

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

**SÜPEROVULASYON UYGULAMASININ DNA
METİLTRANSFERAZ GENLERİNİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma UYSAL

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

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

**SÜPEROVULASYON UYGULAMASININ DNA
METİLTRANSFERAZ GENLERİNİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Fatma UYSAL

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2014.02.0122.013)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 25
Aralık 2015

Tez Danışmanı : Prof Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



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



Üye : Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ
Pamukkale Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri
tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2015
tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ÖZET

Memeli oosit ve erken dönem embriyo gelişiminde, epigenetik mekanizmalardan birisi olan DNA metilasyonu kritik bir öneme sahiptir. DNA metilasyonu, genomdaki CpG ya da CpG olmayan adacıklardaki sitozin nükleotidlerinin 5. karbon atomuna metil grubu takılmasıyla gerçekleştirilir. *De novo*(yeni baştan) ve sürdürme metilasyon mekanizmalarında, DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri rol oynar. Yapılan çalışmalarda, oosit ve erken dönem embriyo gelişiminde DNMT enzimlerinden olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin önemli görevleri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, IVF uygulamaları ve deneysel araştırmalarda sıklıkla kullanılan süperovulasyonun DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin ekspresyonal düzeyleri ve hücre içi yerleşimleri üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Balb/C ırkı 6 haftalık dişi farelerden kontrol, normal doz [5 IU *gebe* kısarak serum gonadotrophini (PMSG)ve 5 IU insan korionik gonadotrophini (hCG)] ve yüksek doz (7.5 IU PMSG ve 7.5 IU hCG) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Belirlenen zaman çizelgesinde toplanan oosit [germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII)] ve erken dönem embriyolarda (1-hücreli ve 2-hücreli) DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin ekspresyonal düzeyleri ve hücre içi yerleşimleri immünofloresan tekniği ile belirlendi. Elde edilen boyanmalar, ImageJ yazılımı ile analiz edilerek göreceli ekspresyonlar belirlenip; One Way Anova istatistiksel testi ile analiz edildi.

Çalışmamızın sonuçlarına göre; DNMT1 ekspresyonu, analiz edilen oosit ve erken dönem embriyolarda nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada daha yoğun gözlenirken membrana yakın bölgelerde ise yoğun şiddette olduğu her üç grupta da belirlenmiştir. DNMT3A ve DNMT3B ekspresyonu, nükleer bölgede yoğun iken, sitoplazmik bölgede ise normal şiddette yerleşim göstermiştir. Ayrıca, DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B protein ekspresyonları normal ve yüksek doz gruplarından elde edilen GV ve MII oosit, 1-hücreli ve 2- hücreli embriyolarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmiştir ($P<0.05$).

Sonuç olarak, bu çalışma ile süperovulasyonun DNMT proteinlerinin ekspresyonal düzeylerini değiştirdiği ilk defa ortaya konulmuştur. Kontrol grubu dışılarından alınan oosit ve embriyolarda bu proteinlerin hücre içi yerleşimleri ilk defa detaylı olarak incelenmiştir. Deneysel çalışmalarda ve yardımcı üreme tekniklerinde sıklıkla kullanılan süperovulasyonun etkisinin oosit ve erken dönem embriyolarda daha detaylı araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNMT, Embriyo, Oosit, İmmünofloresan, Süperovulasyon

ABSTRACT

DNA methylation is one of the epigenetic mechanisms which plays critical role at mammalian oocyte and preimplantation embryo development. DNA methylation materializes by adding a methyl group to the fifth carbon atom of the cytosine residues within cytosine-phosphate-guanine (CpG) and non-CpG dinucleotide sites. DNA methyltransferase (DNMT) enzymes play roles at *de novo* and maintenance methylation processes. In studies, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B which are DNMT enzymes were identified to have important assignments in oocyte and preimplantation embryo development. In this study propose that superovulation which is used frequently in IVF applications and experimental researches that identification expression of protein levels and in subcellular localization of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B.

In this study, three groups were formed which included control, normal dose [5 IU pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG) and 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG)] and high dose (7.5 IU PMSG and 7.5 IU hCG) from 4-5 weeks female mice (BALB/C). Protein expression level and cellular localization of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B were defined by immunofluorescence technique at oocyte [germinal vesicle (GV), metaphase II (MII)] and preimplantation embryos (1-cell and 2-cell) which were picked up in predetermined set of time chart. The images obtained were analyzed by ImageJ software and One Way Anova statistical test so that relative expressions were identified.

According to the results of our study, DNMT1 we identified weak expression pattern in nuclear region, more intensive in cytoplasmic region and the most intensive expression pattern in near the membrane regions at analyzed oocytes and preimplantation embryos for three groups. DNMT3A and DNMT3B expressions have shown intensive localizations in nuclear regions and normal expression in cytoplasmic regions. Additionally, DNMT1, DNMT3A and DNMT3B protein expressions were observed significantly different in normal and high dose groups compared with control groups at GV and MII oocytes, 1-cell and 2-cell embryos ($P<0.05$).

In conclusion, this study has demonstrated for the first time that superovulation alters expression levels of DNMT proteins. Subcellular localizations of these proteins were examined in detail for the first time at oocytes and embryos obtained from a control group of females. Superovulation is commonly used in experimental studies and assisted reproductive techniques that its effect should be further investigated in the oocytes and preimplantation embryos.

Keywords: DNMT, Embryo, Oocyte, Immunofluorescence, Superovulation

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin ilk basamağı olan yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tez projemin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Gökhan Akkoyunlu'ya;

Tezimin projelendirilmesi ve gerçekleştirilmesi sırasında gerek öneri, bilgi ve tecrübeleri gerekse maddi ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan ve akademik bakış açımın gelişmesinde önemli katkısı olan Dr. Saffet Öztürk'e;

Tez projemi gerçekleştirirken bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına;

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına;

Son olarak, eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve her zaman yanımda olup beni destekleyen anneme, babama, kardeşime ve nişanlıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
GİRİŞ	
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	
2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinden Oogoniaların Oluşumu	4
2.2. Memelilerde Oogenez	5
2.3. Memelilerde Folikülogenez	7
2.4. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci	8
2.4.1. Fertilizasyon	8
2.4.2. Memelilerde Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci	9
2.4.3. Zigot Yarıklanmaları	10
2.4.4. Embriyonik Genom Aktivasyonu	10

2.4.5. Kompaksiyon	11
2.4.6. Kavitasyon ve Blastosist Oluşumu	12
2.5. DNA Metilasyonu	12
2.5.1. DNMT'lerin Genel Yapısı ve Görevleri	14
2.5.2. DNMT'ların Belirgin Özellikleri	15
2.5.3. DNMT'lerin Oosit ve Erken Embriyonik Gelişimdeki Ekspresyonları	17
2.6. Süperovulasyon	21
2.6.1. Süperovulasyonun Oogenez ve Erken Dönem Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri	21
2.7. Çalışmanın Hipotezi	25

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Süperovulasyon Protokolü	26
3.1.1. Gonadotropinlerin Hazırlanışı	26
3.1.2. Gonadotropinlerin Uygulanması	26
3.2. Vazektomize Fare Modeli Oluşturulması	26
3.3. Oositlerin Toplanması	27
3.4. Erken Dönem Embriyoların Toplanması	27

3.5.	İmmünofloresan Boyama	28
3.5.1.	Kullanılan Solüsyonlar	28
3.5.2.	Oositlerde ve Preimplantasyon Dönem Embriolarda DNMT Proteinlerinin Gösterilmesi	29
3.5.3.	İmmünofloresan Boyama Yöntem Basamakları	29

BULGULAR

4.1.	İmmünofloresan Bulguları	31
4.1.1.	Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriolarda DNMT1 Ekspresyonu	31
4.1.1.1.	GV Oositlerde DNMT1 Ekspresyonu	31
4.1.1.2.	MII Oositlerde DNMT1 Ekspresyonu	32
4.1.1.3.	1-hücreli Embriolarda DNMT1 Ekspresyonu	33
4.1.1.4.	2-hücreli Embriolarda DNMT1 Ekspresyonu	34
4.1.2.	Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriolarda DNMT3A Ekspresyonu	36
4.1.2.1.	GV Oositlerde DNMT3A Ekspresyonu	36
4.1.2.2.	MII Oositlerde DNMT3A Ekspresyonu	37
4.1.2.3.	1-hücreli Embriolarda DNMT3A Ekspresyonu	38
4.1.2.4.	2-hücreli Embriolarda DNMT3A Ekspresyonu	39
4.1.3.	Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriolarda DNMT3B Ekspresyonu	41
4.1.3.1.	GV Oositlerde DNMT3B Ekspresyonu	41
4.1.3.2.	MII Oositlerde DNMT3B Ekspresyonu	42

4.1.3.3. 1-hücreli Embriyolarda DNMT3B Ekspresyonu	43
4.1.3.4. 2-hücreli Embriyolarda DNMT3B Ekspresyonu	44
TARTIŞMA	47
SONUÇLAR	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AdoMet	:	S-Adenozil Metiyonin
ATRX	:	Sitozin Zengin Çinko Parmak DNA Bağlama
BSA	:	Bovine Serum Albumin
CpG	:	Sitozin Fosfat Guanin
CXXC	:	Sistein Zengin Bölge
DAPI	:	4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride
DNMT	:	DNA Metiltransferaz
eCG	:	Kısrak Koryonik Gonadotropini
E-kaderin	:	Epitelyal kaderin
E2F1	:	E2F transkripsiyon faktör 1
FSH	:	Folikül Stimüle Edici Hormon
GK	:	Lisin- Glisin
GV	:	Germinal Vezikül
hCG	:	İnsan Koryonik Gonadotropini
HDAC1	:	Histon Deasetilaz 1
HDAC2	:	Histon Deasetilaz 2
hSNF2H	:	SNF2 Aile Üyesi ATP-Bağımlı Kromatin Remodeling Enzimi
IVF	:	İn Vitro Fertilizasyon
LH	:	Lüteinize Edici Hormon

MAPK	:	Mitojen Aktive Eden Protein Kinaz
mRNA	:	Mesajcı Ribonükleik Asit
MOS	:	Bir Proto-Onkogen
MII	:	Metafaz II
MPF	:	Maturasyonu Uyarıcı Faktör
NLS	:	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
OMI	:	Oosit Olgunlaşma İnhibitörü
PBD	:	Proliferatif Hücre Nükleer Antijen Bağlama
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz
PFA	:	Paraformaldehit
PGH	:	Primordiyal Germ Hücreleri
PHD	:	Polybromo Homoloji
PMSG	:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
POU5F1	:	POU domain sınıf 5 transkripsiyon faktör 1
PWWP	:	Tetrapeptit Kromatin Bağlama
p21WAF1	:	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 1
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
TDF	:	Testis Belirleyici Faktör
YÜT	:	Yardımcı Üreme Teknikleri
ZP	:	Zona Pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü	4
2.2. Fetal gelişimin 7. haftasında cinsiyet farklılaşması	5
2.3. Oogenez süreci ve olgun oosit oluşumu	7
2.4. Primordiyal germ hücresinden olgun oosit oluşumu ve folikülogenez süreci	8
2.5. Fertilizasyonu gösteren şekil	9
2.6. Fare preimplantasyon embriyo gelişim süreci	10
2.7. Kompaksiyon SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri	11
2.8. DNA metilasyonun genel olarak rol oynadığı mekanizmalar	13
2.9. DNA metilasyonu ve DNA metiltransferazlar	14
2.10. DNA metiltransferazların genel yapısı	15
2.11. Süperovulasyonun çeşitli mekanizmalar üzerine olumsuz etkileri	25
4.1. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları	32
4.2. Metafaz II oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları	33
4.3. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları	34
4.4. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları	35
4.5. Oosit ve erken dönem embriyolarda görel DNMT1	

protein ekspresyonları sonuçları	36
4.6. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları	37
4.7. Metafaz II oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları	38
4.8. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları	39
4.9. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları	40
4.10. Oosit ve erken dönem embriyolarda görel DNMT3A protein ekspresyonları sonuçları	41
4.11. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları	42
4.12. Metafaz II oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları	43
4.13. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları	44
4.14. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları	45
4.15. Oosit ve erken dönem embriyolarda görel DNMT3B protein ekspresyonları sonuçları	46

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. İmmünofloresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları	30
4.1. Oosit ve erken dönem embriyolarda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin hücre içi yerleşimleri	46

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Erkek ve dişi üreme hücreleri primordiyal germ hücrelerinden (PGH) köken almaktadır. Primordiyal germ hücreleri vitellüs kesesinin endoderminde ortaya çıkarlar, ameboid hareketlerle vitellüs kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına doğru göç ederler. Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, her iki cinsiyet içinde tek bir gonad taslağı vardır bu nedenle bu süreç gonadal gelişimin farklılaşmamış dönemi olarak geçmektedir. Cinsiyeti Y kromozomu belirlemektedir. Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi üzerindeki gen tarafından kodlanan ve testis belirleyici faktör (TDF) olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. TDF yokluğunda dişi yönünde bir gelişim olmaktadır [1].

Primordiyal germ hücreleri, dişi gonada ulaştığında oogonyumlara farklılaşırlar. Oogenez, oogonyumların olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen bir süreç olarak bilinmektedir. Bu olgunlaşma süreci, doğumdan önce başlayıp puberte sonrasında tamamlanır. Oogonyumların çoğu mitoz bölünme ile bölünmelerini sürdürürken, bir kısmı bölünmesini I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında duraklayarak primer oositleri oluştururlar. Doğuma kadar var olan primer oositler etraflarındaki tek katlı yassı epitel hücreleri ile birlikte primordiyal folikülü oluştururlar. Bu süreçten sonra foliküller folikülogenez adı verilen bir süreci takip ederler ancak puberte ile birlikte başlayan her ovarial döngüde sadece bir folikül gelişimini tamamlar. Bu süreç sonucunda oluşan en olgun folikül Graaf ya da preovulatuvar folikül olarak adlandırılmaktadır. Ovulasyondan önce I. mayoz bölünme tamamlanır, sekonder oosit ve 1.kutup cisimciği oluşur. Ovulasyonda sekonder oosit II. mayoz bölünmeye başlar ve metafaza kadar ilerleyip bu aşamada duraklar. Eğer bir sperm sekonder oositi fertilize ederse mayoz bölünme tamamlanır. Bu durumda, fertilize olmuş oosit ve ikinci kutup cisimciği oluşmaktadır. İkinci kutup cisimciği de, birinci kutup cisimciği gibi küçük, işlevsel olmayan ve kısa süre içinde dejenere olan bir hücredir. İkinci kutup cisimciği atıldığında oosit maturasyonu tamamlanır [2].

Fertilizasyonu takiben oluşan embriyo, Fallop tüplerinden uterusu doğru ilerlemekte ve bu aşamada da implantasyona hazırlanmaktadır. Fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan zigotun endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç, preimplantasyon embriyo gelişim süreci olarak bilinmektedir [3]. Preimplantasyon embriyo gelişim süreci, zigotun yarıklanma bölünmelerine başlaması, embriyonik genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist oluşumu aşamalarını içermektedir. Bu aşamalar tüm memelilerde benzerdir. Fare embriyolarının 1- hücreli embriyo aşamasından (zigot) blastosist aşamasına kadar gelişmeleri yaklaşık 3.5 günde tamamlanmaktadır.

Memelilerde normal oogenez ve erken dönem embriyo gelişimi süreçlerinde epigenetik mekanizmalar önemli rol oynamaktadır. Epigenetik mekanizmalar, doğrudan veya dolaylı olarak gen ifadesini kontrol etmektedirler. Doğrudan gen ifadesini kontrol eden süreçlerden bir tanesi DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, genomdaki CpG (sitozin fosfat guanin) ya da CpG olmayan adacıklardaki sitozin nükleotidlerinin 5. karbon atomuna metil grubu takılmasıyla gerçekleştirilir [4]. Bu zamana kadar *de novo* (yeni baştan) ve sürdürme metilasyonu olmak üzere iki farklı metilasyon çeşiti tanımlanmıştır. *De novo* metilasyon, metillenmemiş DNA zincirinin ilk defa metilasyonu iken sürdürme metilasyonu ise DNA replikasyonundan sonra yarı metillenmiş DNA zincirinin metilasyonu olarak tanımlanmaktadır. Her iki mekanizmada da, DNA metilasyonu DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir. Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olmak üzere 5 adet DNMT enzimi vardır [5]. DNMT1 enzimi, DNA replikasyonunu takiben yarı-metillenmiş DNA zincirini metilleyerek sürdürme metilasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu enzim, mitotik aktivite gösteren hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmektedir [6]. DNMT2 hem yapısal hemde fonksiyonel olarak diğer DNMT'lerden farklıdır, çünkü N-terminal düzenleyici domain içermemektedir [7]. Ayrıca, DNMT2 DNA'yı metillemek yerine aspartik asit tRNA'sının antikodon ilmiğindeki sitozin 38'i metillemektedir [8]. DNMT3A ve DNMT3B, *de novo* metilasyonu gerçekleştiren öncül enzimlerdir. Her ne kadar DNMT3A yüksek oranda CpG adacıklarındaki metilasyondan sorumlu olsada CpA, CpT ve CpG alanlarındaki sitozinin metilasyonunda da görev almaktadır [9-11]. DNMT3L, nükleer bir proteindir ve metiltransferaz aktif bölge motiflerini içermediği için aktif olarak metilasyona katılamamaktadır ancak DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin karboksi terminal domainlerine bağlanarak bu enzimlerinin aktivitelerini indüklemektedir [12].

Yapılan çalışmalarda yardımla üreme teknolojileri ile doğan çocuklarda epigenetik anomalilerin arttığını vurgulamışlardır [13-16]. Bir yardımla üreme yöntemi olan ve özellikle infertilite tedavilerinde sıklıkla kullanılan süperovulasyon, dışarıdan hormonal müdahaleyle genital döngüyü kontrol altına alarak, normal fizyolojik koşullarda elde edilebilen kalitede fakat çok daha fazla sayıda ve eş zamanlı olarak oosit ve embriyo elde etmek olarak tanımlanabilmektedir. Deney hayvanlarında süperovulasyon protokollerinde sıklıkla kullanılan moleküller gebe kısrak serum gonadotropin (PMSG) [17] ve insan koryonik gonadotropin (hCG)'dir [18]. Çalışmalarda süperovulasyon uygulamasının oosit kalitesi, fetal büyüme geriliği, imprinting hastalıklar, anormal blastosist sayısı, gen ekspresyonları, embriyonik gelişimde gecikme gibi çeşitli süreçleri olumsuz etkilediği gösterilmiştir [14, 15, 19-22].

Çalışmanın Hipotezi: Yardımla üreme teknikleri ile doğan çocuklar doğal yolla dünyaya gelen çocuklarla karşılaştırıldığında artmış epigenetik anomalilerin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bir yardımla üreme yöntemi olan süperovulasyonun da çeşitli mekanizmaları olumsuz etkilediği rapor edilmiştir. Literatürde süperovulasyon uygulamasının çeşitli imprinting genlerdeki metilasyonu etkilediğini, genlerin doğru metillenmemesi

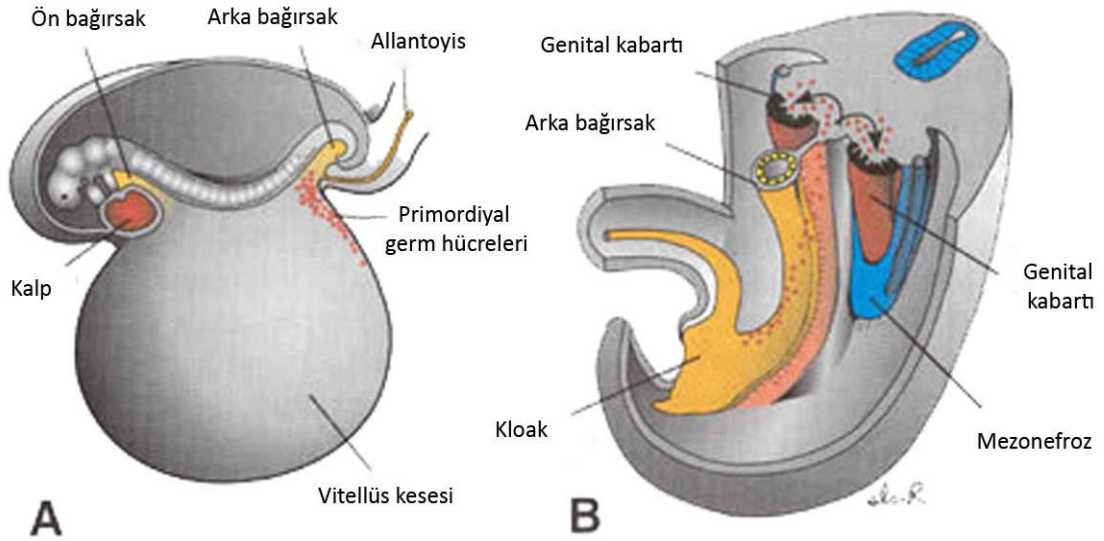
sonucunda ise gen ekspresyonlarında değişimler olduğu bildirilmiştir. Ancak metilasyonu primer olarak gerçekleştiren DNMT enzimlerinden mi anormal metilasyonun gerçekleştiği henüz net olarak bilinmemektedir. Litaratürden yola çıkarak, normal doz ve yüksek doz süperovulasyon uygulamasının DNA metilasyonunda görev yapan protein ifadelerine etkisini, oosit ve preimplantasyon dönemindeki embriyo gelişimi aracılığıyla fare deney modelinde gösterebileceğimiz hipotezini kurduk..

Bu alışmada Balb/C ırkı 4-6 haftalık dişi farelerden kontrol, normal doz [5 IU *gebe* kısarak serum gonadotrophini (PMSG) ve 5 IU insan korionik gonadotrophini (hCG)] ve yüksek doz (7.5 IU PMSG ve 7.5 IU hCG) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Belirlenen zaman çizelgesinde toplanan oosit [germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII)] ve erken dönem embriyolarda (1-hücreli ve 2-hücreli) DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin ekspresyonal düzeyleri ve hücre içi yerleşimleri immünofloresan tekniği ile belirlendi. Elde edilen boyanmalar, ImageJ yazılımı ile analiz edilerek göreli ekspresyonlar belirlenip; One Way Anova istatistiksel testi ile analiz edildi.

GENEL BİLGİLER

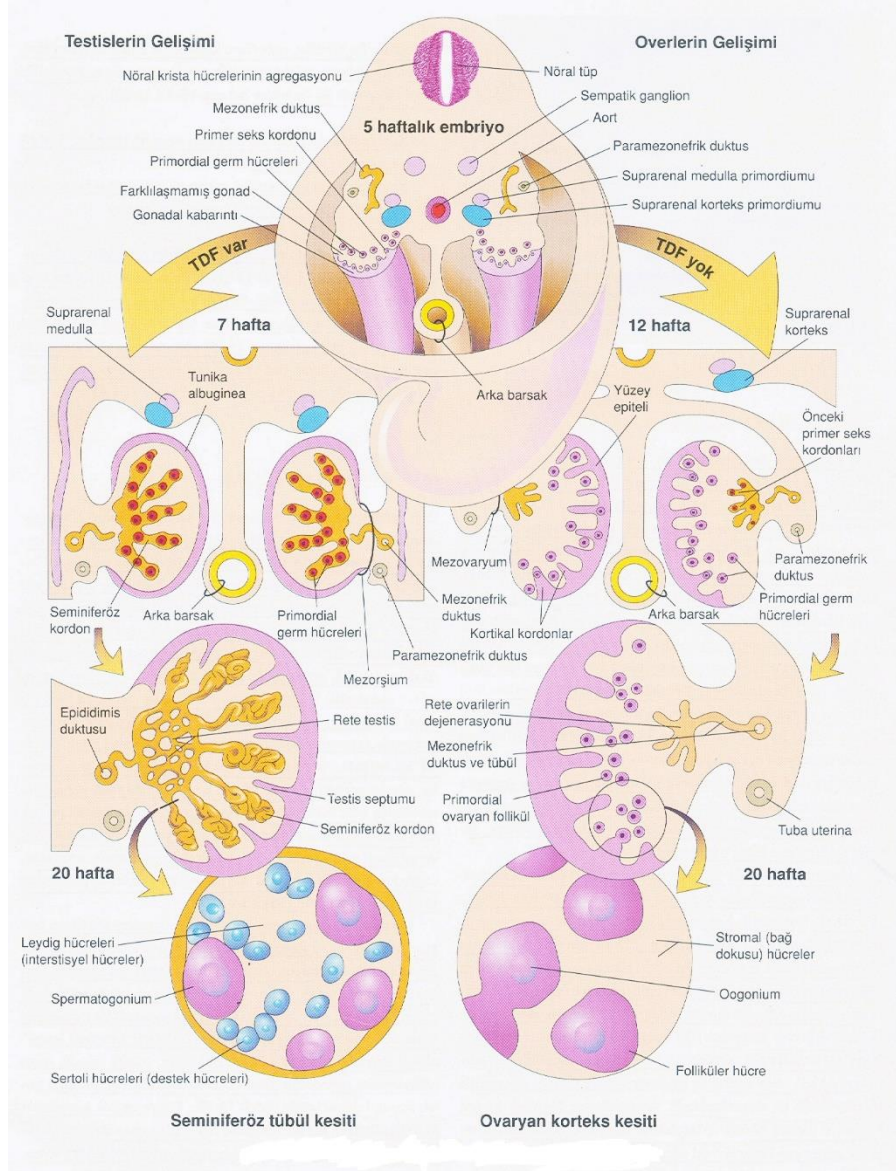
2.1. Primordiyal Germ Hücrelerinden Oogoniaların Oluşumu

Primordiyal germ hücreler, ilk olarak 4 haftalık fetüste vitellüs kesesi duvarının endoderminde ortaya çıkarlar. Dördüncü ve altıncı haftalara arasında, yaklaşık 10-100 primordiyal germ hücresi ameboid hareketlerle vitellüs kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca arka vücut duvarının sağ ve sol yanlarına doğru göç ederler (Şekil 2.1). Primordiyal germ hücrelerinin göçü, alkalen fosfataz enzimi ile izlenebilir çünkü bu hücrelerin plazma membranlarında yüksek oranda alkalen fosfataz enzimi bulunmaktadır. Bu hücrelerin göçü ve çoğalması, bir tirozin kinaz olan c-kit reseptörü ve ona uyan hücre membran ligandı olan kök hücre faktörü ile etkileşimine bağlıdır. Arka vücut duvarında, mezenşim içerisinde bulunan yaklaşık 2500-5000 primordiyal germ hücresi, mezonefroz ve sölomik örtü epitel hücrelerini genital kabarıklık oluşturmak üzere uyarırlar. Sölomik epitelyal kordonlar, farklılaşmamış gonadın dışta korteks ve içte medulla bölgelerini oluştururlar[1].



