

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

NORMAL BİREYLERDE VE POLİKİSTİK OVER SENDROMLU (PKOS)
HASTALARDA GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN MİKRORNA (miRNA)
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ

Alp AYDOS

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

ARALIK

2014

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Alp AYDOS

ONAY SAYFASI

Yrd. Doç. Dr. Bala Gr DEDEOĞLU danışmanlığında, Alp AYDOS tarafından hazırlanan bu çalışma 26/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

İmza:

ye: Yrd. Doç. Dr. Arzu ATALAY

İmza:

ye: Yrd. Doç. Dr. Bala GR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Normal Bireylerde ve Polikistik Over Sendromlu (PKOS) Hastalarda Granüloza Hücrelerinin MikroRNA (miRNA) Profillerinin Belirlenmesi

Alp Aydos

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Anovulatuvar infertilitenin en sık rastlanan sebeplerinden biri olan polikistik over sendromu (PKOS) infertiliteye sebep olan bir endokrin hastalıdır ve hirsutizm, obezite, insülin direnci ve hiperinsülinemi ile alaka gösterdiği bilinmektedir. MikroRNA'lar (miRNA) gen regülasyonunda rol oynayan ve protein kodlamayan, 21-25 baz uzunluğunda endojen küçük RNA molekülleridir ve insan genlerinin %60'ının miRNA'lar tarafından düzenlendiği tahmin edilmektedir. miRNA'ların yumurtalıklarda ve oosit hücrelerindeki ifade profil çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır ve yumurtalıkta, oositlerde ya da yumurtalık somatik hücrelerinde (teka, granüloza, kumulus), ifade olan miRNA'ların PKOS gibi infertiliteye sebep olan hastalıklardaki rolü henüz ortaya konmamıştır.

Bu çalışma PKOS'ta oosit mikroçevresini oluşturan somatik hücrelerden biri olan granüloza hücrelerinde miRNA profilinin belirlenmesine yönelik yapılan ilk çalışmadır. Tez kapsamında infertilite sebebi ile IVF tedavisine başvuran 14 PKOS hastası ve 9 normal bireyden elde edilen granüloza hücreleri ile miRNA mikrodizin çalışması gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin verilerinin analizi sonucunda PKOS'ta normal bireylere göre anlamlı olarak farklılık gösteren 7 adet miRNA bulunmuştur. miRNA'lara ait tahmini hedef genler ve rol aldıkları yollar veritabanları aracılığıyla belirlenmiştir. Belirlenen tahmini hedefler; granüloza hücreleri ile PKOS ve normal bireyler kıyaslanarak gerçekleştirilen bağımsız mikrodizin çalışması kullanılarak biyoinformatik olarak doğrulanmıştır.

Tez çalışması sonucunda daha önce PKOS ile ilişkilendirilmemiş 7 adet miRNA tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların olası hedeflerinin daha önce PKOS ile ilişkilendirilmiş olması ve PKOS'ta etkin olduğu tespit edilen yollarda (MAPK, TGF- β , steroidogenez, insülin sinyal yolları) görev almaları ve bağımsız çalışmada biyoinformatik olarak doğrulanmaları miRNA'ların PKOS ile olan ilişkisinin güvenilirliğini artırmaktadır. Bu tez kapsamında elde edilen veriler miRNA'ların yumurta mikroçevresindeki moleküler düzenlemede aktif rol alabileceklerine dikkat çekmektedir.

2014, 103 sayfa

Anahtar kelimeler: mikroRNA (miRNA), polikistik over sendromu (PKOS), infertilite, granüloza, mikrodizin

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

Identification of the microRNA (miRNA) Expression Profiles of Granulosa Cells in Normal Controls and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Patients

Alp Aydos

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assist. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder and it is the most common cause of anovulatory infertility, which is related with hirsutism, obesity, insulin resistance and hyperinsulemia. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression and up to 60% of human protein coding genes are expected to be regulated by miRNAs. miRNA expression studies in the oocytes and ovaries are still at the very beginning and the roles of miRNAs expressed in oocytes or ovarian somatic cells (theca, granulosa, cumulus), have still not been revealed in reproductive infertility disorders such as PCOS.

This is the first study that identifies the expression profiles of miRNAs in granulosa cells, which is one of the somatic cells of oocyte microenvironment, in PCOS. In this thesis study, miRNA microarray analysis was conducted with granulosa cells obtained from 14 PCOS patients and 9 healthy controls that are subjected to in vitro fertilization (IVF) procedure. At the end of microarray data analysis 7 miRNAs were found to be differentially expressed significantly in PCOS patients compared to normal controls. The identification of predicted target genes of these 7 miRNAs and the pathway enrichment analysis was performed by databases. Afterwards the target genes were validated bioinformatically by an independent microarray study.

As a result of this thesis study 7 miRNAs that have not been previously associated with PCOS were identified. The potential targets of aforementioned miRNAs and the pathways they are enriched (MAPK, TGF- β , ovarian steroidogenesis, insulin signaling pathway) were previously associated with PCOS. These relations together with the validation with an independent microarray study increases the reliability of the relationship of these miRNAs with PCOS. The data obtained in this study emphasizes the potential roles of miRNAs in the molecular regulation of oocyte microenvironment.

2014, 103 pages

Keywords: microRNA (miRNA), polycystic ovary syndrome (PCOS), infertility, granulosa, microarray

TEŞEKKÜR

Bana olan inancı, yol göstericiliği, arkadaşlığı ve sonsuz sabrı için danışmanım, canım hocam, hayattaki en büyük şansım Yrd. Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu'na,

Tez çalışmamı 112S579 numaralı proje kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu'na (TÜBİTAK-SBAG),

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans eğitimimde sağladığı maddi destek için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu - Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (TÜBİTAK-BİDEB),

Yol arkadaşlığı ve her anlamda sonsuz desteği için canım arkadaşım, dostum Yasemin Öztumur'a,

Cümlelere sığdıramadığım bitmek bilmeyen sevgisi, sabrı ve desteği için hayat arkadaşım, sonsuz aşkım Pelin Aksoy'a,

Dünyama mutluluk ve ışık getirdiği için uğur böceğim, miniğim, Bade Dedeoğlu'na,

Deneylerimdeki yardımları ve arkadaşlıkları için Dr. Ali Kemal Oğuz'a, Dr. Günseli Çubukçuoğlu Deniz'e ve Blm. Uzm. Seda Yılmaz'a,

Sıcacık dostlukları ve destekleri için Dr. Nevin Belder, Blm. Uzm. Özge Cumaogulları, Blm. Uzm. Mısra Nadir ve Blm. Uzm. Funda Kaya Demirsoy'a,

Tezin en zor kısmı olan örneklerin elde edilmesinde büyük desteği ve özverisi olan Embriyolog Aykut Gürel'e,

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine ve BGD Lab üyelerine,

Beni büyüten, yetiştiren, bugüne gelmemi sağlayan canım annem Emiç Aydos'a, canım kardeşim, küçüğüm, cadım Sıla Aydos'a, hiçbir zaman desteğini esirgemeyen uzakta da olsa bana güven duygusunu yaşatan dayım Vedat Yıldırım'a ve iyilik meleğim teyzem Aynur Yıldırım'a,

Sonsuz teşekkürler.

Alp AYDOS

Ankara, 2014

Babam Güngör AYDOS'a

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. İnsan Dışı Üreme Sistemi	3
2.1.1. Yumurtalıklar ve folikül olgunlaşması.....	3
2.1.2. Antral folikül ve granüloza hücreleri	5
2.2. Polikistik Over Sendromu	9
2.2.1. Polikistik over sendromu'nun etiyolojisi	9
2.2.2. Polikistik over sendromu'nun tanısı.....	10
2.2.3. PKOS ve infertilite	11
2.3. İn-vitro Fertilizasyon Yöntemi.....	11
2.4. MikroRNA	12
2.4.1. MikroRNA'ların keşfi	12
2.4.2. MikroRNA biyogenezi.....	14
2.4.3. MikroRNA'ların etki mekanizması.....	15
2.4.4. MikroRNA'ların fonksiyonu.....	16
2.5. MikroRNA'lar ve Polikistik Over Sendromu	17
2.6. Mikrodizin Yöntemi.....	18
2.6.1. Mikrodizin tanımı ve temeli.....	18
2.6.2. Mikrodizin teknolojisinin kullanım alanları.....	19

3. GEREKÇE VE AMAC	20
4. MATERYAL VE YÖNTEM	22
4.1. Materyal	22
4.1.1. Hasta ve normal örnekler	22
4.1.2. RNA bütünlük analizi için kullanılan cihazlar ve kitler	24
4.1.3. Mikrodizin çipleri, kitleri ve kullanılan cihazlar	24
4.1.4. cDNA sentez reaksiyonu kitleri, eş zamanlı PZR kitleri ve cihazlar	24
4.1.5. Veritabanlarından indirilen mikrodizin çalışmaları	25
4.1.6. Primerler	25
4.2. Yöntem	26
4.2.1. Hastalardan ve normal bireylerden folikül sıvısının toplanması	27
4.2.2. Folikül sıvısından granüloza izolasyonu	27
4.2.3. Granüloza hücrelerinden total RNA izolasyonu	28
4.2.4. RNA miktarının belirlenmesi	29
4.2.5. RNA bütünlüğünün kontrolü	30
4.2.6. Mikrodizin çalışmasının gerçekleştirilmesi	34
4.2.7. Mikrodizin verilerinin analizi	38
4.2.8. İstatistiksel analizler	39
4.2.9. miRNA'ların eş zamanlı PZR yöntemi ile doğrulanması	40
4.2.10. miRNA hedef genlerinin belirlenmesi	41
4.2.11. Yolak analizleri	41
4.2.12. miRNA hedef genlerinin biyoinformatik olarak doğrulanması	41
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
5.1. RNA İzolasyonuna Ait Bulgular	43
5.2. Mikrodizin Çalışmasına Ait Bulgular	45
5.3. Mikrodizin Verilerinin Analizine Ait Bulgular	47
5.3.1. Normalizasyon sonrası bulgular	47
5.3.2. İki grup arasında farklılık gösteren miRNA'lar	48
5.4. miRNA'ların Eş Zamanlı PZR Yöntemi ile Doğrulanmasına Ait Bulgular	50
5.5. miRNA Hedef Genlerinin Tespiti	52
5.6. miRNA Hedef Genleri ile Gerçekleştirilmiş Yolak Analizlerine Ait Bulgular	52
5.7. miRNA Hedef Genlerinin Biyoinformatik Olarak Doğrulanmasına Ait Bulgular	57
5.7.1. Doğrulanmış miRNA hedeflerinin yer aldığı yolaklar	61
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6.1. Tartışma	64
6.2. Sonuç	72

7.	<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>74</u>
8.	<u>EKLER.....</u>	<u>83</u>
9.	<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>85</u>
10.	<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>87</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Antral folikülün iç yapısı.....	6
Şekil 2.2. İnsanda dişi üreme döngüleri	8
Şekil 2.3. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması.....	16
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması	26
Şekil 4.2. Biocoll ayırma işleminden sonra oluşan katmanlar ve granüloza hücre tabakası	28
Şekil 4.3. Poly (A) kuyrukla ve ligasyon aşamalarının şematik gösterimi.....	35
Şekil 4.4. GeneChip® miRNA 3.0 çipi için .DAT uzantılı dosyanın AGCC Viewer ile açılmış görüntüsü.....	37
Şekil 5.1. İzole edilen total RNA'ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü	45
Şekil 5.2. Çiplere ait verilerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin kutu grafiği.....	47
Şekil 5.3. Çiplerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları	48
Şekil 5.4. Analiz sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği.....	49
Şekil 5.5. Sınıf karşılaştırması sonucunda anlamlı değişiklik gösteren ($p<0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait heatmap.....	50
Şekil 5.6. PKOS hastası ve normal bireyler ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği.....	51
Şekil 5.7. PKOS hastaları ve normal bireyler arasında anlamlı olarak artış gösteren ve doğrulanan miRNA'lara ait mikrodizin ve eş zamanlı PZR sonuçlarını gösterir grafik.	51
Şekil 5.8. miRNA hedef genleri ile bağımsız çalışmada farklılık gösteren genleri ve iki grubun ortaklarını gösterir venn şeması	58

Şekil 5.9. miRNA hedef genleri ile indirilen veride anlamlı olarak farklılık gösteren genlerin ortakları (toplam hedefler) ve miRNA ifade değişimine uygun olarak değişim gösteren genleri (biyoinformatik olarak doğrulanmış hedefleri) gösterir grafik.....	59
Şekil 5.10. PKOS hastalarında normal gruba göre ifadesi azalan hsa-miR-4286'nın hedeflerinin bağımsız çalışmada PKOS hastalarında (PK) normal gruba (NM) göre ifade artışını gösterir heatmap	60
Şekil 5.11. hsa-miR-4286'nın biyoinformatik olarak doğrulanan hedeflerinin bazılarına (LDLR, PRKACA, TGFB1) ait hizalama analizi sonuçları ve mirSVR skorları.....	61
Şekil 5.12. Doğrulanmış miRNA hedefleri arasında yer alan PRKACA, Cb1 ve eIF4E genlerinin KEGG yolak analiz sonucu (İnsülin sinyal yolağı, $p=0,0076$)	62
Şekil 5.13. Doğrulanmış miRNA hedefleri arasında yer alan BDNF, TGFB, MLTK ve PRKACA genlerinin KEGG yolak analiz sonucu (MAPK sinyal yolağı, $p=0,0072$).....	63
Şekil 6.1. Ovaryumda steroid hormonlarının sentez yolağı	67
Şekil 6.2. İnsülin sinyal yolağı	68
Şekil 6.3. MAPK sinyal yolağı.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin örnek numaraları, yaş bilgisi ve toplanan oosit sayıları.....	23
Çizelge 4.2. Eş zamanlı PZR’de kullanılan miRNA primerlerinin kısa adları, katalog numaraları, dizi ve Qiagen ürün adı bilgileri.....	25
Çizelge 4.3. Poly (A) kuyruklama karışımı.....	34
Çizelge 4.4. Hibridizasyon kokteyli bileşenleri.....	36
Çizelge 5.1. RNA örneklerine ait konsantrasyon, saflık ve RIN (RNA bütünlük sayısı – RNA integrity number) değerleri	44
Çizelge 5.2. Çiplerin tarama sonrası hibridizasyon yüzdelerini gösterir çizelge	46
Çizelge 5.3. PKOS hastaların normal bireyler ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p<0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA’lar	48
Çizelge 5.4. Tahmini miRNA hedef gen sayıları	52
Çizelge 5.5. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-1587’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	53
Çizelge 5.6. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-1909’a ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	53
Çizelge 5.7. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-3135b’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	54
Çizelge 5.8. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-3188’e ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	55
Çizelge 5.9. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi azalan hsa-miR-4286’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	55
Çizelge 5.10. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-4417’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	56

Çizelge 5.11. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-4433’e ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları.....	56
Çizelge 5.12. Tahmini miRNA hedeflerinin ortak olarak rol aldıkları yolaklar ve yolaklarda bulunan hedef gen sayıları	57
Çizelge 5.13. Doğrulanmış hedeflerin yer aldığı yolak isimleri, yolaklarda rol alan gen sayıları ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri (p-değerleri)	62

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
AGO	Argonaute
AGTR2	Angiotensin II reseptörü
BDNF	Beyinde üretilen nörotrofik faktör
CYP1B1	Sitokrom P450, aile 1, altaile B, polipeptit 1
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GAG	Glikozaminoglikan
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
HS	Heparan sülfat
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
INSR	İnsülin reseptörü
IVF	İn-vitro fertilizasyon
KOK	Kumulus-oosit kompleksi
LDLR	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
LH	Lüteinleştirici hormon
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
NDST	N-deasetilaz/N-sülfotransferaz
ng	Nanogram
PKOM	Polikistik over morfolojisi
PKOS	Polikistik over sendromu
PRKACA	Protein kinaz, cAMP-bağımlı, katalitik, alfa

PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
TGFB1	Transforming (dönüştürücü) büyüme faktörü, beta 1
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınları etkileyen bir endokrin hastalıdır. Sendrom polikistik over morfolojisi, kronik yumurtlama bozukluğu ve androjen hormonların artışıyla karakterizedir ve başta infertilite olmak üzere insülin direnci ve tip 2 diyabet gibi hastalıklarla da doğrudan ilişkilidir.

PKOS'un görülme sıklığı kullanılan tanı kriterlerine göre değişiklik göstermektedir. ESHRE/ASRM (European Society of Human Reproduction and Embryology / American Society for Reproductive Medicine) kriterlerine göre her yıl 100 kadından 15-20'sine PKOS teşhisi konmaktadır.

Tip 1-2 diyabet hastası yetişkin kadınlar PKOS açısından risk altındadırlar. PKOS hastası kadınların %50-70'inde insülin direnci ve bu duruma bağlı olarak ortaya çıkan hipertansiyon, dislipidemi, glikoz intoleransı, diyabet gibi hastalıklar gelişmektedir. Kılınma (hirsutizm) ve adet döngüsü düzensizlikleri de PKOS ile birlikte görülebilmektedir. Yapılan çalışmalarda PKOS'un kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıklarla ilişkisi gösterilmiştir. Bunlar ile birlikte mental düzensizliklerin de (depresyon, kaygı bozukluğu, bipolar bozukluk ve tıkanırcasına yeme bozukluğu (Binge Eating Disorder)) PKOS hastası kadınlarda daha sık görüldüğü tespit edilmiştir.

PKOS'ta hasta profiline göre değişen klomifen sitrat-metformin terapisi, üremeye yardımcı tedaviler, laparoskopik ovaryum cerrahisi veya dışarıdan gonadotropin verilmesi gibi tedavi yöntemleri uygulanmaktadır.

