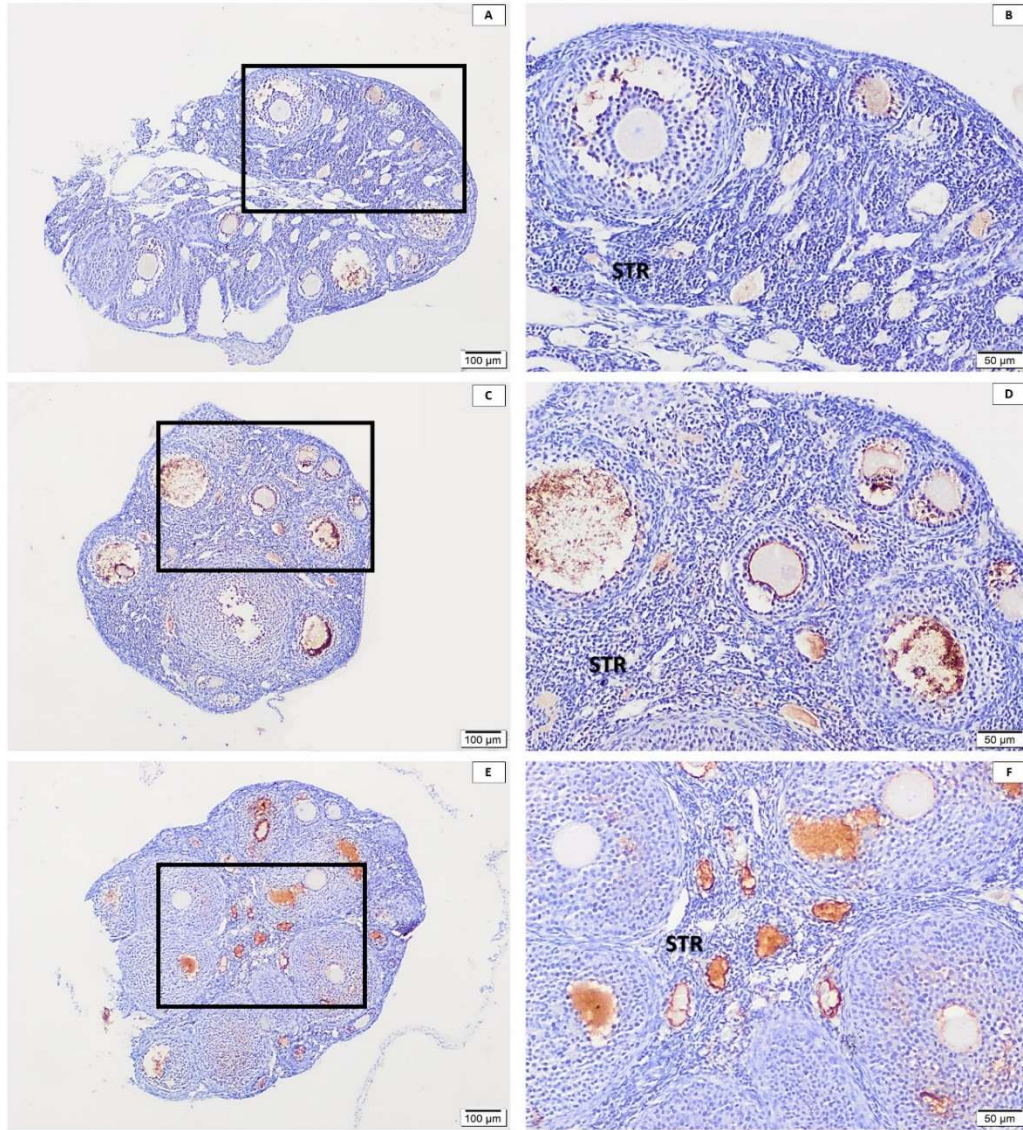
Resim 3. Ovaryum P73 immunreaktivitesi. Anti-P73 poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, granüloza hücrelerinde gruplar arası anlamlı fark görülmedi. Stromal alandaki immunreaktivite, deney grubuna ait örneklerde (+), kontrol ve sham grubuna (+++) göre azalmış olarak tespit edildi.

STR: Stromal alan, A-B: Kontrol grubu, C-D: SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-E: 50 µm



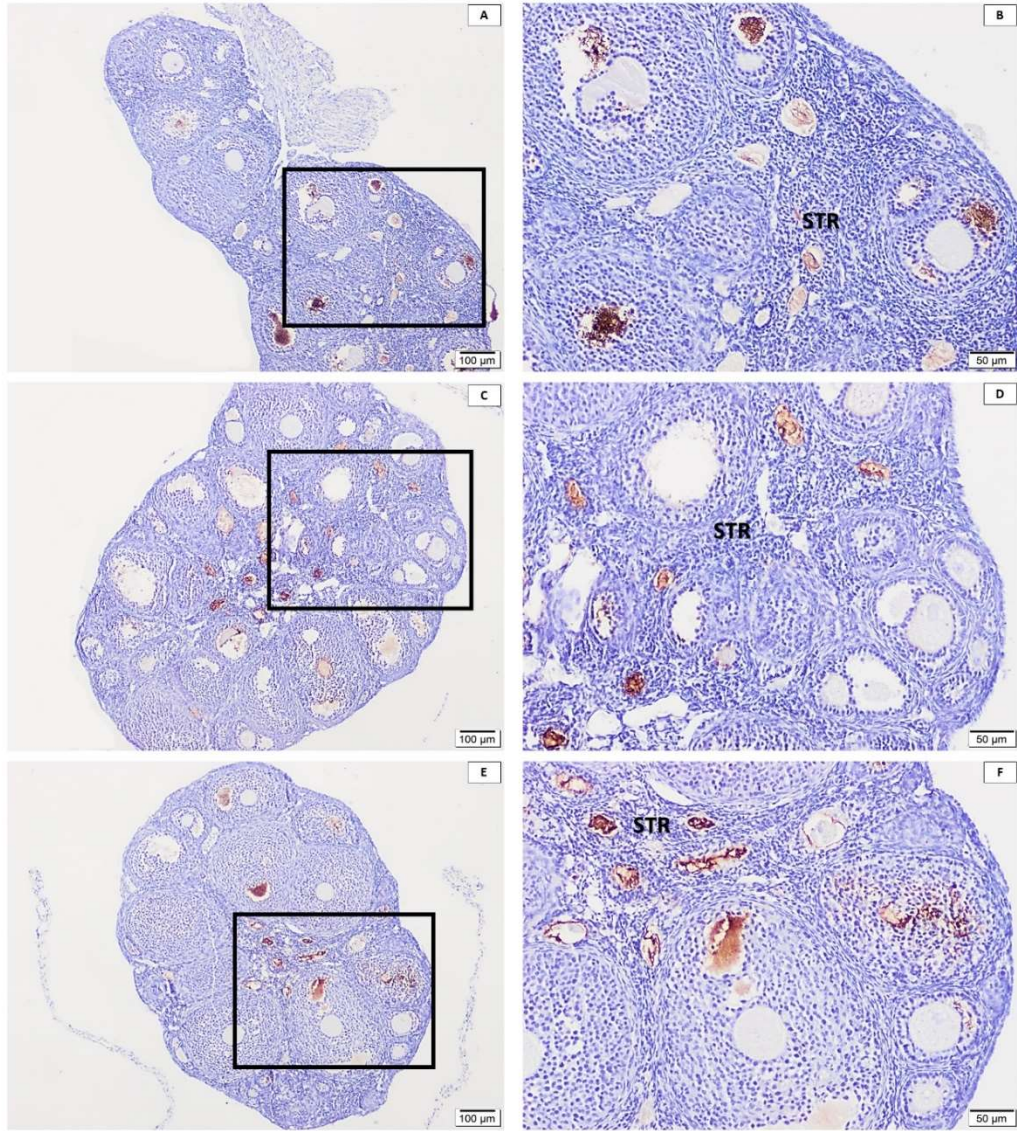
Resim 4. Ovaryum dokusunda TEAD3 immunreaktivitesi. Anti-TEAD3 poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, granüloza hücrelerinde ve stromal alanda izlenen TEAD3 immunreaktivitesi, FSH uygulanan deney grubunda (+++), diğer gruplara (++) göre artmış olarak belirlendi. Deney grubunda TEAD3'ün immunreaktivitesi çekirdekte yaygın olarak gözlenmektedir (oklar).

ANT: Antral folikül, STR: Stroma, A-B: Kontrol grubu, C-D: SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-E: 50 µm



Resim 5. Ovaryum kaspaz-3 immunreaktivitesi. Anti-kaspaz3 poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, granüloza hücrelerinde gruplar arası anlamlı bir fark görülmedi (+). Stromal alandaki immunreaktivite, deney grubuna ait örneklerde (+), kontrol ve sham grubuna (++) göre azalmış olarak tespit edildi.