Şekil 2.1. Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü[2].

Fetal gelişimin 7. haftasına kadar, her iki cinsiyet içinde tek bir gonad vardır bu nedenle bu süreç gonadal gelişimin farklılaşmamış dönemi olarak geçmektedir. Yedinci haftadan sonra dişi yönünde bir farklılaşma olacaksa korteks gelişmekte medulla gerilemekte iken erkek yönünde ise medulla gelişmekte ve korteks gerilemektedir. Cinsiyeti Y kromozomu belirlemektedir. Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi üzerindeki gen tarafından kodlanan ve testis belirleyici faktör (TDF) olarak adlandırılan bir transkripsiyon faktörü tarafından kontrol edilmektedir. TDF yokluğunda dişi yönünde bir gelişim olmaktadır (Şekil 2.2) [23] [1].

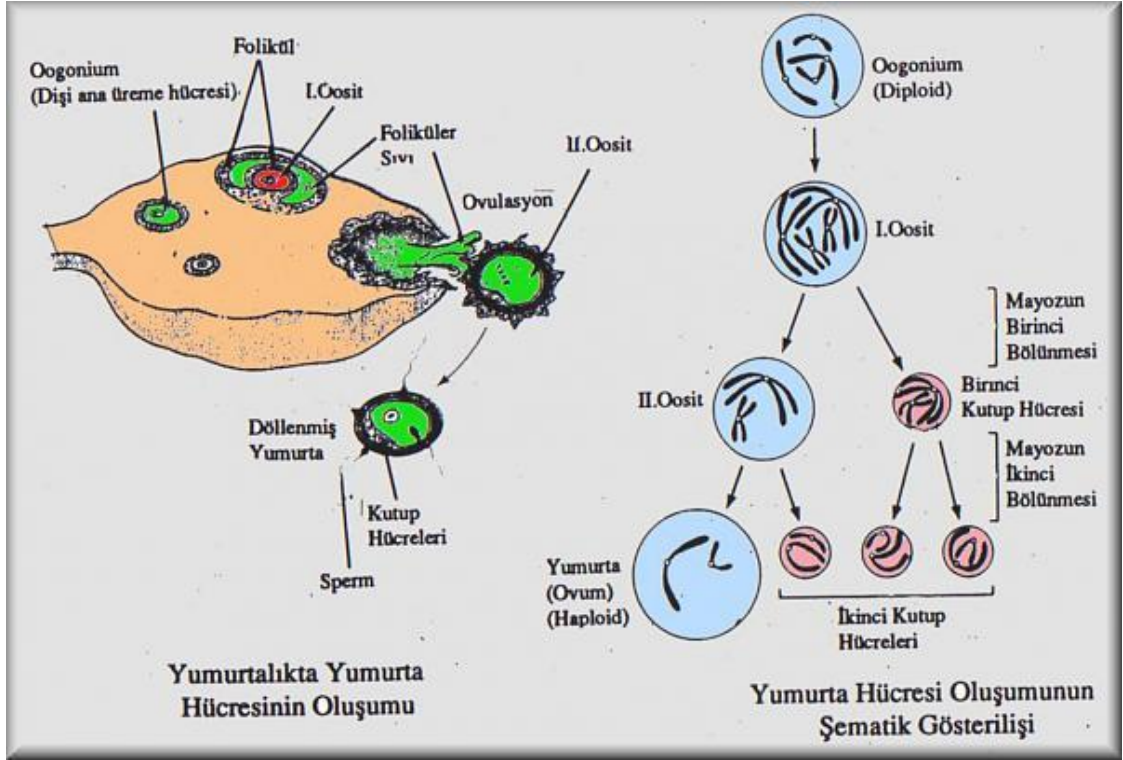


Şekil 2.2. Fetal gelişimin 7. haftasında cinsiyet farklılaşması [23].

2.2. Memelilerde Oogenez

Primordiyal germ hücreleri, dişi gonada ulaştığında oogonyumlara farklılaşırlar. Oogenez, oogonyumların olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen bir süreç olarak bilinmektedir. Bu olgunlaşma süreci, doğumdan önce başlayıp puberte sonrasında tamamlanır. Erken fetal yaşamda, oogonyumlar mitoz bölünme ile çoğalmaktadırlar ancak yaklaşık 3. aydan sonra, bölünmenin durmasıyla beraber yeni germ hücresi oluşmaz. Germ hücre kisti adı verilen primordiyal foliküllere dönüşecek, sonlanmamış sitokinez nedeniyle aralarındaki sitoplazmik köprülerin izlendiği germ hücre grupları belirginleşir [24]. Mitoz ile çoğalma durduktan sonra hacimsel büyüme başlar. Doğumdan önce, oogonyumlar DNA'larını kopyalayarak birinci mayoz bölünmeye başlayacak olan primer oositleri oluştururlar ancak

bölünme aşamasını tamamlayamazlar. Primer oosit geliştiğinde ovaryuma ait stroma hücreleri ile sarılır ki bu yapı foliküler epitel hücrelerini meydana getirir. Yassı epitel hücreleri ile çevrelenmiş primer oosit, primordiyal folikül olarak tanımlanmaktadır. Primer oosit, ilk mayoz bölünmesine doğumdan önce başlar fakat bölünme tamamlanmaz ve puberteye kadar profaz I aşamasında beklemektedir. Bu aşamadaki oosit, profaz I (PI) yada germinal vezikül (GV) oosit olarak adlandırılmaktadır. Bu süre boyunca, oositin olgunlaşması folikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden madde oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI) tarafından baskılanır. Böylece, insanda 40-50 yıl kadar sürebilecek olan oldukça uzun süren bu aşamada mayoz bölünme devam etmeden oositin hacmi artar. Buna göre, doğumdaki primer oositler 46 kromozom içerirler ve her biri kardeş kromatid içermektedir. Puberte ile birlikte her ay birçok (insanda 10-12 kadar) primer oosit gelişir, ancak bunlardan yalnızca biri gerçek olgunluğa ulaşarak ilk mayotik bölünmeyi gerçekleştirir (Şekil 2.3). Mayotik olgunlaşma süreçlerinden geçecek olan oositte ilk olarak germinal vezikül yıkılmaktadır ki bu aşamadaki oosit metafaz I (MI) oosit olarak adlandırılır. Ovulasyondan önce birinci mayoz bölünme tamamlanır, sekonder oosit ve birinci polar cisimcik oluşur. Polar cisimcik, kısa süre içinde dejenere olan ve işlevsel olmayan küçük bir hücredir. Oositte mayozun sürdürülebilmesi ve tamamlanması maturasyonu uyaran faktör (MPF), bir proto-onkogen (MOS), ve mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK) faktörlerinin birbirleri ile uyumlu çalışmasına bağlıdır. MPF, GV'nin yıkılması ile aktive olur ve farelerde oositi mayoza yönlendirir. NOS/MAPK yolu ise metafazda içcik oluşumu, MI-MII geçişinde, DNA replikasyonunun baskılanması ve MII aşamasındaki duraklamanın sürdürülmesi gibi süreçlerde rol oynamaktadır [25, 26]. Ovulasyonda sekonder oosit II. mayoz bölünmeye başlar ve metafaza kadar ilerleyip bu aşamada tekrar duraklar. Eğer bir sperm sekonder oositi fertilize ederse mayoz bölünme tamamlanır. Bu durumda, fertilize olmuş oosit ve ikinci polar cisimcik oluşmaktadır (Şekil 2.3). İkinci polar cisimcik de, birinci polar cisimcik gibi küçük, işlevsel olmayan ve kısa süre içinde dejenere olan bir hücredir. İkinci polar cisimcik atıldığında oosit maturasyonu tamamlanır.



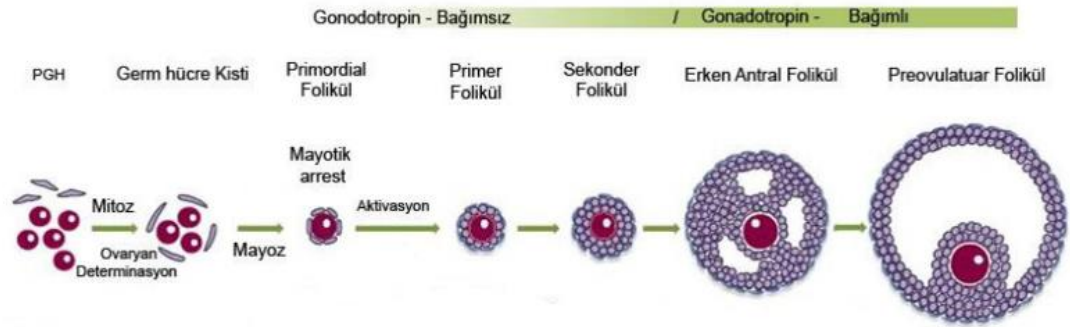
Şekil 2.3. Oogenez süreci ve olgun oosit oluşumu[27].

Sonuç olarak, dişi ana germ hücresi olan oogoniumdan olgun bir oositin gelişme ve olgunlaşma süreci olan oogenez tamamlanmış olur. Olgun bir insan oosit, 150-180 μm çapında büyük ve hareketsiz bir hücredir. Farede ise olgun oosit 90 μm olarak bilinmektedir. Sitoplazması besin maddelerinden zengindir ki fertilizasyondan sonra uterusu yerleşene kadar zigota gerekli olan besin maddelerini sağlar. Fertilize olmamış oosit, ovulasyondan 24-48 saat sonra canlılığını kaybederek dejenere olur.

2.3. Memelilerde Folikülogenez

Puberteye ulaşıldığında ovaryum primordiyal foliküllerden oluşan bir folikül havuzuna sahiptir ve her ovaryal siklusta bu foliküllerden 5-15 tanesi ovulasyon ile gelişerek olgunlaşır ki bu süreç folikülogenez olarak bilinmektedir. Gelişen foliküllerden sadece 1 ya da 2 tanesi ovulasyonla atılırken kalan foliküller ise atretik foliküle dönüşmektedir. Primordiyal folikül, primer yada preantral folikül, sekonder yada antral folikül ve Graaf, tersiyer yada preovulator folikül olmak üzere 3 aşamadan geçerek olgunlaşır (Şekil 2.4). Profaz aşamasında beklemekte olan primer oosit büyümeye başladığında oositin saran yassı epitel hücreleri kübikleşir ve çoğalmaya başlar. Çoğalan bu hücreler, granuloza hücreleridir. Bu aşamada ki folikül, primer folikül olarak bilinmektedir. Bu dönemde, primer oosit granuloza hücreleri ve oosit tarafından salgılanan glikoprotein yapısında olan “zona pellusida (ZP)” adı verilen bir kılıf ile sarılmaktadır. Granuloza hücreleri ise stromal hücrelerin oluşturduğu teka tabakasından bir bazal membran ile ayrılırlar. Folikül gelişmeye devam ettikçe teka tabakası içte teka interna

dışta ise teka eksterna tabakalarını oluşturur. Daha sonra oluşan foliküler aşama ise sekonder foliküldür, bu folikül kalınlaşmış ZP ve küçük antrumların (boşluk) oluşumu ile karakterizedir (Şekil 2.4). Folikül hücreleri arasında sıvı dolu boşlukların birleşmesiyle tek büyük bir antrum oluşmaktadır. Böylece, sekonder folikül lüteinize edici hormon (LH)'ın etkisiyle preovulator evreye girmektedir. Bu aşamadaki folikül ise Graaf veya preovulator folikül olarak isimlendirilmektedir ki folikülogenezin en olgun ve en büyük folikülüdür (Şekil 2.4). Eksentrik duruşlu primer oosit içeren preovulator folikül, tek bir antrum ile karakterizedir. Ovulasyondan birkaç saat önce I. mayoz tamamlanır ve sekonder oosit oluşur.



Şekil 2.4. Primordiyal germ hücresinden olgun oosit oluşumu ve folikülogenez süreci. Sanchez ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmadan değiştirilerek alınmıştır [28].

Ovaryumda foliküllerin; oositi korumak, olgunlaştırmak, ovulasyonu sağlamak, implantasyon için hazırlık yapmak gibi temel amaçları mevcuttur. Folikül gelişimi başlangıçta gonadotropinlerden bağımsız olarak meydana gelmektedir. Primordiyal foliküller gonadotropinlerden bağımsız olarak dinlenme evresinden çıkıp gelişmeye başlarlar. Bu süreçte, çeşitli sinyal mekanizmalarının ve büyüme faktörlerinin rol oynadığı bilinmektedir [29]. Folikül antral foliküle geliştiğinde ise gonadotropinlere bağımlı dönem başlamaktadır. Bu süreçte ise Folikül uyarıcı hormon (FSH ve Luteinizing Hormon (LH) görev almaktadır.

2.4. Fare Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci

2.4.1. Fertilizasyon

Dişi ve erkek gametlerin birbiriyle birleşip kaynaşmasına fertilizasyon (döllenme) denir. Fertilizasyon, uterus tüplerinin (Fallop) ampulla bölgesinde gerçekleşir ki bu bölge tüpün en geniş ve ovaryuma yakın kısmıdır. Fertilizasyon sonucu oluşan döllenmiş oosit, zigot olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.5) [2].

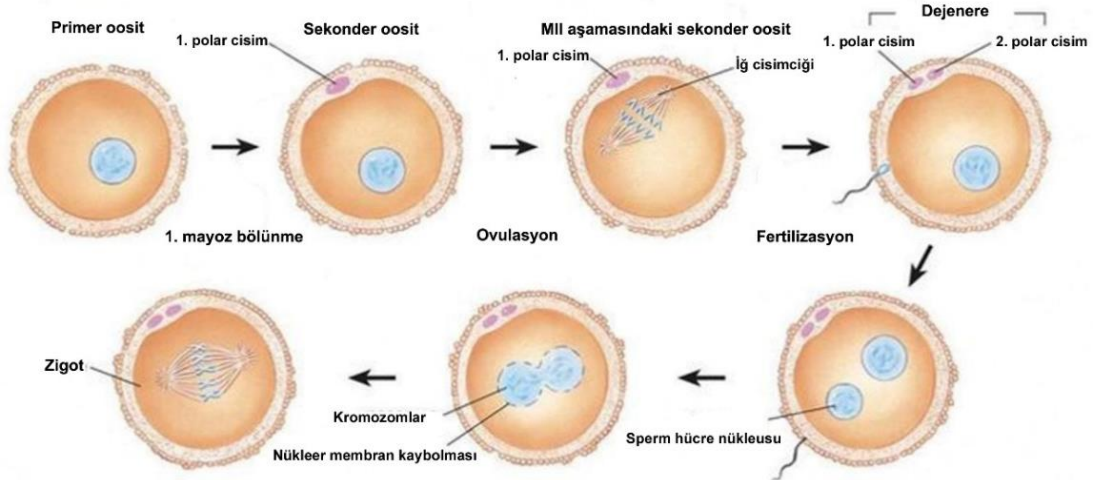
Fertilizasyon üç aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada kapasitasyonunu tamamlayan sperm, sekonder oositi saran ilk sıra hücre tabakası olan korona radiatayı delip geçmektedir. İkinci aşamada ise spermin akromozomal reaksiyonu tamamlamasıyla sahip olduğu akromozomal enzimler yardımıyla zona pellusidayı geçmektedir. Fertilizasyonun son

aşamasında ise oosit ve sperm hücre membranlarının kaynaşması ile fertilizasyon tamamlanır[2].

Spermin oosit sitoplazmasına girmesiyle II. mayoz bölünme tamamlanır ve bölünme sonucu oluşan hücrelerden çok az bir sitoplazmaya sahip olan ikinci polar cisim, diğeri ise MII oosit olarak isimlendirilir. Bu sekonder oositin kromozomları (22+X) dişi pronükleus olarak adlandırılan bir çekirdek içinde yeniden düzenlenirler[2].

Fertilizasyonun temel sonuçları ise genel olarak 3 aşamada özetlenebilir:

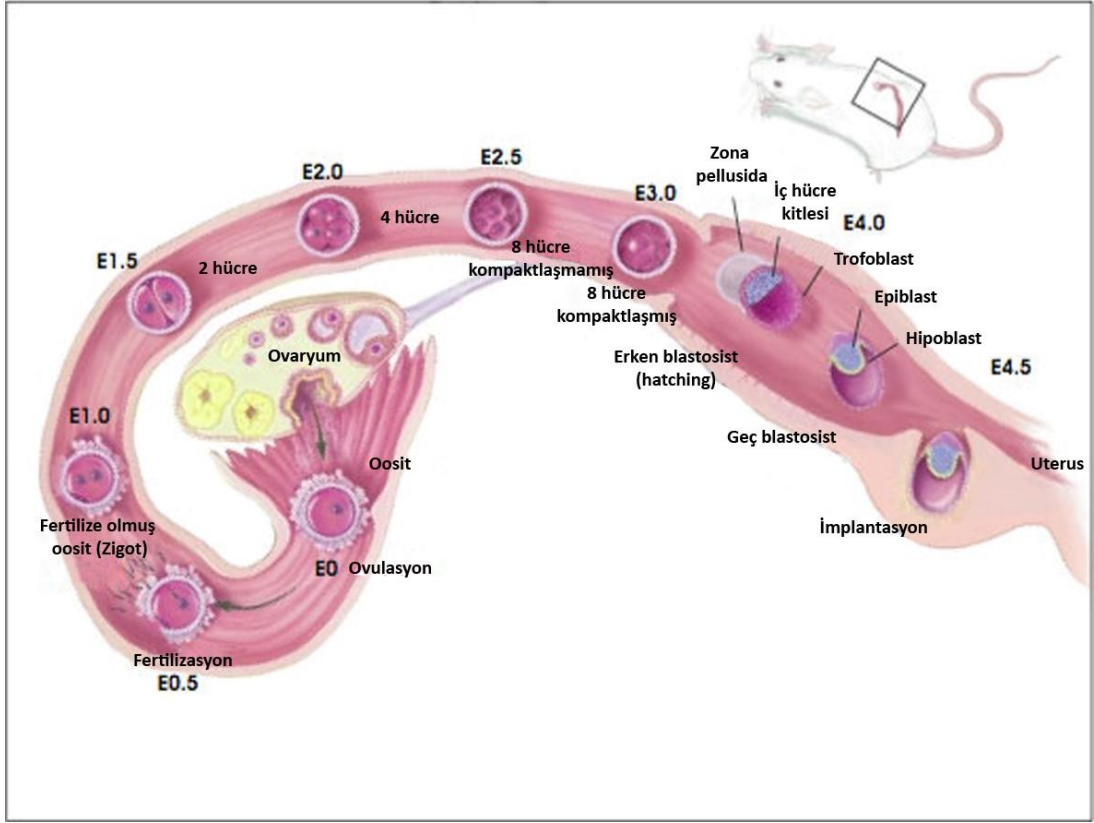
- Yarıısı anneden, yarıısı babadan gelen kromozomların diploid sayısının yeniden düzenlenmesiyle oluşan zigotun hem anneden hemde babadan gelen kromozomal içeriğe sahiptir.
- Yeni oluşacak canlının cinsiyetinin belirlenmesi: X kromozomu taşıyan sperm, dişi bir embriyo (XX), Y kromozomu taşıyan sperm ise erkek bir embriyo (XY) oluşmasına imkan sağlamaktadır.
- Yarıklanma (cleavage) yani embriyonik ilk mitotik bölünme olayı fertilizasyon ile başlatılmaktadır.



Şekil 2.5. Fertilizasyonu gösteren şekil[30].

2.4.2. Memelilerde Preimplantasyon Embriyo Gelişim Süreci

Fertilizasyonu takiben oluşan embriyo, Fallop tüplerinden uterusu doğru ilerlemekte ve bu aşamada da implantasyona hazırlanmaktadır. Fertilizasyonun gerçekleşmesinden sonra oluşan zigotun endometriyuma implante olana kadar geçirdiği süreç, preimplantasyon embriyo gelişim süreci olarak bilinmektedir (Şekil 2.6) [3]. Preimplantasyon embriyo gelişim süreci, zigotun yarıklanma bölünmelerine başlaması, embriyonik genom aktivasyonu, kompaksiyon, kavitasyon ve blastosist oluşumu aşamalarını içermektedir. Bu aşamalar tüm memelilerde benzerdir.



Şekil 2.6. Fare preimplantasyon embriyo gelişim süreci [31].

2.4.3. Zigot Yarıklanmaları

Erken dönem embriyo, iki pronükleuslu zigot aşamasından iki hücre embriyo evresine ulaştıktan sonra bir seri mitotik bölünmeye girerek hücre sayısını artırır. Her yarıklanma sonucunda oluşan hücrelerin hacmi giderek küçülür ki bu hücrelerin her birine blastomer denir ve sekiz hücreli embriyo aşamasına kadar gevşek bir hücre kümesi görünümündedir[2]

Farede birinci yarıklanma fertilizasyondan bir gün sonra gerçekleşmektedir. Bu yarıklanmanın pozisyonu hakkında farklı görüşler olsa da [32-34], ilk yarıklanma ekseninin kutup cisimlerinin pozisyonu ile ilişkili olduğu kabul görmüştür. Plazma membranı ile ZP arasında yer alan I. ve II. kutup cisimlerinin olduğu yerleşimde plazma membranı içeri doğru çöker ve ilk bölünme bu çökük olan noktadan başlayıp karşı tarafa doğru devam eder[3]. Fare embriyolarının 1- hücreli embriyo aşamasından (zigot) blastosist aşamasına kadar gelişmeleri yaklaşık 3.5 günde tamamlanmaktadır.

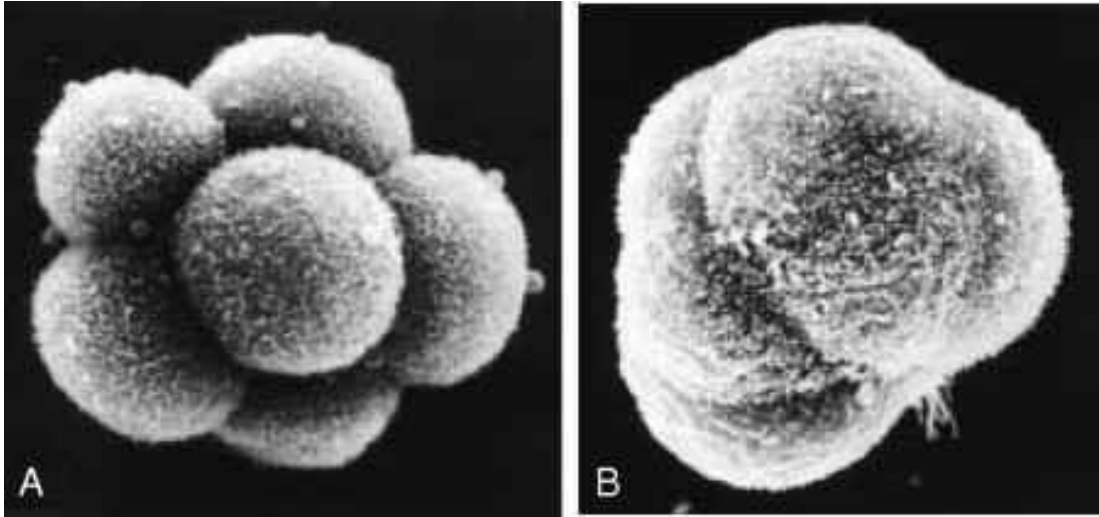
2.4.4. Embriyonik Genom Aktivasyonu

İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresindeki oositte transkripsiyonun durmasıyla beraber mesajcı ribonükleik asit (mRNA) translasyonu da azalmaktadır. Fare embriyoları, 2- hücreli embriyo aşamasına kadar protein sentezini maternal mRNA'ları kullanarak gerçekleştirmektedirler. Ancak 2- hücreli embriyo aşamasında maternal transkript rezervi tükenmeye

başlamakta ve özellikle zigot aşamasında, bu aşamaya özgü genlerin eksprese olması ile birlikte embriyonik gen aktivasyonu başlar ve 2- hücreli embriyo aşamasında tamamlanır. Bu süreçten sonra gelişecek embriyolar artık protein sentezi için maternal mRNA'lar yerine kendi mRNA'larını kullanmaya başlamaktadırlar. Embriyonik genom aktivasyonu türler arasında farklılıklar göstermektedir: Farede 2- hücreli embriyo aşamasında[35], insanda 4-8 hücreli embriyo aşamasındaiken [36, 37]sığırdı ise 8-16 hücreli embriyo aşamasında meydana gelmektedir [38]

2.4.5. Kompaksiyon

Blastomerler sekiz hücre embriyo aşamasına kadar gevşek bir hücre kümesi iken üçüncü yarıklanmanın ardından birbirleriyle daha sıkı temas kurarak kompakt bir hücre grubu haline gelirler (Şekil 2.7). Bu süreç, hücre yüzey adezyon glikoproteinleri ve özellikle epitelyal kaderin (E-kaderin) tarafından gerçekleştirilir. Aynı zamanda hücre bağlantı komplekslerinin artması ile hücreler arası etkileşim de artmaktadır. Kompaksiyon olarak bilinen bu süreçte, iç hücreler dış hücrelerden ayrılırlar. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra, kompakt haldeki embriyo tekrar bölünür ve bu aşamadaki embriyo16-hücreli morula olarak adlandırılır. Morulanın iç hücreleri, iç hücre kitlesini oluştururken dış hücreleri de dış hücre kitlesini oluşturmaktadır. İç hücre kitlesinden embriyonun üç germ tabakasına ait dokuları, dış hücre kitlesinden ise plasentayı oluşturacak olan trofoblastlar gelişmektedir [2].