Polikistik over sendromu metabolik, endokrinolojik, psikiyatrik ve kardiyovasküler etkileri ile kompleks bir hastalıktır. Etkileri hastaların hayatı boyunca sürebilmekte ve yaşam kalitesini düşürebilmektedir. Bu nedenle daha etkili tanı ve tedavi yöntemleri geliştirilmesi hastada görülebilecek diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastanın yaşam süresini kısaltabilecek durumlardan korunmak için önemlidir.

PKOS'un etiyolojisi açık olmamakla birlikte; genetik temele dayanan ailesel geçişlere ait bağlantılar bulunmaktadır. Yapılan alışmalar PKOS hastası kadınlarda birçok moleküler sinyal yolağına ait genlerin ifadesinin değışerek yumurtalıklarda fonksiyonel bozuklukların oluştuğunu göstermiştir. Bu nedenle PKOS'un moleküler temelinin aydınlatılması ve bu yolaklarda hangi genlerin etkilendiğinin bulunması, PKOS'un mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ve tanı-tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İnsanda Dişi Üreme Sistemi

İnsanlarda dişi üreme sistemi temel olarak dışta; klitoris, vajinal açıklık ve bu iki yapıyı çevreleyen iki çift dudaktan (labia) oluşur. İçte ise hormonları salgılayan ve yumurta üreten gonadlar, oviduct (yumurta kanalları), uterus (rahim), rahim duvarı, endometriyum gibi döllenme için ortam hazırlayan ve embriyonun tutunmasını ve gelişmesini sağlayan yapılardan oluşur.

Karın boşluğunun her iki yanında uterusu bağlı şekilde içinde olgunlaşmamış folikülleri ve oositleri taşıyan bir çift yumurtalık bulunur. Ovidukt (yumurta kanalı ya da fallop tüpü) ovaryumların hemen yanındaki boşluğa açılır ve yumurtlama sonucunda boşluğa bırakılan yumurta ovidukt içi epitel hücrelerinde bulunan siller yardımıyla tüplere giderek rahime doğru taşınır. Bu taşıma esnasında yumurta sperm ile karşılaşır ve gebelik gerçekleşir. Rahim yani uterus elastik, kalın ve kaslı bir yapıya sahiptir ve hamilelik esnasında ortalama 4 kg'lık bir fetüsü taşıyabilecek kadar genişleyebilir. Rahmin iç yüzeyini kaplayan endometriyum ise kan damarlarınca zengin bir ağ yapısındadır.

Serviks uterusun boyun kısmıdır ve vajinaya açılır. Vajina ince duvarlı ve doğum kanalı olarak görev yapan bir odadır. Çiftleşme sırasında sperm de vajinada toplanmaktadır ve sonrasında yumurtaya ulaşmak üzere uterusu oradan da ovidukta doğru ilerlerler (1).

2.1.1. Yumurtalıklar ve folikül olgunlaşması

Oogenez

Yumurta hücresinin gelişimi (oogenez) embriyoda anne karnında primordial germ hücrelerinin mitoz bölünmesi sonucu oogoniyumların oluşması ile başlar. Oogoniyumlar mitotik bölünmeler ile çoğalırlar ve daha sonra doğuma kadar bölünmelerinin profaz 1 aşamasında duraklayacağı mayoz bölünme aşamasına geçerler. Büyümesi ve gelişmesi duran bu primer oositler kendilerini koruyacak somatik hücreler ile çevrili küçük bir

folikül içerisinde dirler. Doğum esnasında ovaryumlar içerisinde 1-2 milyon primer oosit bulunmaktadır.

Ergenlik çağının gelmesi ile birlikte folikül uyarıcı hormon (Follicle-stimulating hormone – FSH) belirli aralıklarla salgılanır ve ovaryumlardaki küçük bir grup folikül uyarılarak büyüme ve gelişmelerine devam etmeye başlarlar. Tipik olarak ergenlikten itibaren menopoza kadar geçen sürede her ay bir folikül içerisinde bulunan primer oositin mayoz 1'i tamamlaması ile tamamen olgunlaşır. İkinci mayotik bölünme bu primer oositte başlar ancak metafaz 2 aşamasında yine durur. Mayoz 2'nin metafaz aşamasında duran bu sekonder oositler folikülün çatlaması ile (yumurtlama) serbest kalır. Sekonder oosit ancak bir sperm ile karşılaşırsa mayoz bölünmesi tamamlayabilmektedir. Primer ve sekonder oositin geçirdiği mayoz bölünmelerde sitoplazma bölünmesi (sitokinez) eşit değildir ve oositin yanında oluşan daha küçük hücreler kutup cisimciği olarak adlandırılırlar. Bu kutup cisimcikleri genellikle yıkılırlar. Sonuç olarak oogenezin son fonksiyonel ürünü spermin baş kısmını içeren olgun bir yumurta hücresidir (1).

Folikül olgunlaşması

Ergenlik çağının gelmesi ile birlikte ovaryum döngüsü başlar. Bu döngünün başlangıcında ilk olarak hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon (Gonadotropin-releasing hormone – GnRH) salgılanır. GnRH, ön hipofizden düşük miktarda FSH ve luteinleştirici hormon (Luteinizing hormone – LH) salgılanmasını düzenler. FSH; folikül büyümesini indükler ve büyüyen foliküldeki granüloza hücreleri östradiol (steroid yapıdaki bir çeşit östrojen) salgılamaya başlarlar ancak kandaki östrojen artışı çok yavaş gerçekleşmektedir. Bu aşamada birçok folikül olgunlaşmaya başlamaktadır ancak ilerleyen fazlarda yalnızca bir folikül içerisindeki oosit olgunlaşacaktır. Foliküler fazda östrojen seviyesindeki bu hafif artış hipofiz hormonlarının (FSH ve LH) kandaki miktarının düşük tutulmasını sağlamaktadır (1).

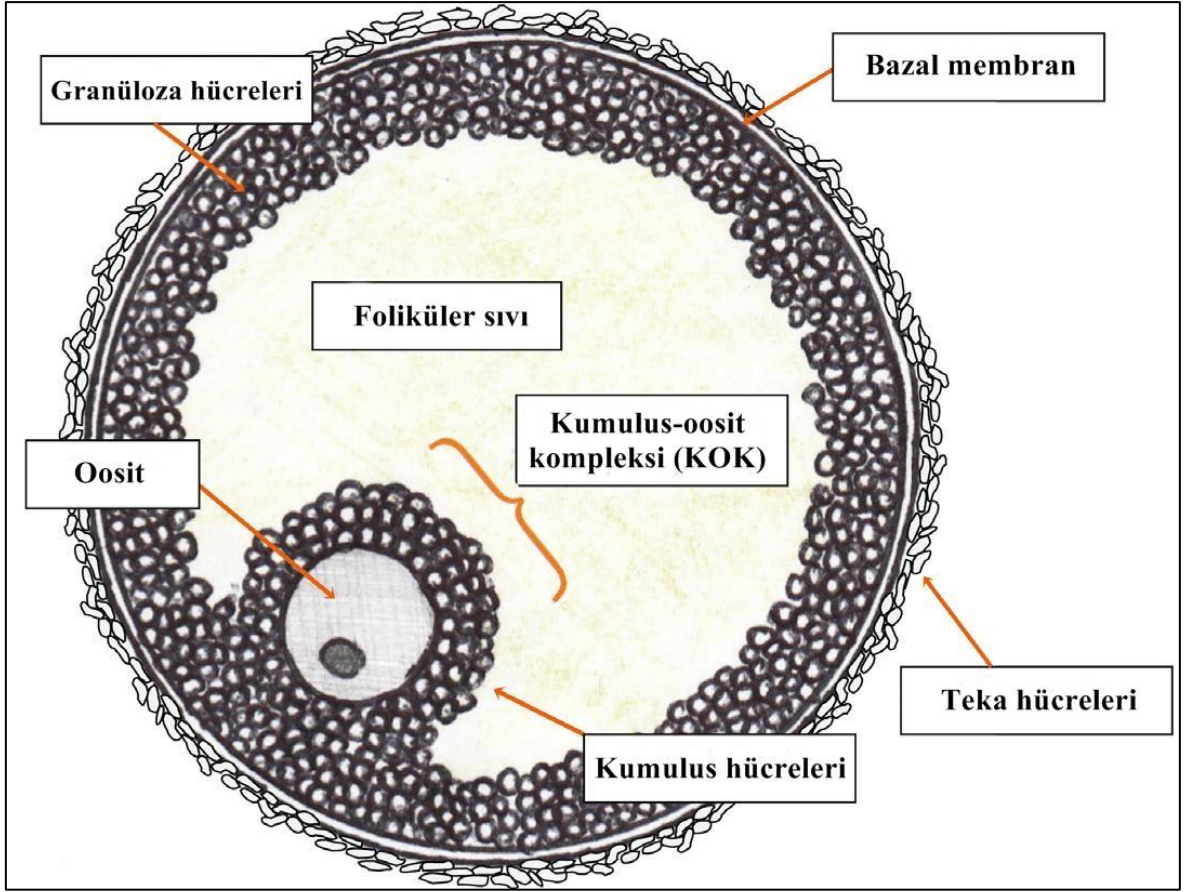
Kandaki östrojen seviyesi belirli bir düzeyin üzerine çıktığında hipotalamus üzerindeki baskılayıcı etki ortadan kalkar ve GnRH salgılanması artar. GnRH'nin artması ile birlikte

salgılanan FSH ve özellikle LH düzeyi önemli ölçüde artış gösterir. LH düzeyindeki artışın daha yüksek olmasının nedeni yüksek östrojen düzeyinin hipofizdeki LH salgılayıcı mekanizmalar üzerinde GnRH duyarlılığını artırmasıdır (1). Foliküler fazın başında FSH'a duyarlı olan granüloza hücreleri olgunlaşır ve farklılaşırken östrojen üretirler. Buna karşılık yumurtlamadan hemen önceki aşamaya kadar olgunlaşan folikülde (Antral folikül veya Graafin folikülü) LH'a duyarlı hale gelen granüloza hücreleri bu hormonun kontrolü altında progesteron üretmeye başlarlar (2).

Olgunlaşmanın sonuna doğru folikül içerisinde içerisi folikül sıvısıyla dolu bir boşlukla karakterize antral folikül oluşur. Antral folikülün çok fazla yükselen LH ve FSH düzeyleri nedeniyle çatlayarak sekonder oositi yumurtlama kanalına bırakmasıyla ise foliküler faz sona erer.

2.1.2. Antral folikül ve granüloza hücreleri

Antral folikülün gelişimi oositin olgunlaşması, dişi endokrin sisteminin kontrolü ve fertilitenin oluşması için gereklidir (3). Antral foliküller içi foliküler sıvı ve somatik hücreler tarafından salgılanan maddelerle (hormonlar, enzimler, elektrolitler ve steroidler) dolu olan bir antrum, folikül iç yüzeyini kaplayan mural granüloza hücreleri ve yumurtanın çevresini saran kumulus hücreleri ile karakterizedir. Kumulus hücreleri ve oosit kumulus-oosit kompleksi (KOK) denilen bir yapı şeklinde folikül içinde bulunurken folikül bazal membranının iç duvarı mural granüloza hücreleri ile dış tarafı ise teka hücreleri ile çevrilidir (Şekil 2.1) (4).



Şekil 2.1. Antral folikülün iç yapısı (Hennet ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (4)

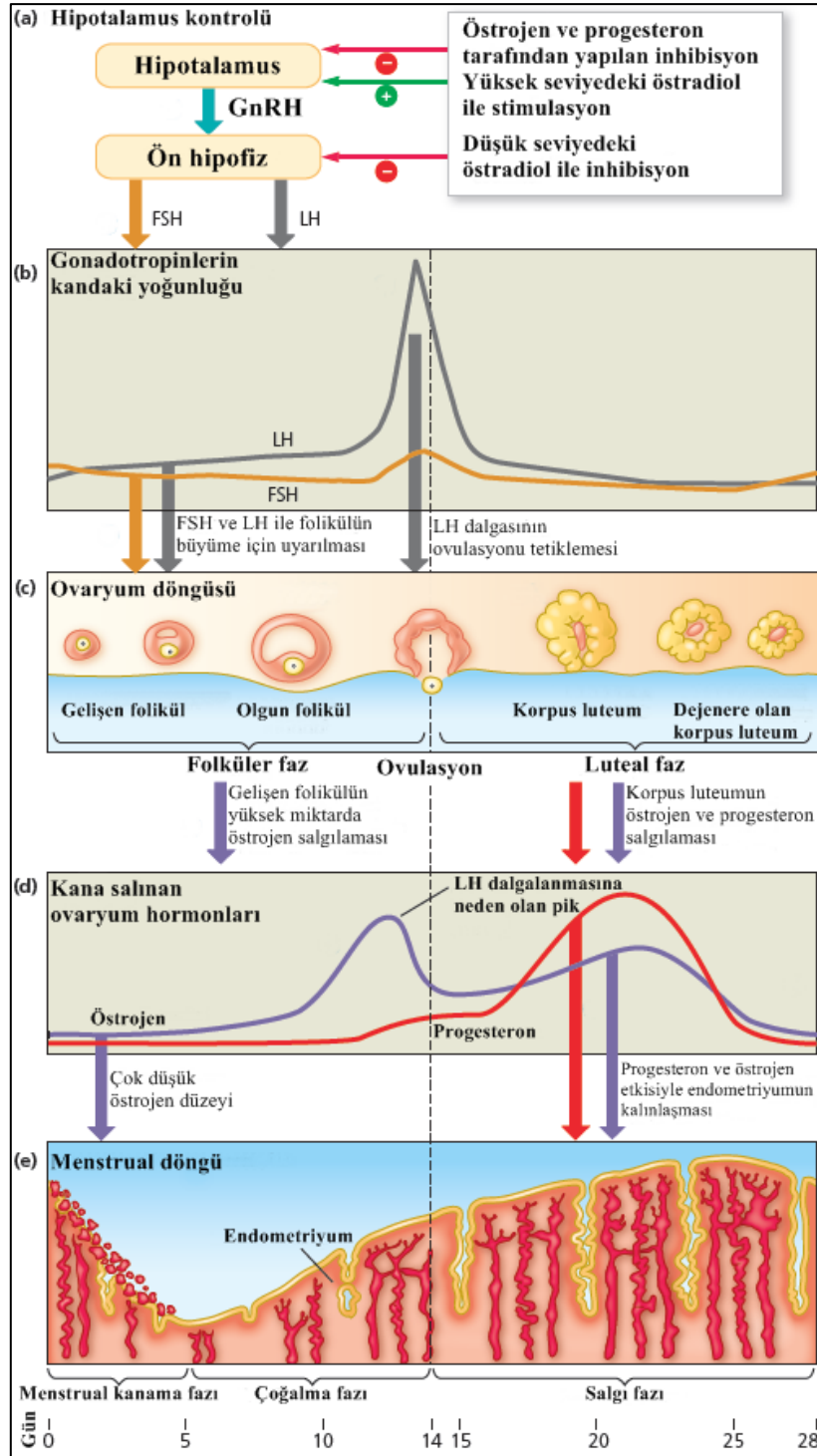
Yumurtlama öncesinde büyük foliküllerde bulunan teka hücreleri LH'a tepki veren reseptörlere sahiptir. Bu tepki androjenlerin ve progesteronun salgılanmasıdır (5,6). Granüloza hücreleri de FSH'a yanıt vererek östrojen, LH'a yanıt vererek de progesteron üretirler (2). Antral folikülün gelişimi için teka ve granüloza hücreleri arasındaki etkileşim oldukça önemlidir (3). Bu etkileşimde özellikle büyüme faktörlerinin lokal olarak üretimi önemli bir rol oynamaktadır ve bu faktörler antral folikülün gelişimini etkilemektedir (7). TGF- β (Transforming growth factor-beta) teka hücreleri tarafından üretilen ve granüloza hücrelerini doğrudan etkileyen en önemli büyüme faktörlerinden birisidir (8).

Granüloza hücreleri gelişen yumurtaya fiziksel destekte bulunan ve yumurta mikroçevresini düzenleyen primer hücre tipidir. Granülozalar birçok hücre popülasyonuna özelleşebilen aktif farklılaşabilen hücrelerdir. Yumurtlama sürecinde folikülogenez

boyunca primordial folikülden luteal faza kadar geçen zamanda granüloza hücreleri için bu farklılaşma potansiyeli büyük önem arz etmektedir. Bu hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde de çok sayıda hormon ve büyüme faktörü rol oynamaktadır (2). Granüloza hücrelerinin yüzeyinde FSH ve LH hormonlarına spesifik çok sayıda reseptör bulunmaktadır (9). Bu reseptörlere ek olarak EGF (Epidermal growth factor), TGF- β (Transforming growth factor-beta) ve IGF (Insulin-like growth factor) gibi büyüme faktörlerinden gelen sinyalleri de algılayacak reseptörlere sahiptir. Ovaryum kaynaklı 2 önemli steroidin (östrojen ve progesteron) salgılanması granüloza hücrelerinin temel görevlerindendir. FSH'ın cAMP üzerinden folikülün gelişmesini indüklemesi ile granüloza hücrelerinin farklılaşması ve buna bağlı olarak östrojen sentezi artmaktadır (2).