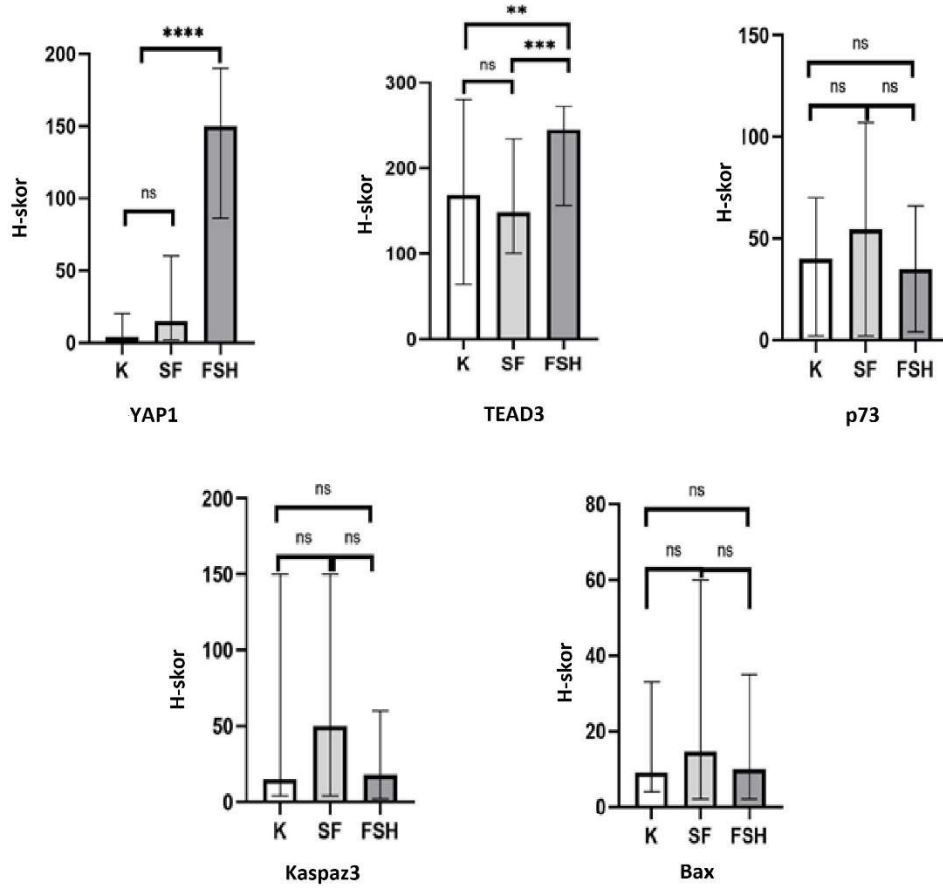
STR: Stromal alan, A-B: Kontrol grubu, C-D: SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-F: 50 µm



Resim 6. Ovaryum Bax immunreaktivitesi. Anti-Bax poliklonal primer antikoru ile boyanan parafin doku kesitlerinde, granüloza hücrelerinde ve stromal alanda tüm gruplarda benzer immunreaktivite tespit edildi (+).

STR: Stromal alan, A-B: Kontrol grubu, C-D: SF uygulanan grup, E-F: FSH uygulanan grup. Ölçek: A-C-E: 100 µm, B-D-E: 50 µm

4.2.6. İmmunohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması

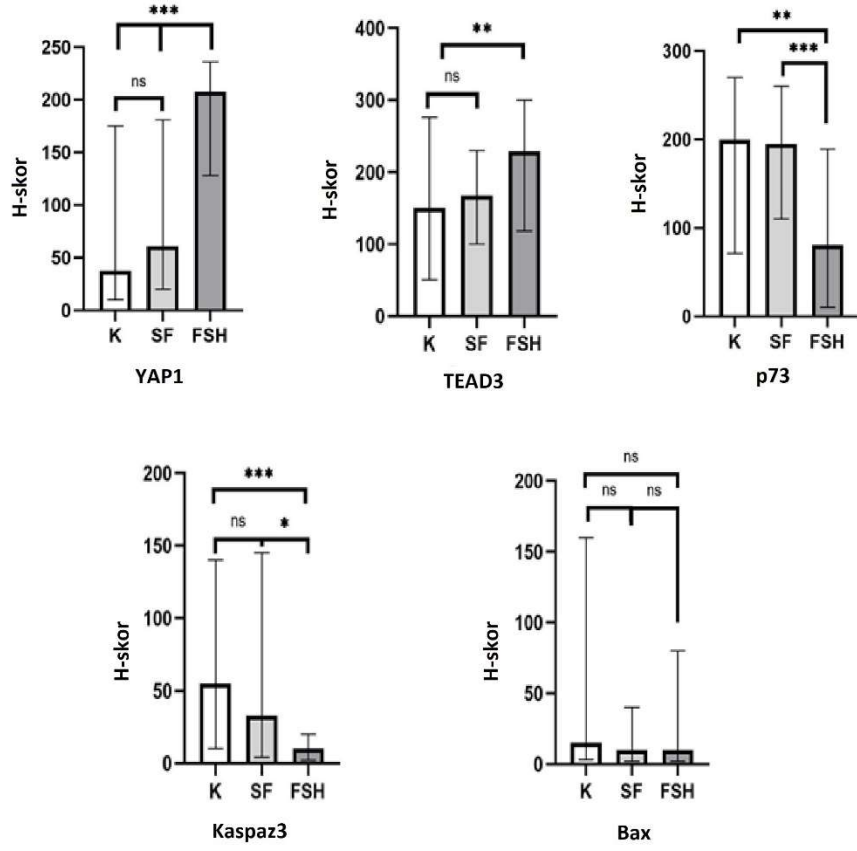


Şekil 23. Granüloza hücrelerindeki immunreaktivitelerin karşılaştırması
K: Kontrol, SF: Serum fizyolojik uygulanan grup, FSH: FSH uygulanan grup.
(ns: $p > 0,05$, * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$)

Tablo 7. Granüloza hücrelerindeki immunreaktivitelerin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Granüloza hücreleri						
Antikor	Deney Grupları	Ortanca	Minimum	Maksimum	p	Posthoc (Mann Whitney U)
YAP1	Kontrol	4	2	20	<0.0001*	a=b>c
	SF	15	2	60		
	FSH	150	86	190		
TEAD3	Kontrol	168.5	64	280	0.0023*	a=b>c
	SF	148	100	234		
	FSH	245	156	272		
P73	Kontrol	40	2	70	0.5813	a=b=c
	SF	54.5	2	107		
	FSH	35	4	66		
Kaspaz3	Kontrol	15	4	150	0.2293	a=b=c
	SF	50	4	150		
	FSH	18	2	60		
Bax	Kontrol	9	4	33	0.7997	a=b=c
	SF	14.5	2	60		
	FSH	10	2	35		

*P < 0,05 ise anlamlı, Kruskal-Wallis testine göre; a=kontrol, b=SF, c=FSH



Şekil 24. Stromal alandaki hücrelerin immunreaktivitelerinin karşılaştırması
 K: Kontrol, SF: Serum fizyolojik uygulanan grup, FSH: FSH uygulanan grup.
 (ns: $p > 0,05$, * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$)

Tablo 8. Stromal alandaki hücrelerin immunreaktivitelerin istatistiksel olarak karşılaştırılması

Stromal Hücreler						
Antikor	Deney Grupları	Ortanca	Minimum	Maksimum	p	Posthoc (Mann Whitney U)
Yap1	Kontrol	37.5	10	175	0.0004*	a=b>c
	SF	61	20	181		
	FSH	207.5	128	236		
TEAD3	Kontrol	150	50	276	0.005*	a=b>c
	SF	167.5	100	230		
	FSH	229	118	300		
P73	Kontrol	199.5	71	270	0.0011*	a=b>c
	SF	195	110	260		
	FSH	80.5	10	189		
Kaspaz3	Kontrol	55	10	140	0.0038*	a=b>c
	SF	32.5	4	145		
	FSH	10	2	20		
Bax	Kontrol	15	3	160	0.8283	a=b=c
	SF	10	2	40		
	FSH	10	2	80		

*P < 0,05 ise anlamlı, Kruskal-Wallis testine göre; a=kontrol, b=SF, c=FSH

Sonuç olarak tüm gruplar değerlendirildiğinde YAP1 ve TEAD3 immunreaktiviteleri en yüksek deney grubunda izlendi, p73 ve Kaspaz3 immunreaktivitesi kontrol grubunda en yüksek iken deney grubunda azalmıştı.

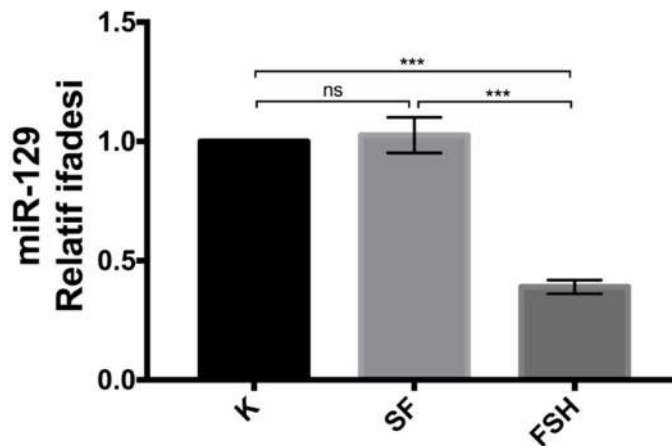
4.3. PCR Bulguları

4.3.1. Ovaryum Dokularının qRT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

qRT-PCR işleminin sonunda gen ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin analizi için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı. Verilerin normalizasyonunda referans olarak miRNA-192-5p kullanıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Bu yöntemle göre kontrol grubu gen ifadesi 1 olarak alındı. Gruplar arası karşılaştırma için ANOVA testi; çoklu karşılaştırma için ise Tukey Testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.3.1.1. miRNA 129-5p

qRT-PCR sonuçlarına göre SF grubunun miR-129-5p ifadesi $1,025 \pm 0,07$ idi. ($p = 0,6099$). Bu ifadenin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi (Şekil 25, Tablo 9). FSH grubundaki 129-5p ifadesinin kontrol grubuna göre miR- 2,571 kat azaldığı ($0,389 \pm 0,02$), SF grubuna göre 2,635 kat daha az ($p < 0,0002$) olduğu bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,0002$) (Şekil 25, Tablo 9).



