

OVER HAYAT DÖNGÜSÜNÜ ANLAMAK

Özgür ÖKTEM, Bülent URMAN

Amerikan Hastanesi Kadın Sağlığı Merkezi, İstanbul

ÖZET

Bir kadının üreme yeteneğinin ne kadar süreceğinin overlerindeki primordial foliküllerin sayısı belirler. Dorman fazda bekleyen primordial foliküller primer foliküllere dönüşerek büyümeye başlayarak sırası ile preantral ve antral aşamaya ulaşırlar. Primordial foliküllerin büyümeye başlamasını neyin tetiklediği yıllarca bilinmezliğini korurken son yıllarda elde edilen veriler tek bir hormon veya sinyal yolağından ziyade gonadotropinlerden bağımsız olarak overde lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin etkisi ile aylar içinde gerçekleştiğini göstermektedir. Üstelik bu faktörler foliküllerin gonadotropinlere olan yanıtlarının modifikasyonu ve luteinizasyonun inhibisyonu gibi görevlerde üstlenmektedirler. Başlangıçta sayıları yüz kadar olan germ hücreleri mid-gestasyonda milyonlara ulaşmış ardından atreziye bağlı olarak menopozda rezerv tükeninceye kadar harcanarak kaybolmaktadırlar. Neden sadece 300-400 tanesi ovulasyon aşamasına kadar gelebilen bu hücrelerin milyonlarcasının üretildiği üreme tıbbının en bilinmeyen denklemlerinden biridir. Ve yine son yıllarda üreme tıbbının en temel dogmalarından biri olan memeli overinde belli sabit sayıda oosit olduğu ve bunların yenilenmediği görüşüne meydan okurcasına postnatal oogenez ile ilgili çarpıcı çalışmalar bulunsada insanda yardımcı üreme tekniklerinin başarısında henüz bir belirleyicilikleri olmamıştır. Bu derlemede üreme fizyolojisinin en temel kavramlarından olan over yaşam döngüsünün germ kök hücre oluşumundan ovulasyona kadarki kısmı ile postnatal oogenez hakkında güncel bilgiler sunulması amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: follükül büyümesi, folikulogenez, germ hücresi, oogenez, oosit, over

Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2011; Cilt: 8 Sayı: 2 Sayfa: 71- 82

SUMMARY

UNDERSTANDING OVARIAN LIFE CYCLE

Ovarian reserve is determined by the number of primordial follicles in the ovary. Quiescent primordial follicles are recruited as primary follicles, which continue to grow until they reach gonadotropin responsive antral stage where after another wave of cyclic recruitment occurs to select a cohort of antral follicles for further growth, dominance and ovulation. What triggers the initiation of growth in primordial follicles remained a mystery for decades. But now a growing body of evidence suggests that rather than a single hormone or signaling pathway an orchestrate of many signals arising from different compartments in the ovary such oocyte, granulosa and theca cells and stroma coordinate the activation of primordial follicles and the early stages of follicle growth. Furthermore these locally produced hormones can modify the response of the growing follicles to gonadotropins; may act as luteinization inhibitors at later stages of follicle growth; and thence may influence the success of assisted reproduction techniques in human. Therefore the aim of this article is to provide an update on folliculogenesis that highlights important features in ovarian life cycle such as formation of germ cells, follicle assembly, growth and ovulation along with the concept of postnatal oogenesis in the ovary from current and historical perspectives.

Key words: germ cells, follicle growth, folliculogenesis, oocyte, oogenesis, ovary

Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2011; Vol: 8 Issue: 2 Pages: 71- 82

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Özgür Öktem. Güzelbahçe sok. no: 20, Nişantaşı 34365, İstanbul.

Tel.: (0533) 955 38 30

e-posta:ozgurok@amerikanhastanesi.org

Alındığı tarih: 15.06.2010, revizyon sonrası alınma: 15.06.2010, kabul tarihi: 26.09.2010, online yayın tarihi: 14.03.2011

Postnatal Oogenez

Üreme tıbbının belkide en temel dogması over dokusunda belli sayıda oosit olduğu ve bunların sayısının arttırılmasının mümkün olmadığıdır. İlk 1870'lerde temeli atılan bu doktrin⁽¹⁾ 1950 lerde daha da kristalize edilmiştir⁽²⁾. Ancak ne varki son yıllarda yapılan bir seri çalışmada bu dogmanın ne kadar doğru olduğu sorgulanmaya başlanmıştır⁽³⁻⁵⁾. Aslında postnatal oogenez kavramı ilk olarak farede 1923 yılında⁽⁶⁾ ve ardından insanda 1932 yılında ortaya atılmıştır⁽⁷⁾. Tilly ve ekibi periferik kan ve kemik iliğinde varsayımsal germ hücrelerinden oositlerin rejenerasyonu olduğunu göstererek postnatal oogenez fikrini yeniden canlandırdılar. Kemoterapi ile sterilize edilmiş fare overinde sağlıklı ve atretik folikülleri sayarak folikül sayısında hızlı bir artış olduğunu ve 2. ayın sonunda kontrol ile kemoterapi almış overlerde folikül sayılarının hemen aynı olduğunu buldular. Üstelik kemoterapi ile overleri ablate edilerek tüm oositleri yok edilmiş farelere kemik iliği nakli uyguladıklarında oosit yapımının yeniden oluştuğunu gözlediler. Dahası yeşil floresan protein (GFP) ekprese eden transjenik fareden kemoterapi ile overleri sterilize edilmiş normal fareye periferik kök hücre nakli yapıldığında bu hayvanların overlerinde oositleri GFP sinyali veren primordial foliküller oluşmuştur. Kemik iliği nakli gonadotoksik siklofosamid verilmiş fareden fertilitasyonu korunmuş ancak tüm fare yavruları donor germ hücresinden oluşmuştur⁽³⁻⁵⁾.

Bu sonuçlar bilim dünyasında ve basında çok büyük bir yankı bulmakla kalmamış aynı zamanda tartışmalarda başlatmıştır. Kimileri over yüzey epitelinde mevcut germ hücrelerinin periferik kana geçerek kemik iliği örneklerinde gözlenen germ hücre belirteçlerinin pozitif çıkmasına neden olduğunu savunmuşlar^(8,9), kimileri ise çoğalmakta olan oositlerin aslında yanlış tanımlanmış immun hücreler olduğunu iddia etmişlerdir⁽¹⁰⁾. Bir kısmı ise atretik primordial folikül sayımında hata yapıldığına inanmış⁽¹¹⁾ veya kemoterapiden sonra nasıl 2 günde folikül yenilenmesi olduğuna şüphe ile bakmış⁽⁹⁾ veya insane overinde aktif mayoz bulgusuna rastlamamıştır⁽¹²⁾. Bu konuda tartışmalar devam ederken yeni bir çalışmada fare modelinde oosit ve yavru fareler dışı germ hücrelerinden elde edilmiştir⁽¹³⁾. Çalışmada öncelikle germ kök hücreler fareden izole edilip 6 ay kültüre edilmiş, ardından bu hücreler GFP taşıyan virus ile transfekte edilerek kemoterapi ile sterilize edilmiş fareye

nakledilmişlerdir. Nakledilen farelerde oogenez olmuş ve GFP geni taşıyan fareler doğurmuşlardır. Bu sonuçlar erişkin memelilerde germ kök hücrelerinin bulunduğunu ve en azından belli deneysel şartlarda bu hücrelerin fertilize olup canlı doğumla sonuçlanacak yetenekte oosit üretimi sağladığını göstermektedir.