Şekil 2.7. Kompaksiyon SEM (Taramalı Elektron Mikroskop) görüntüleri. **A)**Kompaktlaşmamış 8 hücreli embriyo, **B)** Kompakt morula [2].

2.4.6. Kavitasyon ve Blastosist Oluşumu

Kompaksiyonun tamamlanması ile birlikte kavitasyon başlamaktadır. Kavitasyon blastosöl oluşumunu tetiklemektedir. Bu süreçte, trofoektoderm

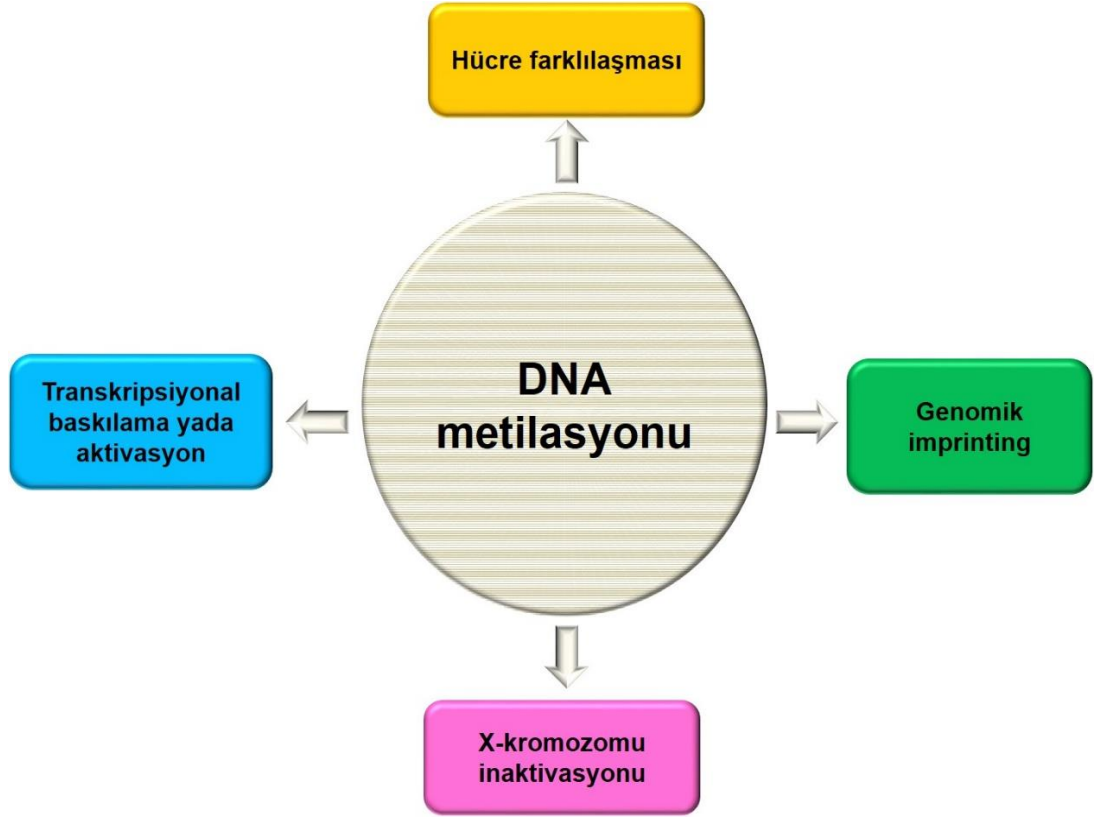
hücreleri sıkı bağlantı kompleksleri ile bir araya gelmiştir ve yassılaşıp epitelial hücre karakterindedir. Yaklaşık olarak 32-hücreli embriyo aşamasına gelindiğinde trofoektoderm hücreleri gerek hücre içi gerekse hücre dışı alanlara sıvı pompalayarak blastosist kavitesini oluşturmaya başlamaktadır.

Morula uterusu ulaştığında, uterus boşluğundaki var olan sıvı zona pellusidayı geçer ve iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna sızarak orada toplanmaya başlar. Genişleyen hücrelerarası boşlukların birbirleriyle birleşmesiyle blastosöl denilen tek bir boşluk oluşur. Bu aşamada, embriyo blastosist olarak adlandırılmaktadır. Blastosistin bir kutbunda yerleşmiş olan iç hücre kitlesi embriyoblast, dış hücre kitlesi de trofoblast olarak isimlendirilir. Trofoblastlar yassılaşıp blastosistin epitelial duvarını oluştururlar. Bu aşamadan sonra ZP kaybolur ve embriyonun endometriyuma implantasyonu gerçekleşir [2].

Memeli oogenez ve erken dönem embriyonik gelişimi için birçok genin belirli zamanlarda eksprese edilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu genlerin ekspresyonel kontrollerinde belirli epigenetik mekanizmalar görev almaktadır. Bu mekanizmalarından birisi olan DNA metilasyonu oogenez ve erken embriyo gelişim dönemlerinde oldukça kritik bir öneme sahiptir.

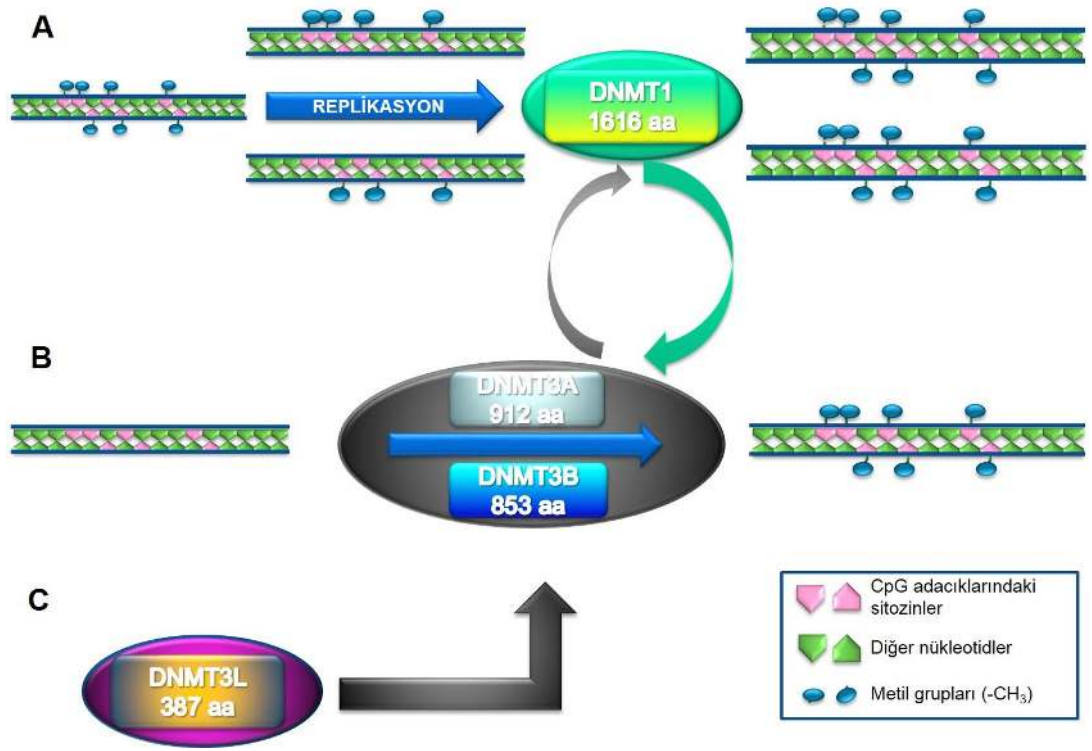
2.5. DNA Metilasyonu

Epigenetik, gen sekansını değiştirmeyen ve kalıtsal olan gen ifadesi değişikliklerini inceleyen bilim dalıdır. Epigenetik mekanizmalar, doğrudan veya dolaylı olarak gen ifadesini kontrol etmektedirler. Doğrudan gen ifadesini kontrol eden süreçlerden bir tanesi DNA metilasyonudur. DNA metilasyonu, tek zincir üzerindeki sitozin fosfat guanin(CpG) ya da CpG olmayan adacıklardaki sitozin nükleotidlerinin 5. karbon atomuna metil grubu takılmasıyla gerçekleştirilir [4]. Bu süreçte S-Adenozil Metiyonin (AdoMet) ise metil grubu vericisi olarak kullanılmaktadır [39]. DNA metilasyonu, transkripsiyonel aktivasyon ve baskılama, genomik imprinting, hücrel farklılaşma, tümorogenez, yaşlanma, X-kromozomu inaktivasyonu ve diğer hücrel aktivitelerde rol oynamaktadır (Şekil 2.8) [40-42]. Bu görevlerin dışında, oogenez ve embriyogenez süreçlerinde de gelişimle ilişkili genlerin kontrolünde DNA metilasyonu kritik öneme sahiptir.



Şekil 2.8. DNA metilasyonun genel olarak rol oynadığı mekanizmalar.

Bu zamana kadar *de novo* (yeni baştan) ve sürdürme (maintenance) metilasyonu olmak üzere iki farklı metilasyon çeşiti tanımlanmıştır. *De novo* metilasyon, metillenmemiş DNA zincirinin ilk defa metilasyonu iken sürdürme metilasyonu ise DNA replikasyonundan sonra yarı metillenmiş DNA zincirinin metilasyonu olarak tanımlanmaktadır. Her iki mekanizmada da, DNA metilasyonu DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir. Memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B ve DNMT3L olmak üzere 5 adet DNMT enzimi vardır (Şekil 2.9) [5].

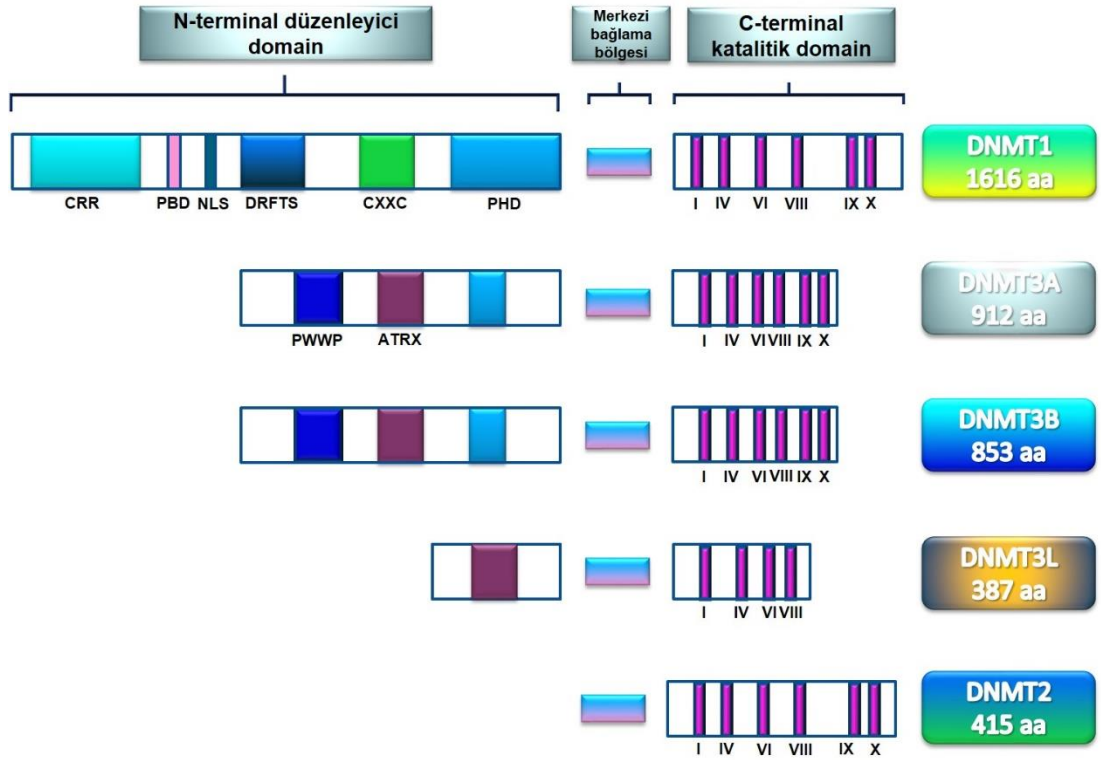


Şekil 2.9. DNA metilasyonu ve DNA metiltransferazlar. **A:** Sürdürme metilasyonu ve DNMT1. **B:** De novo metilasyon ve DNMT3A-DNMT3B. **C:** DNMT3L[7].

2.5.1. DNMT'lerin Genel Yapısı ve Görevleri

İlk DNMT enzimi bir bakteri olan '*Haemophilus haemolyticus*'den izole edilip, klonlanmıştır[43]. Memeli DNMT enzimleri, N-terminal düzenleyici domain, C-terminal katalitik domain ve merkezi bağlama bölgesi olmak üzere 3 ana yapısal domain içerir (Şekil 2.10) [44]. N-terminal düzenleyici domain, DNMT enzimlerinin hücre içi yerleşimlerinin belirlenmesinden ve metillenmemiş ve yarı metillenmiş DNA zincirlerinin ayırt edilmesinde rol oynar. Bu domain, proliferatif hücre nükleer antijen bağlama (PBD), nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), sitozin zengin çinko parmak DNA bağlama (ATRX), polybromo homoloji (PHD) ve tetrapeptit kromatin bağlama (PWWP) bölgeleri olmak üzere alt domainler içerir (Şekil 2.10) [5, 45]. Bunlardan, PBD domain replikasyon sırasında DNMT'lerin DNA dizileri ve PCNA proteini ile etkileşimini sağlarken[46], PHD replikasyon sırasında dengeyi kurar ve yeni DNA zincirlerinin biyosentezini uyarır [47]. Bundan başka, bu alt domainler DNMT'lerin SNF2 aile üyesi ATP-bağımlı kromatin remodeling enzimi (hSNF2H) [48], siklin bağımlı kinaz inhibitör 1 (p21WAF1)[46], E2F transkripsiyon faktör 1 (E2F1) [49], histon deasetilaz 1 (HDAC1) ve 2 (HDAC2) gibi hücre içi proteinlerle etkileşimini kolaylaştırabilirler [50, 51]. DNMT1 enzimi aynı zamanda CpG adacıklarındaki metillenmemiş DNA dizilerinin tanınmasına olanak sağlayan CXXC (sistein zengin bölge) domaini içermektedir [52].

Öte yandan, C- terminal katalitik domain, 10 farklı karakteristik motif içerir ancak bunlardan 6 tanesi (I, IV, VI, VIII, IX ve X) evrimsel olarak korunmuştur. Motif I, AdoMet bağlanma yerinin oluşumuna katılır; motif IV aktif bölgede sitozin substratına bağlanır, motif VI bir proton vericisi gibi hizmet eden glutamil rezidüsü içerir, motif VIII'in fonksiyonu hala bilinmemektedir. Motif IX, substrat bağlanma yeri yapısını korurken; motif X AdoMet bağlanma yerinin oluşumuna katılmaktadır[53]. DNMT proteininin üçüncü temel domain olan merkezi bağlama bölgesi, tekrarlayan Lizin-Glisin (GK) dipeptitlerinden oluşur ve N- ve C-terminal domainleri arasında yapısal bir köprü kurar (Şekil 2.10) [44].



Şekil 2.10. DNA metiltransferazların genel yapısı[7].

2.5.2. DNMT'lerin Belirgin Özellikleri

DNMT1 enzimi, DNA replikasyonunu takiben yarı-metillenmiş DNA zincirini metilleyerek sürdürme metilasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu enzim, mitotik aktivite gösteren hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmektedir [6]. Tanımlanan pakiten spermatositlerde eksprese olan formu (DNMT1p), oosit spesifik (DNMT1o) ve somatik formu (DNMT1s) olmak üzere 3 izoformu bulunmaktadır [54]. *Dnmt1p* mRNA'sı pakiten spermatositlerde eksprese edilmekte iken protein olarak gözlenmemiştir[55, 56]. DNMT1o, DNMT1s'nin N terminal bölgesinde yerleşmiş olup 118 aminoasitlik bir fragment eksiktir. Bu izoformların lokalizasyonu ve alternatif eklemelerin (splicing) biyosentezi *Dnmt1* geninin birinci ekzonunda yerleşimli domainler tarafından düzenlenir [57]. Diğer DNMT'ler ile

karşılaştırıldığında, DNMT1 *in vitro* şartlarda yarı metillenmiş DNA zincirlerine metillenmemiş DNA zincirlerinden 5 ile 40 kat yüksek afinite gösterir ki bu enzimin sürdürme metilasyonundaki fonksiyonu ile uyumludur [5, 58]. Ayrıca, DNMT1 DNMT3A tarafından uyarıldığında minimum düzeyde *de novo* metilasyon sürecinde rol oynar [59]. DNMT1'in fonksiyonu ile uyumlu olarak, *Dnmt1* knockout (*Dnmt1*^{-/-}) fare modelleri gastrulasyonda yada sonrasında letalite ve global DNA metilasyonunda bozukluklar göstermektedir [9, 60, 61]. *Dnmt1*^{-/-} fare embriyonik kök hücrelerde minimum düzeyde *de novo* metilasyon kaybına yol açar çünkü *de novo* metilasyon büyük ölçüde DNMT3A ve DNMT3B tarafından katalizlenmektedir [62].

DNMT3A ve DNMT3B, *de novo* metilasyonu gerçekleştiren öncül enzimlerdir. Her ne kadar DNMT3A yüksek oranda CpG adacıklarındaki metilasyondan sorumlu olsada CpA, CpT ve CpG alanlarındaki sitozinin metilasyonunda da görev alır [9-11]. Ancak CpG olmayan adacıklarda gerçekleşen metilasyonun önemi hala bilinmemektedir. DNMT3A enzimi DNMT1 ile karşılaştırıldığında daha düşük enzimatik aktiviteye sahiptir. Bu nedenden dolayı aktivitesini arttırmaya yönelik spesifik bir kofaktöre ihtiyaç duyabilir [53]. Şimdiye kadar tanımlanan 2 izoformu bulunmaktadır [63]. Bu izoformlar, ağırlıklı olarak embriyonik genom aktivasyonuna (EGA) kadar oosit ve erken dönem embriyolarda eksprese edilmektedir [64]. Ekspresyon paterni bu enzimlerin maternal kaynaklı olabileceğini akla getirmektedir. *Dnmt3a* knockout (*Dnmt3a*^{-/-}) fare modelleri, doğum öncesi gelişimde kısmi kusurlar gösterirken, bazıları ise canlıdır [65].

DNMT3B enzimi sadece perisentrik satellit bölgedeki tekrarlayan DNA dizilerinde bulunan CpG dinükleotitlerinin metilasyonu için özelleşmiştir [65, 66]. Yirmiden fazla izoformu tanımlanmıştır [63]. *Dnmt3b* knockout (*Dnmt3b*^{-/-}) fare modellerinde de, *Dnmt1*^{-/-} olduğu gibi embriyonik letalite gözlenmiştir [65]. *Dnmt3b* geninin mutasyonu sonucu ICF sendromu oluşur ki bu sendrom immün yetmezlik (I), sentromerik instabilite (C) ve fasyal dismorfizm (F) ile karakterize konjenital bir hastalıktır [67, 68]. Perisentrik bölgedeki kromozom 1, 9 ve 16'nın satellit bölgeleri metile durumdayken, bu sendromu taşıyan hastalarda bu bölgeler tamamen metillenmemiş durumdadır [69].

DNMT3L, nükleer bir proteindir ve metiltransferaz aktif bölge motiflerini içermediği için aktif olarak metilasyona katılamamaktadır ancak DNMT3A ve DNMT3B enzimlerinin karboksi terminal domainlerine bağlanarak bu enzimlerinin aktivitelerini indüklemektedir [12]. Bu yolla, DNMT3L enzimi gametogenez sırasında maternal genomik imprintlerin kurulmasında dolaylı olarak rol oynamaktadır [70]. *Dnmt3l* knockout (*Dnmt3l*^{-/-}) fareler canlıdır ancak düşük *de novo* metilasyon seviyesi erkek farelerde kısırlılığın nedeni olarak gösterilmektedir [70, 71].

DNMT2 hem yapısal hemde fonksiyonel olarak diğer DNMT'lerden farklıdır, çünkü N-terminal düzenleyici domain içermemektedir. DNMT2, C-terminal katalitik domain içermesine karşın, yapısında N-terminal düzenleyici

domain olmadığı için *de novo* ve sürdürme metilasyon süreçlerini katalizleyememektedir[7]. Bilindiği gibi, N-terminal düzenleyici domain diğer DNMT'lerin DNA dizilerine ve diğer düzenleyici proteinlere bağlanmasına olanak sağlamaktadır[53]. Ayrıca, DNMT2 DNA'yı metillemek yerine aspartik asit tRNA'sının antikodon ilmiğindeki sitozin 38'i metillemektedir[8]. Bu görevleriyle uyumlu olarak, *Dnmt2* knockout (*Dnmt2^{-/-}*) fare modellerinde herhangi bir fenotip gözlenmemiştir[72].

2.5.3. DNMT'lerin Oosit ve Erken Embriyonik Gelişimdeki Ekspresyonları

DNMT'lerin dinamik ekspresyon paternleri ve hücre içi yerleşimleri (daha çok DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) fare, sığır, maymun ve insanlarda tanımlanmıştır. Farede, *Dnmt1* fetal (E17.5-18.5) ve postanal 1, 5, 10, 15, 21, 35, 70 günlerdeki ovaryumlarda ve aynı günlerde alınan oositlerde eksprese edilmektedir. Bununla birlikte, *Dnmt1*'in oosit spesifik izoformu olan *Dnmt1o*, sadece postanal ovaryumlarda ve oositlerde eksprese edilmekte iken fetal ovaryum ve oositlerde eksprese edilmemektedir[73]. Daha başka analizler DNMT1^{1s/1o} proteinin GV ve MII oositlerde sitoplazmada dağılım gösterdiğini ortaya koymuştur[74]. DNMT1 öncelikli olarak MII oositlerde korteks bölgesinde yerleşiktir[56]. DNMT1o ise MII oositin plazma membranına yakın yerde lokalize olmuştur. Beklenildiği gibi, hem *Dnmt1* hem de *Dnmt1o* mRNA olarak MII oositlerde eksprese edilmektedir ve *Dnmt1o*'nun, *Dnmt1*'den daha yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarda *Dnmt1* ve *Dnmt1o*'nun mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilmemiştir [7].

Bu bilgilerle uyumlu olarak, *Dnmt1* GV oositlerde metilasyonun kurulmasında rol oynayan en önemli enzimdir ve bütün GV aşamasındaki sığır oositlerinde eksprese olmaktadır. Diğer taraftan, Lodde ve ark. (2009), DNMT1'in *in vitro* olgunlaşmış MII oositlerde de eksprese olduğunu bulmuşlardır[75].

İnsanda, *DNMT1* gen ekspresyonu sekonder foliküllerde, GV ve MII oositte tanımlanırken; primordiyal ve primer foliküllerde ise saptanmamıştır [76]. DNMT1 proteini, GV oositlerde nükleusta, MI ve MII oositlerde ise sitoplazmada bulunurken; GV oositte sitoplazmada ve MI oositte de nükleusta gözlenmemiştir. Benzer olarak, bir DNMT1 izoformu olan DNMT1s de GV oositte nükleer, MI ve MII oositlerde ise sitoplazmada yerleşim göstermektedir[77]. Bu bulgular göstermektedir ki DNMT1 farklı gelişim aşamasındaki oositlerde zamansal ve bölgesel olarak farklı ekspresyon paternleri sergilemektedir[7].

Dnmt3a ve *Dnmt3b* mRNA olarak fare, sığır ve kedi oositlerinde tanımlanmıştır[70, 78, 79]. Fare oositlerinde DNMT3A, GV oositlerin nükleusunda, MII oositlerde ise sitoplazmada yerleşim göstermektedir[74]. DNMT3A izoformlarından olan DNMT3a2 ekspresyonu, metilasyon imprintlerinin kurulması sırasında oosit büyümesiyle doğru orantılı olarak artmaktadır[80]. DNMT3A ve DNMT3a2 olgunlaşmamış fare oositlerinde

(primordiyal foliküllerde yerleşimli) sentezlenmemektedir, bu bulgu bu genlerin ekspresyonlarının postnatal dönemde foliküler gelişimin başlangıcı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir[80]. Maymunda, *DNMT3A* mRNA ekspresyonu tüm oosit aşamalarında tanımlanmıştır ancak metilasyon seviyesi anlamlı olarak GV aşamasından MII aşamasındaki oositlere azalan yöndedir[81]. Diğer taraftan bu genin ekspresyonu primordiyal folikülden sekonder foliküle, GV ve MII oositlerde de saptanmıştır[76]. *DNMT3A* proteini GV, MI ve MII aşamasındaki oositlerde 0. günde (oosit toplamadan 2 saat sonra) eksprese olmaktadır. Ancak, 1. günde (bir gece *in vitro* olgunlaşmış) GV oositlerde tanımlanmazken, MI ve MII oositlerde sitoplazmik olarak bulunmuştur[77]. Benzer olarak, *DNMT3B* insanda geç primer ve sekonder foliküllerde sentezlenirken, primordiyal, erken primer folikül ve MII oositlerde ekspresyonu gözlenmemiştir[76]. Bu genin protein ekspresyonu ise GV, MI ve MII oositlerde 0. ve 1. günlerde tanımlanmıştır[77].