Şekil 25. Ovaryum dokusunda mir-129-5p ifadesi

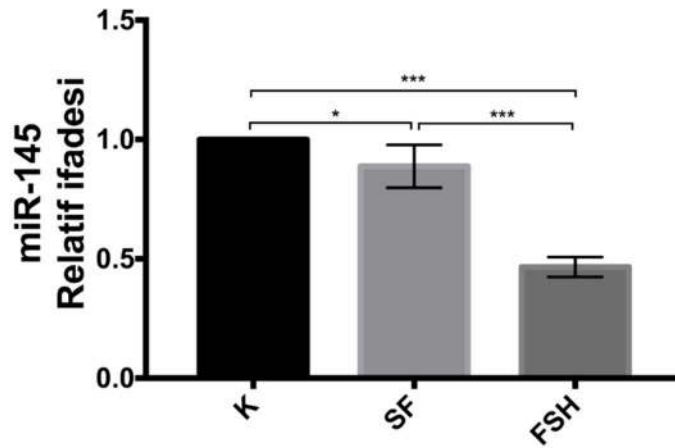
K: Kontrol, SF: Serum fizyolojik uygulanan grup, FSH: FSH uygulanan grup. (ns: $p > 0,05$, * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$)

Tablo 9. Ovaryum relatif mir-129-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri
(ortalama $\pm$ std sapma)

	Kontrol	SF	FSH
mir-129-5p relatif ifadesi	1 $\pm$ 0	1,025 $\pm$ 0,07	0,389 $\pm$ 0,02

4.3.1.2. miRNA 145-5p

qRT-PCR analiz sonuçlarına göre SF grubunun miR-145-5p ifadesi 0,887 $\pm$ 0,08 idi Bu ifadenin kontrol grubuna göre daha az olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p=0,0102$) (Şekil 26, Tablo 10). FSH uygulanan grupta miR-145-5p ifadesinin Kontrol grubuna göre 2,151 kat azaldığı (0,465 $\pm$ 0,04) ($p<0,0002$), SF grubuna göre ise 1,908 kat daha az ($p<0,0002$) olduğu ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (Şekil 26, Tablo 10).



Şekil 26. Ovaryum dokusunda mir-145-5p ifadesi

K: Kontrol, SF: Serum fizyolojik uygulanan grup, FSH: FSH uygulanan grup. (ns: $p>0,05$, * $p<0,033$, ** $p<0,002$, *** $p<0,0002$, **** $p<0,0001$)

Tablo 10. Ovaryum relatif mir-145-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama $\pm$ std sapma)

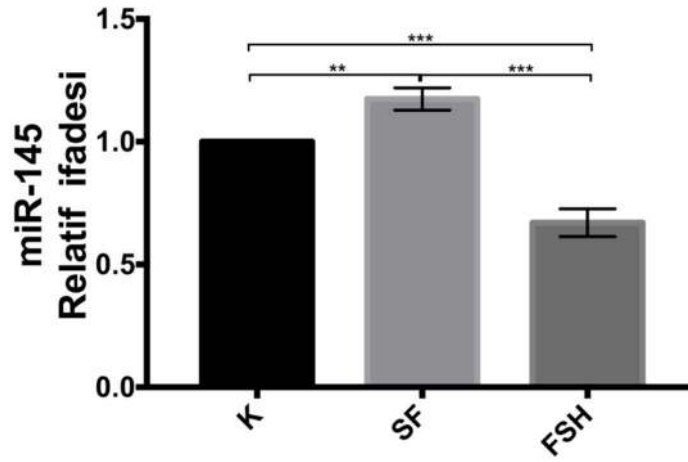
	Kontrol	SF	FSH
mir-145-5p relatif ifadesi	1 $\pm$ 0	0,887 $\pm$ 0,08	0,465 $\pm$ 0,04

4.3.2. Serum qRT-PCR Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

qRT-PCR işleminin sonunda gen ekspresyonlarında meydana gelen değişikliklerin analizi için 2- $\Delta\Delta$ CT yöntemi kullanıldı. Verilerin normalizasyonunda referans olarak miRNA-16-5p kullanıldı ve sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Bu yöntemle göre kontrol grubu gen ifadesi 1 olarak alındı. Gruplar arası karşılaştırma için ANOVA testi; çoklu karşılaştırma için ise Tukey Testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Serumdaki mir-129-5p ifadesi 35. döngüden sonra tespit edildiği için değerlendirme dışı bırakıldı.

4.3.2.1. miRNA 145-5p

qRT-PCR yöntemi ile yapılan serum analizi sonuçlarına göre SF grubunun miR-145-5p ifadesi 1.17 $\pm$ 0,04 idi ($p=0,0014$). Bu ifadenin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ve aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi (Şekil 27, Tablo 11). FSH verilen grupta miR-145-5p ifadesinin kontrol grubuna göre yaklaşık 1,494 kat azaldığı (0,669 $\pm$ 0,05), SF grubuna göre ise 1,749 kat daha az ($p < 0,0002$) olduğu ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,0002$) (Şekil 27, Tablo 11).



Şekil 27. Serumda mir-145-5p ifadesi

K: Kontrol, SF: Serum fizyolojik uygulanan grup, FSH: FSH uygulanan grup. (ns: $p > 0,05$, * $p < 0,033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,0002$, **** $p < 0,0001$)

Tablo 11. Serum relatif mir-145-5p ifadeleri ve istatistiksel analizleri (ortalama $\pm$ std sapma)

	Kontrol	SF	FSH
mir-145-5p	1 $\pm$ 0	1.17 $\pm$ 0,04	0,669 $\pm$ 0,05
relatif ifadesi			

V. TARTIŞMA

Hippo sinyal yolu, YAP1 aktivitesini düzenleyerek organ boyutunu kontrol eder. Büyüme sinyalleri varlığında Hippo yolu baskılanır ve YAP1'in sitoplazmadan çekirdeğe translokasyonu uyarılarak proliferatif genlerin ekspresyonu tetiklenir bunun sonucunda hücre proliferasyonu ve organ büyümesi gerçekleşir. Hippo yolağının majör efektörü olan YAP1 ovaryan granüloza hücrelerinde eksprese olmaktadır ve hem ovulasyonda hem de folikül gelişiminin düzenlenmesinde önemli rolü vardır. Granüloza hücrelerinin çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli bir düzenleyicidir. YAP1'in aktif formu olan çekirdekteki YAP1 baskın olarak proliferatif granüloza hücrelerinde sentezlenirken inaktif formu olan sitoplazmik YAP1 esas olarak luteal hücrelerde sentezlenmektedir. YAP1'in dengeli ekspresyonu ve aktivasyonu folikül gelişimi ve üremenin gerçekleşmesi için hayattır (81).

Daha önceki çalışmalarda Hippo yolağının gelişim ve tümör gelişimindeki rolleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir (8,9,67). Bununla birlikte, folikül gelişimindeki rolü büyük ölçüde bilinmemektedir. Bu çalışmada, hippo yolağı elemanları olan YAP1, TEAD3 ve P73'ün over dokusundaki immunreaktivitelerinin FSH etkisi altındaki değişikliklerini in vivo olarak değerlendirdik.

Çalışmamızda kontrol grubunda YAP1, TEAD3 ve P73 immunreaktivitelerinin varlığını tespit ettik. Bu bulgu bize hippo sinyal yolağının, overin normal fonksiyonlarında rolünün bulunduğunu düşündürdü. Nitekim daha önceki çalışmalarda hippo sinyal yolağının folikül gelişiminde, erken dönem folikülogenezde ve overin yaşlanmasında rol aldığı gösterilmiştir (160–162). Kontrol grubunda hippo sinyal yolağı elemanlarının eksprese olması, ovaryan döngüde yolağın fizyolojik olarak aktif görev aldığına göstergesi olarak değerlendirildi.

FSH, antral foliküllerde büyümeyi uyaran ve granüloza hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan önemli bir hormondur. FSH uygulanan grupta, YAP1 immunoreaktivitesi, stromal hücrelerde ve antral foliküllerin bazal membrana yakın olan granüloza hücre çekirdeklerinde izlendi. Xiangmin ve

arkadaşları yaptıkları çalışmada folikül gelişimi esnasında primer folikülden preovulatuvar folikül aşamasına kadar olan dönemde YAP1'in esas olarak granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde eksprese olurken korpus luteumda ise luteal hücrelerin sitoplazmasında eksprese olduklarını bulmuşlardır (81). Buradan yola çıkarak bulgularımıza göre yüksek doz FSH etkisi altında granüloza hücrelerinin proliferasyon gösterdiği ve bu proliferasyon sürecinde hippo yolağının baskılandığı söylenebilir. Granüloza hücrelerindeki proliferasyonun, bazal membrana komşu granüloza hücrelerinden başladığı bilinmektedir (163). Bu nedenle yüksek doz FSH etkisi altında granüloza hücrelerinin bu proliferatif süreciyle YAP1'in ilişkisi olduğu düşünüldü.