Halehazırda bu hücrelerin biyolojik önemleri, over fonksiyonu ile ilişkileri; farede gözlenen bu olayın insan overinde de geçerli olup olmadığını veya insanda da benzer kök hücreler olup olmadığını bilmiyoruz. Ancak gelinen nokta reproduktif yaşlanma ve/veya kemoterapi/radyoterapiye bağlı erken ve kalıcı over yetmezliğinin önlenmesinde belkide bir çare olma potansiyeli taşıdığını göstermektedir⁽¹⁴⁾. Aslında yine kemik iliği nakli sonrası fertilitasyonu geriye döndüğü vakalar yanında^(15,16) yüksek doz kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonu sonrası gebelik oluşan vakalar kanser hastalarında⁽¹⁷⁾, Fanconi anemisinde⁽¹⁸⁾ ve Hodgkin lenfomasında⁽¹⁶⁾ bildirilmiştir. Üstelik erişkin gönüllülerden alınan kemik iliği örneklerinde germ hücre belirteçlerinin (MVH ve dazl) bulunması da kemik iliği orijinli kök hücrelerinden kaynaklanan oositlerin overde çoğaldığı fikrini desteklemektedir⁽⁴⁾.

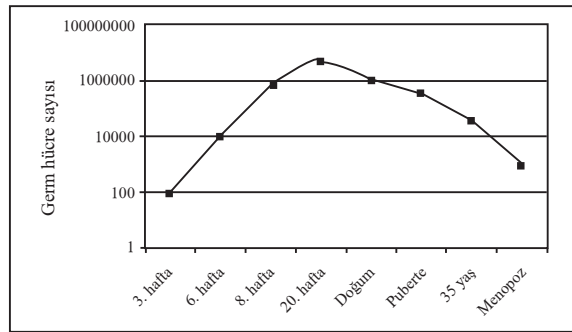
Primordial Germ Hücreleri

Postnatal oogenez tartışmaları bir kenara dursun, oositlerin en temel başlangıç öncüleri olan primordial germ hücreleri (PGH) ekstraembryonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembryonik ektodermal orijinli bone morphogenetic proteinler (BMP) 4 and 8b, ile ekstraembryonik endodermal kaynaklı BMP2 sinyali ile gelişmektedir^(19,21). BMP4'e yanıt olarak epiblast germ hücre özellikleri kazanmaktadır. Germ hücre kompetansının kazanılması interferon ile uyarılan bir transmembran proteini olan Fragilis'in germ hücresi üzerinde ekprese olması ile başlar. Fragilis daha sonra germ hücrelerinin arka barsak (hindgut) mezenterisi üzerinden gonada yolculuğu esnasında sadece germ hücrelerinde bulunan Stella isimli genin ekspresyonunu uyararak somatik hücre yazgısından (somatic cell fate) kaçılması ve pluripoten-sinin devam ettirilmesini sağlar^(22,23). PGH ilk olarak insanda 3-4 gebelik haftalarında (postkonsepsiyonel) yol kesesinin dorsal duvarının endoderminde 100 kadar hücre olarak kendilerini belli ederler. Endodermal hücrelerden daha büyük olmaları, daha az organel içeren şeffaf sitoplazmaları ile ayırt edilirler⁽²⁴⁾. 7.

haftaya kadar gonadın germ hücreleri ile kolonizasyonu tamamlanır. Aslında germ hücreleri overin oluşumu ve devamı için gereklidir zira hiç germ hücresi veya oosit olmayan over dokusu kord benzeri yapılara dejenere olmaktadır⁽²⁵⁾. Gonada ulaşan PGH daha hızlı mitoz göstererek sayıları kısa sürede 6. haftada 10 bin iken 8. haftada 600 bine, 20. haftada ise 6 milyona ulaşır. Bu dönemden sonra mitoz azalır 28. haftada sona erer ve eş zamanlı başlayan atrezi 20 haftada pik yapar. Bu sebeple 20. haftadan sonra germ hücre sayısı düşmeye başlar, yenidoğanda 1 milyon, pubertede 300-400 bin kadar kalır. Sadece %1 i ovulatuvar aşamaya kadar ulaşan bu hücrelerin çoğu atreziye gider ve menopoza sonrası bin kadar overde kalır (Figür 1)⁽²⁶⁾. Germ hücresinden folikül oluşumu ve aktivasyonuna kadarki rol alan genler, transkripsiyon faktörleri tabloda özetlenmiştir.

PGH → Oogonia → Oosit dönüşümü

Figür 1: Germ hücrelerinin yolculuğu. Bir kere spesifiye olduktan sonra 100 kadar germ hücresi prospektif gonada göç ederken çoğalmayada devam ederler. Sayıları eksponansiyel bir artış ile 8. haftada 600 binden 20. Haftaya gelindiğinde 6-7 milyona çıkar. Bu haftadan itibaren atreziden dolayı sayıları giderek azalır ve sadece %1 kadarı ovulasyona gider.



