

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

**FARE OVARYUMUNDA PROTEİN KİNAZ C İZOTİPLERİNİN
DAĞILIMI VE FOLİKÜLOGENEZLE İLİŞKİSİ**

Filiz TEPEKÖY

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2011

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

**FARE OVARYUMUNDA PROTEİN KİNAZ C İZOTİPLERİNİN
DAĞILIMI VE FOLİKÜLOGENEZLE İLİŞKİSİ**

Filiz TEPEKÖY

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2009.02.0122.010)

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”
Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. / / 2011

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

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

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

Üye : Prof. Dr. İnanç MENDİLCİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

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

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 2011 tarih ve / sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Protein Kinaz C (PKC) 12 farklı üyeden oluşan cAMP bağımsız bir protein kinaz ailesidir. Bu aile, üç farklı alt aileye bölünebilir. Klasik PKC'lerin tümü (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ) fosfolipidler, diaçilgliserol (DAG) ve Ca^{2+} tarafından aktive edilirken; novel PKC'ler (δ , ϵ , η , θ , μ) aktivasyon için Ca^{2+} 'a gerek duymazlar. Atipik PKC'ler (λ , ι , ξ) DAG ve Ca^{2+} 'a yanıt vermezler, ancak aktivasyon için fosfolipidlere ihtiyaç duyarlar. PKC'lerin memeli ovaryumlarında granuloza hücre proliferasyonu, ovosit maturasyonu, ovulasyon ve luteinizasyon ile ilgili kritik rolleri olduğu düşünülmektedir. PKC'lerin farklı hücresel olayları kontrol ettiği bilinse de farklı PKC izotiplerinin memeli ovaryumunda gösterdiği dağılım bugüne kadar açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmanın amacı prepubertal, pubertal ve erişkin döneme ait fare ovaryumlarında farklı PKC izotiplerinin özgün dağılımlarını göstermektir.

Çalışmamızda gonadotropin reseptörlerinin transkriptlerinin tam olarak oluşmadığı prepubertal evredeki 1 günlük, gonadotropin reseptörlerinin oluşmasından sonraki evrede bulunan 7 günlük, foliküllerin gonadotropinlerden bağımsız olarak sekonder aşamaya kadar gelişebildiği pubertal evredeki 21 günlük ve erişkin evredeki 60 günlük BalbC türü farelerden alınan ovaryum dokularına rutin parafin kesit teknikleri uygulanarak üç farklı PKC izotipinin (PKC α , PKC δ , PKC ϵ) ve bunların fosforile formlarının (pPKC α , pPKC ϵ) ovaryum kesitlerindeki lokalizasyonu immunohistokimyasal teknikler kullanılarak belirlenmiştir.

PKC α 'nın gelişen ovaryum foliküllerindeki ovosit ve granuloza hücrelerinde ve korpus luteumun luteal hücrelerinde yerleşim gösterdiği, immünoreaktivitesinin farklı gelişim aşamasındaki foliküllerde ve prepubertal evrede farklılık gösterdiği görülmüştür. PKC δ 'nın ovaryum foliküllerinin granuloza hücrelerinde ovositlere göre daha yoğun immünoreaktivite gösterdiği, korpus luteumun luteal hücrelerindeki immünoreaktivitesinin PKC α kadar yoğun olmadığı ve prepubertal evrede immünoreaktivitesinin değiştiği belirlenmiştir. PKC ϵ 'un ise tüm gruplara ait ovaryumlarda farklı gelişim aşamalarındaki tüm foliküllerde spesifik olarak ovositlerde lokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir. Luteal hücrelerde immünopozitif reaksiyon görülmemiştir.

Sonuç olarak PKC α , PKC δ ve PKC ϵ farklı gelişim dönemlerindeki ovaryumlarda farklı hücrelerde özgün yerleşim göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları PKC izotiplerinin ovaryumdaki özgün rollerinin araştırılmasına ve diğer sinyal yolları ile ilişkilerinin belirlenmesine ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: PKC, ovaryum, ovosit, granuloza, immunohistokimya

ABSTRACT

Protein kinase C (PKC) is a cAMP independent protein kinase family consisting of twelve distinct members. They can be subdivided into three subfamilies. The conventional PKCs (α , β 1, β 2, γ) are all activated by phospholipids, in particular phosphatidyl serine, diacylglycerol (DAG) and Ca^{2+} where the novel PKCs (δ , ϵ , η , θ , μ) do not require Ca^{2+} for its action. The atypical PKCs (λ , ι , ξ) respond neither to DAG nor to Ca^{2+} but they still require phospholipids. The PKCs are suggested being critical in the regulation of follicular development, ovulation and luteinization. Although it is hypothesized to control different cellular processes, the specific localization of these PKCs has not been enlightened in ovary up today. The aim of this study is to determine the specific localization of PKC isotypes in prepubertal, pubertal and adult mouse ovary.

In our study, ovaries were obtained from 1 day old prepubertal BalbC mice in which full length transcripts of gonadotropin receptors can not be seen, 7 days old prepubertal BalbC mice in which full length transcripts of gonadotropin receptors can be seen, 21 day old pubertal BalbC mice in which follicles can be developed until gonadotropin independent secondary stage and day 60 adult BalbC mice and localization of three different PKC isotypes (PKC α , PKC δ , PKC ϵ) and their phosphorylated forms (pPKC α , pPKC ϵ) in the ovary sections were determined using immunohistochemical techniques.

PKC α was localized in the oocytes and granulosa cells of ovarian follicles and luteal cells of corpora lutea and its immunoreactivity showed variations in different follicular stages and was different in prepubertal stage. PKC δ showed a higher immunoreactivity in the granulosa cells of ovarian follicles than the oocytes and its immunoreactivity in the luteal cells of corpora lutea was not as higher as PKC α and was changed in the prepubertal stage. PKC ϵ was localized specifically in the oocytes of all different maturation stages of follicles in all groups. It was not immunopositive in luteal cells.

In conclusion, PKC α , PKC δ and PKC ϵ were specifically localized in different cells of the ovaries from different developmental stages. Our study will provide an insight for the studies on specific roles of PKC isotypes and determination of their relationship with other signal transduction pathways.

Keywords: PKC, ovary, oocyte, granulosa, immunohistochemistry

TEŞEKKÜR

Tez projemin gerçekleŐtirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam sayın Doç. Dr. Gökhan Akkoyunlu'ya,

Tezimin projelendirilmesi sırasında görüş ve önerileri ile destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. İsmail Üstünel'e,

Tez projemi gerçekleŐtirirken 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 değerli çalışanlarına,

Sahip olduğum ve sonradan kazanılamayacağına, ancak geliştirilebileceğine inandığım bilimsel ve akademik duruşun temellerini atan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dişi Üreme Sistemi	4
2.2. Ovaryumlar	4
2.3. Ovaryum Gelişimi	6
2.4. Primordiyal Folikül Oluşumu	7
2.5. Dinlenen Folikülleri Aktive Eden Faktörler	8
2.6. Folikül gelişimi	9
2.6.1. Erken Folikül Gelişimi	9
2.6.2. Ovosit Gelişimi	10
2.6.3. Preovulatuvar Folikül Gelişimi	12
2.6.4. Antral Folikül Gelişimi	13
2.6.4.1 Hipotalamus ve hipofizin kilit rolleri	13
2.6.4.2. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH)	13
2.6.4.3. Folikül Stimulan Hormon (FSH)	13
2.6.4.4. FSH reseptörü (FSHR)	14
2.6.4.5. LH reseptörü (Lhcgr)	14
2.7. Ovosit Maturasyonu	15
2.7.1. Nuklear Maturasyon	15
2.7.1.1. Nuklear Maturasyonu Yürüten Kilit Hücre Siklusu Molekülleri	16
2.7.1.2. Mayotik Kompetens	17
2.7.1.3. Antral Foliküllerdeki Ovositlerde Profaz Duraklamasının Korunması	18
2.7.1.4. Nuklear Maturasyon İndüksiyonu	20
2.7.2. Sitoplazmik Maturasyon	21
2.8. Ovulasyon	22

2.9.	Luteinizasyon	23
2.10.	Luteoliz	24
2.11.	Ovosit- Granuloza Hücre Etkileşimleri	24
2.12.	Protein Fosforilasyon Reaksiyonu	25
2.13.	Protein Kinazlar	26
2.13.1.	Protein Kinaz C (PKC)	26
2.13.1.1.	PKC İzotipleri ve Alt Ünite Yapıları	27
2.13.1.2.	PKC Aktivasyonu	28
2.13.1.3.	Hipotalamus-Hipofiz-Ovaryum Etkileşiminde PKC'nin Rolü	30
GEREÇ VE YÖNTEM		31
3.1.	Dokuların Elde Edilmesi	31
3.2.	İmmünohistokimya Tekniği için Doku Hazırlanması	31
3.3.	İmmünohistokimya Yöntemi	32
BULGULAR		33
4.1.	PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	33
4.1.1.	60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	33
4.1.2.	21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	35
4.1.3.	7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	36
4.1.4.	1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	37
4.2.	pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	37
4.2.1.	60 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	37
4.2.2.	21 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	39
4.2.3.	7 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	40
4.2.4.	1 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları	40
4.3.	PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	41
4.3.1.	60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	41
4.3.2.	21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	43
4.3.3.	7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	44

4.3.4.	1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	45
4.4.	PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	45
4.4.1.	60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	45
4.4.2.	21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	47
4.4.3.	7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC ϵ Boyanmalarının Sonuçları	48
4.4.4.	1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	49
4.5.	pPKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	49
4.5.1.	60 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC ϵ İmmün Boyanmaların Sonuçları	49
4.5.2.	21 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC ϵ İmmün Boyanmaların Sonuçları	51
4.5.3.	7 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	52
4.5.4.	1 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları	53
TARTIŞMA VE SONUÇLAR		54
KAYNAKLAR		62
ÖZGEÇMİŞ		73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	: anti Müller Hormonu
bFGF	: Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
Ca²⁺	: Kalsiyum iyonu
cAMP	: siklik Adenozin Monofosfat
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CSF	: Sitotoksik Faktör
DAG	: Diaçilgliserol
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FSH	: Folikül Stimule Edici Hormon
GDF	: Büyüme ve Farklılaşma Faktörü
GMP	: Guanozin Monofosfat
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GR	: Granuloza Hücresi
GVB	: Germinal Vezikül Yıkımı
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
IGF	: İnsülin Büyüme Faktörü
KL	: Kit Ligand
L	: Luteal Hücreler
LH	: Luteinleştirici Hormon
MAPK	: Mitojenle Aktive Olan Protein Kinazlar
MPF	: Maturasyon İlerletici Faktör
O	: Ovosit
PDE	: Fosfodiesteraz
PKC	: Protein kinaz
PKD1	: Fosfolipid Bağımlı Kinaz 1
PGF₂α	: Prostaglandin 2α
PGH	: Primordiyal Germ Hücreleri
PKC	: Protein kinaz

- RNA** : Ribo Nükleik Asit
StAR : Steroidogenik Akut Regülatör Protein
T : Tekal Hücreler
TGF : Transforme Edici Büyüme Faktörü
ZP : Zona Pellusida

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No	
2.1.	İnsanda dişi üreme sistemi organları	4
2.2.	Farede dişi üreme sistemi	5
2.3.	Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartılara göçü	6
2.4.	Primordiyal folikül oluşumu	7
2.5.	Primer folikül gelişimi	8
2.6.	Ovaryumda folikülogenez	10
2.7.	Folikülogenezin hormonal kontrolü	14
2.8.	Ovosit maturasyonunun MAPK sinyal yolağı ile kontrolü	17
2.9.	Granuloza hücreleri ve ovositlerde ovosit maturasyonunu kontrol eden sinyal düzenleyiciler	20
2.10.	Folikülogenez sürecinde ovosit maturasyonu	23
2.11.	Ovosit- granuloza hücre etkileşimleri	25
2.12.	PKC izotipleri ve alt ünit yapıları	28
2.13.	PKC aktivatörleri	28
2.14.	PKC aktivasyon mekanizması	29
4.1.a-h.	60 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları	34
4.2.a-f.	21 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları	35
4.3.a-d.	7 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları	36
4.4.a-b.	1 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları	37
4.5.a-f.	60 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları	38
4.6.a-c.	21 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları	39
4.7.	7 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları	40
4.8.	1 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları	40
4.9.a-g.	60 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları	42
4.10.a-e.	21 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları	43
4.11.a-c.	7 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları	44
4.12.	1 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları	45
4.13.a-g.	60 günlük fare ovaryumunda PKC ϵ immün boyanmaları	46
4.14.a-e.	21 günlük fare ovaryumunda PKC ϵ immün boyanmaları	47
4.15.a-c.	7 günlük fare ovaryumunda PKC ϵ immün boyanmaları	48
4.16.	1 günlük fare ovaryumunda PKC ϵ immün boyanmaları	49
4.17.a-f.	60 günlük fare ovaryumunda pPKC ϵ immün boyanmaları	50
4.18.a-e.	21 günlük fare ovaryumunda pPKC ϵ immün boyanmaları	51
4.19.a-c.	7 günlük fare ovaryumunda pPKC ϵ immün boyanmaları	52
4.20.	1 günlük fare ovaryumunda pPKC ϵ immün boyanmaları	53
5.1.	PKC-MAPK Aktivasyon Döngüsü	59

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
5.1. PKC izotiplerinin aminoasit dizilimleri	54

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Protein kinaz C (PKC), siklik adenozin monofosfat (cAMP) aktivasyonuna gerek duymaksızın membran fosfolipidleri, Ca^{2+} ve diaçilgliserol (DAG) ile aktive olarak (1), farklı proteinlerin fonksiyonunu serin ve treonin aminoasitlerinin hidroksil gruplarının fosforilasyonunu gerçekleştirerek kontrol eden bir enzim grubudur (2). PKC, tümör oluşumu, konak savunması, embriyonik gelişim, acının algılanması ve inflamasyon gibi pek çok fizyolojik süreçte görev aldığı belirlenmiştir (1). Ovaryumda ise PKC'nin granuloza hücre proliferasyonu, ovosit maturasyonu, ovulasyon ve luteinizasyonda görevli olduğu düşünülmektedir.

PKC, 12 farklı üyeden oluşan cAMP bağımsız bir protein kinaz ailesidir. Bu aile, üyelerin dizi benzerlikleri ve aktivasyon şekillerine göre üç farklı alt aileye bölünebilir. Klasik PKC'lerin tümü (α , $\beta 1$, $\beta 2$, γ) fosfolipidler, DAG ve Ca^{2+} tarafından aktive edilirken; novel PKC'ler (δ , ϵ , η , θ , μ) aktivasyon için Ca^{2+} 'a gerek duymazlar. Atipik PKC'ler (λ , ι , ξ) DAG ve Ca^{2+} 'a yanıt vermezler, ancak aktivasyon için fosfolipidlere ihtiyaç duyarlar (3). PKC'lerin memeli ovaryumlarında granuloza hücre proliferasyonu, ovosit maturasyonu, ovulasyon ve luteinizasyon ile ilgili kritik rolleri olduğu düşünülmektedir. PKC'lerin çeşitli sinyal yolları ile ilişkili olarak farklı hücrelerel olayları kontrol ettiği bilirse de farklı PKC izotiplerinin memeli ovaryumunda gösterdiği dağılım bugüne kadar açıklığa kavuşmamıştır. Bu çalışmanın amacı prepubertal, pubertal ve erişkin döneme ait fare ovaryumlarında farklı PKC izotiplerinin özgün yerleşimini göstermektir.

Pekçok farklı PKC izotipinin bulunması ancak her izotip için başlıbaşına substrat özgünlüğünün bulunmaması pek çok PKC'nin gerekli olup olmadığı sorusunu akıllara getirir. Ancak immünohistokimyasal analizler belirli izotiplerin farklı hücrelerde ve farklı hücre içi kompartımanlarda yer aldığını ve kendilerine özgü protein komplekslerine bağlandıklarını ortaya koymuştur (1).

Bugüne kadar PKC ile ilgili farklı memeli türlerinin ovaryumlarında yapılan çalışmalar PKC'nin ovaryumlarda granuloza hücre proliferasyonu, folikül gelişimi ve ovulasyon, ovosit maturasyonu, luteinizasyon ve luteolizde görevli olduğunu göstermiştir. Ancak regülatör bölgeleri ve aktivatörleri açısından farklılıklar gösteren ve dolayısıyla fonksiyonel farklılıklar bulundurabilecek olan farklı PKC izotiplerinin özgün rolleri ovaryan folikülleri oluşturan granuloza hücreleri ve ovositlerde, korpus luteumu oluşturan luteal hücrelerde tam olarak tanımlanamamıştır.

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) uyarımlı hipofiz primer kültüründe, PKC'nin sitosolden plazma membranına translokasyonu bilinmektedir. PKC hipofizdeki

gonadotropik hücrelerde hipotalamustan gelen uyarının etkisiyle plazma membranına aktivite kazanmak üzere göç etmektedir (4).

PKC'nin birçok GnRH aracılı sinyal iletim yolunda fosforilasyon hedefleri vardır. Bu hedeflerden biri gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi pek çok hücre fonksiyonunu etkileyen mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yoludur (5).

Preantral granuloza hücrelerindeki Folikül Stimulan Hormon (FSH) veya Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nin indüklediği DNA sentezi için PKC aracılı MAPK aktivasyon döngüsü gereklidir. Bu aktivasyon döngüsü Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK4)'ü aktive ederek DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlar (6).

PKC sinyal yolu, foliküler gelişim ve ovulasyon genlerinin (*Pgr*, *Prkg2* ve *Cyp11a1*) indüksiyonunda gereklidir. Domuz granuloza primer hücre kültürlerinde *Prkg2* indüksiyonu PKC'nin aktivasyonunu gerektirir (7).

PKC inhibitörleri aracılığıyla, FSH veya EGF ile indüklenen MAPK3/1 fosforilasyonu ve DNA sentezinin bozulması MAPK3/1'in devam eden aktivasyonunun PKC aktivitesine gerek duyduğunu ortaya koyar (7).

PGF_{2α}'nın korpus luteum üzerindeki etkisinin plazma membranında fosfolipaz C'nin uyarılması ile başladığı ve inositol trifosfat ile indüklenen hücre içi Ca²⁺ mobilizasyonu ve PKC'nin DAG ile aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Mevcut veriler PGF_{2α}'nın korpus luteumda Raf/MEK1/p42mapk/p44mapk sinyal basamaklarını aktive ettiğini açıkça göstermektedir. Luteal hücrelerde hem PGF_{2α} hem de PKC aktivatörü olan PMA'nın, Raf-1 fosforilasyonunu artırdığı görülmüştür. Bu veriler PGF_{2α} aracılığıyla aktive olan PKC'nin Raf-1 aktivasyonu sağladığını göstermektedir (8).

Tüm bu çalışmalar PKC'lerin hipotalamus-hipofiz-ovaryum eksenindeki hücre rollerini ortaya koysalar da izotip spesifik lokalizasyonlarını ve farklı hücrelere özgü fonksiyonlarını açığa çıkaramamışlardır.

PKC ile ilgili izotip spesifik çalışmalarda ise farklı gelişim aşamasındaki ovaryan foliküller ve bunları oluşturan granuloza hücreleri ile ovositler ayrı ayrı analiz edilmemiş, belli hücreler üzerinde yoğunlaşmıştır.

PKCε'un, sığır korpus luteumlarındaki steroidogenik hücrelerde farklı miktarlardaki ekspresyonu bu enzimin PGF_{2α} (prostaglandin) ile indüklenen luteal regresyonda rolü olduğunu düşündürebilir (9). Ancak PKCε'un granuloza hücreleri ve ovositlerdeki rolleri henüz araştırılmamıştır.

bFGF (temel Fibroblast Büyüme Faktörü)'nin SIGC (kendiliğinden ölümsüzleşen granuloza hücreleri) üzerindeki antiapoptotik etkisi PKC aktivatörü olarak kullanılan 12-*O*-tetradekanoilforbol-13-asetat (TPA) tarafından taklit edilir ve genel PKC inhibitörleri tarafından azaltılır. Ayrıca, PKC inhibitörleri bFGF'nin normal bazal Ca²⁺ seviyesini koruma yeteneğini ortadan kaldırırlar (10). TPA tarafından aktive edilebilen PKC δ (11,12), SIGC tarafından eksprese edilen tek PKC izotipi olduğundan (10) PKC δ 'nın bFGF aktivitesinin düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir.

PKC δ ovosit maturasyonu boyunca ovosit sitoplazmasında yoğun bir dağılım göstermektedir ve birinci mayoz bölünme sırasında iğ ipliği ile yakın bir konumda bulunmaktadır. Bunun aksine, MII sırasında, PKC δ , tamamının değil ancak bazı olgun ovositlerin kromozomları ile ilişkili olarak ve benekli bir şekilde gözlemlenirken, ovosit aktivasyonu sonrasında proteinin defosforile olduğu ve erken evredeki embriyoların nükleuslarında biriktiği görülmüştür. Bu gözlemler, PKC δ 'nın ovositlerde ve erken evredeki embriyolarda posttranslasyonel olarak modifiye olduğunu ve hücre içinde hücre siklusuna bağlı olarak dağılım gösterdiğini kanıtlar (13). Ancak PKC δ 'nın gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granuloza hücreleri ve korpus luteumdaki dağılımları belirlenmemiştir.

Puberte döneminde ve erişkin dönemde gonadotropinlerin ve gonad hormonlarının etkisiyle foliküler gelişim sırasında çalışan hücresel sistemlerin prepubertal dönemden farklı olması gerektiği düşüncesinden yola çıkarak planladığımız çalışmamızda gonadotropin reseptörlerinin transkriptlerinin tam olarak oluşmadığı prepubertal evredeki 1 günlük, gonadotropin reseptörlerinin transkriptlerinin oluşmasından (14) sonraki evrede bulunan 7 günlük, pubertal evredeki 21 günlük ve erişkin evredeki 60 günlük BalbC türü farelerden alınan ovaryum dokularına rutin parafin kesit teknikleri uygulanarak üç farklı PKC izotipinin (PKC α , PKC δ , PKC ϵ) ve bunların fosforile formlarının (pPKC α , pPKC ϵ) ovaryum kesitlerindeki lokalizasyonunun immunohistokimyasal teknikler kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

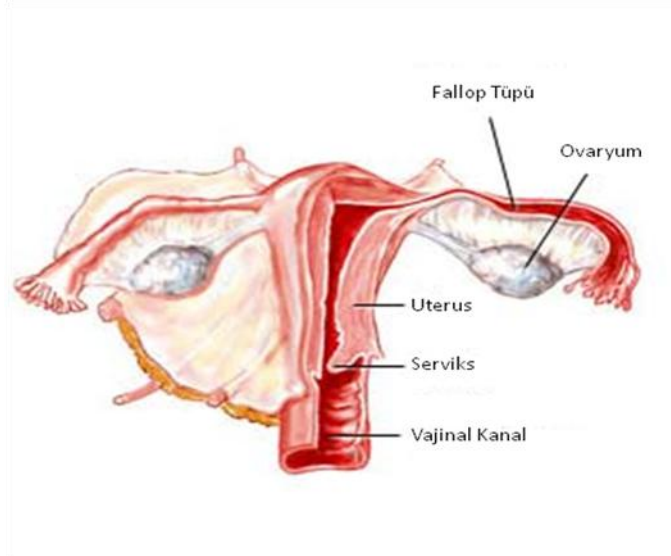
GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi kadında iki ovaryum, iletim kanalı, ovidukt (tuba uterina), uterus, vajina ve dış genital organlardan oluşur (Şekil 2.1). İşlevi dişi eşey hücreleri olan gametlerin (ovositler) üretimi ile embriyo ve fetüs evrelerinden doğuma kadar döllenmiş ovositi taşımaktır. Ayrıca üreme sisteminin organlarını kontrol eden ve vücudun diğer organları üzerinde etkileri olan eşey hormonlarını da üretir. İlk menstrüasyon kanamalarının meydana geldiği menarşta (ilk adet) başlayarak üreme sistemi yapı ve işlevsel etkinlik bakımından döngüsel (siklik) değişiklikler geçirir. Bu değişiklikler hormonlar tarafından kontrol edilir. Menapoz ile döngüsel değişiklikler düzensizleşir ve sonuçta tümüyle ortadan kalkar. Menapoz sonrası dönemde üreme sisteminde yavaş bir gerileme görülür (15).

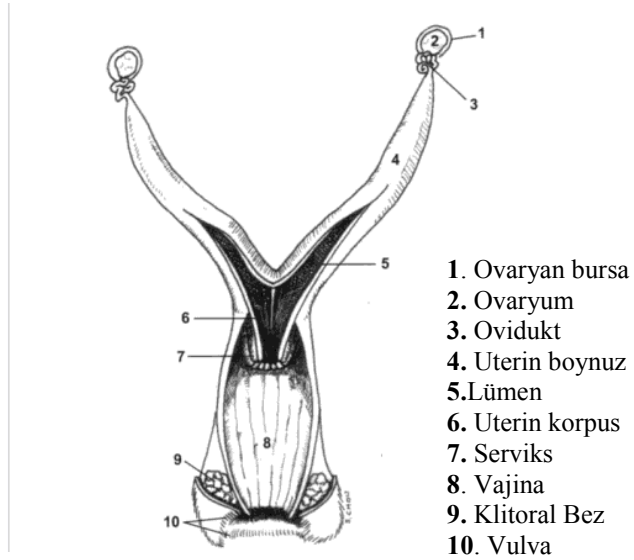
2.2. Ovaryumlar

Ovaryumlar insanda, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1.5 cm ve kalınlığı 1 cm olan badem biçiminde yapılardır. Yüzeyleri tek katlı yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitelyum germinal epitelyum olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albugineanın altında ovositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu kortikal bölge yer alır. Foliküller kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içine gömülüdür. Bu stroma tipik iğ biçiminde fibroblastlar içerir. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medüller bölgedir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (15).



Şekil 2.1. İnsanda dişi üreme sistemi organları (16)

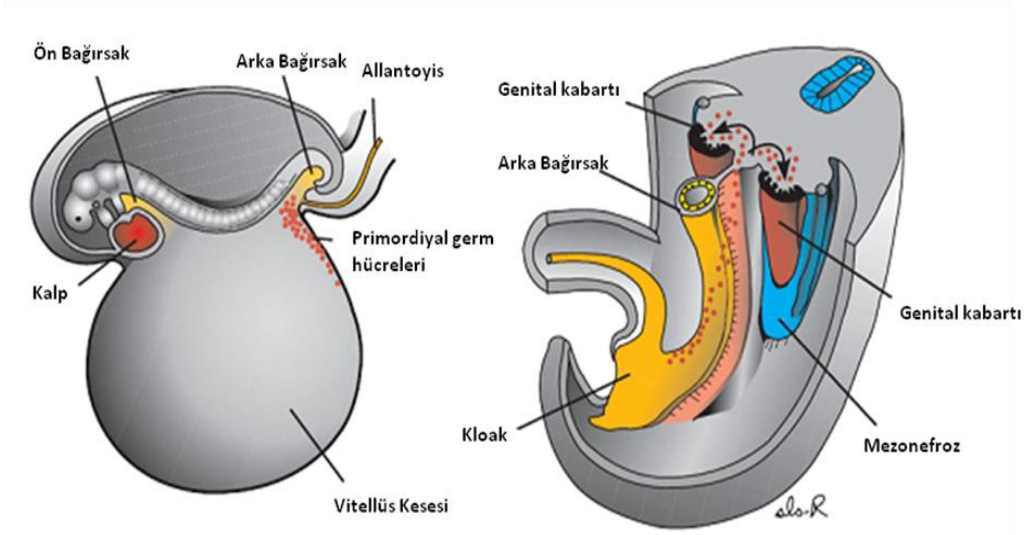
Farelerde ovaryumlar, böbreklerin hemen yanında yer alan, dorsal vücut duvarına mezovaryum ligamentleri ile asılı olan küçük oval organlardır (Şekil 2.2). Her bir ovaryum kendisini abdominal kaviteden ayıran bir kapsül tarafından çevrenmiştir. Ovaryum kesin sınırları olmayan iki tabakadan, medulla ve korteksten oluşmuştur. Kan ve lenf damarları ile sınırlar hilus ile medullaya girer ve daha sonra ovaryumun periferel bölgesindeki kortekse ulaşmak üzere medullanın stromal dokusu boyunca dallanır. Gelişimin tüm aşamalarındaki foliküller ve pek çok östrus siklusu geçirmiş hayvanlarda korpus luteum kalıntıları kortekste yer alır. Ovaryan yüzey epiteli veya germinal epitel olarak bilinen ince bir kuboidal epitel hücre tabakası bazal membran üzerindeki ovaryumun yüzeyini kaplar (17).



Şekil 2.2. Farede dişi üreme sistemi (17)

Doğumda 8000 folikül vardır ancak bunlardan çok azının kaderinde ovulasyon vardır. Bu foliküllerden %77'si yok olur. Foliküler gelişimin ilk aşaması primordiyal evredir. Primordiyal foliküller, yassı pregranuloza hücreleri ile çevrili 15µm'lik bir ovosit içerirler. Primordiyal foliküller neonatal dönemde pre-granuloza hücrelerinin germ hücre kistleri arasına girmesiyle oluşur. Primordiyal foliküllerin aktivasyonu foliküler gelişim sürecini başlatır. Ovosit çevreleyen granuloza hücreleri kuboidal hale geldiğinde folikül primer folikül adını alır. Granuloza hücre tabakaları çoğaldığında ve antral boşluklar oluşmaya başladığında folikül sekonder folikül adını alır. Bu aşamada folikül teka hücre farklılaşması için faktörler salgılamaya başlar. Antrum oluştuğunda, folikül antral folikül olarak adlandırılır. Antral folikülde mitoz hızı oldukça düşmüştür, ancak hücrelerin boyutları büyümeye devam eder. Olgun antral foliküller 600 µm'den büyüktür (17).