YAP1'in, hücrede proliferasyonu tetiklemek için, proproliferatif genlerin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörleri TEAD1-4'ün koaktivatörü olarak görev yaptığı bilinmektedir. Ancak bu etkiyi sağlaması için çekirdeğe translokasyonu gerekmektedir (8). TEAD ailesi elemanlarından TEAD3'ün kontrol grubunda var olan ifadesinde, deney grubunda hem granüloza hem de stromal hücrelerde artış saptandı. TEAD3'ün bu hücrelerin çekirdeklerinde eksprese olduğu görüldü. Çekirdekte YAP1 immunreaktivitesi saptanan granüloza hücrelerinde, FSH'nın, YAP1 ile TEAD3'ün beraber transkripsiyonunu sağlayarak proliferatif etki gösterdiği ancak; sitoplazmalarında YAP1 immunreaktivitesi saptanan granüloza hücrelerinde, TEAD3'ün YAP1 ile uyarılmadığı düşünüldü. Bu nedenle bu hücrelerde TEAD3'ün artan regülasyonunun hippo yolağı elemanlarının dışında bir faktör tarafından tetikleniyor olabileceği öngörüldü. Nitekim daha önce yapılan bir çalışmada VGLL3'ün hippo yolağını aktive ederek LATS2 ve AMOTL2 yoluyla YAP/TAZ inaktivasyonuna neden olduğu ancak TEAD3 ile birlikte hücre proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (164). Bu nedenle YAP1'in sitoplazmik ifadesine rağmen TEAD3'ün çekirdekte ifade olması yine de FSH uygulaması sonrası granüloza hücrelerinin proliferatif bir süreçte olduğunu göstermektedir.

Hippo sinyal yolağı, hücrelerin mikroçevrelerinin fiziksel yapısı ile düzenlenmektedir (64). Çalışmamıza ait deney grubu ovaryum dokularında stromal alandaki YAP1 immunreaktivitesinde artış saptandı.

İmmunreaktivitedeki bu değişiklik, FSH'nın stromal alanda hippo sinyal yolağını etkilediğini düşündürdü. Hücre iskeletinde meydana gelen değişiklikler, hücre-hücre, hücre-matriks elemanları arası etkileşimler ve ekstraselüler matriksin fiziksel içeriği Hippo yolu aktivitesi üzerinde etkilidir. Daha önce yapılan bir hücre kültürü çalışmasında, sklerozal yapıya sahip mikroçevrede, hücrelerdeki YAP aktivitesinin artarak hücrelerin proliferere oldukları, yumuşak yapıya sahip mikroçevrede ise YAP aktivitesinin azalarak hücrelerin farklılaşmaya yöneldikleri bulunmuştur (165,166). Ovaryum dokusunda folikül gelişimi esnasında, primordial foliküller medullar kısma göre daha skiröz yapıda olan kortikal kısımda yerleşirler ve uyku halinden çıkıp aktive olduklarında büyüyerek daha yumuşak yapıda olan medullar bölgeye ilerlemektedirler (163,166). Daha yumuşak yapıdaki bu bölgede azalan hippo aktivitesi nedeniyle folikül büyümesi yavaşlar (166). Bu sebeple FSH uygulaması sonrası tespit edilen stromal alandaki YAP1 immünreaktivite artışı, stromal dokudaki yapısal değişikliği de işaret ediyor olabilir. Bu şekilde FSH stimölasyonu devam ettiği sürece, folikül mikroçevresi skiröz bir yapı kazanarak foliküllerin büyümesinin devamını mümkün kılabilecektir. Benzer şekilde FSH uygulanan grupta TEAD3'ün stromal immünreaktivitesinde de anlamlı artış saptanmıştır. TEAD, YAP'ın anahtar transkripsiyon faktörüdür ve YAP'ın fonksiyonunu düzenler (92,93). Bu sebeple TEAD3 immünreaktivitesinin de YAP1'e benzer şekilde mikroçevrenin fiziksel yapısından etkilenecek artmış olabileceği düşünöldü ancak bu konu ile ilgili ve TEAD3'ün stromadaki fonksiyonu ile ilgili henüz bir çalışma yapılmamıştır.

MikroRNA'ların, granüloza hücreleri dahil farklı hücre tiplerinin proliferasyonunda önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Çalışmamızda deney grubuna ait ovaryum dokularının qRT-PCR sonuçlarında miR-129-5p'nin down-regüle edildiğini gözlemledik. Bu bulgu bize FSH sonrası ovaryum dokularının proliferere olduğunu düşündürdü. Serumdaki düzeyi 35. döngüden sonra saptandığı için değerlendirme dışı bırakıldı. Mir129-5p'nin hücrenin proliferasyonu ve apoptozuyla olan bağlantısı çeşitli kanser çalışmaları gösterilmiştir. Yapılan birçok araştırmada mir-129-5p'nin up-regölasyonunun hücre invazyonunu, migrasyonunu ve proliferasyonunu

baskıladığı bu sebeple birçok kanserde tümör süpresör olarak rol aldığı belirtilmiştir (132,134,143,167). Ancak bunun tam tersi larinks skuamöz hücreli kanserinde, mir-129-5p'nin down-regülasyonu ile kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe olduğu ve apoptozun uyarıldığı bulunmuştur. Bu etkisini, in vivo ve in vitro ortamda, down-regülasyonu ile Wnt sinyal yolağınının negatif düzenleyicisi olan APC ekspresyonunu uyararak göstermiştir (139). Bu nedenle mir-129-5p'nin regülasyonu farklı tümör tiplerinde dokuya spesifik farklılıklar gösteriyor gibi görünmektedir.

Tan ve arkadaşları over kanseri hücre hattı üzerinde yaptıkları çalışmada mir-129-5p transfekte edilen hücrelerde YAP ve TAZ'ın ekspresyon düzeylerinin azaldığını, mir129-5p ile susturulan hücrelerde de YAP ve TAZ'ın ekspresyon düzeylerinin arttığını göstermişlerdir. Bu nedenle mir129-5p'nin up-regülasyonunun hippo yolağı elemanları olan YAP ve TAZ transkripsiyonunu direkt olarak baskıladığını ve down-regülasyonunun da proliferasyona neden olduğunu belirtmişlerdir (138). Yine aynı çalışmanın devamında mir129-5p'yi in vivo olarak tümör içerisine enjekte etmiş ve tümör boyutunda küçülme gözlemlemişlerdir (138). Buradan yola çıkarak mir129-5p'nin overin proliferasyonunun düzenlenmesinde zıt yönlü etkisinin olduğu ve bu etkisini hippo yolağı üzerinden gerçekleştirdiği söylenebilir. Ovaryum dokusunda tespit edilen mir-129-5p'deki azalma ve YAP1 ve TEAD3'de görülen immunreaktivite artışı, yüksek doz FSH etkisi altında ovaryum dokusunda proliferasyonun gerçekleştiğini ve bu süreçte Hippo sinyal yolağının baskılandığını göstermektedir.

P73, p53 ailesinin bir üyesi olup proapoptotik ve antiapoptotik fonksiyonu vardır. Genomik stabilitenin korunmasında görevlidir ve p73'ün delesyonu tümör oluşumuna yol açar. Araştırmamızda, deney grubu farelerine ait ovaryum dokularında, antral foliküllerin granüloza hücrelerinde, kontrol grubuna göre anlamlı bir immunreaktivite değişikliği gözlenmezken stromada p73'ün immunreaktivitesinde azalma izlendi. Bu sonuç bize p73'ün apoptotik fonksiyonunun baskılandığını düşündürdü. P73'ün foliküler rezerv büyüklüğü, ovulasyon hızı ve oosit kalitesi ile ilişkili rolleri bulunmaktadır (104,169). DNA hasarı durumunda granüloza hücrelerinde p73 ekspresyonunun arttığı

gösterilmiştir (168). Çalışmamızda p73 immunreaktivitesinde artışın olmaması, FSH'nın p73'ü baskılayarak granüloza ve stromal hücreleri apoptozdan koruduğunu göstermektedir. P73 delesyonlu dişi farelerde, primordiyal ve primer folikül sayısı azalırken sekonder foliküllerin sayısı değişmemektedir (104). Bulgularımıza göre, stromal hücrelerde p73 immunreaktivitesi azalırken antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinde anlamlı değişiklik görülmemesi p73'ün folikülogenez sırasında döneme spesifik fonksiyon göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.

Mir-145 seviyelerindeki artışın insan granüloza hücrelerinde MAPK/ERK sinyal yolağını inhibe ederek DNA sentezini ve proliferasyonu baskıladığı bilinmektedir (171). Bu çalışmada, FSH uygulaması sonrası serumda ve ovaryum dokusunda mir-145-5p seviyesinin azalmış olduğunu tespit ettik. Kontrol ve sham grubuna göre mir-145-5p seviyesindeki azalma bize FSH'ın ovaryum dokusunda proliferasyonu uyardığını düşündürdü. Bilindiği üzere, FSH uygulamasına benzer şekilde, PCOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde proliferasyon hızında artış apoptoz hızında düşüş görülmektedir. Bu şekilde over dokusunda büyüyen folikül sayısı artar. Yakın zaman önce Cai ve arkadaşları da PCOS'lu hastaların folikül sıvıları üzerinde yaptıkları incelemede mir-145 düzeyinin azaldığını bulmuşlardır (171). Ayrıca mir-145-5p'nin ovaryan siklus sırasında foliküler luteal geçişte rol aldığıyla ilgili çalışmalar vardır. İn vitro olarak, geviş getiren hayvanlardan alınan dokular üzerinde yapılan çalışmalarda, foliküler fazda, foliküllerdeki granüloza hücrelerinde mir-145-5p seviyesi yüksek iken farklılaşmayla beraber bu seviyenin azaldığı gösterilmiştir (128,158). Buradan yola çıkarak deney grubunda FSH ile tetiklenen farklılaşma, deney grubundaki fare ovaryum dokularında belirlenen mir-145-5p'deki azalmanın diğer bir nedeni olabilir.

