

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARE OVARYUMU KÖK HÜCRELERİNİN REAL TIME-PCR VE
İMMÜNHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Yashar ESMAEILIAN

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Esra ATABENLİ ERDEMLİ

ANKARA

2010

Fare Ovaryumu Kök Hücrelerinin Real Time-PCR ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

ÖZET

Günümüze kadar kabul gören insan ovaryumundaki oositlerin oluşumu ve gelişimi ile ilgili bilgiler son yıllarda tamamen değişim göstermektedir. İddia edildiği gibi kök hücrelerden oosit ve granüloza hücresi oluşumunun olası varlığı üreme biyolojisi ve infertilite tedavisi adına büyük değişimlere yol açacaktır. Bu araştırmanın amacı, fare ovaryumlarında olası kök hücre potansiyeline sahip hücrelerin varlığının ve yerleşimlerinin gösterilmesi ve ilerideki araştırmalarda ovaryumla ilgili infertilitenin "autologous" tedavisinde kullanılmasıdır. İnfertilite tedavisinin yanı sıra ovaryum kök hücreleri *in vitro* koşullarda benzersiz "totipotent" özellik gösterir. Bu hücreler fibroblastlara, epitelyal hücrelere ve nöral hücrelere farklılaşabilir ve aynı zamanda yeni oosit hücrelerine ve partenogenik embriyoya dönüşebilir. OKH'leri bu özelliklerinden dolayı prematür bozukluğunun otolog tedavisinde ve aynı zamanda nörodejeneratif hastalıkların otolog kök hücre tedavisinde, allogenik embriyonik kök hücrelerine veya çekirdek aktarımı yöntemine ihtiyaç duymadan kullanılabilir.

Bu araştırma BALB-C türü iki haftalık (erişkinlik öncesi) ve sekiz haftalık (erişkin) farelerin ovaryumu üzerine yapılmıştır. Histolojik analizi için, İki (iki fare) ve sekiz (iki fare) haftalık ovaryum dokusu Bouin tespit sıvısıyla tespit edildikten sonra bilinen ışık mikroskobu takip yöntemlerinden geçirilip parafine gömülmüş olan dokulardan alınan kesitler Hematoksilin Eozin (HE) ve Periodik Asit Shift (PAS) boyama yöntemiyle boyanıp korteks kısmında yer alan follikül ve oositler, epitelyum germinativum değerlendirilmiştir. Çalışmanın amacına uygun olarak iki (dört fare) ve sekiz (dört fare) haftalık ovaryumlardan alınan kriyo kesitlerde kök hücre işaretleyicilerini (Sox2, Nanog ve Oct-4) araştırmak için immünohistokimyasal yöntem kullanılmıştır. Real Time-PCR ile iki yaş gurubu (dörder fare) örneklerin ovaryum dokusunda Oct4, Nanog ve Sox2 genlerinin ifade varlığı ve aynı zamanda ifade farkı araştırılmıştır.

İmmünohistokimyasal boyama yönteminin sonuçlarına göre her iki yaş gurubu ovaryumunda Oct-4 (ovaryum epitel hücrelerinin sitoplazmasında, granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında), Nanog (sadece oosit çekirdeğinde) ve Sox2 (ovaryum epitel hücrelerinin sitoplazmasında, granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit çekirdeğinin çevresinde ve sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında) proteinleri tespit edilmiştir.

RT-PCR yöntemiyle iki ve sekiz haftalık farelerin ovaryumunda Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin ifade olduğu tespit edilmiş, Real Time-PCR sonuçlarına göre Oct-4 ve Nanog genlerinin ifade düzey farkı iki ve sekiz haftalık yaş grupları arasında anlamlı bulunmuştur. Sox2 geninin ifade düzeyinde ise iki yaş gurubu arasında kayda değer fark gözlenmemiştir. Oct-4 geninin ifade seviyesi iki haftalık örneklerde daha fazlayken Nanog geni sekiz haftalık örneklerde daha fazla ifade olmuştur. Çalışmamız iki yaş gurubu ovaryumunda bu genlerin Real Time-PCR'la ifade farkını gösteren ilk çalışmadır.

Sonuç olarak EKH belirteçlerini taşıyan bu hücrelerin varlığı ve değişik hücre gruplarındaki dağılımı çalışmamızda gösterilmiştir. Bu hücreler daha çok sitoplazmalarında gösterdikleri pozitif işaretleyicilerle kök hücre özelliklerini taşıdıklarını göstermektedir ancak bu hücrelerin gerçekten kök hücre olduklarını tespit etmek için farklılaşabilme yetenekleri de daha sonraki çalışmalarda gösterilmelidir.

Anahtar Kelimeler

Ovaryum kök hücresi (OKH), germinal kök hücre (GKH), oosit, Oct-4, Nanog, Sox2, Real Time-PCR, immünohistokimyasal boyama, fare

Investigation of Stem Cells in Mouse Ovaries by Real Time-PCR and Immunohistochemical Methods

ABSTRACT

The knowledge of formation and development of human oocyte which was acceptable until recent years has changed completely. As claimed, possible presence of oocyte and granulosa cells formation from stem cells will lead to major changes on reproductive biology and infertility treatments. Purpose of this research is to demonstrate possible existence and location of cells that have a potential of stem cells in mouse ovaries and to be used in autologous treatment of ovarian related infertility in future researches. Together with infertility treatments under in vitro circumstances, ovarian stem cells (OSCs) show unique totipotent features that have not been found in other adult stem cell types. They differentiate into fibroblasts, epithelial, and neural cells, as well as new eggs and parthenogenetic embryos producing embryonic stem cells (ESC). Because of these features, OSCs could be utilized for autologous treatment of premature ovarian failure and also for autologous stem cell therapy of neurodegenerative diseases without use of allogeneic embryonic stem cells or somatic cell nuclear transfer.

This research was done on two weeks (pre adulthood) and eight weeks (adult) BALB-C type of mice ovaries. For histological analysis in cortex of ovarian tissue, general structures such as follicles, oocytes and epithelial germinativum after fixation with BOUIN solution and well-known tissue processing methods, were embedded in paraffin. Sections were stained with Hematoxylin Eosin (HE) and Periodic Acid Shift (PAS) for evaluation of follicles. In addition, by taking frozen sections from ovarium, these sections by using of antibody were investigated with stem cell markers (Sox2, Nanog and Oct-4). Possible expression and differences between expression of Oct-4, Nanog and Sox2 genes in two age groups of ovarian tissue samples were determined with Real Time-PCR.

According to the results of immunohistochemical staining for both age groups, presence of Oct-4 (cytoplasm of ovarian epithelial cells, granulosa cells, oocytes and theca cells), Nanog (nucleus of oocyte) and Sox2 (cytoplasm of ovarian epithelial cells, granulosa cells, oocytes and theca cells) proteins have been detected.

By using of RT-PCR, expression of Oct-4, Nanog and Sox2 genes were found in two and eight week mice ovaries. Moreover, according to the results of Real Time-PCR, Oct-4 and Nanog genes expression levels between two and eight week groups had significant differences.

Remarkable differences in expression levels of Sox2 between two age groups were not observed. Expression level of Oct-4 in two week samples were more than eight week samples, while in case of Nanog expression level was higher in eight week samples. Our research is the first study that shows expression differences of these genes by quantitative RT-PCR.

Because of these markers are ESC determiner, we considered that both of prepuberty and adult mice ovaries have had cells that sustain stem cells features.

Key words

Ovarian stem cell (OSC), germinal stem cell (GSC), oocyte, Oct-4, Nanog, Sox2, Real Time-PCR, immunohistochemical staining, mouse

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren ve beni yönlendiren değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Esra ATABENLİ ERDEMLİ'ye, Histoloji laboratuvarlarında çalışmama izin veren ve desteğini esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji ABD Bşk.'nı Prof. Dr. Canan AKBAY'a

Bu tez çalışmasında bana araştırma olanağı sağlayan, çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, bilgileriyle yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Yar. Doç. Dr. Arzu ATALAY'a

Laboratuvar bilgi birikimini benimle paylaşan ve çalışmalarım sırasında benden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Doktora Sonrası Araş. Gör. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Ferda TOPAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, eğitimimin her aşamasına maddi ve manevi destekleriyle benim yanımda olan ve hiç bir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili babam, annem ve kardeşime teşekkür ederim.

Yashar ESMAEILIAN

Ankara, Temmuz 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1. Ovaryum Kök Hücresi.....	2
2.1.1. Doğum sonrası ovaryumda germ kök hücre varlığı.....	2
2.1.2. Erişkin ovaryumda düşünülen germ hücreler kemik iliğindeki kök hücrelerden mi kaynaklanıyor?.....	3
2.1.3. Erişkin insan ovaryumunun yüzey epitelinde kök hücre varlığı.....	5
2.1.4. Doğum sonrası farelerin ovaryumunda teka kök hücre varlığı.....	6
2.1.5. Erişkin insan ovaryumunda yeniden oogeneze ve germ kök hücre bulunmadığını öne süren araştırma.....	6
2.2. Eş Zamanlı PCR.....	7
2.2.1. <i>Housekeeping</i> genlerin kantitatif RT-PCR çalışmalarındaki önemi.....	9
2.3 Kullanılan Markerlerin Tanımı.....	10
2.3.1. Oct-4.....	10

2.3.2. Nanog.....	10
2.3.3. Sox2.....	11
2.3.4. Oct-4, Nanog ve Sox2 Genlerinin Transkripsiyonel Düzenleyici Rollerini.....	11
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	16
3.1. Histolojik Analiz.....	16
3.2. RNA İzolasyonu İçin Farelerden Ovaryum Alma İşlemi.....	17
3.3. Ovaryumdan RNA İzolasyonu.....	18
3.4. Kandan RNA İzolasyonu.....	18
3.5. Ovaryum ve Kandan Elde Edilen Total RNA'ların Kalitatif Değerlendirilmesi.....	19
3.6. cDNA Sentezi.....	19
3.7. Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği.....	21
3.8. Isı Döngüsü PCR İle Elde Edilen cDNA'lar GAPDH Geni (<i>Housekeeping</i> Gen) ile Kontrol Edilmesi.....	22
3.9. Isı Döngüsü PCR ile Oct-4 ve Nanog Genin İfadesi Ovaryum ve Kan Örneklerinde Araştırılması.....	23
3.10. Eş Zamanlı PCR.....	24
3.11. Primer Tasarımı.....	25
3.12. Elektroforez Jel Görüntülerinde Kullanılan Markerler.....	26
3.13. İmmün Boyama.....	27
3.13.1. Kryo kesit alma işlemi.....	27
3.13.2. Antikor boyama.....	27
3.13.3. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	28

4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
4.1. Histolojik İnceleme.....	29
4.2. Real Time-PCR.....	31
4.2.1. Ovarum ve kandan elde edilen RNA'ların kantitatif sonuçları.....	31
4.2.2. Ovaryun ve kandan elde edilen total RNA'ların kalitatif sonuçları.....	32
4.2.3. Elde edilen cDNA'ların GAPDH geniyle ısı döngüsü PCR'da kontrol edilme.....	33
4.2.4. Standart eğri ve amplifikasyon verimliliği inceleme sonucu.....	34
4.2.5. RT-PCR yöntemiyle Oct-4 ve Nanog genin ifade varlığı ovaryum ve kan örneklerinde incelenmesi.....	35
4.2.6. Real Time-PCR sonuçları.....	36
4.2.7. Real Time-PCR sonuçlarının istatistiksel analizi.....	39
4.3. İmmünohistokimyasal Boyama.....	41
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.1. SYBR Green tekniği.....	8
Şekil 2.2.2. Erime eğrisi analizi.....	9
Şekil 2.3.4.1. Oct-4, Nanog ve Sox2 yolağı.....	12
Şekil 2.3.4.2. EKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmalarının Nanog geninin ifadesiyle ilişkisi.....	12
Şekil 2.3.4.3. Oct-4 ve Nanog genlerinin birbirinin üzerindeki düzenleyici etkileri.....	14
Şekil 3.11.1. Elektroforez jel görüntülerinde kullanılan markerler.....	25
Şekil 4.1.1. İki haftalık ovaryumda HE ve PAS boyama görüntüleri.....	29
Şekil 4.1.2. Sekiz haftalık ovaryumda HE ve PAS boyama görüntüleri.....	30
Şekil 4.2.2.1. Sekiz haftalık ve kan örneklerinden elde edilen total RNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 4.2.2.2. İki haftalık örneklerinden elde edilen total RNA'ların agaroz jel görüntüsü.....	32
Şekil 4.2.3.1. İki ve sekiz haftalık ovaryumlardan elde edilen cDNA'larının GAPDH geniyle kontrol edilmesi.....	33
Şekil 4.2.4.1. Amplifikasyon verimliliğini hesaplamak için Oct4 ve GAPDH genlerinin standart eğrisi.....	34
Şekil 4.2.5.1. İki haftalık, sekiz haftalık ve kan örneklerinde Oct-4 ve Nanog genlerinin RT-PCR yöntemiyle araştırılma sonucu.....	35
Şekil 4.2.6.1. Sox2 geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime piki (B).....	36
Şekil 4.2.6.2. GAPDH geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü.....	37

Şekil 4.2.6.3. Oct-4 geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü.....	37
Şekil 4.2.6.4. Nanog geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü.....	38
Şekil 4.2.6.5. Sox2 geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü.....	38
Şekil 4.2.7.1. Real Time-PCR sonuçlarının iki ve sekiz haftalık örnekler için grafikleri...	39
Şekil 4.3.1. İki haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi.....	42
Şekil 4.3.2. İki haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi.....	43
Şekil 4.3.3. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi.....	44
Şekil 4.3.4. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi.....	45
Şekil 4.3.5. Oct-4 proteini için negatif kontrol.....	46
Şekil 4.3.6. İki haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi.....	47
Şekil 4.3.7. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi.....	48
Şekil 4.3.8. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi.....	49
Şekil 4.3.9. Nanog proteini için negatif kontrol.....	50
Şekil 4.3.10. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi.....	51
Şekil 4.3.11. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi.....	52
Şekil 4.3.12. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi.....	53
Şekil 4.3.13. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi.....	54
Şekil 4.3.14. Sox2 proteini için negatif kontrol.....	55

ÇİSELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.10.1. Oct-4, Nanog, Sox2 ve GAPDH genleri için kullanılan primerler.....	24
Çizelge 3.13.3.1. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar.....	28
Çizelge 4.2.7.1. SPSS yazılımıyla Real Time-PCR sonuçları için yapılan T-Test analizi.....	39

SİMGELER DİZİNİ

BSA	Dana Serum Albümini
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik döngü değeri
dk	Dakika
DNA	Dezoksiribonükleik asit
dNTP	Dezoksिनुकлеотитрифосфат
EKH	Embriyonik Kök Hücre
GCNA	Germ hücre nükleer antijen
GFP	Yeşil Floresan Protein
GKH	Germinal Kök Hücre
LIF	Lösemi baskılayıcı faktör
mRNA	Mesajcı RNA
OKH	Ovaryum Kök Hücre
OSC	Ovaryum kök hücre
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su çözeltisi
PCNA	Proliferasyon hücre nükleer antijen
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
SCP3	Sinaptonemal kompleks protein 3
Tm	Erime sıcaklığı
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
°C	Celcius

1. GİRİŞ

Yüksek omurgalılar ve erişkin memeli ovaryumlarındaki oositlerin kaynağının gonadal kabartıya gonad oluşumunu indüklemek üzere göç eden primordiyal germ hücreleri olduğu bilinen ve kabul gören eski bir bilgidir. Ancak günümüzde bazı kuşlar ve küçük laboratuvar kemirgenleri üzerine yapılan araştırmalar, primordiyal germ hücrelerinin dejenere olup fetal oosit hücrelerinin ovaryum yüzeyinde bulunan yüzey epiteli kök hücrelerinden kaynaklandığını iddia etmişlerdir. İddia edildiği üzere, ovaryumun yüzeyindeki kök hücreler, yeni germ hücrelerinin yanı sıra granüloza hücrelerine de kaynaklık edebilmekte, yeni germ hücreleri, ovaryumun yüzeysel epitelyumundaki kök hücrelerin asimetrik bölünmesinden oluşmaktadır (Bukovsky 2008). Üreme biyolojisinin temel doktrinine göre çoğu dişi memelilerin ovaryumunda oosit germ hücre oluşma ve yenileme kapasitesi fetüs dönemine kadardır ve doğum sonrası ovaryumda bu özellik yoktur ancak bazı araştırmalar genç ve erişkin farelerin ovaryumunda mitotik bakımdan aktif olan germ hücrelerin olduğunu öne sürmektedir (Johnson et al. 2004). Farelerin ovaryumu ile insan ovaryumu arasında bazı önemli farklar vardır. İnsanda menstrüel siklusun luteal fazında ovaryum kök hücreleri (OKH) yüzeysel tabakada bulunmazken erişkin farelerin ovaryumu her iki dönemde de OKH'lerini içerir (Bukovsky et al. 2009). Erişkin insan ovaryumunun yüzey epitelinde kök hücrelerin varlığıyla ilgili bazı iddialar varsa da bu konuyla ilgili somut kanıtlar bulunmamaktadır. Erişkin memelilerde yeni oositlerin oluşumu ile ilgili iki olası mekanizma vardır:

1. Yeni oositler gonad dışında bulunan kök hücrelerden -kemik iliğindeki kök hücreler- oluşurlar ve periferik kana salınırlar. Bu öncü hücreler ovaryuma gelerek yeni oositleri oluşturup folliküllerin içine yerleşir (Johnson et al. 2005).
2. Yeni oositler transformasyon mekanizması ile ovaryumda oluşur. Ovaryum "bipotent" öncü hücreleri hem yeni oositlere hem de somatik hücrelere (granüloza hücreleri) ovaryumun içinde dönüşür (Bukovsky et al. 2005).

Bu tezin amacı bu iddia edilen konuya açıklık getirmek üzere genç ve erişkin farelerde OKH'lerin olası varlığının embriyonik kök hücre belirteçleri ve yerleşimleri açısından göstermektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Ovaryum Kök Hücresi

2.1.1. Doğum sonrası ovaryumda germ kök hücre varlığı

Üreme biyolojisi üzerine yapılan uzun araştırma sonuçlarına göre dişi memelilerde bütün germ hücreleri fetüs gelişiminin sonunda mayoza girer ve sonuç olarak doğum sonrası ovaryumda oosit sınırlı sayıda bulunmaktadır. Ovaryumun bu kaynağı hastalık veya hasar nedeniyle kaybedilirse tekrar yenilenme olanağı yoktur. Ancak yeni raporlar bu bakış açısını tartışmaktadır. Johnson ve arkadaşları 2004'de yaptıkları bir çalışmada, oosit dejenerasyon oranına ve sürekli follikül havuzunun tekrar doldurulmasına gerek olduğu temeline dayanarak genç ve erişkin farelerin ovaryumunda mitotik bakımdan aktif olan germ hücrelerin varlığını göstermek üzere mitotik germ hücrelere sahip olan prepubertal dişi fareleri toksik Busulfan'a maruz bırakmış ve atreziye uyardıktan sonra primordiyal follikül kaynağın erişkinlik dönemine kadar yok etmiştir. Wild tip ovaryumlar, GFP ile transgen olmuş dişi farelere nakledildikten sonra follikül oluşturan GFP pozitif germ hücreler Wild tip ovaryumlarda gösterilmiştir. Aynı çalışmada mayoz belirleyici işaret olan SCP3 genç ve erişkin fare ovaryumunda gösterilmiştir. Sonuç olarak doğum sonrası memelilerin ovaryumunda oosit ve follikül oluşumunu destekleyen proliferatif germ hücrelerin varlığı gösterilmiştir (Johnson et al. 2004).

Erişkin fare ovaryumda germ kök hücrelerinin (GKH) varlığını destekleyen diğer bir araştırma, immünmagnetik izolasyon ve kültür yoluyla 15 fare üzerinde yapılmış, dişi GKH'leri erişkin farelerden izole edildikten sonra 6 aydan fazla kültür edilerek bu dişi

GKH'ler GFP virüsüyle enfekte edilip kısır farelerin ovaryumuna nakledilmiştir. Nakledilmiş hücreler oogeneze uğramışlar ve kısır olan fareler, GFP transgen yavrular üretmişlerdir. Yeni doğmuş farelerde normal karyotipe sahip ve yüksek telomerez aktivitesi olan dişi GKH hattı tespit edilmiştir (Zour et al. 2009).

2.1.2. Erişkin ovaryumda düşünülen germ hücreler kemik iliğindeki kök hücrelerden mi kaynaklanıyor?

Doğum sonrası fare ovaryumlarında, germ hattı kök hücrelerinden yeni oositlerin oluşabileceği düşünülmüş ve germ hücrelerin gonad dışı kaynağı olabileceği düşünülerek, germ hattı markerlerinin ifadesi kemik iliğinde gösterilmeye çalışılmıştır. Buna göre kemoterapiyle steril olmuş farelerde ve oosit üretiminde genetik yetmezliği olan (*ataxia telangiectasia-mutated*) farelerde kemik iliği nakli oosit üretimini restore etmiştir. Kemik iliğinden ve periferik kandan kaynaklanan oositlerin döllenebilme ve gelişimsel yeterliliği belirsizliğin korunurken onların morfolojisi, follikül içinde çevrenmesi, germ hücreleri ve oosite özgül belirteçleri göstermesi bu hücrelerin gerçek oosit olduğunu desteklemiştir. Bu sonuçlar, kemik iliğinin germ hücreleri için potansiyel bir kaynak olduğunu ve erişkinlik aşamasında oosit üretimin sürdürebileceğini göstermektedir (Johnson et al. 2005). Buna karşılık kan dolaşımındaki hücrelerin dişi doğurganlığında direk olarak fizyolojik ilişkisini test etmek için, prabiyotik fare modellerinde transplantasyon uygulanarak kan dolaşımındaki kemik iliği hücrelerinin kapasitesi hem normal hem de hasarlı ovaryumda ovulasyona uğrayan oosit oluşumu açısından incelenmiş. Kan dolaşımında veya kemik iliğindeki hücrelerin matür veya ovulasyona uğrayan oosit oluşumuna katkısıyla ilgili hiçbir kanıt bulunamamış, kan dolaşımıyla ovaryuma göç eden hücrelerin lökositlerin karakteristik özelliklerini gösterdikleri görülmüştür (Eggen et al. 2006).