Luteal faz

Ovaryum döngüsünde foliküler fazı luteal faz izlemektedir. Yumurtlamadan sonra geriye kalan foliküler doku LH tarafından etkilenecek korpus luteuma dönüşmektedir. LH ismini bu luteinleştirici etkisinden almaktadır. Korpus luteum salgı yapan bir bezdir. Bu bez LH'nin etkisiyle progesteron ve östrojen üretimini tekrar artırır. Progesteron ve östrojen hormonlarındaki bu artış hipotalamus ve hipofiz üzerinde negatif geri besleme ile LH ve FSH düzeylerinin düşmesine neden olur. Burada dikkat edilmesi gereken nokta östrojen seviyesi bir önceki pik noktasına ulaşacak kadar artmamaktadır. Bunun yerine kandaki progesteron düzeyi pik yapmaktadır. FSH ve LH düzeylerinin düşmesi aynı döngü içerisinde başka bir folikülün olgunlaşmasını engeller. Hamilelik gerçekleşmez ise düşük gonadotropin düzeyleri nedeniyle luteal fazın sonunda korpus luteum dejenere olur ve östrojen ve progesteron düzeylerinde ani bir düşüş gerçekleşir. Bu ani düşüş nedeniyle hipotalamus ve hipofiz üzerindeki baskı kalkar ve ovaryum döngüsü FSH'ın düşük düzeylerde salgılanmaya başlaması sonucunda yeni foliküllerin olgunlaşması ile yeniden başlar (Şekil 2.2) (1) .



Şekil 2.2. İnsanda dişi üreme döngüleri. Şekilde (a) hipotalamus etkisi ile ön hipofizden salgılanan (b) gonadotropinler ve (d) ovaryumlardan salgılanan steroid hormonlar tarafından düzenlenen (c) ovaryum döngüsünün ve (e) menstrual döngünün 28 günlük değişimi gösterilmektedir (Reece ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (1).

2.2. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınları en çok etkileyen (teşhis kriterine göre %8-18 arasında prevalans gösterir) endokrinolojik sorundur (10). Polikistik over morfolojisi (PKOM) ve polikistik over sendromu (PKOS) birbirlerinden farklı kavramlardır. PKOM terimi 12 veya daha fazla sayıda 2-9 mm çapında folikül içeren ovaryum için kullanılırken (11), PKOS heterojen ve etiyolojisi kesin olmayan kompleks endokrin bir düzensizliği ifade eder (12).

Sendromla ilgili ilk çalışma 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından yapılmıştır. Çalışmada genişlemiş çok sayıda kist içeren overlere sahip, kıllanma (hirsutism) sorunu olan ve oligo/amenorrhea (adet kanamasının çok seyrek veya hiç olmaması) şikayetleri bulunan 7 kadın kullanılmıştır (13).

PKOS genellikle hiperandrojenizm (androjen yüksekliği), kronik yumurtlama bozukluğu, PKOM, hirsutism (erkek tipi kıllanma), insülin direnci, glikoz intoleransı ve hiperinsulinaemia (kandaki insülin düzeyinin aşırı yükselmesi) ile karakterizedir. Bu karakteristik özellikler hem hastaların yaşam kalitesini düşürmektedir hem de uzun dönemde kanser, diyabet, hipertansiyon, obezite gibi hastalıklara ve infertiliteye neden olmaktadır (14).

2.2.1. Polikistik over sendromu'nun etiyolojisi

Polikistik over sendromu'nun temeliyle ilgili kesin bir açıklama bulunmamakla birlikte genetik ve çevresel nedenlerden köken aldığına dair çok sayıda hipotez mevcuttur (15). Yapılan çalışmalar PKOS fenotipinin erken çocukluktan ergenliğe kadar çok çeşitli zamanlarda görülebildiğini ortaya çıkarmıştır. PKOS'un genetik faktörlerden etkilendiğine dair kanıtlar mevcuttur ancak tek bir genle ilişkilendirilememiş daha çok poligenik bir hastalık olduğu düşünülmektedir (16–18). PKOS'un klinik ve biyokimyasal belirtilerinin androjenlerin fazla salgılanması sonucunda (genetik bir nedenden dolayı) çocukluk çağında ya da sonrasında ortaya çıktığına dair kanıtlar da bulunmaktadır (19). Genetik

faktörlerin yanında düşük doğum ağırlığı ve fetal dönemde androjenlere maruz kalınması da PKOS fenotipinin gelişmesinde rol oynamaktadır (20). Düşük doğum ağırlığı aynı zamanda PKOS fenotipi ile birlikte sıklıkla gözlenen insülin direnci ve obezite ile ilişkilendirilmiştir (12).

2.2.2. Polikistik over sendromu'nun tanısı

PKOS tanısı koyulurken kullanılan kriterler ilk olarak 1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health - NIH) tarafından belirlenmiştir. Daha sonra bu kriterler çeşitli toplantılarda geliştirilerek günümüzde kullanılan halini almıştır. Günümüzde PKOS tanısı 2003 yılında Rotterdam'da ESHRE/ASRM (European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine) konferansında kararlaştırılan tanı kriterlerine veya 2006 yılında AE-PCOS (Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society) konferansında kararlaştırılan kriterlere göre konulmaktadır.

NIH, 1990 (21) kriterlerine göre;

- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- Yumurtlama düzensizliği (oligo-ovulation) (oligo/amenorrhea)
- PKOS'un neden olabileceği diğer herhangi bir durum kriterlerinden hepsinin hastada görülmesi gerekmektedir.

ESHRE/ASRM (Rotterdam), 2004 (22) kriterlerine göre;

- Yumurtlama düzensizliği (oligo-ovulation veya anovulation)
- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- Polikistik over morfolojisi kriterlerinden 2 tanesinin hastada görülmesi yeterlidir.

AE-PCOS Society, 2008 (23) kriterlerine göre;

- Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm
- Yumurtlama düzensizliği ve/veya polikistik over morfolojisi kriterlerinin hastada görülmesi yeterlidir.

2.2.3. PKOS ve infertilite

PKOS'lu kadınların %40'ında infertilite görülmektedir (24). Anovulasyon sorunu olan kadınların %90-95'ine PKOS teşhisi koyulmaktadır ve PKOS anovulatuvar infertilitenin en yaygın nedenidir. PKOS'lu bir kadında normal sayıda primordial folikül bulunurken primer ve sekonder foliküllerin sayısı ciddi oranda artmıştır. Normal foliküler olgunlaşma için gerekli olan faktörler düzensizleştiği için foliküller 2-9 mm büyüklüğe ulaştıklarında foliküler olgunlaşma duraksar. Baskın bir folikülün gelişmemesinden dolayı ovulasyon gerçekleşemez ve bu durum infertiliteye neden olur (25).

2.3. İn-vitro Fertilizasyon Yöntemi

İn-vitro fertilizasyon (IVF) yöntemi; ilk uygulanişından ve ilk “test tüpü bebeği”nin doğumundan bu zamana kadar geçen 25 yılda oldukça geliştirilmiştir. Özellikle yumurtanın mikroçevresiyle etkileşimine ait mekanizmaların bir kısmı aydınlatıldıktan sonra yöntem üzerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

IVF; ilk olarak “tübal faktörlü kısırlık” durumu için geliştirilmiş bir yöntem olmasına rağmen günümüzde ilaç tedavisinin işe yaramadığı ve uygun bulunan infertil hastalar için kullanılmaktadır. IVF yöntemi ilk defa kullanılmaya başlandığında menstrüel siklus esnasında spontane olarak gelişen baskın tek bir folikül kullanılmıştır. Bu durumun hamilelik oranlarının düşük olmasına neden olduğu anlaşıldıktan sonra “süperovulasyon” protokolleri yani gonadotropinler yardımıyla çok sayıda oositin olgunlaştırılması yöntemi kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem; çok sayıda embriyo arasından transfere en uygun olanının seçilerek hamilelik olasılığının artırılmasını ve transfer edilmeyen embriyoların özel yöntemlerle dondurularak sonraki transfer denemeleri için saklanabilmesini sağlamıştır.

Hormonların (GnRH, FSH ve LH) belirli dozlarda belirli zamanlarda hastaya uygulanması sonucunda çok sayıda oositin olgunlaşması indüklenir ve süperovulasyon sağlanır. Olgunlaşan yumurtalar laparoskopi ile folikül içerisinden folikül sıvısı, granüloza ve

kumulus hücreleri ile birlikte toplanır. Bu toplama işleminde genellikle 10 ile 20 adet yumurta hücresi elde edilir ve granüloza-kumulus hücrelerinden uzaklaştırılarak kültür ortamına alınır. Bu ortam kadınlardaki fallop tüpleri ile aynı özelliklere sahiptir. Kültür ortamındaki yumurtalar 37°C’de inkübe edilir. 100.000-200.000 spermin kültür ortamına bırakılmasıyla veya spermin doğrudan her bir yumurtaya intrasitoplazmik enjeksiyonu (ICSI) ile döllenme gerçekleştirilir.

Morfolojik olarak en iyi durumda olan embriyolar döllenmeden 3-5 gün sonra transfer için seçilir. Standart olarak 3 gün sonra embriyo transferi gerçekleştirilmektedir ancak bazı kaynaklar 5. günde embriyo transferini desteklemektedir. Bununla birlikte bu konuda anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir. Embriyo transferinden sonra endometriyumun embriyo duyarlılığının artması için dışardan progesteron hormonu verilir. IVF yönteminin başarı şansı özellikle 40 yaştan sonra düşmektedir (26).

2.4. MikroRNA

MikroRNA’lar (miRNA’lar) 21-25 baz uzunluğunda küçük endojen RNA molekülü ailesidir. Bu küçük RNA molekülleri protein kodlamazlar ve gen regülasyonunda mRNA’ların degradasyonunu veya translasyonun baskılanmasını sağlayarak önemli rol oynamaktadırlar (27).

2.4.1. MikroRNA’ların keşfi

1993 yılına kadar mikroRNA’ların (miRNA’ların) varlığı ve önemi bilinmemekteydi. *Ceanorhabditis elegans* adlı nematodda, *lin-14* geninin (larval dönemin zamana bağlı gelişimi ve düzenlenmesini kontrol eden genlerden biri) fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların varlığında, yetişkin yapılarında çeşitli bozuklar ve larval gelişimde sorunlar olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalarla, gelişimsel öneme sahip bir başka gen olan *lin-4* geninin, *lin-14* geninin düzenlenmesinde etkin olduğu ortaya çıkartılmıştır (28). Lee ve arkadaşları “open reading frame” olarak kabul edilen kısımda bölgeye özgü mutagenез yoluyla elde edilen mutasyonların *lin-4* geninin fonksiyonunu değiştirmedigini ortaya

koymuşlar ve *lin-4* geninin protein kodlamadığı sonucuna varmışlardır. Çalışmada elde edilen RNA'lardan birinin 22 nükleotid, diğerinin ise 61 nükleotid uzunluğunda olduğu gözlenmiştir. Uzun olan RNA'nın; sap kısmından ilmi oluşturacak şekilde kıvrılmış yapıda (stem-loop) olduğu ve kısa olan RNA'nın öncülü olabileceği tahmin edilmiştir (29). Wightman ve arkadaşları, *lin-14* geninin transkripsiyon sonrası aşamada baskılanabileceğini ve 3' UTR bölgesinin bu baskılanmada tek başına yeterli rol oynayabileceğini bulmuşlardır (30). Çalışmalar sonucunda *lin-4* geni RNA'larının *lin-14* geni 3' UTR bölgesindeki çeşitli alanlara komplementer olduğu ve bu durumun *lin-4* gen ürünü ile *lin-14* ifadesinin baskılanması şeklinde ortaya çıktığı vurgulanmıştır (29,30).

Lin-4 geninin keşfinden sonra 7 yıl boyunca nematodlarda ve başka canlılarda "kodlanmayan RNA'lar" ile ilgili herhangi bir bilgi açığa çıkarılamamıştır. 2000 yılında yine *C. elegans*'ın gelişimsel zamanlamasını kontrol eden genlerden biri olan *let-7* keşfedilmiştir. *Let-7* geni de yaklaşık 22 nükleotidlik bir RNA kodlamakta ve bu RNA, tıpkı *lin-4*'de olduğu gibi, nematodun geç larval evreden yetişkin hale geçmesinde, yani gelişimin zamansal kontrolünde etkili olmaktadır. *Let-7* geninin larval gelişimde etkili olan *lin-41* geninin 3' UTR bölgesi üzerinde iki farklı yere komplementer olduğu gözlenmiştir (31). Daha sonra yapılan çalışmalarda *lin-4* geninin aksine *let-7* geninin evrimsel olarak, sinekten insana kadar uzanan farklı türler arasında korunduğu anlaşılmış ve kodlanmayan RNA'ların diğer organizmalarda da önemli olabileceğine dair ilk bulgular elde edilmiştir. Örneğin insanlarda, içlerinde beyin, timüs, böbrek, akciğer, karaciğer, dalak gibi organların da olduğu pek çok dokuda farklı ifade düzeylerinde tespit edilmiştir (32).

Larval gelişimin zamansal kontrolündeki rolleri nedeniyle *lin-4* ve *let-7* gibi genler öncelikli olarak "small temporal RNA" (küçük zamansal RNA'lar) (stRNA) olarak adlandırılmışlardır. Bununla birlikte bir yıl gibi bir süre içerisinde, insan, hayvan ve sinek hücrelerinde küçük RNA'ları klonlayan üç farklı laboratuvar da yaklaşık 100'ün üzerinde gen bulunmuş ve *Drosophila*'da 20, insanda 30, solucanlarda 60 yeni kodlanmayan RNA ile ilgili gen tespit edilmiştir. Bu genlerden ilmi bir öncül yapıya sahip RNA sentezlenmektedir ve bu RNA'lar *lin-4* ve *let-7*'ye yapısal olarak benzemektedir. Pek çoğunun sadece değişik gelişimsel evreler sırasında ifade edilmediği, daha çok belirli hücre

tiplerinde belirli genlerin ifade edildikleri fark edilmiştir. Böylece, bu fonksiyonları tam olarak anlaşılamayan yapılar için “mikroRNA (miRNA)” ifadesi kullanılmaya başlanmıştır (33).

2.4.2. MikroRNA biyogenezi

mikroRNA’lar, üç aşamada oluşurlar. İlk olarak miRNA genlerinden primer miRNA (pri-miRNA)’ların transkripsiyonu gerçekleşir. İkinci adımda pri-miRNA’lar prekürsör miRNA (pre-miRNA)’lara nükleus içinde dönüştürülür ve son adımda sitoplazma içinde olgun miRNA’ların oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.3) (34).

mikroRNA’lar, primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenir. Pri-miRNA (500-3000 baz), cap (şapka) ve poly (A) kuyruğuna sahip sap-ilmik yapısındadır. Çekirdekte pri-miRNA, RNAaz III enzim ailesinin bir endonükleazı olan Drosha ve kofaktörü Pasha (DGCR8) tarafından yaklaşık olarak 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA’ya dönüştürülür (35). Çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein olan Pasha ve bir nükleaz olan Drosha’nın oluşturduğu komplekse mikroişlemci (microprocessor) kompleks adı verilir (35).

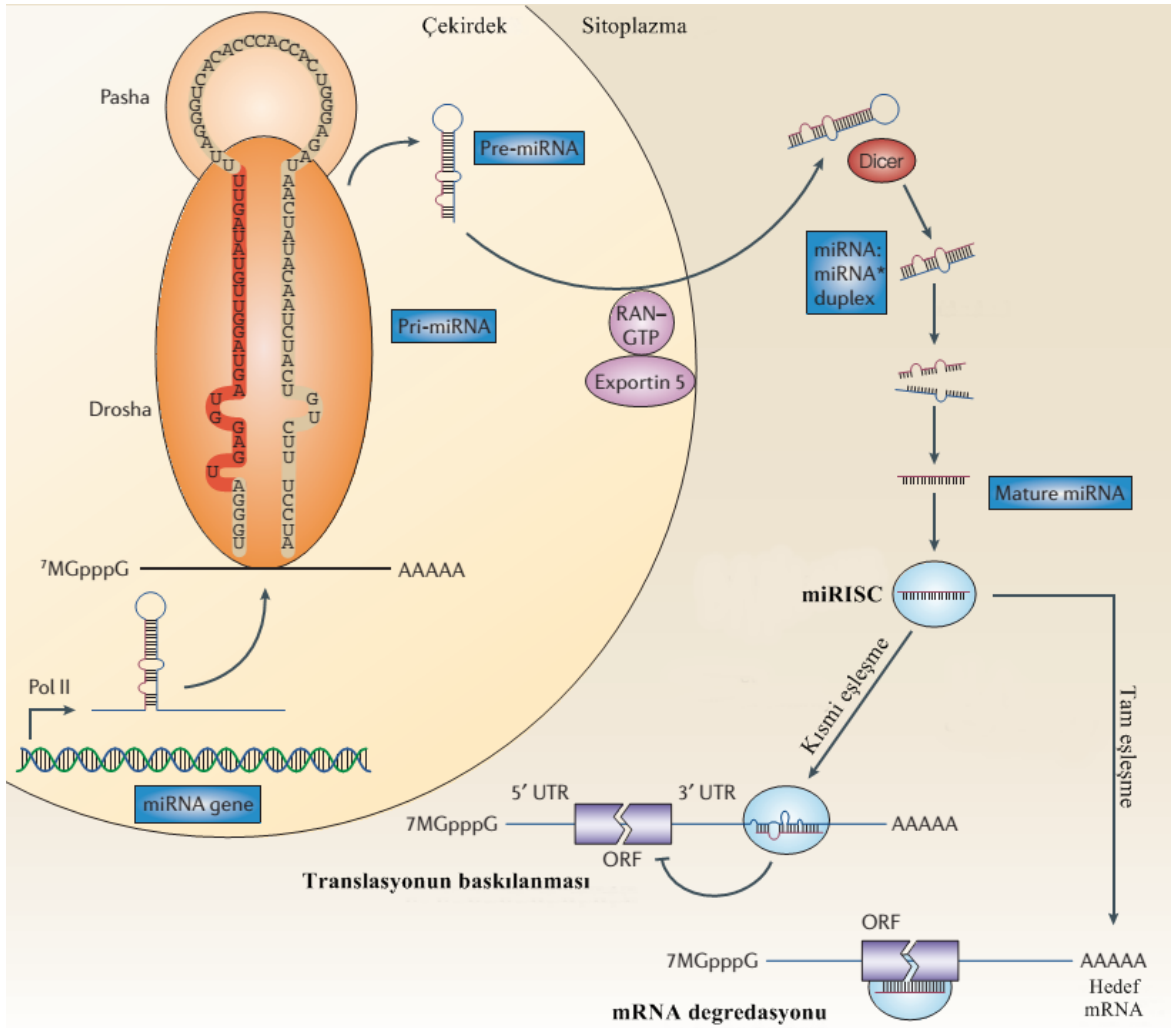
Pre-miRNA Exportin 5 (taşıma reseptörü) ve RAN-GTP’ye bağımlı şekilde sitoplazmaya taşınır (36). Sonrasında, pre-miRNA’lar sitoplazmada RNAaz III enzim ailesinden Dicer adlı endonükleaz ile kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA dubleksine çevrilir (37). Dicer, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır (38). Dicer, pre-miRNA’nın sap-ilmliğini kestikten sonra, miRNA:miRNA dubleksinden sadece biri oluşan RISC’e dahil olur. RISC içinde yer alan bir RNaz olan Argonaute’un (AGO) etkisiyle iki iplikten daha kararlı olanı (genelde 5’ ucu) seçilip komplekse dahil edilir (kılavuz iplik). Diğer iplik, anti-kılavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır ve RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. mikroRNA’lar RISC kompleksine dahil olduktan sonra AGO proteinleri yardımıyla mRNA’nın yıkımına veya translasyonunun baskılanmasına neden olurlar (39).

miRNA dupleksinin her iki zinciri de eşit etkiye sahip değildir ve hangi zincirin olgun miRNA olacağına dair karar kalıtsal etkenler ışığında termodinamik etkileşimler ile belirlenir (40). Genellikle miRNA'nın daha stabil olan 5' ucuna sahip zinciri olgun miRNA olarak seçilirken, diğer zincir yıkılır (41). Yine de günümüzde ileri sekanslama yöntemleri kullanılarak yapılan çalışmalar miRNA* olarak ifade edilen ve mRNA ile birleşmeyen yapının her zaman yıkılmadığını ve etkin olabileceğini ortaya koymuştur (42).