İnsan kümülüs hücrelerinde, yakın tarihte yapılan bir çalışmada mir-145-5p'nin down-regülasyonunun, GDNF ekspresyonunu artırarak, oosit maturasyonunu ve kümülüs hücrelerinin canlılığını arttırdığını, apoptozunu azalttığını bulmuşlardır (157). Çalışmamızda deney grubu ovaryum dokusunda mir-145-5p'nin down-regüle olduğunu tespit ettik. Bu doğrultuda, çalışmamızda apoptoz açısından, dokuda kaspaz 3 ve Bax

immunoreaktivitelerini değerlendirdiğimizde granüloza hücrelerinde anlamlı bir değişik gözlenmezken stromal hücrelerin kaspaz 3 immunreaktivitesinde azalma saptandı. Bax immunreaktivitesinde ise ne granüloza hücrelerinde ne de stromal hücrelerde, gruplar arası farklılık saptanmadı. Bax delesyonu olan farelerde granüloza hücre sayısının arttığı anormal foliküller görölmektedir (172) ve Bax, atretik foliküllerde, sağlıklı foliküllere göre oldukça fazla eksprese olmaktadır (173). Benzer şekilde kaspaz-3 atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde eksprese olurken sağlıklı foliküllerde ekspresyonu bulunmamaktadır (174). Buradan Bax'ın ve kaspaz3'ün granüloza hücrelerinin apoptozunda rolünün olduğu anlaşılmaktadır. Bu sebeple granüloza hücrelerinin Bax ve kaspaz3 immunreaktivitelerinde gruplar arası herhangi bir farklılık olmaması, FSH uygulaması sonrası erken dönemde, granüloza hücrelerinde apoptoza gidiş olmadığını göstermektedir. Nitekim Zhou ve arkadaşları da FSH yapıldıktan sonraki erken dönemde apoptoza gidiş olmadığını bulmuşlardır (46). Bu sonuçlar mir-145-5p'nin dokuda saptanan azalmış ifadesi ile koreledir. Çalışmamızda deney grubunda, kaspaz3 ile benzer şekilde, apoptoz ile ilişkisi bulunan, p73 immunreaktivitesinde de granüloza hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken stromal hücrelerdeki immunreaktivitede azalma saptandı. Daha önce yapılan az sayıda çalışmada mir-145'in, p73 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiği gösterilmiştir (148,175,176). Akut promyelositik lösemili hastalar üzerinde yapılan bir araştırmada mir-145 düzeyindeki düşüklüğün p73'ün ekspresyonundaki azalmayla ilişkisi bulunmuştur (175). Çalışmamızdaki ovaryum dokularında, stromal alanda tespit edilen p73 immunreaktivitesindeki azalma mir-145-5p'deki down-regülasyon ile uyumludur. Bu bulgunun FSH etkisi ile erken dönemde ovaryan stromada apoptozun azalmasından kaynaklanıyor olabileceği düşünöldü.

Foliköl maturasyonu gonadotropinler ve ovaryum içi etkileşimler ile düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Özellikle FSH, granüloza hücrelerinden östrojenin üretimi, antral foliküllerin büyüme ve gelişmesi ve dominant foliköl seçimi açısından gereklidir. Daha önceki çalışmalarda FSH'nın granüloza

hücreleri üzerindeki bu fizyolojik etkilerinin protein kinaz A, protein kinaz B, p38-MAPK ve ERK1/2 sinyal yolları üzerinden yaptığı gösterilmiştir. Çalışmamızda FSH'nın bu proliferasyon sürecinde hippo sinyal yolağı elemanları üzerinde de bir etkisinin olabileceğini ve bu yolak üzerinden de etkisini gerçekleştirebileceğini gösterdik. Granüloza hücrelerinin apoptozunu azaltarak antral foliküllerin canlılığını sağlamadaki önemi nedeniyle, yardımcı üreme tekniklerinde ovulasyon öncesi hazırlıkta sıklıkla FSH kullanılmaktadır. Bu sebeple FSH'nın uygulama sonrası etkilerinde hangi yolların aktif olduğu ve bu yollarla ilişkili miRNA'ların tespiti önemlidir. Bu şekilde granüloza hücrelerinin proliferatif süreçte mi olduğu, yoksa apoptoza giderek folikülleri atreziye mi götürdüğü ya da oosit maturasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespiti periferik kandan ilgili miRNA'lar yoluyla tespit edilebilecektir. Bu anlamda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, 6-8 haftalık genç-erişkin dişi Balb-C fareler kullanıldı. Deney grubundaki farelere intraperitoneal olarak 12 saat arayla 4 doz (10,10,5,5 IU) FSH uygulandı. Sham grubundaki farelere deney grubu ile eş zaman ve hacimlerde SF uygulandı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı. İlk dozdan 48 saat sonra sakrifiye edildikten sonra over doku ve kan örnekleri alındı. Doku örneklerine histokimyasal ve anti-YAP1, anti-TEAD3, anti-P73, anti-kaspaz3 ve anti-Bax primer antikorları kullanılarak avidin-biyotin-peroksidaz yöntemi ile indirekt immunohistokimyasal boyamalar uygulandı. Ayrıca qRT-PCR yöntemi ile over dokuları ve kan örneklerinin miR-129-5p ve miR-145-5p ifadeleri belirlendi.

Over dokularının histokimyasal olarak değerlendirilmesi hematoksilin eozin boyası kullanılarak yapıldı. qRT-PCR analizinde, over dokularında, miR-129-5p ve miR-145-5p ifadeleri azalmış olarak tespit edilirken serumda mir-129-5p ifadesi 35. döngüden sonra saptandığı için anlamlı olarak kabul edilmedi ve değerlendirme dışı bırakıldı. miR-145-5p ifadesi serumda azalmış olarak bulundu. Azalan mir-129-5p ve mir-145-5p ifadeleri kısa süreli yüksek doz FSH uygulaması sonrası over dokusunun proliferere olduğunu bir kanıtı olarak değerlendirildi.

Deney grubu YAP1 ve TEAD3 immunreaktivitesinde, granüloza hücrelerinde ve stromada anlamlı artış saptandı. YAP1 immunreaktivitesi granüloza hücrelerinin hem sitoplazma hem de çekirdeklerinde gözlemlendi. YAP1'in ve TEAD3'ün çekirdek immunreaktivitesi, FSH'nın folikül gelişimindeki proliferatif etkisinde hippo sinyal yolağının aktif rol oynadığını düşündürdü.

Stromadaki YAP1 ve TEAD3 immunreaktivitesindeki artış, folikül mikroçevresinin, folikülün gelişimini devam ettirebilmek için daha skiröz bir yapıya dönüşmüş olabileceği şeklinde yorumlandı.

P73 immunreaktivitesinde, deney grubu granüloza hücrelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken stromada azalma saptandı. Bu sonuç bize FSH etkisi altında p73'ün proapoptotik fonksiyonunun baskılandığını düşündürdü.

Bax immunreaktivitesinde ne granüloza hücrelerinde ne de stromal hücrelerde anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Kaspaz3 immunreaktivitesinde, deney grubu granüloza hücrelerinde anlamlı bir değişiklik saptanmazken stromada azalma görüldü. Bu sonuç apoptoza gidiş olmadığı yönünde yorumlandı.

Granüloza hücrelerinin Bax ve kaspaz 3 immunreaktivitelerinde gruplar arası anlamlı bir farklılık olmaması, yüksek doz FSH uygulaması sonrası erken dönemde, granüloza hücrelerinde apoptoza gidiş olmadığını göstermektedir.

Bu çalışmada FSH'nın uyardığı antral foliküllerin gelişimi sırasında granüloza hücrelerinde, YAP1 ve TEAD3 ekspresyonlarının önemli rolünün bulunduğu, ovaryum doku örneklerinde tespit edilen miR-129-5p ve miR145-5p'deki azalmanın ilgili proteinlerin regülasyonu ile ilişkisinin bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

VII. ÖZET

FSH'NİN FARE GRANÜLOZA HÜCRELERİNE ETKİSİNİN HIPPO SİNYAL YOLAĞI PROTEİNLERİ (YAP, TEAD VE P73) VE MİKRORNA'LARI (MİR129-5P VE MİR145-5P) İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Rekombinant gonadotropinler aynı anda birden fazla folikülün gelişiminin uyarılması için yardımcı üreme tekniklerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Ancak FSH'nin (folikül stimülan hormon) aşırı kullanımının folikül gelişimini bozduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Hormonlar, büyüme faktörleri ve miRNA'lar overdeki hücre proliferasyonunu ve homeostazisi Hippo yolağı aracılığıyla düzenlemektedirler. Bu yolağın üyelerinden YAP/TEAD hücrelerin hayatta kalması ve proliferasyonu yönünde etki ederken; YAP/P73 apoptoza gidişi kontrol eder.

Bu çalışmada YAP1/TEAD3 immunreaktivitesi ve bununla ilişkili miR-129-5p ve p73 immunreaktivitesi ve bununla ilişkili miR-145-5p düzeyleri incelenmiştir. Doğrulama amacıyla kaspaz-3 ve bax immunreaktiviteleri değerlendirilmiştir. Yüksek doz FSH uygulamasının granüloza hücreleri üzerindeki etkisinin Hippo sinyal yolağı üzerinden değerlendirilmesi ve bahsi geçen miRNA'lar ile ilişkisinin açıklanması amaçlanmıştır.