2007 yılında Bukovsky ve arkadaşları tarafından, laboratuvar kemirgenlerinde, farz edilen germ hücrelerin kemik iliği hücrelerinden mi yoksa kemik iliğindeki hücrelerin indüktif etkisiyle ovaryum kök hücrelerinden mi oluştuğu tekrar sorgulanmaya açılmıştır. Kontrol olarak erişkin (45-50 günlük) ve yeni doğmuş östrojenlenmiş dişi sıçan ovaryumlarında düşünülen germ hücrelerin, oositlerin ve kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin yerini belirtmek için immünperoksidaz boyama yöntemi kullanılmıştır. Kontrollerde, kemik iliğinden kaynaklanan hücreler ovaryumun yüzey epitelinde farz edilen germ hücrelerle birlikte gözlenmiştir. Farz edilen germ hücreler simetrik olarak bölünüp ayrılmışlar ve primordiyal folliküller oluşmuştur. %50 oranında östrojenlenmiş yeni doğmuş sıçanlarda ovaryum yüzey epiteli bulunamamış bu sıçanlarda, çok sayıda kemik iliğinden kaynaklanan hücreler ve farz edilen germ hücrelerin öncüsü medüller bölgede meydana çıkmıştır. Ovaryum korteksinin medullaya yakın bölgesinde bulunduğu düşünülen germ hücreler, belirgin yalancı ayaklar oluşturarak çok sayıda primordiyal follikülün bulunduğu orta kortekse doğru göç etmiştir. Bu sonuçlara göre, kemik iliğinden kaynaklanan hücrelerin, farz edilen germ hücrelerin normal erişkin dişi sıçanlarda ovaryum yüzey epitelinden kaynaklanmasına ve ovaryum yüzey epiteli olmayan yeni doğmuş östrojenlenmiş sıçanlarda medüller bölgedeki öncü hücrelerden oluşmasına eşlik ettiği gösterilmiştir. Yüzey epiteli bozulmuş ovaryumlarda hala yeni primordiyal folliküllerin oluşması, medüller bölgede farz edilen germ hücrelerin yeni primordiyal folliküller için alternatif kaynak olduğun düşündürmektedir.

Bukovsky ve arkadaşları (2009), kemik iliğinden kaynaklanan bazı hücrelerin (B ve T lenfosit hücreleri) uygun hormon sinyali eşliğinde OKH'lerinin asimetric bölünmesinde, kortekse doğru göç edip oosite farklılaşmasında indükleyici rol oynadığını göstermişler.

2.1.3. Erişkin insan ovaryumunun yüzey epitelinde kök hücre varlığı

Erişkin insan ovaryumundan elde edilen kültürlerde, oosit ve granüloza hücrelerinin farklılaşma yeteneği incelenmiş ve ovaryumun yüzeyinden kazıma yoluyla elde edilen hücreler östrojenik uyarıcıların (fenol kırmızısı) varlığı veya yokluğunda 5-6 gün kültür edilmiş. Fenol kırmızısı olmayan kültürde ovaryum yüzey epitel hücreleri granüloza hücreleri fenotipine benzer küçük (15 mikron) hücrelere, epitelyal, nöral ve mezankimal hücrelere farklılaşırken fenol kırmızısı olan kültürde ovaryum yüzey epitel hücreleri direk oosit fenotipi olan büyük (180 mikron) hücrelere farklılaşmışlardır. Bu hücreler, sekonder oositlerin karakteristik özelliklerini gösteren germinal vezikül yıkılması, kutup cisimciği oluşması ve zona pellusida proteinlerinin yüzeysel ifadesi gibi değişiklikler göstermiştir (Bukovsky et al. 2005).

Virant-Klun ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmanın amacı, 20 menopoz sonrası ve 5 prematür ovaryum bozukluğu olan kadında -ovaryumlarının yüzey epitelyumundan normal olarak oosit ve follikül bulunmamaktadır- varsayılan OKH'leri izole edilmeye çalışılmış, ovaryum yüzey epitelinden elde edilen örneklerden 2-4 µm çaplı, hava kabarcığına benzer yapısı olan küçük yuvarlak hücreler izole edilmiştir. Bu hücreler erken embriyonik gelişme markerlerini örneğin, SSEA4 (*stage-specific embryonic antigen 4*), Oct-4, Nanog, Sox2 ve c-kit transkripsiyon faktörlerini ifade etmişlerdir. Bu hücreler yoğunluk gradientine bağlı santrifüj ile ayıklandıktan sonra *in vitro* koşullarda üremişler, bu hücrelerden bazıları şiddetli biçimde büyümüş ve 5-7 gün sonra çapları yaklaşık 20 µm'ye ulaşmıştır. Ovaryumun yüzey epitelinden elde edilen hücre kültüründe, oosite benzer hücreler gelişmiş, bu hücrelerin çapı 95 µm'ye ulaşmış ve primer oositlere uyararak bu hücreler Oct-4A, Oct-4B, c-kit, VASA ve ZP2 transkripsiyon markerlerini ifade etmiş ve SCP3 mayotik işaretleyiciyi ifade etmemiştir. Sonuç olarak, ortaya çıkan hücreler embriyonik kök hücrelerin markerlerini ifade etmekle erişkin OKH'leri olarak önerilmişlerdir.

2.1.4. Doğum sonrası farelerin ovaryumunda teka kök hücresi varlığı

Honda ve arkadaşları (2007) tarafından yapılan çalışmada, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği olan tekal kök hücreler olduğu düşünülen hücreler izole edilmiştir. Bu hücreler morfoloji bakımından fibroblastalara benzerlik gösterip *in vitro* koşullarda homolog hücre popülasyonu içeren yuvarlak koloniler halinde çoğalmıştır. Bu hücrelerin ilkel öncü hücrelere (*precursor*) ve steroidogenik hücrelere farklılaşmaları için granüloza hücrelerdeki parakrin faktörler, *luteinizing* hormon ve serum kullanılmıştır. Bu hücreler her farklılaşma aşamasında, uygun gen ekspresyonu ve morfolojik belirteçler gösterip daha sonra *androstenedione* salgılamıştır.

2.1.5. Erişkin insan ovaryumunda yeniden oogenez ve germ kök hücre bulunmadığını öne süren araştırma

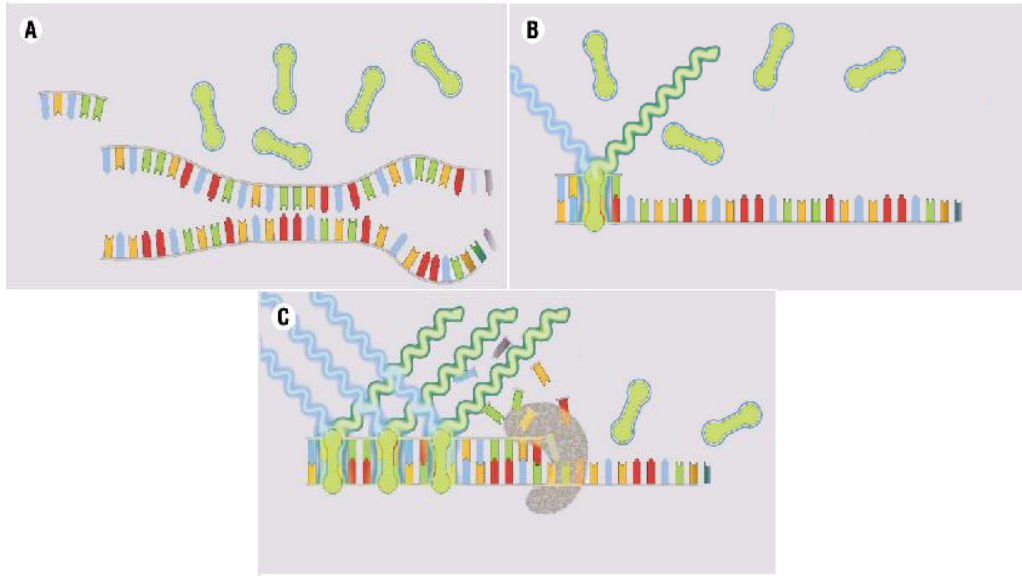
Birçok araştırma sonucu insan ve fare ovaryumunda kök hücre varlığını desteklerken Liu ve arkadaşları 2007'de, erişkin insan ovaryumunda yeniden oogenez ve germ hattı kök hücrelerinin varlığını test etmek üzere 28 ve 53 yaş arasındaki erişkin insan ovaryumunda genetik manipulasyon yerine -insanda etik değil- yeni oogenez için gerekli olan mayotik gen markerleri ve germ hücre proliferasyonu genlerini analiz etmiştir. Bu araştırma sonucuna göre erişkin insan ovaryumunda aktif mayoz, yeni oogenez ve germ hattı kök hücrelerin olmadığı gösterilmiştir. RT-PCR yöntemiyle normal erişkin insan ovaryumunda oogeneze spesifik mRNA'lar, SPO11, PRDM9, SCP1, TERT ve NOBOX genleri bulunmamıştır. Fetüs ovaryumuyla karşılaştırarak, erişkin ovaryumunda OCT3/4 ve SCP3 genlerinin ifade oranı daha düşük bulunmuştur. Erişkin ovaryumlarında OCT3/4 proteininin varlığı *western blot* analiz yöntemi ile onaylanmıştır. 7 erişkin kadından alınan 385 kesitin immünohistokimyasal boyanmasında OCT3/4 pozitif hücrelerin, yaşa bağlı

olmadan primer oositlerin germinal veziküllerinde (GVs) bulunduğu gözlenmiştir ancak OCT3/4 pozitif hücrelerin *tunica albuginea* ve ovaryumun yüzey epitelinde bulunmadığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, erişkin insan ovaryum yüzey epitelinde veya *tunica albuginea* bölgesine yakın germ hattı kök hücrelerinden yeni oosit oluşma mekanizmasının olmadığını göstermiştir (Liu et al. 2007).

2.2. Eş Zamanlı PCR

Eş Zamanlı (*Real Time*) PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemidir. SYBR Green veya SYTO9 gibi özel boyalar DNA sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapıp amplifikasyon miktarının saptanmasını sağlamaktadır. Bu yöntem aracılığıyla her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarı ölçülerek kantitatif analizlerin yapılması sağlanır (Nolan et al. 2006). SYBR Green I, gen ifadesinin ölçümünde sıklıkla kullanılan bir boyadır ve çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan ışınma yapar. SYBR Green I'in çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresan ışınmaya neden olur (Şekil 2.2.1.). Bu yöntemde, uygun primer seçimi en önemli aşamadır ve başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece spesifik cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya spesifik olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gerekmektedir. RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu da SYBR Green tekniğinde sorun yaşatan bir diğer konudur. Özgül amplifikasyon ürününe ulaşabilmek için, cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, ampikon uzunluklarının kısa tutulması (120-300 baz) ve primerlerin bağlanacağı ekzonlar arasında büyük intronlar olması önemli noktalar (Balcı 2009). SYBR Green I, primer dimerlere ve özgül olmayan PCR ürünlerine de bağlanabilir (Bustin et al. 2005). Bu nedenle floresan artışı her zaman özgül amplifikasyon göstergesi olamaz. Agaroz jel elektroforezi ile amplifikasyon ürününün spesifik olup olmadığı incelenir. Bununla birlikte eş zamanlı PCR cihazlarında özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluşumunu ve

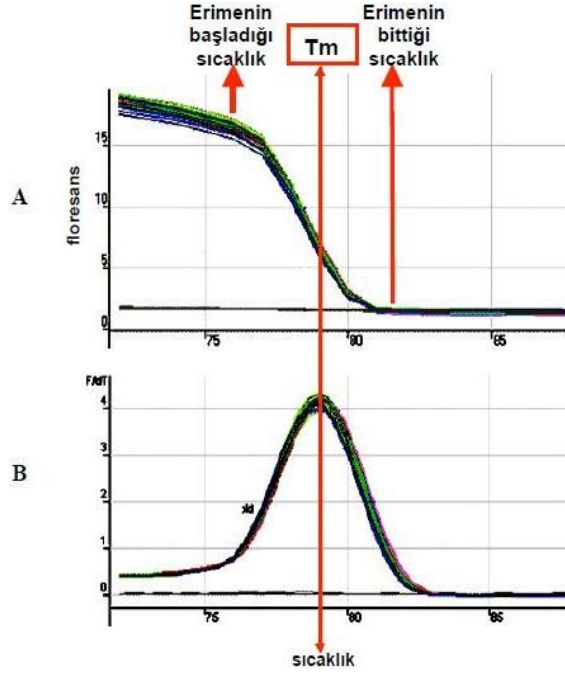
primer dimerleri saptamak için erime eğrisi (*melting curve*) analizi yapılabilmektedir (Şekil 2.2.2.A.). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir erime ısı (*melting temperature*, T_m) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklarla floresan miktarı gözlenilir. Çift zincirli DNA denatüre olmaya başlayınca bağlı olan floresan boya serbest kaldığı için ölçülen ışınma miktarı azalmaya başlar. Bu yöntemle elde edilen erime eğrisinden yararlanılıp amplifikasyonun özgülüğü saptanabilir. T_m değerinin tam olarak tespit edilebilmesi için erime eğrisinin zamana karşı türevi çizilir ve bu türev analizi sıklıkla yapılan bir yöntemdir (Şekil 2.2.2.B.).



Şekil 2.2.1. SYBR Green tekniği. **A.** Başlangıç aşaması: bu aşamada SYBR Green, primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresan ışınma yoktur. **B.** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'da az miktarda floresan sinyal açığa çıkar. **C.** Primer uzaması: Amplifikasyon miktarına bağlı olarak çift zincirli DNA'ya daha fazla boya katılarak floresan sinyal artar

Eşik döngü değeri (*threshold cycle* = C_t) eş zamanlı PCR yönteminde önemli bir değişkendir. C_t değeri, amplifikasyon sırasında saptanan floresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir deyimle üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı gösterir. Farklı PCR reaksiyonlarında yer alan kalıp örneklerin miktarı C_t değerleri karşılaştırılarak öngörülebilir (Wong ve Medrano 2005). Florimetrik PCR tekniğiyle yapılan kantitatif çalışmalarda, kalıp DNA miktarı bilinen standart örneklerle ait C_t

değerleri ile incelenen örneğin Ct değeri karşılaştırılarak yapılmaktadır. Bu nedenle, kantitatif PCR analizlerinde standart olarak tanımlanan kontrol örneklerine ihtiyaç duyulur.



Şekil 2.2.2. Erime eğrisi analizi

2.2.1. Housekeeping genlerin eş zamanlı PCR çalışmalarındaki önemi

Eş zamanlı PCR yönteminde normalizasyon amacı ile çeşitli koşullarda ifade düzeyi değişmediği bilinen (en az etkilenen) bir referans gene ihtiyaç vardır (Bustin 2002). Özellikle farklı bireylerden ya da aynı bireyden farklı dönemlerde alınan örneklerle yapılan araştırmalarda, ilgilenilen genin ifade düzeyinin incelenebilmesi için dokularda ifadesi değişmediği varsayılan bir başka gen ürünü mRNA ile normalizasyon yapılması gerekmektedir. İlgilenilen genin ifade düzeyi, referans gen olarak kullanılan *housekeeping* genin ifade düzeyine oranlanır. Bu oranlamayla amaçlanan izole edilen RNA miktarı ve sentezlenen cDNA miktarının getirdiği örnekler arası başlangıç farklılıklarını, deneysel hataları normalize etmektir.

2.3. Kullanılan Markerlerin Tanımı

2.3.1. Oct-4

Oct-4 proteini EKH'lerin pluripotansiyel yeteneğini korumada ana rol oynar ve bu nedenle, bu hücrelerin teşhisinde en önemli belirteçtir. Bu faktörün ifade seviyesi çok kritiktir, eksik veya fazla eksprese olması EKH'lerinin farklılaşmasına neden olur. Fare embriyosunda Oct-4 geninin eksik ifadelenmesi iç hücre kitlesinin oluşmamasına, bu hücrelerin pluripotansiyel kapasitelerinin kaybına ve sonuç olarak trofoektoderme dönüşmelerine neden olur. Oct-4 geni farenin oositinden de eksprese edilir ve zigotun ilk yarıklanmasında (*cleavage*) kaybolup tekrar embriyonun dört hücreli aşamasında görülür. Bu gen gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz. (Niwa et al. 2000).

2.3.2. Nanog

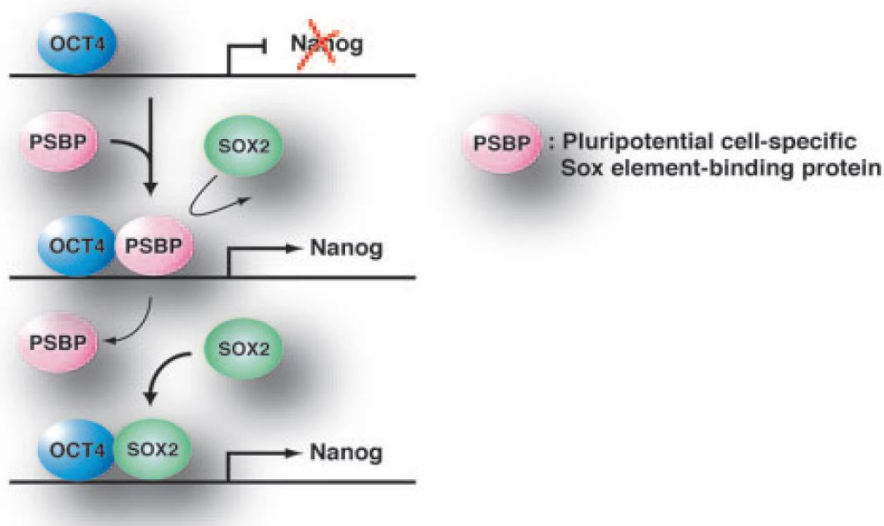
Nanog geninin mRNA'sı insan ve farenin pluripotent hücrelerinde bulunur ama olgunlaşmış hücrelerde yoktur. Nanog aslında hücrenin farklılaşmasına neden olan genlerin ifadesini susturan bir transkripsiyon susturucusu olarak önerilmiştir (Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003). Bu genin eksprese olmaması, EKH'lerin pluripotansiyel özelliklerinin kaybına ve bu hücrelerin ekstraembriyonik hücrelere dönüşmelerini indükler. Nanog geni insan ve farenin embriyonik kök hücrelerinde, embriyonik germ hücrelerinde, olgunlaşmamış teratomlarda ve merkezi sinir sisteminde eksprese olur. Son zamanlarda, bu gen, testiküler karsinoma ve germ hücre tümörlerinin teşhisinde kullanılmaktadır (Mitsui et al. 2003). Primordiyal germ hücrelerinin göçünün tamamlanabilmesi için Nanog geni gerekmektedir ve eğer bu hücrelerde Nanog ifadesi yoksa genital çıkıntıya (*genital ridge*) varmalarında sorun yaşanır (Chambers et al, 2007).

2.3.3. Sox2

Sox2 bir intronsuz gen olarak embriyonik hücrelerin gelişmesi ve kaderlerinin belirlenmesinde önemli rol oynar (Kamachi et al. 2000). Sox2 geni EKH'lerin pluripotansiyel özelliğinin korunması için vazgeçilmez bir gendir (Masui et al. 2007). Adachi ve arkadaşlarına göre (2010) trofoektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH'lerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde Sox2 gen ifadesi gereklidir.

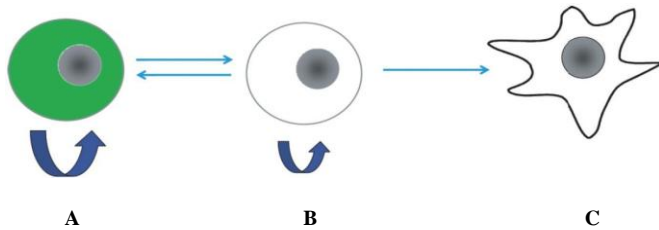
2.3.4. Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin transkripsiyonel düzenleyici rolleri

Oct-4, Nanog ve Sox2 genleri bir transkripsiyonel düzenleyici hiyerarşisinin merkezinde yer alarak kök hücrelerin kimliğini belirlemektedir (Boyer et al. 2006, Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003). Oct-4, Sox2 ve Nanog genleri, kendilerini ve sinyal yolağının anahtar bileşenlerini kodlayan genleri aktive ederek ve gelişim sürecinin genlerini susturarak kök hücrelerin pluripotansiyel ve kendini yenileme özelliğini sağlamaktadır (Laurie et al. 2005). Sox2 proteini Oct3/4 ile *in vitro* koşullarda karşılıklı etkileşim yaratarak (Şekil 2.3.4.1.) Oct-Sox arttırıcısını (*enhancer*) aktive etmektedir ve bunun sonucunda Oct3/4, Nanog ve kendisinin ifadesini düzenlemektedir (Masui et al. 2007). Canlı insan ve fare EKH'lerinde kromatin immünpresipitasyon yöntemi kullanılarak Oct-4 ve Sox2 proteinlerinin Nanog promoter'na bağlandığı gösterilmiştir (Rodda et al. 2005).



Şekil 2.3.4.1. Oct-4, Nanog ve Sox2 yolağı

Nanog geninin ifade seviyesi EKH'lerde dalgalı seyrederek. Nanog miktarı düşük olan (geçici) hücreler farklılaşmaya eğilim göstermektedir fakat bu hücreler farklılaşmamaktadırlar. Bazı sonuçlar Nanog geninden yoksun EKH'lerin kendilerini yenileme potansiyelinin korunması ve farklılaşmalarını göstermektedir (Şekil 2.3.4.2.). $Nanog^{-/-}$, EKH'ler klonojenik özellik ve farklılaşmamış morfolojilerini koruyarak farklılaşmama belirteçlerini ifade edip pluripotent olmaya devam ederler (Chambers et al. 2007).