2.3 Ovaryum Gelişimi



Şekil 2.3. Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartılara göçü (18)

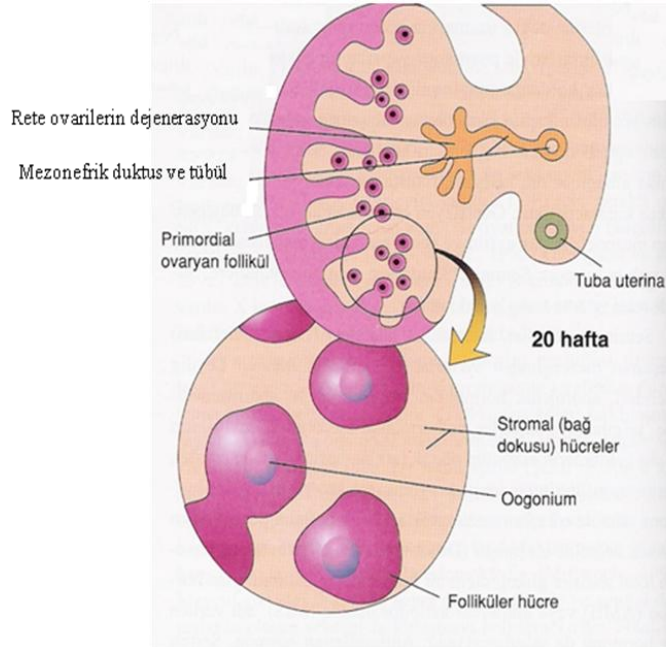
İnsanda, embriyonik gelişimin dördüncü haftasının başında primordiyal germ hücreleri (PGH) gonadal kabartıların sölomik epiteline göç eder (Şekil 2.3). Cinsiyet farklılaşması gerçekleştiğinde PGH embriyonik ovaryum içerisinde prolifer olmaya devam ederek oogonia'ya dönüşür (Şekil 2.4). Gebeliğin 12. haftasında yaklaşık 7 milyon oogonia mevcuttur (19); bundan sonra oogonia, germ hücre üretiminin durduğunu gösteren mayotik profaza girer. Gestasyonun yaklaşık 24. haftasında, artık ovosit olarak adlandırılan bu germ hücrelerinin neredeyse tümü mayoz 1'in ilk dört evresini geçmiş ve diploten evresinde duraklamışlardır. Ovositler, primordiyal folikülleri oluşturmak üzere bir epiteliyal pregranuloza hücre tabakası ile çevrilmişlerdir. Bu foliküllerden bazıları hemen büyümeye başlasa da çoğu dejenere olmak veya büyüme fazına girmek üzere bir bekleme evresinde kalırlar. Doğumdan sonra, bekleme evresindeki folikül havuzu, ovositin yassı granuloza hücreleri (GH) tarafından çevrildiği primordiyal foliküllerden, ovositin yassı ve kübik GH tarafından çevrelendiği geçiş aşamadaki foliküllerden ve ovositin tek tabaka kübik GH tarafından çevrelendiği küçük primer foliküllerden meydana gelen ovaryan rezervi oluşturur (18).

Farede de gonad oluşumundaki kilit katılımcılar PGH ve genital kabartılardır. PGH proksimal epiblasttan doğar ve ilk olarak yaklaşık E7.25.-7.50. günlerde

ekstraembriyonik mezoderimde yüksek seviyedeki alkalın fosfataz aktiviteleri ile belirlenirler (17).

2.4. Primordiyal Folikül Oluşumu

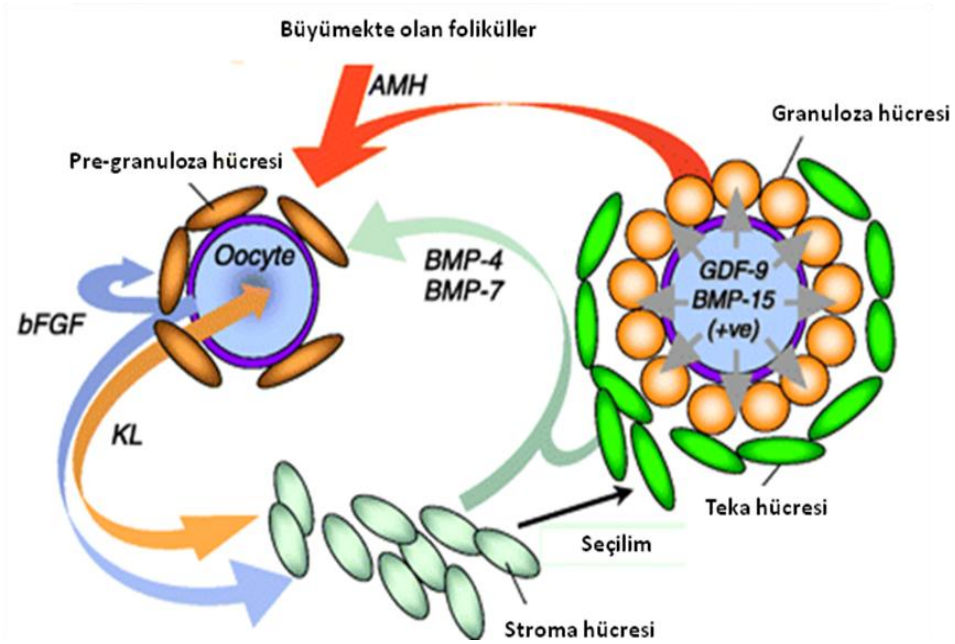
Yenidoğan ovaryumunda germ hücre kistlerinin yıkımı ve buna eşlik eden primordiyal folikül oluşumundan sorumlu olan mekanizmalar henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak, germline alpha'daki faktör (figla), mouse-helix-loop-helix transkripsiyon faktöründeki mutasyon primordiyal folikül oluşumunda aksaklığa ve bunun sonucunda postnatal 2. günde pek çok ovositin kaybına neden olur (20). FIGLA ovosit spesifik bir proteindir ve in vitroda ovosit zona pellusida genlerindeki promoter elemanlara (E box) bağlandığı ve ekspresyonlarını düzenlediği bilinmektedir (21). Zona pellusida proteinleri gelişen ovositi çevreleyen glikoproteinden zengin matriksin temel bileşenleridir ve fertilizasyon için gereklidir. Ayrıca ovosit ve komşu granuloza hücreleri arasında büyüme faktörlerinin geçişi için bir bariyer olarak da görev yapar (22). Ancak ZP1, ZP2 ve ZP3 knockout farelerde primordiyal folikülden antral foliküle dönüşüm gerçekleşebildiğinden, zona pellucida genleri tek başına Figla mutant farelerin fenotipinin nedeni olamaz. Ayrıca, FIGLA'nın, folikül oluşumu ve ovositin hayatta kalması için gerekli diğer genlerin ekspresyonunu da düzenlediği düşünülmektedir. İnsanda FIGLA ekspresyonu en erken gestasyonun 14. haftasında görülür ve gestasyonun ortasında (19. hafta), insanda primordiyal foliküllerin meydana geldiği zamanda etkin bir artış gösterir (23-26).



Şekil 2.4. Primordiyal folikül oluşumu (27)

2.5. Dinlenen Folikülleri Aktive Eden Faktörler

Foliküler gelişimin başlamasında kit sisteminin çok önemli görevleri olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.5), çünkü çok çeşitli mutasyonlar (siklik adenozin monofosfat'a [cAMP] duyarlı (28), kit ligand [KL, SCF olarak da bilinir] kodlayan genlere ait) gösteren farelerde, foliküler gelişimin primer aşamada düşük ya da yüksek seviyede engellendiği görülmüştür. Ratlarda in vitro teknikler uygulanarak temel fibroblast büyüme faktörünün (bFGF) de folikül gelişiminin başlatılmasında önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır (29). Ancak, KL ve c-kit primatlarda gelişmeye başlamamış foliküllerde görülmüş olsalar da (30,31) bFGF insan foliküllerinde preantral evreden önce görülmemiştir. Sinomolgus maymunlarında, transforme edici büyüme faktörü alfa (TGF- α) dinlenme halindeki foliküllerin granuloza hücrelerinde görülmezken, büyümekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinde görülür (31). TGF- α granuloza hücre proliferasyonunu uyardığı için TGF- α 'nın granuloza hücre proliferasyonu aracılığı ile folikül gelişiminin başlatılmasında rolü olabileceği yorumunu yapmak mümkündür. Primatlarda, büyüme halinde olmayan foliküller uzun bir süre (insanda 50 yıla kadar) bekleme evresinde tutulabilirler. Anti Müller hormonunun (AMH) yeni doğan rat ovaryumlarında folikül gelişimini, bir dereceye kadar inhibe ettiği kanıtlanmıştır (32).



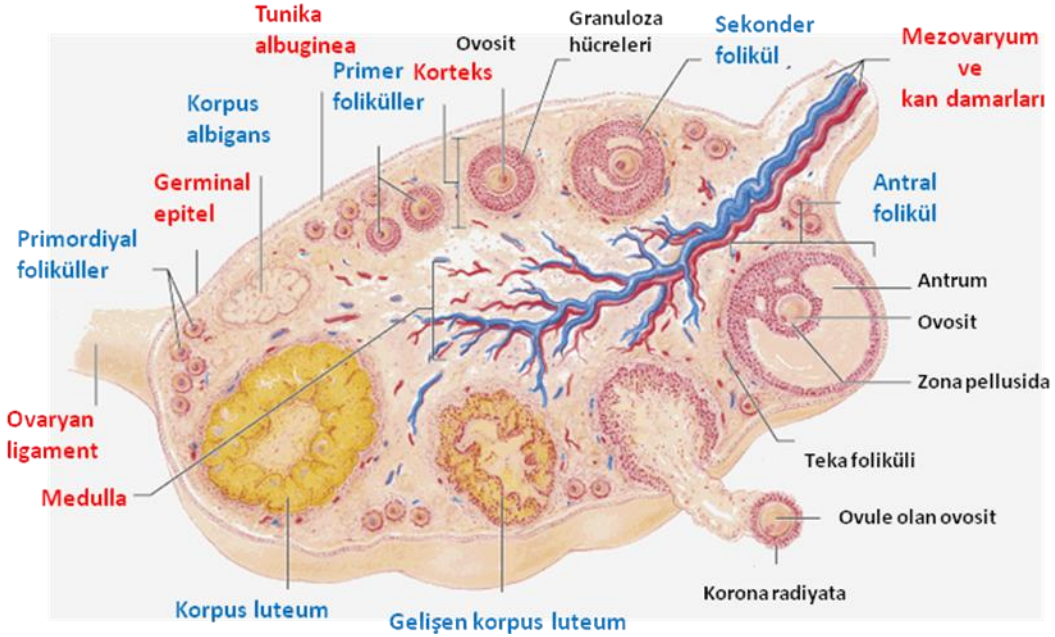
Şekil 2.5. Primer folikül gelişimi (33)

2.6. Folikül gelişimi

2.6.1. Erken Folikül Gelişimi

Foliküller büyüme evresine girdiklerinde, granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve ovosit boyutunun büyümesi ile gelişirler. İnsanda foliküler büyümenin ilk evresi büyük primer foliküldür. Ultrayapısal çalışmalar göstermiştir ki, immatür granuloza hücreleri daha çok, proliferasyon için gerekli olan protein sentezinin yoğunluğunu yansıtır şekilde granüllü endoplazmik retikulum içerir (34). Buna ek olarak bu granuloza hücreleri, plazma membranının hücrelerarası kısımlardaki filamentöz yoğun materyal ile ilişkili olan ara bağlantılar ve merkezi bir oluk oluşturmak üzere düzenlenmiş 6 eş konneksin altbiriminden oluşmuş transmembran kanalların kalıntıları olan oluklu bağlantılar (gap junction) ile metabolik olarak birbirlerine bağlıdır. Oluşan metabolik sinsisyum foliküler gelişim için çok önemlidir, çünkü granuloza hücreleri arasındaki bu bağlantı komplekslerinin protein altbirimi olan konneksin 43'ten yoksun farelerde folikülogenez primer evreye kadar ilerler ancak bundan sonraki gelişim bozulur (35). Üç glikoproteinden (ZP1, ZP2, ZP3) meydana gelen zona pellusida, foliküler büyümenin başlamasının hemen ardından ovositin çevresindeki yerini alır (36). Her bir folikülde, primordiyal evreden itibaren granuloza hücreleri kendilerini çevre stromal/tekal hücrelerden ayıran ve kan damarlarını, kan hücrelerini ve sınırları granuloza hücre tabakasından ayrı tutan bir bazal lamina ile çevrilidir (37). Daha sonra foliküller sekonder foliküller (ovositi çevreleyen iki veya daha fazla granuloza hücre tabakası içeren foliküller) haline gelirler. Büyümenin erken evrelerindeki en küçük foliküller bağımsız bir kan kaynağından yoksun iken 80-100 µm çapındaki sekonder foliküller, bazal laminanın hemen dışındaki anostomatik ağda sonlanan bir veya iki arteriyole sahiptir (38). Bu olayın fizyolojik önemi, folikülün kan dolaşımındaki faktörlere doğrudan maruz kalması şeklinde açıklanır. Gelişimin bu evresinde bazal lamina yakınındaki bazı stromal hücreler birbirlerine paralel olarak hizalanırlar ve teka tabakasını oluştururlar. Folikül büyüdükçe teka, tabakalaşır ve iki kısma farklılaşır. Dış kısımdaki teka eksterna farklılaşmamış teka hücrelerinden herhangi bir açıdan farklılık göstermeyen hücrelerden oluşur. İç kısımdaki teka internada fibroblast benzeri öncül hücreler, tipik steroid salgılayan hücrelerin (epiteloid hücreler) görünümündedirler. Morfolojik çalışmalar göstermiştir ki, tanımlanabilir teka tabakaları ancak foliküller 3-6 granuloza hücre tabakası (insanda folikül çapı= 103-163 µm) içerdiğinde görülebilir. Epiteloid hücrelerin ortaya çıktığı andan itibaren sekonder folikül preantral folikül olarak tanımlanır ve morfoloji ile her bir folikülün içerdiği toplam granuloza hücre sayısına dayanan bir sınıflandırmada büyüyen foliküller içinde 1. sınıfı oluşturur (39). İnsanda preantral foliküllerin sayısı erken luteal evrede en fazladır. Bu durum, endokrin perioovulatuvar (LH uyarımı) veya mikroçevresel değişiklikler (preovulatuvar folikül tarafından üretilen lokal faktörler) ile ilişkilendirilebilirse de aydınlatılmayı beklemektedir. Aynı anda ve bir dalga şeklinde birbirlerine yakın bir hızda büyüyen bir folikül grubunu oluşturan bu foliküller erken luteal fazda gelişmeye başlar ve bu gelişim yaklaşık üç siklus sonra bu foliküllerden birinin ovulasyonu ile sonuçlanır. Sıvı ile dolu küçük oyuklar antrum'u oluşturmak üzere birleştiklerinde folikül erken atral folikül adını alır. Bu evreden sonra, ovositi çevreleyen granuloza hücreleri kumulus ovoforus'u

oluştururlar. Bu granuloza hücreleri ovolemmaya temas etmek üzere, ovosit ile zona pellusida aracılığıyla heterolog oluklu bağlantılar oluştururlar (40). Bu, granuloza hücresi- ovosit ilişkisinin foliküler olgunlaşmanın son evresinde önemli bir rolü olduğu konneksin 37'den yoksun farelerde preovulatuvar foliküllerin yokluğu ile kanıtlanmıştır (41). Birçok memelide olduğu gibi primatlarda, folikülün tek bir antral boşluğa sahip olmasının hemen ardından, bazal membranı sınırlayan granuloza hücreleri kübik şekillerini kaybederler ve silindirik bir görünüm alırlar. İnsanlarda ve maymunlarda foliküller preantral evreden (sınıf 1), folikül çapının 180- 250 µm arasında değiştiği erken antral evreye (sınıf 2) geçerler (39, 42). Antral boşluktaki sıvının birikmesi ve granuloza hücreleri ile teka interna hücrelerinin proliferasyonu ile folikül artan bir hızla, 2 ila 5 mm arası bir boyuta ulaşana ve seçilebilir bir folikül haline gelene kadar gelişimin sonraki evrelerine geçer. Sonuç olarak folikül gelişiminin başlangıcında ovosit büyür, teka interna hücreleri proliferer olur ve farklılaşır, granuloza hücreleri proliferer olur.



Şekil 2.6. Ovaryumda folikülogenez (45)

2.6.2. Ovosit Gelişimi

Belirgin nuklear durgunluklarına rağmen ovositler, bir veya daha fazla nukleolus varlığı, ribonukleik asit (RNA) polimeraz aktivitesi ve sürekli olarak amino asit ve ribonukleosit alımının da gösterdiği gibi transkripsiyon açısından aktiftir ve yüksek sentetik aktivite seviyesi gösterir. Ovositin hacmi arttıkça sitoplazması daha kompleks bir organizasyon kazanır. Örneğin, mitokondriler daha vakuollü hale gelir ve Golgi

aygıtı genişler ve perifere göç eder (43). Ovosit erken foliküler büyüme döneminde en hızlı şekilde büyür; insanda primer folikülde 30 µm olan ovosit çapı erken antral folikülerde yaklaşık 100 µm'ye çıkar. Gelişimin bu aşamasından sonra ovositin boyutundaki artış daha yavaş bir hızla olur, çünkü çapı preovulatuvar bir folikülde yaklaşık 140 µm'ye kadar ulaşacaktır.

KL, folikül büyümesinin başlangıcında ortaya çıkarak tek başına ovosit büyümesine katkıda bulunsa da, sadece granuloza hücreleri ile iletişim varlığında, preantral evreye kadar olan büyümenin erken evresindeki ovosit büyümesini sürdürmede etkindir (44). KL aracılı ovosit büyümesi Büyüme ve Farklılaşma Faktörü 9 (GDF-9) tarafından kontrol ediliyor olabilir, çünkü GDF-9'dan yoksun farelerde primer evreden sonraki foliküllerin granuloza hücreleri ve ovositleri morfolojik olarak anormaldir (46). Bu anormal ovosit büyümesi GDF-9 yokluğunda KL'nin aşırı ekspresyonundan kaynaklanıyor olabilir (47).

2- 5 mm boyutlarındaki seçilebilir foliküller olarak adlandırılan sağlıklı foliküller menstrüel siklusun tüm evrelerinde görülebilirler (48). Lutel fazın geç evrelerinde, siklik korpus luteumun gerilemesinin ardından periferik FSH seviyesinin artmasına cevaben sayıları ve kaliteleri artar (49). Bu sırada sayıları 24-33 yaş arası kadınlarda 3 ve 11 arasındadır (50), ancak bu sayı yaşlanma ile giderek azalır. Bir sonraki siklusta ovule olacak olan folikül bu foliküller arasından seçilir (48, 49). Büyümenin erken evrelerindeki foliküller siklik hormonal değişikliklere duyarlı değilken, seçilebilir foliküller bu değişikliklere daha duyarlıdır. Seçilebilir foliküllerin granuloza hücrelerinin mitotik indeksleri geç luteal fazda orta luteal faza göre oldukça artmıştır (51) ve granuloza hücre proliferasyonu açısından eksojen gonadotropinlere yüksek oranda duyarlı hale gelmişlerdir (52). Ancak, seçilebilir foliküllerdeki östradiyolün folikül içi konsantrasyonu androjenler ile karşılaştırıldığında düşüktür. Seçilebilir foliküllerin folikül sıvısı FSH ile indüklenen aromataz'ı (53) ve androjenlerin tekal üretimini (54) inhibe edebilen faktörleri yüksek seviyede içerir. Bununla birlikte, aromatize edilebilir androjenlerin üretimindeki bu olumsuz etkiler LH reseptörlerinin sayılarının artmasıyla (55), erken foliküler fazda LH salınım sıklığının artmasıyla (56) ve GDF-9'un teka hücrelerinde androjen üretimi üzerindeki olumlu etkisiyle (57) kısmen de olsa giderilebilir.

Her memeli türü her bir siklusta ovule olacak belli sayıda foliküle sahiptir (ovulatuvar kontenjan). Seçim terimi Goodman ve Hodgen tarafından (58), büyüyen folikül topluluğunun bu ovulatuvar kontenjandaki son düzenlemesini ifade etmek için kullanılmıştır. Dolaşımdaki FSH tarafından stimüle edilebilmek için, her bir büyüyen folikül preovulatuvar gelişimin devam etmesini sağlamak üzere geçilmesi gereken bir eşığe sahiptir (59). Seçilmiş folikülün FSH artışına cevaben en hızlı büyüyen folikülün FSH eşığı en düşük olan folikül (49) olduğu düşünülmektedir. Foliküler fazın başlangıcında en büyük sağlıklı folikül seçilmiş foliküldür. Diğer folikülerden daha büyük bir hızla büyür (60), algılanabilir düzeyde FSH içerir (61) ve foliküler sıvısındaki östradiyol seviyesi açısından seçilebilir foliküllerden büyük ölçüde farklılık gösterir.

Birlikte ele alındığında bu veriler seçilmiş folikülde granuloza hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının stimulatorlerinin etkin olduğunu gösterir. IGFler granuloza hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasının yanında (62), teka hücreleri tarafından androjenlerin üretimini de destekledikleri için IGF sisteminin FSH'nın etkilerini düzenlemedeki önemi son zamanlarda gittikçe belirginleşmektedir (63).

2.6.3. Preovulatuvar Folikül Gelişimi

Ovule olmak üzere seçildiği andan itibaren folikül steroidogenik aktivitesinde belirgin değişiklikler gösterir. Teka hücrelerinde artan androjen üretimi ile birlikte, muhtemelen inhibin'in artan üretimine cevaben (64, 65), yalnızca 10 mm ve daha büyük foliküllerin granuloza hücrelerinde görülen aromataz IGFII üretiminin artmasıyla uyarılır (66) ve plazma östradiyol seviyesinin en yüksek olduğu sırada maksimal folikül içi östradiyol konsantrasyonuna neden olur. Bu nedenle insan foliküler sıvısındaki östradiyol miktarı erken foliküler fazdan geç foliküler faza kadar 658 ng/ml'den 2583 ng/ml'ye yükselir ve granuloza hücrelerindeki aromataz ve granuloza hücre sayısı ile foliküler sıvıdaki östradiyol konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon vardır (67). Folikül olgunlaştıkça granuloza hücreleri LH bağlayabilir hale gelirler. Bundan sonra LH, dolaşımdaki miktarı preovulatuvar folikülün östradiyol ve inhibin üretimine cevaben önemli ölçüde düşen FSH'nın yerini alabilir. LH, rekombinant hFSH ile yönetildiğinde folikül gelişimini hızlandırarak, FSH doz gerekliliklerini ve küçük foliküllerin gelişimini indirgeyerek ve böylece hastaları ovaryan hiperstimulasyon gibi birtakım komplikasyonlardan koruyarak geç folikülogenezi optimize eder (68). Bu gözlem, LH geç foliküler fazda foliküle girdiğinde granuloza hücre fonksiyonunun önemli bir efektörü ve belki de FSH'nın yerini alarak granuloza hücre farklılaşmasının başlıca düzenleyicisi olduğu ihtimalini destekler. Foliküler fazın ortasından itibaren primat preovulatuvar folikülü aynı ovaryumdaki veya diğer ovaryumdaki foliküllerden iki kat daha geniş alan kaplayan kan damarlarına sahip teka ile büyük ölçüde vaskularize bir hale gelir (69). Tekaya ait vaskularizasyondaki hissedilebilir artış tekadaki kan kapillerlerini oluşturan endotel hücrelerinin anjiyogenik faktörlerce indüklenen proliferasyonunun bir sonucu olarak gerçekleşir (70). Siklus ortasındaki gonadotropin artışının ardından, preovulatuvar folikül östradiyol üreten bir yapıdan progesterin üreten bir yapıya dönüşür, granuloza hücre proliferasyonu duraklar, mural ve kumulus granuloza hücreleri ayrılır ve teka tabakalarındaki kapillerler granuloza hücre tabakasını invaze eder. Steroid üretimi önemli ölçüde artar. Progesteronun üretimindeki bu artış iki artırıcı etkiden kaynaklanır. Birincisi, hem 3bHSD hem de P450scc (71) gonadotropin artışının ardından granuloza hücrelerinde görülür. İkincisi, bazal laminanın yıkılmasının bir sonucu olarak granuloza hücrelerine progesterin üretimi için gerekli olan ve hücrelere lipoproteine bağlı kolesterol şeklinde sağlanan kolesterol substratının artık kan ile foliküle ulaşabiliyor olmasıdır. LH artışının ardından granuloza hücrelerinin maturasyonlarının son evresini tamamladıktan sonra proliferere olma yeteneklerini kaybetme ihtimallerine ek olarak progesteronun granuloza hücre mitozunu doğrudan bloke edebileceği de düşünülmektedir (72).

FSH, granuloza hücrelerinin arasında gap junction oluşumunu artırdığı için, gonadotropin artışı gap junctionlarda anlamlı bir gerilemeye ve mural granuloza hücrelerinin ayrılmasına, kumulus hücrelerinin ekspansiyonuna neden olur. Ayrıca, GDF-9, kumulus ekspansiyonu ile ilişkili olan hiyaluronan sentaz ve siklooksigenaz 2 ile steroid akut regülatuar proteinin (StAR) ekspresyonunu ve progesteron üretimini indükler (73). Ovulasyondan birkaç saat önce granuloza hücreleri tarafından üretilen anjiyogenik faktörlere cevaben (70), siklus ortası gonadotropin artışından önce avasküler olan granuloza duvarının tekadan gelen kan damarlarının invazyonunun ardından kanlandığı görülür.

2.6.4. Antral Folikül Gelişimi

2.6.4.1. Hipotalamus ve hipofizin kilit rolleri

Antrum oluşumu folikülogenezin son fazlarının ve intraovaryan düzenlemeden ekstraovaryan düzenlemeye geçişin habercisidir. Dişide hipotalamus-hipofiz-gonad eksenini (HPG) folikül maturasyonunu ve gebelik için fizyolojik hazırlığı kontrol eder. Olgun bir HPG ekseninden önce primordiyal aşamadaki foliküller gelişmek üzere seçilir, ancak yeterli gonadotropin uyarımı olmadan antral folikülleri oluşturamazlar. Farede pekçok peptid ve hormonun hipotalamus ve hipofizdeki üretimini etkileyen kendiliğinden veya hedefli mutasyon ve insandaki genetik bozukluklar folikülogenezin hormonal düzenlenmesinin anlaşılmasında önemli katkılar sağlamıştır (74).

2.6.4.2. Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH)

Gonadotropin salgılatıcı hormon hipotalamik nöronlar tarafından median eminens'in kapiller pleksusuna salgılanan bir dekaeptittir ve ön hipofizin gonadotropik hücrelerinden LH ve FSH salınımını etkiler (Şekil 2.7). GnRH yokluğu ile karakterize edilen Kalmann sendromlu kişilerde hipogonadotropik (düşük seviyeli FSH ve LH) hipogonadizm meydana gelir. Gonadotropin salgılatıcı hormon reseptörü (GnRH-R) mutasyonları insanda infertiliteye neden olur (74).

2.6.4.3. Folikül Stimulan Hormon (FSH)

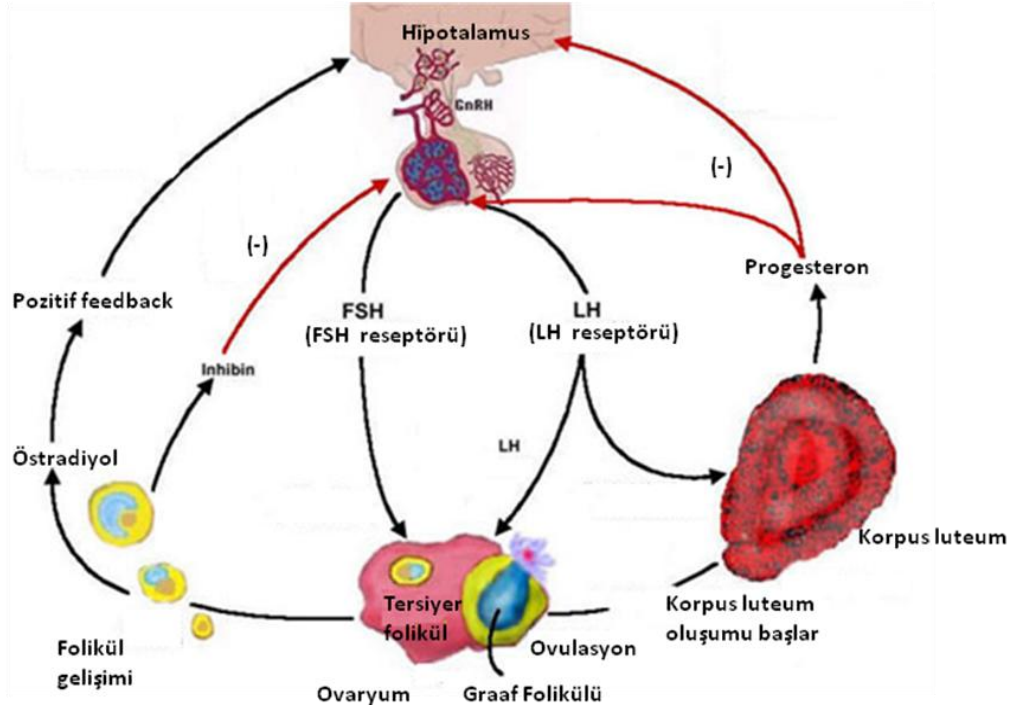
Hipofizin glikoprotein yapıdaki hormonu olan FSH, gonadal FSH reseptörleri ile etkileşime girerek üremede önemli bir rol oynar. a ve b altbirimlerinden oluşan FSH, FSH reseptörüne bağlanır ve germ hücre maturasyonu ile foliküler büyümeyi gerçekleştiren sinyalleri aktive eder. Farede yapılan çalışmalarda FSH yokluğunda erkekler fertildir ancak sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve testis büyüklüğü azalır. Buna zıt olarak FSH bulunmayan dişiler küçük uteruslara ve ovaryumlara, yüksek LH'ya sahiptir ve östrus siklusu görülmez. 6. haftada primordiyal, primer ve çok tabakalı preantral foliküller görülse de antral folikül oluşmaz ve ovulasyon gerçekleşmez. FSH, granuloza hücre proliferasyonunu indükler ve FSHb knockout fareler foliküler gelişimin preantral evrelerinde duraklarlar (74).