PGH overe ulaşınca ismi oogonia olur. Oogonia PGH'e nazaran daha hızlı mitotik aktivite gösterir ve mayoza girmeden çeşitli defalar mitoz bölünme geçirirler. Aslında oogoniyaların mitotik aktivitesi over rezervinin ne kadar olacağını belirler. Mayoz öncesi son mitoz turunda tam tamamlanmamış hücre bölünmesi (inkomplet sitokinez) ile oogoniyalar birbirlerine sitoplazmik köprüler ile bağlı kalarak sinsisyum oluştururlar. Bu sayede mayoza başlama sinyalinin diğer oogoniyalara da bu yolla iletildiği düşünülmektedir. Pre-mayotik DNA sentezinin başlaması ile oogoniyal dönem biter, oosit dönemi başlar. Oluşan oositlere

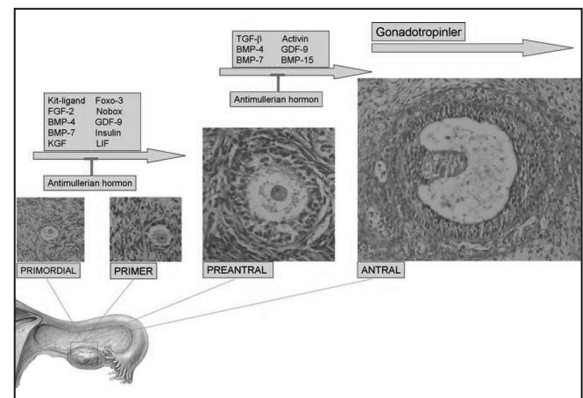
primer oositler denir. Mayoza giriş 8 ile 13 haftalar arasında olup ilk folikül oluşumunun izlendiği 16. haftadan çok öncedir. Stra 8 geni bu aşamada çok önemlidir. Bu gen olmadığında farede premayotik DNA replikasyonu, mayotik kromozom kondensasyonu, kohezin, sinaps ve rekombinasyon olmamaktadır⁽²⁷⁾.

Primordial folikül gelişimi

İnsanda primordial folikül gelişimi en erken 16 haftada başlar ve postnatal 6. ayda en geç biter. Over rezervini temsil eden primordial foliküller tek katlı yassı pre-granuloza hücreleri ile çevrili diptoten ossitten (30-60 mm) oluşur (Figür 2). Primordial folikül oluşumunda rol alan faktörler tabloda özetlenmiştir. Aslında oogoniada mitozun başlayıp granuloza hücreleri ile çevrilmesi yani folikül oluşumu onu atreziden korumaktadır zira 28. haftadan sonra mayoza girmemiş oogonia overde artık izlenmemektedir. Yenidoğan overinde de oogonia mevcut değildir⁽²⁸⁾. Ne varki over rezervini temsil eden primordial foliküller metabolik olarak inaktif fazdadırlar, sayılarını dolayısıyla over rezervini tahmin etmemize yarayacak ne hormonal nede başka bir belirteçleri bulunmamaktadır.

Primordial → Primer Folikül Dönüşümü (Folikül Büyümesinin Başlaması)

Figür 2: Folikül gelişiminde rol alan faktörler ve hormonlar gösterilmiştir.



Primordial foliküller dormant fazdan büyümenin başlaması ile primer aşamaya geçerler. Primordial folikülden primer folikül gelişimini neyin tetiklediği yıllarca bir muamma olarak kalmış iken son yıllarda yapılan özellikle transjenik hayvan çalışmaları bize

göstermektedirki, tek bir hormon veya sinyal yolağından ziyade over içinde farklı kompartmanlardan kaynaklanan (oosit, granuloza ve teka hücreleri, stroma) sinyallerin otokrin-parakrin etkileşimleri ile primordial foliküllerin primer basamağa ulaştıkları bilinmektedir⁽²⁹⁻³²⁾. Bu bulgular aslında niçin izole edilen primordial foliküllerin kültür ortamında yaşamadığını ancak doku kültürü içinde in situ olarak aktive olabildiklerini açıklamaktadır⁽³³⁾. Üstelik primordial foliküllerin aktivasyonu için FSH'ya gerek yoktur zira primordial foliküller FSH reseptörü barındırmazlar⁽³²⁾. Primordial primer transformasyonu esnasında yassı granuloza hücreleri küboidal hale gelmekte oosit çapıda beraberinde artmaktadır⁽³⁴⁾. Primordial foliküllerin primer foliküllere aktive olmaları siklik sürekli bir hadisedir, fetal hayatta başlayıp menopoza kadar devam eder⁽²⁶⁾. Bu aktivasyonda transforming growth factor-beta (TGF-β) ailesinin bazı üyeleri rol almaktadır. Bone morphogenetic proteinler, BMP-4 ve BMP-7 (ovarian stroma ve theca hücrelerinden salınan)^(35,36); büyüme farklılaşma faktörü-9 (growth differentiation factor-9) (oosit kaynaklı)⁽³⁷⁻³⁹⁾ bu olayda rol oynamaktadır. GDF-9 geni olmayan fare infertile olup primer aşamadan ileri folikül gelişimi izlenmezken^(37,38), GDF-9 'un invitro primordial primer geçişinde etkileri tartışmalıdır. Bir çalışmada etkisi olduğu gösterilirken⁽³⁹⁾, bir diğesinde böyle bir etki izlenmemiştir⁽⁴⁰⁾.

TGF-β üyelerinin etkileri açısından türler arasında da farklar olduğu belirtilmelidir. Örneğin, oosit kaynaklı BMP-6 and BMP-15 (GDF-9B) genleri olmayan farede normal folikül gelişimi ve fertilitite izlenirken^(41,42) BMP-15 mutasyonu insan ve koyunda prematür over yetmezliği ile karakterizedir^(43,44).

Primordial folikülden primer gelişimini tetikleyen başka faktörlerde mevcuttur. Bunlardan biri Kit-ligand (KL), stem cell factor olarak da bilinir ve granuloza hücrelerinde bulunur, reseptörü c-kit oosit ve teka hücrelerinde eksprese edilir^(45,46). Bir diğeri leukemia inhibitory factor (LIF granuloza hücrelerinde eksprese edilir)⁽⁴⁶⁾. LIF ayrıca primordial germ hücrelerinin proliferasyonu, oosit büyümesi ve teka hücrelerinin çevre stroma dokusunda folikül çevresine toplanması gibi etkileride vardır⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Yine teka hücreleri ve stromadan salınan keratinosit büyüme faktörü (keratinocyte growth factor diğeri ismi fibroblast growth factor-7, FGF-7) ve FGF-2'de (basic fibroblast growth factor) primordialden primer folikül gelişimini hızlandırmaktadır^(45,48). İlginçtir ki insulin hormonu da KL ve

LIF ile aditif etkileşim göstererek bu geçişi hızlandırmaktadır^(46,49). Germ hücrelerinden salınan nobox (newborn ovary homeobox) ve forkhead transcription factor Foxo3 da aynı şekilde primordial primer geçişini uyarmaktadır^(50,51).

Anti-mullerian hormone (AMH) büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde salınmakta olup primordial primer folikül geçişini inhibe etmektedir (Figür 2)^(52,53). İlerleyen yaş ve azalan over rezervi ile birlikte AMH düzeylerinin düşüşü daha fazla folikül büyümesini sağlamaya yöneliktir.