Şekil 2.3.4.2. EKH'lerin kendilerini yenileme ve farklılaşmalarının Nanog geninin ifadesiyle ilişkisi. **A.** Nanog pozitif EKH **B.** Geçici Nanog negatif EKH **C.** Farklılaşmış Nanog negatif hücre

İnsan EKH'lerinde Nanog geninin düşük ifadesi Oct-4 geninin düşük ifadesine neden olurken Sox2 geninin ifadesinde etkisi bulunmamaktadır (Hyslop et al. 2005). İnsan ve fare EKH'lerinde Nanog geninin yüksek ifadesi bu hücrelerin farklılaşmasına neden olmazken, besleyici hücre tabakası ve LIF'in yokluğunda bu hücrelerin farklılaşmaksızın kendilerini yenileme kapasitelerini yükseltmektedir (Chambers et al. 2003, Darr et al. 2006, Mitsui et al. 2003). Fare EKH'lerinde Nanog geninin ifadesinin susturulması bu hücrelerin ilkel endoderm hücrelerine farklılaşmalarına neden olmaktadır (Chambers et al. 2003, Mitsui et al. 2003). İnsan EKH'lerinde Nanog geninin bastırılması bu hücrelerin hem endoderm hem de ektoderm hücrelerine farklılaşmalarını sağlamaktadır (Hyslop et al. 2005, Zaehres et al. 2005).

Morula hücreleri ve onların öncü hücrelerinin çekirdeğinde hem Oct-4 hem de Sox2 genleri ifade olurken Nanog geninin negatif olması, Oct-4 ve Sox2 genlerinin uygun hücreyel yerleşiminin yanı sıra başka moleküler sinyallerinde Nanog geninin ifadesi için gerekli olduğunu düşündürmektedir (Rodda et al. 2005). Bazı araştırmalar Oct-4 ve Sox2 genlerinin Nanog geninin ifade olması için gerekli olduğunu ve ayrıca Oct-4 proteini yokken Sox2 proteininin Nanog promoter'ına etkili bir şekilde bağlanamadığını göstermektedir (Kurda et al. 2005, Rodda et al. 2005). Her ne kadar Nanog ve Oct-4 proteinleri EKH'lerin kendisini yenilemekte birbirinden farklı işlevler gösterse de Oct-4 proteini yokken Nanog proteini fonksiyon gösterememektedir, bu yüzden bu iki proteinin birbirine bağlı ve paralel olarak işlev yapabildikleri düşünülmektedir (Chambers et al. 2003, Pan et al. 2006).

EKH'lerde Oct-4 konsantrasyonu eğer sabit ifade (*steady-state*) miktarının altındaysa Nanog promoter'ını aktive eder, sabit ifade miktarında veya daha yüksekse o zaman Nanog geni ifadesinde engelleyici etkisi olur (Şekil 2.3.4.3.). Bu mekanizma kök hücrelerin pluripotansiyel özelliğinin Oct4 miktarına bağlı olarak düzenlendiğini göstermektedir (Niwa et al. 2000). Oct-4 geni düşük ifade olursa Sox2 ve Nanog genlerinin de düşük

ifadesine neden olur (Babaie et al. 2007, Zaehres et al. 2005). EKH'lerinin pluripotansiyelliğinin korunması için Oct-4 geninin ifade miktarı çok kritiktir. Örneğin bu gen fazla ifade olursa EKH'lerin endoderm veya mezoderm hücre hattına (Niwa et al. 2000, Rodriguez et al. 2007) düşük ifade olursa trofoektodermal hücrelere farklılaşmasını tetikler (Babaie et al. 2007, Hay et al. 2004, Niwa et al. 2000, Zaehres et al. 2005).



Şekil 2.3.4.3. Oct-4 ve Nanog genlerinin birbirinin üzerindeki düzenleyici etkileri

EKH'lerde RNAi (RNA *interference*) ile Sox2 geninin susturulması sonucu bu hücreler trofoektoderm dâhil olmak üzere çoklu hücre hattına (*multiple lineage*) farklılaşmaktadırlar (Ivanova et al. 2006). EKH'lerde Sox2 proteininin küçük artışı (iki kat veya daha az) çeşitli farklılaşmış hücre tiplerindeki (endoderm hariç, nöroektoderm, mezoderm ve trofoektoderm) belirteçleri sergilemektedir (Kopp et al. 2008). İnsan EKH'lerinde Sox2 proteininin düşük ifadesi trofoektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı tetiklemektedir (Adachi et al, 2010). Sox2 geninin yüksek ifadesi hem kendisi hem de Sox2:Oct3/4 kompleksinin hedef genlerinin (Oct/34, Nanog, Fgf-4 ve Utf1) düşük ifadelerine neden olup aynı zamanda CDX2 proteininin eşliğinde trofoektodermal farklılaşmayı tetikler (Kopp et al. 2008, Adachi et al. 2010). Özet olarak Sox2 geninin düşük veya fazla ifadelenmesi insan EKH'lerinin trofoblast hücre hattına farklılaşmasını sağlar. Sonuç olarak EKH'lerin kendilerini yenileme özelliklerinin korunması için hem Sox2 hem de Oct-4 genlerinin ifadesi bir ince çizgi içerisinde olması gerekmektedir.

EKH'lerde Sox2 geninin ifadesi hem kendisi ve hem Oct-4 geni tarafından, Oct-4 geninin ifadesi ise hem kendisi hem de Sox2 geni tarafından düzenlenmektedir (Okumura et al. 2005).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Histolojik Analiz

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun No:(2009-186) izniyle yapılmıştır.

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Laboratuvarında BALB-C cinsi 2 ve 8 haftalık farelere ketamin+ksilazin (100+10 mg/kg) verilip anestezi uygulanarak ovaryumları laparoskopik yöntemle çıkarıldıktan sonra tespit edilmek için Bouin solüsyonuna aktarıldı. Histolojik inceleme için 2 (iki fare) ve 8 (iki fare) haftalık fareden ovaryum alındı.

Bouin solüsyonu:

- Suda doyurulmuş Pikrik asit: 300 cc
- %40 Formalin: 100 cc
- Glasiyal asitik asit: 20cc

24 saat tespit işleminden sonra aşağıda gösterilen takip yöntemi uygulandı.

A) Dehidratasyon

- %50 Alkol: 1 saat × 2
- %70 Alkol+3 damla doymuş lityum karbonat çözeltisi
- %80 Alkol: 2 saat × 2
- %95 Alkol: 1 gece × 2
- %100 Alkol: 1.5 saat × 2

B) Şeffaflandırma

- Amil Asetat: 5.5 saat

C) İnfiltrasyon (Emdirme)

- Yumuşak parafin: 1 saat
- Yumuşak+sert parafin: 3 saat
- Sert parafin: 2 saat

D) Gömme

- Sert parafine gömülür

Elde edilen parafin bloklardan *LEICA RM2125RT* tipi mikrotomla 3 µm kalınlığında kesitler alınıp HE (Hematoksilin Eozin) ve PAS (Periodik Asit Shift) yöntemleri ile boyanıp *Nikon Eclipse E200* mikroskobuyla incelenmiştir.

3.2. RNA İzolasyonu için Farelerden Ovaryum Alma İşlemi

Farelerden ovaryumlar alındıktan sonra hemen sıvı azota aktarılıp RNA izolasyonu için Aakara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarına götürüldü ve -80°C'de saklandı. Her iki gurup için (2 ve 8 haftalık) dörder fare ayrıldı ve her fareden alınan 2 ovaryum bir tüpün içine koyulup bir örnek olarak hesaplandı.

3.3. Ovaryumdan RNA İzolasyonu

RNA izlasyonu için TRIzol (*Invitrogen*) protokolü uygulandı. Öncelikle ovaryumlar -80°C'den alınıp RNase Free tüpe aktarıldı ve üzerine 1000µl TRIzol koyulup dokuyu parçalamak için *tissuelyser* cihazı kullanıldı. Parçalama işlemi (birinci aşama 2 dakika 25 frekans saniye, ikinci aşama ise 1 dakika 30 frekans saniye olmak üzere) iki aşamada yapıldı. Dokunun daha iyi homojen olması için birkaç kere enjektörden geçirildi. Sonraki aşamada tüpün içine 200µl kloroform eklenip iyice çalkaladıktan sonra vortex edilip 5 dakika oda ısısında bekletildi ve daha sonra 25 dakika, 13000 rpm, 4°C'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpte 3 tabaka (üst tabakada RNA, ortada tabakada DNA ve alt tabakada protein ve lipit) oluştu. Pipetle üsteki tabaka (RNA tabakası) alınıp başka tüpe aktarılıp üzerine 500 µl isopropanol ve 2 µl glikojen konulup vortex edildikten sonra 10 dakika oda ısısında bekletilip sonra 15 dakika, 13000 rpm, 4°C'de santrifüj edildi. Tüpün dibinde pelet oluşumu görüldü ve isopropanol dökülüp yerine 1000µl %70 etanol koyulup 5 dakika, 1000 rpm ,4°C'de santrifüj edildi. Bu aşama iki kere tekrar edildi. Sonraki aşamada etanol dışarı alınıp RNA peletinin çözülmesi için 40µl RNase Free su koyulup pipetaj edildi. Elde edilen RNA, *Nanodrop ND-1000 Spectorophotometr* cihazı ile kantitatif olarak ölçüldü ve daha sonra tüpler -80°C'ye kaldırıldı.

3.4. Kandan RNA İzolasyonu

Embriyonik kök hücre belirteçleri için pozitif kontrol olarak periferik kan kullanıldı (Virant-klum .I et al, 2008). 8 haftalık farelerin kalbinden EDTA'lı tüpe 4ml kan alındı. Kandan RNA izolasyonu yapmak üzere ilk önce lökositleri ayırmak için Ficoll protokolü uygulandı. 4ml kan pipetle çok yavaşça 4ml Ficoll üzerine aktarılıp 20 dakika, 3000 rpm, oda ısısında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra falkon tüpte 4 tabaka oluştu; üstten aşağıya doğru, plasma, lökositler, Ficoll ve alyuvarlar. Lökosit tabakası pipetle toplanıp başka

falkon tüpüne aktarılıp üzerine 5ml PBS ile hazırlanmış DEPC (Diethylpyrocarbonate) ilave edildikten sonra 10 dakika, 3000 rpm, oda ısısında santrifüj edildi. Lökositleri yıkamak için bu aşama iki kere yapıldı. Santrifüjden sonra tüpün dibinde pelet oluştuğu görüldü ve DEPC döküldükten sonra peletin üzerine 1000  l TRIzol koyulup pipetaj yapıldı ve daha iyice homojen olması için birkaç kere enjektörden geçirildi.

Kandaki lökositlerden RNA izolasyonu için aynen ovaryumdan RNA izole edildiği gibi TRIzol protokolü takip edildi. Kandan elde edilen RNA 30 l RNase Free suda üzülüp kantitatif olarak *Nanodrop* cihazı ile  l ld .

3.5. Ovaryum ve Kandan Elde Edilen Total RNA'ların Kalitatif Değerlendirilmesi

Total RNA'ların kalitatif değerlendirmesi için %1.2 agaroz jel kullanıldı. 8 ve 2 haftalık farelerin ovaryumundan elde edilen RNA'lar 1  g ve kandan elde edilen RNA 0.5  g olarak jele yüklendi ve 90 V'ta y r t l p *Gene Genius Bio İmaging System* cihazıyla görüntü alındı.

3.6. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* kullanıldı ve bu kitin standart protokolü takip edilerek cDNA sentez edildi. Kalıp olarak bütün ovaryum

örneklerinden 1µg RNA ve kandan 0.5 µg RNA kullanıldı. Aşağıda kullanılan kitin protokolü verilmiştir:

- 10x Reaction Buffer: 2 µl
- 25mM MgCl₂: 4 µl
- Oligo-p (dT)15 Primer: 2 µl
- AMV Reverse Transcriptase: 0.8 µl
- Deoxynucleotide Mix: 2 µl
- RNase Inhibitor: 1 µl

Distile su ve RNA miktarları örneklere bağlı olarak farklıdır ve toplam hacim 20 µl'dir. Reverse transkripsiyon aşağıdaki koşullarda *DNA Engine (PTC-200) Peltier Thermal Cycler* cihazı kullanılarak gerçekleştirildi:

- 25°C'de 10 dk. Primer bağlanması
- 42°C'de 60 dk. cDNA sentezi
- 99°C'de 5 dk. Denatürasyon

Yukarıdaki reaksiyon sonucunda 20 µl cDNA sentezlendi. Pipetaj hatasın en aza indirmek için cDNA örnekleri 40 µl'ye sulandırıldı (20 µl cDNA + 20 µl distile su = 40 µl).

3.7. Standart Eğri ve Amplifikasyon Verimliliği

Amplifikasyon verimliliğinin hesaplaması Real Time-PCR analizinde önemli aşamadır. Bağıl kantitasyon ölçümünde bu yöntem örneklerin karşılaştırmalı ifadenme düzeyinin hesaplanmasında kullanılır. Eğer amplifikasyon verimliliği hem referans gen ve hem hedef gen için 100% olursa, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılabilir (Pfaffl 2001).

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

$$E = 2^{(-1/eğim)}$$

Oct-4, Nanog, Sox2 ve GAPDH primerlerinin amplifikasyon verimliliğini (E) hesaplamak için cDNA'lardan karışım yaparak 2 kez sulandırma yapıldı (1-1/64).

3.8. Isı Döngüsü PCR ile Elde Edilen cDNA'lar GAPDH Geni (*Housekeeping Gen*) ile Kontrol Edilmesi

Aşağıdaki protokol uygulanarak PCR kuruldu:

- Buffer: 2.5 µl
- MgCl₂: 1.5 µl
- Forward Primer (10pmol/ µl): 1 µl
- Reverse Primer (10pmol/ µl): 1 µl
- dNTP: 0.5 µl
- Taq Polymerase: 0.2 µl
- cDNA: 1 µl
- Distile Su: 17.3 µl

Toplam Hacim: 25 µl

PCR aşağıdaki koşullarda ve 30 döngüde kuruldu:

- 95°C'de 5 dk. Başlangıç denatürasyonu takiben
 - 95°C'de 30 sn. Denatürasyon
 - 60°C'de 30 sn. Primer bağlanması
 - 72°C'de 30 sn. Uzama
 - 72°C'de 5 dk
- } 30 döngü

3.9. Isı Döngüsü PCR ile Oct-4 ve Nanog Genin İfadesi Ovaryum ve Kan Örneklerinde Araştırılması

Bu amaç için pozitif kontrol olarak kan ve iki grup ovaryumdan birer örnek (2 haftalıktan üçüncü örnek ve 8 haftalıktan birinci örnek) seçilip aşağıdaki protokol uygulanarak PCR kuruldu:

- Buffer: 2.5 µl
- MgCl₂: 1.5 µl
- Forward Primer (10pmol/ µl): 1 µl
- Reverse Primer (10pmol/ µl): 1 µl
- dNTP: 0.5 µl
- Taq Polymerase: 0.2 µl
- cDNA: 1 µl
- Distile Su: 17.3 µl

Toplam Hacim: 25 µl

PCR aşağıdaki koşullarda ve 35 döngüde kuruldu:

- 95°C'de 5 dk. Başlangıç denatürasyonu takiben
 - 95°C'de 30 sn. Denatürasyon
 - 55°C'de 30 sn. Primer bağlanması
 - 72°C'de 30 sn. Uzama
- } 35 döngü

3.10. Eş Zamanlı PCR

Deneylede tüm cDNA örnekleri ve standart örnekler aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışılarak bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanılmıştır. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları azaltmaktır. Seçilen zaman noktalarında eksprese olan *housekeeping* gen miktarı, 2 ve 8 haftalık örnekler arasında ifade düzeyleri karşılaştırılarak incelendi.

qRT-PCR koşulları:

- 2X SYBR Green karışımı: 10 µl
- Forward primer (10pmol/ µl): 0.8 µl
- Reverse primer (10pmol/ µl): 0.8 µl
- Distile su: 7.4 µl
- cDNA: 1µl

20 µl Real Time-PCR reaksiyonu *Roche LightCycler 480* cihazında 45 döngüde GAPDH, Oct-4 ve Sox2 geni için ve 40 döngüde Nanog geni için gerçekleştirildi.

- 95°C 5 dk. Başlangıç denatürasyonu takiben
 - 95°C 30 sn. Denatürasyon
 - 55°C 30 sn. Primer bağlanması
 - 72°C 30 sn. Uzama
- } 45 döngü (Oct-4 ve Sox2)/40 döngü (Nanog)

3.11. Primer Tasarımı

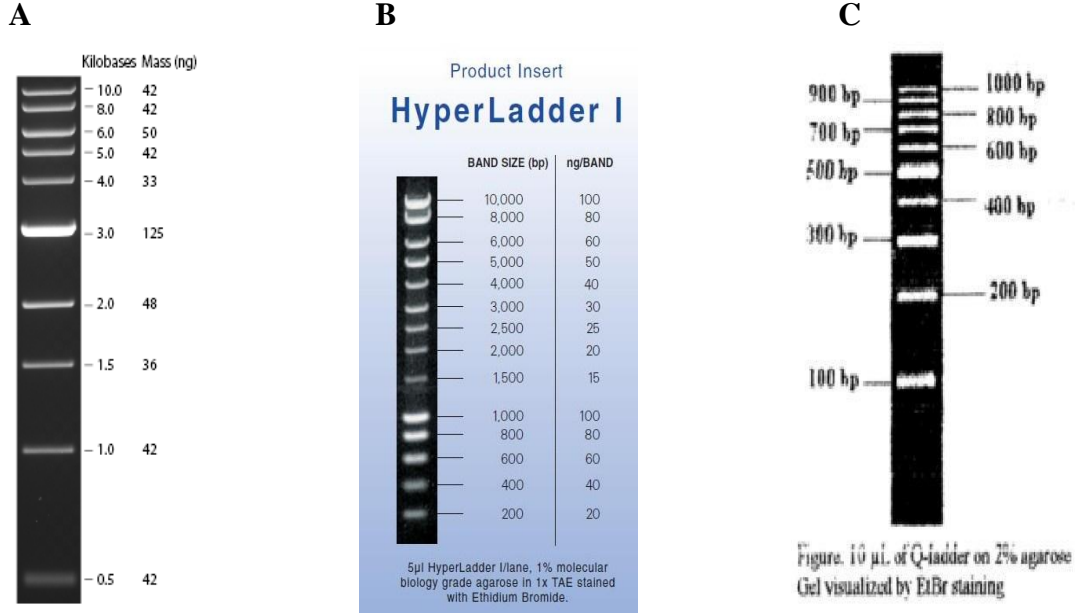
Oct-4, Nanog ve GAPDH primerlerinin tasarımı için *primer.exe* programı kullanıldı. Sox2 primer dizisi, Zour et al. (2009) makalesinden alındı (Çizelge 3.10.1.).

Real Time-PCR için kullanılan primerlerin dizileri, uzunlukları, ürün boyutu ve fonksiyonu				
Gen	Primer	bç	Ürün boyutu	Fonksiyon
Oct-4	Forward: AGGAAGCCGACAACAATGAG Reverse: CTGATTGGCGATGTGAGTGA	20	173	Marker
Nanog	Forward: AGCAGATGCAAGAACTCTCC Reverse: CAGATGCGTTCACCAGATAG	20	207	Marker
Sox2	Forward: TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA Reverse: TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA	23	297	Marker
GAPDH	Forward: ATGGTGAAGGTCGGTGTGAA Reverse: CCTTGACTGTGCCGTTGAAT	20	178	Referans kontrol (<i>Housekeeping</i> gen)

Çizelge 3.10.1. Oct-4, Nanog, Sox2 ve GAPDH genleri için kullanılan primerler.

3.12. Elektrophorez Jel Görüntülerinde Kullanılan Markerler

Jelde yürütülen RNA veya DNA'ların boyutunu belirlemek için farklı markerler kullanılmaktadır. Bu araştırmada kullanılan markerler Şekil 3.11.1'de verilmiştir.



Şekil 3.11.1. Elektrophorez jel görüntülerinde kullanılan markerler. A. 500 bç. B. 200 bç. C. 100 bç.

3.13. İmmün Boyama

3.13.1. Kryo kesit alma işlemi

Ovaryum dokusu *Cryomatrix* maddesine gömülüp daha sonra -20°C 'de *Shandon Cryotome SME* cihazıyla bu dokudan $8\ \mu\text{m}$ kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Poli-L-lizin kaplı lam üzerine alındıktan sonra daha önceden -20°C 'de soğutulmuş saf asetonla oda ısısında tespit edilip boyama aşamasına kadar 4°C 'de saklandı.

3.13.2. Antikor boyama

Kesitler 4°C 'den çıkarılıp 2x5 dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS) ile yıkandı ve alttaki protokole göre boyama işlemi yapıldı:

- Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizildi.
- Bloklama: Kesitler üzerine sığır serum albümini (1%)-fosfat tampon solüsyonu-0.5% triton-x (BSA-PBST) damlatılarak 30 dakika bekletildi.
- Blok solüsyonu PBS ile hafifçe yıkanıp uzaklaştırıldı ve her kesit üzerine uygun şekilde dilüsyonu yapılmış (Oct-4: %4, Nanog: %1, Sox2: %0.05) 50 μl primer antikor damlatılıp kapalı nemli kutuda 1 gece boyunca 4°C 'de bekletildi.
- PBS+Tween (0.05%) solüsyonu ile 3x5 dakika yıkandı.
- Her kesit üzerine 50 μl hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor (%0.1) damlatılıp kapalı nemli kutuda 1 saat oda ısısında bekletildi.
- PBS+Tween solüsyonu ile 3x5 dakika yıkandı.
- DAPI boyası içeren kapatma medyumu (*VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI*) kullanılarak kesitler lamel ile kapatıldı.