Diğer taraftan farede *DNMT3B*'nin GV ve MII oositlerde ekspresyonu gözlenmemiştir[74]. Ancak *Dnmt3b* mRNA olarak düşük düzeyde de olsa GV ve MII oositlerde bulunmuştur. Benzer olarak, maymun oositlerinde *DNMT3B* ekspresyonu tanımlanmıştır[81]. Çalışmalar göstermektedir ki, *DNMT3A* maternal kaynaklı olup, oosit maturasyonu sırasında *de novo* metilasyondan sorumlu iken; *DNMT3B*, embriyonik genom aktivasyonundan sonra erken embriyo gelişimindeki *de novo* metilasyondan sorumludur[74].

DNMT3L, oogenez sırasında analiz edildiğinde olgunlaşmamış fare GV oositlerinde gözlenmezken; tamamen olgunlaşmış oositlerde fazla miktarda ekspresyonu olduğu tanımlanmıştır[80]. Buna ek olarak, *DNMT3L* hem mRNA hem de protein olarak fare MII oositlerde eksprese olmaktadır[82]. *DNMT3L* protein olarak prenatal fare ovaryumunda da tanımlanmıştır[81, 83]. Maymun GV ve MII oositlerinde oldukça düşükte olsa *DNMT3L* mRNA ekspresyonu olduğu ortaya konulmuştur [81]. İnsanda, *DNMT3L* ve *DNMT2* mRNA ekspresyonu primordiyal, primer ve sekonder folikül aşamalarının hiç birinde [76]ya da 0. ve 1. günlerde GV, MI ve MII oositlerde tanımlanmamıştır[77]. Ancak minimum düzeyde de olsa *DNMT2* ekspresyonu MII oositlerde gözlenmiştir[76]. Buna karşın maymun GV oositleri diğer aşamalarla karşılaştırıldığında yüksek oranda *DNMT2* sentezlemektedir[81].

Sonuç olarak, *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A*, *DNMT3B* ve *DNMT3L* genleri farklı oosit aşamalarında bölgesel ve zamansal olarak gerek mRNA gerekse protein olarak farklı ekspresyon paternlerine sahiptir. Buna ek olarak memeli türlerinde GV ve MII aşamasındaki oositlerde farklı yerleşim göstermektedir. Oosit gelişimi sırasında bu genlerin dinamik ekspresyonel değişimlerinin, birbirlerinin fonksiyonunu telafi edebileceklerini gösterebilmektedir[7].

DNMT'ler zigottan blastosist aşamasına kadar erken embriyo gelişimi sırasında dinamik ekspresyon paternleri gösterirler[7]. *Dnmt1* mRNA

ekspresyonu, farede 1-hücreli embriyodan blastosist aşamasına kadar kademeli olarak artmaktadır [73]. Maymun erken dönem embriyolarında analiz edildiğinde, 8-hücreli embriyo aşamasında anlamlı bir biçimde düşüş gözlenmiştir[81]. İneklerde *DNMT1* mRNA ekspresyonu ilk olarak 2-hücreli embriyo aşamasında gözlenirken blastosiste kadar ekspresyonal devamlılık görülmüştür[84]. Diğer taraftan *DNMT1* mRNA ekspresyonu blastosist aşamasına doğru gidildikçe insan [76]ve maymunda [81]anlamlı bir şekilde azalmaktadır.

DNMT1 protein ekspresyonu farede zigottan blastosist aşamasına kadar gözlenmiştir[74]. *DNMT1* ekspresyonu 2-hücreli, 4-hücreli ve blastosist aşamasındaki embriyolarda sitoplazmik bulunurken[73]; 8-hücreli embriyoda nükleer tanımlanmıştır ancak bu aşamadaki nükleer yerleşim tartışmalıdır[85]. Hirasawa ve ark. (2008) [74]ve Kurihara ve ark. (2008) [61]yıllarında yaptıkları çalışmalarda *DNMT1* ve *DNMT1o* ekspresyonlarının sitoplazmik yerleşimli oldukları tespit etmişlerdir. Diğer taraftan Lodde ve ark. (2009) yılında *DNMT1* ekspresyonunu sığırdaki zigot aşamasından 8-16 hücreli embriyo aşamasına kadar araştırmışlardır[75]. Araştırmacılar *DNMT1* ekspresyonunu zigot aşamasında sitoplazmik gözlemlerken, 8-16 hücreli embriyolarda bu proteinin farklı ekspresyon paterni sergilediğini bulmuşlardır. 8-16 hücreli embriyolarda bazı blastomerlerde nükleer görünürken bazı blastomerlerde ise sitoplazmik olduğunu bulmuşlardır[75]. Bununla birlikte, *DNMT1* mRNA ve protein ekspresyonlarının, fare, sığır, maymun ve insanı içeren farklı memeli türlerinde erken embriyo gelişimi sırasında farklı düzeylerde olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Bu farklılık bu türler arasındaki embriyonik genom aktivasyonunun başlamasındaki farklılıktan ve farklı DNA metilasyonu düzenleyici mekanizmalarının kontrolünden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [7].

Blastosist aşamasına kadar erken dönem embriyolarda ve oositlerde *Dnmt1o* mRNA düzeyinde eksprese edilmektedir[86]. *DNMT1o* fare erken dönem embriyolarda 8-hücreli embriyo aşaması dışında sitoplazmik olarak gözlenirken, bu aşamada yoğun olarak nükleer yerleşim göstermektedir[87, 88]. *Dnmt1o* knockout fare embriyolarında E7.5 ve E9.5 günlerde belirgin olarak imprinting anormallikleri gözlenmiştir[89]. Bir diğer *DNMT1* izoformu olan *DNMT1s*, 8-hücreli embriyo aşaması dışındaki bütün erken dönem embriyolarda eksprese edilmektedir[89, 90].

Fare erken dönem embriyo gelişimi sırasında, *Dnmt3a* mRNA ekspresyonu, diğer erken dönem embriyolarla karşılaştırıldığında 8-hücreli ve blastosit aşamaları arasında anlamlı olarak artmıştır[81]. Maymun [81]ve insanda [76]da bu gen zigot aşamasından blastosit aşamasına kadar tanımlanmıştır. İlginç olarak, sığırdaki *DNMT3A* mRNA ekspresyonu 2- hücreli embriyo aşamasında başlar ve blastosist aşamasına kadar devam eder[84]. *DNMT3A* proteini, farede 1- hücreli embriyo aşamasından 8- hücreli aşamaya kadar gözlenirken, blastosit aşamasında tespit edilememiştir[74, 91]. Ancak *DNMT3B*, 2-hücreli embriyo aşamasında başlar, blastosit aşamasında ise

güçlü bir ekspresyon gösterir. Bu bulgular, DNMT3A'nın maternal kaynaklı; DNMT3B'nin ise embriyonik genom aktivasyonundan sonra sentezlendiği hipotezini desteklemektedir [74].

Embriyogenezin sonraki dönemlerinde ise, farede DNMT3A ekspresyonu E4.5-E8.5 günlerinde yokken, DNMT3B E4.5-E7.0 günlerde yüksek oranda ekspresyonu olduğu gözlenmektedir[64]. Bu bilgiyle uyumlu olarak, farede DNMT3B E4.5 günde blastosist iç hücre kitlesinde; E5.5 günde ise epiblast tabakasında ve E7.0 günde ise embriyonik ektoderm tabakasında saptanmıştır[64]. Ayrıca, DNMT3B, POU domain sınıf 5 transkripsiyon faktör 1 (POU5F1) ile benzer ekspresyon paternine sahiptir ki bu gen bir transkripsiyon faktörüdür ve totipotent hücrelerde eksprese edilip bir endoderm belirteci olarak kullanılmaktadır[92]. Bunun anlamı DNMT3B, DNMT3A'dan daha yüksek oranda embriyonik kök hücrelerden eksprese edilir[64]. Ancak, embriyonik kök hücreler somatik hücrelerden daha yüksek oranda *Dnmt3a* ve *Dnmt3b* mRNA'larını eksprese ederler[62]. E10.5 günden sonra DNMT3A tekrar eksprese olmaya başlarken; DNMT3B, E10.5-E14.5 günlerdeki embriyolarda üretilmemektedir. Bununla birlikte, DNMT3A ve DNMT3B'nin embriyonik kök hücrelerde *de novo* metilasyonunda ve oosit ve embriyo gelişiminde post-implantasyon süreçlerinde gerekli olduğu görülmektedir[65, 93]. Golding ve ark. (2003) yılında yapmış oldukları çalışmada, *DNMT1*, *DNMT2*, *DNMT3A* ve *DNMT3B* genlerini RT-PCR yöntemi kullanarak sığır erken dönem embriyolarda analiz ettiklerinde, bu genlerin 2-hücre, 4-hücre, 8-hücre, 16-hücre, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolarda ekspresyonunun olduğunu bulmuşlardır[84]. Benzer olarak, insanda da *DNMT3B* mRNA ekspresyonu zigottan blastosist aşamasına kadar tanımlanmıştır[76]. Maymunda bu genin erken dönem embriyolarda düşük seviyede gözlenirken, blastosist aşamasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır[81].

DNMT1 ile benzer olarak DNMT3L de erken dönem fare embriyolarında farklı ekspresyon paterni göstermektedir. 1-hücreli embriyo aşamasında DNMT3L protein ekspresyonu maternal ve paternal pronükleuslarda eşit olarak dağılmıştır[82]. Bu protein, 2-hücreli embriyo aşamasında nükleer olarak tanımlanırken, 4-hücreli embriyodan morula aşamasına (E2.5) kadar ekspresyonu belirlememiştir[82]. E3.5 gündeki erken dönem embriyolarda ve blastosistte DNMT3L ekspresyonu saptanırken, blastosist aşamasında trofoektoderm ve iç hücre kitlesinde ekspresyonal farklılık tanımlanmamıştır[82]. Ancak dikkat etmek gerekir ki, E4.5 gündeki blastosistte DNMT3L ekspresyonu iç hücre kitlesinde trofoektodermden daha yüksektir[82]. Diğer taraftan, *Dnmt3L* ekspresyonu fare erken dönem embriyolarda (2-hücreli, 4-hücreli, morula, blastosist) protein seviyeleri ile benzer patern göstermektedir. Maymunda *DNMT3L* erken dönem embriyo gelişimi sırasında kademeli olarak artan ekspresyon gösterir[81]. İnsan embriyolarında ise 4-hücreli embriyo aşamasından blastosist aşamasına kadar belirgin DNMT3L ekspresyonu gözlenmektedir[76].

Dnmt2 mRNA'sı, erken dönem sığır embriyo gelişimi sırasında oldukça düşük seviyede tanımlanmıştır. Ancak morula aşamasında ekspresyonu önemli oranda artmıştır [84]. Ancak, maymunda blastosit aşamasında ekspresyon seviyesi yükselmektedir [81]. Her ne kadar *DNMT2* ekspresyonu, insan embriyolarında blastosist aşamasında tanımlanırken [76], ilginç olarak sığır embriyolarında 2-hücreli embriyo aşamasından blastosist aşamasına [84] kadar varlığı saptanmıştır. Bununla birlikte DNMT2 farklı memeli türleri arasında farklı ekspresyon paternine sahiptir. Gelecek çalışmalarda DNMT2 proteinin erken dönem embriyolarda DNA metilasyonu sürecinde rolü tanımlandığında, bu ekspresyonal değişimlerin anlamı daha net anlaşılacaktır.

Sonuç olarak oosit ve erken dönem embriyo gelişimi sırasında DNMT'lerin farklı memeli türlerinde belirgin olarak farklı ekspresyonları gösterilmiştir. Sıralanan faktörler bu farklılıkların nedeni olabilmektedir. İlk neden olarak, embriyonik genom aktivasyonunun farklı türlerde farklı zamanlarda başlaması gösterilebilir. Örneğin; embriyonik genom aktivasyonu farede 2-hücreli embriyoda [35], insanda 4-8 hücreli embriyoda [36, 37] sığırsa ise 8-16 hücreli embriyoda meydana gelmektedir. İkinci olarak, metilasyon imprintlerin farklı gelişimsel süreçlerde kurulmaktadır. Farede gelişmiş blastosist aşamasında, insanda erken blastosistlerde kurulurken [94] sığırdaki ise 16 hücreli embriyo aşamasında [95] kurulmaya başlamaktadır. Sonuç olarak memelilerde bu farklılık, DNMT'lerin hücre içi yerleşimlerini, bölgesel ve zamansal ekspresyonlarını düzenleyen hücre içi sinyal yollarından kaynaklanabilmektedir.

2.6. Süperovulasyon

Süperovulasyon, dışarıdan hormonal müdahaleyle genital döngüyü kontrol altına alarak, normal fizyolojik koşullarda elde edilebilen kalitede fakat çok daha fazla sayıda ve eş zamanlı olarak oosit ve embriyo elde etmek için uygulanan bir protokoldür.

Süperovulasyon uygulamasında kullanılan protokoller karşılaştırıldığında, insan IVF (*in vitro* fertilization) ve deney hayvanlarında uygulanan moleküller açısından birbirinden farklılık gösterebilmektedir. IVF'de kullanılan moleküller östrojen antagonistleri[96], pulsatil gonadotropin salgılatıcı hormon, ekzojen gonadotropinler, gonadotropin salgılatıcı hormon agonistleri ve aromataz inhibitörleri iken [97] deney hayvanlarında kullanılan moleküller ise gebe kısırak serum gonadotropin (PMSG)[17], insan koryonik gonadotropin (hCG)[18], kısırak koryonik gonadotropin (eCG) ve östrojen antagonisti olan klomifen sitrattır[98].

2.6.1. Süperovulasyonun Oogenez ve Erken Dönem Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri

Oosit ve erken dönem embriyo gelişimi sırasında epigenetik değişimler, embriyonik gelişim ve başarılı gebelik için kritik bir öneme

sahiptir. Özellikle yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile doğan çocuklarda artmış oranda epigenetik anomalilerin ortaya çıktığı gözlenmektedir. Ancak bu karmaşık süreç yapılan araştırmalarla aydınlatılmaya çalışılmaktadır.

Farelerde süperovulasyon ve epigenetik anomalilerin ilişkisini anlamak için iki mekanizma akla gelmektedir. İlk olarak hormonal uyarım normal oogenez sürecinde metilasyon imprintlerini bozabilmektedir[99, 100]. İkinci olarakda oosit kalitesine maternal genleri etkileyerek zarar verebilmektedir. Dolayısıyla, bu süreçte DNA metilasyonu ve bu süreçte rol alan DNMT enzimleri zarar görmekte ve bu kusurlu imprintlerin sürdürülmesiyle oluşan bozuk epigenetik profil erken dönem embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir[101-103].

Süperovulasyon yöntemi ile elde edilen bazı oositler normal yolla elde edilen oositlerle karşılaştırıldığında aynı yeterlilikte değildir (Şekil 2.11) [13]. Embriyoların yeterli olmayan oositlerden de geliştiği ancak bazı epigenetik işaretlerde anormallikler içerdiği bildirilmiştir. Süperovulasyon ile elde edilen blastosistlerde global DNA metilasyon düzeyinin kontrole göre özellikle iç hücre kitlesinde azaldığı bildirilmiştir[104]. Ayrıca, süperovulasyon zigot aşamasında maternal pronükleusta global DNA metilasyonunu normal ovülasyon grubuna göre anlamlı olarak düşürmektedir ve blastosist aşamasında gen ekspresyonunu da etkilemektedir. Yapılan analizlerde, blastosistte *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* ve *DNMT3l* genlerinin süperovulasyon grubunda anlamlı olarak artış göstermektedir[105].

YÜT ile ilişkili doğum sayısı Kuzey Amerika'da son on yılda iki kattan fazladır. Kanada da YÜT kayıtları göstermektedir ki 2011 yılında 23.722 YÜT döngüsü rapor edilmiştir ki bu değer 2010 yılına göre %29 oranında artmıştır[106]. YÜT, ovaryumların hipersitümulasyonu (süperovulasyon), *in vitro* fertilizasyon, intra-sitoplazmik sperm enjeksiyonu, gamet ve embriyo dondurma, kültür medyumuna maruz kalma, *in vitro* oosit maturasyonu gibi çeşitli prosedürleri içermektedir. Çeşitli çalışmalar YÜT gebeliklerinde artmış gebelik komplikasyonlarını ile konjenital anomalileri rapor etmişlerdir[14, 15]. Ek olarak CpG adacıklarındaki metilasyon kaybından dolayı sonuçlanan Angelman sendromu ve Beckwith-Wiedemann sendromu gibi imprinting hastalıkları ile YÜT arasındaki ilişki ortaya konulmuştur [107]. Son zamanlarda insanda YÜT uygulamalarının DNA metilasyonuna etkisi araştırılmışdır ancak elde edilen sonuçlar çelişkilidir. Bazı araştırmacılar YÜT ile anormal DNA metilasyonu arasında ilişki olduğunu insan gamet, embriyo[19], plasenta [20] ve göbek kordonu [21] örneklerinde gösterirken, bazı araştırmacılar sonuçların anlamlı olmadığını bulmuşlardır[22, 108]. Bu çelişkinin kullanılan çalışma gruplarından ve/veya kullanılan materyal farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir[106].

Bir YÜT yöntemi olan süperovulasyon yada ovaryan sitümulasyon artmış oosit üretimine olanak sağlar. İnsanlarda bu yöntem infertilite tedavisinde uygulanan yaygın bir uygulama haline gelmiştir. Yüksek dozda

ekzojen hormonların kullanımı, oosit maturasyonu üzerine etkisi birçok tartışmaya neden olmuştur. Tipik olarak, YÜT içinde kullanılan yöntemlerin beraber kullanılması imprinting düzenlenmesinde etkilidir. Ancak süperovulasyonun tek başına fertilité tedavisinde kullanımı çocuklarda anormal imprintinge neden olabilmektedir. Çünkü imprinting kurulumu oogenez sırasında meydana gelmektedir ve bu imprintlerin kurulumu ekzojen hormon tedavilerine duyarlı olabilmektedir[109, 110]. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, bu uygulamanın *in vitro* embriyo gelişiminde gecikmeye, fetal büyüme geriliğine ve artmış anormal blastosist sayısı gibi anomalilere neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.11)[109, 111]. Süperovulasyon uygulaması ile elde edilen embriyolarda, anormal global DNA metilasyonu belirlenmiştir[112]. Angelman sendromu ve Beckwith-Wiedemann sendromu gibi insan imprinting hastalıklarına sahip olan hastalarda ovaryan stimülasyonun bu genetik hastalıkların oluşumuna neden olabildiği gösterilmiştir[113, 114]. Ayrıca, süperovulasyon tek başına blastosist aşamasındaki embriyoda *Snrpn*, *Kcnq1ot1*, *Peg3* ve *H19* imprinting genlerini metilasyon durumlarını etkileyebilmektedir[100, 102].

Memeli ovaryan foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi sırasında çeşitli genlerin aktivasyonu ve deaktivasyonu genetik ve epigenetik mekanizmaların kontrolü altındadır[115]. Dişide metilasyon paternlerinin kurulması ağırlıklı olarak oosit gelişiminin ilerleyen dönemlerindemeydana gelir[116, 117]. Çoğu maternal imprintler, mayotik metafaz II aşamasının tamamlanmasıyla ortaya çıkar[118]. Fakat, insanda bazı maternal imprintler iki pronükleusun füzyonu oluşuna kadar tamamlanmazlar[119]. Fare çalışmaları göstermektedir ki: süperovulasyon azalmış oosit kalitesi, gecikmiş embriyonik ve fetal gelişim[111], post-zigotik genom yeniden düzenlenmesinde bozukluklar [112]ve oositlerde, embriyolarda, fetüslerde ve plasentalarda değişmiş DNA metilasyonu [120] ile ilişkilidir. Süperovulasyonun benzer olumsuz etkileri insanlarda da meydana geldiği rapor edilmiştir[16]. Süperovulasyon ile üretilen embriyolar normal yolla üretilenlerle karşılaştırıldığında farklı gen ekspresyon profillerine sahip oldukları bulunmuştur[121]. Bu farklılık oosit maturasyonu ve ovulasyon sırasında gen ekspresyonlarını kontrol eden epigenetik işaretlerin değişiminden kaynaklanabilir. Ovaryan sitümülasyon, YÜT ile doğan çocuklarda Angelman sendromu ve Beckwith-Wiedemann sendromuna yakalanma sıklığını arttırmaktadır[122].

Liang ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada farelerde süperovulasyonun etkisini; *Dnmt1o*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* ve *Dnmt3l*mRNA düzeyinde MII oositlerde ve zigotlarda, normal doz (6IU) (PMSG/hCG), yüksek doz (10IU)(PMSG/hCG) ve kontrol gruplarında karşılaştırmışlardır. Ancak gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığını dolayısıyla süperovulasyonun doz bağımlı olarak DNMT'lerin ekspresyonunu etkilemediğini rapor etmişlerdir[123].

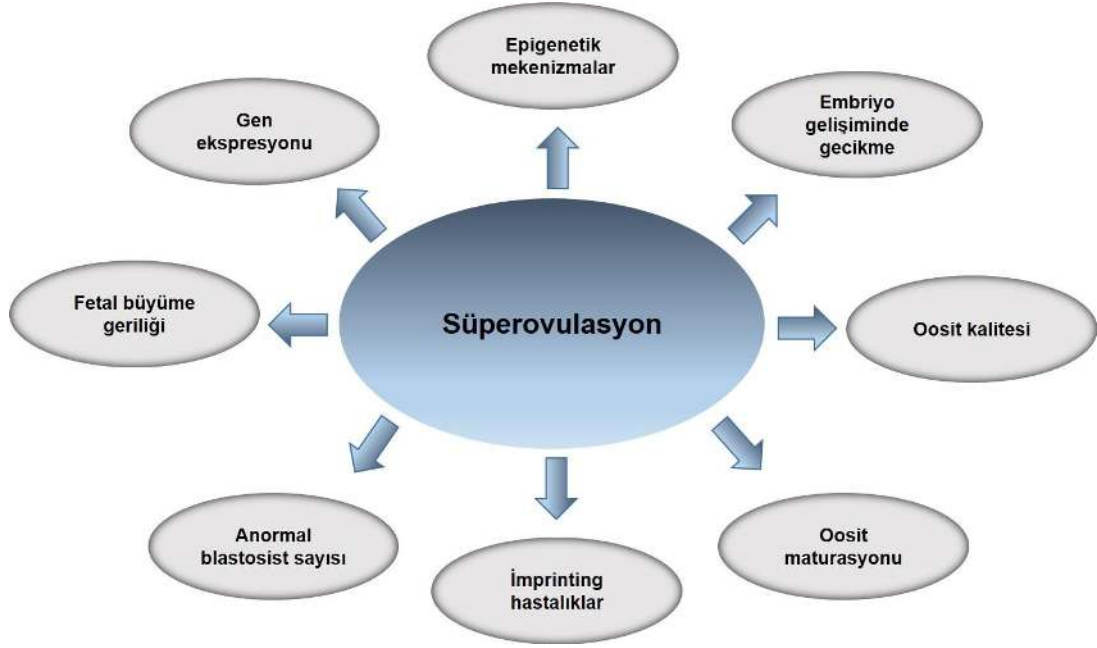
Yapılan bir başka çalışmada da, süperovule fare morula aşamasındaki embriyolarda3 gelişimsel önemli yeniden düzenlenme genlerinden Apex

Nükleaz 1 (*Apex1*), Metil CpG bağlama protein (*Mbd3*) ve Polimeraz Beta (*Polb*) genlerinin ekspresyonunun azaldığını göstermektedir[124]. Bu bulguyla uyumlu olarak, imprinting genlerde metilasyon anomalileri ile ovaryum stimülasyonu (7.5 IU PMSG/7.5 IU hCG) arasında bağlantı olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca, süperovulasyon fare blastosistlerde H19 gen ekspresyonunun bozulması ile ilişkilidir[120]. Süperovulasyonun olumsuz etkileri arasında DNA metilasyon kaybı, DNA metilasyon artışı ve DNA metilasyon gecikmesi de yer almaktadır[125]. DNA metiltransferazlardaki mutasyonlar da göstermektedir ki DNA metilasyonu fare gelişimi ve germ hücre farklılaşması için gereklidir. Embriyo gelişimi sırasında yardımcı üreme teknikleri epigenetik düzenlemeyi aksatan potansiyele sahiptir. Özellikle ovaryum stimülasyonundan kaynaklı DNA metilasyon aksamada yüksek risk olduğu anlaşılmaktadır [126].

Oogenez, preimplantasyon ve postimplantasyon gelişim sırasında ovaryum stimülasyonunun, DNA metilasyonu üzerine etkisini olup olmadığına karar vermek için çalışmalar yapılmaktadır. İlginç olarak bazı çalışmalarda sonuçlar çelişkili olarak rapor edilmiştir. Sato ve ark., süperovulasyon uygulanan dişi fare oositleri ve insan oositlerinde H19 metilasyonunda artış, PEG1 geninde ise metilasyon kaybı olduğunu göstermişlerdir [127]. Halbuki, Anckaert ve ark., fare oositlerinde süperovulasyonun H19, SNPRN yada Igf2r metilasyonunu etkilemediğini bulmuşlardır[128]. Ovaryum stimülasyonu DNA metilasyonunu sadece maternal olarak değil, paternal imprinting genlerinin de fare blastosistlerinde etkilendiği gözlenmiştir.

Yardımcı üreme teknikleri sırasında uygulanan, *in vivo* olgunlaşma ve yüksek doz hormon uyarımı abnormal metilasyon profillerine sahip oositlere neden olabilir. Shi ve Haff süperovule edilen grubu süperovule edilmeyen dişilerle karşılaştırdığında süperovule olan dişilerde 2 hücreli embriyolarda anormal metilasyon paternlerini rapor etmiştir[112].

Sonuç olarak, süperovulasyon uygulamasının oosit ve erken dönem embriyo gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca, süperovulasyonun oosit ve erken dönem embriyolarda DNA metilasyon bozukluklarına neden olduğu da belirlenmiştir. Bu çalışmada, süperovulasyon uygulamasının oosit ve erken dönem embriyolarda DNMT genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 2.11. Süperovulasyonun çeşitli mekanizmalar üzerine olumsuz etkileri.