Preantral ve Antral Aşamalara Folikül Büyümesi

Granuloza hücrelerinin mitotik ekspansiyonu ile tek tabakalı primer foliküller çok tabakalı hale gelirler. Bu dönemde oosit çapında artma, granuloza hücrelerini teka tabakasından ayıracak olan bazal lamina ile zona pellusida ve teka hücrelerinin oluşumu gerçekleşir⁽⁵⁴⁾. Bu büyüme fazında folikül çapı primer safhada 40-60 µm'dan preantral safhada 120-150 µm'a çıkar. Folikülün büyümeye devam etmesi ile 200 µm çapa ulaşan foliküller antral safhaya ulaşır. Asıl bu dönemin karakteristik özelliği granuloza hücre tabakaları arasında sıvı dolu boşlukların oluşup birleşerek antral boşluğu oluşturmalarıdır. Bu aşamaya kadarki folikül gelişimi insanda aylar sürer ve gonadotropinlerden bağımsız olarak gerçekleşir. Preantral foliküller FSH reseptörü barındırsalarda⁽³²⁾, preantral folikül büyümesinde müsamahakar bir rolleri olduğu düşünülmektedir, zira anosmi and hipogonadotropik hipogonadizimli hastalarda çok tabakalı folikül gelişimi nadiren izlenmektedir⁽⁵⁵⁾. Diğeri taraftan immün yetmezlikli hipogonadal fareye nakledilen over greftlerinin sürvisi FSH tarafından artırılmakta ve antral safhaya kadar folikül gelişimi izlenmektedir⁽⁵⁶⁾. İlginç olarak FSH in vitro preantral folikül büyümesine serumsuz ortamda böyle bir etkiye sahip değildir⁽⁵⁷⁾. Kuvvetle muhtemeldir ki overde lokal olarak üretilen bazı faktörlerin FSH ile etkileşimleri sonucu bu farklılığı yaratıyor olabilir.

FSH'ın preantral folikül gelişimine olan tartışmalı etkilerine karşın bu dönemde folikül büyümesinin lokal olarak üretilen bazı faktörler vasıtası ile olduğu artık çok iyi bilinen bir gerçektir. Yine TGF-β ailesinin üyelerinden ve granuloza hücrelerinden salınan aktivinler, teka hücrelerinden salınan BMP-4 ve BMP-7, oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 preantral ve antral folikül gelişiminde rol oynamaktadır (Figür 2). İnsan ve kemirgen over doku kültürlerinde GDF-9 primer ve

büyümekte olan sekonder folikül sayısını arttırmaktadır (40,58-60). GDF-9 geni olmayan farede folikül büyümesinin primer aşamada kalması da folikül büyümesinde bu büyüme faktörünün önemini göstermektedir^(37,61,62). İlginç olarak GDF-9 geni olmayan farede teka hücrelerinin bazal laminaya toplanmaları da bozulmaktadır⁽³⁸⁾.

Preantral-antral aşamaya folikül büyümesini indükleyen bir başka ajan BMP-15 dir. Oosit kaynaklı bu büyüme faktörü FSH'dan bağımsız olarak granuloza hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur⁽⁶³⁾. Yani gonadotropin bağımlılığının olmadığı erken folikül büyümesi döneminde folikül büyümesini BMP-15 sağlayabilmektedir. BMP-15 ilginç olarak FSH reseptör ekspresyonunu inhibe edebilmektedir⁽⁶³⁾ ve follistatin BMP-15'in bu etkilerini antagonize etmektedir. Follistatin ekspresyonu ise en fazla dominant folikülde mevcuttur dolayısıyla follistatinin dominant folikül seçimi esnasında folikülde yeterince FSH reseptörünün bulunmasını sağlamaktadır⁽⁶⁴⁾.

Teka hücreleri pek çok farklı açıdan folikül büyümesinde önemli rollere sahiptirler. Birincisi overde ana androjen kaynağı olarak granuloza hücrelerine östrojen sentezi için prekürsörler sağlarlar. İkincisi BMP-4 ve 7 folikül büyümesini primer aşamadan itibaren büyütür^(36,65). Üçüncüsü, teka hücreleri salgıladıkları hepatocyte growth factor (HGF) and keratinocyte-growth factor (KGF) ile granuloza hücreleriyle karşılıklı bir kommunikasyona geçmektedirler. HGF ve KGF granuloza hücrelerinde KL ekspresyonunu arttırmaktadır. KL'de teka hücrelerinde HGF ve KGF ekspresyonunu artırarak potansiyalize edilmiş bir parakrin etki oluşmaktadır. KGF zaten primordialden primer folikül oluşumunda rol almaktadır⁽⁴⁸⁾. Dördüncüsü preantral ve antral foliküllerin hızlı büyümeleri esnasında BMP-4 ve 7 FSH sinyal yolağını modifiye ederek aromatisasyon yani östrojen sentezini uyarırken progesteron sentezini baskılayarak luteinizasyon inhibitörü görevini yürütmektedirler. Ancak en azından rat modelinde FSH olmadan granuloza hücrelerinde steroid sentezini etkilememektedirler⁽⁶⁶⁾.

Preantral and antral folikül büyümesini arttıran diğer büyüme faktörleri aktivin A (granuloza kaynaklı) ve TGF-beta (hem granuloza hem de teka hücrelerinden salınır) dır^(29,67-70). TGF-β'nin 3 izoformu vardır (TGF-β1, β2 and β3). TGF-β bioaktivitesi ilk olarak preantral folikülde izlenmekte, folikül büyüdükçe kuvvetlice eksprese edilmektedir⁽⁷¹⁻⁷³⁾. İnsanda etkileri hala tam netleşmemişse de en azından rat modelinde

granuloza hücre proliferasyonu, progesteron üretimi ve FSH ile uyarılmış östrojen sentezinde rolleri vardır (74-76).

Antimüllerian hormon insanda folikül büyümesinin mid-antral safhasına kadar granuloza hücrelerinden salınmaktadır⁽⁷⁷⁾. Primordial primer geçişini inhibe etmesinin yanında preantral folikül gelişimi üzerinde de negative bir etkiye sahiptir. Fare modelinde de FSH'ye bağlı geç preantral folikül büyümesini inhibe etmektedir⁽⁷⁸⁾.

Granuloza hücrelerinde direk kan akımı yoktur. Bazal lamina kan-folikül bariyeri gibi çalışıp granuloza hücrelerini vaskülerize teka hücrelerinden ayırır. Granuloza hücreleri yaygın bir gap junction ağı ile kendileri arasında ve oositle sıkı bir ilişki içindedirler. Connexin adı verilen proteinlerin heksamerik konfigürasyonda dizilimleri sayesinde hücreler arasında metabolik değişim, sinyal iletimi ve moleküllerin transportasyonu işlevini görürler. Yine bu sayede zona içinden oosite uzanan bu gap junctionlar ile oosit plazma membranına uzanarak oosit ile kommunikasyon halindedirler. Connexin 43 ve 37 proteini olmadığında folikül gelişimi sırası ile primer ve preantral safhada kalmaktadır^(79,80).