2.6.4.4. FSH reseptörü (FSHR)

FSH reseptörleri transmembran G (guanin nukleotid bağlayıcı) protein-coupled reseptörlerdir. FSHR reseptörüne sahip olmayan dişi fareler infertildir. Primordiyal, primer ve sekonder foliküller mevcuttur ancak geniş antral foliküller ve korpus luteum yoktur. FSHR yokluğu, gonadotropinlerin folikülogenezin erken aşamaları için gerekli olmadığı hipotezine uygun olarak erken aşamadaki foliküllerin büyümesini etkilemez (74).

2.6.4.5. LH reseptörü (Lhcgr)

FSH reseptörleri gibi LH reseptörleri de G protein coupled reseptör ailesine dahil olan tek zincirli transmembran glikoproteinlerdir. LH ve FSH'nin erken folikülogenezde major rolleri olmadığı düşünülse de truncated LH reseptör mRNA'sının ekspresyonu germ hücre kistlerinin bulunduğu ve primordiyal foliküllerin olduğu yenidoğan ovaryumlarında görülür. Tamamlanmış transkriptler postnatal 5. güne kadar görülmez. LH reseptörü olmayan dişilerde preantral ve antral foliküller mevcutken preovulatoz foliküller ve korpus luteum mevcut değildir. FSH reseptör knockoutları ile karşılaştırıldığında LH reseptör knockoutlarda daha gelişmiş folikül yapıları görülür ancak her iki knockout modelde de ovaryumlar küçüktür (74).



Şekil 2.7. Folikülogenezin hormonal kontrolü (75)

2.7. Ovosit Maturasyonu

2.7.1. Nuklear Maturasyon

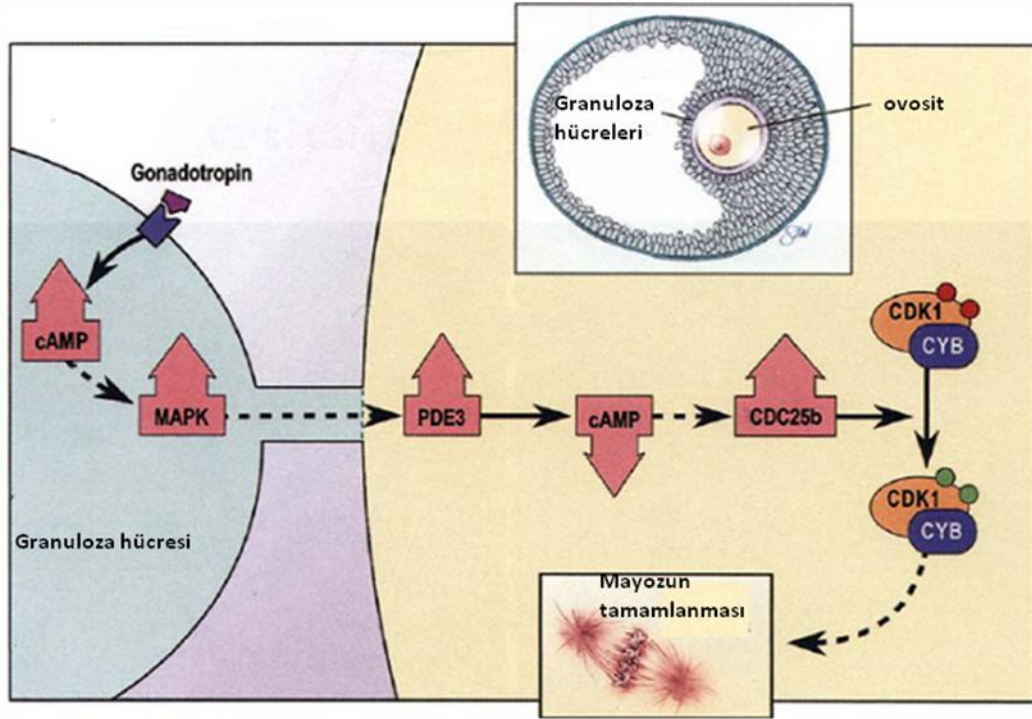
Mayoz, gametlerde kromozom sayısını diploid (2N) sayıdan haploid (N) sayıya indirgemek üzere meydana gelen özgül bir bölünmedir. Dişi memelilerde bu süreç erken fetal gelişim sırasında başlar. Primordiyal germ hücreleri (PGH), fare embriyosunda ilk olarak 7.2. günde ekstraembriyonik mezoderimde görülürler (76), genital çukırtıda kolonize olmak üzere arka bağırsak ve dorsal mezenter boyunca göç ederler. Göçleri boyunca PGH mitotik bölünmeler geçirir; ancak yaklaşık E13'te mitoz durur ve tüm populasyon birinci mayotik bölünmenin (mayoz I) profazına girer (77). Mitotik proliferasyondan birinci mayoz bölünmeye olan bu değişim oogonyadan ovosite olan dönüşümü ifade eder. Fetal ovositler zigoten, pakiten ve erken diploten evrelerini geçerler ancak tümü profaz I'in diktiyoten evresinde duraklarlar. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanması ancak ovosit ve içinde bulunduğu ovaryan folikül yeterli büyüklüğe ulaştığı zaman gerçekleşir. Perinatal ovaryumda, mayotik duraklamanın ardından, ovositler foliküler somatik hücrelerinin öncüllerinin oluşturduğu tek tabaka ile çevrilir ve primordiyal folikülleri oluştururlar. Böylece doğumda ovaryumlar, dışının büyüme halinde olmayan primordiyal foliküller içinde bulunan tüm gametlerini içerir (78). Sonuçta sadece küçük bir kısım ovosit ovule olacak ve fertilize olma şansına sahip olacaktır. Geriye kalan ovositler foliküler somatik hücrelere atretik dejenerasyon sırasında eşlik edeceklerdir. Atreziden kaçan ve primordiyal havuzdan toplanan foliküller primer folikülleri oluştururken ovosit büyüme fazına girer, çevre somatik hücreler (artık granuloza hücreleri adını alır) küboidal ve proliferatif hale gelir. Ovosit ve granuloza hücreleri arasındaki karmaşık etkileşimler her iki hücrenin gelişimi ve fonksiyonu için önemlidir. Foliküller sekonder evreye geçtiklerinde, ovositlerin büyüme evresinin ortalarında olmalarıyla ve çok sayıda granuloza hücre tabakasıyla çevrili olmalarıyla karakterize edilirler. Daha sonra foliküller tamamen büyümüş bir ovosit içeren antral evreye geçerler. Preantralden antral evreye geçiş, ovositin mayozu tamamlamak üzere kapasite kazandığı önemli bir noktadır (79). Tamamen büyümüş olan ovositler luteinizan hormonun (LH) preovulatuvar artışına cevaben mayozu tamamlarlar. Profaz I'de duraklamış olan ovositler tam bir nuklear membran ile karakterize edilirler ve nukleus germinal vezikül (GV) adını alır. Mayozun tamamlanmasının en açık göstergesi GV'nin ortadan kalkması ya da yıkımı (GVB), kromozom yoğunlaşması ve bipolar metafaz I (MI) iğinin oluşmasıdır. Birinci mayotik bölünme süresince, homolog kromozomlar ayrılır ve bir set birinci polar cisimciğe aktarılır ve böylece haploid genom oluşur. Daha sonra ikinci bir mayotik iğ oluşur ve ovositler metafaz II'ye (MII) girerler ve bir spermatozoon tarafından aktive edilene kadar bu evrede beklerler. Pekçok memelide MII evresine kadar olan mayotik maturasyon ovulasyon ile tamamlanır ancak maturasyon ve ovulasyon arasındaki korelasyon deneysel olarak ayrılabilir (80). LH bağımsız (spontan) maturasyon ovosit- kumulus hücre kompleksinin antral foliküllerden ayrılarak uygun bir medyumda kültüre edilmesiyle gerçekleşir (81, 82). Bu nedenle ovulasyonun hormonal indüksiyonu nuklear maturasyonun başlaması için gerekli değildir. Aksine, gonadotropinlerin domuzlarda erken östrus evresinde enjeksiyonu ile ovulasyon indüksiyonu primer (diploid) ovositlerin ovulasyonu ile

sonuçlanmıştır (80). Ovositler mayozun devamında defektler gösteren belirli fare türlerinde MI evresinde de ovule olmuşlardır (83). Bu çalışmalar ovulasyonun ovosit maturasyonuna bağlı olmadığını gösterir.

2.7.1.1. Nükleer Maturasyonu Yürüten Kilit Hücre Siklusu Molekülleri

Mitotik sıklusa benzer olarak siklin B (CYB) tarafından düzenlenen bir protein kinaz olan p34cdc2 kinaz (CDK1) aktivitesindeki dalgalanmalar ile düzenlenir. Bu proteinler, maturasyon (veya M faz) ilerletici faktör (MPF) olarak adlandırılan bir fonksiyonel aktivitenin bileşenleridir (84). Ovositlerde CDK1 mayozun tamamlanmasından hemen önce aktive edilir ve GVB için gereklidir; aktivitesi artar ve MI'de platoya ulaşır. MI ve MII arasındaki geçiş süresince, birinci polar cisimcik atıldığında, CDK1 aktivitesi anlamlı ölçüde düşer. Ancak, MII duraklamasında tekrar ortaya çıkar ve yüksek seviyede tutulur (85). CDK1'in aktivasyon durumu CYB seviyelerinin modülasyonu ve CDK1 kinaz domaininin belirli amino asit birimlerinden fosforilasyonu ile düzenlenir (86). CYB sentezi mayotik maturasyon süresince artar ve birinci mayozun M evresinin sonunda en yüksek seviyededir (87); ancak anafaz I'in başlangıcıyla ubiquitin bağımlı bir yolak ile hızlıca geriler. Yeni sentezlenmiş olan CYB, MII'de CDK1 aktivitesini yeniden sağlamak için gereklidir. MI sonunda CYB de dahil olmak üzere protein sentezinin inhibisyonu CDK1 aktivitesinin yeniden oluşmasını önler ve MII duraklamasının başarısızlığına neden olur (32). Ovositlerde bulunan CYB miktarı mayozun devamlılığı için önemlidir. GV evresinden MI evresine geçiş hızı, CYB sentez ve yıkılma oranının dengesine bağlıdır (87). Bu nedenle metafaza giriş CYB sentezi ve CDK1 aktivasyonu ile yürütülürken, anafaza giriş ubiquitin aracılı CYB yıkımı ve buna bağlı olarak CDK1 aktivitesinin azalması ve aynı zamanda homolog kromozomların (anafaz I) veya kardeş kromatidlerin (anafaz II) adezyonunda görevli proteinlerin proteolizi ile bağlantılıdır (31). CYB ile olan bağlantısının yanında, CDK1 aktivitesi belirli amino asit birimlerinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu ile düzenlenir. CDK1 profaz I aresti boyunca inhibitör kinazlar MYT1 ve WEE1 tarafından gerçekleştirilen Thr-14 ve Tyr-15 üzerinde gerçekleşen fosforilasyon ile inaktif halde tutulur (28). GVB'nin başlangıcından önce CDK1'in bu bölgeleri CDC25 tarafından defosforile edilir ve CDK1 aktive olur (88). Birinci mayoz bölünmenin tamamlanması sırasında, olgun ovositleri fertilizasyona kadar MII'de bekleten uygun kontrol mekanizmaları çalışır. Hücre siklusunu duraklatıcı bu aktivite sitostatik faktör (CSF) olarak adlandırılır ve fertilize olmamış ovositlerde MII duraklamasının devamlılığından sorumludur. CSF aktivitesi MII'de görülmüş ve fertilizasyonun hemen ardından kaybolmuştur (89). Mos- protoonkogeninin ürünü (MOS proteini), onun hedefi, mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz (MAPKK/MEK1) ve MEK1 substrat MAPK, CSF'nin asıl bileşenleridir. MAPK, ancak CDK1 aktivasyonunun ve mayozun tamamlanmasının ardından aktive olur; aktivitesi mayotik maturasyon boyunca artar ve MI'den MII'ye geçişte de korunur (Şekil 2.8). MAPK'ın MII duraklamasını korumak için gerekli olduğu pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır (90). İnterfaza girişte, CDK1 aktivitesinin düşmesinin ardından MAPK da yavaşça inaktif olur. Protein kinaz p90 (RSK) *Xenopus* ve fare ovositlerinde MAPK'ın önemli bir moleküler hedefi olarak tanımlanmaktadır (91). RSK'nın MI ve MII arasında, muhtemelen CDK1'in yeniden

aktivasyonu ile S fazına girişi baskılayıcı rolü olabileceği düşünülmektedir. RSK'nın, CDK1'i aktive etmek üzere MYT1'i inhibe ederek mayoz I' e girişte rol oynadığı gösterilmiştir (92). Fare ovositlerinde MII iğ bütünlüğünün düzenlenmesi yeni bir MAPK substratına, MAPK ile etkileşen iğ stabilize edici proteine (MISS) bağlanmaktadır (93). Anafaz başlangıcı anafaz ilerletici kompleksin (APC) kromozomlar iğ iplikçiklerine doğru şekilde bağlanana kadar inhibe edilmesiyle önlenir (34).



Şekil 2.8. Ovosit Maturasyonunun MAPK sinyal yolağı ile kontrolü (32)

2.7.1.2. Mayotik Kompetens

Mayotik maturasyonu devam ettirme ve tamamlama yeteneği (kompetens) ovositin büyümesi sırasında kademeli olarak kazanılır. Tamamen büyümüş olan ovositler kültür ortamında mayozu kendiliğinden tamamlasalar da aynı koşullarda kültüre edilen preantral foliküllerin ovositleri maturasyonu tamamlayamaz. GVB gerçekleştirmek üzere kompetensin kazanılması folikülün gelişim evresine ve ovosit büyüklüğüne bağlıdır. Kısmen büyümüş olan ovositler GVB'yi gerçekleştirme yeteneği kazanırlar ancak ilginç olarak bu evrede maturasyonu tamamlama ve dolayısıyla metafaz I'de duraklama yeterliliğine sahip değildirler. Ovositler ancak sonraki gelişim aşamalarında olgun ovositler olmak üzere metafaz I'den metafaz II'ye geçebilirler (79). Mayozun devamlılığı ve tamamlanması nuklear maturasyon için gerekli anahtar proteinlerin mevcut ve fonksiyonel olmasını gerektirir. Bu proteinler, ovositler foliküler

somatik bileşenlerin baskılayıcı etkisinden uzaklaştıklarında aktive olabilirler. Preantral foliküllerdeki bu büyüyen ovositler, foliküllerinden izole edildiklerinde ve kültüre edildiklerinde spontan maturasyon gerçekleştiremezler, çünkü nuklear maturasyonu gerçekleştirmek için gerekli olan proteinleri yeteri kadar içermezler veya hücre içi dağılımları ya da ilişkili oldukları yapılar aktivasyon için uygun değildir. Ovosit başına düşen CDK1 ve CYB miktarı ovosit GVB'yi sürdürme yeterliliğini kazandıkça artar (37). Ayrıca, ovositler GVB'yi gerçekleştirmek üzere yeterli hale geldiklerinde CDK1 ve CYB, GV'ye taşınırlar (40). CDC25b'ye sahip olmayan ovositler tamamen büyümüş olsalar da GVB'yi gerçekleştiremezler, ancak CDC25b mRNA'nın enjeksiyonu GVB'yi indükler (32). GVB inkompetensinden kompetensine geçişi başlatan sinyaller henüz bilinmemektedir, ancak komşu granuloza hücrelerinin önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Ovositler, granuloza hücreleri olmaksızın CDK1 birikimi yapabilseler de GVB'yi gerçekleştirmek üzere tam olarak kompetent hale gelemezler (41). Gelişen ovositler öncelikle GVB'yi gerçekleştirebilir hale gelirken nuklear maturasyonu gerçekleştiremez ve metafaz I'de duraklayamazlar; bu ovositler kısmen kompetent olarak adlandırılır. Bu kusurun moleküler temeli henüz açıklığa kavuşmamıştır. Ancak fareler üzerinde yapılan son çalışmalar kısmen kompetent ovositlerde protein kinaz C'nin (PKC) inhibe edilmesinin metafaz II'ye geçişi hızlandırdığını göstermiştir. Ayrıca tamamen kompetent ovositlerde PKC aktivitesinin uyarılması nuklear maturasyonun GV aşamasında veya GVB'yi gerçekleştirmiş olan ovositlerde metafaz I'de durur (42). Bu nedenle PKC aktivitesini baskılama yeteneğinin kazanılması ilk mayoz bölünmenin tamamlanması için gereken gelişim programının önemli bir bileşeni olabilir. Ancak PKC aktivitesinin erken ovosit gelişimindeki rolü bilinmemektedir. Primordiyal fare ovositlerinin germinal veziküllerinin mikrocerrahi ile nukleusları çıkartılmış, tam olarak büyümüş ovositlere aktarıldığı deneyler nuklear maturasyonun tamamlanması için gerekli kapasitenin sitoplazmik bileşenleri de içerdiğini kanıtlar. Bu ovositler metafaz II'ye kadar mature olmuştur [94]. Ancak mayotik maturasyonun tamamlanmasına rağmen inseminasyonun ardından dişi ya da erkek pronukleus oluşmamıştır. Pronukleus oluşum için kompetens ancak GV- donör ovosit daha fazla gelişmiş olan seonder preantral foliküllerden elde edildiğinde sağlanabilmiştir (95). Nuklear maturasyonun tamamlanması ve fertilizasyonda dişi ile erkek pronukleuslarının oluşmalarının gerçekleşmesi için ooplazma içine karışacak olan bir nukleoplazmik bileşenin gerektiği düşünülmektedir (32).

2.7.1.3. Antral Foliküllerdeki Ovositlerde Profaz Duraklamasının Korunması

Preantral foliküllerdeki kompetent olmayan ovositler GV evresinde duraklarlar çünkü nuklear maturasyonu tamamlamak için gerekli sitoplazmik faktörlerden yoksundurlar. Ancak, tamamen büyümüş olan kompetent ovositler bu kilit molekülleri içerirler ancak yine de LH artışına kadar GV evresinde kalırlar. Bu ovositleri profaz I evresinde tutan mekanizmalar nelerdir? Foliküler çevrelerinden uzaklaştırılan ovositlerde gözlemlenen spontan maturasyon (81) antral foliküllerin somatik hücrelerinin ovositerin mayotik duraklamasını sağladıkları hipotezini akıllara getirmektedir. Bu nedenle folikülün atretik dejenerasyonu mayoz duraklama sisteminde bir bozulmaya neden olabilir ve bozuk/erken ovosit maturasyonu ile sonuçlanabilir.

Foliküler sıvıda bulunan faktörlerin ovositleri profazda tutmak için gerekli olduklarına inanılmıştır (96). Daha sonra ovositleri mayotik duraklama halinde tutan bu faktörlerden birinin domuz ve fare foliküler sıvısında milimolar konsantrasyonlarda bulunan purin hipoksantin olduğu saptanmıştır (97). Ancak mayotik duraklama daha çok “ovosit ile iletişimini hücre teması ile sağlayabilen granuloza hücrelerinden elde edilen sinyaller ile (98) ve belki de ovosit ve granuloza hücrelerini metabolik olarak birleştiren oluklu bağlantılar ile sağlanmaktadır. Ovositleri GV evresinde tutan faktörler folikülün granuloza hücre kompartımanından köken alıp foliküler sıvıdan geçmelerine gerek kalmadan oluklu bağlantılar aracılığı ile ovosite aktarılıyor olabilirler. Ovosit siklik adenozin monofosfat (cAMP) seviyelerinin mayozun sürdürülmesini düzenlediği ile ilgili güçlü kanıtlar vardır. cAMP'nin analogları mayotik duraklamayı in vitro ortamda sağlayabilirler (99), laboratuvar kemirgenleri bu bileşiklere sığır veya primat ovositlerinden daha duyarlıdır (100). Ayrıca kumulus hücrelerinden ayrılan ovositlere adenilil siklaz (AC) agonisti olan forskolin uygulanması GVB başlangıcını geciktirir (101). Fare ovositlerine protein kinaz A (PKA)'nın katalitik altbiriminin enjeksiyonu spontan maturasyonu inhibe eder (102). Genel cAMP fosfodiesteraz (PDE) inhibitörleri de GVB'yi önler (103). cAMP'nin preantral foliküllerdeki kompetent olmayan ovositlerin mayotik duraklamasında rol oynamadığı düşünülmektedir, çünkü PKA inhibitörlerinin mikroenjeksiyonu bu ovositlerde GVB'yi indükleyemez (104). Kompetent ovositlerdeki PKA substratları belli değildir. Ancak PKA kurbağa ovosit lizatlarında CDC25'i doğrudan fosforile eder ve CDC25 ovositlerde CDK1 defosforilasyonundan hemen önce defosforile olur. Böylece PKA, CDC25'i inaktif fosforile durumda tutarak CDK1'in defosforilasyon bağımlı aktivasyonunu önler (105).

İzole edilmiş ovosit-kumulus hücre komplekslerine folikül stimulan hormon (FSH) uygulanması kumulus hücrelerinde ve ovositlerdeki cAMP seviyelerini artırır (81), ve ovositler FSH reseptörleri içermediğinden ilk varsayım cAMP'nin kumulus hücrelerinden oluklu bağlantılar aracılığı ile ovositlere aktarılıyor olabileceğidir.

İnozin monofosfat (IMP) dehidrogenaz inhibitörleri hipoksantin aracılı mayotik duraklamayı in vitro ortamda bozarlar (106). Ayrıca bu inhibitörlerin fareye enjekte edilmesi neredeyse ovaryumdaki tüm GVB kompetent ovositlerin maturasyonunu indükler (107). IMP dehidrogenaz, IMP'nin ksantosin monofosfat'a dönüşümünü katalize eder. Ksantosin monofosfat da guanozin monofosfat'a (GMP) dönüşür. Bu nedenle GMP üretimi mayotik arestin korunmasında önemlidir. GMP'nin kaderi büyük olasılıkla guanozin trifosfat'a (GTP) dönüşmek ve ardından G proteinlerine bağlanmaktadır. Belirli hücrel cevapların üretilmesi için kimyasal sinyallerin iletilmesinde önemli olan bu proteinler oolemmada ve kumulus hücrelerinin plazma membranlarında bulunurlar (108). Kumulus hücrelerinden uzaklaştırılmış olan ovositlere GTP analogu olan GTPgS'nin mikroenjeksiyonu GVB'yi baskılar (109).

şekilde nuklear maturasyonu sağlıyor olabilir. LH artışı oluklu bağlantılar ile sağlanan ovosit ve somatik hücreler arasındaki fiziksel iletişimi keserek cAMP aktarımını azaltır. Bu hipotezi destekler şekilde, granuloza hücreleri tarafından eksprese edilen oluklu bağlantı proteini konneksin-43 seviyesi ve fosforilasyon durumundaki fonksiyonel değişiklikler GVB ile koordine edilir (112). Granuloza hücresindeki konneksin-43 fosforilasyonu LH uygulamasının ardından 10 dk içinde gerçekleşir (53). Ancak bu değişikliklerin mayozu inhibe eden kilit faktörlerin, mayozu tamamlamak üzere harekete geçmeden önce ovosite taşınmasını durdurup durdurmadığı açıklığa kavuşmamıştır (56). In vitro sistemler kullanılarak hipoksantin, cAMP analogları veya PDE inhibitörleri gibi mayoz duraklama faktörlerinin bozulması ile yapılan çalışmalar granuloza hücrelerinde gonadotropin uyarımına cevaben bir mayoz indükleyici sistemin geliştiğini göstermektedir (113). Ayrıca bu sinyalin ovosite aktarılması fonksiyonel oluklu bağlantıların varlığını gerektirmektedir (57). Mayoz indükleyici sinyalin ne olduğu henüz anlaşılamadıysa da, granuloza hücrelerindeki hem cAMP hem de MAPK yollarının GVB indüksiyonunda rol aldığı düşünülmektedir. LH'ın foliküler somatik hücrelerdeki cAMP seviyelerindeki artışı indüklediği bilinmektedir (103). Ayrıca mayozun duraklama halinde olduğu izole kumulus-ovosit komplekslerine hipoksantin ile 8-Bromo-cAMP veya forskolin uygulaması mayozun devamını uyarmıştır. LH in vivo veya FSH veya 8-Bromo-cAMP in vitro kumulus hücrelerinde MAPK aktivasyonunu uyarır. Ayrıca, komplekslere MAPK inhibitörlerinin uygulanması gonadotropin ile veya 8-Bromo-cAMP ile GVB indüksiyonunu bloke eder. MAPK aktivitesi ovositlerde GVB için gerekmediğinden, hormon ile indüklenen GVB için gerekli olan granuloza hücrelerindeki MAPK aktivitesidir (59). Hormon ile indüklenen GVB için düşünülen mekanizma şu şekildedir: Gonadotropinler granuloza hücrelerinde cAMP artışını uyararak MAPK seviyesini artırır. Bunun sonucunda granuloza hücreleri tarafından bir mayoz indükleyici sinyal oluşturulur ve bu sinyal gap junctionlar ile ovosite aktarılır. Bu sinyal ovositlerde PDE3'ü aktive eder ve bunun sonucunda cAMP seviyeleri düşer (özellikle ovositlerde) ve bilinmeyen birtakım downstream adımdan sonra CDC25b ve dolayısıyla MPF aktive olur. Daha sonra muhtemelen granuloza hücreleri ve ovosit arasındaki gap junctionlar ile sağlanan iletişim bozulur ve böylece mayoz duraklama faktörlerinin ovosite geçişi son bulur (32).

2.7.2. Sitoplazmik Maturasyon

Sitoplazmik maturasyon gelişen ovositlerde gerçekleşen, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için gerekli olan bir süreçtir. Nuklear maturasyon ile paralel olarak gerçekleştiği düşünülse de, mayozun devamından önce ovosit büyümesi sırasında da kilit adımlar gerçekleşir (32).

Primordiyal foliküller ile karşılaştırıldığında, olgun ovositler çok daha karmaşık bir sitoplazmik organizasyona sahiptir, mayozu tamamlamak için yeterlidirler ve fertilizasyonu gerçekleştirip yarıklanma bölünmelerini tamamlayabilirler.

Primordiyal folikül ovositleri genellikle yanıltıcı biçimde “sessiz” olarak tanımlanırlar. Ancak bu sadece dinlenme halinde olan nukleusun durumudur. Küçük ovositlerdeki bir veya daha fazla nukleusun varlığı, RNA polimeraz aktivitesi ve aminoasitler ile ribonükleotidlerin alımı aktif olduklarını gösterir. Orta-gelişmiş evredeki ovositler pek çok somatik hücreden 10 kat daha fazla RNA üretirler ve nukleoluslar daha geniş ve yoğun hale gelir.

Ovositler, hücre bölünmesi sırasında kromozomları ayıran iğ ipliklerinin düzenlenmesinden sorumlu olan sentriyollere sahip değillerdir. Primordiyal ovositlerde var olan sentriyoller orta-gelişmiş evrede kaybolurlar ve embriyo birçok yarıklanma bölünmesini tamamlayıncaya kadar ortaya çıkmazlar.

Küçük ovositlerin organelleri genellikle nukleus çevresinde kümelenmiştir. Işık mikroskobu altında bu organeller Balbiani vitellin cisimciği (yolk nukleusu) da denen, Golgi aygıtı, mitokondri ve yağ damlacıkları gibi pek çok membranöz organeli içeren tam bir perinuklear yapı olarak gözlemlenir. Ovosit büyümeye başladığında bu organeller hücre polarize olmaksızın periferine doğru göç eder. Golgi aygıtı, dışarı verilecek olan glikoproteinlerin üretimindeki rolüne uygun olarak kortikal bölgede iki ayrı bölgeye bölünür.

Kortikal granül oluşumu rodentlerde ovosit gelişiminin başlangıcından hemen sonra gerçekleşir ve post ovulatör evreye kadar devam eder. Olgun evrede, döllemenin ardından veya diğer aktive edici sinyallere cevaben perivitellin aralığa salınmak üzere hücre membranının hemen altında yer alırlar.