2.7. Çalışmanın Hipotezi

Literatürde yapılan çalışmalarda özellikle yardımla üreme teknolojisiyle doğan çocuklarda epigenetik anomalilerin olma sıklığının daha fazla olduğu rapor edilmiştir. Bu teknoloji içerisinde bulunan süperovulasyon yada ovaryan hipersitümulasyon, *in vitro* fertilizasyon, gamet ve embriyo dondurma, *in vitro* kültür gibi yöntemlerin çeşitli mekanizmalar üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Gerek insanda fertilité tedavisinde gerekse deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılan süperovulasyon uygulamasının da oosit ya da embriyo kalitesi, fetal büyüme geriliği, gen ekspresyonları, embriyo gelişiminde gecikmeler, imprinting genlerin ifadesinde bozukluklar ve buna bağımlı imprinting hastalıklar ve epigenetik mekanizmalar gibi süreçlerde olumsuz etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Süperovulasyon uygulamasının çeşitli genlerin metilasyonunu bozduğunu ve buna bağılı olarak da genlerin ekspresyonlarını değiştirdiği bildirilmiştir. Ancak literatürde DNA metilasyonu değişiminin, bu süreci primer gerçekleştiren DNMT enzimlerinden mi kaynakladığı bilinmemektedir. Bu literatür ışığında çalışmamızın hipotezi, süperovulasyon uygulaması DNMT enzimlerinin (protein) ekspresyonlarını değiştiriyor olabilir.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Süperovulasyon Protokolü

Bu çalışmada dişi farelerde folikülogenezi stimüle etmek için Folikül uyarıcı hormon (FSH) analogu olan Pregnant Mare's Serum Gonadotropin (PMSG, Intervet); ve ovulasyonu indüklemek için Luteinizan Hormon (LH) analogu olan Human Chorionic Gonadotropin (hCG, Sigma CG-10) kullanılmıştır.

3.1.1. Gonadotropinlerin Hazırlanışı

PMSG ve hCG steril enjeksiyonluk su içerisinde 50 I.U./ml ve 75 I.U./ml olacak şekilde çözüldü. Stok solüsyonlar aliquatlar şeklinde hazırlanarak -20°C'de kullanıma kadar muhafaza edildi. Enjeksiyonun yapılacağı zaman, hazırlanan bu aliquatlardan her fareye 0.1 ml intraperitoneal yolla enjekte edildi.

3.1.2. Gonadotropinlerin Uygulanması

Tüm deney protokolü Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Kurulu tarafından incelendi ve etik olarak onaylandı (B.30.2.AKD.0.05.07.00/30). Temel deneysel yöntemler daha önceki çalışmalardan modifiye edilerek uygulandı [129]. Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Üretim Ünitesi'nde üretilen 4-5 haftalık Balb/C ırkı dişi ve çiftleştirme için 8-10 haftalık Balb/C ırkı erkek fareler kullanıldı. Balb/C ırkı dişi ve erkek fareler su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldular. Folikülogenezi stimüle etmek için normal doz grubundaki her bir dişi fareye intraperitoneal yolla 5 I.U/ml ve yüksek doz grubundaki her bir dişi fareye ise 7.5 I.U/ml PMSG enjeksiyonu yapıldı. Toplanacak embriyolar için, PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra ovulasyonu indüklemek amacıyla normal doz grubundaki her bir dişi fareye intraperitoneal yolla 5 I.U/ml, yüksek doz grubundaki her bir dişi fareye ise 7.5 I.U/ml hCG enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonunun yapıldığı günün akşamı dişi fareler, erkek fareler ile çiftleştirme kafesi içinde 1 dişi:1 erkek olacak şekilde gece boyunca çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi sabah vajinal plak kontrolü yapıldı ve vajinal plak görülen dişi fareler fertilizasyonun 0.5. gününde kabul edildi.

3.2. Vazektomize Fare Modeli Oluşturması

Vazoktemize model oluşturma işlemi anestezi altında gerçekleştirildi. Vazoktemize edilecek erkek fareler rompun+ketalar ve serum fizyolojik ile tamamlanıp hayvanın ağırlığına göre belirlenen dozlarda (1:1 oranında) intraperitoneal olarak verildi. Kesim tahtasına yerleştirilen farenin uzuvları flasterle sabitlendi. Penisin üst (farenin başına doğru) bölgesi traş makinesi ile traşlandı. Bu bölgeler %70'lik alkolle temizlendikten sonra bistüri ile iyice temizlendi. Bu temizlenen ve penisin üst bölgesine bir kesik atılıp, yanlarından makasla açıldı. Testislerden uzanan ve belirgin bir uzantı olan vas deferens'e ulaşıldı. Vas deferens yakınındaki damarlardan uzaklaştırılıp arasında 1 cm

olacak şekilde iki uçtan sutur malzemesi ile bağlanıp arasından makasla kesilerek vazoktemize edildi. Diğer vas deferens de aynı şekilde kesilerek vazoktemize işlemi gerçekleştirildi. Önce abdomen bölgesi sonra da farenin deri bölgesi dikildi. Dikiş yeri betadin sürülerek enfeksiyon kapması önlendi. Küvezde yarım saat 37 derecelik ısı altında ve nemli bir ortamda bekletildikten sonra fareler, dinlenme odasına alındı. İçme sularına Veteriner Hekimin önerdiği dozda ağrı kesici eklenen vazektomize erkek farelerin günlük kontrol ve bakımları yapıldı.

3.3. Oositlerin Toplanması

Normal ve yüksek doz grubundaki dişi fareler PMSG enjeksiyonu yapıldıktan 20 saat sonra profaz I yada germinal vezikül aşamasındaki oositler (GV) ve hCG enjeksiyonu yapıldıktan 14 saat sonra metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerin toplanabilmesi için servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Profaz I aşamasındaki oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin ovaryumları, MII aşamasındaki oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin Fallop tüpleri alınarak Modified HTF medyumunun içerisine konuldu. Stereo mikroskop (Zeiss Stemi SV 11) altında ovaryumların parçalanması ile profaz I aşamasındaki oositler, fallop tüplerinin parçalanması ile de MII aşamasındaki oositler toplandı. Ovaryum ve Fallop tüplerinin penset ile bir tarafından sabitlenmesi sağlanarak diğer kısımlarının 23 g'lık enjektör iğnesi ile parçalanması gerçekleştirildi ve oositlerin medyum içerisine çıkması sağlandı. Daha sonra medyum içerisindeki oositler stereo mikroskop altında inceltirilmiş cam Pasteur pipeti takılmış ağız pipeti ile toplandı ve Modified HTF medyumundan geçirilerek yıkandıktan sonra, 1 mg/ml konsantrasyondaki hiyalüronidaz solüsyonu (Sigma, H-4272) içerisine alındı ve böylece metafaz II aşamasındaki oositlerin etrafındaki kumulus hücreleri uzaklaştırıldı. Kumulus hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra oositler, temiz Modified HTF medyumuna alındı.

Kontrol grubundaki dişi farelerden ise GV aşamasındaki ve MII aşamasındaki oositler süperovulasyon uygulanmadan toplandı. GV aşamasındaki oositleri toplamak için sakrifiye edilen farelerin ovaryumları medyum içerisine alındı. MII aşamasındaki oositleri elde etmek için dişi fareler vazektomize erkekler ile çiftleştirmeye atıldı. Diğer gün, vajinal plak kontrolü yapıldı ve vajinal plak pozitif olan dişiler çiftleşmeye atıldıkları saatten 14 saat sonra Fallop tüpleri Modified HTF medyumuna içerisine alındı. Stereo mikroskop altında ovaryumların parçalanması ile profaz I aşamasındaki oositler, Fallop tüplerinin parçalanması ile de MII aşamasındaki oositler deney gruplarındaki şekilde toplandı.

3.4. Erken Dönem Embriyoların Toplanması

Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu kabul edilen kontrol grubundaki dişi fareler ile süperovulasyon grubundaki dişi fareler ise hCG enjeksiyonundan 20, 42 saat sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. 20. saatte farelerin Fallop tüpleri çıkartılarak Modified HTF medyumuna içerisine alındı ve stereo mikroskop altında Fallop tüpünün ampulla bölgesi

bir pensle sabitlenerek diğer kısımları enjektör iğnesi ile patlatıldı ve 1 hücreli embriyoların medyum içerisine çıkması sağlandı. Medyum içerisindeki embriyolar ağız pipeti ile toplandı. 42. saatte 2 hücreli embriyolar yine Fallop tüplerinin mikroskop altında parçalanması ile elde edildi. Toplanan embriyolar temiz Modified HTF medyumuna alınır.

3.5. İmmüno Floresan Boyama

Çalışmada toplanan profaz I ve metafaz II aşamasındaki oositlerde ve preimplantif dönem embriyolarında (1 hücreli, 2 hücreli) DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin lokalizasyonlarının ve ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi amacıyla immüno floresan yöntemi kullanılmıştır.

3.5.1. Kullanılan Solüsyonlar

%4 Paraformaldehit (PFA) Solüsyonu

6 gr paraformaldehit 200 ml bidistile suya konuldu ve içerisine NaOH eklenip manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica, F20520162) tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Berrak çözelti oluşmasının ardından 1 tablet PBS karışımına eklendi (1X PBS, Sigma P4417). Solüsyonun pH'ı 7.2- 7.4 arasında olacak şekilde pH metre ile ölçülerek ayarlandı ve daha sonra solüsyon eşit hacimlere bölünerek -20°C' de kullanıma kadar saklandı.

Fosfat Tamponlu Tuz(PBS) Solüsyonu- %2 Bovine Serum Albumin (BSA) Solüsyonu

Bir tablet PBS (Sigma, P4417) 200 ml bidistile su içerisinde çözülerek kullanılacak olan 1X PBS solüsyonu hazırlandı. %2'lik BSA solüsyonu taze olarak ve 10 ml PBS içine 0.2 gr BSA (Sigma A9647) eklenip çözülerek hazırlandı.

Permeabilizasyon Solüsyonu

1000 µl PBS içerisine 10 µl Tween-20 (Sigma P1379) eklenerek kullanılacağı zaman taze hazırlandı.

Antikor Dilüent (Seyreltme) Solüsyonu

%0.05'lik Tween-20 içeren PBS-%2 BSA solüsyonu antikor dilüye edici solüsyon olarak kullanıldı. 1000 µl PBS-%2 BSA solüsyonu içerisine 0.5 µl Tween-20 eklenerek hazırlandı.

Bloklama Solüsyonu

799 µl PBS içerisine, 1 µl Tween 20 ve 200 µl Normalkeçi serumu (Vector N0912) eklenerek taze hazırlandı.

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

Nüklear boyanma için DAPI (Sigma D8417) 1 ml steril suda çözündü. Aliquotlar şeklinde bölünerek -20°C'ye kaldırıldı. Çalışma solüsyonu hazırlamak için, bu aliquattan 1 µl alınarak 999 µl PBS (1:1000 konsantrasyonda) içerisine konuldu.

Gözlem:

Stereo mikroskop: Tüm parçalama-toplama ve immüno Floresan boyanma basamakları Zeiss Stemi SV11 marka stereo mikroskop altında yapıldı.

Floresan mikroskop: İmmün boyama sonrasında floresan işaretli proteinlerin gözlemi ve değerlendirilmesi ise Olympus BX61 marka floresan mikroskop ve beraberindeki dijital kamera ve bilgisayar yazılımı kullanılarak yapıldı.

3.5.2. Oositlerde ve Preimplantasyon Dönem Embriyolarda DNMT Proteinlerinin Gösterilmesi

Çalışmada DNMT proteinlerinden DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B profaz I ve metafaz II oositlerdeki ve 1 hücreli, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamalarındaki preimplantasyon dönem embriyolarındaki ekspresyonu aşağıda detaylandırılmış olan immüno Floresan boyama yöntemi ile belirlendi.

3.5.3. İmmüno Floresan Boyama Yöntem Basamakları

1. Oositler ve embriyolar, %4 PFA içerisine alınarak 30 dakika fikse edildi.
2. Fiksasyon işleminden sonra oositler ve embriyolar, 3x10 dakika 10' dakika %2'lik BSA damlasından geçirilerek yıkama yapıldı.
3. Yıkamanın ardından oositler ve embriyolar permeabilizasyon solüsyonu içerisinde oda ısısında 15 dk permeabilize edildi.
4. Permeabilizasyon işleminin ardından oositler ve embriyolar, bloklama solüsyonu içerisinde oda ısısında 60 dakika bloklandı.
5. Bloklama işleminin ardından oositler ve embriyolar, antikor seyreltme solüsyonu içerisinde hazırlanmış olan primer antikorların içerisine alınarak gece boyu +4°C' de inkübe edildiler.
6. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3x10 dakika PBS- %2 BSA damlasından geçirilerek yıkama yapıldı.

7. Yıkama işleminin ardından oositler ve embriyolar, antikor seyreltme solüsyonu içerisinde hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor içerisine aktarıldılar ve 60 dakika oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Sekonder antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 3x10 dakika PBS- %2 BSA damlasından geçirilerek yıkama yapıldı.
9. Oositler ve embriyolar, nüklear DNA boyanması için DAPI solüsyonunun içine alınarak 2 dakika boyunca inkübe edildi.
10. DAPI solüsyonu ile inkübe edilme işleminin ardından oositler ve embriyolar, 5 dakika PBS- %2 BSA damlasında yıkama yapıldı.
11. Son olarak oositler ve embriyolar, floresan ışımının solmasını engelleyen 5 µl'lik kapatma solüsyonun (Vector Vectaschield, H-1100) bulunduğu lam üzerine alındı ve lamel ile hava boşluğu kalmayacak şekilde kapatma işlemi yapıldı.

Tablo 3.1. İmmünofloresan boyama yönteminde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve seyreltme oranları

PRİMER ANTİKOR	KATALOG NUMARASI	SEYRELTME	SEKONDER ANTİKOR	KATALOG NUMARASI	SEYRELTME
DNMT1	ABCCAM Ab87654	1:300	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1:400
DNMT3A	ABCCAM Ab23565	1:200	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1:400
DNMT3B	ABCCAM Ab2851	1:200	Alexa Fluor 488 goat anti—rabbit IgG	INVITROGEN A11008	1:400

BULGULAR

4.1. İmmüno Floresan Bulguları

Bu çalışmada süperovule edilmiş fare oosit ve erken dönem embriyolarında DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin hücre içi yerleşimleri ve görelî ekspresyon düzeyleri kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca bu proteinlerin herhangi bir indüksiyon yapılmamış normal oosit ve erken dönem embriyolardaki ekspresyon seyri de ilk defa detaylı bir şekilde değerlendirilmiştir.

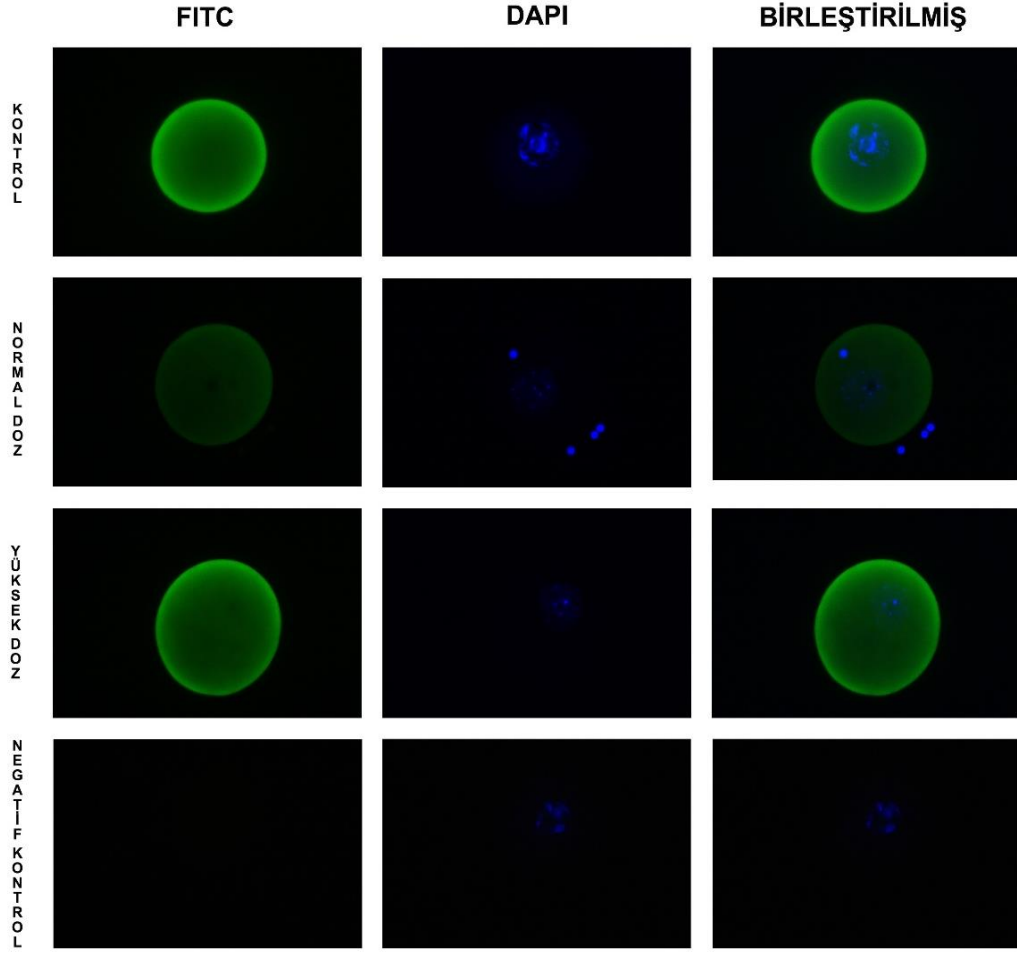
4.1.1. Kontrol ve Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriyolarda DNMT1 Ekspresyonu

Süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV oosit, MII oosit, 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda DNMT1 protein ekspresyonu immüno Floresan yöntemi kullanılarak kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

4.1.1.1. GV Oositlerde DNMT1 Ekspresyonu

Normal doz grubundaki GV oositlerde DNMT1 ekspresyonu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($P<0.01$). Yüksek doz ve normal doz grubundaki GV oositler karşılaştırıldığında yüksek doz grubundaki GV oositlerde DNMT1 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır ($P<0.01$). Ancak kontrol ve yüksek doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.1)(Şekil 4.5).

DNMT1 proteini, kontrol grubundaki GV oositlerde nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterirken, membrana yakın bölgede bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV oositlerde fark olmadığı gözlenmiştir.

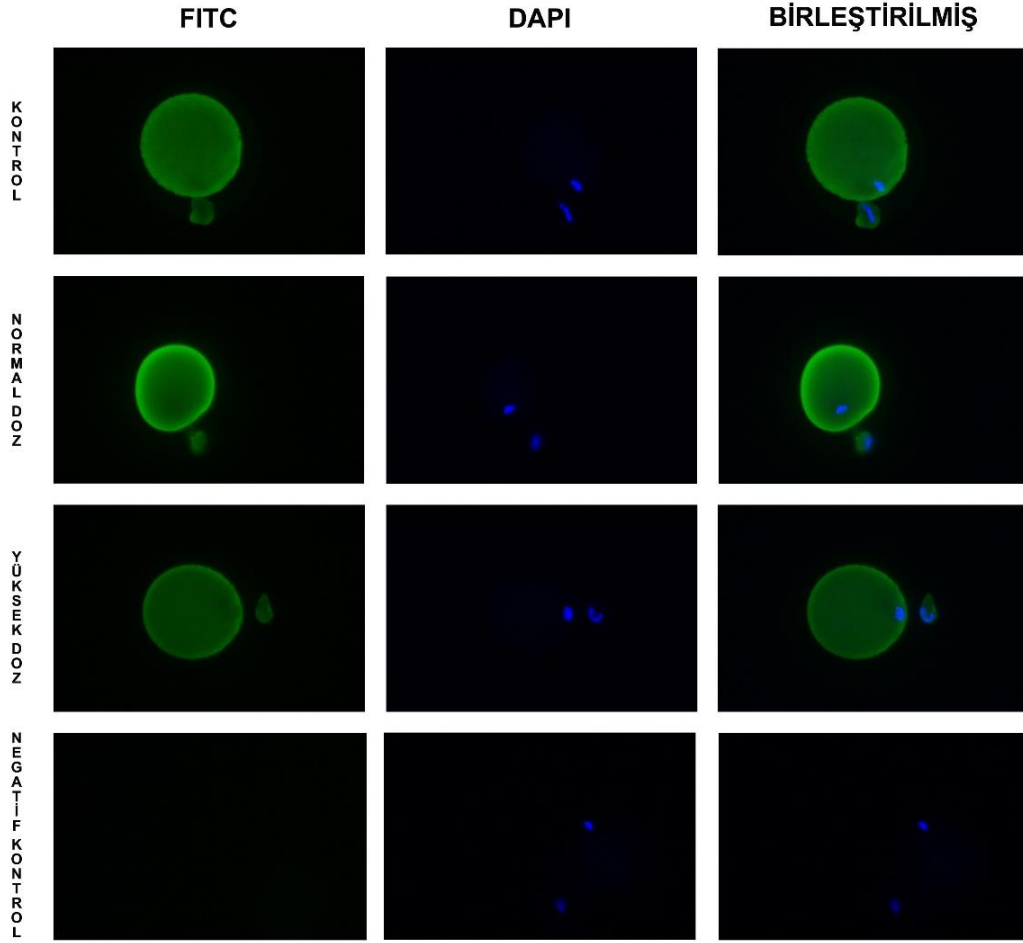


Şekil 4.1. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.1.2. MII Oositlerde DNMT1 Ekspresyonu

Normal doz grubundaki MII oositlerde DNMT1 ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış görülsede anlamlı düzeyde fark yoktur. Yüksek doz ve normal doz grubundaki GV oositler karşılaştırıldığında yüksek doz grubundaki GV oositlerde DNMT1 ekspresyonu azalmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki MII oositler karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.2)(Şekil 4.5).

DNMT1 proteini, kontrol grubundaki MII oositlerde nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterirken, memrana yakın bölgede bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, normal doz grubunda diğer gruplara göre MII oositlerde membranöz yoğunlaşma olduğu gözlenmiştir.

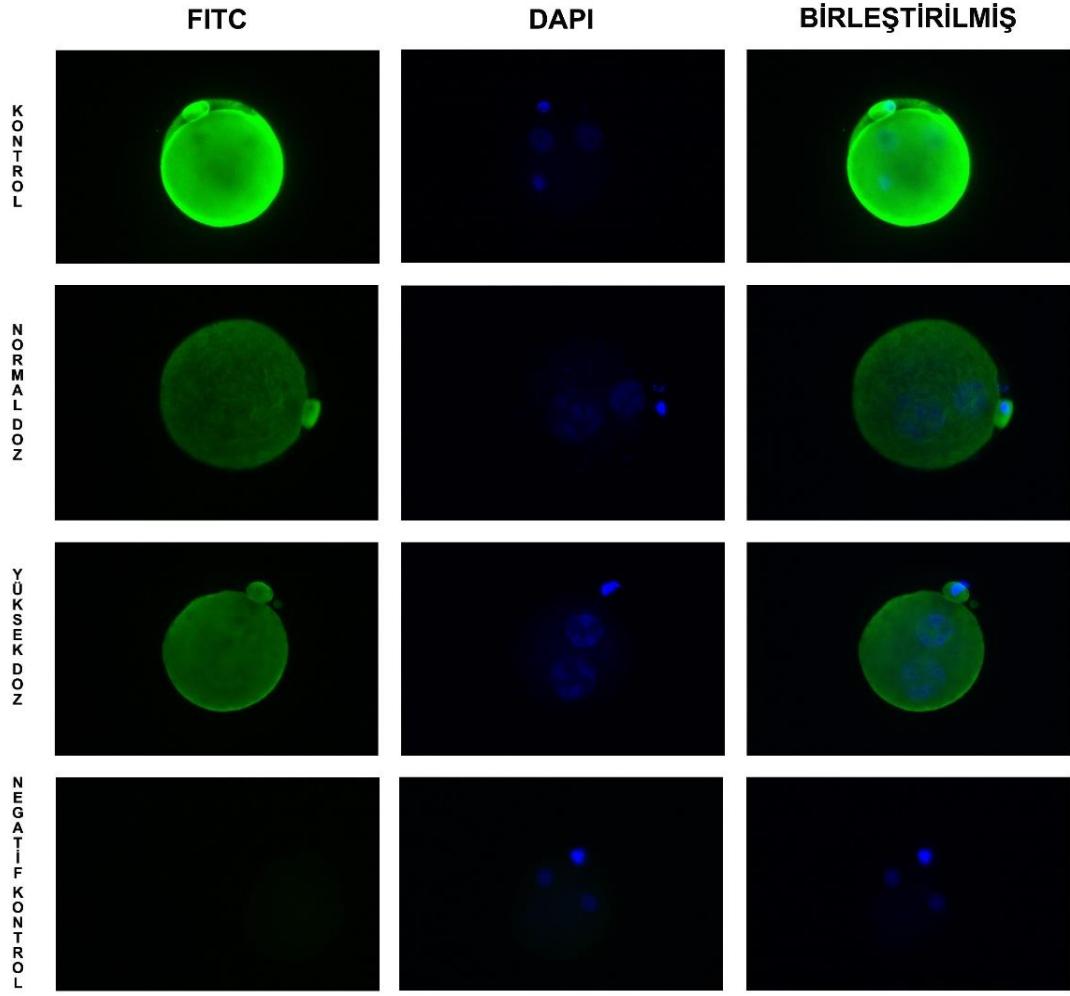


Şekil 4.2. Metafaz II aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.1.3. 1-hücreli Embriyolarda DNMT1 Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolarda DNMT1 ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır ($P<0.05$). Yüksek doz ve normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde DNMT1 ekspresyonunda azalma bulunmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.3) (Şekil 4.5).