Balb/c cinsi, 18 adet, 6-8 haftalık dişi fareler kontrol, sham ve deney grubu olarak üçe ayrılmıştır. Deney grubuna her 12 saatte bir sırasıyla 10-10-5-5 IU/ml olmak üzere toplam 4 doz FSH intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Sham grubuna deney grubuna verilen FSH hacmine eşit miktarda eş zamanlı olarak %0.09 SF yapılmıştır. Fareler son enjeksiyondan 12 sa. sonra sakrifiye edilmiştir. Over dokuları ve kan örnekleri alınarak RT-PCR ve immunohistokimya teknikleriyle analiz edilmiştir.

Over doku kesitlerinin immunohistokimya ile analizinde, granüloza hücrelerinde YAP1 ve TEAD3 immunreaktivitesi artarken p73 ve kaspaz-3 immunreaktivitelerinde değişiklik gözlenmedi. Gruplar arasında Bax immunreaktivitesinde anlamlı farklılık yoktu. MiR-129-5p ve miR-145-5p, FSH uygulaması sonrası downregüle oldu. P73, Kaspaz3 ve Bax'ın granüloza hücrelerinde değişmeyen immunreaktivitesi yüksek doz FSH sonrası atreziye gidiş olmadığını göstermektedir. YAP1 ve TEAD3 immunreaktivitesinde artış ile miR-129-5p ve miR-145-5p düzeylerinde görülen azalma overde proliferatif sürecin baskın olduğunu ve yüksek doz FSH'ın bu etkiyi Hippo sinyal yolağı üzerinden açığa çıkarttığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: FSH, granüloza, Hippo sinyal yolu, miRNA, P73, TEAD3, YAP1

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

EVALUATION OF THE HIGH-DOSE FSH EFFECT ON MICE GRANULOSA CELLS WITH HIPPO SIGNAL PATHWAY PROTEINS (YAP, TEAD AND P73) AND MICRORNAS (MIR129-5P AND MIR145-5P)

Recombinant gonadotropins are widely used in assisted reproductive techniques for the development of many follicles. However, in cases requiring excessive FSH (follicle-stimulating hormone) use, follicle development is also impaired. Hormones, growth factors, or miRNAs in ovaries control cell proliferation and homeostasis by regulating the Hippo pathway. While TEAD/YAP genes in the pathway allow cells to survive; YAP/p73 controls progression to apoptosis.

In this study, TEAD3/YAP1 expressions which also associated miR-129-5p and p73 expression which also associated miR-145-5p levels were investigated. The expressions of the casp3 and bax apoptosis markers were also evaluated for confirmation. It was aimed to reveal the effect of the Hippo pathway on granulosa cells after high-dose FSH administration and link with miRNA reflections.

Eighteen, 6-8 w Balb/c female mice were divided into three groups including control, sham, and FSH groups. FSH group were injected by 10-10-5-5 IU/ml FSH respectively, every 12 hours, 4 doses total. The same amount of saline was applied to sham group. The animals were sacrificed 12 hr after the last injection. Ovary tissues and blood were taken for analysis by RT-PCR and immunohistochemistry technics.

YAP1 and TEAD3 expressions were increased, while p73, caspase-3 expressions weren't changed in granulosa cells in ovary. There was no difference in the bax expression among the groups. MiR-129-5p and miR-145-5p were downregulated in FSH-treated group. The unchanged expression of p73, caspase-3 and bax in granulosa cells indicates no progression to atresia following administration of high-dose FSH. The increase in YAP1 and TEAD3 expressions and the decrease in miR-129-5p and miR-145-5p revealed that the proliferative process is dominant in the ovary and high-dose FSH exerts this effect through the Hippo pathway.

Keywords: FSH, granulosa, Hippo signaling pathway, miRNA, P73, TEAD3, YAP1

IX. KAYNAKLAR

1. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cell Signal* 2006;18:1351–9.
2. YU YS, SUI HS, HAN Z Bin, Wei LI, LUO MJ, TAN JH. Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors. *Cell Res* 2004;14:341–6.
3. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev* 2012;58:44–50.
4. Hsueh AJW, McGee EA, Hayashi M, Hsu SY. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2000;163:95–100.
5. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997;18:739–73.
6. Zhou J, Yao W, Li C, Wu W, Li Q, Liu H. Administration of follicle-stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1 α in mouse granulosa cells. *Cell Death Dis* 2017;8:e3001–e3001.
7. Tang X, Jiang Z. High doses of FSH induce autophagy in bovine ovarian granulosa cells via the AKT/mTOR pathway n.d.:0–1.
8. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev Cell* 2010;19:491–505.
9. Zhao B, Li L, Lei Q, Guan K-L. The Hippo–YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes Dev* 2010;24:862–74.
10. Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 2011;138:9–22.
11. Yu F-X, Guan K-L. The Hippo pathway: regulators and regulations. *Genes Dev* 2013;27:355–71.
12. Pan D. Hippo signaling in organ size control. *Genes Dev* 2007;21:886–97.

13. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004;23:4051–60.
14. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. *J Mol Biol* 2004;339:327–35.
15. Christenson LK. MicroRNA control of ovarian function. *Anim Reprod Bras Reprod Anim* 2010;7:129.
16. Brachova P, Hung W-T, McGinnis LK, Christenson LK. MicroRNA regulation of endocrine functions in the ovary. *Post-transcriptional Mech. Endocr. Regul.*, Springer; 2016, p. 109–27.
17. Donadeu FX, Schauer SN, Sontakke SD. Involvement of miRNAs in ovarian follicular and luteal development. *J Endocrinol* 2012;215:323.
18. Zhang J, Xu Y, Liu H, Pan Z. MicroRNAs in ovarian follicular atresia and granulosa cell apoptosis. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17:1–11.
19. Li Y, Fang Y, Liu Y, Yang X. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *J Ovarian Res* 2015;8:1–8.
20. Lu W, Lu S, Ren Q, Wang W, Chen X, Ye Y, et al. Minireview: New advances in microRNAs related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Adv Biol Med* 2017;2:17–31.
21. Staubesand J. FH. Sobotta Atlas of Human Anatomy. 10th ed. Urban & Schwarzenberg.; 1982.
22. T.W. S. Langman's Medical Embryology. 11th editi. Williams & Wilkins; 2010.
23. Cummings B. an imprint of Addison Wesley Longman. Inc 2001;2:416–34.
24. Keith L. Moore, T. V. N. Persaud MGT. Developing Human- Clinically Oriented Embryolog. vol. 10th Editi. 2016.
25. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. İstanbul Tıp Kitabevi; 2015.
26. Ross MH, Pawlina W. Histology : a text and atlas : with correlated cell and molecular biology. 7th ed. LWW; 2015.
27. Miyano T. In vitro growth of mammalian oocytes. *J Reprod Dev* 2005;51:169–76.
28. Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and cell biology : an introduction to

- pathology. 2019.
29. Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004;228:67–78.
 30. Chu Y-L, Xu Y-R, Yang W-X, Sun Y. The role of FSH and TGF- β superfamily in follicle atresia. *Aging (Albany NY)* 2018;10:305.
 31. INOUE N, MATSUDA F, GOTO Y, MANABE N. Role of Cell-Death Ligand-Receptor System of Granulosa Cells in Selective Follicular Atresia in Porcine Ovary. *J Reprod Dev* 2011;57:169–75.
 32. Gosden RG. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. Gametes the oocyte. Jurgis Geminidas Grudzinskas, John Yovich. United Kingdom, Cambridge University Press; 1995.
 33. HILLIER SG. Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. *Mol Biol Female Reprod Syst* 1994.
 34. Kenigsberg D, Rosenwaks Z, Hodgen GD. Ovarian follicular maturation, ovulation and ovulation induction. *Endocrinol Philadelphia WB Saunders Co* 1995.
 35. Tsafiriri A. Molecular mechanism in ovulation. *Mol Biol Female Reprod Syst* 1994.
 36. Anthony L. Mescher. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 15th ed. McGraw-Hill Education; 2018.
 37. Gartner LP, Hiatt JL. Colour textbook of histology. 3 [sup] rd ed. Philadelphia: Sunders Elsevier 2007.
 38. Prof. Dr. Lale Karakoç, Dr. Necati Fındıklı, Dr. Engin Enginsu, Dr. Elif Ergin, Doç. Dr. Sinan Özkavukçu, Doç. Dr. Evrim Ünsal BB. Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar Teorik Konular ve Pratik Uygulamaları. 1st ed. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri; 2019.
 39. Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro-and anti-apoptotic molecules. *J Reprod Dev* 2006:608220032.
 40. Hsu SY, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis an ovarian perspective. *Trends Endocrinol Metab* 1997;8:207–13.
 41. Heinrich PC. Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, and Graeve L.