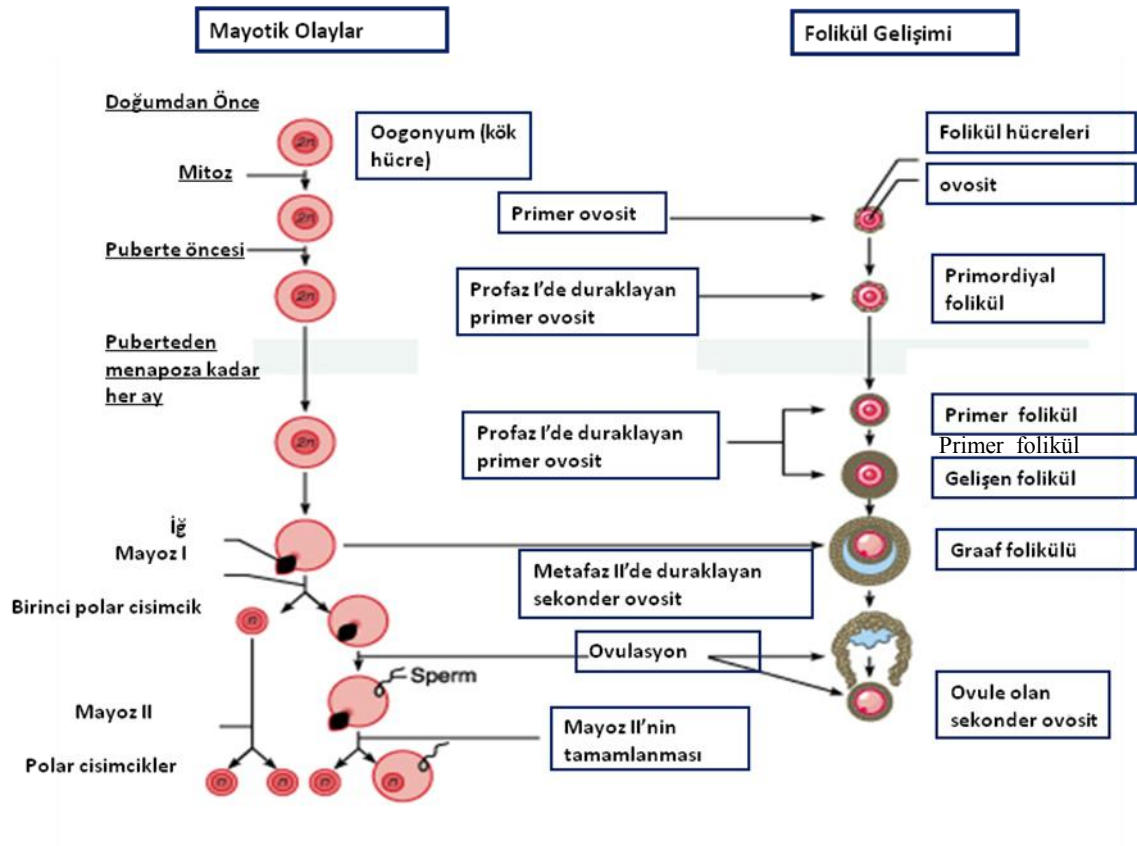
Ovositte bulunan küçük, oval veya yuvarlak şekilli mitokondriler preovulatör evrede sayıca artar ve krista daha sütunsu bir hal alır. Hem granüllü hem de düz yüzlü endoplazmik retikulum (ER) oogenez süresince mevcuttur ancak olgun ovositlerde başka yapılara dönüştükleri için granüllü ER daha seyrek, düz yüzlü ER ise daha az önemli hale gelir. Ribozom sayısı farede oogenez sürecinde ooplazmanın genişlemesi nedeniyle dört kat artar (114).

2.8. Ovulasyon

Memelilerde ovulatör süreç luteinizan hormon'un (LH) endojen artışı ile olgun bir ovaryan folikülün granuloza ve teka hücrelerinin yüzeyinde dağılım gösteren G proteini ile ilişkili LH/insan koryonik gonadotropin (hCG) reseptörlerinin uyarılması ile başlar. Süreç birkaç saat sonra bir folikülün aniden çatlaması ve fertil bir ovositi serbest bırakması ile son bulur.

Dokuda çatlamanın olduğu bölgede meydana gelen değişiklikler patofizyolojiktir ve folikülün çevresindeki teka eksterna ile tüm ovaryumu çevreleyen tunika albuginea'yı kapsayan kollajen dokuların yoğun tabakalarının akut olarak bozulmasını gerektirir.

Lokal hasar sırasında ovaryum yüzeyindeki lezyonun çevresinde kanama meydana gelir. Ancak yapısal değişiklikler foliküler yüzeyin bozulduğu alan ile sınırlı değildir. Ovulasyon süreci tüm stratum granulosum ve buna komşu olan teka internayı etkiler. Ovulasyon sürecinin bileşenleri olarak tanımlanan genlerin çoğu akut inflamatuvar reaksiyonlar ile ilişkilidir (32).



Şekil 2.10. Folikülogenez sürecinde ovosit maturasyonu (115)

2.9. Luteinizasyon

Korpus luteum ovulasyon folikülünün duvarını oluşturan hücrelerden meydana gelir. Luteal formasyon (luteinizasyon) ovulasyondan önce başlar, ancak gerçek anlamda folikül çatlamasının ardından devam eder ve korpus luteum tam olarak oluşana kadar türe özgü olarak birkaç gün sürer. Luteinizasyon; erişkin memelilerde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve erişkin memelilerde benzeri olmayan bir doku yenilenmesini kapsayan dikkate değer bir olaydır. İki temel süreci vardır: a) sonlanmış

proliferasyon ve hızlı hipertrofi ile folikülün steroidogenik hücrelerinin korpus luteumun luteal hücrelerine farklılaşması ve b) kan damarlarının ve bazı türlerde lenfatiklerin korpus luteumun geniş mikrovasküler yatağını oluşturmak üzere folikülün önceden avasküler olan granuloza tabakalarına doğru hızlıca büyümesi. Luteinizasyon genellikle folikülün “son farklılaşması” olarak anılsa da, rodentlerden primatlara kadar pek çok canlı türünde gebeliğe cevaben luteal dokuda daha fazla farklılaşma meydana gelebilir (74).

2.10. Luteoliz

Korpus luteumun fonksiyonu üç aşamadan birinde durur ve yapısı değişir: a) gebelikle sonuçlanmayan ovaryan siklusun sonunda; b) gestasyon sırasında intrauterin gebelik için progesterogenik fonksiyonuna ihtiyaç kalmadığında veya korpus luteuma gebelik boyunca ihtiyaç var ise o halde, c) termde, doğum meydana geldiğinde. Bu luteal yapı-fonksiyon kaybı luteoliz olarak anılır.

Bugüne kadar çeşitli nedenlerle pek çok araştırmacı luteoliz sürecini gebelikle sonuçlanmayan siklusun sonunda incelemiştir ve PG, rodent ve domestik canlılarda uterin luteolitik faktör olarak tanımlanmadan önce genellikle $PGF2\alpha$ ile indüklenen luteoliz modelini kullanmışlardır.

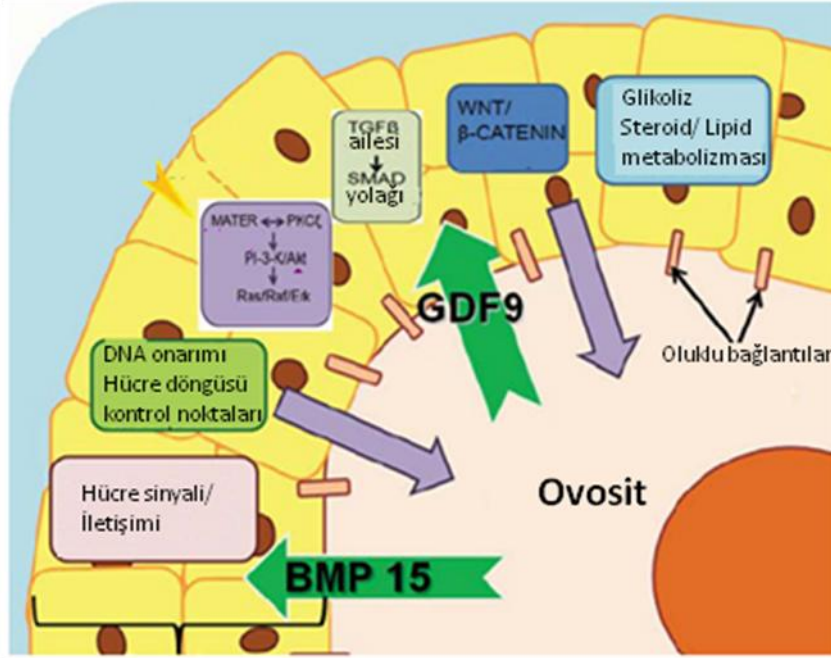
Erken luteal regresyonun özelliği, kandaki seviyesinin düşüşü ile açıkça belirlenen progesteron üretimindeki azalmadır. Luteolitik faktör $PGF2\alpha$ 'nın luteal dokudaki steroid üretimini doğrudan ya da dolaylı olarak azalttığı mekanizmalar üzerine düşünülmektedir. Ancak, luteal yapı-fonksiyon kaybında yer alan mekanizmalar ve hücresel süreçler, özellikle uterin luteolitik ($PGF2\alpha$) kullanmayan türlerde henüz tam olarak anlaşılammıştır (74).

2.11. Ovosit- Granuloza Hücre Etkileşimleri

Ovosit-granuloza hücre etkileşimleri ovosit gelişimi ile granuloza hücre proliferasyonu ve farklılaşması için çok önemlidir (Şekil 2.11).

İntakt komplekslerde kumulus ekspansiyonunun etkin bir uyarıcı olan epidermal büyüme faktörü (EGF) ovosittektomi'nin (ovositlerin foliküllerden ayrılması) ardından kumulus ekspansiyonunun uyarımını gerçekleştirmez. Ancak ovosittektomize edilen kompleksler, germinal vezikül aşamasındaki kumulussuz ovositler ile ko-kültüre edildiğinde veya kültür medyumuna kumulussuz ovositler ile uygun hale getirildiğinde FSH ve EGF'ye yanıt verirler. Bu deneyler ovositler tarafından salınan faktör veya faktörlerin kumulus hücre ekspansiyonunda önemli bir rol oynadığını gösterir. GDF9'un ovositen salınan ve granuloza hücre proliferasyonu ve farklılaşması için önemli olan bir faktör olduğu bilinmektedir.

Ovosit- granuloza hücre iletişimi, hem ovosit tarafından otokrin veya parakrin fonksiyona sahip faktörlerin salınmasını hem de ovositlerin hücre yüzeylerinde granuloza hücrelerinden gelen parakrin faktörleri belirlemek üzere reseptörler bulundurmasını gerektirir (74).



Şekil 2.11. Ovosit- granuloza hücre etkileşimleri (116)

2.12. Protein Fosforilasyon Reaksiyonu

1950'lerde keşfedilen protein fosforilasyon reaksiyonu, fosfat vericisinden (ATP) akseptör proteine bir g-fosfat'ın transferini kapsar. Memeli proteinlerinde serin, treonin ve tirozin kalıntıları fosfat akseptör kalıntılarıdır (117). Histidin fosforilasyonu ise mayalarda ve bitkilerde görülmüştür (118). Fosforilasyon olayıyla yük kazanan akseptör protein fonksiyonel modifikasyona uğrar. Fosforilasyon, proteinin konformasyonel değişikliğiyle sonuçlanabilir veya yüzey görünüşünü değiştirebilir. Sonuçta protein aktif veya inaktif hale gelebilir. Protein bileşenlerini fonksiyonel bir kompleks oluşturmak üzere toplayabilir veya protein komplekslerinden ayrılır. Aktive olan protein substratını tanıyabilir, ona bağlanabilir, aktive veya deaktive edebilir, fosforile veya defosforile edebilir (119).

Protein kinazlar, fosfotransfer reaksiyonlarını yürütürler. Katalitik alt üniteleri fosfat vericisi ATP için bağlanma bölgesi ve protein substratın fosfat akseptör bölgesine uyumlu olarak bir oluk içerir. Bu etkileşimler ATP'nin g-fosfat'ının fosfoakseptör kalıntıya göre uygun pozisyonda olmasını ve fosfotransfer reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlar. Katalitik alt ünitelere ek olarak pek çok kinaz, katalitik

fonksiyonların yürütüldüğü koşulları düzenleyen alt üniteler içerir. Kinazı inaktif konformasyonda tutan otoinhibitör elementler bunlardan biridir. Lipid faktörleri, sekonder haberciler veya proteinlerle etkileşimi sağlayan fonksiyonel modüller de bu alt ünitelerdendir. Böyle elementler kinazı kontrol ederek fonksiyonunu sınırlar (120).

2.13. Protein Kinazlar

Yapılan çalışmalarla yüzlerce farklı kinaz tanımlanmış ve genomla ilgili bilgiler arttıkça protein kinaz süperalesi açığa çıkmıştır (121). Korunmuş bir katalitik alt ünitenin varlığıyla tanımlanan protein kinazlar, *C. elegans*'ta en büyük ikinci protein ailesini oluşturur. Memeli türlerinde de protein kinazlar en önemli protein ailelerinden biridir (122).

Katalitik bölgedeki primer dizi korunumunun kriter olarak kullanılmasıyla kinazlar pek çok gruba ayrılmıştır. Bu gruplanma kinazların belli fonksiyonel özellikleriyle de örtüşür. Örneğin, tirozin kinaz grubu serin/treonin kinaz grubundan farklı diziyeye sahiptir (117-121).

Serin/treonin kinazlar da pek çok gruba ayrılabilir. Protein kinaz C(PKC); cAMP bağımlı protein kinazları [protein kinaz A(PKA)], cGMP bağımlı protein kinazları [protein kinaz G(PKG)], protein kinaz B'yi (PKB), G proteiniyle regüle olan kinazları (GRK), S6 kinazları da içeren AGC kinaz grubuna dahildir. AGC kinazlar kendilerine etki eden farklı kontrol mekanizmalarıyla birbirlerinden ayrılırlar. PKA, sekonder haberci cAMP'nin bağlanmasıyla aktive olur ve katalitik alt ünite ayrılır. Oysa PKC, Ca^{+2} ve Diaçilgliserol'ün (DAG) kontrolü altındadır. PKB, fosfoinositidler tarafından kontrol edilir. Ayrıca AGC grubu kinazlar fosforilasyonla kontrol edilmeye de yatkındır (123).

2.13.1. Protein Kinaz C (PKC)

Ekstraselüler hormonların aktivitesi 'sekonder haberci' denen, hücresel cevabı aktive eden hücre içi moleküllerle kontrol edilir. Sekonder haberci sistemi (cAMP) ilk kez 1960'larda tanımlanmıştır. cAMP'nin hedef proteini olan PKA'nın tanımlanmasıyla hücre içi bir sinyal transdüksiyon zinciri ortaya çıkarılmıştır. Nishizuka ve arkadaşları tarafından 1970'lerde siklik nükleotid bağımsız kinazın (PKC) varlığı öne sürülmüştür (124). Bu kinazın Ca^{+2} , DAG ve fosfolipidlerin kombinasyonu ile aktive olduğu düşünülmüştür. Bu keşif, lipidlerden elde edilen sekonder habercilerin(DAG) de gözlemlenmesiyle 2. bir sinyal transdüksiyon yolağının varlığını kanıtlamıştır (125).

Basit sinyal transdüksiyon yolağı, belli hücre yüzey reseptörlerinin fosfolipaz C (PLC) aktivitesini stimüle etme yeteneğine bağlıdır. PLC, fosfatidilinositol-4,5-bifosfat'a etki ederek DAG ve inositol-3,4,5-trifosfat(PIP_3) oluşturur (Şekil 2.13) ve PKC aktivasyonunu sağlar. PIP_3 , PKC'yi de içeren pek çok kinazı fosforile eden fosfoinositid bağımlı kinazı (PDK) aktive eder. Bu nedenle PIP_3 de sekonder haberci

olarak tanımlanabilir. PKC aktivitesi, hücre içindeki pek çok habercinin varlığına bağlıdır (126).

2.13.1.1. PKC İzotipleri ve Alt Ünite Yapıları

PKC tek ve bağımsız bir moleküler eleman değildir. PKC izotiplerinin oluşturduğu bir PKC ailesi tanımlanmıştır (127). İlk tanımlanan PKC izotipleri PKC α , β ve γ 'dir (16-17). Daha sonra PKC δ , ϵ , η ayrıca PKC η , θ , ve μ tanımlanmıştır (128). Farklı izotipler karşılaştırıldığında pek çok bölgenin homoloji gösterdiği görülür. Tüm PKCler C-terminal katalitik alt ünite ve N-terminal regülatör alt ünite içerir (Şekil 2.12).

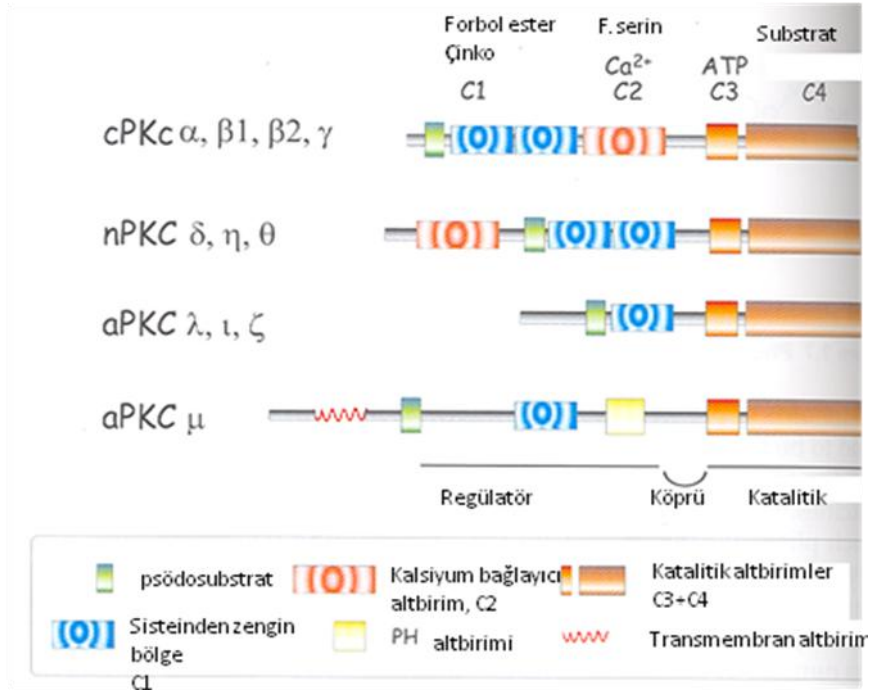
Katalitik alt üniteler yüksek ölçüde homoloji gösterir ve diğer kinazların eş alt üniteleriyle de homologtur. Regülatör alt üniteler daha çok farklılık gösterir ve izotiplerin 3 altgruba ayrılmasına neden olurlar:

- 1) Klasik PKC (α, β, γ)
- 2) Novel PKC ($\delta, \epsilon, \eta, \theta, \mu$)
- 3) Atipik PKC (λ, ι, ξ)

cPKC'nin regülatör alt ünitesi pek çok korunmuş fonksiyonel modül içerir: C1a, C1b ve C2. Bu izotiplerdeki C1a ve b modülleri C2 modülünün N-terminalinde konumlanmıştır. C1, forbol ester/DAG bağlayan bölgeyi oluştururken, C2 modülü Ca^{+2} bağlayan bölgeyi oluşturur. Tüm bu modüller ilk olarak PKC'de tanımlansa da PKC'ye özgü değildir. Bu modüller benzer görevleri yürüttükleri pek çok proteinde bulunurlar.

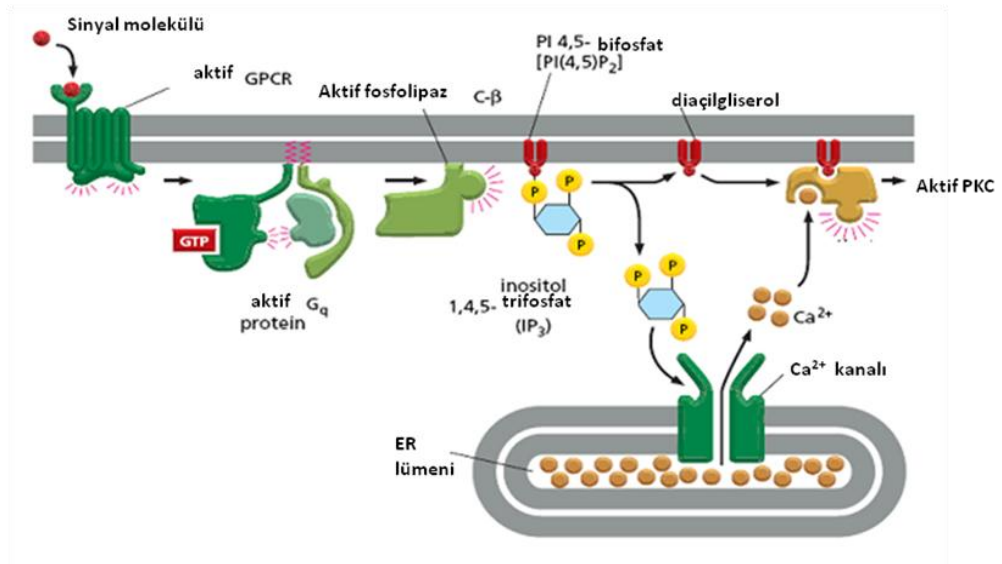
C1 ve C2 modülleri nPKC'de de bulunur. Ancak bu PKC izotipinde C2 bölgesi N-terminal bölgeye yakın konumlanmıştır. nPKC'deki C2 modülü, C2'nin tüm yapısal özelliklerini taşısa da cPKC'dekinden farklıdır ve Ca^{+2} 'u koordine etmez. nPKC'de 2 sınıf C2 modülü vardır. Biri PKC δ ve θ 'da diğeri PKC ϵ ve ν 'de bulunur. aPKC, c ve n'den farklı olarak Ca^{+2} , DAG ve forbol estere cevap vermezler. Çünkü C2 modülü içermezler ve içerdikleri C1 modülü c ve nPKC'den yapısal olarak farklıdır.

Tüm PKC izotipleri regülatör alt ünitelerinde otinhibitör bir modül içerir. Tüm sınıflarda bu modül C1 modülünün N-terminalinde konumlanmıştır. PKC ile fosforile olan hedef proteinlerin fosforilasyon bölgelerine benzer aminoasit dizileri içerir. Pseudosubstrat denen bu molekülde Serin'in yerini Alanin aldığından bu bölgenin fosforile olma özelliği yoktur. Uyarı yokluğunda katalitik alt ünite psödosubstrat'a bağlanır ve enzim C2 ve C3 alt ünitelerini bağlayan destek noktasından katlanır. Böylece kinaz aktivitesi baskılanır (129).



Şekil 2.12. PKC izotipleri ve alt ünite yapıları (1)

2.13.1.2. PKC Aktivasyonu



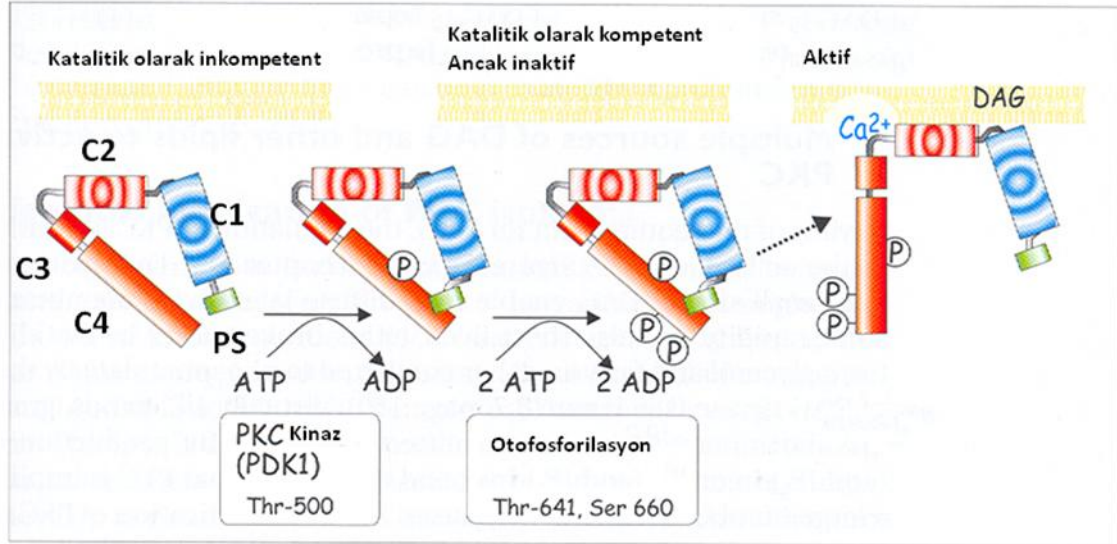
Şekil 2.13. PKC aktivatörleri (130)

PKC aktivasyonu, katalitik alt ünitenin aktivasyonu ve pseudosubstrat'ın aktif kısımdan ayrılmasını içerir (131).

PKC muhtemelen hücre iskeletiyle ilişkili, deterjanda çözünmeyen bir fraksiyon içinde inaktif, fosforile olmamış bir prokürsör olarak sentezlenir. Bu evrede katalitik bölge ATP'den etkilenebilir ancak enzim, katalitik olarak inkompetenttir (132).

Katalitik alt üniteye APE dizisinin yanındaki aktivasyon döngüsü muhtemelen fosfolipid bağımlı kinaz1 (PDK1) etkisiyle fosforile olur (133). Katalitik bölgenin C-terminalinde 2 otofosforilasyon gerçekleşir (134). Olgun PKC deterjanda çözünmeyen fraksiyondan ayrılır ve katalitik olarak kompetent hale gelir. Ancak bu evrede pseudosubstrat katalitik bölgeyle temas ettiği için enzim inaktiftir. Gelen uyarı ile DAG oluşur ve C1 modülünde hidrofobik kısmı kapatır ve yüzey hidrofobik hale gelir. Böylece C1 modülü membrana gömülebilir. DAG aynı zamanda etkileşimin gücünü artırarak C2 modülünün fosfolipidlere bağlanışında Ca^{+2} bağımlılığını ortadan kaldırır.

Pseudosubstrat bölgesi katalitik bölgeden uzaklaşır ve konformasyonel değişikliğe neden olur. Böylece PKC tamamen aktif hale gelir (135). (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. PKC aktivasyon mekanizması (1)

2.13.1.3. Hipotalamus- Hipofiz- Ovaryum Etkileşiminde PKC'nin Rolü

Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) uyarımlı hipofiz primer kültüründe, PKC'nin sitosoldan plazma membranına translokasyonu bilinmektedir (4). PKC hipofizdeki gonadotropik hücrelerde hipotalamustan gelen uyarının etkisiyle plazma membranına aktivite kazanmak üzere göç etmektedir.

PKC'nin birçok GnRH aracılı sinyal iletim yolunda fosforilasyon hedefleri vardır. Bu hedeflerden biri gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi pek çok hücre fonksiyonunu etkileyen mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yoludur (5).

Bu bilgiler bize PKC'nin farklı izotiplerinin ovaryumda bulunan farklı evredeki foliküllerde proliferasyon, ovulasyon, lutealiz gibi olaylarda etkili olduğunu düşündürmektedir. Preantral granuloza hücrelerindeki Folikül Stimulan Hormon (FSH) veya Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)'nin indüklediği DNA sentezi için PKC aracılı MAPK aktivasyon döngüsü gereklidir. Bu aktivasyon döngüsü Siklin Bağımlı Kinaz 4 (CDK4)'ü aktive ederek DNA sentezinin gerçekleşmesini sağlar (6).

PKC sinyal yolu, foliküler gelişim ve ovulasyon genlerinin (*Pgr*, *Prkg2* ve *Cyp11a1*) indüksiyonunda gereklidir. Domuz granuloza primer hücre kültürlerinde *Prkg2* indüksiyonu PKC'nin aktivasyonunu gerektirir (7).

PKCε'un, sıgır korpus luteumlarındaki steroidogenik hücrelerde farklı miktarlardaki ekspresyonu bu enzimin PGF_{2α} (prostaglandin) ile indüklenen luteal regresyonda rolü olduğunu düşündürebilir (8).

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Dokuların Elde Edilmesi

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden elde edilen BALB/C türü 5 damızlık erkek ve 10 damızlık dişi fare çiftleştirilmiş ve doğum sonrası takip edilerek yeni doğan dişi fare sayısı saptanmıştır. Postnatal dönemdeki tüm gruplar (4 grup) için 6'şar adet dişi fare elde edilmiştir ($n= 6 \times 4= 24$). Çiftleştirme, bir kafeste 2 dişiye 1 erkek olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Deney grupları aşağıda belirtilmiştir:

- 1.Grup fareler (postnatal 1. gün)
- 2.Grup fareler (postnatal 7. gün)
- 3.Grup fareler (postnatal 21. gün, pubertal)
- 4.Grup fareler (postnatal 60. gün, yetişkin)

Postnatal 1. günde fare ovaryumunda büyüme göstermeyen yassı folikül hücreleriyle çevrili yaklaşık 8000 mayotik olarak durgun ovosit bulunur (30). Bu ovositlerin yaklaşık %50'si doğumdan sonraki iki hafta içinde yok olur. Germ hücre kistleri, primordiyal foliküller ve primordiyal evreden primer evreye geçmekte olan foliküller gözlemlenebilir. Gonadotropin reseptörlerine ait transkriptler henüz tam olarak oluşmamıştır.

Postnatal 7. gün civarında tüm ovositler birinci mayoz bölünmenin profazının diploten evresindedir (31). Primordiyal ve primer foliküller gözlemlenebilir. Gonadotropin reseptörlerine ait transkriptler mevcuttur.

Postnatal 21. günde ovositin boyutu sabit kalırken, foliküler hücreler hem kübik granuloza hücrelerine dönüşürler hem de hızlıca sayılarını artırır (yaklaşık 50,000). Farelerde pubertenin 3. haftadan sonra başladığı bildirilmektedir (32). Bu aşamada hormondan bağımsız olarak sekonder evreye kadar gelişmiş olan foliküller görülebilir.

Postnatal 60. gündeki erişkin bir farede gelişimin tüm aşamalarındaki foliküller ile korpus luteum alanları gözlemlenebilir.

Folikülogenez sürecindeki kritik aşamalarda granuloza hücre proliferasyonunun ve farklılaşmanın takip edilmesi önemlidir, bu nedenle yukarıda bahsettiğimiz gruplar bu özellikler göz önünde bulundurularak oluşturulmuştur.