2.4.3. MikroRNA'ların etki mekanizması

Olgun miRNA'lar gen ifadesini 2 yolla düzenlerler. Bunlar; mRNA'ya tam olarak komplementerlik görülen durumda mRNA'nın degradasyonu veya bağlanma derecesinin düşük olduğu durumlarda translasyonun baskılanmasıdır (Şekil 2.3) (43,44).

miRNA'lar mRNA deregülasyonunu ya da translasyonel baskılamayı birkaç yolla gerçekleştirmektedir; 1) miRISC'in mRNA'ya bağlanması sonucunda mRNA'nın poly (A) kuyruğu deadenilasyona uğrar ve deadenile mRNA'lar p-body'ler (işlem cisimleri – processing bodies) içine taşınarak depolanır veya yıkıma uğrar, 2) miRISC'in bağlanmasından sonra mRNA'nın şapka yapısının değişmesine neden olarak translasyonun başlamasını engelleyebilir, 3) mRNA'ya bağlanan miRISC'in etkisi ile oluşan protein sentezi sırasında oluşan polipeptid zinciri proteolizise uğrayabilir veya 4) miRISC mRNA'ya bağlanarak ribozomların mRNA üzerinden düşmesine veya peptid sentezinin yavaşlamasına neden olmaktadır (45).



Şekil 2.3. miRNA biyogenez basamakları ve etki mekanizması (He ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (46)

2.4.4. MikroRNA'ların fonksiyonu

Lin-4 ve *let-7* genleri üzerine yapılan çalışmalar miRNA fonksiyonunun gelişimsel zamanlamadaki rolü üzerine fikir verse de, bu onların hücre içerisinde mümkün görünen birkaç görevlerinden sadece biridir. Özellikle miRNA biyogenezinde önemli görevlere sahip Dicer enzimi ve Argonaute (AGO) proteini ile yapılan çalışmalar miRNA'ların işlevlerinin durdurulması ya da mutasyona uğramaları durumunda pek çok model organizmada gelişimsel bozuklukların, anormal embriyo gelişimlerinin ve hücre farklılaşmalarının olduğunu göstermektedir. Bu durum miRNA fonksiyonunun canlılar için

ne kadar önemli olabileceğine dair bir işarettir. Yine belirli miRNA genleri üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmalar, bu genlerin susturulması veya mutasyona uğratılması durumunda çeşitli apoptoz yollarının, hücre gelişiminin ve farklılaşmasının etkilendiğini göstermektedir ve tümör oluşumu gibi bazı önemli durumlarda miRNA ifadelerinin değiştiği gözlenmiştir (46).

2.5. MikroRNA'lar ve Polikistik Over Sendromu

miRNA'ların foliküler gelişim, yumurta olgunlaşması, döllenme ve hamileliğin hangi aşamalarında rol oynadıkları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Bu durum PKOS gibi infertiliteye neden olan bir hastalıkta granüloza, kumulus, teka hücreleri veya foliküler sıvı gibi yumurta mikroçevresini oluşturan yapılarda değişen miRNA ifadelerinin yorumlanmasını zorlaştırmaktadır. Literatürde miRNA'lar üzerinden PKOS'un patofizyolojisini açıklamaya yetecek kadar çalışma yapılmamakla birlikte foliküler sıvı ile yapılmış az sayıda çalışma bulunmaktadır (47–49).

Sang ve arkadaşları insan vücut sıvılarındaki miRNA varlığından ve birçok memelinin ovaryumlarında tanımlanan miRNA'lardan yola çıkarak insan folikül sıvısında da miRNA'ların varlığını göstermişler ve bu miRNA'ların PKOS ile ilişkisini tespit etmişlerdir. PKOS hastası kadınlarda (AE-PCOS kriterlerine göre) normal kadınlara göre hsa-miR-132 ve hsa-miR-320'nin ifadelerinin anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Bu miRNA'lar daha önce yapılan çalışmalarda PKOS ve PKOS ile bağlantısı bulunan insülin direnci ve diyabet ile ilişkilendirilmişlerdir (47).

Roth ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada PKOS hastası (Rotterdam kriterlerine göre) kadınlar ile sağlıklı-doğurgan yumurta donörlerinden alınan folikül sıvısı örneklerinin miRNA profilleri karşılaştırılmıştır. Çalışmada 5 adet miRNA'nın 2 grup arasında anlamlı olarak farklı ifade gösterdiği (artış gösterdiği) tespit edilmiştir (48).

miRNA'ların PKOS'taki rolünün aydınlatılabilmesi için antral folikül yapısında bulunan ve yumurta ile doğrudan temas halinde bulunan kumulus hücrelerindeki, folikül sıvısının

içeriğini belirleyen granüloza hücrelerindeki ve dışarıdan gelen sinyalleri ilk olarak algılayan teka hücrelerindeki miRNA ifadelerinin PKOS hastası kadınlarda normal bireylere göre nasıl değişiklik gösterdiğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Literatürde böyle bir çalışma henüz bulunmamaktadır.

2.6. Mikrodizin Yöntemi

Moleküler biyolojideki geleneksel metotlar genellikle bir deneyde bir lokus analizi ile sınırlıdır (50). Gen fonksiyonlarının bütün resmini görmek bu yöntemlerle oldukça zordur. Mikrodizin teknolojisi ile bir organizmaya ait transkriptomik veya genomik bilgi bir çip üzerinde görüntülenebilmekte ve bu sayede aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan etkileşimlerini görmek mümkün olmaktadır.

Bir zemin üzerinde sabitlenmiş sentetik gen dizileriyle serbest nükleik asitleri melezleştirme (hibridizasyon) düşüncesi moleküler biyolojinin önemli adımlarından biri olmuştur. DNA mikrodizin yöntemi ile proteinlere çevrilebilen (translasyon) ya da çevrilemeyen RNA'lar (miRNA'lar gibi) saptanabilmektedir. Bu tip analizler “ifade analizi” şeklinde adlandırılır (51).

2.6.1. Mikrodizinin tanımı ve temeli

Mikrodizin genellikle silikon, naylon membran veya cam yapıdaki katı yüzeyler (çip) üzerinde küçük alanlara yerleştirilmiş milyonlarca birbirine denk tek iplikli DNA parçacıkları (prob) aracılığıyla bir genomda depolanmış olan bilgilerin hibridizasyon temeline dayanan bir yöntemle incelenmesi tekniğidir. Bir organizmanın tüm genleri çok küçük bir alanda incelenebilir ve binlerce genin ifade seviyeleri aynı anda çalışılabilir.

Yüzeye tutturulan bu DNA segmentlerinin (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) binlercesi tek bir çipte birlikte kullanılabilir. Uygulanan yöntem ve amaç farklılıkları olmakla birlikte, “mikroçip”, “DNA çip” ve “DNA array” gibi tanımlamalar da benzer uygulamaları ifade etmek için kullanılırlar.

Mikrodizin teknolojisi DNA'nın bilinen bir gen ya da fragment ile hibridizasyonu temeline dayalı "Southern Blot" tekniğinden türetilmiştir. Membran yerine cam vb. katı yüzeylerin kullanılması ve sağlığa zararı bilinen radyoaktif işaretleme yönteminin yerini floresan işaretlemenin alması ve bağlanmayı sağlayan yöntemlerin hassaslaştırılması ile çalışmaların verimi ve dolayısıyla elde edilen bilginin de miktarı artmıştır (51).

2.6.2. Mikrodizin teknolojisinin kullanım alanları

Mikrodizin teknolojisi aynı anda binlerce gen tespiti sağlayan yüksek işlem hacimli bir yöntemdir. Bu nedenle;

- Gen ifadesi farklılıklarının tespiti (normal-hasta)
- Hastalık tanısı
- Mutasyon ve polimorfizm tespiti
- Patojen analizi
- Farmakogenetik (kişiyeye özel ilaç tedavisi)
- Toksikogenomik çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

PKOS üreme çağındaki kadınların %8-18'ini etkileyen ve üreme çağındaki kadınlarda en sık gözlenen endokrin hastalığıdır. Anovulatuvar infertilitenin en sık rastlanan sebeplerinden biridir. miRNA'lar gen ifadesini transkripsiyon sırasında ya da transkripsiyon sonrası düzenleyen küçük RNA molekülleridir. İnsan genomunun yaklaşık %3'ü miRNA kodlarken bu miRNA'ların, protein kodlayan genlerin yaklaşık %60'ını kontrol ettiği tahmin edilmektedir (52). miRNA'ların yumurtalıklarda ve oosit hücrelerindeki ifade profil çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır ve yumurtalıkta, oositlerde ya da yumurtalık somatik hücrelerinde (granüloza, teka) ifade olan miRNA'ların PKOS gibi infertiliteye sebep olan hastalıklardaki rolü henüz ortaya konmamıştır. miRNA biyogenezinde kilit bir role sahip olan Dicer 1 proteininin, yumurtalık dokusunda delesyona uğratıldığı fare çalışmalarında yumurtalık fonksiyonunun ve ovulasyon oranının azaldığı ve infertilitenin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular miRNA'ların yumurtalık fonksiyonunda, yumurta gelişiminde ve infertilitede etkin rollerinin olabileceğini işaret etmektedir. Bir oosit hücresinin, çevresindeki somatik hücrelerin regülasyonunda aktif olarak yer alarak, gelişiminin en iyi şekilde gerçekleşmesi için kendine uygun ortam sağlamaya çalıştığı bilinmektedir. Granüloza hücreleri folikülün içinde oositi çevreleyen somatik hücrelerdir ve fonksiyonları steroid hormonları ve oosit hücresinin gelişiminde rol alan pek çok büyüme hormonunu üretmektir.

Bu tez çalışmasında; PKOS hastalarından alınan granüloza hücrelerinin miRNA ifade profillerini normal bireylerin granüloza hücrelerinin miRNA profilleri ile karşılaştırmak ve PKOS oluşumunda rol alabilecek potansiyel miRNA'ları ortaya çıkartmak amaçlanmıştır. Ayrıca, farklılık gösteren miRNA'ların hedeflediği genler ve bu genlerin hangi yollarda yer aldığı biyoinformatik araçlar kullanılarak araştırılmış ve biyoinformatik analizler ile ifade düzeyinde bağımsız çalışmalar kullanılarak doğrulanmıştır.

Bugüne kadar infertiliteye de sebep olan PKOS'ta granüloza hücrelerinde miRNA ifadesini araştıran bir çalışma rapor edilmemiştir. Bu çalışma öncelikle PKOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde miRNA ifade profillerini yüksek işlem kapasiteli bir yöntem olan

mikrodizin teknolojisini kullanarak ortaya çıkartmayı amaçlamaktadır. PKOS'lu hastalarda ve normal bireylerde granüloza hücrelerinde farklılık gösterecek olan miRNA'ların ve bu miRNA'ların hedeflediği genlerin ve dolayısıyla PKOS'ta rolü olan sinyal yollarının ortaya çıkarıldığı bu çalışma granüloza hücrelerinde PKOS'un moleküler mekanizmasını miRNA seviyesinde açıklamaya çalışan ilk çalışmadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Hasta ve normal örnekler

Bu tez çalışmasında Özel HRS Ankara Kadın Hastanesi'nde in-vitro fertilizasyon (IVF) işlemi için uygulanan oosit toplama (oocyte pick-up - OPU) işlemi sırasında aspire edilen folikül sıvısından izole edilen granüloza hücreleri kullanılmıştır. Normal grubu (NM) 9 örnekten, PKOS grubu (PK) ise 14 örnekten oluşmaktadır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Çalışmaya katılmayı kabul etmek
- PKOS haricinde infertiliteye neden olabilecek başka bir hastalığa sahip olmamak
- Açıklanamayan infertiliteye sahip olmamak (Normal bireyler için)
- Erkek faktörü nedeniyle IVF tedavisine başvurmak (Normal bireyler için)

Çalışmadan dışlanma kriterleri;

- Çalışmaya katılmayı kabul etmemek
- PKOS haricinde infertiliteye neden olabilecek başka bir hastalığa sahip olmak
- Açıklanamayan infertiliteye sahip olmak

Elde edilecek sonuçlarla birlikte değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil edilen örneklerin yaş ve toplanan oosit sayısı bilgileri toplanmıştır (Çizelge 4.1). Bu çalışma için etik kurul onayı (Ek 1) ve folikül sıvısı (granüloza hücresi) alınan bireylerden bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin örnek numaraları, yaş bilgisi ve toplanan oosit sayıları

Örnek No.	Klinik Tanı	Yaşı	Oosit Sayısı
PK 1	PKOS	25	17
PK 2	PKOS	41	19
PK 3	PKOS	29	29
PK 4	PKOS	33	8
PK 5	PKOS	30	42
PK 6	PKOS	21	12
PK 7	PKOS	28	28
PK 8	PKOS	25	4
PK 9	PKOS	27	18
PK 17	PKOS	25	19
PK 18	PKOS	36	13
PK 19	PKOS	35	17
PK 20	PKOS	29	24
PK 21	PKOS	25	19
NM 1	Normal	37	8
NM 2	Normal	33	19
NM 3	Normal	30	15
NM 13	Normal	28	17
NM 14	Normal	30	6
NM 15	Normal	35	9
NM 16	Normal	23	8
NM 17	Normal	22	13
NM 18	Normal	33	8

4.1.2. RNA bütünlük analizi için kullanılan cihazlar ve kitler

RNA bütünlük analizi için 2100 Bioanalyzer (Agilent, G2939A) cihazı ve bu cihaz ile uyumlu RNA 6000 Nano Kit (Agilent, 5067-1511) kullanılmıştır.

4.1.3. Mikrodizin çipleri, kitleri ve kullanılan cihazlar

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen mikrodizin çalışması GeneChip® miRNA 3.0 (Affymetrix, 902019) çipleri ile gerçekleştirilmiştir.

Poly (A) kuyruğunun takılması ve biotin ile işaretleme aşamaları için FlashTag™ HSR Biotin RNA Labeling Kit (Affymetrix, 901911) kullanılmıştır.

Hibridizasyon, yıkama ve boyama aşmaları için Wash Buffer A (Affymetrix, 900721), Wash Buffer B (Affymetrix, 900722) solüsyonları ve GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (Affymetrix, 900720) kiti kullanılmıştır.

Çiplerin hibridizasyonu GeneChip® Hybridization Oven 640 (Affymetrix, 800139) fırınında gerçekleştirilmiştir.

Yıkama ve boyama aşamaları GeneChip® Fluidics Station 450 (Affymetrix, 00-0079) yıkama istasyonunda yapılmıştır.

Çiplerin taranma aşaması GeneChip® Scanner 3000 (Affymetrix, 00-0073) tarayıcısı ile gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. cDNA sentez reaksiyonu kitleri, eş zamanlı PZR kitleri ve cihazlar

miRNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır.

Eş zamanlı PZR reaksiyonu için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 218073) kullanılmıştır.

4.1.5. Veritabanlarından indirilen mikrodizin çalışmaları

Çalışmada, literatürdeki tek PKOS'lu hastalar ve normal bireylerin granüloza hücreleri kullanılarak yapılmış gen ifadesi mikrodizin çalışmasına ait veri kullanılmıştır. GEO veritabanından GSE34526 erişim numarası ile indirilen veri seti 7 PKOS hasta ve 3 normal bireye ait mikrodizin verisinden oluşmaktadır.