Dominant folikül seçimi

Antral safhadaki foliküller erken, mid ve geç antral safhalardan geçerek büyümektedirler. Bu dönemde antral kavitede daha fazla büyüme, oosit çapında artma, granuloza ve teka hücrelerinde proliferasyon ve teka hücrelerinde vaskülarizasyonun artışı izlenmektedir. FSH bu dönemde folikül büyümesinin kritik bir belirleyicisi olmaktadır. Belli sayıda antral foliküllerden oluşan bir kohort siklik olarak FSH'nın etkisi ile daha ileri aşamaya büyümeye başlayarak dominant folikül seçimi için yarışa girerler. Önceleri insan overinde tek bir büyüme dalgası ile siklik olarak antral foliküllerin seçildiği düşünülürken artık birden çok büyüme dalgasının varlığı kabul edilmektedir⁽⁸¹⁾.

Seçilen kohort büyümeye devam ederken bu kohorttaki antral foliküllerin gonadotropinlere olan yanıtlarının ve steroidogenetik aktivitelerinin modüle edilmesi ve aynı zamanda olası bir prematür luteinizasyonun inhibe edilmesi kritik önem taşır. Bu sayede belli foliküller FSH'ya daha duyarlı kılınarak dominant folikül seçimi için zemin oluşturulmaktadır. Mevcut bilgiler tüm bu olayların otokrin-parakrin düzeyde lokal olarak üretilen bazı hormonlar ile

gerçekleştirildiğini göstermektedir. Ekspresyon paternleri zaman mekansal özellik gösteren granuloza kaynaklı Aktivin BMP-6, oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 ve teka kaynaklı BMP-2, -3b, -4 ve -7 bu hormonlara örnektir.

Örneğin, Aktivin A kültürde rat granuloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunu arttırmakta⁽⁸²⁾; primer folikül büyümesinin baskılayıp, daha ileri aşamadaki foliküllerin büyümesini indüklemekte^(68,83,84); aromataz aktivitesinin düzenlenmesi, östrojen sentezi, LH reseptör ekspresyonu ve oosit maturasyonunda rol oynamaktadır⁽⁸⁵⁾. Aktivin sinyal yolu reseptör (ActRIIB) mutasyonu ile bloke edildiğinde⁽⁸⁶⁾ veya aktivine irreversibl bağlanıp bioaktivitesinin nötralize eden follistatini aşırı eksprese eden transjenik farede⁽⁸⁷⁾ folikül büyümesi durmaktadır. Aktivinin tersine AMH siklik folikül rekürmanını negative olarak etkilemektedir. Bunuda küçük antral ve preantral foliküllerin FSH'ya olan yanıtlarını azaltarak yapmaktadır^(52,53,77).

Bu aşamada folikül gelişiminin bir diğer özelliği Aktivin A dominant bir ortamdan İnhibin A dominant bir ortama değişim olmasıdır. Küçük foliküller İnhibin A'ya oranla daha fazla Aktivin A üretirken, seçilen büyük antral foliküller daha fazla İnhibin A salarlar⁽⁸⁸⁾. Aktivin-A küçük preantral foliküllerin teka hücrelerinden LH bağımlı androjen sentezini zayıflatırken, seçilen antral foliküllerden salınan İnhibin A bunu tam tersi etki göstererek teka hücrelerinden LH yardımı ile olan androjen salınımını artırır. Bu sayede granuloza hücrelerinde östrojene aromatize edilecek daha fazla androjen mevcut olacaktır. Büyümekte olan foliküllerin granuloza hücrelerinde eksprese olan aktivin A reseptörü oosit üzerinde bulunmaktadır. Bununla uyumlu olarak Aktivin A gelişmekte olan foliküllerdeki oosit maturasyonundan da sorumlu olmaktadır⁽⁸⁹⁾. İn vitro oosit maturasyonunu arttırdığı insan ve hayvan modellerinde gösterilmiştir^(93,94).

TGF-β'nın etkileri Aktivin A'ya benzerdir. Bunlar arasında granuloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonunun, aromataz aktivitesinin ve inhibin yapımının artırılması, teka hücrelerinde progesteron yapımı, LH reseptör ekspresyonu ve androjen yapımının baskılanması vardır⁽⁵⁴⁾.

Büyümekte olan bir kohort mevcudiyetinde granuloza hücrelerinden salınan BMP-6 ve teka kaynaklı BMP-4 ve -7 küçük preantral foliküllerin teka hücrelerinden androjen outputunu sınırlayarak östrojen oluşumu ve bu foliküllerin büyümelerini yavaşlatır.

Luteinizasyonun inhibisyonu

Granuloza hücre proliferasyonu ve folikül büyümesi esnasında prematür luteinizasyonun önlenmesi önemlidir. Bu bağlamda oosit kaynaklı faktörler BMP-6,-15 ve GDF-9 gonadotropin ile olan progesteron sentezini baskılayarak prematur luteinizasyonu inhibe eder⁽⁶⁴⁾. BMP-15 FSH reseptörünü baskılayarak çalışırken^(63,95), BMP-6 FSH reseptörünün adenilat siklaz aktivitesini inhibe eder⁽⁹⁶⁾. İlginç olarak BMP-6 RNA'sı dominant folikül seçimi esnasında kaybolmaktadır, zira dominant folikül seçimi FSH'nın etkileri ile olmaktadır. Ne BMP-15, nede BMP-6 FSH ile olan P450 aromataz aktivitesinin artırılması ve estradiol yapımına olumsuz etkiler göstermezler⁽⁹⁵⁾. BMP-15 ve GDF-9 folikül survi üzerinde olumlu etkilerde sahiptir⁽⁹⁵⁾. BMP-4 ve -7 bazal ve FSH ile indüklenmiş estradiol sentezi, hücre proliferasyonu, androjen ve progesteron sentezinin baskılanması gibi rollere sahiptirler⁽⁵⁴⁾.