DNMT1 proteini, kontrol grubundaki 1-hücreli embriyolarda nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterirken, memrana yakın bölgede bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen 1-hücreli embriyolarda fark olmadığı gözlenmiştir.

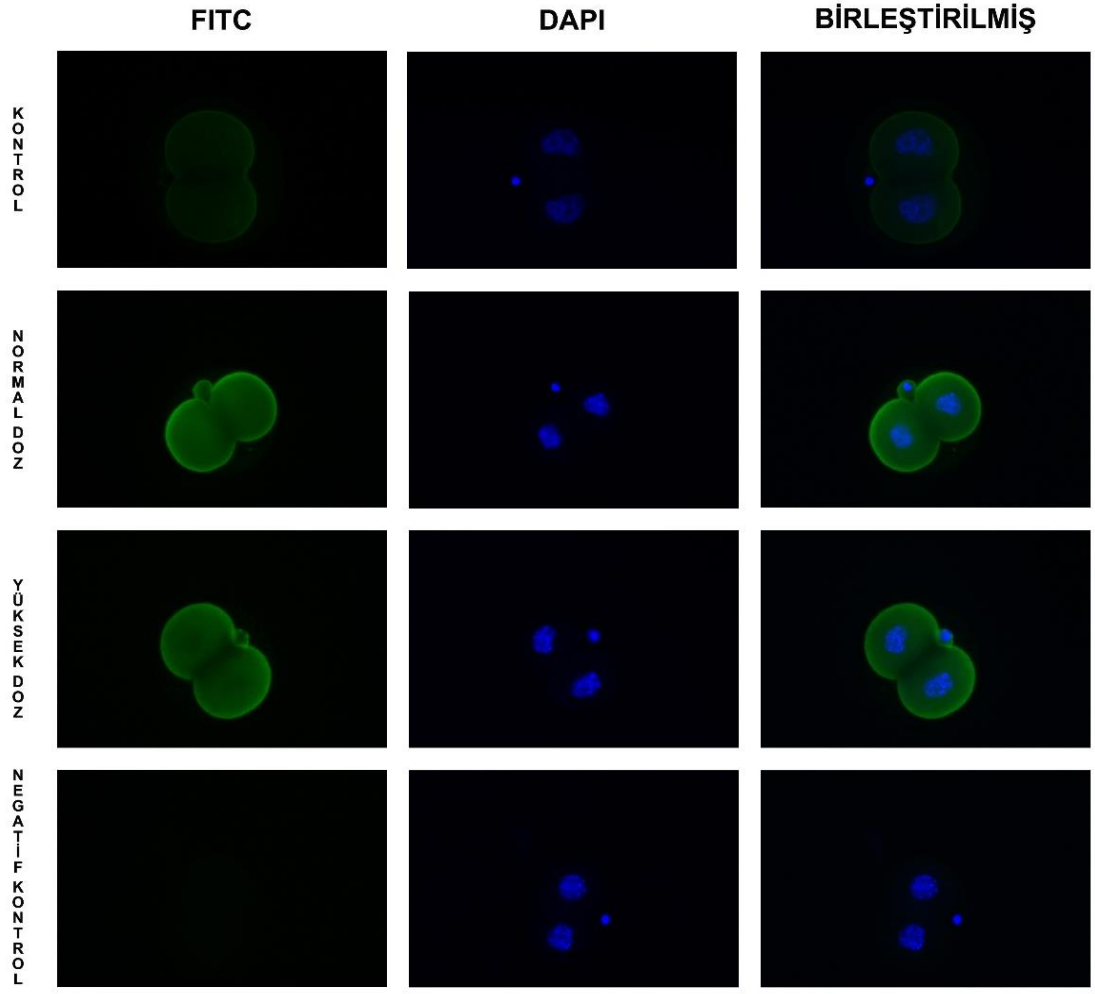


Şekil 4.3. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

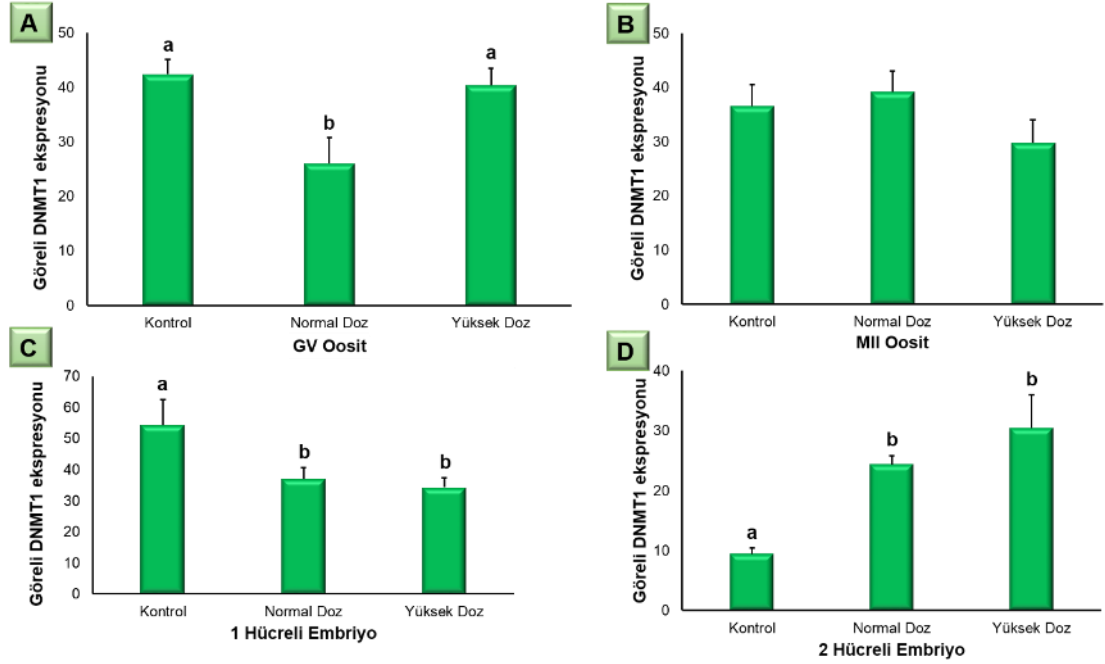
4.1.1.4. 2-hücreli Embriyolarda DNMT1 Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolarda DNMT1 ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($P<0.01$). Yüksek doz ve normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda kontrole göre anlamlı düzeyde DNMT1 ekspresyonunda artış bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.4) (Şekil 4.5).

DNMT1 proteini, kontrol grubundaki 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterirken, kortikal bölgede bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen 2-hücreli embriyolarda membranöz yoğunlaşma olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.4. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT1 protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.



Şekil 4.5. Oosit ve erken dönem embriyolarda görel DNMT1 protein ekspresyonları sonuçları

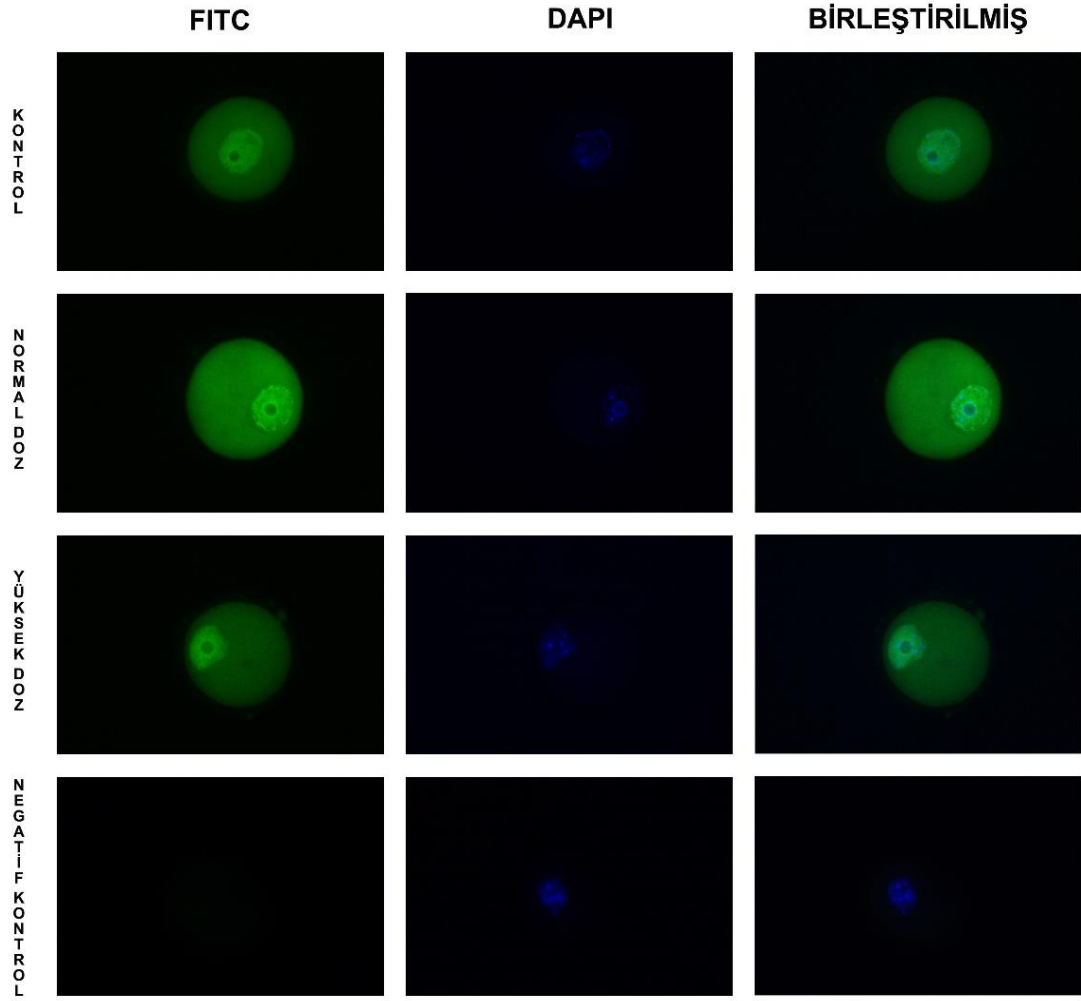
4.1.2. Kontrol ve Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriyolarda DNMT3A Ekspresyonu

Süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV oosit, MII oosit, 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda DNMT3A protein ekspresyonu immunofloresan yöntemi kullanılarak kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

4.1.2.1. GV Oositlerde DNMT3A Ekspresyonu

Normal doz grubundaki GV oositlerde DNMT3A ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış görülsede anlamlı düzeyde fark yoktur. Yüksek doz ve normal doz grubundaki GV oositler karşılaştırıldığında yüksek doz grubundaki GV oositlerde DNMT3A ekspresyonu azalmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki GV oositler karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda azalma görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.6) (Şekil 4.10).

DNMT3A proteini, kontrol grubundaki GV oositlerde nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV oositlerde fark olmadığı gözlenmiştir.

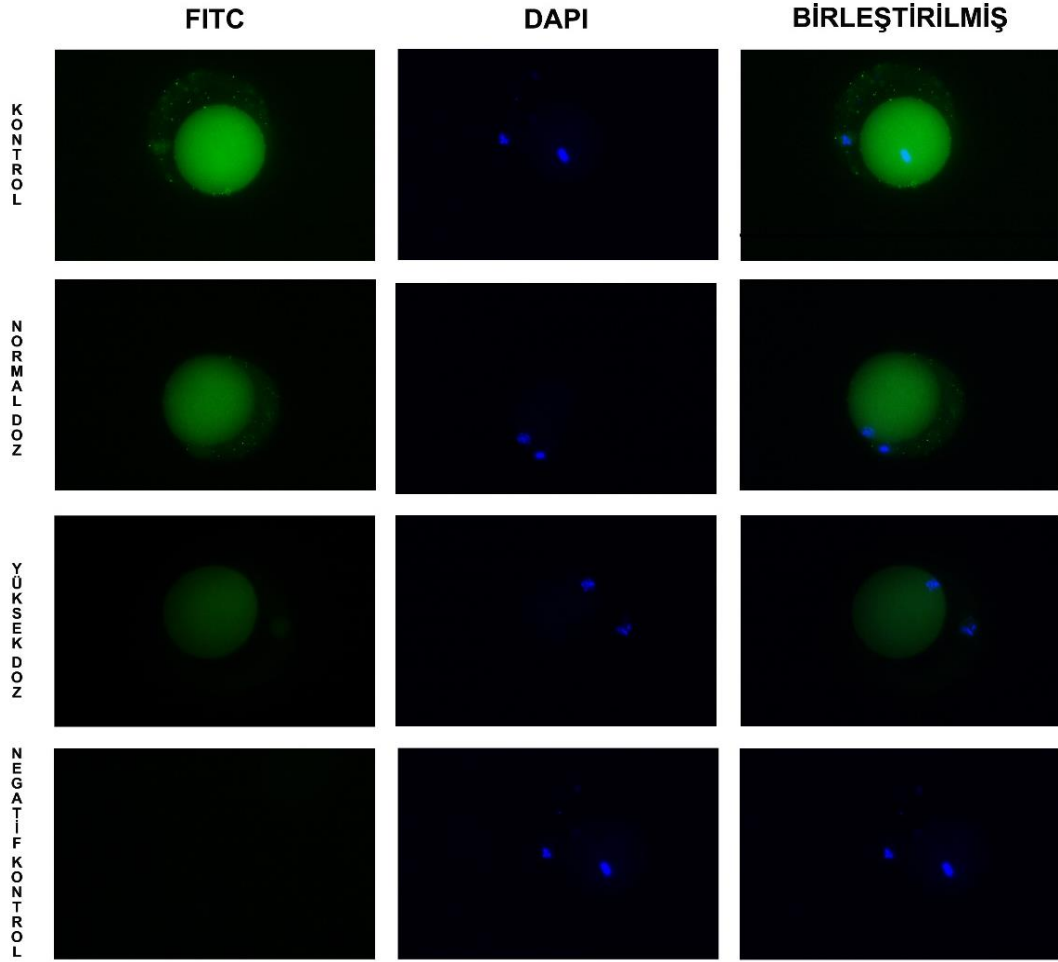


Şekil 4.6. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.2.2. MII Oositlerde DNMT3A Ekspresyonu

Normal doz grubundaki MII oositlerde DNMT3A ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma görülsede anlamlı düzeyde fark yoktur. Yüksek doz ve normal doz grubundaki MII oositler karşılaştırıldığında yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonu azalmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki MII oositler karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.7) (Şekil 4.10).

DNMT3A proteini, kontrol grubundaki MII oositlerde nükleer ve sitoplazmik bölgede normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen MII oositlerde fark olmadığı gözlenmiştir.

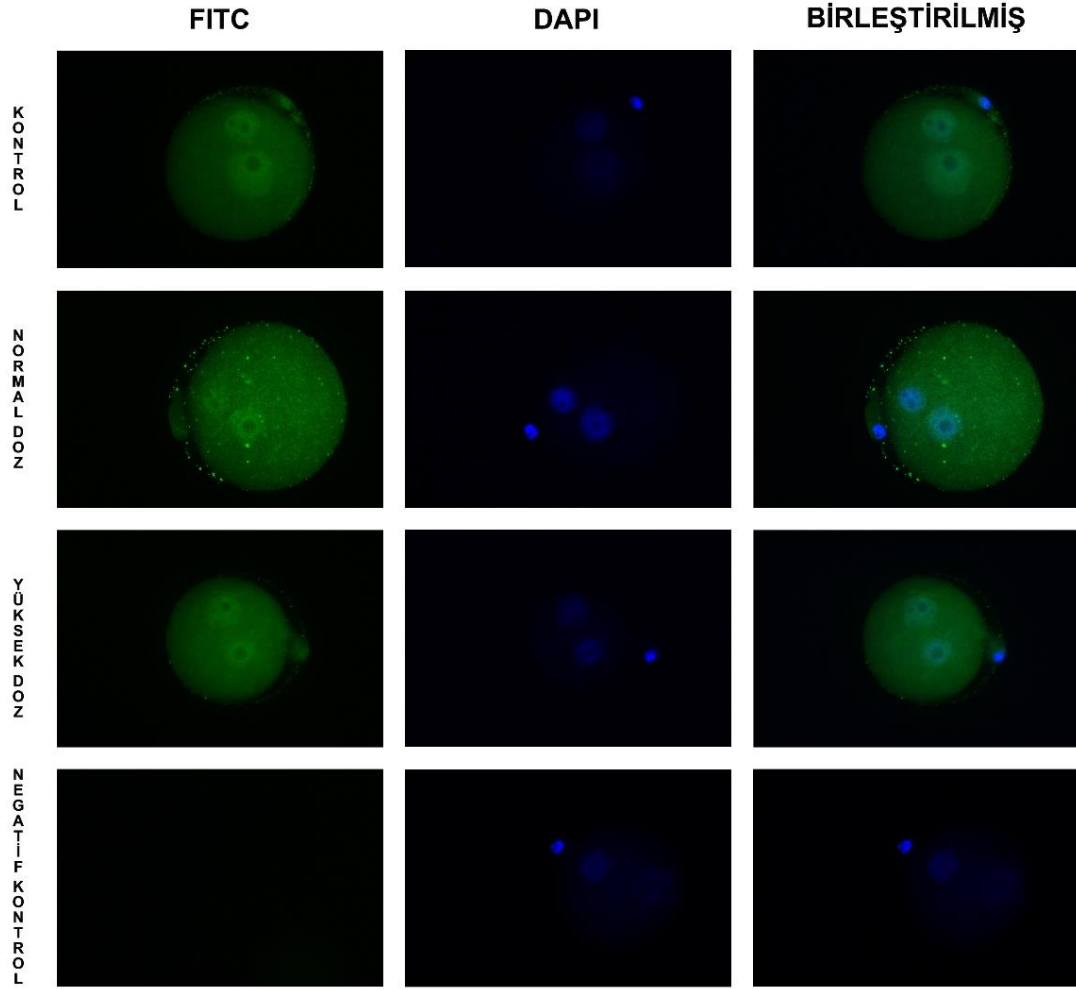


Şekil 4.7. Metafaz II aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.2.3. 1-hücreli Embriyolarda DNMT3A Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolarda DNMT3A ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($P<0.001$). Yüksek doz ve normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($P<0.05$). Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.8) (Şekil 4.10).

DNMT3A proteini, kontrol grubundaki 1-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen 1-hücreli embriyolarda fark olmadığı gözlenmiştir.

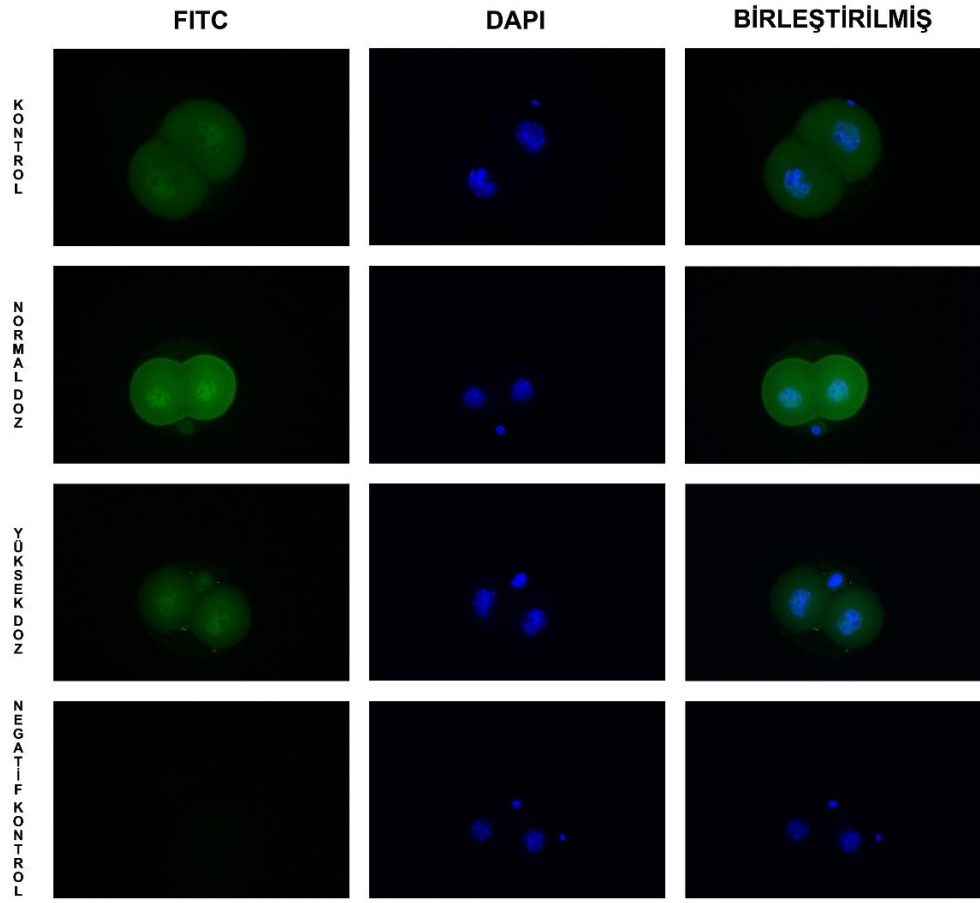


Şekil 4.8. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları. Orjinal büyüme 400X'dir.

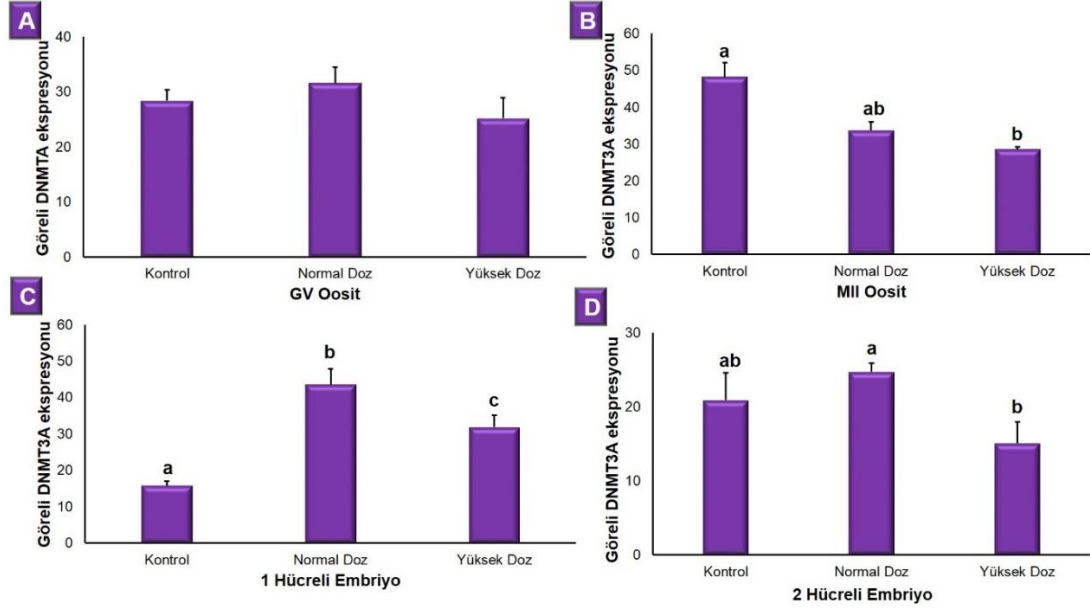
4.1.2.4. 2-hücreli Embriyolarda DNMT3A Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolarda DNMT3A ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış görülsede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Yüksek doz ve normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında, yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($P<0.01$). Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 2-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda DNMT3A ekspresyonunda azalma gözlenmede istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.9) (Şekil 4.10).

DNMT3A proteini, kontrol grubundaki 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, norma doz grubunda 2-hücreli embriyolarda nükleer ve membranöz yoğunlaşma olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.9. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3A protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.



Şekil 4.10. Oosit ve erken dönem embriyolarda görel DNMT3A protein ekspresyonları sonuçları.