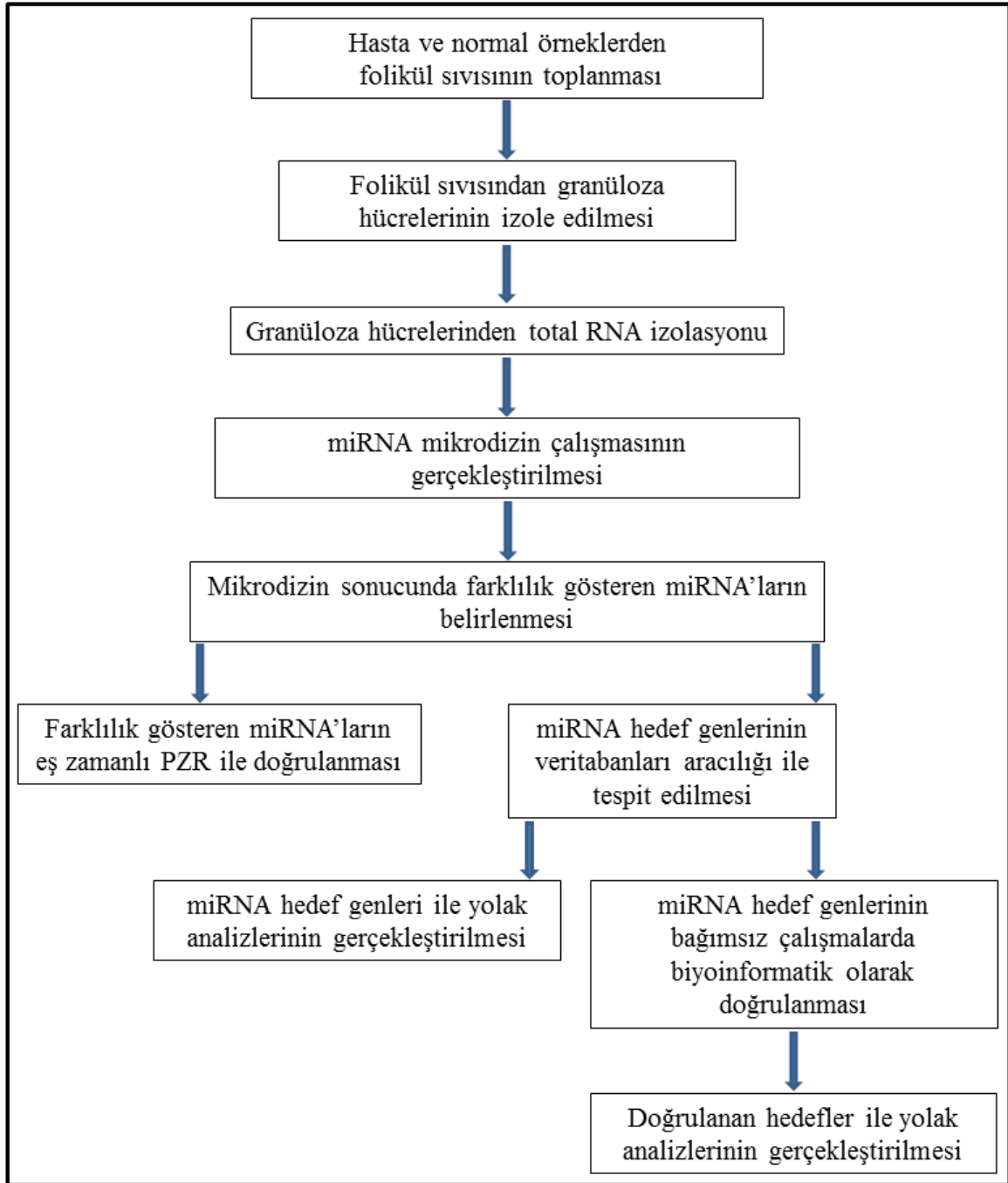
4.1.6. Primerler

miRNA primerleri

Çizelge 4.2. Eş zamanlı PZR'de kullanılan miRNA primerlerinin kısa adları, katalog numaraları, dizi ve Qiagen ürün adı bilgileri

miRNA	Kat. No.	Qiagen Ürün Adı	Dizi
hsa-miR-1587	MS00037492	Hs_miR-1587_1 miScript Primer Assay	UUGGGCUGGGCUGGGUUGGG
hsa-miR-1909	MS00016513	Hs_miR-1909*_1 miScript Primer Assay	UGAGUGCCGGUGCCUGCCCUG
hsa-miR-3135b	MS00037534	Hs_miR-3135b_1 miScript Primer Assay	GGCUGGAGCGAGUGCAGUGGUG
hsa-miR-3188	MS00041923	Hs_miR-3188_2 miScript Primer Assay	AGAGGCUUUGUGCGGAUACGGGG
hsa-miR-4286	MS00021371	Hs_miR-4286_1 miScript Primer Assay	ACCCACUCCUGGUACC
hsa-miR-4417		Custom Primer	GGUGGGCUUCCCGGAGGG
hsa-miR-4433	MS00041356	Hs_miR-4433-3p_1 miScript Primer Assay	ACAGGAGUGGGGGUGGGACAU

4.2. Yöntem



Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması

4.2.1. Hastalardan ve normal bireylerden folikül sıvısının toplanması

IVF tedavisi için başvuran bireylere foliküllerin çatlaması için kullanılan hCG enjeksiyonu uygulamasından 36 saat sonra (foliküller kendileri çatlamadan 12 saat önce) hasta oosit toplama işlemine (OPU - oocyte pick up) alınır. Bu işlem ortalama 160 mmHg basınç ile çalışan aspirasyon pompası (Labotect, 4014) ve çift boşluklu oosit aspirasyon iğnesi (Swemed, 14108) kullanılarak transvajinal ultrason görüntülemesi eşliğinde gerçekleştirilir. Olgunlaşmış ve çatlamadan hemen önceki Graafin folikülü aşamasında bulunan foliküller tek tek aspire edilir. 10 ml hacimli tüplere (Corning, 352001) toplanan her bir folikül sıvısı petri kaplarına (Corning, 353803) dökülür ve stereo mikroskop altında incelenerek kumulus-oosit kompleksi (KOK) ayrılır. KOK, IVF işlemi için besiyerine alınır. İçinden KOK toplanamayan foliküller aspirasyon sıvısı ile (Vitrolife, ASP™-125) yıkanır, aspire edilir ve tekrar petride incelenir. Oosit alındıktan sonra folikül sıvısında kalan kumulus hücreleri de toplanarak uzaklaştırılır. Bu işlemler 37°C altında IVF işlemi için özel olarak geliştirilen laminar kabin (IVF Tech, Sterile) içerisinde gerçekleştirilir. Petri kabında geriye kalan folikül sıvısı 50 ml'lik tüplere (Sarstedt, 62.547.254) alınarak diğer çalışmaların gerçekleştirileceği Ankara Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na transfer edilmek üzere 4°C'de saklanır. Transfer işlemi de buz aküleri kullanılarak 4°C'de gerçekleştirilir.

4.2.2. Folikül sıvısından granüloza izolasyonu

Granüloza hücrelerinin folikül sıvısından ayrılması için folikül sıvısı her hasta için 4 ayrı tüpe ayrılmış ve +4°C'de 200 g'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra her tüp içinde kalan hücreler 10 ml 1X PBS (Lonza, BE17-516F) ile süspansiyon haline getirilmiştir. Granüloza hücrelerini eritrositlerden ayırtmak için süspansiyon halindeki hücreler 10 ml Biocoll (Biochrom AG, L6115) (1:1 oranında) üzerine yayılarak +4°C'de 600 g'de 15 dakika santrifüj edilmiş gradient katmanları oluşturulmuş ve ara fazdaki granüloza hücreleri pipet yardımı ile toplanmıştır (Şekil 4.2). Ara fazdaki doku kalıntıları da pipet yardımı ile toplanarak uzaklaştırılmıştır. Toplanan granüloza hücreleri bir sonraki

aşama olan RNA izolasyonu için ve ileride protein çalışmalarında kullanılmak üzere 2'ye ayrılarak -80°C'ye kaldırılmışlardır.



Şekil 4.2. Biocoll ayırma işleminden sonra oluşan katmanlar ve granüloza hücre tabakası

4.2.3. Granüloza hücrelerinden total RNA izolasyonu

-80°C'de muhafaza edilen granüloza hücreleri RNA izolasyon protokolünün uygulanması için 1 ml QIAzol'e (Qiagen, 79306) alınmıştır. QIAzol içeriğinde bulunan guanidinium thiocyanate proteinleri parçalar ve RNA'yı RNaz'lerden korur. Hücrelerin gruplanma ve yapışma ihtimaline karşı QIAzol içerisindeki hücreler vortekslenmiştir ve ince uçlu enjektörden geçirilmişlerdir. Böylece homojenizasyon sağlanır, QIAzol bütün hücelere ulaşarak patlatır, proteinleri degrades eder ve RNA'yı korumaya alır. 1 ml QIAzol örnek karışımı için 1/5 oranında yani 200 µl kloroform (Sigma, C2432-500ML) eklenmiştir. Kloroform eklendikten sonra tüpler sertçe çalkalanmış ve 2 dakika beklenmiştir. Kloroform QIAzol içerisindeki fenolü bağlayarak dibeye çöktürür. Böylece üstte nükleik asitlerin bulunduğu berrak bir faz oluşur. +4°C'de 13.300 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda 3 farklı faz oluşmuştur. En alttaki pembe faz organik fazdır ve

burada organik bileşikler ile fenol ve kloroform bulunmaktadır. Orta faz beyaz renklidir ve DNA bulunmaktadır. En üstteki berrak fazda ise total RNA (rRNA, tRNA, mRNA, miRNA vd.) bulunmaktadır. Beyaz faza dikkat ederek üstteki berrak faz pipet yardımıyla toplanmıştır. Toplanan RNA yeni bir tüpe (RNazsız, DNazsız) alınmış, başlangıç QIAzol miktarının yarısı kadar isopropanol (Sigma, I9516-25ML) (1 ml QIAzol için 500 µl isopropanol) eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika beklenmiştir. İsoopropanol RNA çevresindeki suyu uzaklaştırır. Örnekler +4°C’de 13.300 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda total RNA pelet halinde dibe çöker. Pelet net olarak dibe çökmez ise çöktüğü düşünülen yere göre devam edilir. Tüp pelete dikkat edilerek boşaltılmış ve kuruması beklenmiştir. Başlangıç QIAzol miktarı kadar (1 ml) %70 etanol (Merck, K38999227) taze olarak hazırlanmış ve peletin üzerine eklenmiştir. +4°C’de 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Etanol QIAzol kaynaklı tuzları uzaklaştırır. Tüp pelete dikkat edilerek boşaltılmıştır. Yeniden başlangıç QIAzol miktarı kadar (1 ml) %70 etanol eklenmiş ve +4°C’de 10.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Peletin yoğunluğuna göre nükleaz içermeyen su (Lonza, BE51200) eklenerek pelet çözölmüş ve buz üzerine alınmıştır.

4.2.4. RNA miktarının belirlenmesi

İzole edilen RNA’ların konsantrasyonu ve saflığı NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. RNA miktarı 1 µl’deki nanogram (ng) cinsinden elde edilir. Nükleik asitler (DNA ve RNA) 260 nm dalga boyunda, proteinler 280 nm dalga boyunda, fenol gibi organik bileşikler ise 230 nm dalga boyunda maksimum absorbans verir. Bu nedenle RNA saflığı için A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları dikkate alınmaktadır. RNA için A_{260}/A_{280} oranının ~2 olması gerekmektedir. A_{260}/A_{230} oranı ise 1,8 ile 2,2 aralığında olması beklenir. Bu tez çalışmasında mümkün olduğunca bu oranlara sahip RNA’lar kullanılmıştır.

RNA konsantrasyonunun ayarlanması

Spektrofotometrik olarak konsantrasyonu belirlenen RNA örnekleri Flashtag™ HSR RNA Labelling Kit (Affymetrix, 901911) protokolünde mikrodizin reaksiyonu için gerekli 500 ng (8 µl hacme su ile tamamlanmıştır) ve RNA 6000 Nano Kit (Agilent, 5067-1511) protokolünde bütünlük ve kalite analizi için gerekli olan 1,1 µl ayrılarak -80°C'ye kaldırılmıştır.

4.2.5. RNA bütünlüğünün kontrolü

Agaroz jel elektroforezi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük kontrolü için örnekler %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanma şekilleri aşağıdaki gibidir.

Reaktifler

5X TBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA)

54 g TRIS Base (Sigma, 0826-1KG), 27,5 g Borik Asit (Sigma, 0588-1KG) ve 20 ml 0,5 M EDTA'nın (pH=8,0) (Sigma, E9884) 800–900 ml deiyonize su (ddH₂O) içerisinde çözülmesi sağlanır ve daha sonra 1000 ml'ye tamamlanır. Hazırlanan 5X TBE, stok solüsyonu olarak kullanılır. 5X TBE'nin deiyonize su ile 1/5 oranında sulandırılması ile hazırlanan 1X TBE ise çalışma solüsyonu olarak agaroz jel hazırlamada ve elektroforez tamponu olarak, RNA örneklerinin bütünlük analizinde kullanılmıştır.

DNA ladder (100 bp DNA ladder)

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, SM0321) üzerine 166 µl 6X Loading Dye (Fermentas, R0611) ve 734 µl distile su ilave edilir. Vorteks yardımı ile karıştırılır.

%1'lik agaroz jel hazırlanması

1 g agaroz (Lonza, 50004) hassas terazi (Shimadzu, BX320H) ile tartılır ve üzerine 100 ml 1X TBE eklenir. %1'lik olarak hazırlanan agaroz mikrodalga fırın (Vestel) yardımı ile çözülür. Çeker ocak altına alınan agarozun el yakmayacak kadar soğuması beklendikten sonra 1 µl etidyum bromür (10 mg/ml) (SNP Biyoteknoloji, SNPEB-5) eklenir ve boyanın homojen dağılması için karıştırılır. Hazırlanan agaroz-boya karışımı kuyuların oluşması için önceden tarak yerleştirilmiş jel tablasına dikkatlice dökülür. Dökme sırasında hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilir. Hazırlanan jelin katılaşması için 20-30 dakika oda sıcaklığında beklenir.

%1'lik agaroz jelde RNA örneklerinin yürütülmesi

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, içerisinde 1X TBE bulunan elektroforez tankına (Clever Sci.) yerleştirilir. Jel'deki ilk kuyuya DNA ladder yüklenir. 8 µl RNA örnekleri 2 µl 6X Loading Dye (Fermantas, R0611) ile karıştırıldıktan sonra pipet yardımıyla jeldeki diğer kuyulara yüklenir.

Jele yükleme yapılırken yüklemenin yapıldığı kuyularda hava kabarcığı olmamasına ve yüklenen boya-jel karışımının kuyulardan taşmamasına dikkat edilir. Yükleme tamamlandıktan sonra örnekler 90 voltta 30 dakika yürütülür. Yürütme sonunda görüntülenmek üzere UV görüntüleme sistemine (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) aktarılır. Burada GeneSnap (v6.08.04) yazılımı ile UV ışık altında görüntülenerek elde edilen RNA'nın %1'lik agaroz jel görüntüsü bütünlük açısından değerlendirilir.

Agilent NanoChip 6000 bütünlük analizi

İzole edilen RNA örneklerinin bütünlük analizleri, 2100 Biyoanalyzer (Agilent, G2940CA) cihazı ile RNA 6000 Nano Kit (Agilent, 5067-1511) kullanılarak üretici firmanın yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. RNA 6000 Nano Kit ribozomal RNA'nın

28S ve 18S bantlarının bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılmaktadır. rRNA stabilitesi miRNA'lar gibi çok daha küçük moleküllerin de stabil olduğunu gösterir.

İlgili yönteme ait protokol aşağıdaki gibidir.

Jelin hazırlanması

Tüm reaktifler kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutularak ısı dengesi sağlanır. 550 µl jel matriksi spin filtresinin üst haznesine koyulur. 10 dakika 1500 g'de santrifüj edilerek filtrelendir. 65 µl jel kitle birlikte verilen RNaz içermeyen 0,5 ml'lik tüplere transfer edilir. Bölünen jeller +4°C'de saklanarak 1 ay süresince kullanılabilir.

Jel-boya karışımının hazırlanması

Tüm reaktifler kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutularak ısı dengesi sağlanır. Yüksek hızda vortekslenir ve 15 saniye santrifüj edilir. 1 µl boya 65 µl jel karışımına eklenir. Tüp vortekslenir ve jel ile boyanın iyice karıştığından emin olduktan sonra tüm bileşenler +4°C'de karanlık ortamda saklanır. Tüpler oda sıcaklığında 13.000 g'de 10 dakika santrifüj edilir. Hazırlanan karışım 1 gün süresince kullanılabilir.

Jel-boya karışımının yüklenmesi

Tüm reaktifler kullanmadan önce 30 dakika oda sıcaklığında tutularak ısı dengesi sağlanır. Çip, çip yükleme istasyona yerleştirilir. 9 µl jel-boya karışımı yönergede belirtilen jel kuyusuna yüklenir. İstasyondaki pistonun 1 ml pozisyonunda olduğundan emin olunur sonra çip yükleme istasyonu kapatılır. Pistona şırınga mandalı tarafından tutulana kadar basılır. 30 saniye bekledikten sonra piston serbest bırakılır. 5 saniye bekledikten sonra piston serbest bırakılır ve 1 ml pozisyonuna tekrar gelmesi beklenir. Çip yükleme istasyonu açılır. 9 µl jel boya karışımı yönergede gösterilen diğer 2 kuyusuna da yüklenir.

Markerın yüklenmesi

12 örnek kuyusu ve ladder kuyusuna 5 µl RNA marker yüklenir.

Ladder ve örneklerin yüklenmesi

Kullanmadan önce ladder solüsyonu eritilir ve buz üzerinde muhafaza edilir. İkincil yapı oluşumunu önlemek için örnekler çipe yüklenmeden önce 70°C’de 2 dakika denatüre edilir. Ladder olarak işaretli olan kuyuya 1 µl RNA ladder yüklenir. RNA örnekleri, 12 örnek kuyusuna 1 µl yüklenir. Çip özel vorteksinde 1200 rpm’de 2 dakika vortekslenir.