Özet olarak preantral ve antral folikül büyümesi FSH ve LH reseptör ekspresyonunu ve FSH ile indüklenen aromataz aktivitesinin artırılması ile karakterizedir. Özellikle granuloza kaynaklı Aktivin-A, TGF-β ve BMP-6, teka kaynaklı BMP-4 ve -7 daha büyük preantral ve antral foliküllerden salınarak küçük foliküller için androjen desteğini kısıp büyümelerini engellerler. Folikül büyüdükçe daha fazla İnhibin A ve follistatin salınarak aktivin dominant ortamdan inhibin dominant ortama bir geçiş olmaktadır. Artan inhibin ile FSH düzeyi düşmekte ve LH ile indüklenen androjen sentezi artarak preovulatar dönemde ihtiyaç duyulan estradiol yüksekliği için substrat hazırlanacaktır. Follistatinde aynı zamanda aktivin A'yı süprese edecektir. Bu sayede yaratılan ortamla erken folikül büyümesi aşamasında aktivin A, TGF-β ve GDF-9 gibi faktörlerin etkisi ile daha fazla FSH ve LH reseptör eksprese eden foliküller ile daha fazla aromataz aktivitesi taşıyan foliküller ileri büyüme aşamasında daha az substratı daha etkili kullanabilir hale gelerek atreziden kaçıp dominant folikül olarak seçilebilecektir. Büyümekte olan kohortun gonadotropinlere olan yanıtlarınının modüle edilmesi ve luteinizasyonun inhibisyonu da bu dönemde eşlik eden önemli olaylardır.

Sonuç olarak antral safahaya kadarki folikül büyümesi çok büyük oranda dışarıdan monitorize edemediğimiz lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin parakrin-otokrin etkileşimleri neticesinde olmaktadır. Tek bir hormon veya sinyal yolağı dışında over içinde oosit, granuloza ve teka hücreleri ile stroma gibi farklı

kompartmentlardan zaman-mekansal bir şekilde salınan bu faktörlerin kompleks etkileşimleri ile folikül büyümesi ve ovulasyon gerçekleşmektedir. Postnatal oogeneze ile ilgili çarpıcı çalışmalar gelmeye devam ettikçe prematür over yetmezliği ve kötü yanıtı düşük over rezervli hastaların tedavisine belki bir adım daha yaklaşmış olacağız. Yakın gelecekte germ kök hücreleri tıbbın diğer kollarında olduğu gibi üreme tıbbında hizmetinde olmaya aday gibi görünmektedir.

8-13. Haftalar arasında mayoza giriş ile beraber oogoniyalar oosite dönüşür. Bu ilk folikül yapısının görüldüğü 16. haftadan önce olmaktadır. Oosit leptoten, zigoten ve pakiten aşamalarından geçerek diptoten de arrest olmaktadır. Ovulasyon esnasında 1. mayoz bölünme tamamlanarak oosit haploid düzeye iner ancak 2cDNA içermeye devam eder. Ardından ikinci mayoz bölünmeye ilerleyip metafaz da kalır ve fertilizasyon esnasında tamamlanarak 1n kromozoma indirgenir.

Tablo 1: Germ hücresi ve primordial folikül oluşumundan aktivasyon-una kadar rol alan genler ve faktörler tabloda sunulmuştur.

GEN	ROLÜ	FONKSİYONU
	PRİMORDIAL GERM HÜCRESİ OLUŞUMU	
BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2)	TGF-β üyesi Extraseküler büyüme faktörü	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽¹⁹⁾
BMP-4 (Bone morphogenetic protein-4)	TGF-β üyesi Extraseküler büyüme faktörü	Primordial germ hücresi oluşumu ^(19,97)
BMP-8B (Bone morphogenetic protein-8B)	TGF-β üyesi Extraseküler büyüme faktörü	Primordial germ hücresi oluşumu ^(20,21)
Fragilis	Interferon ile uyarılan bir gen	Germ hücre kompetansı ⁽²²⁾
Stella	A protein with a SAP-like domain and a splicing factor motif-like structure	Germ hücre özelliği ve pluripotensin korunması ⁽²³⁾
Smad-1	TGF-β ligandlarının hücre içi sinyalizasyon molekülü	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽⁹⁸⁾
Smad-5	TGF-β ligandlarının hücre içi sinyalizasyon molekülü	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽⁹⁹⁾
Nanos3	RNA-bağlayan çinko parmak (zinc-finger) proteini	Göç esnasında germ hücre dizlerinin korunması ⁽¹⁰⁰⁾
Blimp1 (Prdm1)	Transkripsiyonel baskılayıcı	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽¹⁰¹⁾
Prdm14	Transkripsiyon düzenleyicisi	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽¹⁰²⁾
TIAR	Bir RNA tanıma motifi/ribonükleoprotein tip RNA bağlayıcı protein	Primordial germ hücresi oluşumu ⁽¹⁰³⁾
Pog	Bilinmiyor	Primordial germ hücresi proliferasyonu ⁽¹⁰⁴⁾
Stra8	Sitoplazmik bir faktör	Mayoz öncesi DNA sentezi ve mitozun ilerlemesi ⁽²⁷⁾
W (c-kit receptor) and Steel (kit ligand)	Tirozin kinaz reseptör Büyüme faktörü	Primordial germ hücre migrasyon ve proliferasyonu ^(105,106)
Leukemia inhibitory factor (LIF)	Çoklu değişken etkili bir sitokin	Primordial germ hücre proliferasyonu ⁽⁴⁷⁾
	PRİMORDIAL FOLLICLE FORMATION and ACTIVATION	
Figalpha	Transkripsiyon faktörü	Primordial folikül oluşumu ⁽¹⁰⁷⁾ Zone pellucida (ZP) gen ekspresyonu ⁽¹⁰⁸⁾
Notch	Sinyal yolu	Primordial folikül oluşumu ⁽¹⁰⁹⁾
Daz1a	Sitoplazmik protein	Primordial folikül oluşumu ⁽¹¹⁰⁾
Nerve Growth Factor	Büyüme faktörü	Primordial folikül oluşumu ⁽¹¹¹⁾
SPO11 (sporulation protein homology)	Mayoz proteini	Primordial folikül oluşumu ⁽¹¹²⁾
DMC1 [disrupted meiotic cDNA 1 homologue (human)]	Mayoz proteini	Primordial folikül oluşumu ⁽¹¹¹⁾
MSH5 [mutS homologue 5 (Escherichia coli)]	Mayoz proteini	Primordial folikül oluşumu ⁽¹¹¹⁾
Zfx	Çinko parmak proteini	Primordial folikül oluşumu Oosit yaşamı ve proliferasyonu ⁽¹¹³⁾
ATM	Phosphatidylinositol 3-kinaz (PIK)-benzeri kinazların bir üyesi	Mayotik rekombinasyon Mitotik hücre siklus regülasyon kinazı DNA hasarı ile uyarılan mitotik hücre siklus kontrol noktası ⁽¹¹⁴⁾
Nobox	An oosit-specifik homeobox geni	Nobox olmadığında folikül atrezisi ⁽⁵⁰⁾
Foxo3	Forkhead transkripsiyon faktörü	Primordial folikül aktivasyonu ⁽⁵¹⁾