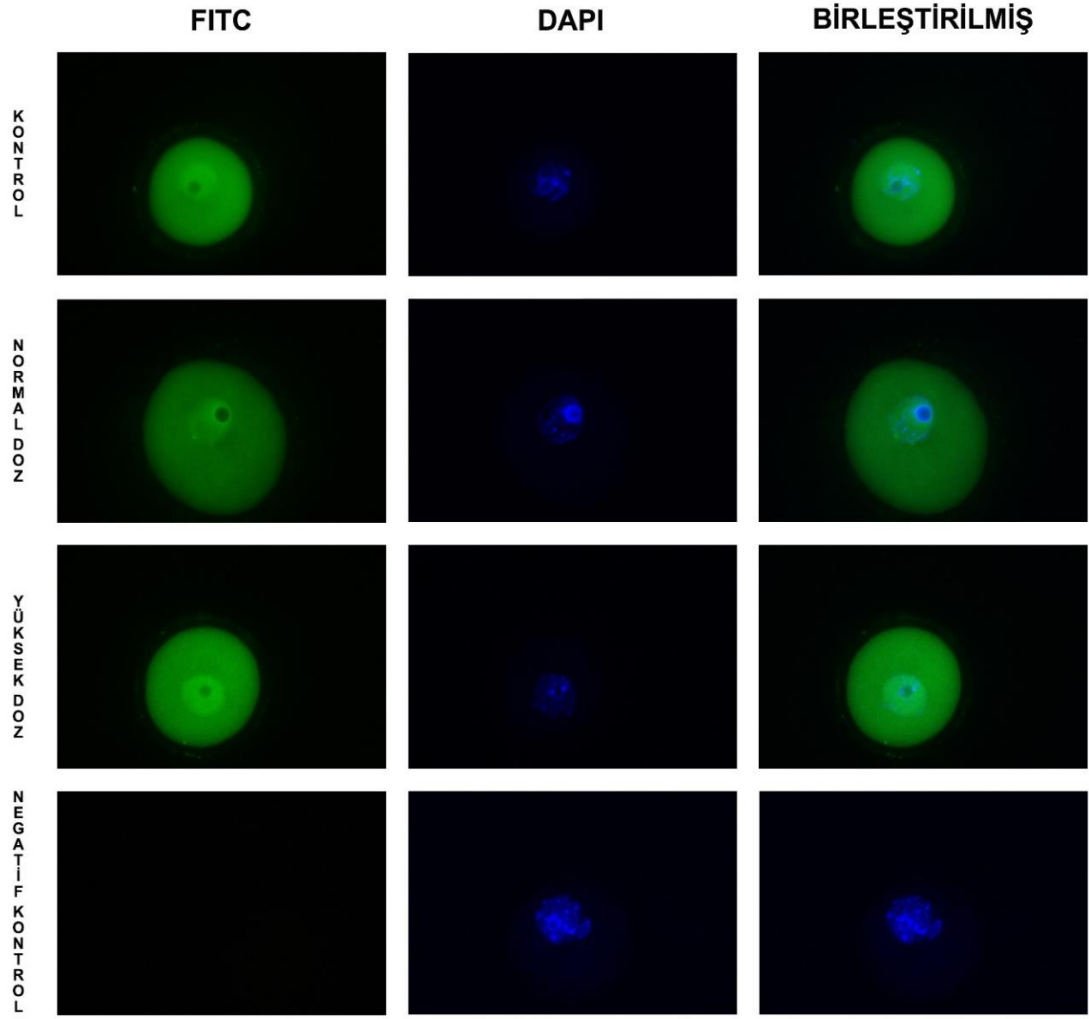
4.1.3. Kontrol ve Süperovulasyon Uygulaması ile Elde Edilmiş Oosit ve Erken Dönem Embriyolarda DNMT3B Ekspresyonu

Süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV oosit, MII oosit, 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda DNMT3B protein ekspresyonu immunofloresan yöntemi kullanılarak kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır.

4.1.3.1. GV Oositlerde DNMT3B Ekspresyonu

Normal doz grubundaki GV oositlerde DNMT3B ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma görülsede anlamlı düzeyde fark yoktur. Yüksek doz ve normal doz grubundaki GV oositler karşılaştırıldığında yüksek doz grubundaki GV oositlerde DNMT3B ekspresyonu artmasına rağmen gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki GV oositler karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda artış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.11) (Şekil 4.15).

DNMT3B proteini, kontrol grubundaki GV oositlerde nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, normal doz grubunda GV oositlerde nükleer ve sitoplazmik bölgede ekspresyonun azaldığı gözlenmiştir.

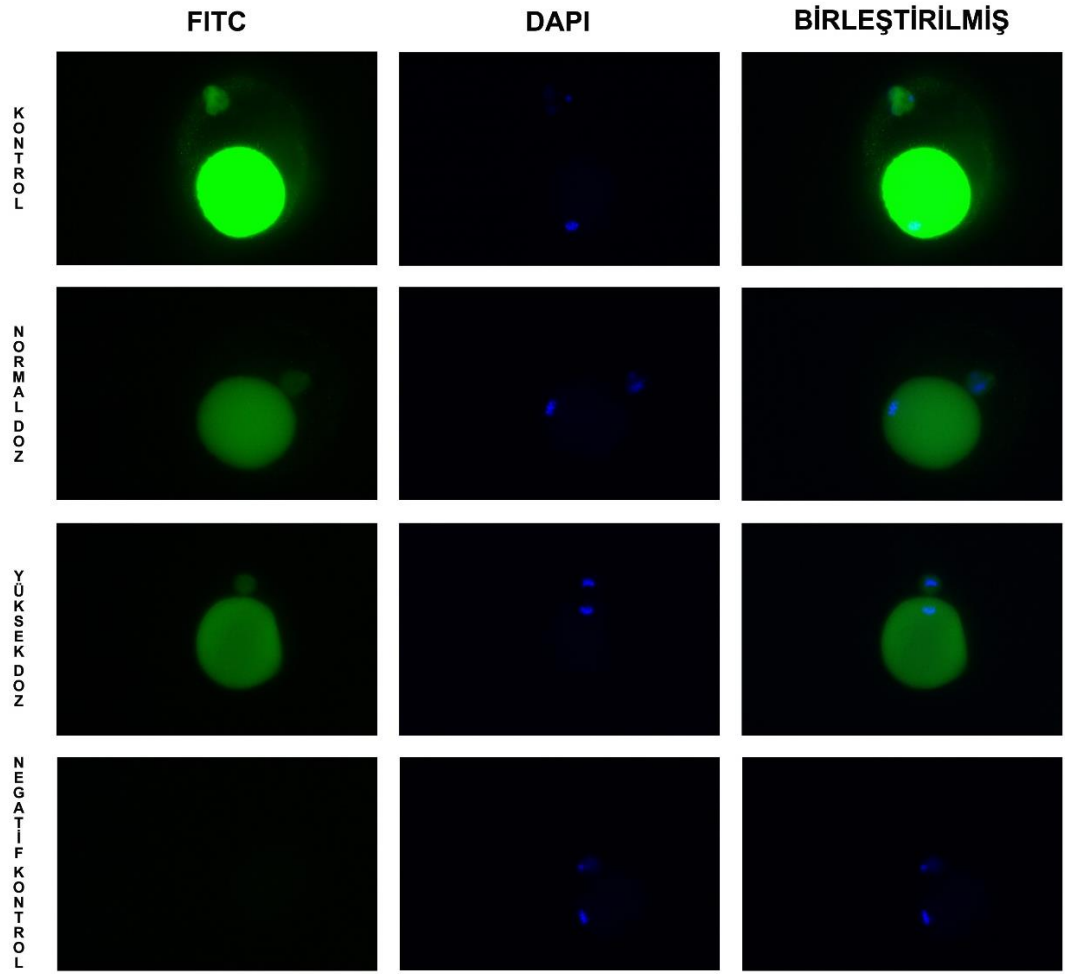


Şekil 4.11. Germinal vezikül aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.3.2. MII Oositlerde DNMT3B Ekspresyonu

Normal doz grubundaki MII oositlerde DNMT3B ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azalma görülsede anlamlı düzeyde fark yoktur. Yüksek doz ve normal doz grubundaki MII oositlerde DNMT3B ekspresyonu karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki MII oositler karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda DNMT3B ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı bulunmuştur ($P<0.05$) (Şekil 4.12) (Şekil 4.13).

DNMT3B proteini, kontrol grubundaki MII oositlerde nükleer ve sitoplazmik bölgede normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen MII oositlerde nükleer ve sitoplazmik bölgede ekspresyonun azaldığı gözlenmiştir.

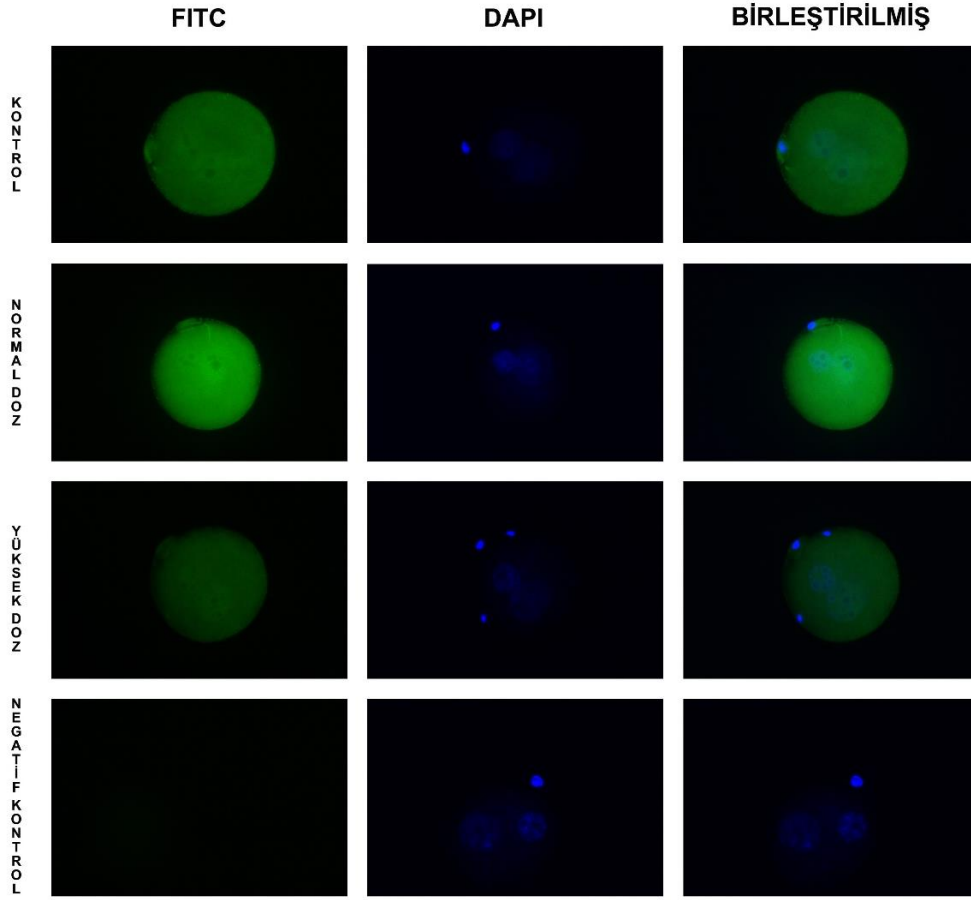


Şekil 4.12. Metafaz II aşamasındaki oositlerde kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

4.1.3.3. 1-hücreli Embriyolarda DNMT3B Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolarda DNMT3B ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Yüksek doz ve normal doz grubundaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında yüksek doz grubunda DNMT3B ekspresyonunda azalma görülsede anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 1-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda DNMT3B ekspresyonunun da azalma gözlene de anlamlı fark bulunmamıştır (Şekil 4.13) (Şekil 4.15).

DNMT3B proteini, kontrol grubundaki 1-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, normal doz grubunda 1-hücreli embriyolarda nükleer ve sitoplazmik bölgelerde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir.

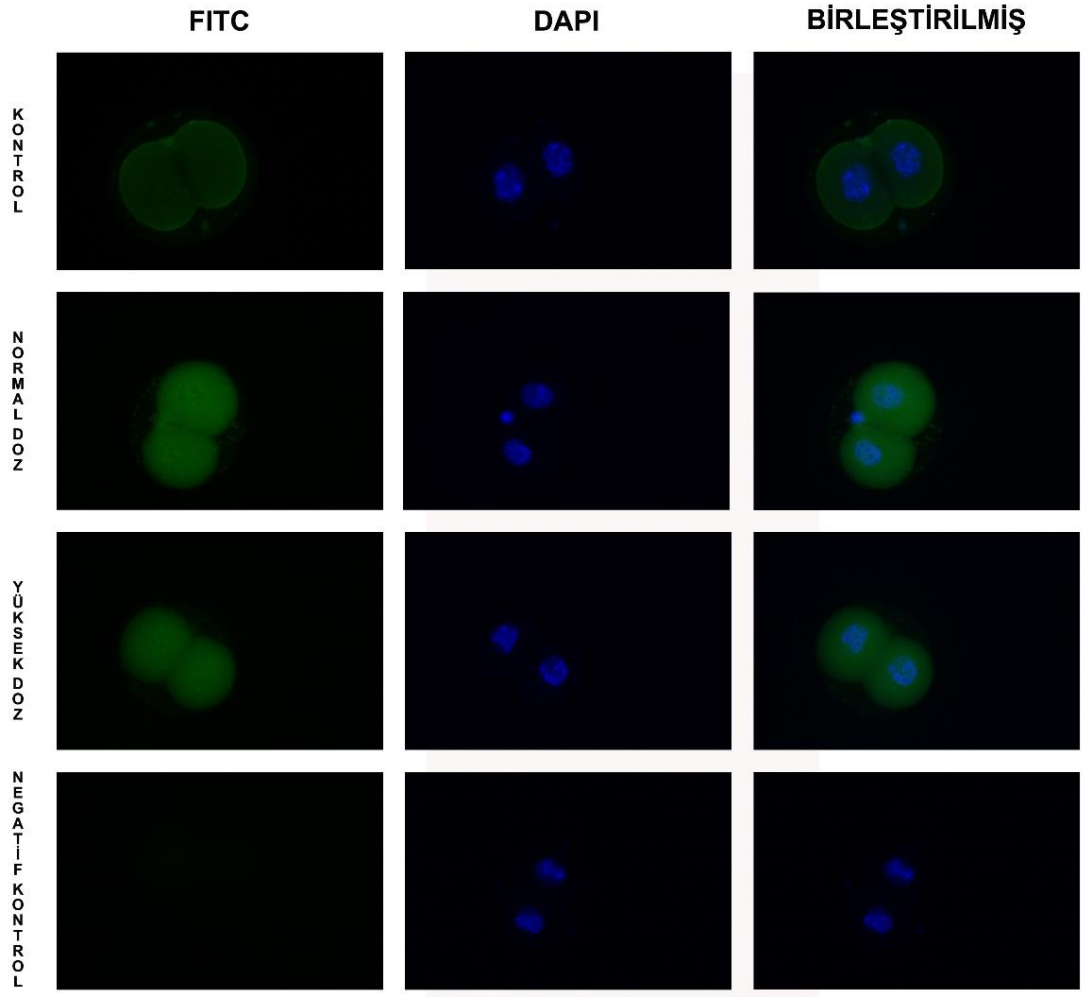


Şekil 4.13. Bir hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.

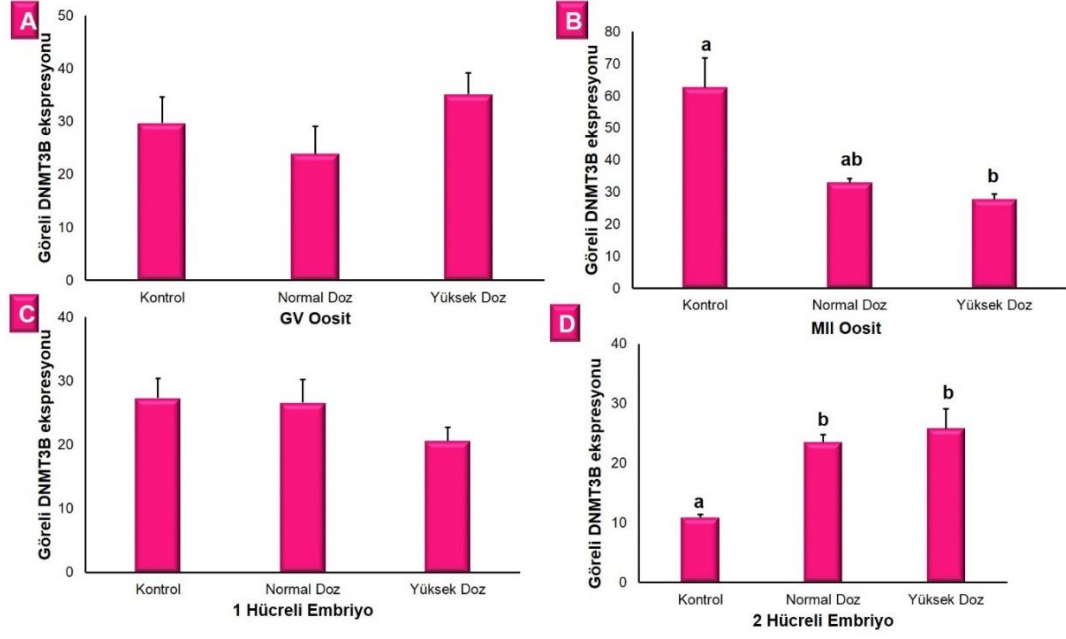
4.1.3.4. 2-hücreli Embriyolarda DNMT3B Ekspresyonu

Normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolarda DNMT3B ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı bulunmuştur ($P<0.01$). Yüksek doz ve normal doz grubundaki 2-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol ve yüksek doz gruplarındaki 2-hücreli embriyolar karşılaştırıldığında ise yüksek doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış DNMT3B ekspresyonunun olduğu bulunmuştur ($P<0.01$) (Şekil 4.14) (Şekil 4.15).

DNMT3B ekspresyonunda DNMT3B proteini, kontrol grubundaki 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun yerleşim gösterirken, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterdiği gözlenmiştir (Tablo 4.1). Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen 2-hücreli embriyolarda nükleer ve sitoplazmik bölgelerde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir.



Şekil 4.14. İki hücreli embriyolarda kontrol, normal doz ve yüksek doz gruplarında DNMT3B protein ekspresyonları. Orjinal büyütme 400X'dir.



Şekil 4.15. Oosit ve erken dönem embriyolarda göreli DNMT3B protein ekspresyonları sonuçları

	DNMT1	DNMT3A	DNMT3B
GV OOSİT	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Zayıf) Kortikal bölge (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)
MII OOSİT	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Zayıf) Kortikal bölge (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)
1-HÜCRELİ EMBRİYO	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Zayıf) Kortikal bölge (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)
2-HÜCRELİ EMBRİYO	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Normal) Kortikal bölge (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)	Sitoplazma (Normal) Nükleus (Yoğun)

Tablo 4.1. Oosit ve erken dönem embriyolarda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin hücre içi yerleşimleri.

TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada fare deney modelinde süperovulasyon uygulamasının oosit ve embriyolarda DNMT proteinlerden olan DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B'nin ekspresyonal düzeylerini değiştirdiği ilk defa ortaya konulmuştur. DNMT1 protein ekspresyonu GV oosit, 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değişirken, MII oosit aşamasında değişim görülse de sonuç anlamlı bulunamamıştır. DNMT3A protein ekspresyonu MII oosit, 1-hücreli ve 2-hücreli embriyo aşamasında istatistiksel olarak anlamlı seviyede değişirken, GV oosit aşamasında da değişim gözlenmiş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Son olarak DNMT3B protein ekspresyonunda ise MII oosit ve 2-hücreli embriyo aşamalarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmesine rağmen, GV oosit ve 1-hücreli embriyo aşamalarında gözlenen değişim anlamlı bulunmamıştır. Yapılan bu çalışma ile, ilk defa bu proteinlerin hücre içi yerleşimleri kontrol gruplarında detaylı olarak incelenmiştir. Hücre içi yerleşimleri karşılaştırıldığında kontrol grubu ve süperovulasyon uygulanan gruplar arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır. DNMT1 proteininin oosit ve embriyolarda yerleşimi nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada normal ve membrana yakın bölgelerde ise yoğun gözlenmiştir. DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin yerleşimleri ise sitoplazmada normal gözlenirken nükleer bölgelerde yoğun şiddette görülmüştür.

Epigenetik mekanizmalar; oosit ve preimplantasyon embriyo gelişim süreçlerinde önemli rol oynar ve başarılı gebelik için önemlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda yardımla üreme teknolojisi ile doğan çocuklarda artmış oranda epigenetik anomalilerin olduğu gözlenmektedir[130]. Doğal yoldan doğan çocuklardan farklı olarak bu teknolojide kullanılan yöntemlerden mi bu anomalilerin ortaya çıktığı henüz net olarak aydınlatılamamıştır. Bu konuda birçok çalışma yapılmıştır ve hala çalışmalara devam edilmektedir. Bir yardımla üreme yöntemi olan süperovulasyon ya da ovaryan sitümulasyon artmış oosit ve embriyo üretimine olanak sağlamaktadır. İnsanlarda bu yöntem fertilité tedavisinde kullanılan bir uygulama haline gelmiştir. Ancak yapılan çalışmalarda süperovulasyon uygulamasının oosit maturasyonu, oosit kalitesi, epigenetik mekanizmalar, anormal blastosist sayısı, imprinting hastalıklar, fetal büyüme geriliği, embriyonik gelişimde gecikme gibi birçok mekanizma üzerinde olumsuz etkisinin olduğu bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada süperovulasyon yöntemi ile elde edilen blastosistlerde *H19* geninin doğru metillenmediği bulunmuştur [120]. *H19* geni paternal imprints olması gereken bir gendir. Babadan gelen genomda *H19* metile durumda iken *IGF2* geni eksprese olmaktadır. Anneden gelen genomda ise *IGF2* geninin, baskılayıcı olan geni metile durumda olmadığı için bu gen anneden üretilmez. Dolayısı ile *H19* geninin doğru metillenmemesi *IGF2*'nin doğru baskılanamamasına sebep olur ve hem

anneden hem babadan IGF2'nin ekspresyonuna neden olur. Sonuç olarak bu imprinting bozukluğu sonucunda doğan çocuklarda Wilm's tümörü gelişebilmektedir [131]. Farklı yapılan çalışmalarda da süperovulasyon uygulamasının oosit ve embriyo dışında plasenta gibi dokularda da imprinting genlerde metilasyon bozukluklarına neden olduğunu ortaya koymuştur [13]. Yapılan 2010 ve 2011 yıllarında farklı çalışmalarda ise süperovulasyon uygulamasının blastosistlerde maternal ve paternal imprinting genler üzerinde olumsuz etkisinin doz bağımlı olduğunu ve özellikle yüksek doz gruplarında (10 IU) bu olumsuz etkinin daha çok arttığını bildirmişlerdir [100, 102].

Yapılan bir başka çalışmada, hormonal uyarımın oogenez sırasında metilasyon imprintlerini bozduğunu yada oosit kalitesine etki eden maternal genleri etkileyerek bu zararı verebileceğini bildirmektedir. Hormonal uyarımın bu zararı, DNA metilasyonu ve bununla ilişkili olarak DNMT enzimlerini etkileyerek, bu kusurlu imprinting mekanizmaların ise sürdürülmesiyle oluşacak bozuk epigenetik işaretli preimplantif dönem embriyoları oluşturabileceğini bildirmişlerdir [103]. Süperovulasyon ile elde edilen blastosistlerde global DNA metilasyonunun kontrole göre özellikle iç hücre kitlesinde azalış gösterdiği bulunmuştur [104].

DNA metilasyonunu öncül olarak gerçekleştiren bilindiği üzere DNMT enzimleridir. Ancak özellikle oosit ve erken dönem embriyolarda, süperovulasyonun DNMT'lar üzerine etkisini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Yapılan 2013 yılında bir çalışmada, süperovulasyonun etkisini, *Dnmt1o*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* ve *Dnmt3l* mRNA düzeyinde MII oositlerde ve 1-hücreli embriyolarda değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada kontrol, düşük doz (6 IU) ve yüksek doz (10 IU) olmak üzere 3 grup oluşturmuşlardır. Araştırmacılar gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkların olmadığını rapor etmişlerdir [123]. Biz de çalışmamızda kontrol, normal doz (5 IU) ve yüksek doz (7.5 IU) olmak üzere 3 grup oluşturduk. MII oositlerde DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken DNMT1 proteinin de ise anlamlı fark bulunmamıştır. 1-hücreli embriyolarda ise bütün gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. Yapılan iki çalışma arasında farklılığın mRNA ve protein ekspresyonal farklılığından, kullanılan hormon doz farklılıklarından, hayvan türü yada hayvan yaşından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Daha yeni bir çalışmada ise süperovulasyon uygulaması ile elde edilen zigotlarda global DNA metilasyonunun normal ovülasyon grubuna göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Aynı zamanda araştırmacılar, blastosistte *Dnmt1*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* ve *DNMT3l* genlerinin süperovulasyon grubunda anlamlı olarak arttığını bulmuşlardır [105]. Bizim çalışmamızda da paralel bir bulgu olarak DNMT3A ekspresyonu artarken; DNMT1 protein ekspresyonu anlamlı olarak zigot aşamasında azalmakta ve DNMT3B ise değişmemektedir. Bu farklılığın ise kullanılan FSH analoglarından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda kullanılan FSH analogu

PMSG iken diğerk çalışmada kullanılan ise kısarak koryonik gonadotropindir (eCG).

Önemli bir bulgu olarak, yaptığımız çalışma ile kontrol gruplarında ilk defa detaylı olarak DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin hücre içi yerleşimleri fare deney modelinde bir arada değerkendirilmiştir. Bulunan sonuçlar literatürde yapılan çalışmalar ile uyumludur. DNMT1 ekspresyonun oositlerde ve erken dönem embriyolarda sitoplazmik yerleşim gösterdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [74]. DNMT1 ekspresyonun sadece 8-hücreli embriyo aşamasında nükleer bölgede yoğunlaştığı bildirilmiştir [74]. Literatürle uyumlu olarak yaptığımız çalışmada DNMT1 proteinin yerleşiminin sitoplazmik bölgede daha yoğun olduğunu gösterdik. DNMT3A proteinin GV oositte nükleer, MII oositte sitoplazmik olduğu 8-hücreli embriyo aşamasına kadar ekspresyonunun zayıfladığı ve blastosist aşamasında ise ekspresyonun olmadığı yapılan çalışmada bildirilmiştir [74]. Çalışmamızda DNMT3A'nın oosit ve erken dönem embriyolarda nükleer bölgede yoğunlaştığını, MII aşamasında nükleus ve sitoplazmada yerleşimi olduğunu gösterdik. DNMT3B ekspresyonunun ise GV ve MII oositlerde ve 1-hücreli embriyo aşamasında olmadığı, özellikle 2-hücreli embriyo aşamasından sonra nükleer bölgede yerleşim göstererek blastosist aşamasına kadar varlığını sürdürdüğü rapor edilmiştir [74]. Ancak alışmamızda DNMT3B protein ekspresyonunun oosit ve embriyolarda nükleer bölgede yerleşim göstererek tüm gelişim aşamalarında varlığının olduğunu gösterdik. DNMT3B proteininin GV ve MII oosit, 1-hücreli embriyo aşamasında, literatürden farklı olarak bulduğumuz sonucun kullanılan hayvan türü yada antikor farklılıklarından dolayı kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

PMSG, glikoprotein hormon ailesine aittir ve FSH analoğu olarak görev yapmaktadır. Bilindiğı gibi FSH folikülogenez sürecinde önemli rol oynar ve ovaryum foliküllerinin maturasyonunu aktive eder [132, 133]. Daha önceden FSH reseptörünün geç foliküler gelişim evrelerindeki granuloza hücrelerinden eksprese edildiğı bilinmekteydi [134]. Ancak yapılan çalışmalarla insan ve domuz ovarumlarında, primer folikülden preovulator foliküle kadar olan evrelerden alınan GV oositlerde FSH reseptörünün varlığı tanımlandı [135]. hCG ise LH analoğu olarak kullanılmaktadır. LH reseptörü ise ovaryumda bulunan granuloza, teka ve luteal hücrelerden sentezlenir. FSH ve LH reseptörleri mRNA olarak insan ve fare oosit ve erken dönem embriyolarda tanımlanmıştır. Temel olarak FSH ve LH reseptörleri hücre içi sinyal mekanizmalarını indükleyen FSH ve LH 'ın aktivasyonunu yönetmektedir. Çünkü FSH ve LH reseptörlerinin gen ekspresyonları fare oosit, erken dönem embriyolar ve granuloza hücrelerinde gösterilmiştir, PMSG ve hCG de oosit ve erken dönem embriyolarda doğrudan yada dolaylı olarak benzer etkiye sahiptir [136]. Yaptığımız alışmada DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin oosit ve erken dönem embriyolarda kontrol ve süperovulasyon grupları ile karşılaştırıldığında, farklı ekspresyon paterine sahip olduğunu gördük. Örneğın; GV oosit aşamasında DNMT1 protein ekspresyonu normal doz grubunda kontrole göre anlamlı olarak düşerken, 2-hücreli embriyo aşamasında kontrole göre normal doz grubunda anlamlı artış

bulduk. Sonuç olarak; PMSG ve hCG farklı oosit ve erken dönem embriyolarda farklı etkiler yaratmaktadır.