Bioanalyzer cihazının hazırlanması

Elektrot temizleyicinin bir kuyusundan 350 µl RNaseZAP ile yavaşça eklenir. Kapak açılır ve elektrot temizleyici cihazın haznesine yerleştirilir. Kapak kapatılır ve bu şekilde 1 dakika beklenir. Kapak açılır ve elektrot temizleyici çıkarılır. Başka bir elektrot temizleyicinin bir kuyusu 350 µl RNaz içermeyen su ile yavaşça doldurulur. Kapak açılır ve elektrot temizleyici cihazın haznesine yerleştirilir. Kapak kapatılır ve bu şekilde 10 saniye beklenir. Kapak açılır ve elektrot temizleyiciyi çıkarılır. 10 saniye daha elektrotlardaki suyun buharlaşması için beklenir.

Çipin cihaza yerleştirilmesi

Cihazın kapağı açılır ve elektrot kartuşunun doğru yerleştirildiğinden emin olunur ve ayrıca çip seçicinin 1. pozisyonda olduğundan emin olunur. Çip hazneye yerleştirilir. Kapak dikkatlice kapatılır. Kartuşun elektrotları çipin kuyularına oturacaktır. 2100 Expert yazılımı size ekranda çipin yerleştirildiğini ve kapağın kapandığını gösterecektir.

Çip cihaza yüklendikten sonra koşturulur ve örnek isimleri cihaza girilir.

4.2.6. Mikrodizin çalışmasının gerçekleştirilmesi

Poly (A) kuyruğunun takılması

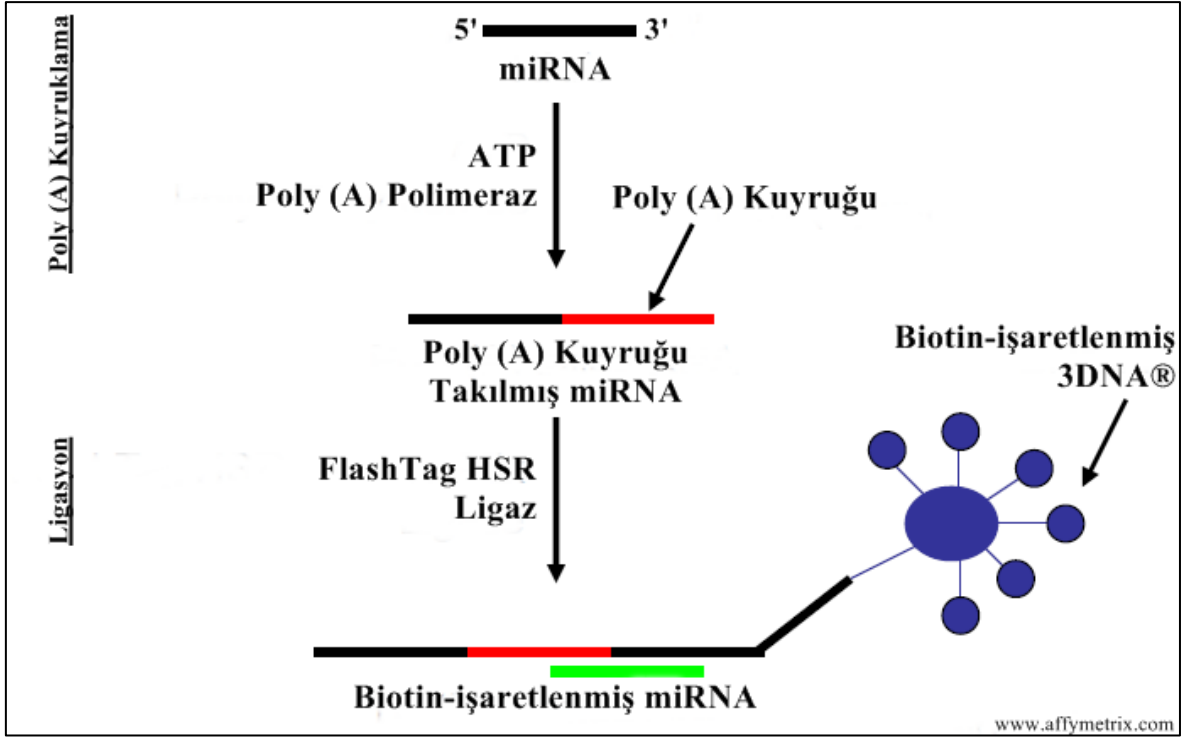
Bu aşamada uygulama buz üzerinde yapılmıştır. Bu aşama miRNA molekülünün 3' ucuna Poly (A) kuyruğu ekleme aşamasıdır. Buz üzerindeki 500 ng/8 µl total RNA örneğine 2 µl RNA Spike Control Oligos eklenmiştir. ATP mix'i 1:500 oranında (Total RNA için) 1mM TRIS ile dilüe edilmiştir. Reaktifler Master Mix olarak hazırlanmıştır (Çizelge 4.3) ve her örnek için 10 µl RNA/Spike Control Oligos karışımı üzerine 5 µl master mix eklenmiştir. 15 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 4.3. Poly (A) kuyruklama karışımı

Reaktifler	Miktarlar
ATP karışımı (dilüe edilmiş)	1,0 µl
PAP Enzimi	1,0 µl
10X Reaksiyon tamponu	1,5 µl
25 mM MnCl ₂	1,5 µl
Toplam hacim	5 µl

miRNA'ların biotin ile işaretlenmesi (Ligasyon)

İnkübe edilen örnek alınıp buza koyulmuştur. 4 µl 5X FlashTag Biotin HSR Ligation Mix her örneğe eklenmiştir. Bu eklemekten hemen sonra 2 µl T4 DNA Ligase her örneğe eklenmiştir. Yavaşça karıştırılmış ve 25°C'de (oda sıcaklığında) 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda miRNA'lar 3' uçlarından biotin ile işaretlenmişlerdir (Şekil 4.3). Reaksiyon 2,5 µl HSR Stop Solution eklenerek durdurulmuştur.



Şekil 4.3. Poly (A) kuyruklama ve ligasyon aşamalarının şematik gösterimi (<http://www.affymetrix.com> sitesinden adapte edilmiştir.)

Hibridizasyon kokteylinin hazırlanması, çipe yüklenmesi ve hibridizasyon

Hibridizasyon kokteyli hazırlanmadan önce 20X Eukaryotic Hybridization Controls 0,2 ml'lik tüplere her örnek için 6 µl bölünerek 5 dakika 65°C'de inkübe edilmiştir. Hibridizasyon kokteyli her örnek için hazırlanmıştır (Çizelge 4.4) ve 21,5 µl biotinle işaretlenmiş örnek ile 110,5 µl kokteyl karıştırılmıştır. Karışım 99°C'de 5 dakika ve 45°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. 130 µl karışım çekilerek çipe üzerindeki septa denilen deliklerden birinden yüklenmiştir. Bu işlem her örnek için ayrı ayrı uygulanmıştır. Daha sonra septalar kapatılmıştır ve çipler hibridizasyon fırınına alınarak 48°C'de 60 rpm'de 18 saat inkübe edilmiştir.

Çizelge 4.4. Hibridizasyon kokteyli bileşenleri

Reaktifler	Miktarlar
2X Hybridization Mix	66 µl
%27,5 Formamide	19,2 µl
DMSO	12,8 µl
20X Hybridization Controls	6,6 µl
Control Oligo B2, 3nM	2,2 µl
Nükleaz içermeyen su	3,7 µl
Toplam hacim	110,5 µl

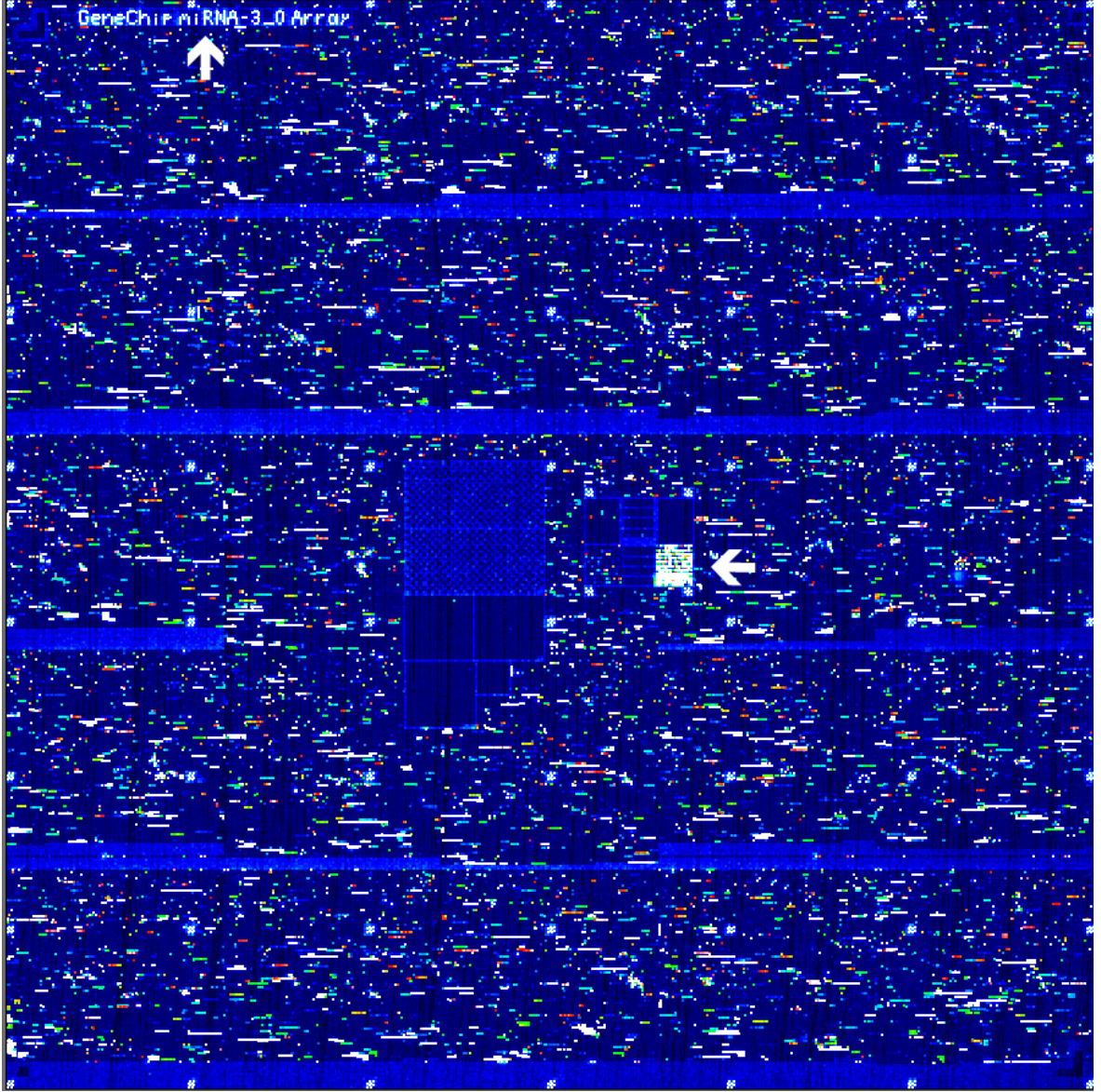
Yıkama-boyama-tarama

18 saat sonunda çipler hibridizasyon fırınından alınmış ve bilgisayara bağlı olan yıkama istasyonunda çip için uygun protokol seçilmiştir. Gerekli tampon ve solüsyonlarla yıkama ve boyama yapılmıştır. Yıkama-boyama protokolü tamamlanan çip alınmış ve tarayıcıya koyulmuştur. Tarama sonucunda analiz için gerekli olan veri .DAT tarama sonucu ve bu dosyanın sayısal değerlere dönüştürülmüş hali olan .CEL formatında elde edilmiştir.

Çip kalitesinin değerlendirilmesi

Tarama sonucu elde edilen .DAT uzantılı dosyalar AGCC 4.0 (Affymetrix® GeneChip Command & Console Software) yazılımı içinde bulunan AGCC Viewer programı ile açılmış ve çiplerin hibridizasyon aşamasında bir problem olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Hibridizasyon kokteylinin hazırlanması sırasında karışıma eklenen kontroller hibridizasyon, yıkama, boyama ve tarama işlemleri başarılı gerçekleştiğinde çipler üzerinde belirli problemlara bağlanarak ışıma verirler. Affymetrix® çipleri dizayn edilirken çipin ismi yazacak şekilde kontrol problemleri yerleştirilir. Çipin isminin .DAT dosyasından okunabilmesi bu aşamalarda bir sorun olmadığının göstergelerinden biridir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. GeneChip® miRNA 3.0 çipi için .DAT uzantılı dosyanın AGCC Viewer ile açılmış görüntüsü. Şekilde okla gösterilen sol üst tarafta çipin platform isminin yazması ve ortadaki parlak bölge hibridizasyonun ve yıkama, boyama aşamalarının başarılı olduğunu göstermektedir.

.CEL uzantılı olarak alınan mikrodizin verisi hibridizasyon yüzdesinin belirlenmesi için Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programına yüklenir. Affymetrix® firması tarafından GeneChip® miRNA 3.0 çipleri için örnek olarak verilen .CEL dosyaları

referans alınarak hibridizasyon yüzdeleri (%P) değerlendirilir. Hibridizasyon başarısı Affymetrix® tarafından verilen örnek veriye göre %18 ve üzerinde olmalıdır.

4.2.7. Mikrodizin verilerinin analizi

Bu tez çalışmasında kullanılan BRB-ArrayTools (v4.3.2) (53) yazılımı “R” yazılım dilinde “Bioconductor” paketini kullanarak “Microsoft Excel” eklentisi olarak mikrodizin analizi yapılmasına olanak sağlar. Affymetrix® firmasının “GeneChip® miRNA 3.0” çipinde diğer ifade analiz çiplerinde sunulan “.cdf” uzantılı çip tanımlama dosyasını sunmaması nedeniyle R-Bioconductor ve dolayısıyla BRB-ArrayTools programı .CEL uzantılı dosyaları bu çip için tanıyamamakta ve programa doğrudan yükleme yapılamamaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında analiz için ön-işleme ve normalizasyon işlemleri Affymetrix® firması tarafından sağlanan Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programı ile normalizasyon sonrası işlemler (istatistiksel analizler) ise BRB-ArrayTools (v4.3.2) programı ile yapılmıştır.

Normalizasyon

Mikrodizin miRNA ifade verisi RMA (Robust Multiarray Average) (54) metodu kullanılarak Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programında normalize edilmiştir. Normalizasyon teknik farklardan dolayı ortaya çıkabilecek farklılıkları (spesifik olmayan bağlanma, yıkama ve boyama aşamasından kaynaklanabilecek farklılıklar, arka plan gürültüsü gibi) eleyerek biyolojik veri üzerindeki gerçek farkların ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. RMA normalizasyon yöntemi, arka plan düzeltmesi (background correction), quantile normalizasyon ve verinin logaritma 2 tabanına dönüştürülmesini içeren bir pakettir.

Korelasyon analizi

Normalize edilen örnekler Pearson korelasyon Expression Console programında analizine alınmıştır. Bu analizde “r” değeri 1’e yaklaştıkça korelasyon artmaktadır. Aynı şartlar altında çalışılan mikrodizin çiplerinin yüksek korelasyon göstermeleri beklenir ($r > 0,8$).

Verilerin BRB-ArrayTools'a yüklenmesi

Expression Console üzerinde normalize edilen veriler “Sekmeyle Ayrılmış Metin (Tab Delimited Text)” formatında programdan çekilmiş ve BRB-ArrayTools programına genel mikrodizin verisi olarak yüklenmiştir.

Filtreleme

GeneChip® miRNA 3.0 çipi üzerinde insan miRNA'ları ile birlikte 153 farklı organizmaya ait proplar bulunmaktadır. Bu nedenle veri üzerinde BRB-ArrayTools programı ile insan (hsa) miRNA'ları filtrelenmiş ve analiz sadece insana ait miRNA'lar üzerinden yapılmıştır.

4.2.8. İstatistiksel analizler

Anlamli olarak farklılık gösteren miRNA'ların belirlenmesi

Yüklenen veri “PK” ve “NM” olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. PK grubu PKOS hastası 14 bireyden, NM grubu ise 9 normal bireyden oluşmaktadır. 2 gruba ayrılan örnekler program içindeki sınıf karşılaştırması (Class Comparison) komutu (t-test) ile kıyaslanmıştır ve 1,5 kat üzeri değişiklik gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

Kümeleme analizi

İstatistiksel olarak anlamlı ve 1,5 kat ve üzeri değişiklik gösteren miRNA'lar kümeleme analizine alınmıştır. Analizde genler ve örnekler hiyerarşik olarak “Average linkage” metodu ile kümelenmişlerdir. Çalışmada kümeleme analizi için Cluster (v3.0) (<http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/>) (55) programı, kümeleme analiz sonucunun görüntülenmesi için ise Java TreeView (v1.1.6r4) (56) programı kullanılmıştır.

Mann-Whitney testi

Mann-Whitney testi (U-test) iki grubun birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir (57). Çalışmada Mann-Whitney testi Minitab® (v16.1.1) programı kullanılarak yapılmıştır.