KAYNAKLAR

1. Waldeyer W Eierstock und EiEngleman. Leipzig 1870;
2. Zuckerman S The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 1951; 6: 63- 109.
3. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru J K, and Tilly J L Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428: 145- 50.
4. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee H J, Adams G B, Niikura Y, et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* 2005; 122: 303- 15.
5. Lee H J, Selesniemi K, Niikura Y, Niikura T, Klein R, Dombkowski D M, et al. Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol* 2007; 25: 3198- 204.
6. Allen E Ovogenesis during sexual maturity. *Am J Anat* 1923; 439- 81.
7. Simkins C Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *Am J Anat* 1932; 51: 465- 505.
8. Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M, and Upadhyaya N B Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2004; 2: 20.
9. Bukovsky A, Svetlikova M, and Caudle M R Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; 3: 17.
10. Eggan K, Jurga S, Gosden R, Min I M, and Wagers A J Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 2006; 441: 1109- 14.
11. Greenfeld C and Flaws J A Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *Bioessays* 2004; 26: 829- 32.
12. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini D F, Keefe D L, et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol* 2007; 306: 112- 20.
13. Zou K, Yuan Z, Yang Z, Luo H, Sun K, Zhou L, et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 631- 6.
14. Oktem O and Oktay K Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. *Cancer* 2007; 110: 2222- 9.
15. Hershlag A and Schuster M W Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2002; 77: 419- 21.
16. Oktay K Spontaneous conceptions and live birth after heterotopic ovarian transplantation: is there a germline stem cell connection? *Hum Reprod* 2006; 21: 1345- 8.
17. Sanders J E, Hawley J, Levy W, Gooley T, Buckner C D, Deeg H J, et al. Pregnancies following high-dose cyclophosphamide with or without high-dose busulfan or total-body irradiation and bone marrow transplantation. *Blood* 1996; 87: 3045- 52.
18. Dalle J H, Champagne M A, and Duval M Pregnancy after bone marrow transplantation in Fanconi anaemia. *Br J Haematol* 2007; 137: 76; author reply.
19. Ying Y and Zhao G Q Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* 2001; 232: 484- 92.
20. Ying Y, Qi X, and Zhao G Q Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7858- 62.
21. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, Yamanaka K, Wakayama T, and Saitou M A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 2009; 137: 571- 84.
22. Lange U C, Saitou M, Western P S, Barton S C, and Surani M A The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol* 2003; 3: 1.
23. Saitou M, Barton S C, and Surani M A A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 2002; 418: 293- 300.
24. Mc K D, Hertig A T, Adams E C, and Danziger S Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec* 1953; 117: 201- 19.
25. Merchant-Larios H and Centeno B Morphogenesis of the ovary from the sterile W/W^v mouse. *Prog Clin Biol Res* 1981; 59B: 383- 92.
26. Oktem O and Oktay K The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 1- 9.
27. Baltus A E, Menke D B, Hu Y C, Goodheart M L, Carpenter A E, de Rooij D G, et al. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nat Genet* 2006; 38: 1430- 4.
28. Abir R, Orvieto R, Dicker D, Zukerman Z, Barnett M, and Fisch B Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertil Steril* 2002; 78: 259- 64.
29. Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojikian G K, and Oktay M Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2000; 63: 457- 61.
30. Eppig J J Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001; 122: 829- 38.
31. Skinner M K Regulation of primordial follicle assembly and

- development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 461- 71.
32. Oktay K, Briggs D, and Gosden R G Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3748- 51.
 33. O'Brien M J, Pendola J K, and Eppig J J A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod* 2003; 68: 1682- 6.
 34. Rankin T, Familari M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, et al. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996; 122: 2903- 10.
 35. Lee W S, Otsuka F, Moore R K, and Shimasaki S Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 994- 9.
 36. Nilsson E E and Skinner M K Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 2003; 69: 1265- 72.
 37. Dong J, Albertini D F, Nishimori K, Kumar T R, Lu N, and Matzuk M M Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996; 383: 531- 5.
 38. Carabatsos M J, Elvin J, Matzuk M M, and Albertini D F Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 1998; 204: 373- 84.
 39. Vitt U A, McGee E A, Hayashi M, and Hsueh A J In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141: 3814- 20.
 40. Nilsson E E and Skinner M K Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2002; 67: 1018- 24.
 41. Solloway M J, Dudley A T, Bikoff E K, Lyons K M, Hogan B L, and Robertson E J Mice lacking Bmp6 function. *Dev Genet* 1998; 22: 321- 39.
 42. Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo F J, Elvin J A, Carino C, et al. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 854- 66.
 43. Di Pasquale E, Beck-Peccoz P, and Persani L Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 106- 11.
 44. Galloway S M, McNatty K P, Cambridge L M, Laitinen M P, Juengel J L, Jokiranta T S, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet* 2000; 25: 279- 83.
 45. Nilsson E E and Skinner M K Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 214: 19- 25.
 46. Nilsson E E, Kezele P, and Skinner M K Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 188: 65- 73.
 47. Cheng L, Gearing D P, White L S, Compton D L, Schooley K, and Donovan P J Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development* 1994; 120: 3145- 53.
 48. Kezele P, Nilsson E E, and Skinner M K Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 2005; 73: 967- 73.
 49. Kezele P R, Nilsson E E, and Skinner M K Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 192: 37- 43.
 50. Rajkovic A, Pangas S A, Ballow D, Suzumori N, and Matzuk M M NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science* 2004; 305: 1157- 9.
 51. John G B, Gallardo T D, Shirley L J, and Castrillon D H Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol* 2008; 321: 197- 204.
 52. Durlinger A L, Gruijters M J, Kramer P, Karels B, Ingraham H A, Nachtigal M W, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1076- 84.
 53. Durlinger A L, Kramer P, Karels B, de Jong F H, Uilenbroek J T, Grootegoed J A, et al. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; 140: 5789- 96.
 54. Knight P G and Glistler C TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191- 206.
 55. Goldenberg R L, Powell R D, Rosen S W, Marshall J R, and Ross G T Ovarian morphology in women with anosmia and hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 126: 91- 4.
 56. Oktay K, Newton H, Mullan J, and Gosden R G Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 1133- 8.
 57. McGee E, Spears N, Minami S, Hsu S Y, Chun S Y, Billig