3.2. İmmünohistokimya Tekniği için Doku Hazırlanması

Tüm gruplara ait sağ ovaryum doku örnekleri Bouin fiksatifinde fikse edilirken sol ovaryum doku örnekleri -80°C 'de saklanmıştır. Bouin fiksatifine alınan dokular 2

saatlik fiksasyonun ardından %70, %80, %90'lık alkollerde 24 saat bekletilmiş ve en son %100'lük alkolde 2 saat tutularak dehidratasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ksilol içerisinde birkaç saniye bekletilerek şeffaflaştırılan dokular 58°C'lik etüvde, 3 defa 1'er saat parafinize edilmiştir. 3. saatin sonunda dokular temiz parafine gömülerek parafinin oda ısısında donması sağlanmıştır.

3.3. İmmünohistokimya Yöntemi

Doku bloklarından alınan 5µm kalınlığındaki kesitler superfrost (manyetik olarak statik) lamalar üzerine alınarak 1 gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirilmiş ve her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Kesitler distile suda çalkalanmış ve fosfat tamponlu tuz çözeltisinde (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kez 5 dakika yıkanmıştır. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 200ml sitrat tamponuna (pH:6.0) konularak mikrodalga fırında 6 dakika 750W'ta kaynatılmıştır. Mikrodalga fırını dışına alınan kesitler 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır.

Hidrofobik kalemle etrafı çizilen kesitler, distile sudan ve ardından PBS'ten 5'er dakika sürelerle geçirilmiştir. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini inhibe etmek için metanolla hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit solüsyonunda 20 dk inkübe edilmiştir. Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra spesifik olmayan immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama solüsyonu (Ultra V Block, LabVision Corporation TA-125UB) ile 5 dakika muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak kesitler, tavşan poliklonal PKC α 1:250 (sc-208, Santa Cruz, USA); PKC δ 1:250 (sc-937, Santa Cruz, USA); PKC ϵ 1:250 (sc-214, Santa Cruz, USA) ve bunların fosforile formları p-PKC α 1:100 (ab-12356, Abcam, UK); pPKC ϵ 1:100 (ab63387, Abcam, UK) primer antikoları ile + 4°C'de gece boyu inkübe edilmiştir. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine izotip kontroller uygulanmıştır. Kesitler inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanmıştır. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş anti- tavşan sekonder antikor (Lab Vision TP-125-BN) ile inkübe edilmiş ve 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkamanın ardından 20 dakika streptavidin peroksidaz kompleksi (Lab Vision Corporation TA-125-HR) ile oda ısısında inkübe edilmiştir. Daha sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler DAB (Lab Vision TA-060-HDX) ile 2-5 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra kesitler distile suya alınmış ve ardından Mayer hematoksilen ile 10 sn zıt boyama uygulanmış ve akar musluk suyunda yıkanmıştır. Kesitler Kaiser'in gliserol jelatini (MERCK Darmstadt Almanya, OB514196) ile kapatma solüsyonu ile kapatılmış, Axioplan ışık mikroskopunda (Zeiss, Almanya) ovaryum kesitlerindeki α , PKC δ , PKC ϵ , p-PKC α , p-PKC ϵ enzimlerinin dağılımları ve immünoaktiviteleri tespit edilip incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

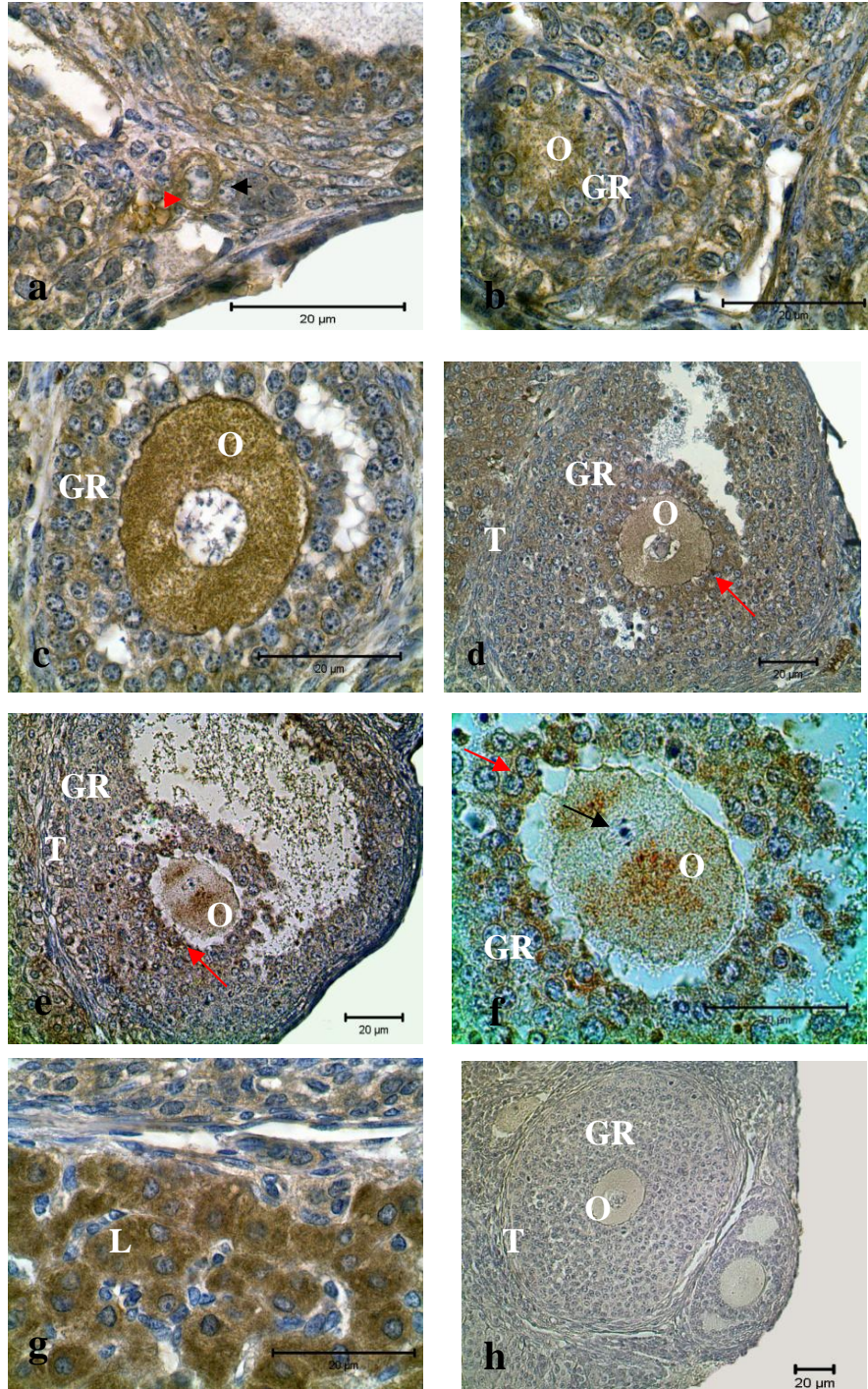
BULGULAR

4.1. PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarına göre PKC α 'nın farklı günlere ait ovaryumların gelişen foliküllerindeki granuloza hücreleri ve ovositlerde farklı yoğunluklarda immunoreaktivite gösterdiği belirlendi.

4.1.1. 60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

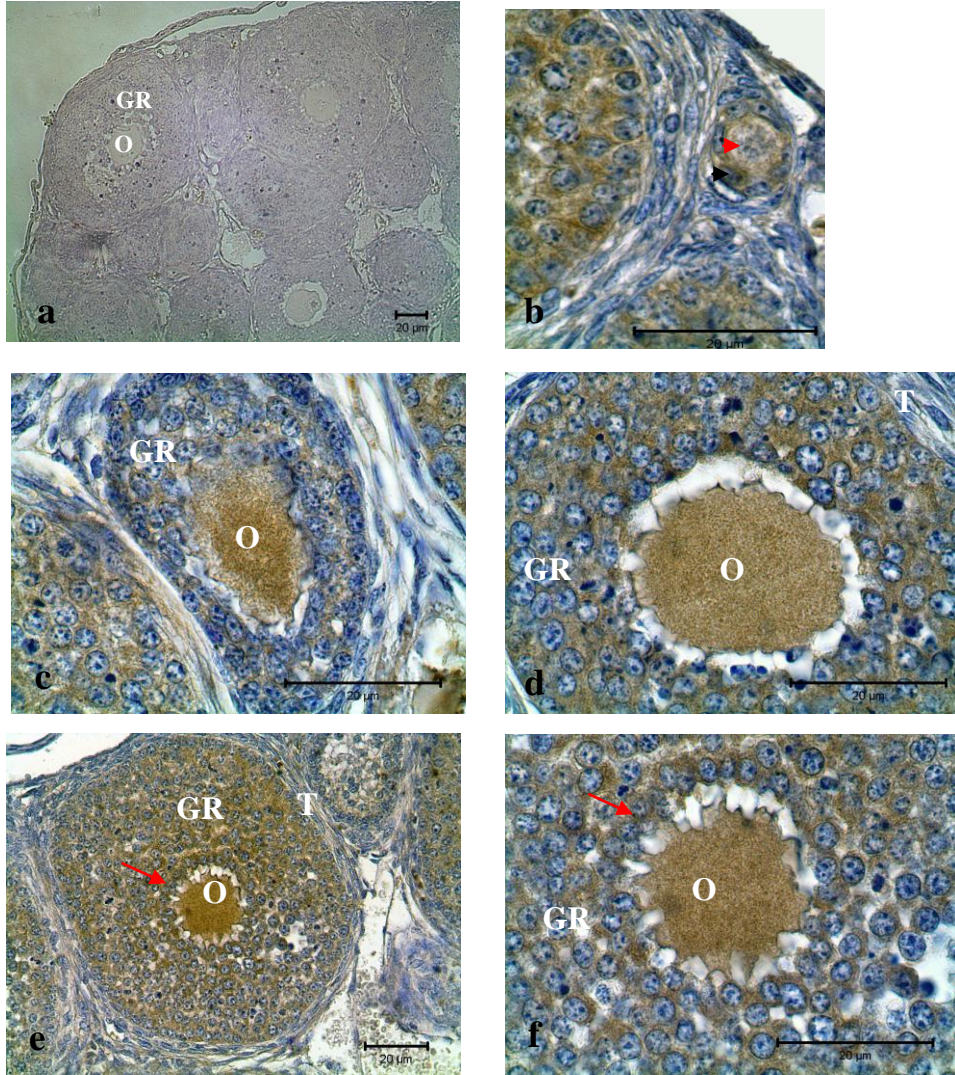
60 günlük fare ovaryumunda foliküler gelişimin farklı aşamalarında bulunan foliküller değerlendirildiğinde; PKC α primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin ovositlerinde daha yoğun immünopozitivite gösterirken, granuloza hücrelerindeki immün reaksiyon daha az yoğundu. Daha büyük sekonder foliküllerde ve antral foliküllerde ise granuloza hücrelerindeki PKC α immunoreaktivitesi ovositlere göre daha yoğundu. Preantral foliküllerde ovositi çevreleyen ve foliküler gelişimin ilerleyen aşamalarında kumulus ovosit kompleksi içerisindeki korona radyata hücrelerini oluşturacak olan granuloza hücrelerinde diğer granuloza hücrelerine göre daha yoğun immün boyanma olduğu gözlemlendi. Korpus luteumun luteal hücrelerinde PKC α immunoreaktivitesi en yoğun şekliyle gözlemlendi.



Şekil 4.1.a-h. 60 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (siyah ok başı) **b:** Primer folikül X100 **c:** Sekonder folikül X100 **d:** Preantral folikül X40 **e:** Antral folikül X40 **f:** Antral folikül X100 **g:** Korpus luteum X100. **h:** Negatif kontrol X20. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), korona radiyata hücrelerine farklılaşacak olan granuloza hücreleri (kırmızı oklar), mayoz bölünmenin metafaz aşamasındaki ovosit nükleusu (siyah ok), teka hücreleri (T), luteal hücreler (L).

4.1.2. 21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

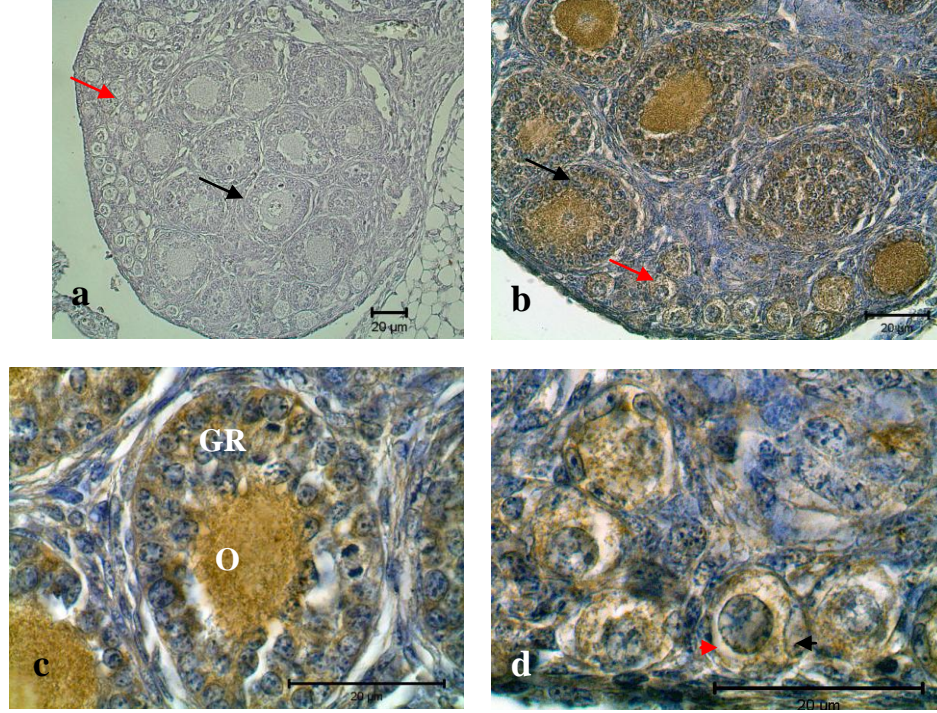
21 günlük fare ovaryumunda PKC α 'nın immunoreaktivitesi foliküler gelişimin farklı aşamalarındaki foliküller açısından değerlendirildiğinde; PKC α immün boyanmasının primordiyal ve primer foliküllerde ovosit ve granuloza hücrelerinde eşit düzeyde olduğu gözlemlendi. Sekonder foliküllerde PKC α 'nın immunopozitif olduğu gözlemlenirken, ovositi çevreleyen ve foliküler gelişimin ilerleyen aşamalarında kumulus ovosit kompleksi içerisindeki korona radyata hücrelerini oluşturacak olan granuloza hücrelerinde diğer granuloza hücrelerine göre daha yoğun immün boyanma olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.2.a-f. 21 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları. **a:** Negatif kontrol 20X. **b:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (siyah ok başı) **c,d:** Primer foliküller X100 **e:** Sekonder folikül X40 **f:** Sekonder folikül X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), korona radyata hücrelerine farklılaşacak olan granuloza hücreleri (kırmızı oklar), teka hücreleri (T).

4.1.3. 7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

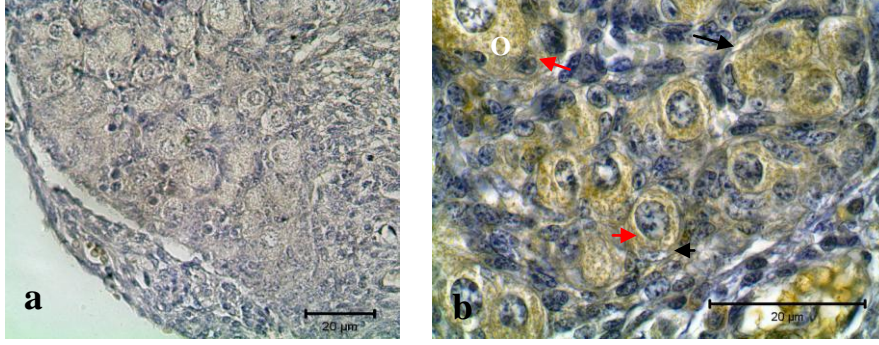
7 günlük fare ovaryumunda bulunan primordiyal ve primer foliküllerde ovosit ve granuloza hücrelerinde PKC α 'nın immünopozitif reaksiyon verdiği görüldü. PKC α 'nın immünoreaktivitesi primer foliküllerde primordiyal foliküllere göre daha yoğundu.



Şekil 4.3. a-d. 7 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanmaları. **a:** Negatif kontrol X20. Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı ok) foliküller **b:** Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı ok) foliküller X40 **c:** Primer foliküller X100 Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR) **d:** Primordiyal foliküller X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (siyah ok başı).

4.1.4. 1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

1 günlük fare ovaryumunda primordiyal foliküllerin ovositlerinde ve germ hücre kistlerinin ovositlerinde PKC α immünopozitif olarak gözlemlenirken granuloza hücrelerinde PKC α immün boyanması görülmedi.

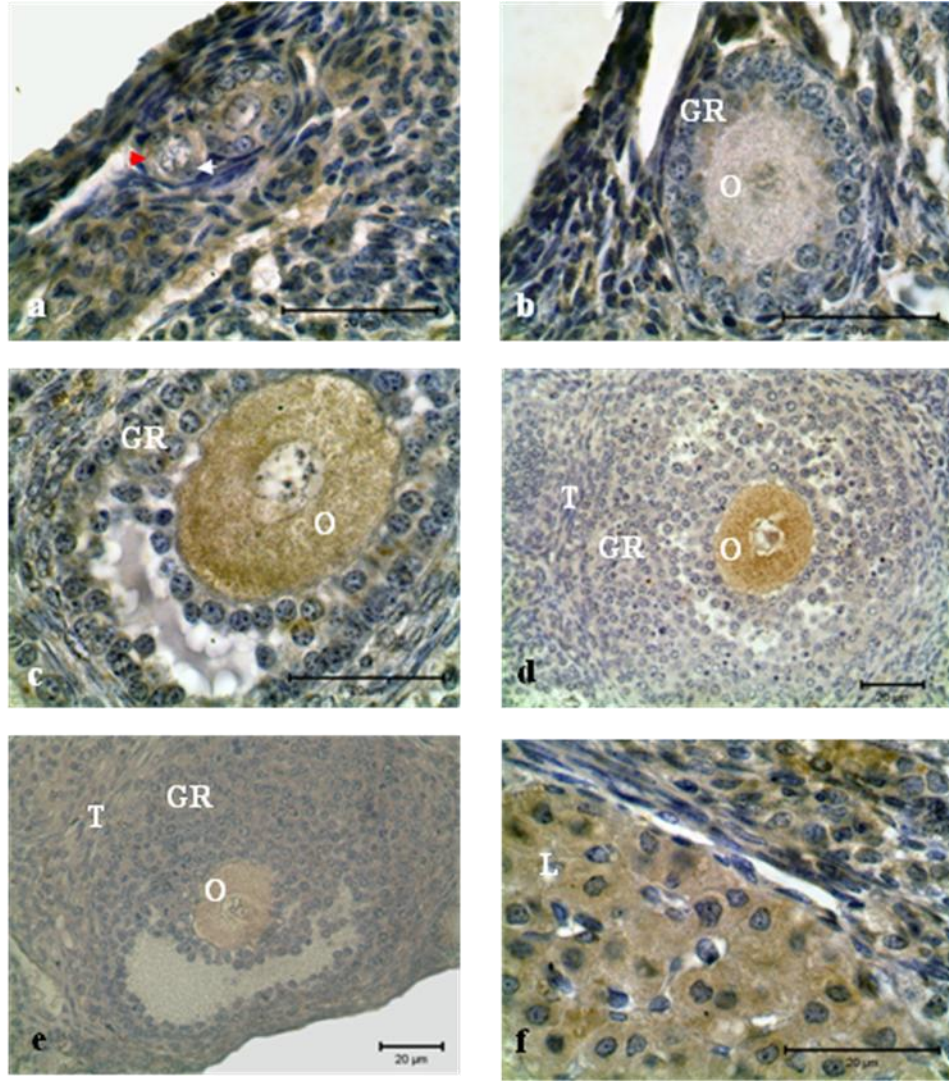


Şekil 4.4. a-b. 1 günlük fare ovaryumunda PKC α immün boyanması. a: Negatif kontrol X40 b: Primordiyal foliküller X100. Germ hücre kisti (siyah ok) primordiyal folikül ovosit (kırmızı ok başı) ve granuloza hücreleri (siyah ok başı), geçiş folikülü ovosit (O) ve granuloza hücreleri (kırmızı ok).

4.2. pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

4.2.1. 60 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

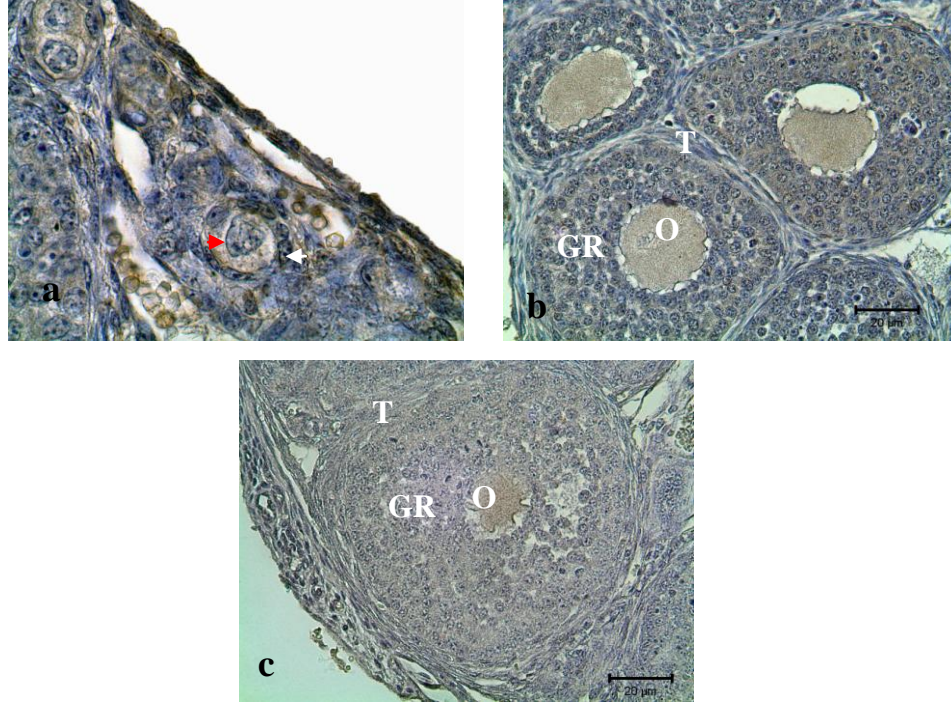
60 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanması sekonder, preantral ve antral foliküllerin ovositlerinde ve korpus luteumun luteal hücrelerinde görüldü. Primordiyal ve primer foliküllerin ovosit ve granuloza hücrelerinde pPKC α immün boyanmasına rastlanmadı.



Şekil 4.5. a-f. 60 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (beyaz ok başı) **b:** Primer folikül X100 **c:** Sekonder folikül X100 **d:** Preantral folikül X40 **e:** Antral folikül X40 **f:** Korpus luteum X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T), luteal hücreler (L).

4.2.2. 21 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

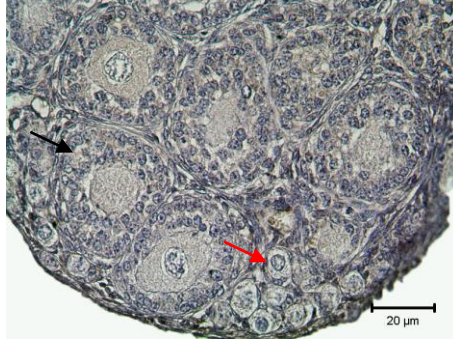
21 günlük fare ovaryumunda pPKC α immünreaktivitesi primordiyal ve primer foliküllerin ovosit ve granuloza hücrelerinde gözlemlenemezken, sekonder foliküllerin ovositlerinin immünpozitif olduğu belirlendi.



Şekil 4.6.a-c. 21 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (beyaz ok başı) **b:** Primer foliküller X100 **d:** Sekonder folikül X40. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR),teka hücreleri (T).

4.2.3. 7 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

7 günlük fare ovaryumunda pPKC α 'nın foliküler gelişimin hiçbir aşamasında granuloza hücrelerinde ya da ovositlerde immünopozitivite göstermediği belirlendi.



Şekil 4.7. 7 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanmaları. Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı ok) foliküller X40.

4.2.4. 1 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC α İmmün Boyanmalarının Sonuçları

1 günlük fare ovaryumunda pPKC α 'nın foliküler gelişimin hiçbir aşamasında granuloza hücrelerinde ya da ovositlerde immünopozitivite göstermediği belirendi.



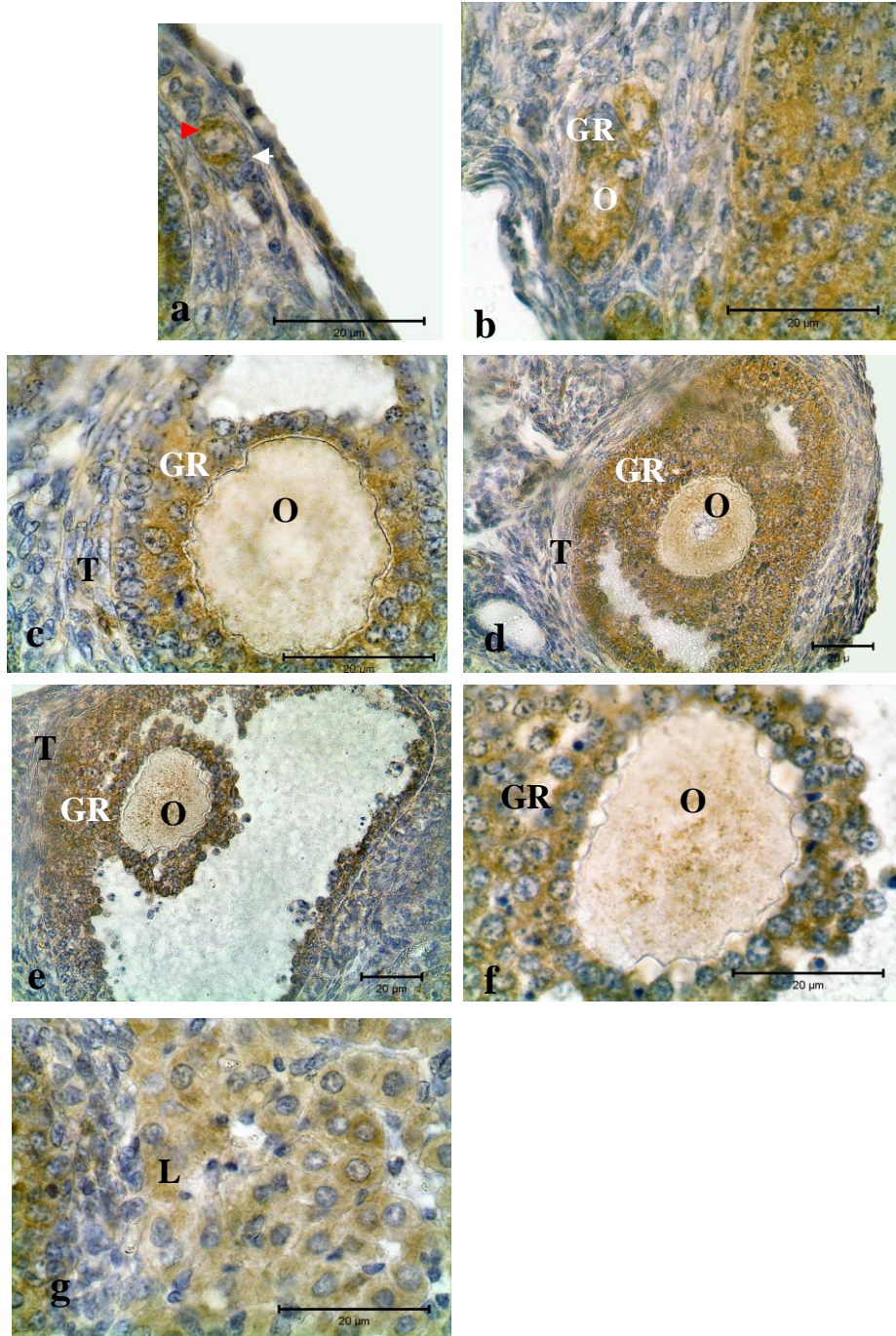
Şekil 4.8. 1 günlük fare ovaryumunda pPKC α immün boyanması. Germ hücre kisti (siyah ok), primordiyal folikül (kırmızı ok).

4.3. PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

İmmunohistokimyasal boyanma sonuçlarına göre PKC δ 'nın farklı günlere ait ovaryumların gelişen foliküllerindeki granuloza hücreleri ve ovositlerde farklı yoğunluklarda immunoreaktivite gösterdiği belirlendi.