Görüntüler *Carl Zeiss Axio Imager M1* floresan mikroskopuyla alındı.

3.13.3. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar

Bu araştırmada kullanılan primer ve sekonder antikorların üretildiği firma ve katalog numaraları Çizelge 3.13.3.1’de verilmiştir.

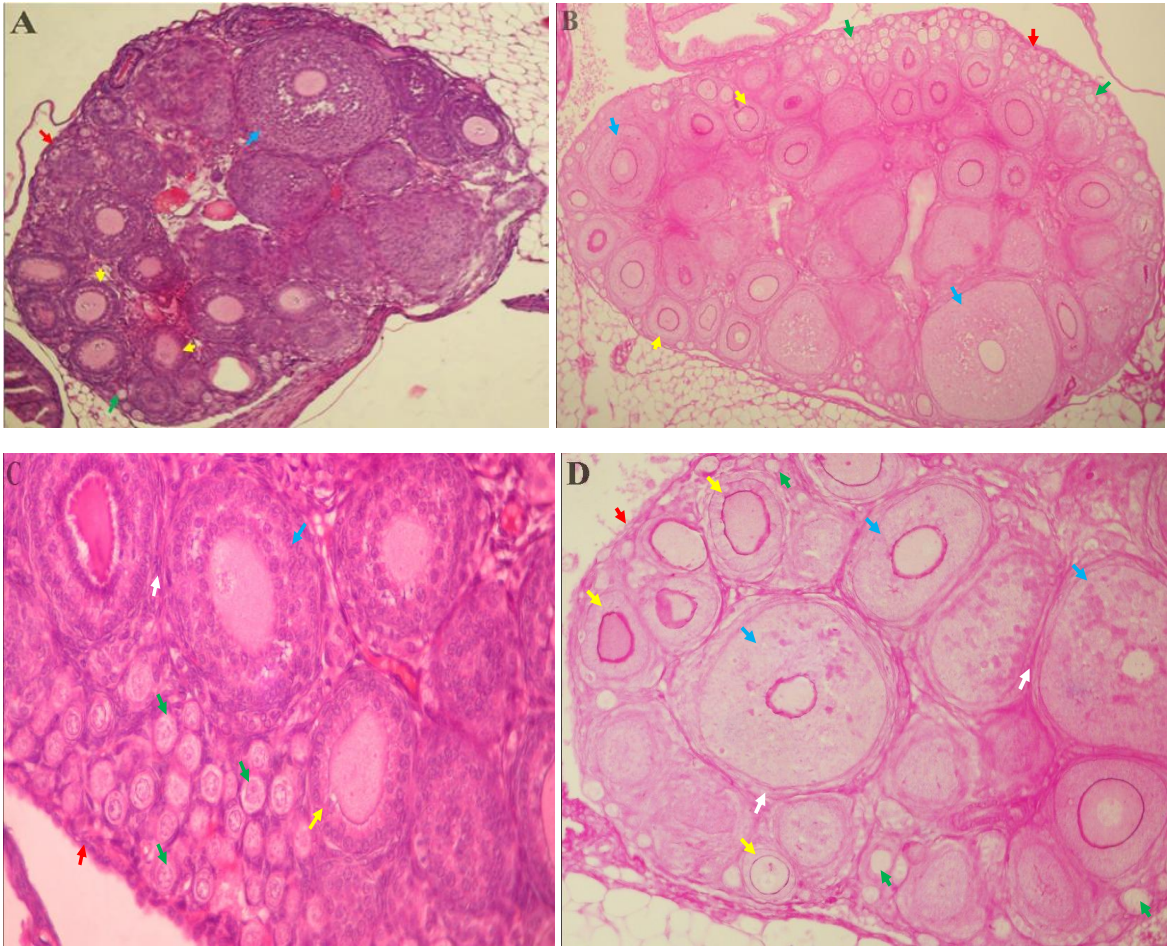
Antikor	Katalog Numara	Firma
Oct4 (primer antikor)	ab18976	Abcam
Nanog (primer antikor)	ab80892	Abcam
SOX2 (primer antikor)	ab59776	Abcam
Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (sekoner antikor)	A-11037	Invitrogen

Çizelge 3.13.3.1. Kullanılan primer ve sekonder antikorlar

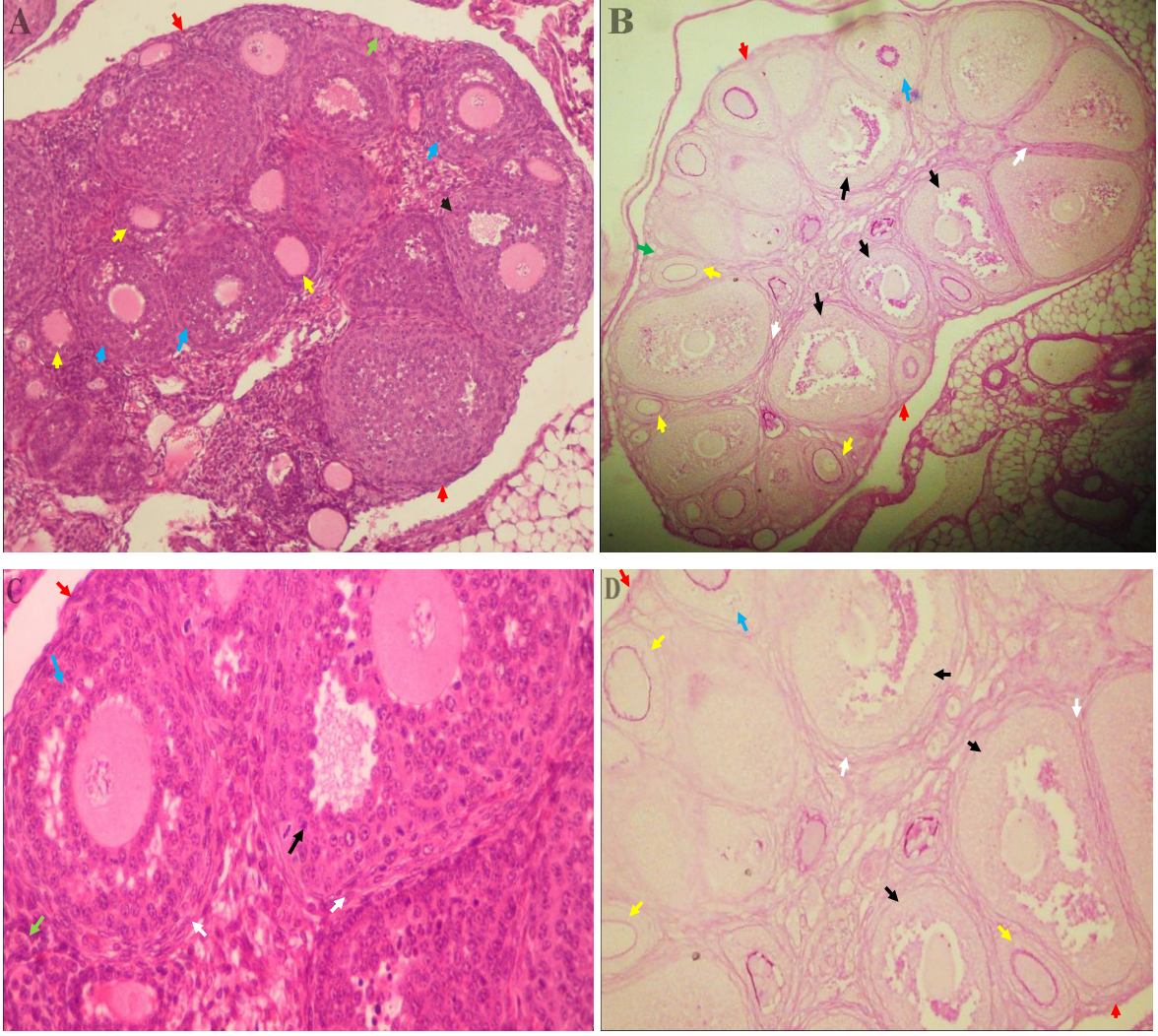
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Histolojik İnceleme

İki ve sekiz haftalık ovaryumlar HE ve PAS yöntemleriyle boyandıktan sonra morfolojik olarak incelendi. Ovaryum yüzey epiteli hücreleri, korteks bölgesindeki primordiyal, primer ve sekonder folliküllerin normal olduğu izlendi (Şekil 4.1.1-2.).



Şekil 4.1.1. İki haftalık ovaryumda HE ve PAS boyama görüntüleri. A. HE (Büyütme x10) **B.** PAS (Büyütme x10) **C.** HE (Büyütme x40) **D.** PAS (Büyütme x40). Primordiyal folliküller (yeşil ok), Primer folliküller (sarı ok), Çok katlı primer folliküller (mavi ok), Teka hücreleri (beyaz ok), epitel (kırmızı ok)



Şekil 4.1.2. Sekiz haftalık ovaryumda HE ve PAS boyama görüntüleri. A. HE (Büyütme x10) B. PAS (Büyütme x10) C. HE (Büyütme x40) D. PAS (Büyütme x40). Primordial follüküller (yeşil ok), Primer follüküller (sarı ok), Çok katlı primer follüküller (mavi ok), sekonder follüküller (siyah ok), Teka hücreler (beyaz ok), epitel (kırmızı ok)

4.2. Real Time-PCR

4.2.1. Ovarum ve kandan elde edilen RNA'ların kantitatif sonuçları

8 Haftalık örnekler:

- 1 inci örnek: 443.4 ng/ μ l
- 2 inci örnek: 759.8 ng/ μ l
- 3 üncü örnek: 759.2 ng/ μ l
- 4 üncü örnek: 445.4 ng/ μ l

2 Haftalık örnekler:

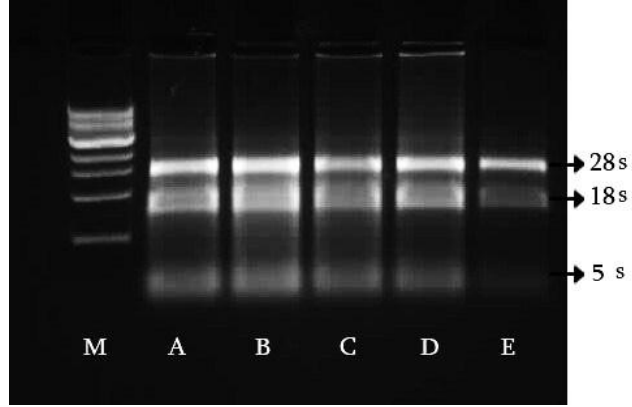
- 1 inci örnek: 322.6 ng/ μ l
- 2 inci örnek: 382.1 ng/ μ l
- 3 üncü örnek: 364.9 ng/ μ l
- 4 üncü örnek: 353.4 ng/ μ l

Kan:

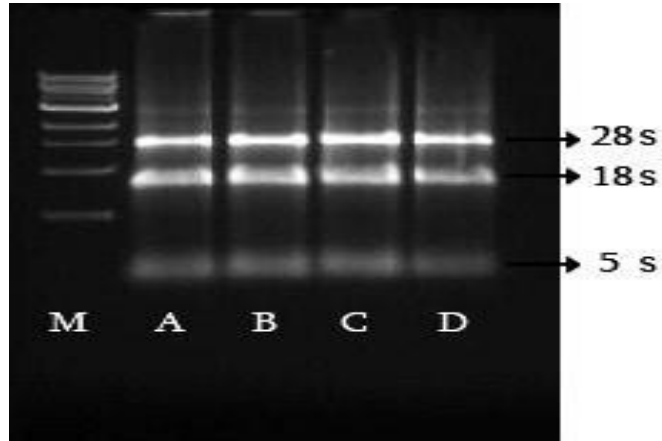
- 108.5 ng/ μ l

4.2.2. Ovaryun ve kandan elde edilen total RNA'ların kalitatif sonuçları

Total RNA'ların kalitatif değerlendirilmesi için elde edilen RNA'lar (1 µg) %1.2 agaroz jelde ve 90 V'ta yürütülmüştür (Şekil 4.2.2.1-2.).



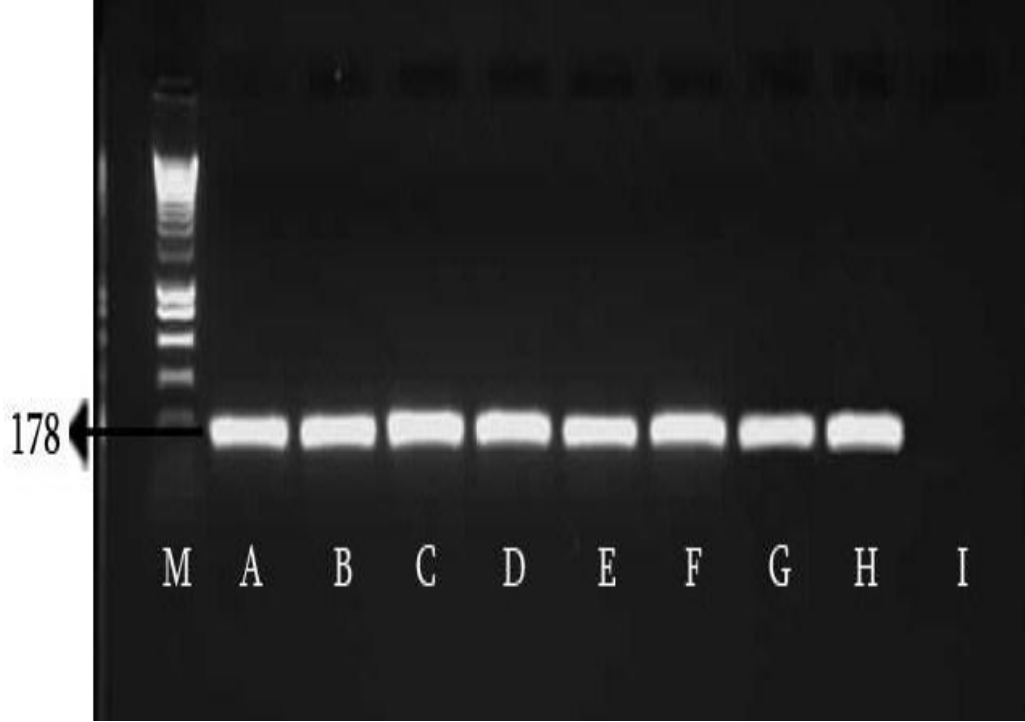
Şekil 4.2.2.1. Sekiz haftalık ve kan örneklerinden elde edilen total RNA'ların agaroz jel görüntüsü. M. Marker (500 bç) A. Birinci örnek B. İkinci örnek C. Üçüncü örnek D. Dördüncü örnek E. Kan



Şekil 4.2.2.2. İki haftalık örneklerinden elde edilen total RNA'ların agaroz jel görüntüsü. M. Marker (500 bç) A. Birinci örnek B. İkinci örnek C. Üçüncü örnek D. Dördüncü örnek

4.2.3. Elde edilen cDNA'ların GAPDH geniyle ısı döngüsü PCR'da kontrol edilmesi

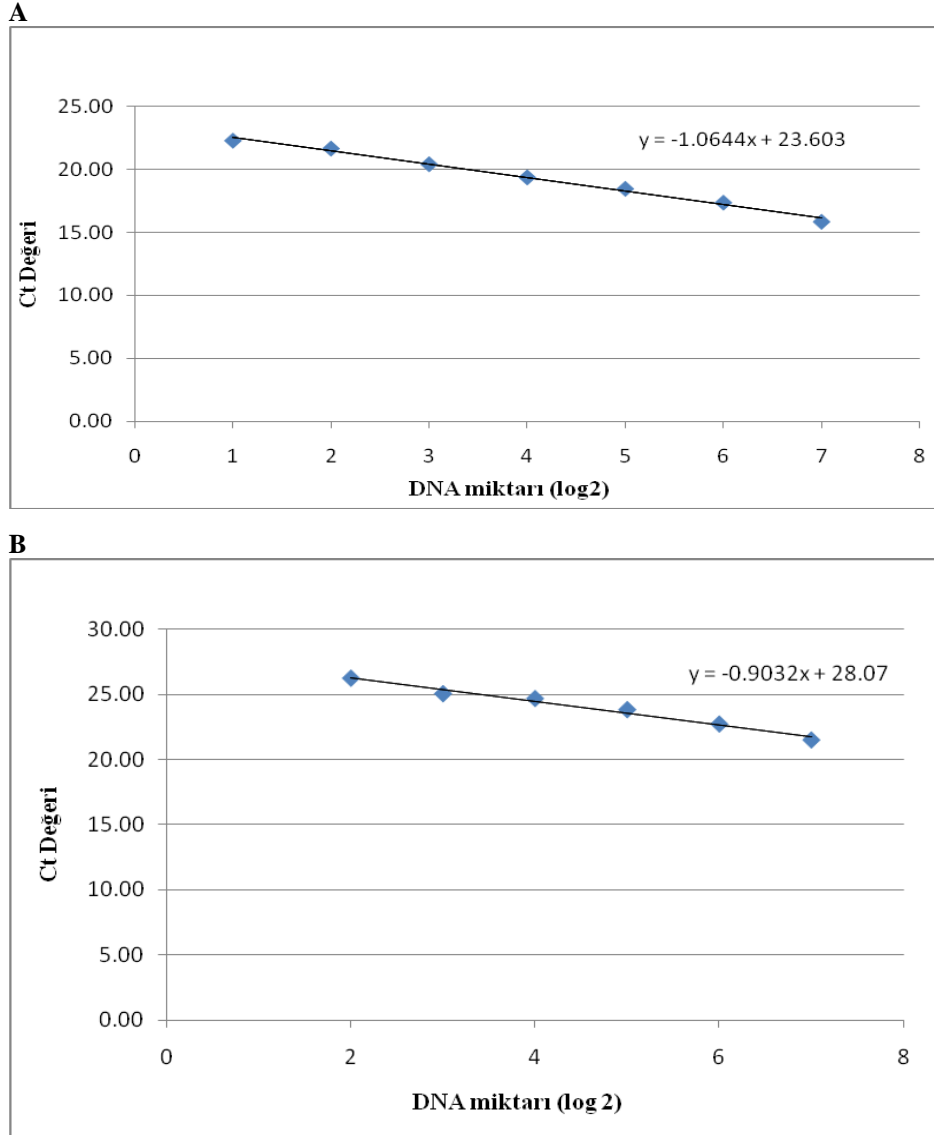
Elde edilen PCR ürünleri (cDNA) %1.5 agaroz jelinde ve 90V'ta yürütüldükten sonra 178 bç. uzunluğunda beklenen GAPDH geni gözlemlendi (Şekil 4.2.3.1.).



Şekil 4.2.3.1. İki ve sekiz haftalık ovaryumlardan elde edilen cDNA'larının GAPDH geniyle kontrol edilmesi. M. marker (200 bç) A. 2 haftalık, birinci örnek B. 2 haftalık, ikinci örnek C. 2 haftalık üçüncü örnek D. 2 haftalık, dördüncü örnek E. 8 haftalık, birinci örnek F. 8 haftalık, ikinci örnek G. 8 haftalık, üçüncü örnek H. 8 haftalık, dördüncü örnek I. Negatif kontrol

4.2.4. Standart eğri ve amplifikasyon verimliliği inceleme sonucu

Hedef ve referans genlerinin amplifikasyon verimliliğinde hiçbir engelleyici etki gözlenmedi ($E=2.0$). Bu nedenle bütün hesaplamalar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülün kullanılarak yapıldı. Örnek olarak GAPDH ve Oct-4 genlerinin grafiği verilmiştir (Şekil 4.2.4.1.).

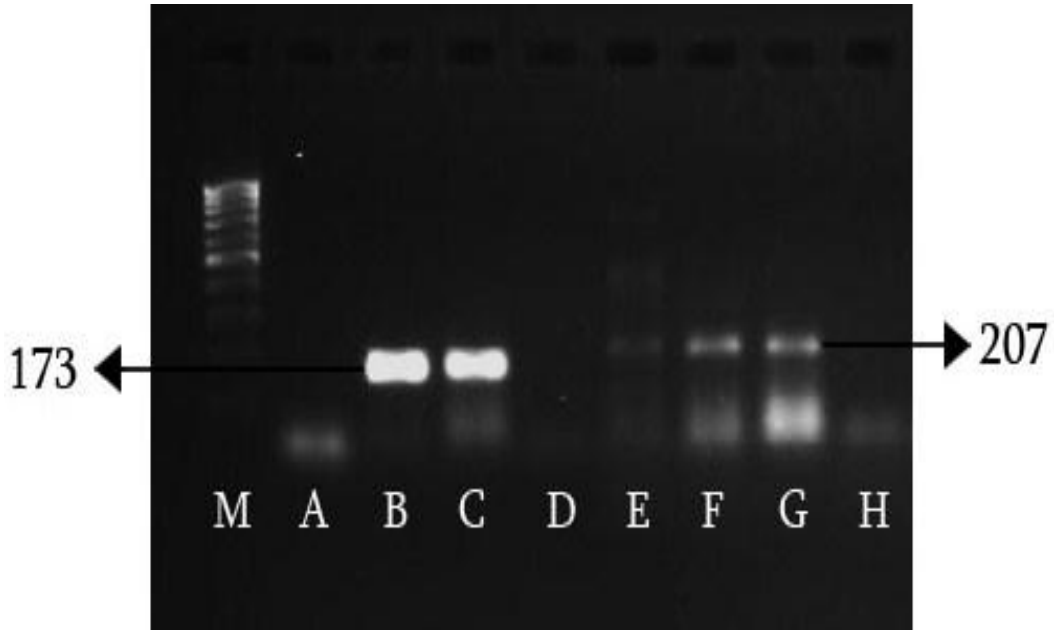


Şekil 4.2.4.1. Amplifikasyon verimliliğini hesaplamak için Oct4 ve GAPDH genlerinin standart eğrisi.