Son olarak, memelilerde normal oogenez ve erken dönem embriyo gelişiminde doğru genlerin doğru zamanda ifadesi için DNA metilasyonu kritik öneme sahiptir. DNA metilasyonu sürdürme ve *de novo* metilasyon olmak üzere iki süreç içermektedir ki metilasyonda görev yapan primer enzimler DNMT'lerdir. DNMT'lerin yokluğunda, mutasyonlarında yada malformasyonlarında oosit maturasyonunda gecikme, embriyonik letalite, imprinting hastalıklar, epigenetik anomaliler gibi birçok mekanizmada bozuklukların ortaya çıkması bu enzimlerin önemini vurgulamaktadır. Bu enzimlerin genel yapıları, ekspresyonal düzeyleri, hücre içi yerleşimleri ve görevleri yapılan çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Ancak henüz hangi hücre içi yada dışı sinyal yollarının ya da hangi moleküllerin bu enzimleri aktive ettiği net olarak bilinmemektedir. Özellikle yardımla üreme teknolojileri ile doğan çocuklarda epigenetik hastalıkların arttığı rapor edilmiştir. Bu teknolojide kullanılan tekniklerin bu hasara neden olabileceği düşünülmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda süperovulasyon uygulamasının DNA metilasyonunu ve bununla ilişkili olarak DNMT enzimlerini değiştirdiği vurgulanmaktadır. Yaptığımız çalışmada ilk defa süperovulasyon uygulamasının oosit ve erken dönem embriyolarda DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B enzimlerini protein düzeyinde etkilediği gösterilen sonuçlar ile bildirilmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda ilk defa detaylı olarak bu proteinlerin hücre içi yerleşimleri gösterilmiştir. İleride yapılacak olan çalışmalar, sinyal yolları gibi bu genleri aktive yada inaktive eden mekanizmaların bulunması ile özellikle yardımla üreme tekniklerindeki kayıplar, açıklanamayan dişi infertilite, polikistik over sendromu, prematur over yetmezliği gibi birçok hastalığın nedenini ve bununla bağlantılı olarak tedavi süreçlerinde yeni bakış açısı kazanmamıza olanak sağlayacaktır.

SONUÇLAR

Yapılan bu çalışma ile; DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B proteinlerinin ekspresyonları kontrol grubu ile süperovulasyon uygulaması ile elde edilen oosit ve embriyolarda ilk defa karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu oosit ve erken dönem embriyolarda bu proteinlerin yerleşimleri ilk defa detaylı olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonuçları aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

1. DNMT1 protein ekspresyonu, GV oositte normal doz grubunda kontrole göre istatistiksel olarak azalmıştır. Normal doz grubu ile yüksek doz grubu karşılaştırıldığında DNMT1 ekspresyonu yüksek doz grubunda anlamlı olarak artarken; kontrol ile yüksek doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
2. DNMT1 protein ekspresyonu, MII oositte gruplar arasında değişim göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
3. DNMT1 protein ekspresyonu, 1-hücreli embriyoda normal doz ve yüksek doz gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalırken, normal ve yüksek doz grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
4. DNMT1 protein ekspresyonu, 2-hücreli embriyoda normal doz ve yüksek doz gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarken, normal ve yüksek doz grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
5. DNMT1 proteini, kontrol grubundaki GV ve MII oositler ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede zayıf, sitoplazmada ise normal seviyede yerleşim gösterirken, membranda bu proteinin ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV ve MII oosit ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda belirgin fark olmadığı gözlenmiştir.
6. DNMT3A protein ekspresyonu, GV oositte gruplar arasında farklılık gösterse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
7. DNMT3A protein ekspresyonu, MII oositte yüksek doz grubunda kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.

8. DNMT3A protein ekspresyonu, 1-hücreli embriyoda normal ve yüksek doz gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Normal ve yüksek doz grupları arasında karşılaştırıldığında ise, yüksek doz grubunda anlamlı bir azalma bulunmuştur.
9. DNMT3A protein ekspresyonu, 2-hücreli embriyoda normal doz grubunda yüksek doz grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
10. DNMT3A proteini, kontrol grubundaki GV ve MII oositler ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun, sitoplazmada ise normal düzeyde yerleşim göstermektedir. Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV ve MII oosit ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda belirgin fark olmadığı gözlenmiştir.
11. DNMT3B protein ekspresyonu, GV oositte gruplar arasında farklılık gösterse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
12. DNMT3B protein ekspresyonu, MII oositte yüksek doz grubunda kontrole göre anlamlı olarak azalmıştır. Ancak diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
13. DNMT3B protein ekspresyonu, 1-hücreli embriyoda gruplar arasında farklılık gösterse de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.
14. DNMT3B protein ekspresyonu, 2-hücreli embriyoda normal doz ve yüksek doz gruplarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artarken, normal ve yüksek doz grupları arasında anlamlı fark bulunmamıştır.
15. DNMT3B proteini, kontrol grubundaki GV ve MII oositler ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda nükleer bölgede yoğun, sitoplazmada ise normal düzeyde yerleşim göstermektedir. Hücre içi yerleşim düzeyleri karşılaştırıldığında, süperovulasyon uygulaması ile elde edilen GV ve MII oosit ile 1-hücreli ve 2-hücreli embriyolarda belirgin fark olmadığı gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Kierszenbaum, A.L., *Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş*,. 2006: Palme Yayıncılık.
2. Sadler, T.W., *Medikal Embriyoloji*,. 2005: Palme Yayıncılık.
3. Demir, R., *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. 1995: Palme Yayıncılık.
4. Reik, W. and W. Dean, *DNA methylation and mammalian epigenetics*. Electrophoresis, 2001. **22**(14): p. 2838-43.
5. Bestor, T.H., *The DNA methyltransferases of mammals*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(16): p. 2395-402.
6. Kishikawa, S., et al., *Control elements of Dnmt1 gene are regulated in cell-cycle dependent manner*. Nucleic Acids Res Suppl, 2003(3): p. 307-8.
7. Uysal, F., G. Akkoyunlu, and S. Ozturk, *Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos*. Biochimie, 2015. **116**: p. 103-13.
8. Goll, M.G., et al., *Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2*. Science, 2006. **311**(5759): p. 395-8.
9. Arand, J., et al., *In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases*. PLoS Genet, 2012. **8**(6): p. e1002750.
10. Ramsahoye, B.H., et al., *Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5237-42.
11. Shirane, K., et al., *Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases*. PLoS Genet, 2013. **9**(4): p. e1003439.
12. Suetake, I., et al., *DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27816-23.
13. Fortier, A.L., et al., *Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(11): p. 1653-65.
14. Hansen, M., et al., *The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization*. N Engl J Med, 2002. **346**(10): p. 725-30.
15. Schieve, L.A., et al., *Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology*. N Engl J Med, 2002. **346**(10): p. 731-7.
16. Baart, E.B., et al., *Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial*. Hum Reprod, 2007. **22**(4): p. 980-8.
17. Yu, C., et al., *Ovarian stimulation reduces IL-6 release from mouse and human pre-implantation embryos*. Am J Reprod Immunol, 2012. **68**(3): p. 199-204.
18. Ertzeid, G. and R. Storeng, *Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice*. J Reprod Fertil, 1992. **96**(2): p. 649-55.
19. El Hajj, N. and T. Haaf, *Epigenetic disturbances in in vitro cultured gametes and embryos: implications for human assisted reproduction*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 632-41.
20. Nelissen, E.C., et al., *Placentas from pregnancies conceived by IVF/ICSI have a reduced DNA methylation level at the H19 and MEST differentially methylated regions*. Hum Reprod, 2013. **28**(4): p. 1117-26.

21. Li, L., et al., *Evaluation of DNA methylation status at differentially methylated regions in IVF-conceived newborn twins*. Fertil Steril, 2011. **95**(6): p. 1975-9.
22. Rancourt, R.C., H.R. Harris, and K.B. Michels, *Methylation levels at imprinting control regions are not altered with ovulation induction or in vitro fertilization in a birth cohort*. Hum Reprod, 2012. **27**(7): p. 2208-16.
23. T.V.N, M.K.L.a.P., *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. 2009.
24. Pepling, M.E. and A.C. Spradling, *Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles*. Dev Biol, 2001. **234**(2): p. 339-51.
25. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
26. Durlinger, A.L., et al., *Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(12): p. 5789-96.
27. <http://www.alasayvan.com/her-telden-egitim-konulari/454017-oogenez-kisaca.html>.
28. Sanchez, F. and J. Smits, *Molecular control of oogenesis*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(12): p. 1896-912.
29. McGinnis, L.K., S.D. Limback, and D.F. Albertini, *Signaling modalities during oogenesis in mammals*. Curr Top Dev Biol, 2013. **102**: p. 227-42.
30. <https://humanphysiology2011.wikispaces.com/15.+Reproductive+Physiology>.
31. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>.
32. Piotrowska, K. and M. Zernicka-Goetz, *Role for sperm in spatial patterning of the early mouse embryo*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 517-21.
33. Davies, T.J. and R.L. Gardner, *The plane of first cleavage is not related to the distribution of sperm components in the mouse*. Hum Reprod, 2002. **17**(9): p. 2368-79.
34. Plusa, B., K. Piotrowska, and M. Zernicka-Goetz, *Sperm entry position provides a surface marker for the first cleavage plane of the mouse zygote*. Genesis, 2002. **32**(3): p. 193-8.
35. Bolton, V.N., P.J. Oades, and M.H. Johnson, *The relationship between cleavage, DNA replication, and gene expression in the mouse 2-cell embryo*. J Embryol Exp Morphol, 1984. **79**: p. 139-63.
36. Braude, P., V. Bolton, and S. Moore, *Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development*. Nature, 1988. **332**(6163): p. 459-61.
37. Vassena, R., et al., *Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development*. Development, 2011. **138**(17): p. 3699-709.
38. Morgan, H.D., et al., *Epigenetic reprogramming in mammals*. Hum Mol Genet, 2005. **14 Spec No 1**: p. R47-58.
39. Pradhan, S., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
40. Ehrlich, M., *Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development*. J Cell Biochem, 2003. **88**(5): p. 899-910.
41. Feinberg, A.P., *DNA methylation, genomic imprinting and cancer*. Curr Top Microbiol Immunol, 2000. **249**: p. 87-99.
42. Feinberg, A.P., H. Cui, and R. Ohlsson, *DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(5): p. 389-98.

43. Kumar, S., et al., *The DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(1): p. 1-10.
44. Araujo, F.D., et al., *The DNMT1 target recognition domain resides in the N terminus*. J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6930-6.
45. Posfai, J., et al., *Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases*. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(7): p. 2421-35.
46. Chuang, L.S., et al., *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. Science, 1997. **277**(5334): p. 1996-2000.
47. Easwaran, H.P., et al., *Replication-independent chromatin loading of Dnmt1 during G2 and M phases*. EMBO Rep, 2004. **5**(12): p. 1181-6.
48. Robertson, A.K., et al., *Effects of chromatin structure on the enzymatic and DNA binding functions of DNA methyltransferases DNMT1 and Dnmt3a in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **322**(1): p. 110-8.
49. Robertson, K.D., et al., *DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 338-42.
50. Fuks, F., et al., *DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity*. Nat Genet, 2000. **24**(1): p. 88-91.
51. Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin, *DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 269-77.
52. Grayson, D.R. and A. Guidotti, *The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders*. Neuropsychopharmacology, 2013. **38**(1): p. 138-66.
53. Turek-Plewa, J. and P.P. Jagodzinski, *The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression*. Cell Mol Biol Lett, 2005. **10**(4): p. 631-47.
54. Ko, Y.G., et al., *Stage-by-stage change in DNA methylation status of Dnmt1 locus during mouse early development*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9627-34.
55. Trasler, J.M., et al., *DNA methyltransferase is developmentally expressed in replicating and non-replicating male germ cells*. Nucleic Acids Res, 1992. **20**(10): p. 2541-5.
56. Mertineit, C., et al., *Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells*. Development, 1998. **125**(5): p. 889-97.
57. Margot, J.B., et al., *Structure and function of the mouse DNA methyltransferase gene: Dnmt1 shows a tripartite structure*. J Mol Biol, 2000. **297**(2): p. 293-300.
58. Hermann, A., R. Goyal, and A. Jeltsch, *The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48350-9.
59. Fatemi, M., et al., *Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA*. Eur J Biochem, 2002. **269**(20): p. 4981-4.
60. Yoder, J.A., et al., *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe*. J Mol Biol, 1997. **270**(3): p. 385-95.
61. Kurihara, Y., et al., *Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1*. Dev Biol, 2008. **313**(1): p. 335-46.
62. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 219-20.

63. Ostler, K.R., et al., *Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins*. *Oncogene*, 2007. **26**(38): p. 5553-63.
64. Watanabe, D., et al., *Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis*. *Mech Dev*, 2002. **118**(1-2): p. 187-90.
65. Okano, M., et al., *DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development*. *Cell*, 1999. **99**(3): p. 247-57.
66. Kato, Y., et al., *Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse*. *Hum Mol Genet*, 2007. **16**(19): p. 2272-80.
67. Gowher, H., et al., *Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(14): p. 13341-8.
68. Miniou, P., et al., *alpha-satellite DNA methylation in normal individuals and in ICF patients: heterogeneous methylation of constitutive heterochromatin in adult and fetal tissues*. *Hum Genet*, 1997. **99**(6): p. 738-45.
69. Geiman, T.M., et al., *Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(9): p. 2716-29.
70. Bourc'his, D., et al., *Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints*. *Science*, 2001. **294**(5551): p. 2536-9.
71. Bourc'his, D. and T.H. Bestor, *Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L*. *Nature*, 2004. **431**(7004): p. 96-9.
72. Okano, M., S. Xie, and E. Li, *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. *Nucleic Acids Res*, 1998. **26**(11): p. 2536-40.
73. Ratnam, S., et al., *Dynamics of Dnmt1 methyltransferase expression and intracellular localization during oogenesis and preimplantation development*. *Dev Biol*, 2002. **245**(2): p. 304-14.
74. Hirasawa, R., et al., *Maternal and zygotic Dnmt1 are necessary and sufficient for the maintenance of DNA methylation imprints during preimplantation development*. *Genes Dev*, 2008. **22**(12): p. 1607-16.
75. Lodde, V., et al., *Localization of DNA methyltransferase-1 during oocyte differentiation, in vitro maturation and early embryonic development in cow*. *Eur J Histochem*, 2009. **53**(4): p. e24.
76. Huntriss, J., et al., *Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells*. *Mol Reprod Dev*, 2004. **67**(3): p. 323-36.
77. Petrusa, L., H. Van de Velde, and M. De Rycke, *Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies*. *Mol Hum Reprod*, 2014. **20**(9): p. 861-74.
78. O'Doherty, A.M., L.C. O'Shea, and T. Fair, *Bovine DNA methylation imprints are established in an oocyte size-specific manner, which are coordinated with the expression of the DNMT3 family proteins*. *Biol Reprod*, 2012. **86**(3): p. 67.
79. Kaneda, M., et al., *Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting*. *Nature*, 2004. **429**(6994): p. 900-3.
80. Hara, S., et al., *Forced expression of DNA methyltransferases during oocyte growth accelerates the establishment of methylation imprints but not functional genomic imprinting*. *Hum Mol Genet*, 2014. **23**(14): p. 3853-64.

81. Vassena, R., R. Dee Schramm, and K.E. Latham, *Species-dependent expression patterns of DNA methyltransferase genes in mammalian oocytes and preimplantation embryos*. Mol Reprod Dev, 2005. **72**(4): p. 430-6.
82. Guenatri, M., et al., *Plasticity in Dnmt3L-dependent and -independent modes of de novo methylation in the developing mouse embryo*. Development, 2013. **140**(3): p. 562-72.
83. Lees-Murdock, D.J., et al., *DNA methyltransferase expression in the mouse germ line during periods of de novo methylation*. Dev Dyn, 2005. **232**(4): p. 992-1002.
84. Golding, M.C. and M.E. Westhusin, *Analysis of DNA (cytosine 5) methyltransferase mRNA sequence and expression in bovine preimplantation embryos, fetal and adult tissues*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(5): p. 551-8.
85. Cardoso, M.C. and H. Leonhardt, *DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development*. J Cell Biol, 1999. **147**(1): p. 25-32.
86. Carlson, L.L., A.W. Page, and T.H. Bestor, *Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting*. Genes Dev, 1992. **6**(12B): p. 2536-41.
87. Howell, C.Y., et al., *Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene*. Cell, 2001. **104**(6): p. 829-38.
88. Doherty, A.S., M.S. Bartolomei, and R.M. Schultz, *Regulation of stage-specific nuclear translocation of Dnmt1o during preimplantation mouse development*. Dev Biol, 2002. **242**(2): p. 255-66.
89. Cirio, M.C., et al., *DNA methyltransferase 1o functions during preimplantation development to preclude a profound level of epigenetic variation*. Dev Biol, 2008. **324**(1): p. 139-50.
90. Cirio, M.C., et al., *Preimplantation expression of the somatic form of Dnmt1 suggests a role in the inheritance of genomic imprints*. BMC Dev Biol, 2008. **8**: p. 9.
91. Hirasawa, R. and H. Sasaki, *Dynamic transition of Dnmt3b expression in mouse pre- and early post-implantation embryos*. Gene Expr Patterns, 2009. **9**(1): p. 27-30.
92. Pesce, M., M.K. Gross, and H.R. Scholer, *In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ*. Bioessays, 1998. **20**(9): p. 722-32.
93. Lucifero, D., et al., *Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 36.
94. Geuns, E., et al., *Methylation imprints of the imprint control region of the SNRPN-gene in human gametes and preimplantation embryos*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(22): p. 2873-9.
95. Dean, W., F. Santos, and W. Reik, *Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer*. Semin Cell Dev Biol, 2003. **14**(1): p. 93-100.
96. Pfeifer, S. and M. Practice Committee of the American Society for Reproductive, *Reply of the authors*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. e10.
97. Pavone, M.E. and S.E. Bulun, *Clinical review: The use of aromatase inhibitors for ovulation induction and superovulation*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(5): p. 1838-44.
98. London, S.N., et al., *Clomiphene citrate-induced perturbations during meiotic maturation and cytogenetic abnormalities in mouse oocytes in vivo and in vitro*. Fertil Steril, 2000. **73**(3): p. 620-6.
99. Khoueiry, R., et al., *Dynamic CpG methylation of the KCNQ1OT1 gene during maturation of human oocytes*. J Med Genet, 2008. **45**(9): p. 583-8.

100. Market-Velker, B.A., et al., *Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(1): p. 36-51.
101. de Waal, E., et al., *Gonadotropin stimulation contributes to an increased incidence of epimutations in ICSI-derived mice*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(20): p. 4460-72.
102. Denomme, M.M., L. Zhang, and M.R. Mann, *Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition*. Fertil Steril, 2011. **96**(3): p. 734-738 e2.
103. Fortier, A.L., et al., *Modulation of imprinted gene expression following superovulation*. Mol Cell Endocrinol, 2014. **388**(1-2): p. 51-7.
104. Bakhtari, A., et al., *The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst*. Cryobiology, 2014. **69**(3): p. 419-27.
105. Huffman, S.R., Y. Pak, and R.M. Rivera, *Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice*. Mol Reprod Dev, 2015. **82**(3): p. 207-17.
106. Melamed, N., et al., *Comparison of genome-wide and gene-specific DNA methylation between ART and naturally conceived pregnancies*. Epigenetics, 2015. **10**(6): p. 474-83.
107. Halliday, J., et al., *Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study*. Am J Hum Genet, 2004. **75**(3): p. 526-8.
108. Wong, E.C., et al., *DNA methylation at H19/IGF2 ICR1 in the placenta of pregnancies conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. Fertil Steril, 2011. **95**(8): p. 2524-6 e1-3.
109. Van der Auwera, I. and T. D'Hooghe, *Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development*. Hum Reprod, 2001. **16**(6): p. 1237-43.
110. Krisher, R.L., *The effect of oocyte quality on development*. J Anim Sci, 2004. **82 E-Suppl**: p. E14-23.
111. Ertzeid, G. and R. Storeng, *The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice*. Hum Reprod, 2001. **16**(2): p. 221-5.
112. Shi, W. and T. Haaf, *Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure*. Mol Reprod Dev, 2002. **63**(3): p. 329-34.
113. Chang, A.S., et al., *Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients*. Fertil Steril, 2005. **83**(2): p. 349-54.
114. Young, E., et al., *Triplet pregnancy after intracytoplasmic sperm injection of cryopreserved oocytes: case report*. Fertil Steril, 1998. **70**(2): p. 360-1.
115. Pan, Z., et al., *Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis*. J Genet Genomics, 2012. **39**(3): p. 111-23.
116. Kerjean, A., et al., *In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice*. Eur J Hum Genet, 2003. **11**(7): p. 493-6.
117. Ciccone, D.N., et al., *KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints*. Nature, 2009. **461**(7262): p. 415-8.
118. Urrego, R., N. Rodriguez-Osorio, and H. Niemann, *Epigenetic disorders and altered gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle*. Epigenetics, 2014. **9**(6): p. 803-15.
119. El-Maarri, O., et al., *Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 341-4.

120. Fauque, P., et al., *Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 116.
121. Mundim, T.C., et al., *Changes in gene expression profiles of bovine embryos produced in vitro, by natural ovulation, or hormonal superstimulation*. Genet Mol Res, 2009. **8**(4): p. 1398-407.
122. Sutcliffe, A.G., et al., *Assisted reproductive therapies and imprinting disorders--a preliminary British survey*. Hum Reprod, 2006. **21**(4): p. 1009-11.
123. Liang, X.W., et al., *Superovulation induces defective methylation in line-1 retrotransposon elements in blastocyst*. Reprod Biol Endocrinol, 2013. **11**: p. 69.
124. Linke, M., et al., *The impact of ovarian stimulation on the expression of candidate reprogramming genes in mouse preimplantation embryos*. Cytogenet Genome Res, 2013. **139**(2): p. 71-9.
125. Fauque, P., *Ovulation induction and epigenetic anomalies*. Fertil Steril, 2013. **99**(3): p. 616-23.
126. Lee, K.F., et al., *Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system*. Cell, 1992. **69**(5): p. 737-49.
127. Sato, A., et al., *Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes*. Hum Reprod, 2007. **22**(1): p. 26-35.
128. Anckaert, E., et al., *Unaltered imprinting establishment of key imprinted genes in mouse oocytes after in vitro follicle culture under variable follicle-stimulating hormone exposure*. Int J Dev Biol, 2009. **53**(4): p. 541-8.
129. Akkoyunlu, G., I. Ustunel, and R. Demir, *The distribution of transglutaminase in the rat oocytes and embryos*. Theriogenology, 2007. **68**(6): p. 834-41.
130. Lawrence, L.T. and K.H. Moley, *Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes*. Semin Reprod Med, 2008. **26**(2): p. 143-52.
131. Wada, M., et al., *Maintenance of normal imprinting of H19 and IGF2 genes in neuroblastoma*. Cancer Res, 1995. **55**(15): p. 3386-8.
132. Allen, W.R. and R.M. Moor, *The origin of the equine endometrial cups. I. Production of PMSG by fetal trophoblast cells*. J Reprod Fertil, 1972. **29**(2): p. 313-6.
133. Kumar, T.R., et al., *Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility*. Nat Genet, 1997. **15**(2): p. 201-4.
134. Tisdall, D.J., et al., *FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep*. J Mol Endocrinol, 1995. **15**(3): p. 273-81.
135. Meduri, G., et al., *Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes?* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(5): p. 2266-76.
136. Ozturk, S., et al., *Superovulation alters embryonic poly(A)-binding protein (Epab) and poly(A)-binding protein, cytoplasmic 1 (Pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos*. Reprod Fertil Dev, 2014.

ÖZGEÇMİŞ

Fatma UYSAL 1990 yılında Antalya’da doğdu. İlk ve ortaöğretimini 2004 yılında Alaaddin Keykubat İlköğretim Okulu’nda, lise öğretimini 2008 yılında Gazi Lisesi’nde tamamladı. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2012 yılında mezun oldu. Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Üreme Biyolojisi’ programında yüksek lisansa başladı. Aynı zamanda Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği programından 2013 yılında mezun oldu. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir. İngilizce bilmektedir.