4.3.1. 60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

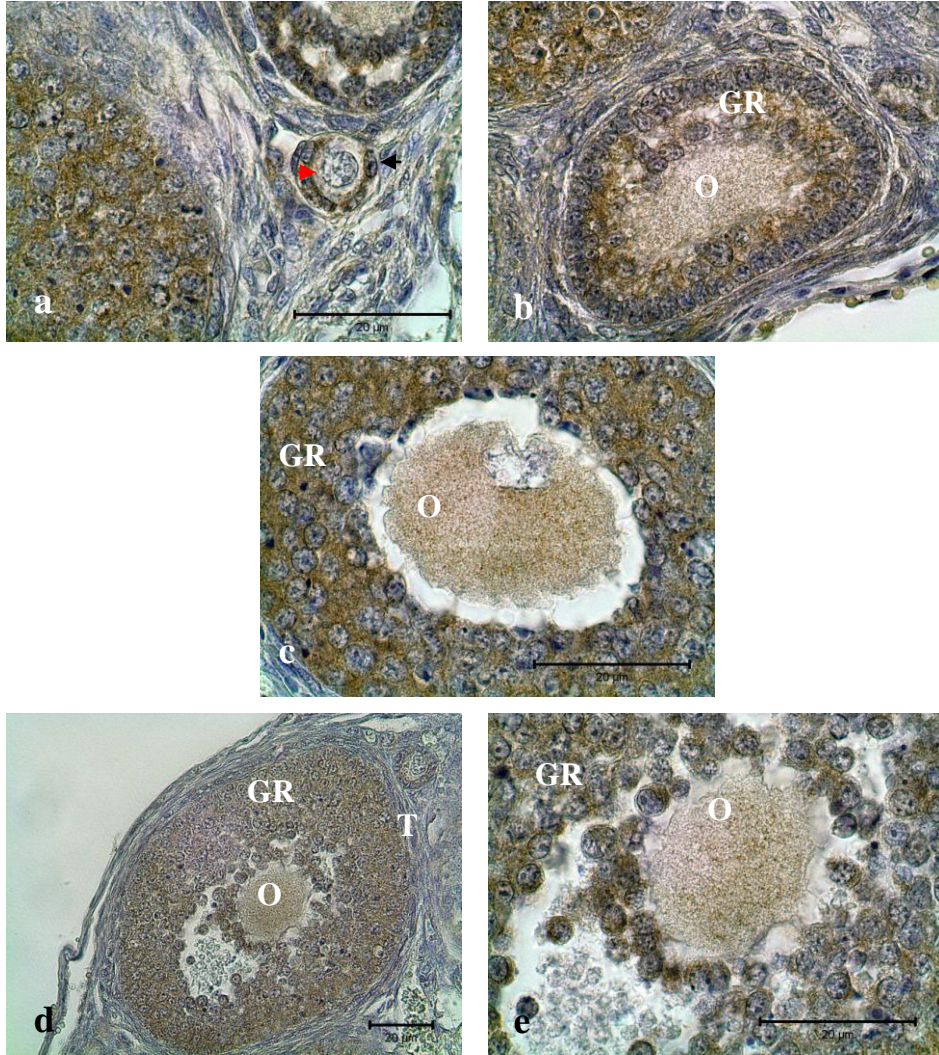
60 günlük fare ovaryumlarında farklı gelişim aşamalarındaki foliküller granuloza hücreleri ve ovositler açısından değerlendirildiğinde; PKC δ 'nın primordiyal foliküllerin granuloza hücrelerinde immünopozitif reaksiyon verdiği, primer ve sekonder foliküllerde ise PKC δ immün boyanmasının ovositlerde çok zayıf, granuloza hücrelerinde ise yoğun olduğu gözlemlendi. Preantral ve antral foliküllerde granuloza hücrelerinde yoğun PKC δ immün boyanması gözlemlenirken, ovositlerdeki boyanmanın çok düşük yoğunlukta olduğu belirlendi. Korpus luteum'un luteal hücrelerinde de PKC δ immünopozitif reaksiyon gösterse de bu reaksiyon PKC α kadar güçlü ve yoğun değildi.



Şekil 4.9. a-g. 60 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (beyaz ok başı) **b:** Primer folikül X100 **c:** Sekonder folikül X100 **d:** Preantral folikül X40 **e:** Antral folikül X40 **f:** Antral folikül X100 **g:** Korpus luteum X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T), luteal hücreler (L).

4.3.2. 21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

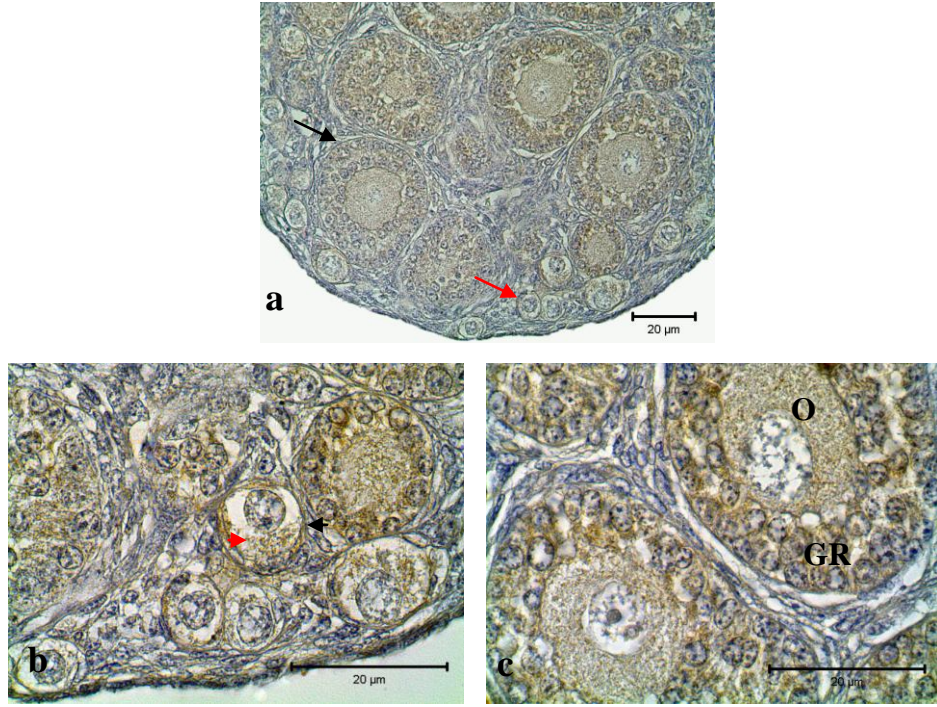
21 günlük fare ovaryumlarında PKC δ immün boyanmalarının foliküler gelişimin farklı evrelerindeki primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin tümü için ovositlerde düşük, fakat granuloza hücrelerinde yüksek yoğunlukta olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.10. a-e. 21 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (siyah ok başı) **b,c:** Primer foliküller X100 **d:** Sekonder folikül X40 **e:** Sekonder folikül X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T).

4.3.3. 7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

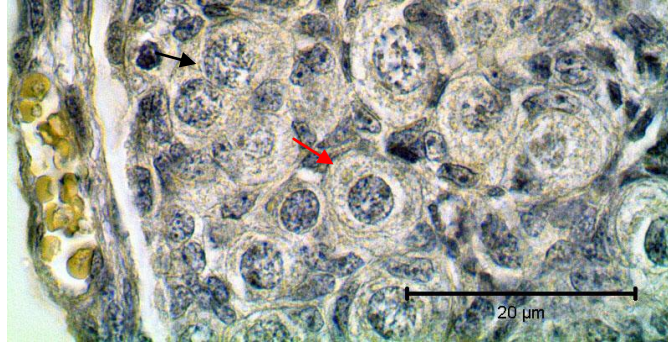
7 günlük fare ovaryumlarında PKC δ 'nın primordiyal foliküllerin ovosit ve granuloza hücrelerindeki oldukça düşük olan immünreaksiyonunun primer foliküllerin granuloza hücrelerinde artış gösterdiği görüldü. Primer foliküllerin ovositlerindeki PKC δ immünoreaktivitesi granuloza hücrelerinden daha düşük seviyede idi.



Şekil 4.11.a-c. 7 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanmaları. **a:** Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı ok) foliküller X40 **b:**, Primordiyal foliküller X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (beyaz ok başı). **c:** Primer foliküller X100 Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR).

4.3.4. 1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC δ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

1 günlük fare ovaryumlarındaki germ hücre kistleri, primordiyal foliküllerin ovositlerinde veya granuloza hücrelerinde PKC δ immün boyanmasına rastlanmadı.



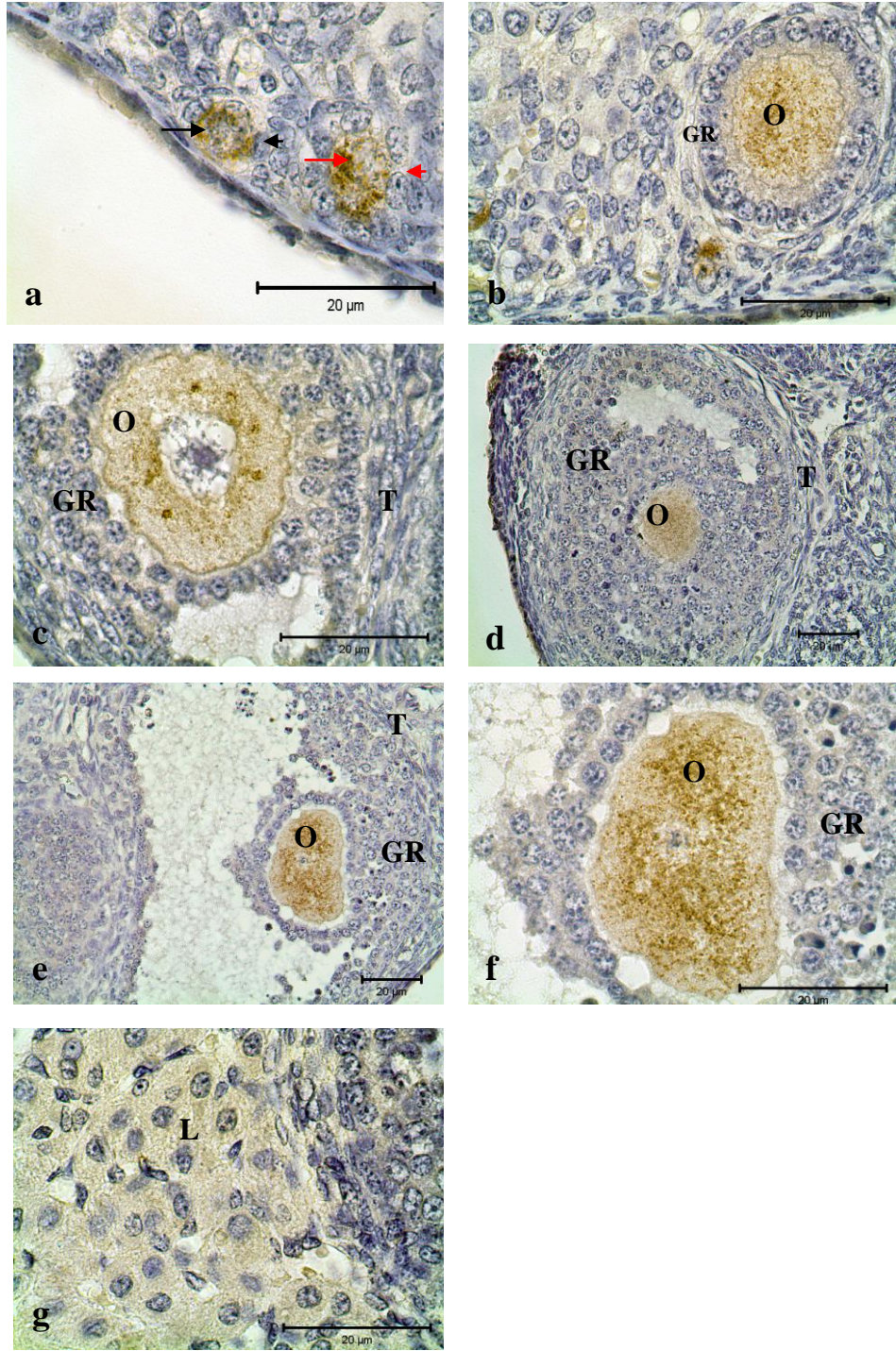
Şekil 4.12. 1 günlük fare ovaryumunda PKC δ immün boyanması. Germ hücre kisti (siyah) primordiyal folikül (kırmızı ok).

4.4. PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarına göre PKC ϵ 'un farklı günlere ait fare ovaryumlarında bulunan foliküler gelişimin farklı aşamasındaki foliküllerin yalnızca ovositlerinde immünopozitif reaksiyon gösterdiği, farklı büyüklüklerdeki foliküllerin granuloza hücrelerinde ve korpus luteumların luteal hücrelerinde herhangi bir immün boyanma olmadığı görüldü.

4.4.1. 60 Günlük Fare Ovaryumlarında PKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

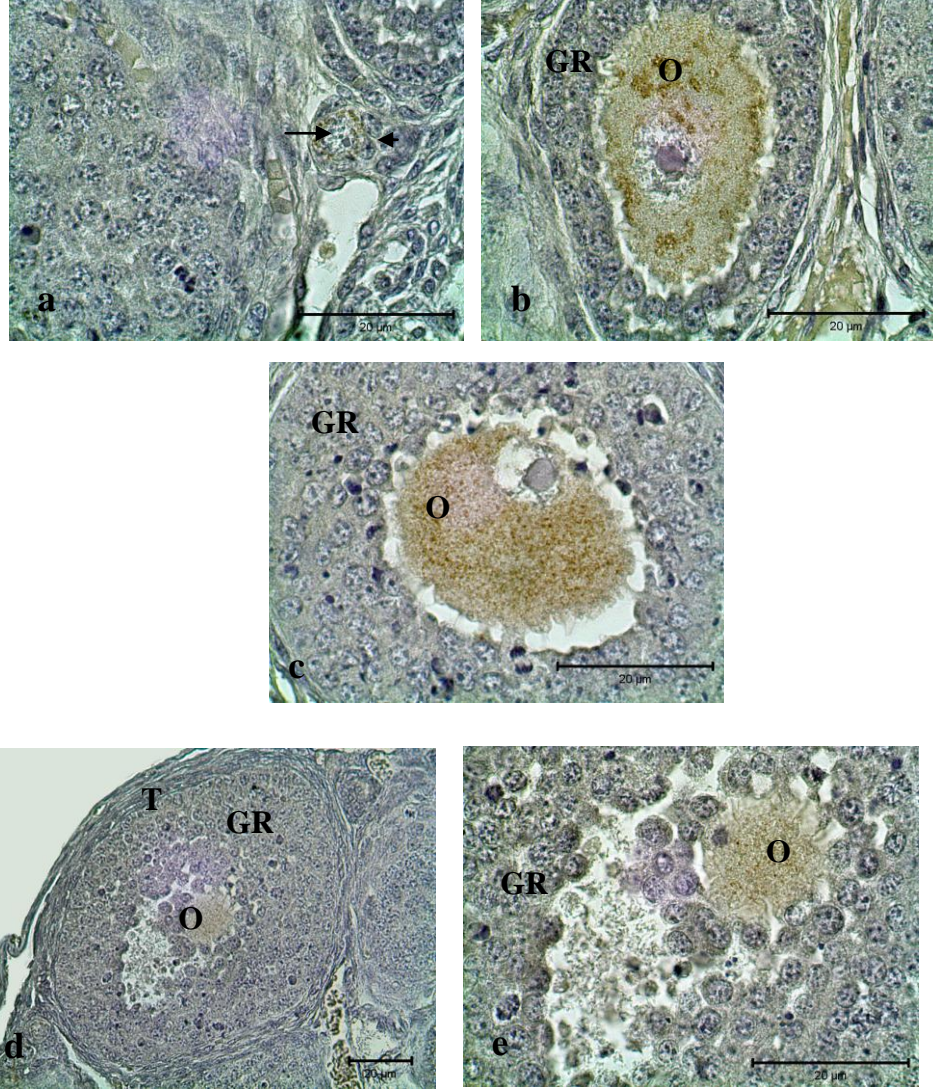
60 günlük fare ovaryumlarındaki PKC ϵ immünoreaktivitesi tüm foliküllerin ovositlerinde gözlemlendi. PKC α ve PKC δ 'dan farklı olarak foliküler gelişimin tüm aşamalarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde ve korpus luteumların luteal hücrelerinde immünopozitif reaksiyon görülmedi.



Şekil 4.13. a-g. 60 günlük fare ovaryumunda PKCε immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül ve primer folikül X100. Primordiyal folikül ovosit (siyah ok), granuloza hücresi (siyah ok başı), primer folikül ovosit (kırmızı ok), granuloza hücresi (kırmızı ok başı) **b:** Primer folikül X100 **c:** Sekonder folikül X100 **d:** Preantral folikül X40 **e:** Antral folikül X40 **f:** Antral folikül X100 **g:** Korpus luteum X100. Oositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T), luteal hücreler (L)

4.4.2. 21 Günlük Fare Ovaryumlarında PKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

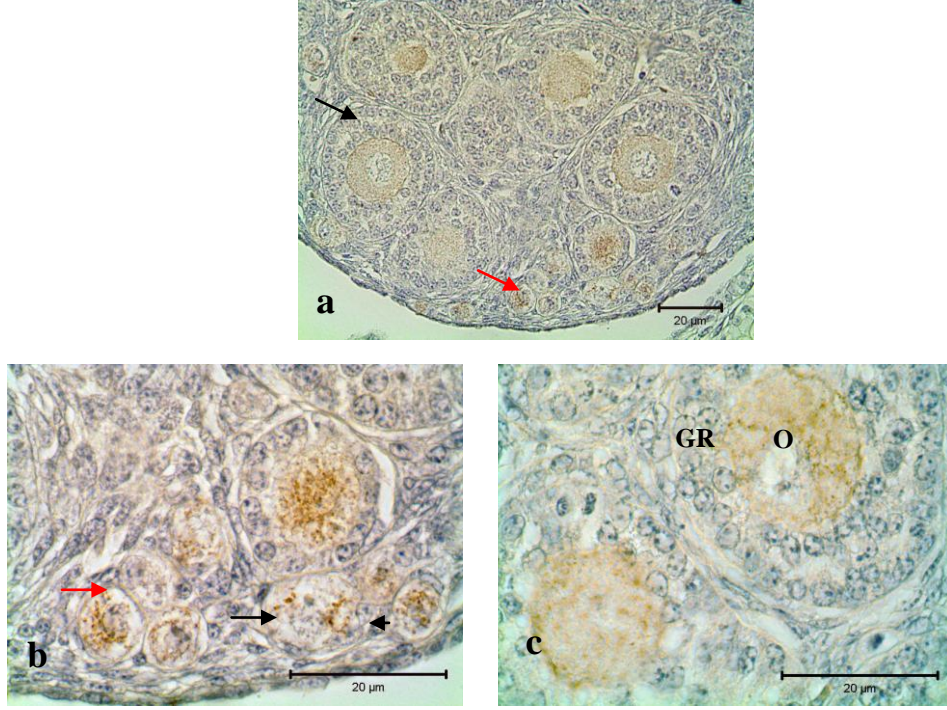
21 günlük fare ovaryumlarında PKCε immünreaktivitesi tüm foliküllerin ovositlerinde gözlemlendi. PKCα ve PKCδ'dan farklı olarak foliküler gelişimin tüm aşamalarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde immünpozitif reaksiyon görülmedi.



Şekil 4.14. a- e. 21 günlük fare ovaryumunda PKCε immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (siyah ok), Granuloza hücresi (siyah ok başı) **b,c:** Primer foliküller X100 **d:** Sekonder folikül X40 **e:** Sekonder folikül X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), (beyaz oklar), teka hücreleri (T).

4.4.3. 7 Günlük Fare Ovaryumlarında PKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

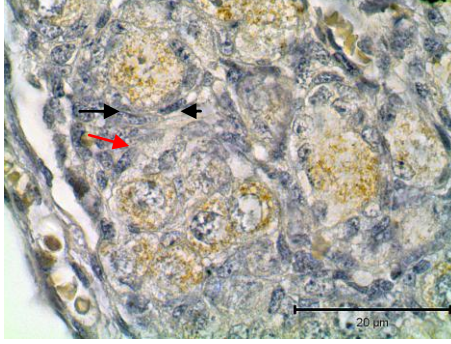
7 günlük fare ovaryumlarında bulunan primordiyal ve primer foliküllerin ovositlerinde PKCε'nun immünopozitif reaksiyon verdiği görüldü. Foliküllerin granuloza hücrelerinde ise PKCε açısından herhangi bir immün boyanmaya rastlanmadı.



4.15.a-c. 7 günlük fare ovaryumunda PKCε immün boyanmaları. **a:** Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı ok) foliküller X40 **b:**Primordiyal foliküller X100. Ovosit (siyah ok), Granuloza hücresi (siyah ok başı), Germ hücre kisti (kırmızı ok) **c:** Primer foliküller X100 Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR).

4.4.4. 1 Günlük Fare Ovaryumlarında PKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

1 günlük fare ovaryumlarında primordiyal foliküllerin ovositlerinde PKCε'un immüno pozitif reaksiyon verdiği görüldü. Foliküllerin granuloza hücrelerinde ise PKCε açısından herhangi bir immün boyanmaya rastlanmadı.

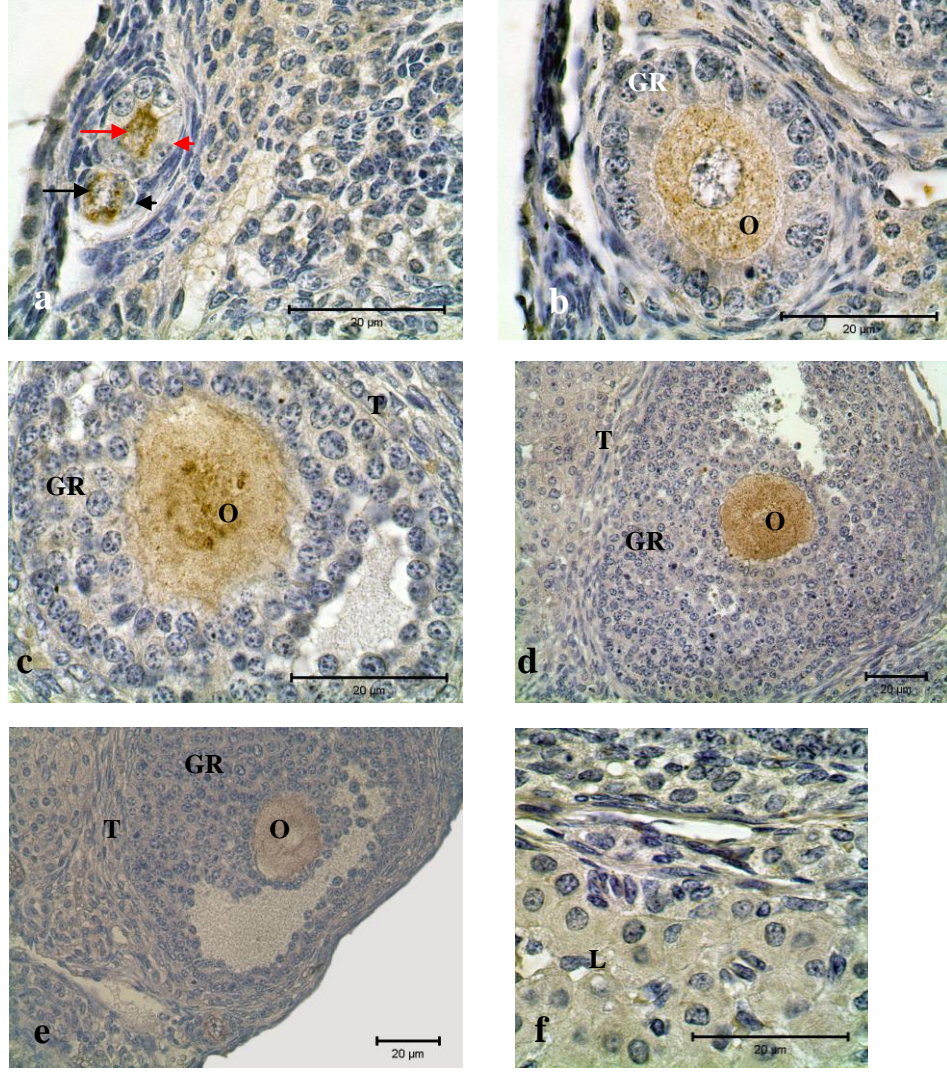


Şekil 4.16. 1 günlük fare ovaryumunda PKCε immün boyanması. Germ hücre kisti (kırmızı ok) primordiyal folikül ovosit (siyah ok) ve granuloza hücreleri (siyah ok başı) X100.

4.5. pPKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

4.5.1. 60 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

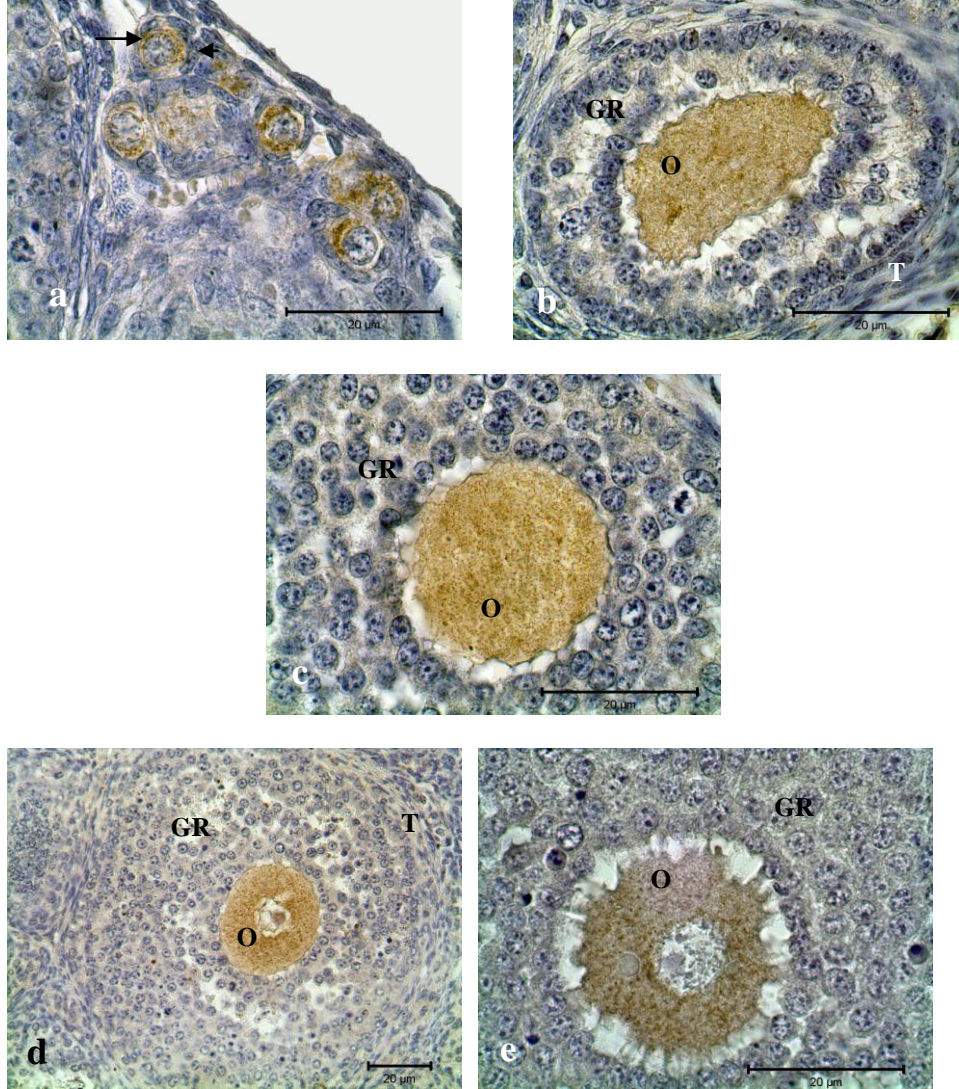
60 günlük fare ovaryumlarındaki pPKCε immünreaktivitesi tüm foliküllerin ovositlerinde gözlemlendi. Foliküler gelişimin hiçbir aşamasındaki folikülün granuloza hücrelerinde ve korpus luteumların luteal hücrelerinde immüno pozitif reaksiyon görülmedi.



Şekil 4.17.a-f. 60 günlük fare ovaryumunda pPKCε immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül ve primer folikül X100. Primordiyal folikül ovosit (siyah ok), granuloza hücresi (siyah ok başı), primer folikül ovosit (kırmızı ok), granuloza hücresi (kırmızı ok başı) **b:** Primer folikül X100 **c:** Sekonder folikül X100 **d:** Preantral folikül X40 **e:** Antral folikül X40 **f:** Korpus luteum X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T), luteal hücreler (L).

4.5.2. 21 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKC ϵ İmmün Boyanmalarının Sonuçları

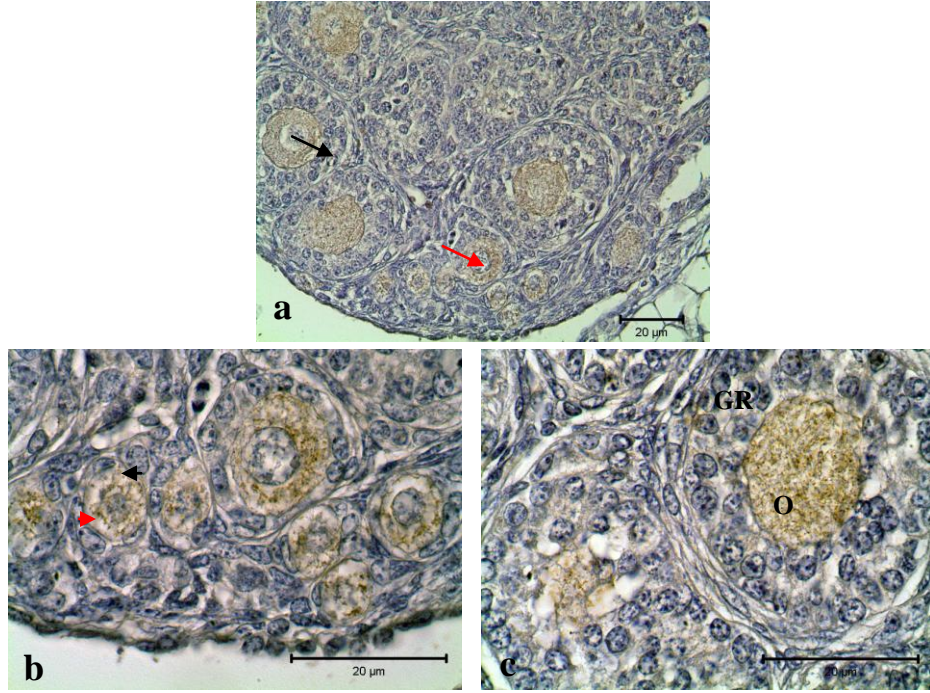
21 günlük fare ovaryumlarında pPKC ϵ immünoaktivitesi tüm foliküllerin ovositlerinde gözlemlendi. Foliküler gelişimin hiçbir aşamasındaki folikülün granuloza hücrelerinde immünopozitif reaksiyon görülmedi.