A. GAPDH B. Oct-4

4.2.5. RT-PCR yöntemiyle Oct-4 ve Nanog genlerinin ifade varlığının ovaryum ve kan örneklerinde incelenmesi

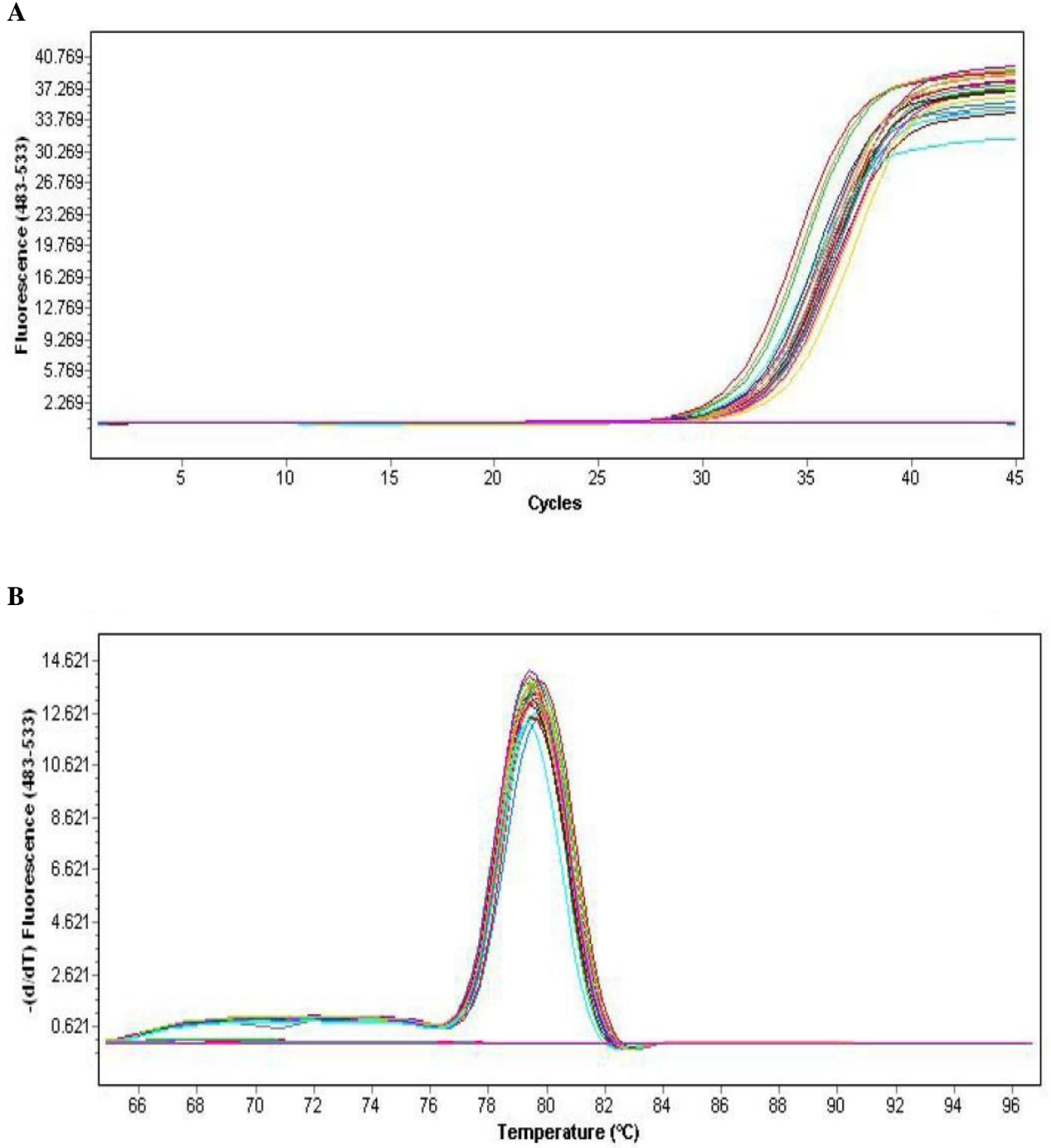
Elde edilen RT-PCR ürünleri %2 agaroz jelde ve 90V'ta yürütüldükten sonra 173 bç. uzunluğunda Oct-4 geni ve 207 bç. uzunluğunda Nanog geninin varlığı kan ve ovaryum örneklerinde incelendi. Jel görüntüsünden elde edilen sonuçlara göre, 2 ve 8 haftalık ovaryumlarda Oct-4 ve Nanog geninin varlığı tespit edildi. Kanda ise sadece Nanog geni gözlemlendi (Şekil 4.2.5.1.).



Şekil 4.2.5.1. İki haftalık, Sekiz haftalık ve kan örneklerinde Oct-4 ve Nanog genlerinin RT-PCR yöntemiyle araştırma sonucu. M. Marker (200 bç) A) Oct-4 geni kanda B. Oct-4 geni 2 haftalık ovaryumda C. Oct-4 geni 8 haftalık ovaryumda D. Oct-4 geni için negatif kontrol E. Nanog geni kanda F. Nanog geni 2 haftalık ovaryumda G. Nanog geni 8 haftalık ovaryumda H. Nanog geni için negatif kontrol

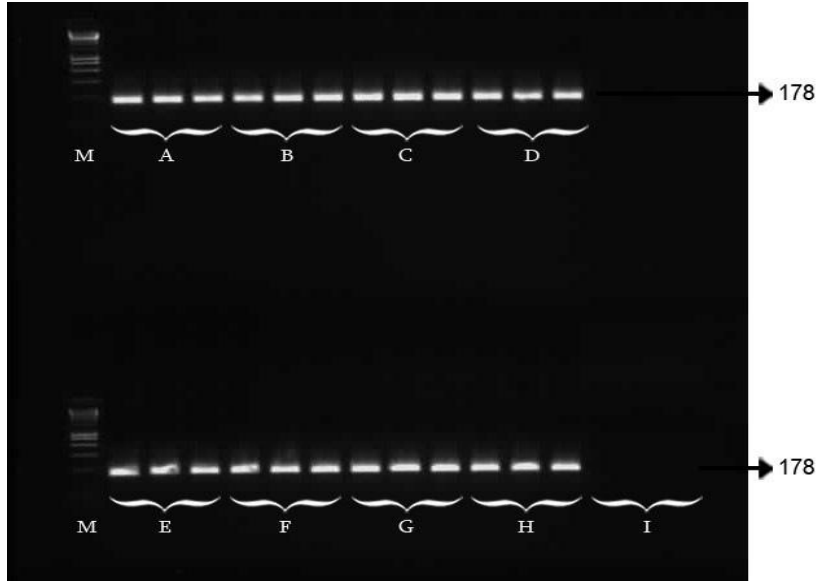
4.2.6. Real Time-PCR sonuçları

Real Time-PCR reaksiyonu sonucunda her gen için amplifikasyon eğrisi ve erime piki gözlemlendi. Şekil 4.2.6.1’de örnek olarak Sox2 geni verilmiştir.

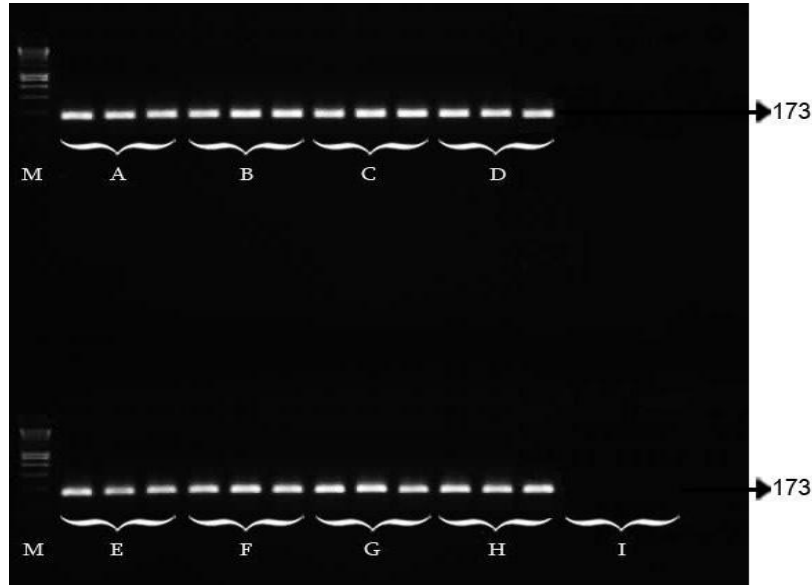


Şekil 4.2.6.1. Sox2 geninin amplifikasyon eğrisi (A) ve erime piki (B)

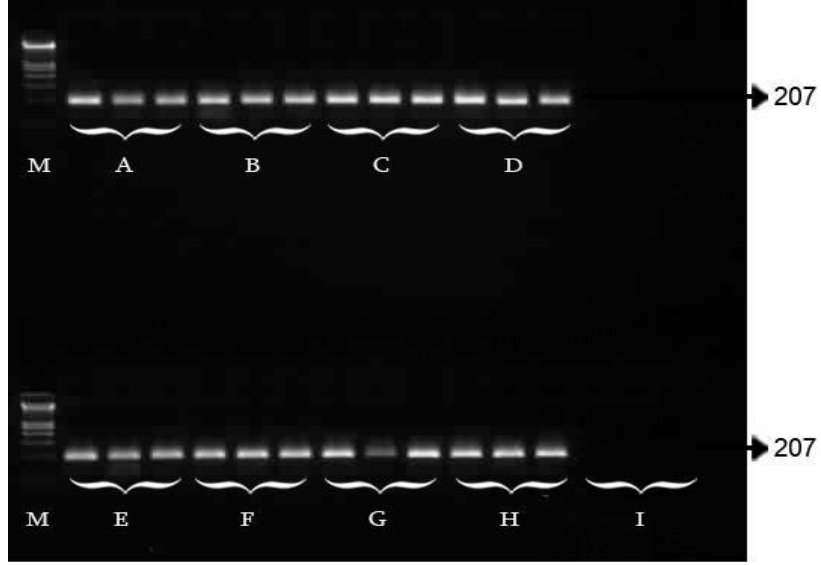
Elde edilen Real Time-PCR ürünleri %2 agaroz jelinde, 90 V'ta yürütüldükten sonra alttaki görüntülere ulaşıldı. (Şekil 4.2.6.2-5.).



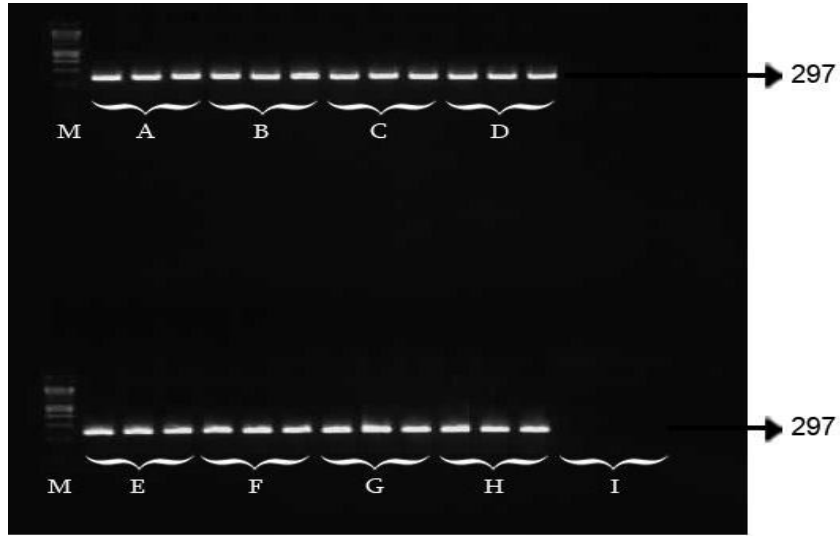
Şekil 4.2.6.2. GAPDH geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü. M. Marker (200 bç) **A.** 2 haftalık 1 inci örnek **B.** 2 haftalık 2 inci örnek **C.** 2 haftalık 3 üncü örnek **D.** 2 haftalık 4 üncü örnek **E.** 8 haftalık 1 inci örnek **F.** 8 haftalık 2 inci örnek **G.** 8 haftalık 3 üncü örnek **H.** 8 haftalık 4 üncü örnek **I.** Negatif kontrol



Şekil 4.2.6.3. Oct-4 geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü. M. Marker (200 bç) **A.** 2 haftalık 1 inci örnek **B.** 2 haftalık 2 inci örnek **C.** 2 haftalık 3 üncü örnek **D.** 2 haftalık 4 üncü örnek **E.** 8 haftalık 1 inci örnek **F.** 8 haftalık 2 inci örnek **G.** 8 haftalık 3 üncü örnek **H.** 8 haftalık 4 üncü örnek **I.** Negatif kontrol



Şekil 4.2.6.4. Nanog geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü. M. Marker (200 bç) A. 2 haftalık 1 inci örnek B. 2 haftalık 2 inci örnek C. 2 haftalık 3 üncü örnek D. 2 haftalık 4 üncü örnek E. 8 haftalık 1 inci örnek F. 8 haftalık 2 inci örnek G. 8 haftalık 3 üncü örnek H. 8 haftalık 4 üncü örnek I. Negatif kontrol



Şekil 4.2.6.5. Sox2 geni için agaroz jelinde yürütülen Real Time-PCR ürünlerinin görüntüsü. M. Marker (200 bç) A. 2 haftalık 1 inci örnek B. 2 haftalık 2 inci örnek C. 2 haftalık 3 üncü örnek D. 2 haftalık 4 üncü örnek E. 8 haftalık 1 inci örnek F. 8 haftalık 2 inci örnek G. 8 haftalık 3 üncü örnek H. 8 haftalık 4 üncü örnek I. Negatif kontrol

4.2.7. Real Time-PCR sonuçlarının istatistiksel analizi

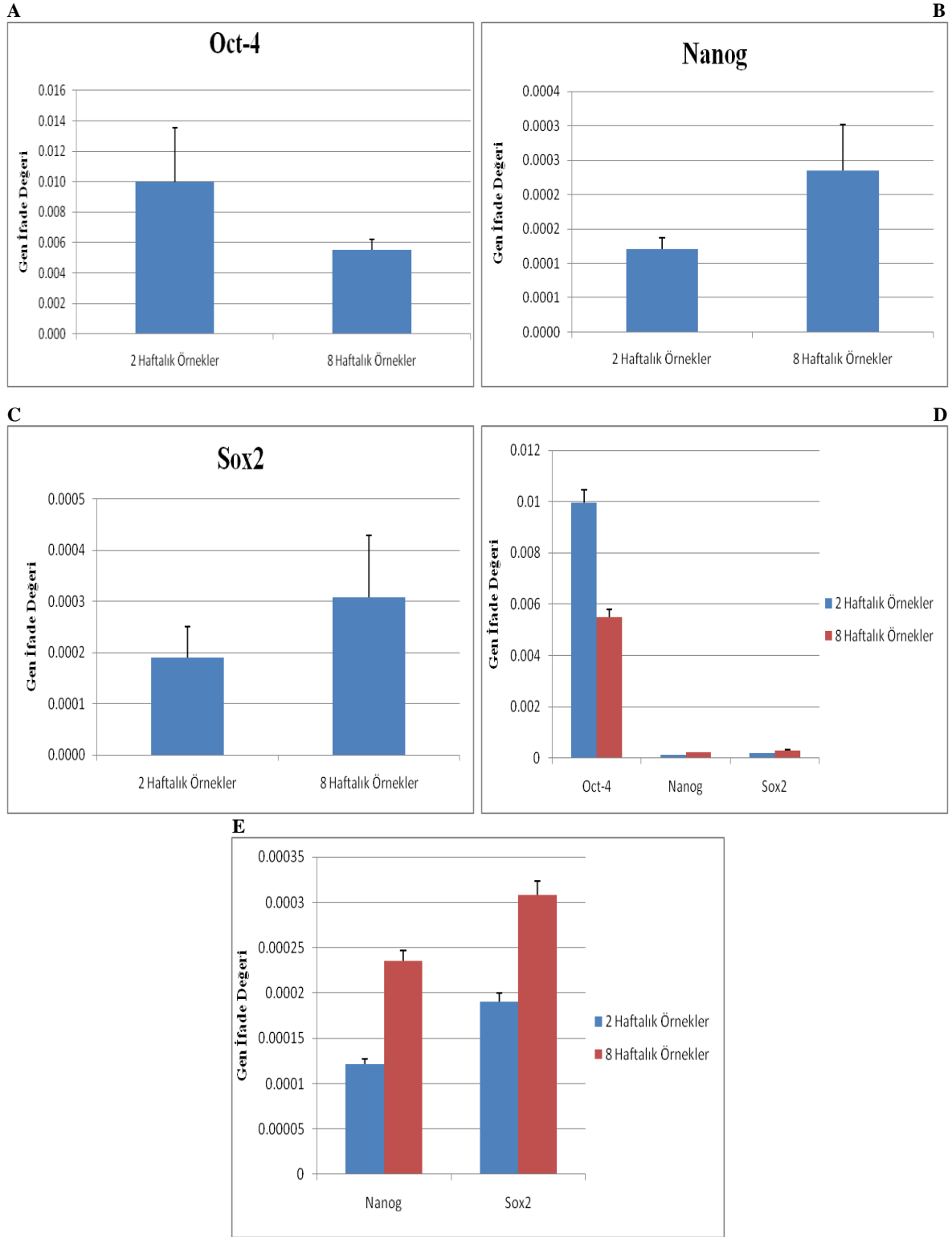
Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, qRT-PCR sonuçları *Roche LightCycler 480* yazılımı ile kantite edilmiş. Verilerin istatistiksel analizi *SPSS 15.0* yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin verileri GAPDH geniyle normalize edilip $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülünden çıkan verilerle istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Yapılan T-Test analizine göre (Çizelge 4.2.7.1.) Oct-4 ve Nanog genlerinin ifade düzey farkı 2 ve 8 haftalık yaş grupları arasında anlamlı olmuştur ($p \leq 0.05$). Sox2 geninin ifade düzeyinde ise iki grup arasında kayda değer fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Oct-4 genini ifade seviyesi 2 haftalık guruplarda daha fazlayken Nanog genin ifade seviyesi 8 haftalık guruplarda daha fazla olmuştur. Ayrıca, Oct-4 geninin ekspresyon miktarı her iki grupta Nanog ve Sox2 genlerine karşı daha fazladır (Şekil 4.2.7.2.).

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
oct	Equal variances assumed	13,848	,010	2,447	6	,050	,004	,002	,000	,009
	Equal variances not assumed			2,447	3,229	,086	,004	,002	-,001	,010
nanog	Equal variances assumed	3,891	,096	-3,273	6	,017	,000	,000	,000	,000
	Equal variances not assumed			-3,273	3,333	,040	,000	,000	,000	,000
sox2	Equal variances assumed	1,291	,299	-1,678	6	,144	,000	,000	,000	,000
	Equal variances not assumed			-1,678	4,385	,162	,000	,000	,000	,000

NPART TESTS

```
/M-W= oct nanog sox2 BY grup(1 2)
/MISSING ANALYSIS.
```

Çizelge 4.2.7.1. SPSS yazılımıyla Real Time-PCR sonuçları için yapılan T-Test analizi. Her gen için p değerleri (kutucuk içinde) hesaplanmıştır



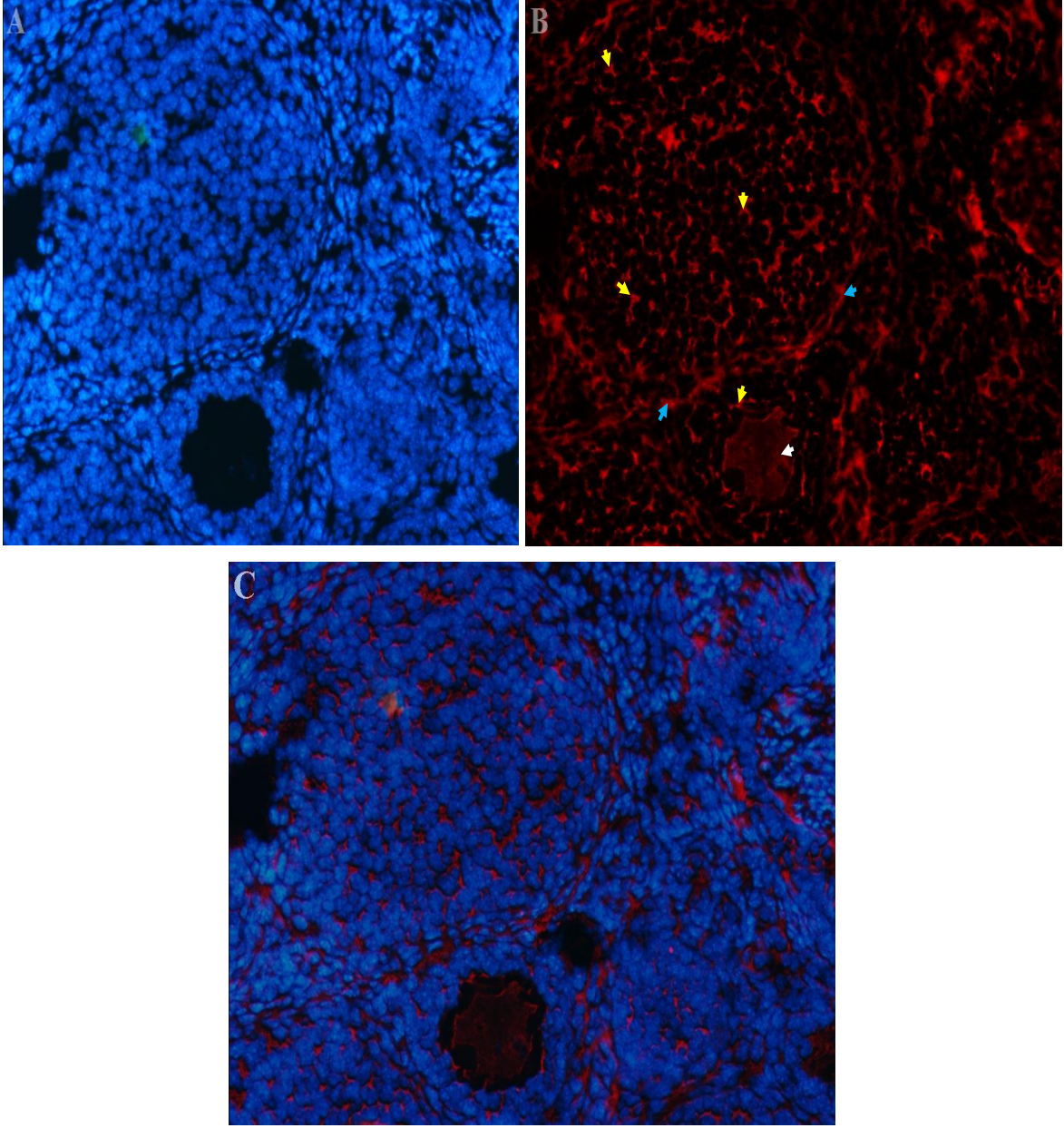
Şekil 4.2.7.1. Real Time-PCR sonuçlarının iki ve sekiz haftalık örnekler için grafikleri. A. Oct-4 geninin ifade düzeyi B. Nanog geninin ifade düzeyi C. Sox2 geninin ifade düzeyi D. Oct-4, Nanog ve Sox2 genlerinin ifade seviyesi her iki yaş gurubunda E. Nanog ve Sox2 genlerinin ifade seviyesi her iki yaş gurubu arasında