4.2.9. miRNA'ların eş zamanlı PZR yöntemi ile doğrulanması

miRNA'lardan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi

Total RNA kullanılarak yapılan cDNA sentez reaksiyonlarında mRNA'yı total RNA'dan ayırmak için mRNA'nın 3' ucunda bulunan poly (A) kuyruğu kullanılır ve oligo (dT) primeri poly (A) kuyruğuna hedef olarak kullanılarak total RNA'nın içinde bulunan mRNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenir. Olgun miRNA'ların 3' uçlarında poly (A) kuyruğu bulunmamaktadır ve bu durum klasik bir cDNA sentezinin yapılmasını engellemektedir. miRNA'lardan cDNA sentezi için miScript II RT Kit (Qiagen, 218161) kullanılmıştır. Kit ile öncelikle miRNA'ların 3' uçlarına poly (A) kuyruğunu da içeren bir "universal tag" eklenmiştir. Bu ek hem cDNA sentezi için kullanılacak primer dizisini içermekte (poly (A)) hem de miRNA'nın boyunu eş zamanlı PZR için yeterli uzunluğa getirmektedir. Bir sonraki basamakta universal tag'e spesifik bir primer kullanılarak cDNA sentez reaksiyonu üreticinin yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Mikrodizin analizi sonucu seçilen miRNA'ların ifade farklılığının eş zamanlı PZR ile doğrulanması

İfade farklılıkları gösteren miRNA'ların doğrulama çalışması eş zamanlı PZR tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Her bir örnekten elde edilen RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmış ve PZR sonucunda elde edilecek ifadeler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. miRNA'lara özel ileri primerler cDNA sentezi kitlerine uyumlu olarak ilgili firma tarafından sağlanmıştır. Geri primer olarak cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan universal tag'e tamamlayıcı olan universal primer kullanılmıştır. Bu kitler laboratuvarımızda bulunan LightCycler® 480 (Roche, 05015243001) platformu

ile uyumludur. miRNA ifadelerinin analizleri için referans gen kullanmak yerine eş zamanlı PZR çalışmasında kullanılan tüm miRNA'ların Ct değerlerinin ortalamaları hesaplanmış ve her bir miRNA bu ortalama değer ile normalize edilmiştir (58). Analiz yöntemi olarak, yaklaşım yöntemi olarak da adlandırılan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metodu (59) kullanılmıştır.

4.2.10. miRNA hedef genlerinin belirlenmesi

miRNA hedef genlerinin bulunması için pek çok biyoinformatik araç bulunmaktadır. Bu çalışmada miRNA hedef genleri bulunurken miRDB (<http://mirdb.org/>) (60,61) veritabanı kullanılmıştır.

4.2.11. Yolak analizleri

Her miRNA'ya ait hedef gen listeleri tespit edildikten sonra bu listeler WebGestalt (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) (62) internet sitesi aracılığıyla yolak zenginleştirme analizine alınmışlardır.

4.2.12. miRNA hedef genlerinin biyoinformatik olarak doğrulanması

Literatürdeki gen ifadesi profillemeye çalışmalarının araştırılması ve indirilmesi

Literatür araştırması PKOS hastası ve normal bireylerden toplanan granüloza hücrelerinin gen ifadesi profillemeye çalışmaları (mikrodizin verileri) taranarak gerçekleştirilmiştir. Mikrodizin verilerinin taranması işlemi halka açık veritabanları olan GEO (Gene Expression Omnibus) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (63) ve ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) (64) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu veri tabanlarında arama yapılırken anahtar kelime olarak sırası ile “PCOS”, “granulosa” ve “microarray” terimleri birlikte kullanılmıştır. Elde edilen gen ifadesi verisi indirilerek depolanmıştır.

miRNA hedef genlerinin indirilen veriler ile biyoinformatik olarak doğrulanması

İndirilen gen ifadesi verisi BRB-ArrayTools (v4.3.2) programı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda anlamlı olarak 2 kat ve üzeri farklılık gösteren genler ($p < 0,05$) ile çalışmada ortaya çıkan miRNA'ların hedeflediği genler VENNY (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) (65) web programı aracılığı ile kesiştirilmiştir.

Kesişen ortak genlerin miRNA ifade duruma göre artma azalma durumu tespit edilerek miRNA ifadesi ile ters ifade gösteren (biyoinformatik olarak doğrulanan) mRNA'lar seçilmiştir. Seçilen genler ile WebGestalt (WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) (62) internet sitesi kullanılarak yolak analizi yapılmıştır.

Biyoinformatik olarak doğrulanan miRNA'lar ile hedeflerinin hizalama sonuçları ve hedef tahmininde değerlendirme kriteri olan mirSVR skorları microrna.org (<http://www.microRNA.org>) veritabanı kullanılarak tespit edilmiştir. mirSVR, miRNA hedef bölgelerini tarayarak tahmini hedef gen ifade azalışına göre skollama yapan bir algoritmadır (66,67).

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. RNA İzolasyonuna Ait Bulgular

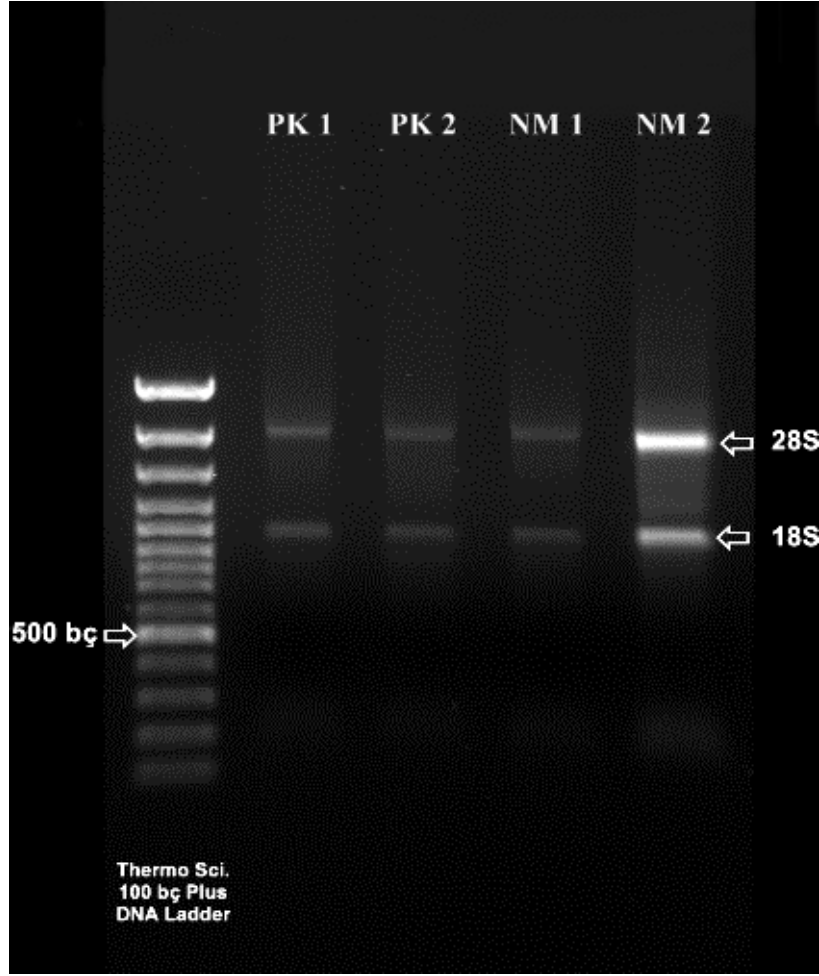
Tez çalışmasında kullanılan bütün örneklerin RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA'lar NanoDrop™ 1000 cihazına yüklenerek konsantrasyonları ve A_{260}/A_{280} oranları tespit edilmiştir. İzole edilen RNA miktarları yapılacak çalışmalar için yeterli bulunmuştur. RNA konsantrasyonları 25,2 ile 1930 ng/µl arasında değişim göstermektedir.

RNA'ların Nanochip 6000 Kit ile Bioanalyzer 2100 cihazında bütünlük analizleri yapılmıştır (Çizelge 5.1). Örneklerin RNA bütünlük sayıları (RIN – RNA integrity number) 5,10 ile 9,50 arasında dağılım göstermektedir. RIN değerleri olmayan örnekler de çalışmaya dahil edilmiş ve literatür ile uyumlu olarak (68) yüksek verimlilikte mikrodizin verileri elde edilmiştir.

Çizelge 5.1. RNA örneklerine ait konsantrasyon, saflık ve RIN (RNA bütünlük sayısı – RNA integrity number) değerleri. RIN değeri 10’a yaklaştıkça RNA bütünlüğü artmaktadır. RIN değeri boş olan örneklerde değer okunamamıştır.

Örnek No.	Konsantrasyon (ng/μl)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN
PK 1	397,3	2,00	5,10
PK 2	951,9	2,08	6,10
PK 3	1840,2	2,07	-
PK 4	519,1	2,02	-
PK 5	156,6	2,00	-
PK 6	1930,0	2,08	9,10
PK 7	194,0	2,01	7,90
PK 8	250,8	2,01	7,20
PK 9	204,2	1,98	7,90
PK 17	52,8	1,97	9,50
PK 18	241,8	1,99	9,50
PK 19	261,7	2,04	9,00
PK 20	25,2	1,94	7,50
PK 21	45,0	1,79	6,20
NM 1	217,4	1,98	-
NM 2	56,2	1,93	-
NM 3	3477,3	2,00	6,70
NM 13	63,3	2,04	9,50
NM 14	154,7	1,91	9,10
NM 15	79,7	1,87	8,60
NM 16	89,3	1,97	7,10
NM 17	126,4	1,94	7,20
NM 18	114,6	1,93	7,60

İzole edilen total RNA’lar %1’lik agaroz jelde yürütülerek genomik DNA kontaminasyonu olup olmadığı ve 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüğü kontrol edilmiştir (Şekil 5.1). Örneklerle ait total RNA’larda DNA kontaminasyonuna rastlanmamıştır. İzole edilen RNA’ların 28S ve 18S rRNA bantlarının bütünlüklerini korudukları tespit edilmiştir.



Şekil 5.1. İzole edilen total RNA'ların temsili agaroz jel elektroforezi görüntüsü. İlk 3 örnek 100 ng, son örnek 200 ng yüklenmiştir ve %1'lik agaroz jelde 90 V'da 30 dakika yürütülmüşlerdir.

5.2. Mikrodizin Çalışmasına Ait Bulgular

Çiplere ait .CEL dosyaları hibridizasyon yüzdelerinin (%P) tespit edilmesi için Affymetrix® Expression Console (v1.4.0) programına yüklenmiştir. Affymetrix® firması tarafından GeneChip® miRNA 3.0 çipleri için örnek olarak verilen .CEL dosyaları referans alınarak hibridizasyon yüzdeleri (%P) değerlendirilir. Referanslar ile yapılan analiz sonucunda bu çiplerin en az %18 hibridizasyon yüzdesine sahip olduğu gözlemlenmiştir. Çizelge 5.2'de gösterildiği gibi çalışmanın hibridizasyon yüzdeleri (%P) 18,84 ile 23,31 arasında değişmektedir.

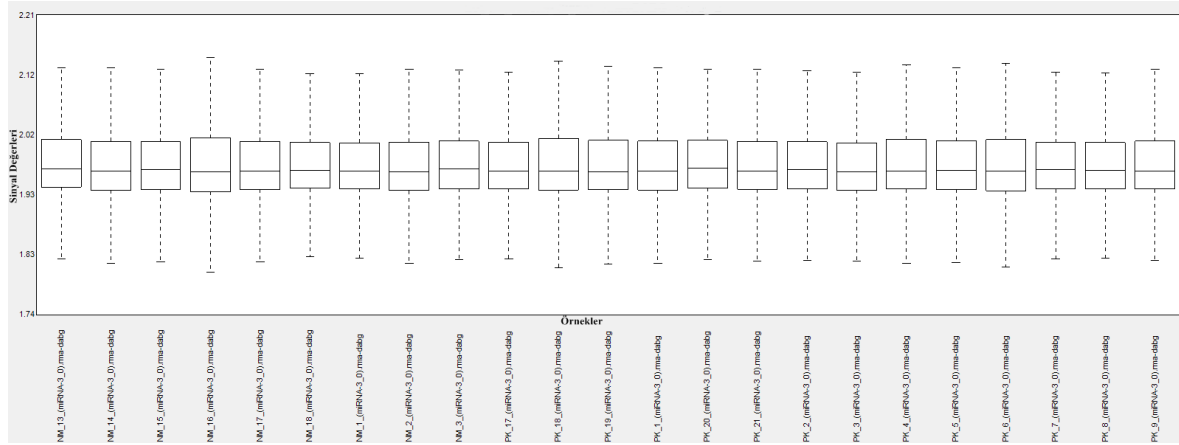
Çizelge 5.2. Çiplerin tarama sonrası hibridizasyon yüzdeleri gösterir çizelge

Çip İsmi	Hibridizasyon Yüzdesi (%P)
NM_1_(miRNA-3_0)	22,39
NM_2_(miRNA-3_0)	20,90
NM_3_(miRNA-3_0)	21,26
NM_13_(miRNA-3_0)	22,17
NM_14_(miRNA-3_0)	22,82
NM_15_(miRNA-3_0)	21,42
NM_16_(miRNA-3_0)	20,76
NM_17_(miRNA-3_0)	22,65
NM_18_(miRNA-3_0)	20,54
PK_1_(miRNA-3_0)	21,77
PK_2_(miRNA-3_0)	23,31
PK_3_(miRNA-3_0)	21,91
PK_4_(miRNA-3_0)	21,86
PK_5_(miRNA-3_0)	21,58
PK_6_(miRNA-3_0)	18,84
PK_7_(miRNA-3_0)	19,88
PK_8_(miRNA-3_0)	22,39
PK_9_(miRNA-3_0)	21,08
PK_17_(miRNA-3_0)	22,45
PK_18_(miRNA-3_0)	20,41
PK_19_(miRNA-3_0)	19,51
PK_20_(miRNA-3_0)	18,69
PK_21_(miRNA-3_0)	19,92

5.3. Mikrodizin Verilerinin Analizine Ait Bulgular

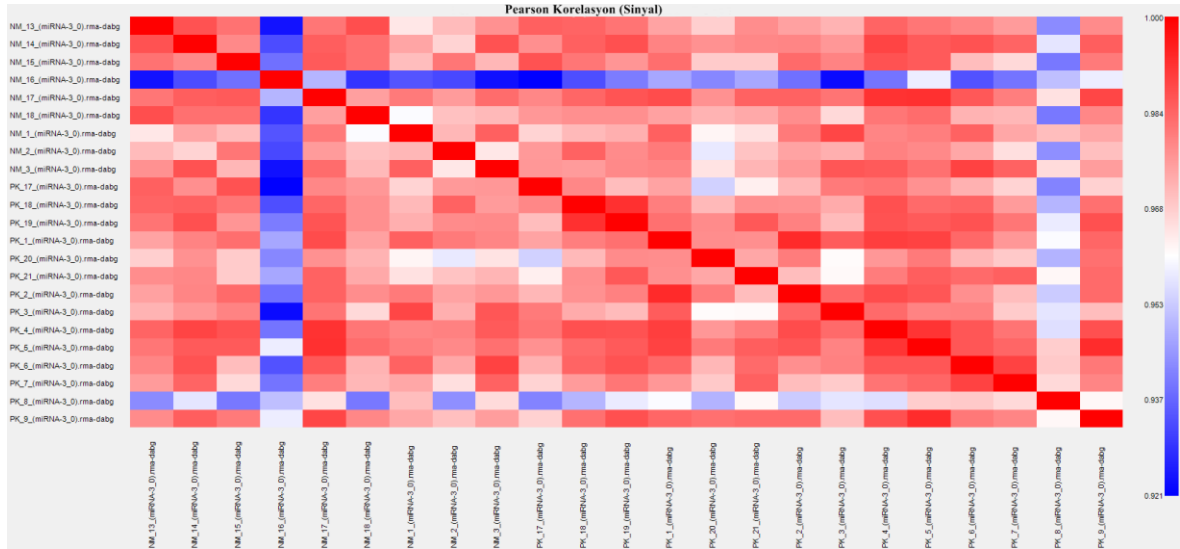
5.3.1. Normalizasyon sonrası bulgular

miRNA ifade verileri Affymetrix® Expression Console programı ile normalize edilmiştir. RMA normalizasyonu sonrasında çizilen kutu grafiği ile verilerin medyan değerlerinin aynı düzleme geldiği ve çiplerin birbirleri ile kıyaslanabilir olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Çiplere ait verilerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin kutu grafiği

Veriler normalizasyon sonrasında korelasyon analizine alınmışlardır. Çipler aynı şartlarda çalışıldığı için yüksek korelasyon göstermeleri beklenmektedir. Normalize veriler ile gerçekleştirilen korelasyon analizleri 23 çipin birbirleri ile yüksek derecede korele olduğunu göstermektedir (Şekil 5.3). Korelasyon kat sayısı 1'e yaklaştıkça örnekler arasındaki ilişki güçlenmektedir. Çalışılan 23 örnek %92 oranında korele bulunmuştur. Bu değer çalışmanın doğruluğu ve çiplerin güvenilirliği için önem taşımaktadır. Bu korelasyon analizi aynı zamanda çiplerin birbirleri ile kıyaslanabilir olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.3. Çiplerin normalizasyon sonrası sinyal verilerinin Pearson korelasyon analizi sonuçları. Çipler en az %92 oranında korelasyon ($r \geq 0.921$) göstermektedir.