- Interleukin-6-Type Cytokine Signal through Gp130/Jak/STAT Pathway
Biochem J 1998;334:297–314.
42. Rosenfeld CS, Wagner JS, Roberts RM, Lubahn DB. Intraovarian actions of oestrogen. *Reproduction* 2001;122:215–26.
 43. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2009;2:9.
 44. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, et al. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:13612–7.
 45. Yang MY, Rajamahendran R. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 2000;62:1209–17.
 46. Zhou XL, Teng Y, Cao R, Fu H, Xiong K, Sun WX, et al. Rescue from dominant follicle atresia by follicle-stimulating hormone in mice. *Genet Mol Res* 2013;12:2945–52.
 47. Regan SLP, Knight PG, Yovich JL, Leung Y, Arfuso F, Dharmarajan A. Involvement of bone morphogenetic proteins (BMP) in the regulation of ovarian function. *Vitam Horm* 2018;107:227–61.
 48. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009:1–8.
 49. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol* 2002;62:609–14.
 50. Parkening TA, Collins TJ, Smith ER. Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiol Aging* 1982;3:31–5.
 51. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle:

- correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 1992;131:1458–66.
52. Byers SL, Wiles M V, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 2012;7:e35538.
 53. Jiang X, Dias JA, He X. Structural biology of glycoprotein hormones and their receptors: insights to signaling. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382:424–51.
 54. Harvey K, Tapon N. The Salvador–Warts–Hippo pathway—an emerging tumour-suppressor network. *Nat Rev Cancer* 2007;7:182.
 55. Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 1995;121:1053–63.
 56. Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Verstreken P, Hiesinger PR, Bellen HJ, et al. Shar-pei mediates cell proliferation arrest during imaginal disc growth in *Drosophila*. *Development* 2002;129:5719–30.
 57. Harvey KF, Pfleger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003;114:457–67.
 58. Pantalacci S, Tapon N, Léopold P. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 2003;5:921–7.
 59. Udan RS, Kango-Singh M, Nolo R, Tao C, Halder G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat Cell Biol* 2003;5:914–20.
 60. 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. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:17474–9.
 61. Dong J, Feldmann G, Huang J, Wu S, Zhang N, Comerford SA, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals. *Cell* 2007;130:1120–33.
 62. Hao Y, Chun A, Cheung K, Rashidi B, Yang X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem* 2008;283:5496–509.

63. Zhang J, Smolen GA, Haber DA. Negative regulation of YAP by LATS1 underscores evolutionary conservation of the *Drosophila* Hippo pathway. *Cancer Res* 2008;68:2789–94.
64. Halder G, Dupont S, Piccolo S. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:591–600.
65. Schroeder MC, Halder G. Regulation of the Hippo pathway by cell architecture and mechanical signals. *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, Elsevier; 2012, p. 803–11.
66. Gaspar P, Tapon N. Sensing the local environment: actin architecture and Hippo signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2014;31:74–83.
67. Yu F-X, Zhao B, Guan K-L. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer. *Cell* 2015;163:811–28.
68. Dupont S. Role of YAP/TAZ in cell-matrix adhesion-mediated signalling and mechanotransduction. *Exp Cell Res* 2016;343:42–53.
69. Sun S, Irvine KD. Cellular organization and cytoskeletal regulation of the Hippo signaling network. *Trends Cell Biol* 2016;26:694–704.
70. https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04390+10413. Hippo signaling pathway - Homo sapiens (human) n.d.
71. Zhang X, Abdelrahman A, Vollmar B, Zechner D. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19:3770.
72. Overholtzer M, Zhang J, Smolen GA, Muir B, Li W, Sgroi DC, et al. Transforming properties of YAP, a candidate oncogene on the chromosome 11q22 amplicon. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103:12405–10.
73. Camargo FD, Gokhale S, Johnnidis JB, Fu D, Bell GW, Jaenisch R, et al. YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells. *Curr Biol* 2007;17:2054–60.
74. Cottini F, Hideshima T, Xu C, Sattler M, Dori M, Agnelli L, et al. Rescue of Hippo coactivator YAP1 triggers DNA damage–induced apoptosis in hematological cancers. *Nat Med* 2014;20:599.
75. Liu C-Y, Zha Z-Y, Zhou X, Zhang H, Huang W, Zhao D, et al. The hippo tumor pathway promotes TAZ degradation by phosphorylating a

- phosphodegron and recruiting the SCF β -TrCP E3 ligase. *J Biol Chem* 2010;285:37159–69.
76. Zhao B, Li L, Lu Q, Wang LH, Liu C-Y, Lei Q, et al. Angiomotin is a novel Hippo pathway component that inhibits YAP oncoprotein. *Genes Dev* 2011;25:51–63.
 77. Oka T, Remue E, Meerschaert K, Vanloo B, Boucherie C, Gfeller D, et al. Functional complexes between YAP2 and ZO-2 are PDZ domain-dependent, and regulate YAP2 nuclear localization and signalling. *Biochem J* 2010;432:461–78.
 78. Benham-Pyle BW, Pruitt BL, Nelson WJ. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and β -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* (80-) 2015;348:1024–7.
 79. Kim N-G, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:11930–5.
 80. Zhang H, Liu C-Y, Zha Z-Y, Zhao B, Yao J, Zhao S, et al. TEAD transcription factors mediate the function of TAZ in cell growth and epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 2009;284:13355–62.
 81. 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;33:10049–64.
 82. Kaneko KJ, Cullinan EB, Latham KE, DePamphilis ML. Transcription factor mTEAD-2 is selectively expressed at the beginning of zygotic gene expression in the mouse. *Development* 1997;124:1963–73.
 83. Ishiji T, Lace MJ, Parkkinen S, Anderson RD, Haugen TH, Cripe TP, et al. Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells. *EMBO J* 1992;11:2271–81.
 84. Kaneko KJ, Kohn MJ, Liu C, DePamphilis ML. Transcription factor TEAD2 is involved in neural tube closure. *Genesis* 2007;45:577–87.
 85. Feng Y, Hang W, Sang Z, Li S, Xu W, Miao Y, et al. Identification of

- exosomal and non-exosomal microRNAs associated with the drug resistance of ovarian cancer. *Mol Med Rep* 2019;19:3376–92.
86. Hogg K, Robinson WP, Beristain AG. Activation of endocrine-related gene expression in placental choriocarcinoma cell lines following DNA methylation knock-down. *Mol Hum Reprod* 2014;20:677–89.
 87. Peng L, Huang Y, Jin F, Jiang S-W, Payne AH. Transcription enhancer factor-5 and a GATA-like protein determine placental-specific expression of the type I human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase gene, HSD3B1. *Mol Endocrinol* 2004;18:2049–60.
 88. Nishioka N, Yamamoto S, Kiyonari H, Sato H, Sawada A, Ota M, et al. Tead4 is required for specification of trophoctoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 2008;125:270–83.
 89. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, Kaneko KJ, Vullhorst D, DePamphilis ML, et al. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 2007;134:3827–36.
 90. Pobbati A V, Hong W. Emerging roles of TEAD transcription factors and its coactivators in cancers. *Cancer Biol Ther* 2013;14:390–8.
 91. Tian W, Yu J, Tomchick DR, Pan D, Luo X. Structural and functional analysis of the YAP-binding domain of human TEAD2. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:7293–8.
 92. Zhao B, Ye X, Yu J, Li L, Li W, Li S, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008;22:1962–71.
 93. Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* 2008;135:4059–69.
 94. Levine AJ, Tomasini R, McKeon FD, Mak TW, Melino G. The p53 family: guardians of maternal reproduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:259–65.
 95. Hu W. The role of p53 gene family in reproduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001073.
 96. Feng Z, Zhang C, Kang H, Sun Y, Wang H, Naqvi A, et al. Regulation of

- female reproduction by p53 and its family members. *FASEB J* 2011;25:2245–55.
97. Holembowski L, Kramer D, Riedel D, Sordella R, Nemajerova A, Dobbstein M, et al. TAp73 is essential for germ cell adhesion and maturation in testis. *J Cell Biol* 2014;204:1173–90.
 98. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27–29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998;2:305–16.
 99. Schmale H, Bamberger C. A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene* 1997;15:1363–7.
 100. Dötsch V, Bernassola F, Coutandin D, Candi E, Melino G. p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a004887.
 101. Yang A, Walker N, Bronson R, Kaghad M, Oosterwegel M, Bonnin J, et al. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* 2000;404:99–103.
 102. Nemajerova A, Kramer D, Siller SS, Herr C, Shomroni O, Pena T, et al. TAp73 is a central transcriptional regulator of airway multiciliogenesis. *Genes Dev* 2016;30:1300–12.
 103. Inoue S, Tomasini R, Rufini A, Elia AJ, Agostini M, Amelio I, et al. TAp73 is required for spermatogenesis and the maintenance of male fertility. *Proc Natl Acad Sci* 2014;111:1843–8.
 104. Tomasini R, Tsuchihara K, Wilhelm M, Fujitani M, Rufini A, Cheung CC, et al. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev* 2008;22:2677–91.
 105. Guasch GLS, Beeler JS, Marshall CB, Shaver TM, Sheng Q, Johnson KN, et al. p73 is required for ovarian follicle development and regulates a gene network involved in cell-to-cell adhesion. *IScience* 2018;8:236–49.
 106. Oka T, Mazack V, Sudol M. Mst2 and Lats kinases regulate apoptotic function of Yes kinase-associated protein (YAP). *J Biol Chem* 2008;283:27534–46.

107. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res* 2010;1803.
108. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97.
109. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* (80-) 2001;294:853–8.
110. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843–54.
111. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403:901–6.
112. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;408:86–9.
113. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III *Drosha* initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425:415–9.
114. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004;432:231–5.
115. Berezikov E, Chung W-J, Willis J, Cuppen E, Lai EC. Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 2007;28:328–36.
116. Han J, Lee Y, Yeom K-H, Nam J-W, Heo I, Rhee J-K, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the *Drosha*-DGCR8 complex. *Cell* 2006;125:887–901.
117. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* (80-) 2004;303:95–8.
118. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123:631–40.