4.3. İmmünohistokimyasal Boyama

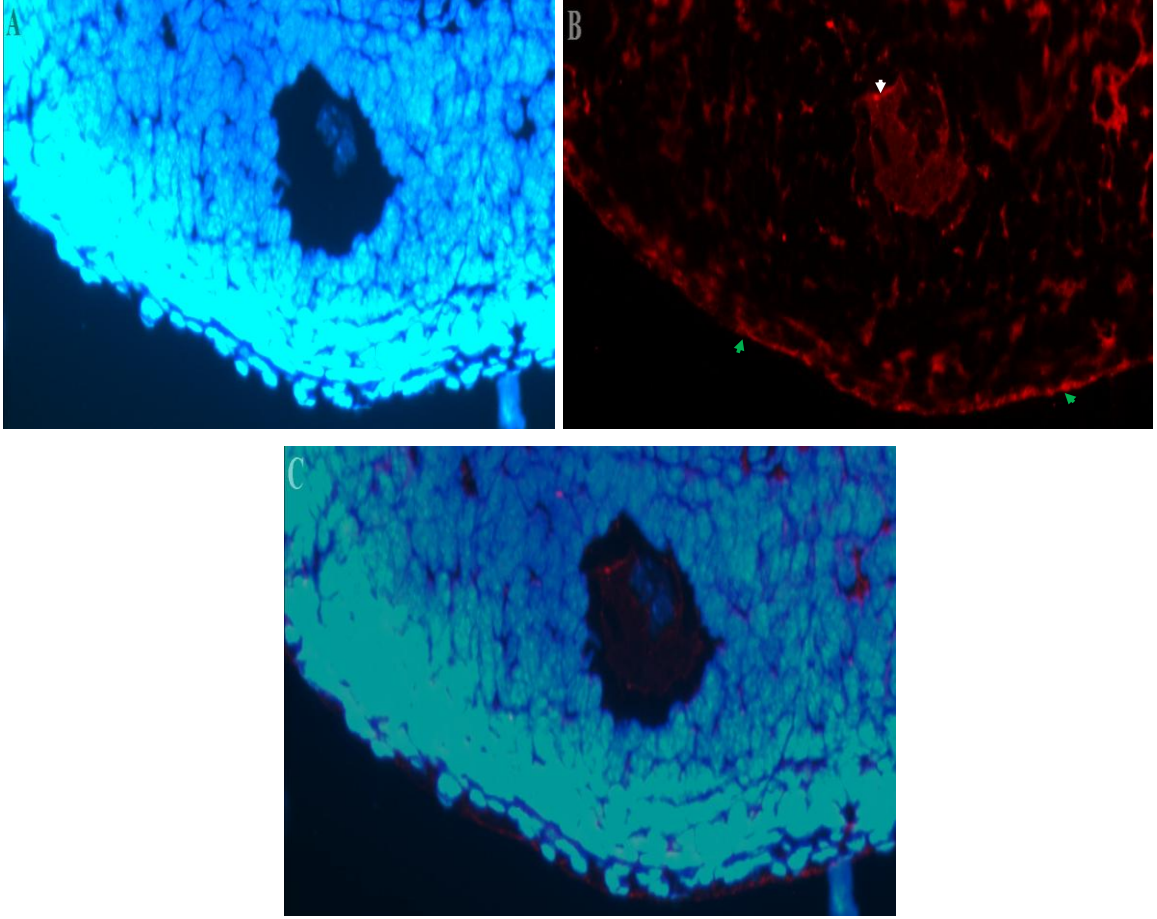
Oct-4 proteini her iki grup içinde ovaryumun epitel hücrelerinin sitoplazmasında, folliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında gözlemlendi (Şekil 4.3.1-5.).

Nanog proteini sadece oosit çekirdeğinde gözlemlendi (Şekil 4.3.6-9.). 8 haftalık örneklerde 2 haftalıklara göre daha yüksek sinyal vardı ve bu sonuç Real Time-PCR analizlerine uyumaktadır.

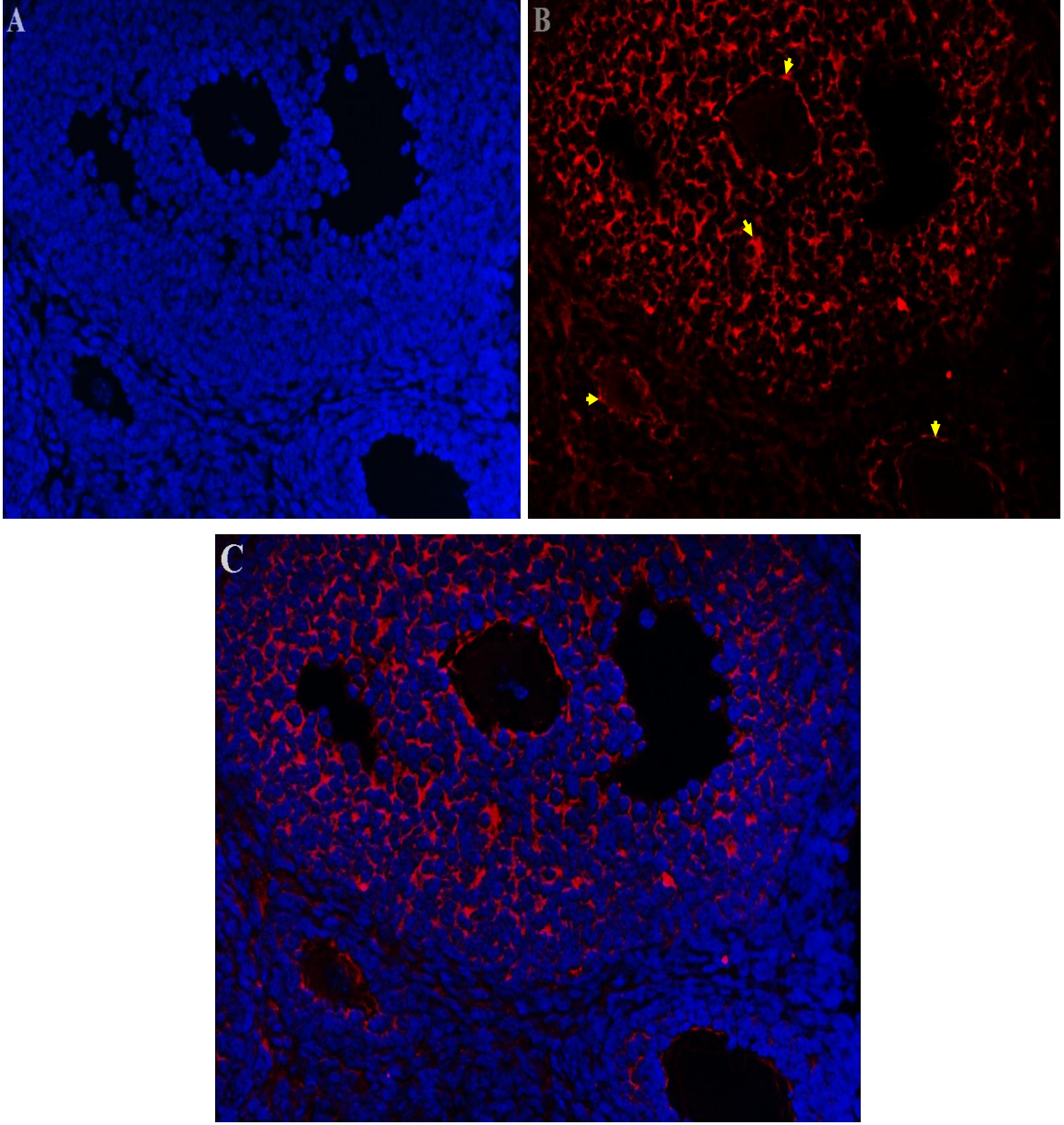
Sox2 proteini ovaryumun epitel hücrelerinin sitoplazmasında, granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit çekirdeğinin çevresinde ve sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında tespit edildi (Şekil 4.3.10-14.).



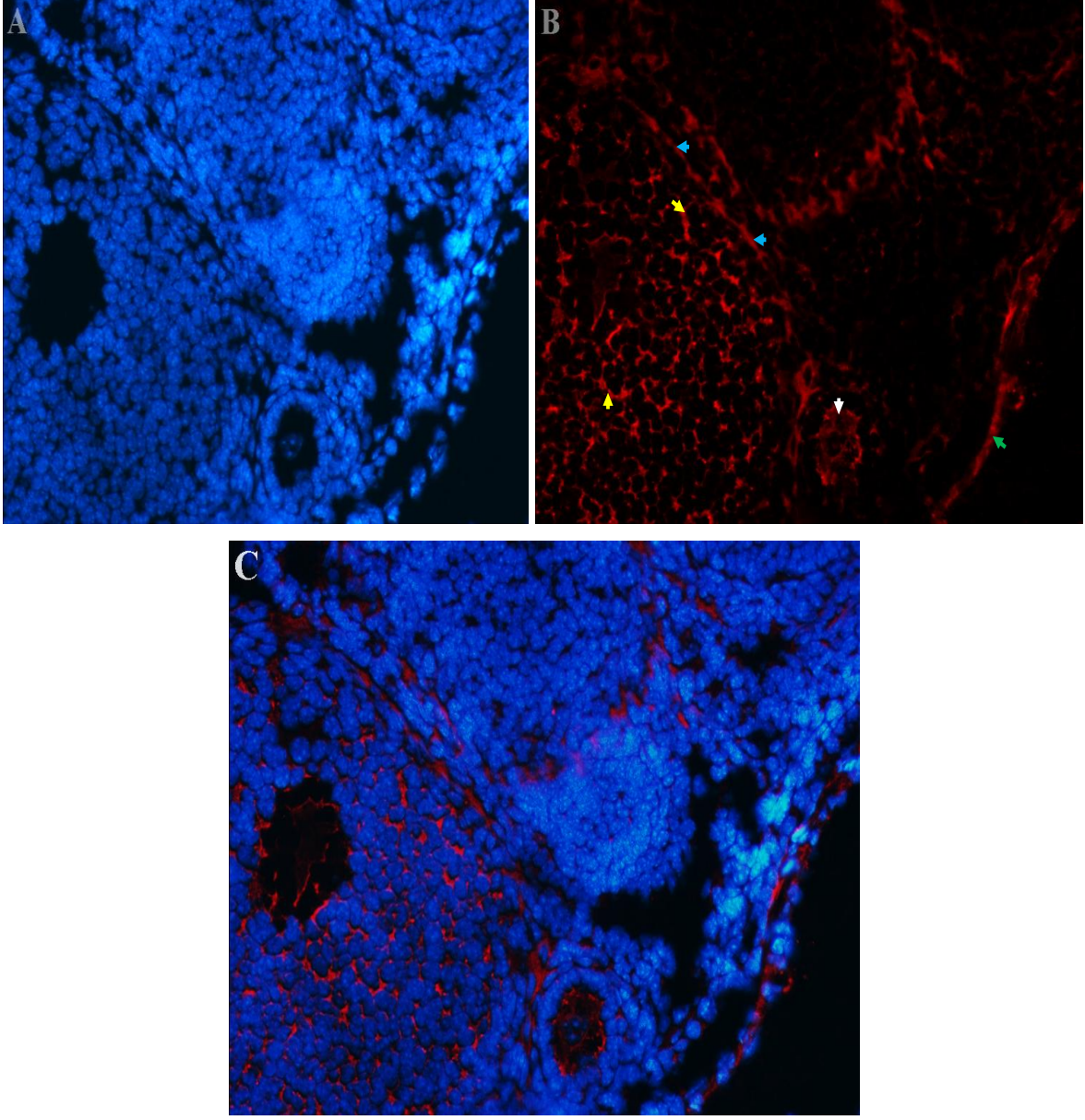
Şekil 4.3.1. İki haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Oct-4; granüloza hücreleri (sarı ok), teka hücreleri (mavi ok), oosit sitoplazması (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x40)



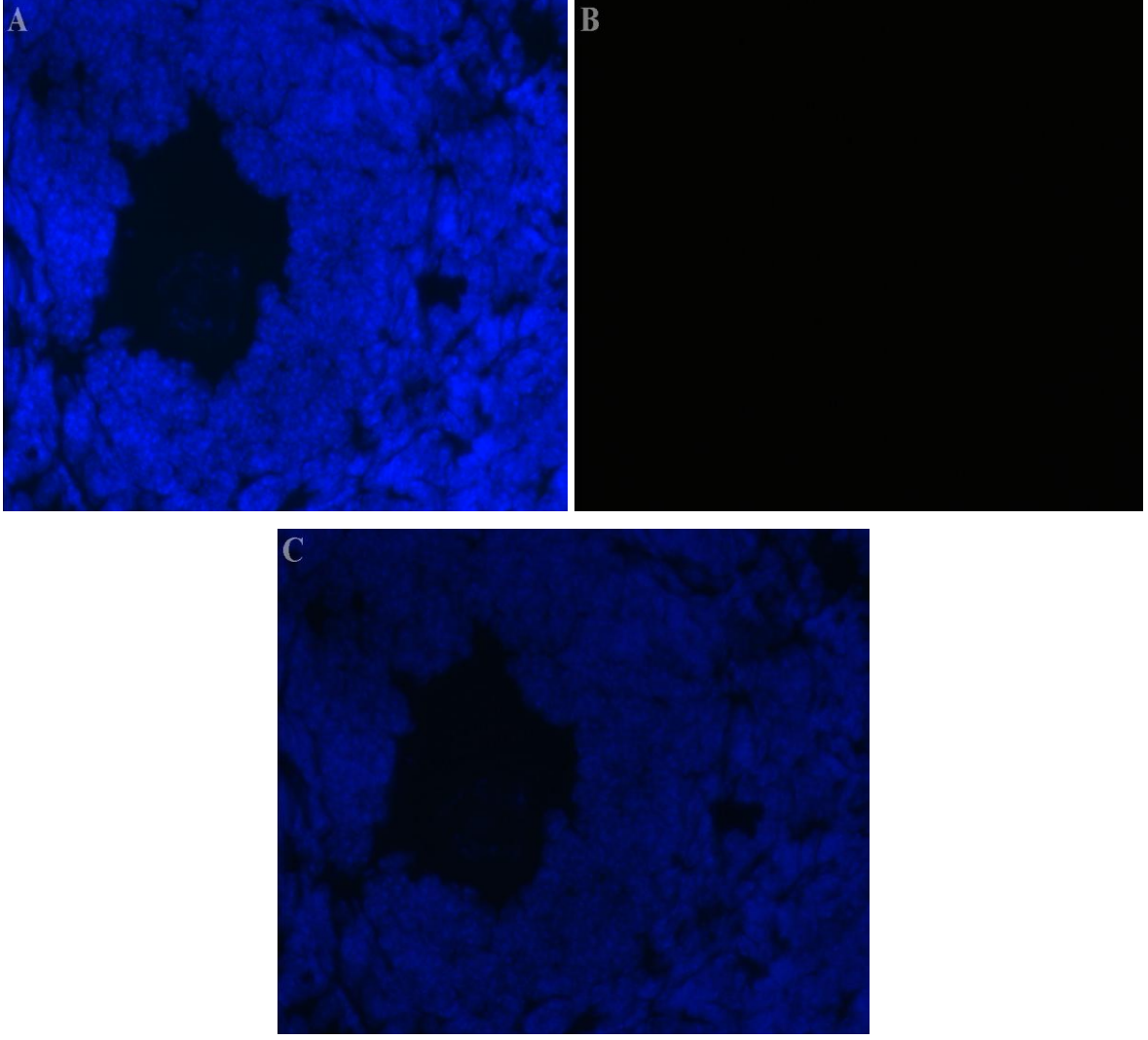
Şekil 4.3.2. İki haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Oct-4; oosit sitoplazması (beyaz ok), epitel hücreleri (yeşil ok) C. Birleşik. (Büyütme x20)



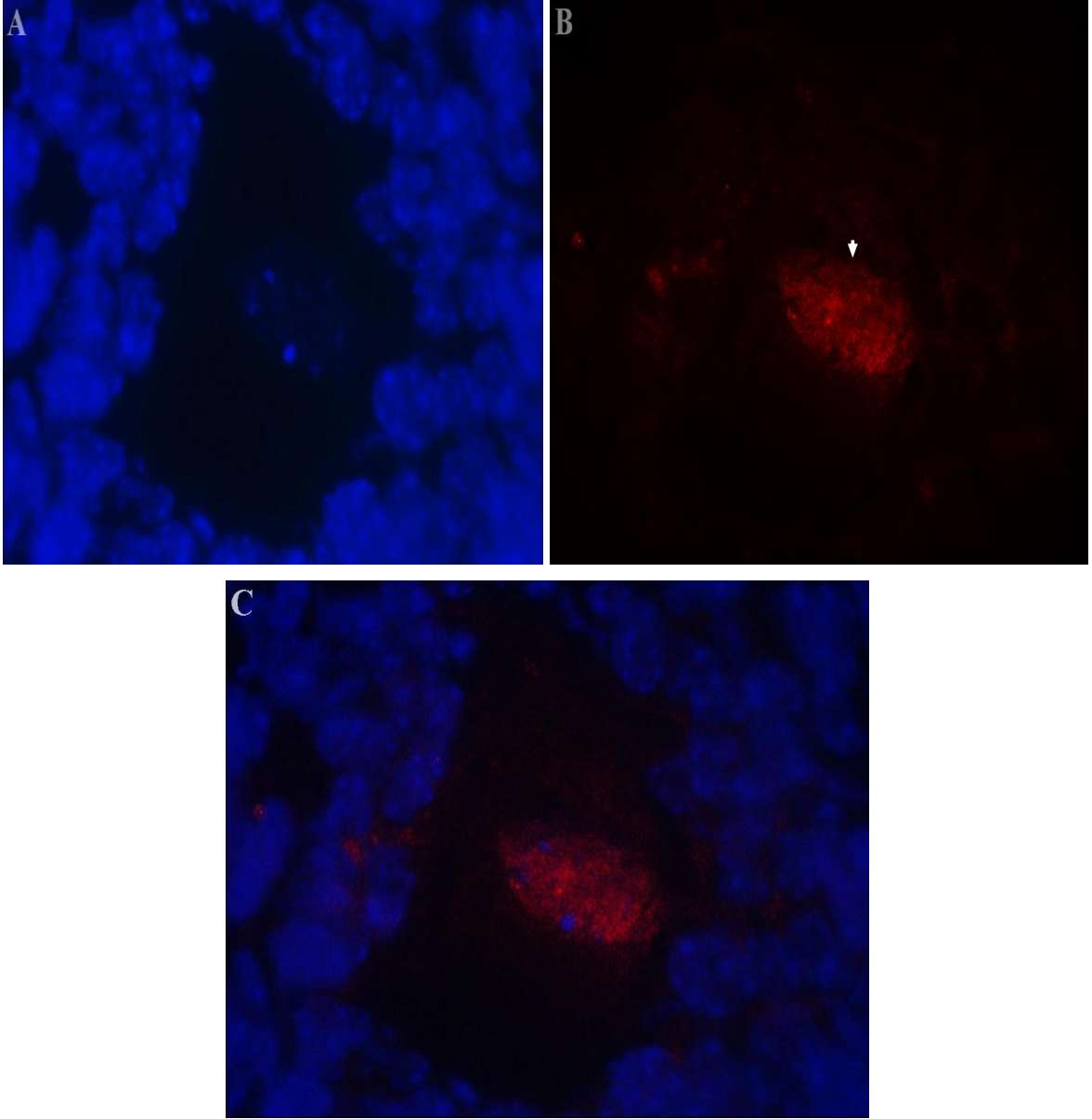
Şekil 4.3.3. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Oct-4; granuloza hücreleri (sarı ok) C. Birleşik (Büyütme x40)