Şekil 4.18. a-e. 21 günlük fare ovaryumunda pPKC ϵ immün boyanmaları. **a:** Primordiyal folikül X100. Ovosit (siyah ok), Granuloza hücresi (siyah ok başı) **b,c:** Primer foliküller X100 **d:** Sekonder folikül X40 **e:** Sekonder folikül X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR), teka hücreleri (T).

4.5.3. 7 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

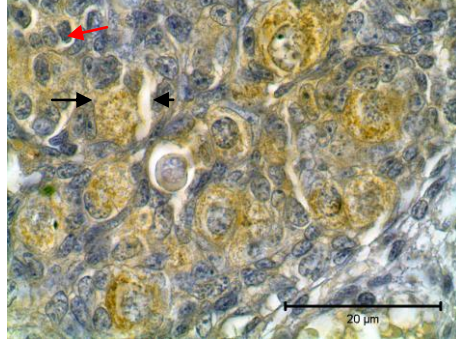
7 günlük fare ovaryumlarında bulunan primordiyal, primer ve multilaminar primer foliküllerin ovositlerinde pPKCε'un immünopozitif reaksiyon verdiği görüldü. Foliküllerin granuloza hücrelerinde ise pPKCε açısından herhangi bir immün boyanmaya rastlanmadı.



Şekil 4.19. a-c. 7 günlük fare ovaryumunda pPKCε immün boyanmaları. **a:** Primer (siyah ok) ve primordiyal (kırmızı) foliküller X40 **b:**Primordiyal foliküller X100. Ovosit (kırmızı ok başı), Granuloza hücresi (siyah ok başı), Germ hücre kisti (beyaz ok) **c:** Primer foliküller X100. Ovositler (O), Granuloza hücreleri (GR).

4.5.4. 1 Günlük Fare Ovaryumlarında pPKCε İmmün Boyanmalarının Sonuçları

1 günlük fare ovaryumlarında primordiyal foliküllerin ovositlerinde pPKCε'un immünopozitif reaksiyon verdiği görüldü. Foliküllerin granuloza hücrelerinde ise pPKCε açısından herhangi bir immün boyanmaya rastlanmadı.



Şekil 4.20. 1 günlük fare ovaryumunda pPKCε immün boyanması. Germ hücre kisti (kırmızı ok) primordiyal folikül ovosit (siyah ok) ve granuloza hücreleri (siyah ok başı) X100.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Protein kinaz C (PKC), cAMP aktivasyonuna gerek duymaksızın membran fosfolipidleri, Ca^{2+} ve DAG ile aktive olarak (1), farklı proteinlerin fonksiyonunu serin ve threonin aminoasitlerinin hidroksil gruplarının fosforilasyonunu gerçekleştirerek kontrol eden bir enzim grubudur (2). PKC'nin, tümör oluşumu, konak savunması, embriyonik gelişim, acının algılanması ve inflamasyon gibi pek çok fizyolojik süreçte görev aldığı belirlenmiştir (1). Ovaryumda ise PKC'nin granuloza hücre proliferasyonu, ovosit maturasyonu, ovulasyon ve luteinizasyonda görevli olduğu düşünülmektedir.

PKC'nin aktive edici faktörlerine göre 3 farklı alt ailede toplanan 11 farklı izotipi vardır. Klasik PKC alt ailesi PKC α , β 1, β 2, γ izotiplerini içerir ve aktivasyonu için fosfolipidlere, DAG'e ve Ca^{2+} 'a ihtiyaç duyar. Novel PKC alt ailesi δ , ϵ , η , θ , μ izotiplerini içerir ve aktivasyonu Ca^{2+} 'dan bağımsız olarak fosfolipidler ve DAG varlığında gerçekleşir. Atipik PKC alt ailesi ise λ , ι , ξ izotiplerini içerir ve aktivasyonu için yalnızca fosfolipidlere gerek duyar (3). Katalitik alt üniteler yüksek ölçüde homoloji gösterir ve diğer kinazların eş alt üniteleriyle de homologtur. Regülatör alt üniteler enzimin aktive edici faktörlerine göre şekillendikleri için daha çok farklılık gösterir (1).

Tablo 5.1. PKC izotiplerinin aminoasit dizilimleri (1).

İzoform	Aktivasyon segmenti	Bağlanma motifi	Hidrofobik motif
hPKC α	GVTRTRFCGTPDYIAPE	T497	RGQPVLTPPQDLVI T638 QSDFEFGSYVNPQ S657
hPKC β 1	GVTTKTFCGTPDYIAPE	T500	RQPVELTPTDKLFI T642 QNEFAGFSYTNPE S661
hPKC β 2	GVTTKTPCGTPDYIAPE	T500	RHPPVLTPPDQEVI T640 QSEFEGFSFVNSE S659
hPKC γ	GTTTRTFCGTPDYIAPE	T514	RAAPAVTPPDRLLV T655 QADFQGFYVNPDP T674
hPKC δ	ESRASTFCGTPDYIAPE	T507	NEKARLTYSOKNLI S645 QSAFAGFSFVNPK S664
hPKC ϵ	GVTTTTFCGTPDYIAPE	T566	REEPVLTLVDEAIV T710 QEEFKGFSYFGED S729
hPKC ζ	GDTTSTFCGTPNYIAPE	T410	SEPVQLTPDDEDAI T560 QSEFEGFEYINPL E579
hPKC η (L)	GVTTATFCGTPDYIAPE	T512	KEEPVLTPIDEGLH T655 QDEFRNFSYVSPE S674
hPKC θ	DAKTNTFCGTPDYIAPE	T538	NEKPRLSPADRALI S676 QNMFRNFSFMNPG S695
hPKC ι (λ)	GDTTSTFCGTPNYIAPE	T403	NEPVQLTPDDDDIV T555 QSEFEGFEYINPL E582

Pekçok farklı PKC izotipinin bulunması ancak her izotip için başlıbaşına substrat spesifitesinin bulunmaması pek çok PKC'nin gerekli olup olmadığı sorusunu akıllara getirir. Ancak immünohistokimyasal analizler belirli izotiplerin farklı hücrelerde ve farklı hücre içi kompartımanlarda yer aldığını ve kendilerine özgü protein

komplekslerine bağlandıklarını ortaya koymuştur. Bu nedenle farklı PKC izotiplerinin özelleşmiş fonksiyonları olabilir. İzotipler arasındaki farklar ilk kez *Xenopus laevis* embriyolarındaki indüktif sinyalizasyon çalışması ile belirlenmiştir. Burada dorsal ektoderm nöral dokuyu geliştirmek için ventral ektodermden daha yeterlidir. PKC α öncelikli olarak dorsal ektodermden eksprese olurken, PKC δ eşit oranda dağılım gösterir. (136). Ventral ektodermden PKC α 'nın aşırı ekspresyonu ventral ektodermin nöral dokuyu oluşturmak için yeterli hale gelmesiyle farkı ortaya koyar (137).

Çalışmamızda yer alan immünohistokimyasal bulgulara göre aktivasyonu için fosfolipid, DAG ve Ca²⁺ a gerek duyan klasik PKC alt ailesinin bir üyesi olan PKC α 'nın 60 ve 21 günlük fare ovaryumlarında ovositin mayotik duraklamanın önem kazandığı primordiyal, primer ve erken sekonder folikül evrelerinde ovositlerde yoğun immün reaksiyon gösterdiği belirlendi. Granuloza hücre proliferasyonunun yavaşladığı ve farklılaşmasının önem kazandığı preantral foliküller ve 60. günde gözlemleyebildiğimiz antral foliküllerde özellikle ovositi çevreleyen ve korona radyata hücrelerine farklılaşacak olan granuloza hücrelerinde yoğun PKC α immünreaktivitesi görüldü. Ayrıca diğer izotiplerden farklı olarak 60. gün ovaryumlarında bulunan korpus luteumlarda PKC α immünoreaktivitesi oldukça yoğun olarak görüldü. Bu bulgular bize PKC α 'nın pubertal ve erişkin dönem fare ovaryumlarında gelişimin erken aşamalarındaki foliküllerde ovositin mayotik olarak sessiz kalmasında ve granuloza hücre proliferasyonunda görev alırken, gelişimin daha ileri aşamalarındaki foliküllerde granuloza hücre farklılaşması, ayrıca korpus luteumun luteal hücrelerinde lutealizasyon veya luteoliz sürecinde görev alabileceğini düşündürdü. 7 günlük fare ovaryumlarında PKC α ekspresyonu multilaminar primer foliküllerde hem ovosit hem de granuloza hücrelerinde artmıştı. Bu bulgulara göre PKC α 'nın prepubertal evrede de granuloza hücre proliferasyonu ve ovositin mayotik duraklamasında görev alıyor olabileceği düşünülebilir. Gonadotropin reseptörlerinin henüz oluşmadığı 1 günlük ovaryumlardaki primordiyal ve primer foliküllerde ise ovositlerde görülen PKC α immünoreaktivitesi granuloza hücrelerinde görülmemektedir. Bu bulgulara göre PKC α granuloza hücrelerindeki görevlerini gerçekleştirmek üzere sentezlenmesi foliküllerde bulunan gonadotropin reseptörlerinin oluşmasına bağlı olabilir. PKC α 'nın fosforile formu olan pPKC α 'nın immünoreaktivitesine bakıldığında, yalnızca 60 ve 21 günlük fare ovaryumlarında, sekonder, preantral ve antral foliküllerin ovositlerinde var olduğu görüldü. Ayrıca 60 günlük ovaryumlarda luteal hücrelerde de immünpozitif olarak gözlenmiştir. Prepubertal evrede, 7 ve 1 günlük ovaryumlarda pPKC α immün boyanmasına rastlanmamıştır. Bu bulgulara göre pubertal ve erişkin dönemde ovositlerde fosforile halde bulunan PKC α ovositin mayotik sessizliğinde görev alabileceği gibi, GDF9 gibi ovosit kaynaklı bir faktör olarak granuloza hücre proliferasyonunu indükleyerek veya granuloza hücre apoptozunu engelleyerek granuloza hücrelerinin yaşamalarını ve çoğalmalarını sağlayabilir.

İmmünohistokimyasal bulgularımıza göre Ca^{2+} a gerek duymaksızın fosfolipidler ve DAG ile aktive olan novel PKC alt ailesinde bulunan PKC δ immünreaktivitesi gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde yoğunlaşmıştır. Erişkin ve pubertal evrede primordiyal, primer ve sekonder foliküllerin, erişkin dönemde antral foliküllerin granuloza hücrelerinde immünopozitif reaksiyon gösterirken ovositlerde bu reaksiyon oldukça zayıftır. Ayrıca erişkin ovaryumlarında korpus luteumun luteal hücrelerinde de immün boyanma görülmüştür. Ancak bu boyanma PKC α kadar yoğun değildir. Prepubertal evrede de granuloza hücrelerinde ovositlere göre daha yoğun bir immünoreaktivite gözlenir. Bu immünoreaktivite özellikle primer foliküllerde artmıştır. Gonadotropin reseptörlerinin oluşmadığı 1 günlük ovaryumlarda ise PKC δ 'ya ait immün boyanmaya rastlanmamıştır. Bu bulgular bize PKC δ 'nın gelişen foliküllerde granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve hayatlarını devam ettirmeleri için önemli rolleri olabileceğini ve bu rolleri gerçekleştirmesinin gonadotropin reseptörlerine, dolayısıyla gonadotropinler ile ilişkili sinyal yollarına bağlı olabileceğini göstermiştir.

İmmünohistokimyasal bulgularımıza göre Ca^{2+} a gerek duymaksızın fosfolipidler ve DAG ile aktive olan novel PKC alt ailesinde bulunan PKC ϵ ve fosforile formu olan pPKC ϵ erişkin, pubertal ve prepubertal evrede foliküler gelişimin tüm aşamalarında foliküllerin yalnızca ovositlerinde immünopozitif reaksiyon göstermiştir. Granuloza hücrelerinde veya korpus luteumun luteal hücrelerinde herhangi bir immün boyanmaya rastlanmamıştır. Bu bulgulara göre PKC ϵ foliküllerde yalnızca ovositlerden sentezlenir ve aktivasyonu için gonadotropin reseptörlerine gerek duymaz. Ayrıca bu bulgular bize PKC ϵ 'un fare ovaryumlarında luteinizasyon ya da luteolizde görev almadığını düşündürür.

Bugüne kadar PKC ile ilgili farklı memeli türlerinin ovaryumlarında yapılan çalışmalar PKC'nin ovaryumlarda granuloza hücre proliferasyonu, folikül gelişimi ve ovulasyon, ovosit maturasyonu, luteinizasyon ve luteolizde görevli olduğunu göstermiştir. Ancak amino asit dizilimindeki farklılıklardan dolayı (Bkz. Tablo 1) regülatör bölgeleri ve aktivatörleri açısından farklılıklar gösteren ve dolayısıyla fonksiyonel farklılıklar bulundurabilecek olan farklı PKC izotiplerinin spesifik rolleri tam olarak tanımlanamamıştır.

PKC'nin granuloza hücre proliferasyonu ve luteoliz üzerindeki etkisini MAPK sinyal yolağı ile birlikte gerçekleştirdiği düşünülmektedir (6,8). Ancak ovaryumda farklı hücelere spesifik olarak hangi PKC izotiplerinin MAPK sinyal yolağı tarafından aktive edildiğini kapsamlı olarak analiz eden çalışmalara rastlanamamıştır.

PKC'nin granuloza hücre proliferasyonundaki rollerini anlamak üzere simian virus (SV) 40 enfeksiyonu ile ölümsüz bir domuz granuloza hücre hattı (PGV) oluşturulmuş ve granuloza hücre proliferasyonunun düzenlenmesi için gerekli potansiyel mekanizmaları araştırmak için kullanılmıştır. PGV hücre sayısı sera ve PKC

stimulatörleri ile artarken PKC inhibitörleri ile azalmıştır. PKC stimulatörleri PGV hücre sayısını anlamlı şekilde artırırken PKC inhibitörleri, hem sera hem de PKC stimulatörleri tarafından uyarılmış olan PGV hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır.

PIP2'yi (fosfatidil inositol bifosfat) DAG ve IP3'e (inositol trifosfat) katalize eden PLC (Fosfolipaz C) inhibitörü PGV hücre proliferasyonunu anlamlı şekilde azaltmıştır. Ayrıca, fosfatidik asidi DAG'a dönüştüren fosfatidik asit fosfataz (PAP)'ın inhibitörü de PGV hücre sayısının anlamlı şekilde düşmesine neden olmuştur. PMA, hem PLC hem de PAP inhibitörleri tarafından indirgenen PGV hücre sayısını eski haline getirir (138).

Bu durumda granuloza hücre proliferasyonundan aktivasyonu için fosfolipidlerin yanında DAG ve IP3 yardımıyla salınımı gerçekleşen Ca^{2+} 'a ihtiyaç duyan klasik PKC'lerden PKC α veya Ca^{2+} 'a ihtiyaç duymaksızın aktivasyonu için DAG gerektiren novel izotiplerden PKC δ sorumlu olabilir.

MAPK aktivitesi kültüre edilen primer granuloza hücrelerinde FSH uyarımının ardından 5-10 dk sonra görülmektedir. FSH uyarımının ardından granuloza hücrelerindeki MAPK aktivitesi gösterilmiştir ve FSH'ın granuloza hücre proliferasyonunu başlattığı cAMP ile yönlendirilen yolların MAPK aktivasyonunu içerdiği belirtilirken, FSH'ın cAMP bağımsız büyümeyi destekleyici etkisinin kalsiyum iyonu ve MAPK bağımlı yollar tarafından aktive edildiği kanıtlanmıştır (139).

FSH'ın indüklediği, cAMP'den bağımsız ancak Ca^{2+} ve MAPK bağımlı bu yollar PKC'yi içeriyor olabilir. Ancak hangi PKC izotiplerinin bu sinyal yollarına dahil olduğunun belirlenmesi için fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

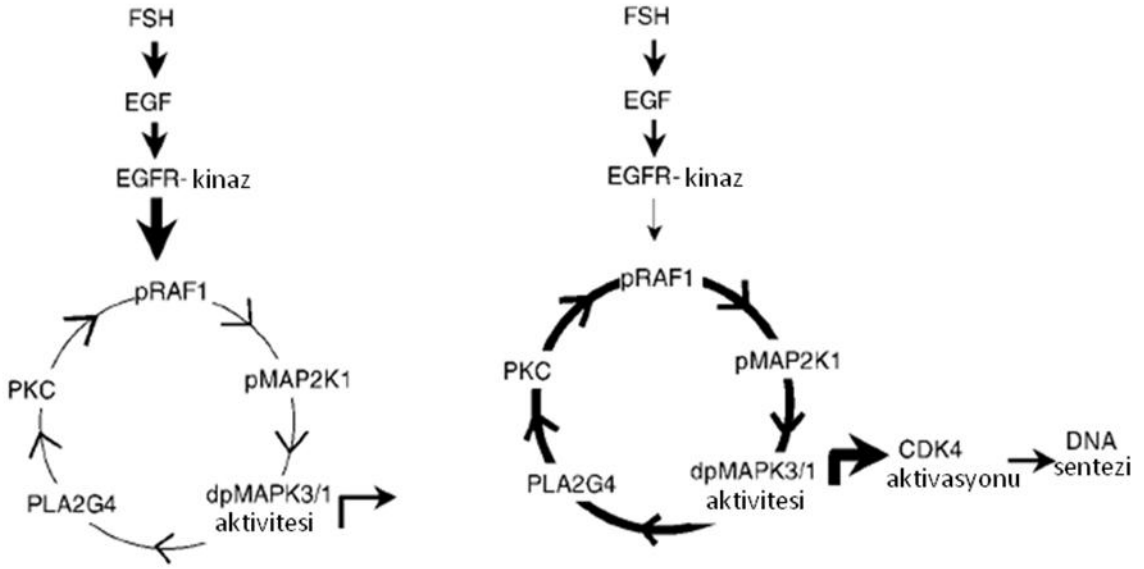
PKC'nin granuloza hücre canlılığına olan etkisi rat granuloza hücrelerinde araştırılmış ve PKC δ 'nın bFGF (temel fibroblast büyüme faktörü)'nin antiapoptotik aktivitesinde yer aldığı belirlenmiştir. bFGF ve reseptörleri gelişimin tüm evrelerindeki sağlıklı foliküllerin granuloza hücreleri (GC) tarafından eksprese edilse (140), ve bFGF granuloza hücre apoptozunu önlese de (141), bFGF'nin hangi mekanizma ile GC hücre canlılığını koruduğu bilinmemektedir. FGF reseptörünün ligand aktivasyonunun reseptör dimerizasyonunu, tirozin kinaz aktivitesini ve otofosforilasyonu indüklediği bilinmektedir (142). Ayrıca çalışmalar bir tirozin kinaz inhibitörü olan genistein'in GC apoptozunu önleyen bFGF aktivitesini bloke ettiğini göstermiştir (143). Hedef sinyalizasyonun hem akut hem de genomik faaliyetleri içerdiği düşünülmektedir (141). Her ne kadar genomik faaliyetler önemli olsa da akut faaliyetler de kritiktir, çünkü bFGF'nin sadece 30 sn.lik yokluğu kendiliğinden ölümsüz hale gelen granuloza hücrelerinin (SIGC) apoptoza gitmesi ile sonuçlanır (10). bFGF'nin bu akut faaliyetlerinin hücre içi serbest kalsiyum seviyelerindeki değişiklikler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (10). Bu görüş SIGC'nin apoptoza gitmesinden önce Ca^{2+} 'da olan artış

(10) ve bFGF'nin Ca^{2+} 'daki bu artışı önlemesi (10) ile ilgili gözleme dayanmaktadır. bFGF'nin SIGC üzerindeki antiapoptotik etkisi PKC aktivatörü olarak kullanılan 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) tarafından taklit edilir ve genel PKC inhibitörleri tarafından azaltılır. Ayrıca, PKC inhibitörleri bFGF'nin normal bazal Ca^{2+} seviyesini koruma yeteneğini ortadan kaldırırlar (10). TPA tarafından aktive edilebilen PKC δ (11, 12), SIGC tarafından eksprese edilen tek PKC izotipi olduğundan (8) PKC δ 'nın bFGF aktivitesinin düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir.

CDK4 aktivitesi, reseptör tirozin kinaz ve MAPK3/1 (ERK2/1 olarak da bilinen mitojen ile aktive olan protein kinaz 3/1) aracılığı ile fonksiyonunu gerçekleştiren epidermal büyüme faktörü (EGF) tarafından uyarılır (144). EGF de FSH gibi kültürdeki domuz granuloza hücrelerinde MAPK3/1'i fosforile eder (145). Bu faktörler hamster preantral foliküllerinde de MAPK3/1 ve CDK4'ü fosforile ederler (146). Ayrıca, EGF-antiserum veya EGF deoksioligonukleotidleri FSH veya siklik-30, 50-AMP tarafından uyarılan DNA sentezini preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde bloke edebilir (147). Bulgular gösterir ki hormonlar ve bazı büyüme faktörleri MAPK 3/1'i PKC aracılığıyla aktive edebilirler.

Çalışmalar sonucunda gösterilmiştir ki FSH, hamster preantral foliküllerinde granuloza hücrelerindeki DNA sentezini EGF-EGFR kinaz, PLA2G4 (fosfolipaz A2G4), PKC, ve MAPK3/1 sinyali arasındaki etkileşimi kapsayan yeni bir mekanizma ile düzenler. Bu etkileşim, CDK4 aktivasyonu için gerekli olan, kendi kendine devam eden bir MAPK3/1 aktivasyon döngüsü oluşturur (6)

FSH hamster preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde EGF (148) ve EGFR (149)'nin sentezini uyarır ve EGF de FSH'm foliküler DNA sentezindeki etkisine aracılık eder (147). PKC inhibitörleri aracılığıyla, FSH veya EGF ile indüklenen MAPK3/1 fosforilasyonu ve DNA sentezinin bozulması MAPK3/1'in devam eden aktivasyonunun PKC aktivitesine gerek duyduğunu ortaya koyar. PLA2G4 inhibitörü ile FSH veya EGF ile uyarılan DNA sentezinin azalması PLA2G4'ün de döngünün integral bir bileşeni olduğunu kanıtlar (6).



Şekil 5.1. PKC- MAPK Aktivasyon Döngüsü (6).

PKC'nin MAPK sinyal yolağını aktive ederek DNA sentezinde görev aldığı açıkça ortaya kalsa da, PKC'nin izotip spesifik inhibitörleri kullanılmadığından bu süreçte hangi PKC izotiplerinin görevli olabileceği saptanamamıştır. PLA2G4'ün aktivasyon döngüsünde PKC'yi aktive etmek üzere yer alması, PI'nın DAG IP3'e katalize olması, dolayısıyla klasik ve novel PKC alt ailelerinin aktivasyon kriterlerini tamamladığı dikkate alındığında, bu süreçte en azından atipik PKC'lerin yer almadıkları, yer alsalar bile PLA2G4 aktivasyonuna gerek duymayacakları düşünülebilir. Bu nedenle PKC'nin DNA sentezi üzerindeki rolü ve MAPK gibi sinyal yollarıyla olan ilişkisi sinyal yolağında aktivasyon için PKC'yi hedef alan ve PKC'nin aktivasyon hedefinde olan proteinlerin yanında PKC izotiplerinin aktivatörleri de düşünülerek PKC'nin izotip spesifik inhibitörleri veya aktivatörleri kullanılmalıdır.

Gelişimleri boyunca ovositler yüksek oranda transkripsiyonel aktivite gösterirler ve gelişimin daha sonraki evreleri için gerekli olan maternal mRNA transkriptlerini depolarlar. Ancak, tamamen büyümüş olan ovositler preovulatör evreye ulaştıklarında, mayozu tamamlamadan hemen önce global transkripsiyonel aktivite baskılanır (150, 151). Maternal genom mayotik maturasyon boyunca ve embriyogenezin ilk basamaklarında, embriyonik genom aktivasyonu sırasında transkripsiyonel olarak sessiz kalır (152). Bu nedenle mayozun tamamlanması öncelikli olarak sitoplazmik sinyal transdüksiyon mekanizmaları ve translasyonu yapılmış olan maternal mesaj depoları ile düzenlenir. cAMP'yi (153) ve MAPK'ı (154) içerenler gibi spesifik sinyal kaskadları ovosit maturasyonunda önemli bir rol oynar ancak PKC sinyal yolağı da dahil diğer temel sinyal yollarının fonksiyonları ile ilgili oldukça az bilgi vardır. Profaz I

duraklamasındaki ovositlerde PKC'nin doğrudan aktivasyonu mayozun kendiliğinden tamamlanmasını metafaz I'e (MI) geçişi önleyerek engellerken (155), germinal vesikül yıkımının (GVB) hemen ardından PKC agonistlerinin uygulanması birinci polar cisimciğin atılmasını geciktirir (156). MII'de PKC aktivasyonu ise tam bir ovosit aktivasyonu ve hücre siklusunun tamamlanması gerçekleşemese de (157) *Xenopus*, fare, hamster ve fare ovositlerinin interfaza girmesini destekler (158). PKC'ye verilen cevap, spesifik isoformların çeşidine, ekspresyon şekline, substratlarına ve aktive olmuş PKC reseptörleri (RACK) olarak bilinen ve proteinleri belirli hücrel kompartimanlara yönlendiren demirleyici proteinlerine bağlıdır (159). Ayrıca farklı PKCler muhtemelen kendilerini özgü fonksiyonları düzenlemektedirler. Bu nedenle, bu kinaz ailesinin mayotik maturasyondaki ve ovosit aktivasyonundaki rollerinin açık bir şekilde tanımlanabilmesi için her bir izoformun ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekmektedir.

PKC- δ maturasyon boyunca sitoplazmada yoğun bir dağılım göstermektedir ve birinci mayoz bölünme sırasında iğ ipliği ile yakın bir konumda bulunmaktadır. Bunun aksine, MII sırasında, PKC δ , tamamının değil ancak bazı olgun ovositlerin kromozomları ile ilişkili olarak ve benekli bir şekilde gözlemlenirken, ovosit aktivasyonu sonrasında proteinin defosforile olduğu ve erken evredeki embriyoların nukleuslarında biriktiği görülmüştür. Bu, PKC- δ 'nın ovositlerde ve erken evredeki embriyolarda postranslasyonel olarak modifiye olduğunun ve hücre içinde hücre siklusuna bağlı olarak dağılım gösterdiğini kanıtlar (13).

FSH, c-fos mRNA ekspresyonunu PKC bağımlı mekanizmalar ile indükler. LH ve FSH uygulaması yapılan granuloza hücrelerinde kaydadeğer bir PKC aktivasyonu sağlamasa da, foliküler gelişim ve ovulasyon PKC aktivasyonuna bağlıdır ve PKC sinyali granuloza hücrelerinin farklılaşma aşamalarına bağlı olarak farklı etki yaratır. Çalışmalar primer granuloza hücre kültüründe *Prkg2* 'nin maksimal indüksiyonunun PKC'nin genel PKC aktivatörü olan PMA ile aktivasyonu gerektirdiğini ortaya koymuştur. PKC'nin akut aktivasyonunun domuz granuloza hücrelerinde *Cyp11a1* (SCC)'yı indüklediği gösterilmiştir (7).

SCC promoter aktivasyonunun hem ERK hem de JNK aktivasyonuna bağlı olduğu, buna karşın *Prkg2* indüksiyonunun ERK'ya bağlı olduğu ancak JNK'ya bağlı olmadığı gösterilmiştir. (7). Dolayısıyla PKC farklı ovulatör genler üzerindeki etkisini farklı hedef proteinleri aktive ederek gerçekleştirmektedir. PKC'nin farklı genler üzerindeki indükleyici etkisini farklı hedef proteinler aracılığıyla gerçekleştiriyor olması farklı PKC izotiplerinin farklı hedef proteinlerin aktivasyonundan sorumlu olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. PKC izotiplerine özgü hedef proteinlerin açıkça belirlenebilmesi için PKC izotiplerinin farklı hücrelerde değişiklik gösteren lokalizasyonları dikkate alınarak izotiplere yönelik fonksiyonel çalışmalar ortaya konmalıdır.

PGF2 α vücutta farklı fizyolojik fonksiyonlara sahiptir. Çok sayıda memelide PGF2 α 'nın korpus luteum'un gebelik oluşmadığında ortadan kalkmasını (luteoliz) ve böylece östrus siklusunu tamamlanmasını tetiklediği düşünülmektedir. PGF2 α reseptörleri (FP reseptörleri) luteal hücre membranlarında mevcuttur (160). PGF2 α ile indüklenen luteolizin fosfolipaz C/DAG ve IP3/Ca²⁺-PKC sinyal sisteminin ligand reseptör aktivasyonu ile başlatıldığı düşünülmektedir (161). Bu konsept, PKC aktivatörü PMA'nın PGF2 α ile indüklenen luteolizi in vivo'da (162), PGF2 α fonksiyonlarını in vitroda (163) kısmen taklit edebileceğini gösteren birçok veri ile desteklenmektedir. MAPK sinyal kaskadı NIH-3T3 hücrelerinde PGF2 α ile indüklenen ve muhtemelen p21Ras-GTP kompleksinin oluşması ve bunun ardından MAPK kinaz (MEK1) ve p42mapk aktivasyonu ile başlatılan mitogenez ile ilişkilendirilmektedir.