119. Bohnsack MT, Czaplinski K, GÖRLICH D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *Rna* 2004;10:185–91.
120. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363–6.
121. Gao Y, Feng B, Han S, Lu L, Chen Y, Chu X, et al. MicroRNA-129 in human cancers: from tumorigenesis to clinical treatment. *Cell Physiol Biochem* 2016;39:2186–202.
122. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9:102–14.
123. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Curr Top Med Chem* 2013;13:1493–502.
124. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:219–30.
125. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12:861.
126. Baley J, Li J. MicroRNAs and ovarian function. *J Ovarian Res* 2012;5:8.
127. Otsuka M, Zheng M, Hayashi M, Lee J-D, Yoshino O, Lin S, et al. Impaired microRNA processing causes corpus luteum insufficiency and infertility in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1944–54.
128. McBride D, Carr W, Sontakke SD, Hogg CO, Law A, Donadeu FX, et al. Identification of miRNAs associated with the follicularluteal transition in the ruminant ovary. *Reproduction* 2012;144:221.
129. Chen X, Hu H, Guan X, Xiong G, Wang Y, Wang K, et al. CpG island methylation status of miRNAs in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2012;130:1607–13.
130. Yu X, Song H, Xia T, Han S, Xiao B, Luo L, et al. Growth inhibitory effects of three miR-129 family members on gastric cancer. *Gene* 2013;532:87–93.
131. <http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?acc=MIMAT0000209>. miR-

129-5p n.d.

132. Ma N, Chen F, Shen S-L, Chen W, Chen L-Z, Su Q, et al. MicroRNA-129-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell metastasis and invasion via targeting ETS1. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;461:618–23.
133. Yang Y, Huang J-Q, Zhang X, Shen L-F. MiR-129-2 functions as a tumor suppressor in glioma cells by targeting HMGB1 and is down-regulated by DNA methylation. *Mol Cell Biochem* 2015;404:229–39.
134. Li J, Wang H, Ke H, Ni S. MiR-129 regulates MMP9 to control metastasis of non-small cell lung cancer. *Tumor Biol* 2015;36:5785–90.
135. Yu Y, Zhao Y, Sun X-H, Ge J, Zhang B, Wang X, et al. Down-regulation of miR-129-5p via the Twist1-Snail feedback loop stimulates the epithelial-mesenchymal transition and is associated with poor prognosis in breast cancer. *Oncotarget* 2015;6:34423.
136. Dyrskjot L, Ostensfeld MS, Bramsen JB, Silahdaroglu AN, Lamy P, Ramanathan R, et al. Genomic profiling of microRNAs in bladder cancer: miR-129 is associated with poor outcome and promotes cell death in vitro. *Cancer Res* 2009;69:4851–60.
137. Han C, Wang W. MicroRNA-129-5p suppresses cell proliferation, migration and invasion via targeting ROCK1 in osteosarcoma. *Mol Med Rep* 2018;17:4777–84.
138. Tan G, Cao X, Dai Q, Zhang B, Huang J, Xiong S, et al. A novel role for microRNA-129-5p in inhibiting ovarian cancer cell proliferation and survival via direct suppression of transcriptional co-activators YAP and TAZ. *Oncotarget* 2015;6:8676.
139. Li M, Tian L, Wang L, Yao H, Zhang J, Lu J, et al. Down-regulation of miR-129-5p inhibits growth and induces apoptosis in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting APC. *PLoS One* 2013;8.
140. Zhang H, Jia R, Wang C, Hu T, Wang F. Piceatannol promotes apoptosis via up-regulation of microRNA-129 expression in colorectal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2014;452:775–81.
141. Liu Y, Hei Y, Shu Q, Dong J, Gao Y, Fu H, et al. VCP/p97, down-regulated by microRNA-129-5p, could regulate the progression of

- hepatocellular carcinoma. PLoS One 2012;7.
142. Luo J, Chen J, He L. mir-129-5p attenuates irradiation-induced autophagy and decreases radioresistance of breast cancer cells by targeting HMGB1. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2015;21:4122.
 143. Zhang Y, An J, Lv W, Lou T, Liu Y, Kang W. miRNA-129-5p suppresses cell proliferation and invasion in lung cancer by targeting microspherule protein 1, E-cadherin and vimentin. *Oncol Lett* 2016;12:5163–9.
 144. Setijono SR, Park M, Kim G, Kim Y, Cho KW, Song SJ. miR-218 and miR-129 regulate breast cancer progression by targeting Lamins. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;496:826–33.
 145. Sirotkin A V, Ovcharenko D, Grossmann R, Lauková M, Mlynček M. Identification of MicroRNAs controlling human ovarian cell steroidogenesis via a genome-scale screen. *J Cell Physiol* 2009;219:415–20.
 146. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129:1401–14.
 147. [Http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?acc=MIMAT0000437](http://www.mirbase.org/cgi-bin/mature.pl?acc=MIMAT0000437). miR-145-5p n.d.
 148. Boominathan L. The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:613–39.
 149. Kitade Y, Akao Y. MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: microRNAs, miR-143 and-145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug. *J Pharmacol Sci* 2010:1010080465.
 150. Zhang Y, Wen X, Hu XL, Cheng LZ, Yu JY, Wei ZB. Downregulation of miR-145-5p correlates with poor prognosis in gastric cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016;20:3026–30.
 151. Chang Y, Yan W, Sun C, Liu Q, Wang J, Wang M. miR-145-5p inhibits epithelial-mesenchymal transition via the JNK signaling pathway by targeting MAP3K1 in non-small cell lung cancer cells. *Oncol Lett*

- 2017;14:6923–8.
152. Anton L, DeVine A, Sierra L-J, Brown AG, Elovitz MA. miR-143 and miR-145 disrupt the cervical epithelial barrier through dysregulation of cell adhesion, apoptosis and proliferation. *Sci Rep* 2017;7:1–15.
 153. Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009;137:647–58.
 154. Ozen M, Karatas OF, Gulluoglu S, Bayrak OF, Sevli S, Guzel E, et al. Overexpression of miR-145–5p inhibits proliferation of prostate cancer cells and reduces SOX2 expression. *Cancer Invest* 2015;33:251–8.
 155. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* 2009;460:705–10.
 156. Hang W, Feng Y, Sang Z, Yang Y, Zhu Y, Huang Q, et al. Downregulation of miR-145-5p in cancer cells and their derived exosomes may contribute to the development of ovarian cancer by targeting CT. *Int J Mol Med* 2019;43:256–66.
 157. Cui L, Fang L, Mao X, Chang H-M, Leung PCK, Ye Y. GDNF-induced downregulation of miR-145-5p enhances human oocyte maturation and cumulus cell viability. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:2510–21.
 158. Ling YH, Guo XF, Chen T, Ding JP, Ma YH, Chu MX, et al. Characterization and analysis of differentially expressed microRNAs in hircine ovaries during the follicular and luteal phases. *Anim Reprod Sci* 2016;166:47–57.
 159. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
 160. Cheng Y, Feng Y, Jansson L, Sato Y, Deguchi M, Kawamura K, et al. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB J* 2015;29:2423–30.
 161. Ye H, Li X, Zheng T, Hu C, Pan Z, Huang J, et al. The Hippo signaling

- pathway regulates ovarian function via the proliferation of ovarian germline stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2017;41:1051–62.
162. Li J, Zhou F, Zheng T, Pan Z, Liang X, Huang J, et al. Ovarian germline stem cells (OGSCs) and the hippo signaling pathway association with physiological and pathological ovarian aging in mice. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1712–24.
 163. ELI Y. ADASHI, MD, MS, CPE F. *The Ovary*. vol. 53. 3th ed. London: Academic Press; 2019.
 164. Hori N, Okada K, Takakura Y, Takano H, Yamaguchi N, Yamaguchi N. Vestigial-like family member 3 (VGLL3), a cofactor for TEAD transcription factors, promotes cancer cell proliferation by activating the Hippo pathway. *J Biol Chem* 2020;295:8798–807.
 165. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* 2011;474:179–83.
 166. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev* 2015;36:1–24.
 167. Wang Q, Yu J. MiR-129-5p suppresses gastric cancer cell invasion and proliferation by inhibiting COL1A1. *Biochem Cell Biol* 2018;96:19–25.
 168. Liu J, Yang M, Jing L, Ren L, Wei J, Zhang J, et al. Silica nanoparticle exposure inducing granulosa cell apoptosis and follicular atresia in female Balb/c mice. *Environ Sci Pollut Res* 2018;25:3423–34.
 169. Wang J, Liu Y-X, Hande MP, Wong AC, Jin YJ, Yin Y. TAp73 is a downstream target of p53 in controlling the cellular defense against stress. *J Biol Chem* 2007;282:29152–62.
 170. Steuerwald NM, Bermúdez MG, Wells D, Munné S, Cohen J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2007;14:700–8.
 171. Cai G, Ma X, Chen B, Huang Y, Liu S, Yang H, et al. MicroRNA-145 negatively regulates cell proliferation through targeting IRS1 in isolated ovarian granulosa cells from patients with polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci* 2017;24:902–10.
 172. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL.

- Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nat Genet* 1999;21:200–3.
173. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao X-J, Martimbeau S, et al. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ* 1998;5:67–76.
174. Boone DL, Tsang BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biol Reprod* 1998;58:1533–9.
175. Batliner J, Buehrer E, Fey MF, Tschan MP. Inhibition of the miR-143/145 cluster attenuated neutrophil differentiation of APL cells. *Leuk Res* 2012;36:237–40.
176. Boominathan L. The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One* 2010;5:e10615.