- H, et al. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1997; 138: 2417- 24.
58. Hreinsson J G, Scott J E, Rasmussen C, Swahn M L, Hsueh A J, and Hovatta O Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 316- 21.
 59. Wang J and Roy S K Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 2004; 70: 577- 85.
 60. Hayashi M, McGee E A, Min G, Klein C, Rose U M, van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 1999; 140: 1236- 44.
 61. Hanrahan J P, Gregan S M, Mulsant P, Mullen M, Davis G H, Powell R, et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 2004; 70: 900- 9.
 62. Juengel J L, Hudson N L, Heath D A, Smith P, Reader K L, Lawrence S B, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002; 67: 1777- 89.
 63. Otsuka F, Yao Z, Lee T, Yamamoto S, Erickson G F, and Shimasaki S Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem* 2000; 275: 39523- 8.
 64. Otsuka F, Moore R K, Iemura S, Ueno N, and Shimasaki S Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 961- 6.
 65. Lee W S, Yoon S J, Yoon T K, Cha K Y, Lee S H, Shimasaki S, et al. Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 159- 63.
 66. Shimasaki S, Zachow R J, Li D, Kim H, Iemura S, Ueno N, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 7282- 7.
 67. Zhao J, Taverne M A, van der Weijden G C, Bevers M M, and van den Hurk R Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod* 2001; 65: 967- 77.
 68. Oktem O and Oktay K The role of extracellular matrix and activin-A in in vitro growth and survival of murine preantral follicles. *Reprod Sci* 2007; 14: 358- 66.
 69. Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, et al. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology* 1999; 140: 2480- 5.
 70. Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y, and Vanderstichele H Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 1998; 50: 294- 304.
 71. Juengel J L and McNatty K P The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 143- 60.
 72. Roy S K and Kole A R Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 207- 14.
 73. Chegini N and Flanders K C Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology* 1992; 130: 1707- 15.
 74. Saragueta P E, Lanuza G M, and Baranao J L Autocrine role of transforming growth factor beta1 on rat granulosa cell proliferation. *Biol Reprod* 2002; 66: 1862- 8.
 75. Dodson W C and Schomberg D W The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1987; 120: 512- 6.
 76. Adashi E Y, Resnick C E, Hernandez E R, May J V, Purchio A F, and Twardzik D R Ovarian transforming growth factor-beta (TGF beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 61: 247- 56.
 77. Visser J A and Themmen A P Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 234: 81- 6.
 78. Durlinger A L, Gruijters M J, Kramer P, Karels B, Kumar T R, Matzuk M M, et al. Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 4891- 9.
 79. Juneja S C, Barr K J, Enders G C, and Kidder G M Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; 60: 1263- 70.
 80. Simon A M, Goodenough D A, Li E, and Paul D L Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; 385: 525- 9.
 81. Baerwald A R, Adams G P, and Pierson R A Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biol Reprod* 2003; 69: 1023- 31.
 82. Xiao S, Robertson D M, and Findlay J K Effects of activin

- and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1992; 131: 1009- 16.
83. Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, et al. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 1999; 140: 37- 42.
 84. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998; 139: 2342- 7.
 85. Findlay J K An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol Reprod* 1993; 48: 15- 23.
 86. Matzuk M M, Kumar T R, and Bradley A Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 1995; 374: 356- 60.
 87. Guo Q, Kumar T R, Woodruff T, Hadsell L A, DeMayo F J, and Matzuk M M Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 96- 106.
 88. Yamoto M, Minami S, Nakano R, and Kobayashi M Immunohistochemical localization of inhibin/activin subunits in human ovarian follicles during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 989- 93.
 89. Hsueh A J, Dahl K D, Vaughan J, Tucker E, Rivier J, Bardin C W, et al. Heterodimers and homodimers of inhibin subunits have different paracrine action in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 5082- 6.
 90. Alak B M, Coskun S, Friedman C I, Kennard E A, Kim M H, and Seifer D B Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis in vitro. *Fertil Steril* 1998; 70: 1126- 30.
 91. Alak B M, Smith G D, Woodruff T K, Stouffer R L, and Wolf D P Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization in vitro by inhibin A and activin A. *Fertil Steril* 1996; 66: 646- 53.
 92. Sadatsuki M, Tsutsumi O, Yamada R, Muramatsu M, and Taketani Y Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 388- 95.
 93. O W S, Robertson D M, and de Kretser D M Inhibin as an oocyte meiotic inhibitor. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 62: 307- 11.
 94. Silva C C, Groome N P, and Knight P G Demonstration of a suppressive effect of inhibin alpha-subunit on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1999; 115: 381- 8.
 95. Shimasaki S, Moore R K, Otsuka F, and Erickson G F The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* 2004; 25: 72- 101.
 96. Erickson G F and Shimasaki S The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 9.
 97. Lawson K A, Dunn N R, Roelen B A, Zeinstra L M, Davis A M, Wright C V, et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 1999; 13: 424- 36.
 98. Tremblay K D, Dunn N R, and Robertson E J Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* 2001; 128: 3609- 21.
 99. Chang H and Matzuk M M Smad5 is required for mouse primordial germ cell development. *Mech Dev* 2001; 104: 61- 7.
 100. Tsuda M, Sasaoka Y, Kiso M, Abe K, Haraguchi S, Kobayashi S, et al. Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science* 2003; 301: 1239- 41.
 101. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, et al. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005; 436: 207- 13.
 102. Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, et al. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nat Genet* 2008; 40: 1016- 22.
 103. Beck A R, Miller I J, Anderson P, and Streuli M RNA-binding protein TIAR is essential for primordial germ cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 2331- 6.
 104. Agoulnik A I, Lu B, Zhu Q, Truong C, Ty M T, Arango N, et al. A novel gene, Pog, is necessary for primordial germ cell proliferation in the mouse and underlies the germ cell deficient mutation, gcd. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 3047- 53.
 105. Huang E J, Manova K, Packer A I, Sanchez S, Bachvarova R F, and Besmer P The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; 157: 100- 9.
 106. Manova K, Huang E J, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost S M, et al. The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev Biol* 1993; 157: 85- 99.
 107. Soyal S M, Amleh A, and Dean J FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development* 2000; 127: 4645- 54.
 108. Liang L, Soyal S M, and Dean J FIGalpha, a germ cell specific

- transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development* 1997; 124: 4939- 47.
109. Trombly D J, Woodruff T K, and Mayo K E Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology* 2009; 150: 1014-24.
110. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay S J, Kilanowski F, Saunders P, et al. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 1997; 389: 73- 7.
111. Dissen G A, Romero C, Hirshfield A N, and Ojeda S R Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2078- 86.
112. Di Giacomo M, Barchi M, Baudat F, Edelman W, Keeney S, and Jasin M Distinct DNA-damage-dependent and -independent responses drive the loss of oocytes in recombination-defective mouse mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 737- 42.
113. Luoh S W, Bain P A, Polakiewicz R D, Goodheart M L, Gardner H, Jaenisch R, et al. *Zfx* mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Development* 1997; 124: 2275- 84.
114. Plug A W, Peters A H, Xu Y, Keegan K S, Hoekstra M F, Baltimore D, et al. ATM and RPA in meiotic chromosome synapsis and recombination. *Nat Genet* 1997; 17: 457- 61.