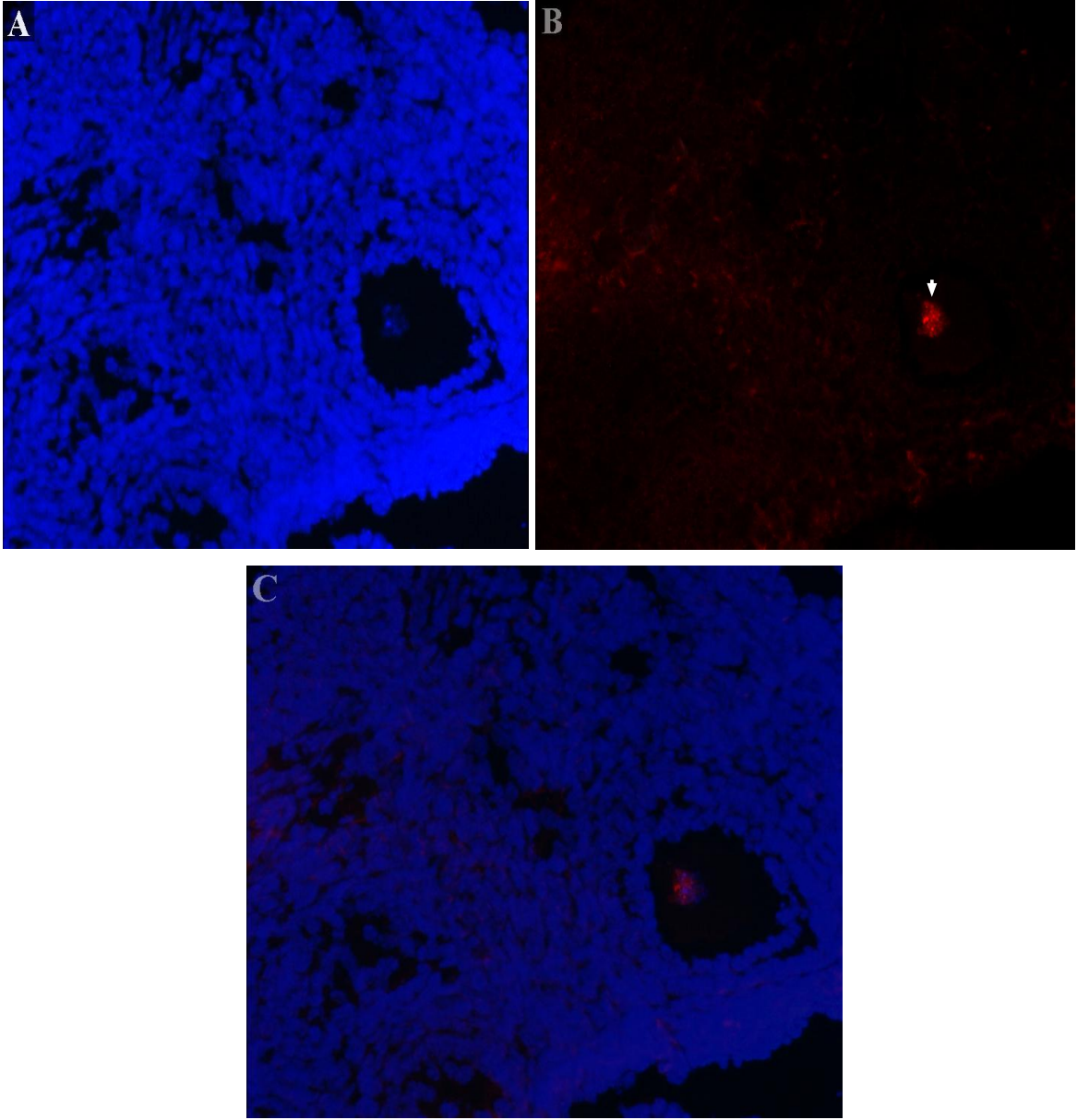
Şekil 4.3.4. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Oct-4 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Oct-4; granüloza hücreleri (sarı ok), teka hücreleri (mavi ok), oosit sitoplazması (beyaz ok), epitel hücreler (yeşil ok) C. Birleşik (Büyütme x40)



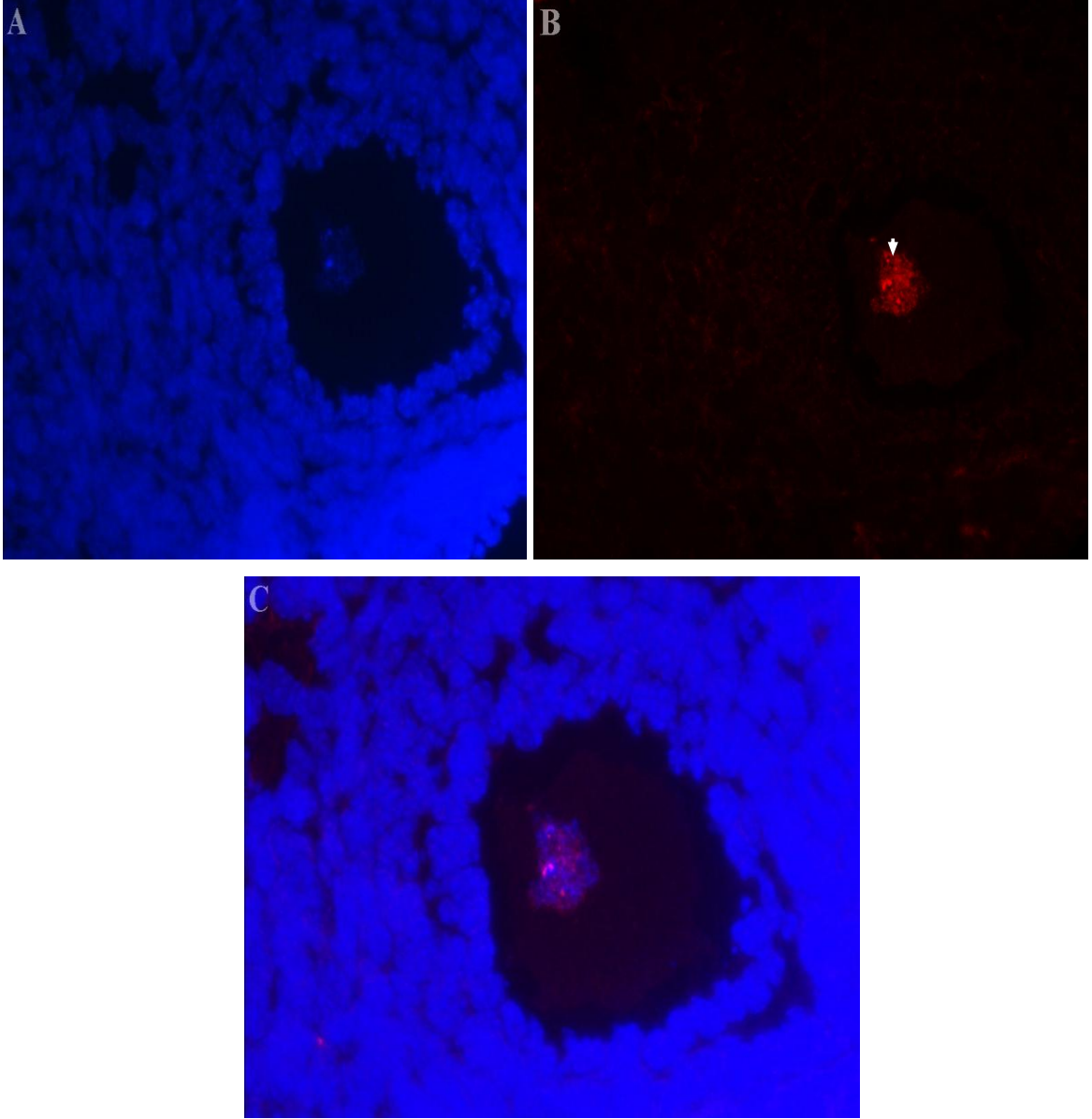
Şekil 4.3.5. Oct-4 proteini için negatif kontrol. A. DAPI B. Oct-4 C. Birleşik (Büyütme x40)



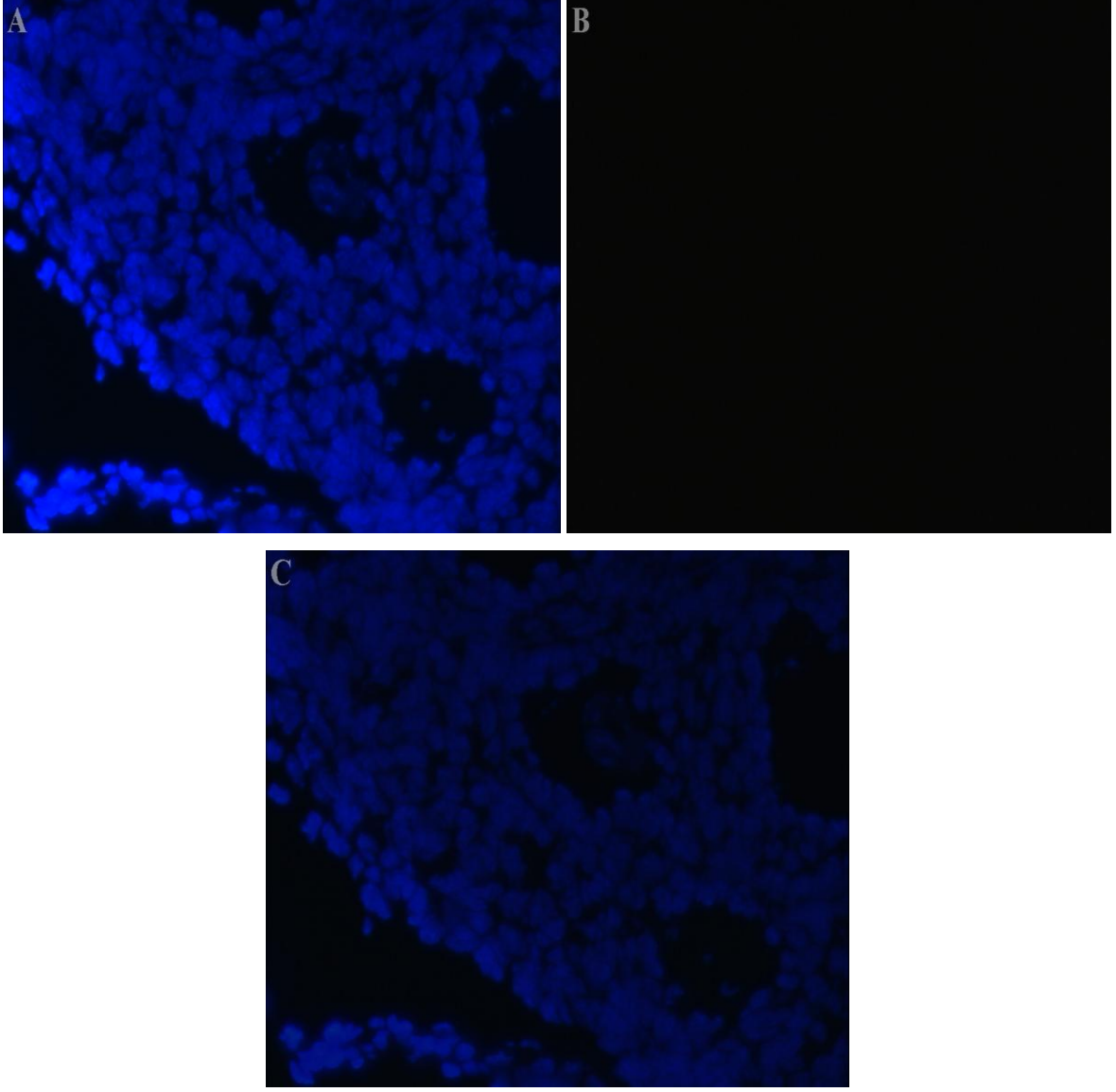
Şekil 4.3.6. İki haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi. A. DAPI B. Nanog; oosit çekirdeği (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x100)



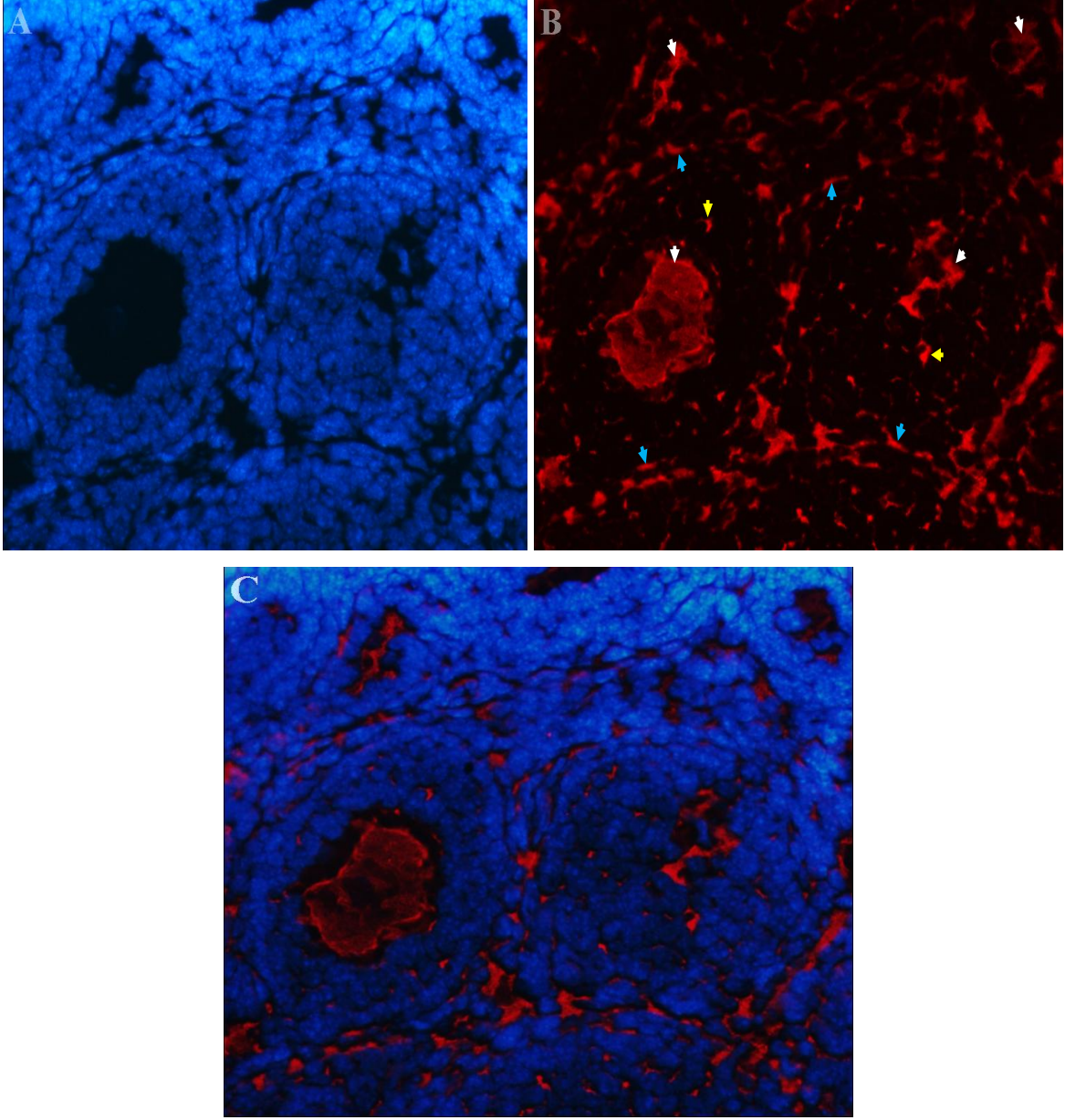
Şekil 4.3.7. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi. A. DAPI B. Nanog; oosit çekirdeği (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x20)



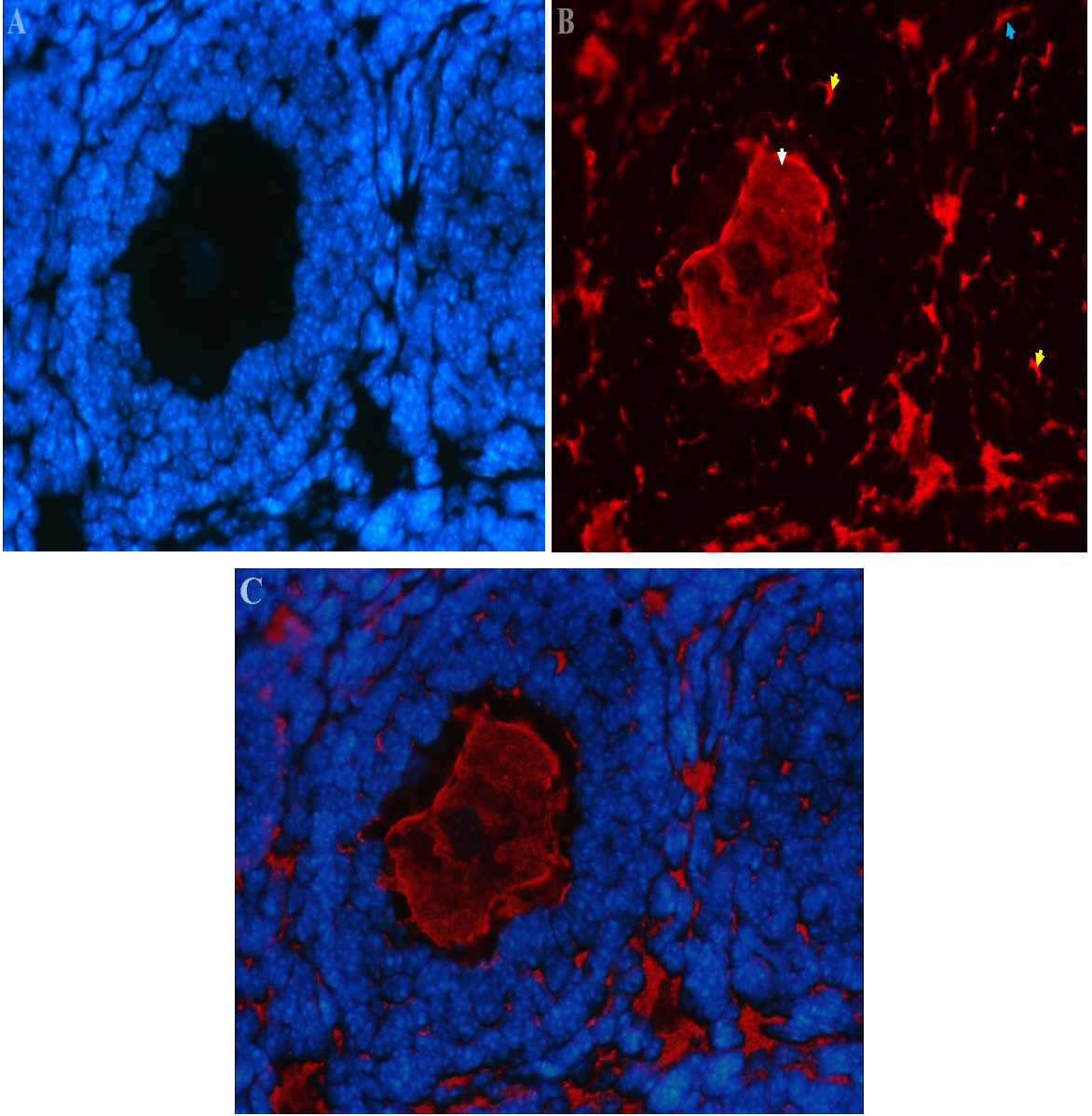
Şekil 4.3.8. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Nanog proteinin ifadesi. A. DAPI B. Nanog; oosit çekirdeği (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x40)



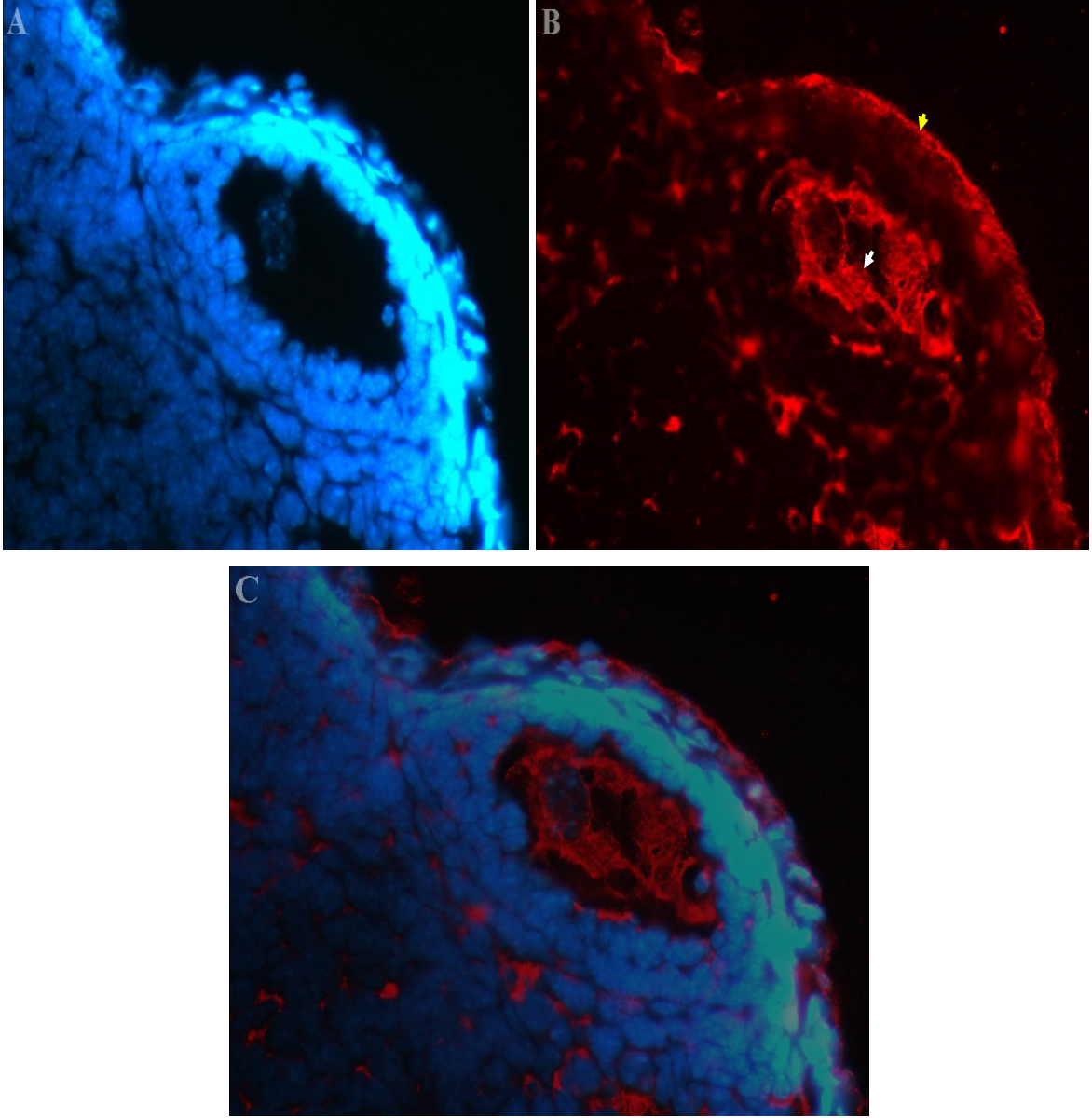
Şekil 4.3.9. Nanog proteini için negatif kontrol. A. DAPI B. Nanog C. Birleşik (Büyütme x40)