PGF2 α 'nın korpus luteum üzerindeki etkisinin plazma membranında fosfolipaz C'nin uyarılması ile başladığı ve inositol trifosfat ile indüklenen hücre içi Ca²⁺ mobilizasyonu ve PKC'nin DAG ile aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Mevcut veriler PGF2 α 'nın korpus luteumda Raf/MEK1/p42mapk/p44mapk sinyal kaskadını aktive ettiğini açıkça göstermektedir. Bu sitoplazmik protein kinaz yolağının PGF2 α tarafından aktive edilmesi, PGF2 α reseptörü tarafından başlatılan sinyalizasyon olayları ile nuklear transkripsiyonel aktivite arasında bir bağlantı kurmak için bir mekanizma sağlayabilir.

Mevcut veriler PKC'nin korpus luteumda Raf aktivasyonu sağladığını göstermektedir. PGF2 α ve PKC'nin farmakolojik bir aktivatörü olan PMA'ya cevaben Raf-1 ve B-Raf'ın benzer şekillerde aktive olduklarını gözlemlenmiştir. Ayrıca, [32P]ortofosfat işaretli sağlıklı hücrelerde hem PGF2 α hem de PMA, Raf-1 fosforilasyonunu artırmıştır (8). Dolayısıyla PGF2 α indüksiyonuyla aktive olan PKC'nin Raf-1 fosforilasyonunu gerçekleştirdiği belirlense de hangi PKC izotipinin Raf-1 fosforilasyonundan sorumlu olduğu açığa kavuşmamıştır.

Sonuç olarak PKC'nin PKC α , PKC δ , PKC ϵ izotiplerinin lokalizasyonları ovaryan foliküllerdeki granuloza hücreleri ve ovositlerde, korpus luteumun luteal hücrelerinde değişiklik göstermektedir. Prepubertal dönemde PKC ϵ ekspresyon yoğunluğunda değişiklik görülmezken PKC α ve PKC δ izotiplerinin ekspresyonlarının azalması PKC'nin belirli izotiplerinin ekspresyonunun hormon bağımlı mekanizmalar ile gerçekleştiğini göstermektedir.

Ovaryumda özgün şekilde yerleşim gösteren PKC izotiplerinin fonksiyonlarının tam olarak anlaşılabilmesi, bu fonksiyonların gerçekleştirilmesi için gerekli olan sinyal yolları ve bu sinyal yollarında PKC izotiplerini aktive eden ve PKC izotiplerinin fosforilasyon hedefi olan sinyal yolağı elemanlarının belirlenebilmesi için PKC izotiplerine özgü aktivatör veya inhibitörlerin kullanıldığı fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

KAYNAKLAR

- 1- Gomperts BD.,Kramer IM.,Tatham ER.(2004). Signal transduction. Academic Press. 4, 160-190
- 2- Mellor H, Parker PJ. (1998).The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 5, 281–292.
- 3- Newton AC. (1995). Protein kinase C. Structure, function and regulation. *J Biol Chem.* 270, 28495–8
- 4- Horn F,Bilezikjian LM,Perrin MH,Bosma NM,Windle JJ,Huber KS,Blount AL,Hille B,Vale W,Mellon PL. (1991). Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol. Endocrinol.* 5(3), 347-55
- 5- Strulovici B.,Tahilramani R.,Nestor JJ Jr. (1987). Phosphorylation substrates for protein kinase C in intact pituitary cells: characterization of a receptor-mediated event using novel gonadotropin-releasing hormone analogues. *Biochemistry.* 22;26(19):6005-11
- 6- Yang,P, Roy,S.K. (2006). A Novel Mechanism of FSH Regulation of DNA Synthesis in the Granulosa Cells of Hamster Preantral Follicles: Involvement of a Protein Kinase C-Mediated MAP Kinase 3/1 Self-Activation Loop. *Biology of reproduction.* 75,149–157
- 7- Sriraman,V.,Modi S.R., Bodenbug, Y., Denner,L.A., Urban,R.J. (2008). Identification of ERK and JNK as signaling mediators on protein kinase C activation in cultured granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 294, 52–60
- 8- Chen DB, Westfall SD, Fong HW. (1998). Prostaglandin F_{2α} Stimulates the Raf/MEK1/Mitogen- Activated Protein Kinase Signalling Cascade in Bovine Luteal Cells. *Endocrinology.* 139, 3876-3885
- 9- Sen,A.,Wright,M.,Inskeep,K.E.,Flores,J.A. (2006). Participation of specific PKC isozymes in the inhibitory effect of ET-1 on progesterone accumulation in cells isolated from earlyand mid-phase corpora lutea. *Domestic Animal Endocrinology* 3, 284–299
- 10-Lynch K, Fernandez G, Pappalardo A, Peluso JJ.(2000). Basic fibroblast growth factor inhibits apoptosis of spontaneously immortalized granulosa cells by regulating intracellular free calcium levels through a protein kinase Cdelta-dependent pathway. *Endocrinology.* 141, 4209–4217
- 11- Kampfer S, Uberall F, Giselbrecht S, Hellbert K, Baier G, Grunicke HH. (1998) Characterization of PKC isozyme specific functions in cellular signaling. *Adv Enzyme Regul* 38, 35–48
- 12-Kanashiro CA, Khalil RA. (1998). Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 25, 974–985
- 13- Viveiros MM, O' Brien M., Wigglesworth K., Eppig JJ. (2003). Characterization of Protein Kinase C-d in Mouse Oocytes Throughout Meiotic

- Maturation and Following Egg Activation. (2003). *Biol. of Reproduction*. 69, 1494–1499
- 14-P.J. O'Shaughnessy, D. McLelland, M.W. McBride. (1997). Regulation of Luteinizing Hormone-Receptor and Follicle-Stimulating Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Levels during Development in the Neonatal Mouse Ovary. *Biol. of Reproduction*. 57, 602-608
 - 15-Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO (2010). *Basic Histology*. McGraw Hill. 22, 170-200
 - 16-Medbroadcast Clinical Team (1996). Mediresource Inc.
 - 17-Fox GF. (2007). *The Mouse in biomedical research*. Academic Press. 3, 25-53
 - 18-Sadler TW, Langman J (2006). *Langman's Medical Embryology*. Lippincott Williams&Wilkins. 1, 3-31
 - 19-Pangas, S.A., Choi, Y., Ballow, D.J., Zhao, Y., Westphal, H., Matzuk, M.M., and Rajkovic, A. (2006). Oogenesis requires germ cell-specific transcriptional regulators *Sohlh1* and *Lhx8*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8090-8095.
 - 20-Pangas, S.A., and Rajkovic, A. (2006). Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Hum Reprod Update* 12, 65-76. (physio repro)
 - 21-Panning, B., and Jaenisch, R. (1996). DNA hypomethylation can activate *Xist* expression and silence X-linked genes. *Genes Dev* 10, 1991-2002.
 - 22-Pepling, M.E., and Spradling, A.C. (1998). Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* 125, 3323-3328.
 - 23-Pesce, M., and De Felici, M. (1995). Purification of mouse primordial germ cells by MiniMACS magnetic separation system. *Dev Biol* 170, 722-725.
 - 24-Rajkovic, A., Pangas, S.A., Ballow, D., Suzumori, N., and Matzuk, M.M. (2004). *NOBOX* deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 305, 1157-1159.
 - 25-Razin, A. (1998). CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J* 17, 4905-4908.
 - 26-Saffman, E.E., and Lasko, P. (1999). Germline development in vertebrates and invertebrates. *Cell Mol Life Sci* 55, 1141-1163.
 - 27-Saitou, M., Barton, S.C., and Surani, M.A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418, 293-300. (moore embriy)
 - 28-Packer, A. I., Hsu, Y. C., Besmer, P., and Bachvarova, R. F. (1994). The ligand of the c-kit receptor promotes oocyte growth. *Dev. Biol.* 161, 194–205.
 - 29-Nilsson, E., Parrott, J. A., and Skinner, M. K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 175, 123–130.
 - 30-Gougeon, A., and Busso, D. (2000). Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 163, 33–41.
 - 31-Horie, K., Fujita, J., Takakura, K., Kanzaki, H., Suginami, H., Iwai, M., Nakayama, H., and Mori, T. (1993). The expression of c-kit protein in human adult and fetal tissues. *Hum. Reprod.* 8, 1955–1962.
 - 32-Leung CK, Adashi EY. (2004). *The Ovary*. Academic Press. 3, 45-52

- 33- Knight PG and Glistler C. (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*. 132, 191–206
- 34- Amsterdam, A., and Rotmensch, S. (1987). Structurefunction relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr. Rev.* 8, 309–337.
- 35- Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G. C., and Kidder, G. M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin-43. *Biol. Reprod.* 60, 1263–1270.
- 36- Wassarman, P. M., Liu, C., and Litscher, E. S. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: Some new pieces of an old puzzle. *J. Cell Sci.* 109, 2001–2004.37- 50
- 37- Irving-Rodgers, H. F., and Rodgers, R. J. (2000). Ultrastructure of the basal lamina of bovine ovarian follicles and its relationship to the membrana granulosa. *J. Reprod. Fertil.* 118, 221–228.
- 38- Hirshfield, A. N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.* 124, 43–101.
- 39- Gougeon, A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17, 121–155.
- 40- Anderson, E., and Albertini, D. F. (1976). Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J. Cell. Biol.* 71, 680–686.
- 41- Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., and Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin-37. *Nature* 385, 525–528.
- 42- Koering, M. J. (1983). Preantral follicle development during the menstrual cycle in the *Macaca mulatta* ovary. *Am. J. Anat.* 166, 429–443.
- 43- Wassarman, P. M. (1988). The mammalian ovum. In *Physiology of Reproduction*, Vol. 1, eds. E. Knobil, J. D. Neill, L.L. Ewing, C. L. Markert, G. S. Greenwald, and D.W. Pfaff, 69–102. New York : Raven Press.
- 44- Klinger, F. G., and De Felici, M. (2002). In vitro development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: Stagespecific regulation by stem cell factor and granulosa cells. *Dev. Biol.* 244, 85–95.
- 45- Benjamin Cummings. (2001). An imprint of Addison Wesley Longman, Inc.
- 46- Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., and Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during ovarian early folliculogenesis. *Nature* 383, 531–535.
- 47- Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M., and Albertini, D. F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9—deficient mice. *Dev. Biol.* 204, 373–384.
- 48- Gougeon, A., and Lefèvre, B. (1983). Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J. Reprod. Fertil.* 69, 497–502.
- 49- McNatty, K. P., Hillier, S. G., Van den Boogaard, A. M. J., Trimpos-Kemper, T. C. M., Reichert, L. E. , and Van Hall, E.V. (1983). Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 56, 1022–1031.
- 50- Pache, T. D., Wladimiroff, J. W., de Jong, F. H., Hop, W. C., and Fauser, B. C. J. M. (1990). Growth patterns of nondominant ovarian follicles during the normal menstrual cycle. *Fertil. Steril.* 54, 638–642

- 51-**Gougeon, A. (1984). Influence of cyclic variations in gonadotrophin and steroid hormones on follicular growth in the human ovary. In *Clinical Pathology of the Endocrine Ovary*, eds. J. de Brux and J. P. Gautray, 63–72. Lancaster, UK: MTP Press.
- 52-**Gougeon, A., and Testart, J. (1990). Influence of human menopausal gonadotropin on the recruitment of human ovarian follicles. *Fertil. Steril.* 54, 848–852.
- 53-**Mason, H. D., Margara, R., Winston, R. M. L., Beard, R.W., Reed, M. J., and Franks, S. (1990). Inhibition of oestradiol production by epidermal growth factor in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *Clin. Endocrinol.* 33, 511–517.
- 54-**Nahum, R.,Thong, K. J., and Hillier, S. G. (1995). Metabolic regulation of androgen production by human thecal cells in vitro. *Hum. Reprod.* 10, 75–81.
- 55-**Kobayashi, M., Nakano, R., and Ooshima, A. (1990). Immunocytochemical localization of pituitary gonadotrophins and gonadal steroids confirms the “two-cell, two gonadotrophins” hypothesis of steroidogenesis in the human ovary. *J. Endocrinol.* 126, 483–488.
- 56-**Soules, M. R., Steiner, R. A., Clifton, D. K., Cohen, N. L., Aksel, S., and Bremner,W. J. (1984). Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58, 378–383.
- 57-**Solovyeva, E. V., Hayashi, M., Margi, K., Barkats, C., Klein,C., Amsterdam, A., Hsueh, A. J., and Tsafiriri, A. (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates rat thecainterstitial cell androgen biosynthesis. *Biol. Reprod.* 63, 1214–1218.
- 58-**Goodman, A. L. and Hodgen, G. S. (1983). The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent. Prog. Horm.Res.* 39, 1–73.
- 59-**Macklon,N. S., and Fauser,B. C. M. J. (1998). Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas* 30, 181–188.
- 60-**Gougeon,A. (1982). Rate of follicular growth in the human ovary. In *Follicular Maturation and Ovulation*, eds. R. Rolland, E. V. Van Hall, S. G. Hillier, K. P. McNatty, and J. Schoemaker, 155–163. Amsterdam: Excerpta Medica.
- 61-**McNatty, K. P. (1982). Ovarian follicular development from the onset of luteal regression in humans and sheep. In *Follicular Maturation and Ovulation*, eds. R. Rolland, E.V.Van Hall, S. G. Hillier, K. P. McNatty, and J. Schoemaker, 1–18. Amsterdam: Excerpta Medica.
- 62-**Yong, E. L., Baird, D. T., Yates, R., Reichert, Jr., L. E., and Hillier, S.G. (1992). Hormonal regulation of the growth and steroidogenic function of human granulosa cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 842–849.
- 63-**Poretsky, L., Cataldo, N. A., Rosenwaks, Z., and Giudice, L. C. (1999). The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr. Rev.* 20, 535–582.
- 64-**Hillier, S. G., Yong, E. L., Illingworth, P. J., Baird, D. T., Schwall, R. H., and Mason, A. J. (1991). Effect of recombinant inhibin on androgen synthesis in cultured human thecal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75, R1–R6.
- 65-**Roberts, V. J., Barth, S., El-Roeiy, A., and Yen, S. S. C. (1993). Expression of inhibin/activin subunits and follis tatin messenger ribonucleic acids and proteins

- in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77, 1402–1410.
- 66-** Hernandez, E. R., Hurwitz, A., Vera, A., Pellicer, A., Adashi, E. Y., LeRoith, D., and Roberts, Jr., C. T. (1992). Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 74, 419–425.
- 67-** Hillier, S. G. (1985). Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. *Oxford Rev. Reprod. Biol.* 7, 168–222.
- 68-** Filicori, M., Cognigni, G. E., Taraborrelli, S., Spettoli, D., Ciampaglia, W., Tabarelli De Fatis, C., Pocognoli, P., Cantelli, B., and Boschi, S. (2001). Luteinizing hormone activity in menotropins optimizes folliculogenesis and treatment in controlled ovarian stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 337–343
- 69-** Zeleznik, A. J., Schuler, H. M., and Reichert, Jr., L. E. (1981). Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: Role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology* 109, 356–362.
- 70-** Geva, E., and Jaffe, R. (2004). Ovarian angiogenesis. In *The Ovary*, 2d ed., eds P. K. C. Leung and E. Y. Adashi. Boston: Elsevier.
- 71-** Gougeon, A. (1977). Steroid 3 β -ol-dehydrogenase activity in the largest healthy and atretic follicles in the human ovary during the menstrual cycle. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 17, 1087–1094.
- 72-** Chaffkin, L. M., Luciano, A. A., and Peluso J. J. (1992). Progesterone as an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell proliferation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 75, 1404–1408.
- 73-** Elvin, J. A., Clark, A. T., Wang, P., Wolfman, N. M., and Matzuk, M. M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol. Endocrinol.* 13, 1035–1048.
- 74-** Knobil E, Neill JD. (2006). Knobil and Neil’s Physiology of Reproduction. *Gulf Professional.* 10, 383-425.
- 75-** Partners in Reproduction. (2009). Hormonal regulation of reproduction.
- 76-** Ginsburg, M., Snow, M. H. L., and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110, 521–528.
- 77-** McLaren, A., and Southee, D. (1997). Entry of mouse embryonic germ cells into meiosis. *Dev. Biol.* 187, 107–113.
- 78-** Peters, H. (1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. *Acta. Endocrinol.* 62, 98–116.
- 79-** Sorensen, R. A., and Wassarman, P. M. (1976). Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev. Biol.* 50, 531–536.
- 80-** Hunter, R. H. F., Cook, B., and Baker, T. G. (1976). Dissociation of response to injected gonadotropin between the Graafian follicle and oocyte in pigs. *Nature.* 260, 156–158.
- 81-** Pincus, G., and Enzmann, E. V. (1935). The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. *J. Exp. Med.* 62, 655–675.

- 82-**Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature* 208, 349–351.
- 83-**Eppig, J. J., Kozak, L. P., Eicher, E. M., and Stevens, L. C. (1977). Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division. *Nature* 269, 517–518.
- 84-**Murray, A. (1995). Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell* 81, 149–152.
- 85-**Masui, Y., and Markert, C. L. (1971). Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177, 129–146.
- 86-**Verlhac, M.-H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., and Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120, 1017–1025
- 87-**Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M. E., and Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Dev. Biol.* 232, 400–413.
- 88-**Coleman, T. R., and Dunphy, W. G. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6, 877–882.
- 89-**Masui, Y. (1991). The role of “cytostatic factor (CSF)” in the control of oocyte cell cycles: A summary of 20 years of study. *Dev. Growth Differ.* 33, 543–551.
- 90-**Colledge, W. H., Carlton, M. B. L., Udy, G. B., and Evans, M. J. (1994). Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 65–68.
- 91-**Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L., and Maller, J. L. (1999). Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90Rsk. *Science* 286, 1365–1367.
- 92-**Palmer, A., Gavin, A. C., and Nebreda, A. R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* 17, 5037–5047.
- 93-**Lefebvre, C., Terret, M. E., Djiane, A., Rassinier, P., Maro, B., and Verlhac, M. H. (2002). Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J. Cell. Biol.* 157, 603–613.
- 94-**Kono, T., Obata, Y., Yoshimizu, T., Nakahara, T., and Carroll, J. (1996). Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nat. Genet.* 13, 91–94.
- 95-**Bao, S., Obata, Y., Ono, Y., Futatsumata, N., Niimura, S., and Kono, T. (2002). Nuclear competence for maturation and pronuclear formation in mouse oocytes. *Hum. Reprod.* 17, 1311–1316
- 96-**Tsafiriri, A., Channing, C. P., Pomerantz, S. H., and Lindner, H. R. (1977). Inhibition of maturation of isolated rat oocytes by porcine follicular fluid. *J. Endocrinol.* 75, 285–291.
- 97-**Downs, S. M., Coleman, D. L., Ward-Bailey, P. F., and Eppig, J. J. (1985). Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 82, 454–458.

- 98-** Eppig, J. J. (1991). Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biol. Reprod.* 45, 824–830.
- 99-** Cho, W. K., Stern, S., and Biggers, J. D. (1974). Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *J. Exp. Zool.* 187, 383–386.
- 100-** Homa, S. T. (1988). Effect of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. *J. Exp. Zool.* 248, 222–231
- 101-** Bornslaeger, E. A., and Schultz, R. M. (1985). Adenylate cyclase activity in zona-free mouse oocytes. *Exp. Cell Res.* 156, 277–281.
- 102-** Bornslaeger, E. A., Mattei, P. M., and Schultz, R. M. (1986). Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. *Dev. Biol.* 114, 453–462.
- 103-** Tsafiriri, A., Chun, S. Y., Zhang, R., Hsueh, A. J. W., and Conti, M. (1996). Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: Studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev. Biol.* 178, 393–402.
- 104-** Bornslaeger, E. A., Mattei, P. M., and Schultz, R. M. (1988). Protein phosphorylation in meiotically competent and incompetent mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 1, 19–25.
- 105-** Duckworth, B. C., Weaver, J. S., and Ruderman, J. V. (2002). G2 arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16794–16799.
- 106-** Downs, S. M. (1994). Induction of meiotic maturation in vivo in the mouse by IMP dehydrogenase inhibitors: Effects on the developmental capacity of ova. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 293–302.
- 107-** Downs, S. M., and Eppig, J. J. (1987). Induction of mouse oocyte maturation in vivo by perturbants of purine metabolism. *Biol. Reprod.* 36, 431–437.
- 108-** Garty, N. B., Galiani, D., Aharonheim, A., Ho, Y.-K., Phillips, D. M., and Salomon, Y. (1988). G-proteins in mammalian gametes: An immunocytochemical study. *J. Cell Sci.* 91, 21–31.
- 109-** Downs, S. M., Buccione, R., and Eppig, J. J. (1992). Modulation of meiotic arrest in mouse oocytes by guanyl nucleotides and modifiers of G-proteins. *J. Exp. Zool.* 262, 391–404
- 110-** Cheng-Guang Liang, You-Qiang Su, Heng-Yu Fan, Heide Schatten, and Qing-Yuan Sun. (2007). Mechanisms Regulating Oocyte Meiotic Resumption: Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology* 21(9):2037–2055
- 111-** Tsafiriri, A., Lindner, H. R., Zor, U., and Lamprecht, S. A. (1972). In vitro induction of meiotic division in follicle-enclosed rat oocytes by LH, cAMP, and prostaglandin. *E. J. Reprod. Fert.* 31, 39–50
- 112-** Dekel, N. (1988). Spatial relationship of follicular cells in the control of meiosis. In *Progress in Clinical and Biological Research. Meiotic Inhibition: Molecular Control of Meiosis*, eds., F. P. Haseltine, and N. L. First, 87–101. New York: Alan R. Liss, Inc.

- 113-** Downs, S. M., Daniel, S. A. J., and Eppig, J. J. (1988). Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: Evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. *J. Exp. Zool.* 245, 86–96.
- 114-** Grudzinskas JG, Yovich JL. (1995). *Gametes- The Oocyte*. Cambridge Uni. Press. 3, 54-95
- 115-** Austin Community College. (2008). *Reproductive System*.
- 116-** Huang Z and Wells D. (2010). The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 715–725
- 117-** Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* 241, 42-52
- 118-** Klumpp S, Krieglstein J. (2002). Phosphorylation and dephosphorylation of histidine residues in proteins. *Eur J Biochem.* 269, 1067-1071
- 119-** Gomperts BD., Kramer IM., Tatham ER: *Signal transduction 4*: 190, 2004
- 120-** Woodget, Robert. (1993). *Protein kinases*. Elsevier 2, 3-87,
- 121-** Smith CM, Shindyalov IN, Veretnik S et al. (1997). The protein kinase resource. *Trends Biochem Sci.* 22, 444-446
- 122-** Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J et al. (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 13603-13610
- 123-** Dekker LV. (2002). *Protein kinase C*. Academic Press. 2, 2-20
- 124-** Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, M., Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. (1997). I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J. Biol. Chem.* 252, 7603-9
- 125-** Kishimoto, A., Takai, Y., Mori T., Kikkawa U., Nishizuka, Y. (1980). Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol Chem.* 255, 2273-6
- 126-** Parker PJ, Parkinson SJ. (2001). AGC protein kinase phosphorylation and protein kinase C. *Biochem Soc Trans.* 29, 860-863.
- 127-** Coussens L, Parker PJ, Rhee L et al. (1986). Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science* 233, 859-866
- 128-** Dekker LV and Parker PJ. (1994). Protein kinase C-a question of specificity. *Trends Biochem Sci.* 19, 73-77
- 129-** Dekker LV. (2002). *Protein kinase C*. Academic Press. 2, 15-42
- 130-** Alberts B. (2008). *Molecular biology of the cell*. Garland Science. 5, 831-907
- 131-** Newton, A.C. Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997;9:161-7
- 132-** Dutil, E.M., Newton, A.C. (2000). Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *J. Biol. Chem.* 275, 10697-70
- 133-** Le Good, J.A., Ziegler, W.H., Parekh, D.B. et al. (2000). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science.* 281, 2042-5

- 134-** Parekh, D.B., Ziegler, W., Parker, P.J. (2000). Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.*; 19:496-503.
- 135-** Peluso JJ, Pappalardo A and Fernandez G. (2001). Basic fibroblast growth factor maintains calcium homeostasis and granulosa cell viability by stimulating calcium efflux via a PKC(δ) dependent pathway. *Endocrinology*. 142, 4203-4211
- 136-** Otte AP, Kramer IM, Durston AJ. (1991). Protein kinase C and regulation of the local competence of *Xenopus* ectoderm. *Science*. 251, 570 – 573.
- 137-** Otte AP, Moon RT. (1992). Protein kinase C isozymes have distinct roles in neural induction and competence in *Xenopus*. *Cell*. 68, 1021 – 1029.
- 138-** Ming-Te Lin. (2004). Establishment of an immortalized porcine granulosa cell line (PGV) and the study on the potential mechanisms of PGV cell proliferation. *54 (1): 29–38*
- 139-** Babu PS, Jiang L, Sairam AM, Touyz RM, Sairam MR. (1999). Structural features and expression of an alternatively spliced growth factor type I receptor for follitropin signaling in the developing ovary. *Mol Cell Biol Res Commun*. 2, 21–27
- 140-** Ojeda SR, Dissen GA (1994). Developmental regulation of the ovary via growth factor tyrosine kinase receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 5, 317–323
- 141-** Aharoni D, Dantes A, Oren M, Amsterdam A. (1995). cAMP-mediated signals as determinants for apoptosis in primary granulosa cells. *Exp Cell Res* 218, 271–282
- 142-** Szebenyi G, Fallon JF (1999) Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors. *Int Rev Cytol* 185, 45–106
- 143-** Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Hsueh AJ (1992). Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6, 1942–1950
- 144-** Blenis J. (1993). Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 5889–5892.
- 145-** Cameron MR, Foster JS, Bukovsky A, Wimalasena J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinases by gonadotropins and cyclic adenosine 5'-monophosphates in porcine granulosa cells. *Biol Reprod*. 55, 111–119.
- 146-** Yang P, Roy SK. (2004). Follicles stimulating hormone-induced DNA synthesis in the granulosa cells of hamster preantral follicles involves activation of cyclin-dependent kinase-4 rather than cyclin D2 synthesis. *Biol Reprod*. 70, 509–517.
- 147-** Roy SK, Greenwald GS. Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. (1991). *Endocrinology*; 129, 1903–1908.
- 148-** Roy SK, Harris SG. (1994). Antisense epidermal growth factor oligodeoxynucleotides inhibit follicle-stimulating hormone-induced in vitro DNA and progesterone synthesis in hamster preantral follicles. *Mol Endocrinol* 8, 1175–1181.

- 149-** Garnett K, Wang J, Roy SK. (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biol Reprod*; 67,1593–1604.
- 150-** Bachvarova R, De Leon V, Johnson A, Kaplan G, Payton BV. (1985). Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol*. 108,325–331.
- 151-** De la Fuente R, Eppig JJ. (2001). Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Dev Biol*; 229,224–236.
- 152-** Schultz RM. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*. 15,531–538.
- 153-** Schultz RM, Montgomery R, Belanoff J. (1983). Regulation of mouse oocyte maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Dev Biol*. 97,264–273.
- 154-** Colledge WH, Carlton MBL, Udy GB, Evans MJ. (1994). Disruption of *cnos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370, 65–68.
- 155-** Downs SM, Cottom J, Hunzicker-Dunn M. (2001). Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 58, 101–115.
- 156-** Bornslaeger EA, Poueymirou WT, Mattei P, Schultz RM. (1986) Effects of protein kinase C activators on germinal vesicle breakdown and polar body emission of mouse oocytes. *Exp Cell Res*, 165,507–517.
- 157-** Moore GD, Kopf GS, Schultz RM. (1995). Differential effect of activators of protein kinase C on cytoskeletal changes in mouse and hamster eggs. *Dev Biol*. 170, 519–530.
- 158-** Luria A, Tennenbaum T, Sun QY, Rubinstein S, Breitbart H. (2000). Differential localization of conventional protein kinase C isoforms during mouse oocyte development. *Biol Reprod*. 62,1564–1570.
- 159-** Mochly-Rosen D. (1995). Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science*. 268, 247–251
- 160-** Hammarstorm S. (1982). A receptor for prostaglandin F_{2a} from corpora lutea. *Methods Enzymol* 86,202–209
- 161-** Davis JS, Weakland LL, Weiland DA, Farese RV, West LA. (1987). Prostaglandin F_{2a} stimulates phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis and mobilizes intracellular Ca²⁺ in bovine luteal cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84,3728–3732
- 162-** McGuire WJ, Juengel JJ, Niswender GD. (1994). Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F_{2a} in the ovine corpus luteum in vivo. *Biol Reprod* 51, 800–806
- 163-** Abayasekera DR, Jones PM, Persaud SJ, Michael AE, Flint AP. (1993). Prostaglandin F_{2a} activates protein kinase C in human ovarian cells. *Mol Cell Endocrinol* 91, 51–57

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul, Kadıköy’de doğdu. 2000 yılında Kadıköy, İhsan Sungu İlköğretim Okulu’nu birincilikle bitirdi. Lise öğrenimini İSTEK Vakfı Öğrenim Bursu ile Kadıköy, İSTEK Özel Acıbadem Lisesi’nde ikincilikle tamamladı. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde sürdürdüğü lisans eğitimini 2008 yılında tamamladı. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Programı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında ERASMUS Staj Hareketliliği bursu ile 3 ay süreyle Birleşik Krallık, Edinburgh Üniversitesi’nde stajını tamamladı. İngilizce bilmektedir.