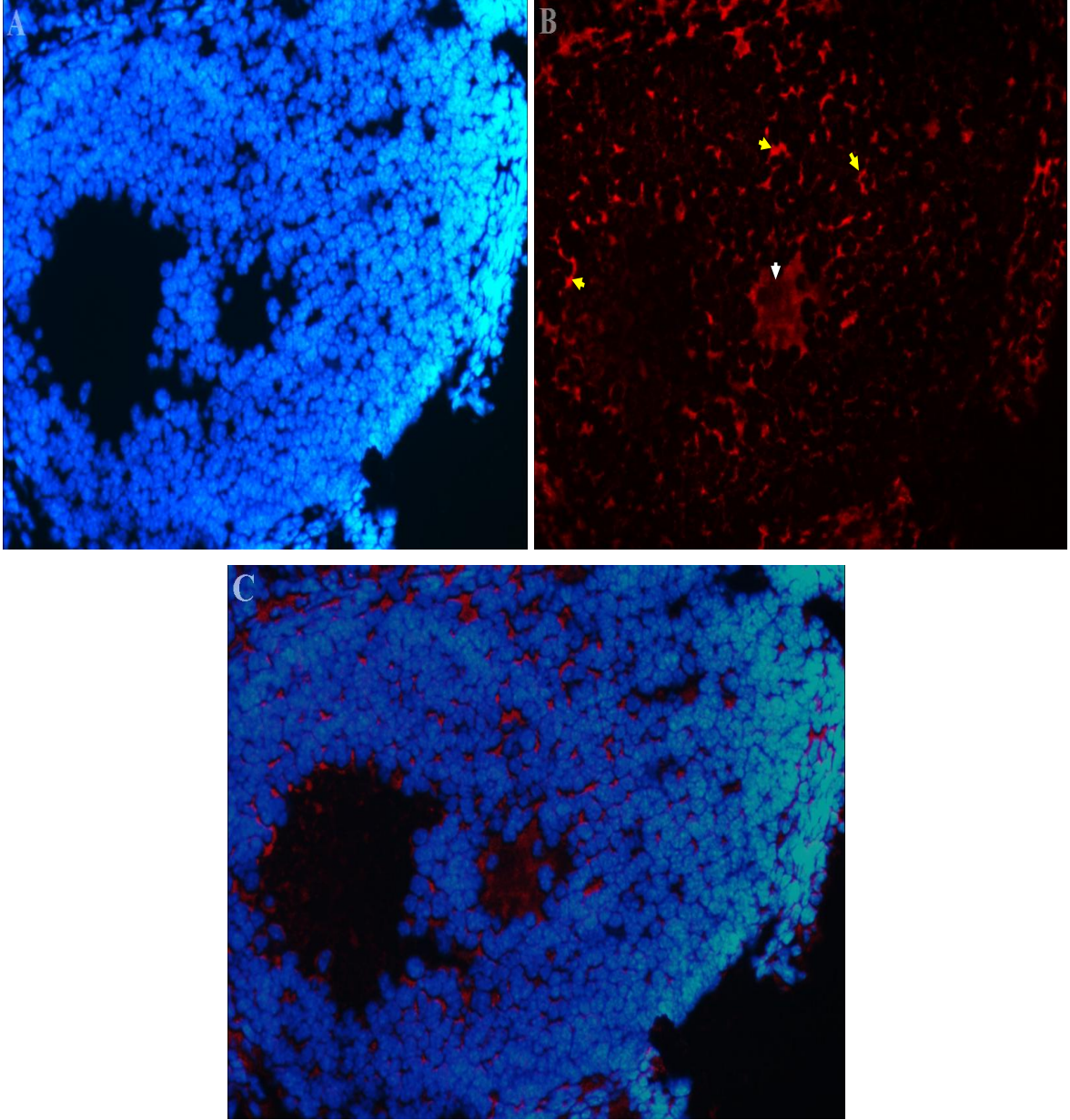
Şekil 4.3.10. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Sox2; granuloza hücreleri (sarı ok), teka hücreleri (mavi ok), oosit sitoplazması (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x20)



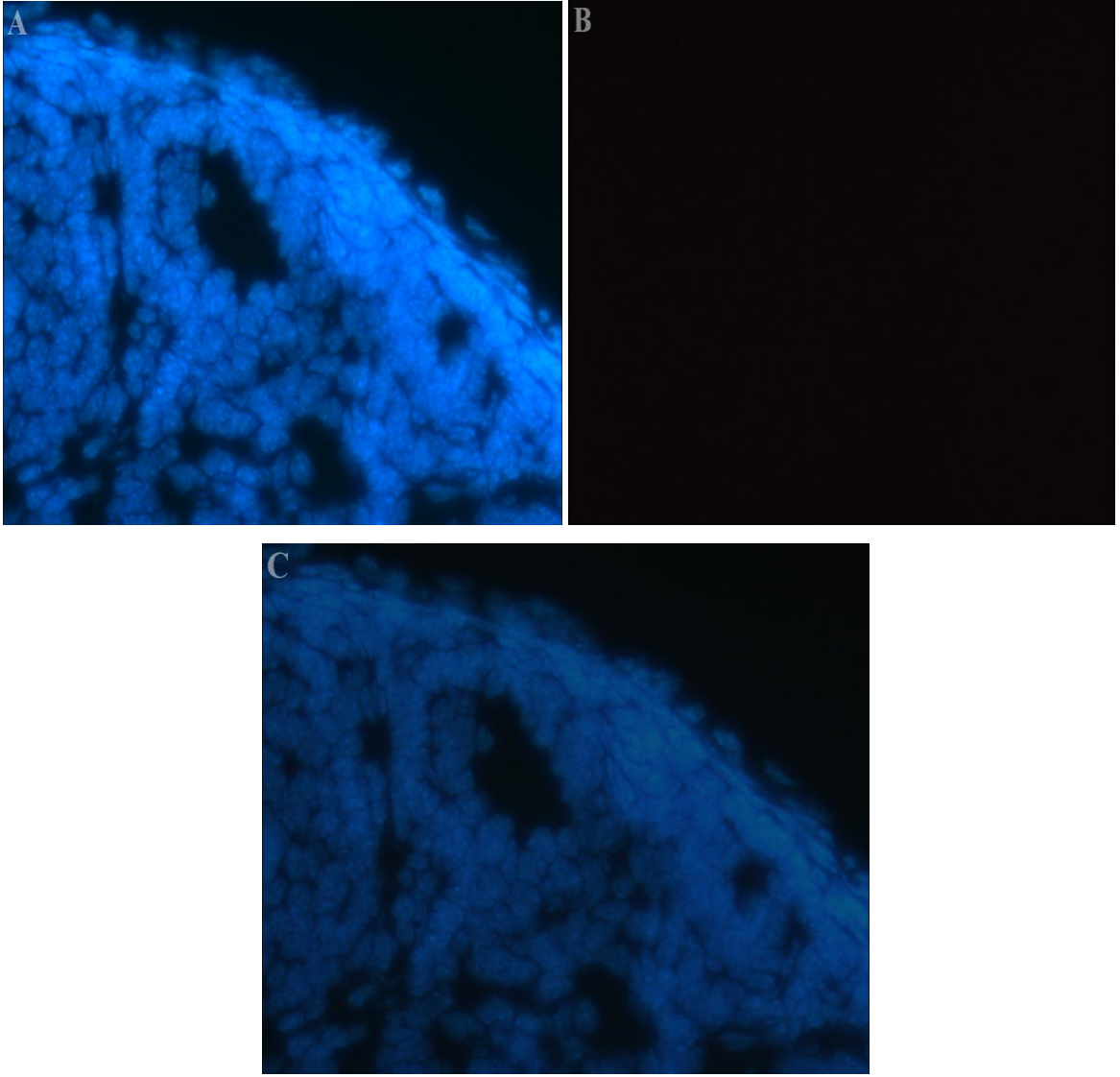
Şekil 4.3.11. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Sox2; granüloza hücreleri (sarı ok), teka hücreleri (mavi ok), oosit sitoplazması (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x40)



Şekil 4.3.12. İki haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Sox2; epitel hücreleri (sarı ok), oosit sitoplazması (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme 40x)



Şekil 4.3.13. Sekiz haftalık fare ovaryumunda Sox2 proteinin ifadesi. A. DAPI B. Sox2; granüloza hücreleri (sarı ok), oosit sitoplazması (beyaz ok) C. Birleşik (Büyütme x20)



Şekil 4.3.14. Sox2 proteini için negatif kontrol. A. DAPI B. Sox2 C. Birleşik (Büyütme x40)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dişi primordiyal germ hücrelerinde, Oct-4 geni mayozun profaz I evresinde susturulup doğum sonrası oosit gelişimiyle birlikte tekrar ifade edilmiştir (Kehler et al. 2004). Oct-4 geninin ifadesi RT-PCR ile döllenmemiş oositlerde ve immünohistokimyasal yöntemle oosit sitoplazmasında gösterilmiştir (Gauffman et al. 2005). Oosit gelişimi sırasında Oct-4 proteininin ifadesi SN (*surrounded nucleolus*) oositlerde tespit edilmiş ve NSN (*not surrounded ncleolus*) oositlerin gelişimi sırasında bu protein gözlenmemiştir. Oosit geliştikçe Oct-4 proteini çekirdek çevresi ve sitoplazmaya doğru yerleşmeye eğilim göstermiştir (Zuccotti et al. 2009). Yukarıdaki çalışmaların sonuçlarına uyararak bizim çalışmamızda da, Real Time-PCR sonuçlarına göre Oct-4 geninin ifadesi her iki yaş gurubu ovaryumunda tespit edilmiş ve 2 haftalık örneklerde 8 haftalıklara göre istatistiksel olarak daha yüksek ifade gözlenmiştir. Buna ilaveten immünohistokimyasal yöntemler sonucunda her iki yaş gurubunda Oct-4 proteini ovaryum epitel hücrelerinin sitoplazmasında, folliküllerin granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında tespit edilmiştir.

Oogenezin son aşamasında olan 8 haftalık erişkin farenin ovaryumunda (PMSG hormonuyla uyarılmış veya uyarılmamış), immünohistokimyasal yöntemle gelişmekte olan veya olmayan oositler Nanog negatif olarak gösterilmiştir (Yamaguchi et al. 2005) fakat bizim araştırmamızda, Nanog geninin ifadesi RT-PCR yöntemiyle tespit edilip buna ilaveten immünohistokimyasal yöntemle bu proteinin oosit çekirdeğinde pozitif olduğu gösterilmiştir. Daha önce yapılan bir araştırmada, çeşitli erişkin hücrede (kalp, ovaryum, bağırsak, testis, rahim, beyin, kas, deri, kemik iliği, böbrek, karaciğer, timüs ve dalak) Nanog geninin düşük ifadesi RT-PCR ile tespit edilmiştir (Hart et al. 2004). Bu bakımdan çalışmamız oosit hücrelerinde immünohistokimyasal yöntemle Nanog protein yerleşimini gösteren ilk çalışmadır.

Bu araştırmadaki Real Time-PCR sonuçları Sox2 geninin her iki yaş gurubunda ifade olduğunu tespit etmiştir. İmmünohistokimyasal yöntemle bu proteinin ovaryum epitel

hücrelerinin sitoplazmasında, granüloza hücrelerinin sitoplazmasında, oosit çekirdeğinin çevresinde ve sitoplazmasında ve teka hücrelerinin sitoplazmasında olduğu gösterilmiştir. Bizim sonuçlarımızı destekleyen başka bir araştırmada erişkin fare ovaryumunda yapılan immünohistokimyasal yöntem sonucunda yüksek düzeyde Sox2 proteini hem gelişmekte olan hem de olgunlaşmış oositlerin sitoplazmasında ve onu çevreleyen stromal hücrelerde tespit edilmiştir (Avilion et al. 2003).

Araştırmamızda EKH markerleri hem gen hem de protein düzeyinde ovaryum dokusunda tespit edilmeye çalışıldı. RT-PCR yöntemiyle bu genlerin mRNA'sının ifade olduğu gösterildi, immün boyama sonucunda da Oct-4 ve Sox2 proteinleri her iki grup ovaryumda farklı hücrelerin sitoplazmasında ve Nanog proteini sadece oosit çekirdeğinde tespit edildi. Ancak Oct-4, Sox2 ve Nanog proteinleri transkripsiyon faktörler olduklarından fonksiyon yapabilmeleri için çekirdekte olmaları gerekmektedir oysa araştırmamızda ve daha önce yapılan bazı çalışmalarda da Oct-4 ve Sox2 proteinleri erişkin ovaryum hücrelerinin sitoplazmasında (Avilion et al. 2003, Gauffman et al. 2005, Zuccotti et al. 2009) ve erişkin insan mezankimal ve adiposit kök hücrelerinde kullanılan ticari antikora bağlı olarak farklı düzeyde hem çekirdek hem de sitoplazmada (Zuk et al 2009) gözlenmiştir. Bu proteinlerin hücre sitoplazmasında bulunduğu süreçte bu hücrelerin o süreç içinde pluripotent kök hücre olmaları sorgulanabilir (Gauffman et al. 2005). Fakat transkripsiyon faktörleri hücrel uyarılara bağlı olarak kısa amino asit sekansları aracılığıyla çekirdekte sitoplazmaya (*Nuclear Export Sequence or NES*) veya ters yönde (*Nuclear Localization Sequence or NLS*) geçiş yapmaktadırlar (Whiteside ve Goodbourn 1993). Ovaryumda kök hücre varlığıyla ilgili daha önce yapılan bazı araştırmalarda da ovaryum kök hücrelerinden farklı hücrelerin farklılaşması gösterilmiştir. Örneğin, Bukovsky ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (2009) OKH'lerinin belli hücrelere (yeni oosit, fibroblast, epitel ve nöral hücreler) farklılaşma potansiyeli olduğu bildirilmiştir.

Real Time-PCR sonuçlarına göre Nanog geninin ifadesi 2 haftalık örneklerde 8 haftalıklardan daha düşük olmuştur (bu sonuç immün boyama sonucuna da uymaktadır). Oct-4 geninin yüksek ifadesi Nanog geninin ifadesinde bastırıcı rol oynadığından dolayı

(Niwa et al, 2000), 2 haftalık örneklerde Nanog geninin düşük ifadesi Oct-4 geninin yüksek ifadesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada EKH markerleri oldukları kabul edilen Oct-4, Sox2 ve Nanog protein ve gen düzeyinde hem erişkinlik öncesi (2 haftalık) hem de erişkin (8 haftalık) fare ovaryumlarında gösterilmiştir. Pluripotent kök hücre özelliğini taşıyan bu hücrelerin varlığı yapmayı planladığımız ileri çalışmalarda farklılaşma becerilerinin gösterilmesiyle tam olarak kanıtlanılacaktır.

KAYNAKLAR

- Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, Sh., Nakatsuji, N., Kawase, E. 2010. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 15; 455–469.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H. 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on sox2 function. *Genes Dev*, 17; 126-140.
- Babaie, Y., Herwig, R., Greber, B., Brink, T. C., Wruck, W., Groth, D., Lehrach, H., Burdon, T., Adjaye, J. 2007. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 25; 500–510.
- Balcı, D. 2009. İnsan Göbek Kordonu Stroma Dokusunun Kök Hücreleri Transplantasyonları Amacıyla Kullanılmak Üzere Kontrollü Dondurulması Koşullarının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Boyer, L. A., Mathur, D., Jaenisch, R. 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev*, 16; 455–462.
- Boyer, L., Lee, T., Cole, M., Johnstone, S., Levine, S., Zucker, J., Guenther, M., Kumar, M., Murray, H., Jenner, R., Gifford, D., Melton, M. 2005. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122; 947–956.

- Bukovsky, A. 2008. Ovarian Stem Cells and Mammalian Neo-Oogenesis. *Microsc Microanal*, 14; 1474-1475.
- Bukovsky, A., Ayala, M., Dominguez, R., Svetlikova, M., Selleck-White, R. 2007. Bone Marrow Derived Cells and Alternative Pathways of Oogenesis in Adult Rodents. *Cell Cycle*, 6 (18); 2306-2309.
- Bukovsky, A., Michael, R., Virant-Klun, I., Satish K. G., Dominguez, R., Svetlikova, M., Fei Xu. 2009. Immune Physiology and Oogenesis in Fetal and Adult Humans, Ovarian Infertility, and Totipotency of Adult Ovarian Stem Cells. *Birth Defects Research (Part C)*, 87; 64–89.
- Bukovsky, A., Svetlikova, M., Caudle, M. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology. BioMed Central*, 3 (1); 1-13.
- Bustin, M., Catez, F., Lim, J. H. 2005. The dynamics of histone H1 function in chromatin. *Mol Cell*, 17(5): 617-20.
- Bustin, S. A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29(1); 23-39.
- Cauffman, G., Van, H., Velde, D., Liebaers, I., Van, A. 2005. Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Steirteghem Molecular Human Reproduction*, 11 (3); 173–181.

- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(13); 643–655.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith, A. 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450; 1230-1235.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 441; 1109–1114.
- Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M., Robb, L. 2004. Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human. *Developmental Dynamics*, 230; 187–198.
- Hay, D. C., Sutherland, L., Clark, J., Burdon, T. 2004. Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and Mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22; 225–235.
- Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., Lako, M. 2005. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* 23; 1035–1043.

- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, CH., Schafer, X., Lun, Y., Ihor, R. 2006. Lemischka Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*, 442; 533–538.
- James Kehler , Elena Tolkunova , Birgit Koschorz, Maurizio Pesce, Luca Gentile, Michele Boiani, Lomeli, H., Nagy, A., McLaughlin K. J., Scho H. R., Tomilin, A. 2004. Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports*, 5 (11); 1078-1083.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* Vol, 122; 303-315.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., James, K., Jonathan, L., Vincent, J. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *NATURE*, 430; 145-150.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Kondoh, H. 2000. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, 16 (4); 182–7.
- Kopp, J. L., Ormsbee, B. D., Desler, M., Rizzino, A. 2008. Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS*, 26; 903–911.

- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T., 2005. Octamer and Sox Elements Are Required for Transcriptional cis Regulation of Nanog Gene Expression. *Molecular and cellular biology*, 25 (6); 2475–2485.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, Niwa, H. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3 / 4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol*, 9; 625–635.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cell. *Cell*, 113 (5); 631–642.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A. G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cell. *Nat Genet*, 24; 372–6.
- Nolan, T., Hands, E., Bustin, S. A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*, 1 (3); 1559-82.
- Okumura-Nakanishi, N., Saito, M., Niwa, H., Ishikawa, F. Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 280; 5307–5317.

- Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H., Pei, D. 2006. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *The FASEB Journal*, 20; 1094-1102.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29: e45.
- Rodda, D., Chew, J., Lim, L. H., Loh, Y. H., Bei Wang, Ng, H. H., Robson, P. 2005. Transcriptional Regulation of *Nanog* by OCT4 and SOX2. *Biological Chemistry*, 280; 24731–24737.
- Rodriguez, R. T., Velkey, J. M., Lutzko, C., Seerke, R., Kohn, D. B., O’Shea, K. S., Firpo, M. T. 2007. Manipulation of OCT4 levels in human embryonic stem cells results in induction of differential cell types. *Exp. Biol. Med*, 232; 1368–1380.
- Virant-Klun, I., Zech, N., Vogler, A., Cvjeticanin, B., Klemenc, P., Malicev, E., Meden-Vrtovec, H. 2008. Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Journal compilation , International Society of Differentiation*, 76; 843-856.
- Whiteside, S. T. ve Goodbourn, S. 1993. Signal transduction and nuclear targeting: regulation of transcription factor activity by subcellular localisation. *Journal of Cell Science*, 104; 949-955.

- Wong, M. L., Medrano, J. F. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1); 75-85.
- Yamaguchia, S., Kimuraa, H., Tadaa, M., Nakatsujib, N., Tada, T. 2005. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expression Patterns*, 5; 639–646.
- Zaehres, H., Lensch, M. W., Daheron, L., Stewart, S. A., Itskovitz- Eldor, J., Daley, G. Q. 2005. High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23; 299–305.
- Zou, K., Yuan, Z., Yang, Z., Luo, Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J. 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*, 11; 631-636.
- Zuccotti, M., Merico, V., Sacchi, L., Bellone, M., Brink, T. C., Stefanelli, M., Redi, C. A., Bellazzi, R., Adjaye, J., Garagna, S. 2009. Oct-4 regulates the expression of Stella and Foxj2 at the Nanog locus: implications for the developmental competence of mouse oocytes. *Human Reproduction*, 00 (0) 1–13.
- Zuk, P. A. 2009. The Intracellular Distribution of the ES Cell Totipotent Markers OCT4 and Sox2 in Adult Stem Cells Differs Dramatically According to Commercial Antibody Used. *Journal of Cellular Biochemistry*, 106; 867–877.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yashar ESMAEILIAN

Doğum Yeri: İRAN

Doğum Tarihi: 07/02/1981

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: Sema Azad Üniversite Lisesi (2000)

Lisans: Urmia Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi (2004)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2008-2010)