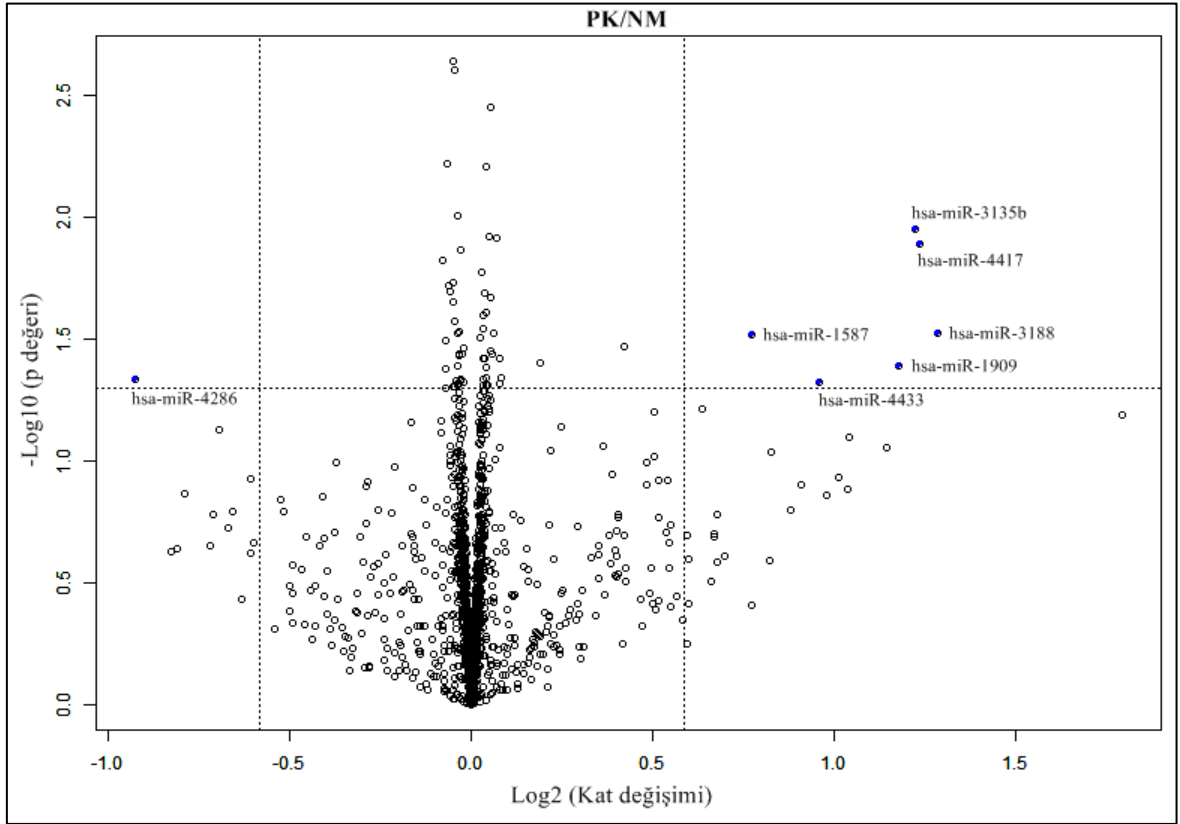
5.3.2. İki grup arasında farklılık gösteren miRNA'lar

Verilerin BRB-ArrayTools programı ile sınıf karşılaştırması (Class Comparison – unpaired t-test) analizi sonucunda 7 adet miRNA'nın 1,5 kat ve üzerinde anlamlı olarak ($p < 0,05$) değişim gösterdiği (arttığı ya da azaldığı) görülmüştür (Çizelge 5.3). Bu miRNA'lardan 6 tanesinin ifadesi PKOS hastalarında (PK) normal bireylere (NM) göre en çok 2.43 kat artarken 1 tanesinin ifadesi 2 kat azalmaktadır (Şekil 5.4).

Çizelge 5.3. PKOS hastaların normal bireyler ile kıyaslanması sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'lar

UniqueID	miRNA	p-değeri	Kat Değişimi (PK/NM)
hsa-miR-3188_st	hsa-miR-3188	0,0288	2,43
hsa-miR-4417_st	hsa-miR-4417	0,0118	2,35
hsa-miR-3135b_st	hsa-miR-3135b	0,0111	2,33
hsa-miR-1909_st	hsa-miR-1909	0,0373	2,26
hsa-miR-4433_st	hsa-miR-4433	0,0496	1,94
hsa-miR-1587_st	hsa-miR-1587	0,0294	1,71
hsa-miR-4286_st	hsa-miR-4286	0,0242	0,53

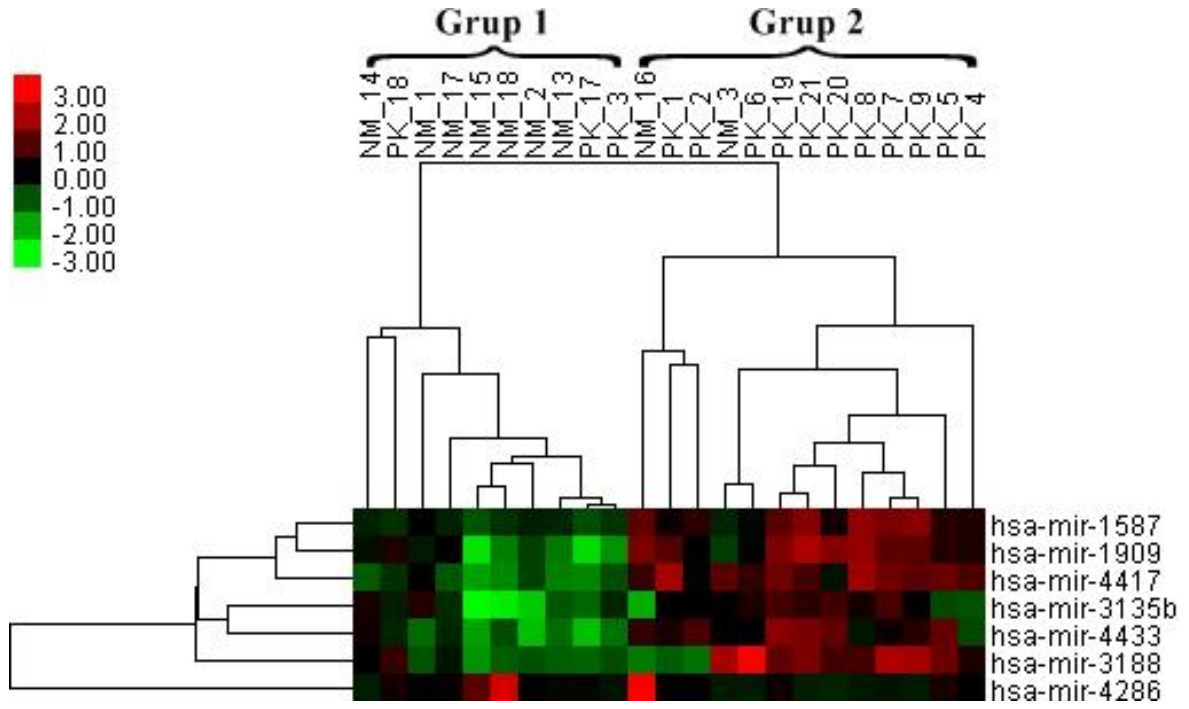
Mikrodizin verilerinin analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren (artan ve azalan) miRNA'lar Şekil 5.4'teki volkan grafiğinde gösterilmiştir.



Şekil 5.4. Analiz sonucunda anlamlı olarak 1,5 kat ve üzeri ($p < 0,05$) ifade değişikliği gösteren miRNA'ların volkan grafiği. 6 miRNA'nın ifadesi PKOS (PK) grubunda Normal (NM) grubuna göre artış gösterirken 1 miRNA'nın ifadesi azalmaktadır.

Kümeleme analizi sonuçları

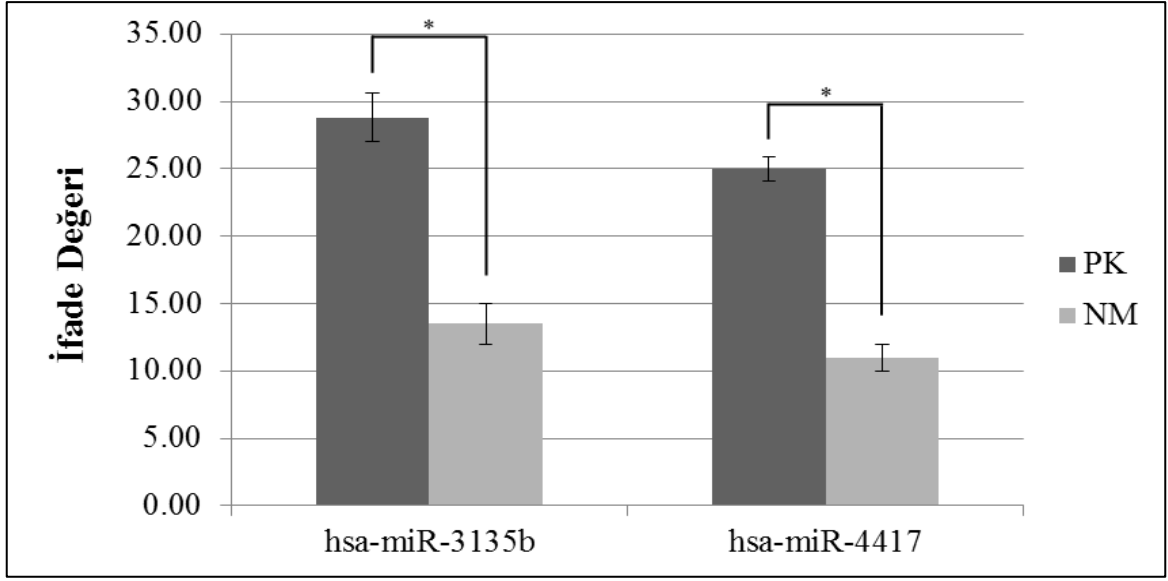
Farklılık gösteren miRNA'lar Cluster programı ile kümeleme analizine alınmışlardır. Hiyerarşik küme analizi sonucunda çalışmada kullanılan örnekler ilgili miRNA'ların ifade profilleri kullanıldığında istatistiksel olarak anlamlı kümelenmişlerdir (Şekil 5.5). Farklılık gösteren miRNA'ların ifadeleri göz önüne alındığında PKOS ve normal örnekler Grup 1 ve Grup 2 olarak iki anlamlı gruba ayrılmışlardır (Mann-Whitney; $W=155,5$; $p=0,03$).



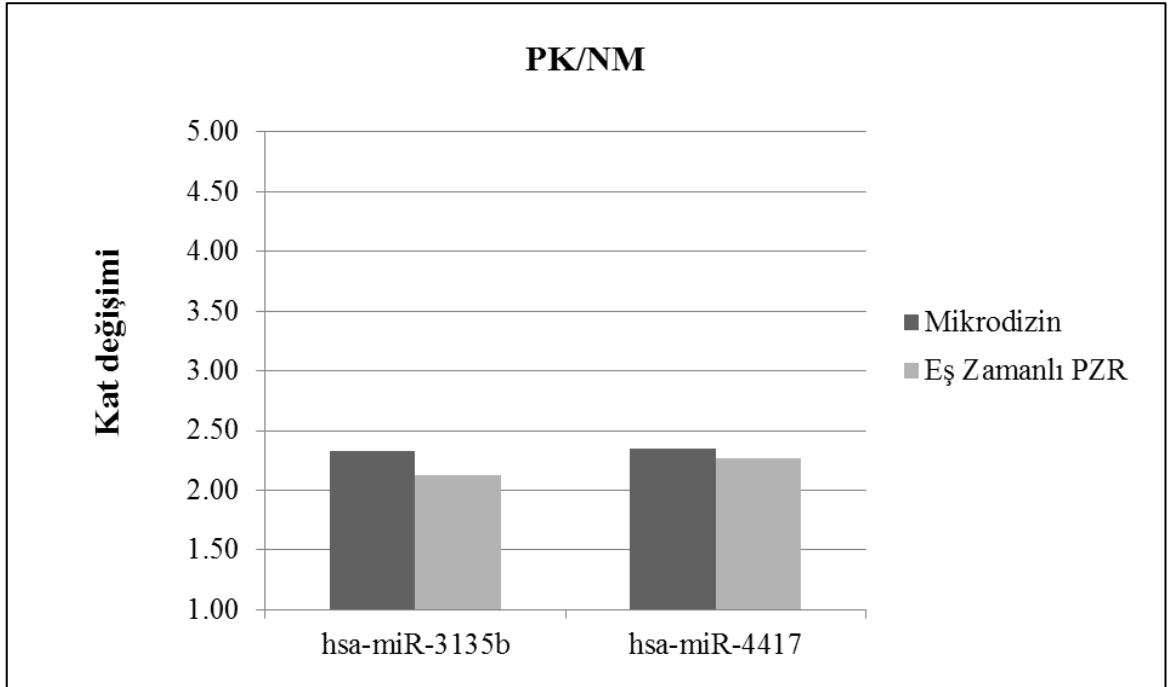
Şekil 5.5. Sınıf karşılaştırması sonucunda anlamlı değişiklik gösteren ($p < 0,05$) miRNA'lar kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizine ait heatmap. Örnekler ilgili miRNA ifade profillerine göre istatistiksel olarak anlamlı kümelenmişlerdir (Grup 1 ve Grup 2 olarak) (Mann-Whitney; $W=155,5$, $p=0,03$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir.

5.4. miRNA'ların Eş Zamanlı PZR Yöntemi ile Doğrulanmasına Ait Bulgular

miRNA mikrodizin çalışması sonucunda PKOS grubunda normal bireylere göre anlamlı olarak değişiklik gösteren miRNA'lar ile eş zamanlı PZR çalışması yapılmıştır. Mikrodizin çalışması sonucunda yapılan analizlerde hsa-miR-3135b'nin ifadesinin PKOS hastalarında normal bireylere göre 2,33 kat ($p=0,01$), hsa-miR-4417'nin ifadesi ise 2,35 kat artış ($p=0,01$) gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan eş zamanlı PZR sonucunda da PKOS grubunda normal bireylere göre hsa-miR-3135b'nin ifadesinin 2,13 kat artış ($p=0,02$), hsa-miR-4417'nin ifadesinin ise 2.27 kat artış gösterdiği ($p=0,01$) doğrulanmıştır (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. PKOS hastası ve normal bireyler ile gerçekleştirilen eş zamanlı PZR sonucu ifade farklılığı analiz edilen miRNA'ların sonuçları ile çizilen sütun grafiği. hsa-miR-3135b'nin ve hsa-miR-4417'nin ifadesinin PKOS grubunda normal bireylere göre anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir (n=18, $p \leq 0,02$).



Şekil 5.7. PKOS hastaları ve normal bireyler arasında anlamlı olarak artış gösteren ve doğrulanan miRNA'lara ait mikrodizin ve eş zamanlı PZR sonuçlarını gösterir grafik.

5.5. miRNA Hedef Genlerinin Tespiti

Sınıf karşılaştırması sonucunda iki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'lar ile hedef analizine gidilmiştir. miRNA'ların hedefleri biyoinformatik analizler ile tahmini (predicted) olarak tespit edilmektedir. Her miRNA için tahmini hedefler miRDB sitesinden indirilerek saklanmıştır. Çizelge 5.4'te çalışmada anlamlı olarak kat değişimi gösteren her miRNA'nın tahmini hedef gen sayıları verilmektedir.

Çizelge 5.4. Tahmini miRNA hedef gen sayıları

miRNA	Hedef Gen Sayısı
hsa-miR-1587	387
hsa-miR-1909	123
hsa-miR-3135b	527
hsa-miR-3188	234
hsa-miR-4286	950
hsa-miR-4417	217
hsa-miR-4433	312

5.6. miRNA Hedef Genleri ile Gerçekleştirilmiş Yolak Analizlerine Ait Bulgular

İki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösterdiği bulunan 7 miRNA'nın hedef genleri ile yolak analizleri gerçekleştirilmiştir. Her bir miRNA için gerçekleştirilen yolak analiz sonuçları çizelgelerde (Çizelge 5.5, Çizelge 5.6, Çizelge 5.7, Çizelge 5.8, Çizelge 5.9, Çizelge 5.10, Çizelge 5.11) verilmiştir. Ortak yollara bakıldığında granüloza farklılaşması ve yumurta olgunlaşmasında önemli olduğu bilinen ayrıca PKOS'un gelişiminde etkisi olduğu bilinen *insülin sinyal yolağı*, *Wnt sinyal yolağı*, *MAPK sinyal yolağı* ve *TGF- β sinyal yolağının* zenginleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 5.5. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-1587’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Kalsiyum sinyal yolağı	7	0,0366
Hücre adezyon molekülleri	6	0,0366
Kanser yolakları	9	0,0390
Purin metabolizması	6	0,0390
Adipositokin sinyal yolağı	4	0,0390

Çizelge 5.6. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-1909’a ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Kanser yolakları	6	0,0040
MAPK sinyal yolağı	5	0,0040
TGF- β sinyal yolağı	3	0,0049
ErbB sinyal yolağı	3	0,0049
Osteoklast farklılaşması	3	0,0113
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	4	0,0116
Endoplazmik retikulum’da protein işlenmesi	3	0,0185
Adherens junction	2	0,0265
Endositoz	3	0,0265
Apoptoz	2	0,0321

Çizelge 5.7. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-3135b’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Akson yönlendirmesi	12	0,0001
Kemokin sinyal yolağı	12	0,0001
Osteoklast farklılaşması	10	0,0001
Tight junction	9	0,0006
MAPK sinyal yolağı	12	0,0015
Kanser yolakları	13	0,0021
İnsülin sinyal yolağı	8	0,0029
Protein sindirimi ve emilimi	6	0,0035
GnRH sinyal yolağı	6	0,0085
VEGF sinyal yolağı	5	0,0105
Fosfatidilinositol sinyal sistemi	5	0,0109
Metabolik yolaklar	25	0,0109
Fokal adezyon	8	0,0118
Endometrial kanser	4	0,0137
Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	8	0,0158
Hücre adezyon molekülleri	6	0,0186
Melanogenez	5	0,0244
Glioma	4	0,0246
Adipositokin sinyal yolağı	4	0,028
Wnt sinyal yolağı	6	0,0283
Safra sekresyonu	4	0,0289
Jak-STAT sinyal yolağı	6	0,0291
Endositoz	7	0,0291
Karbonhidrat sindirimi ve emilimi	3	0,0376
ECM-reseptör etkileşimi	4	0,0436
Tip II diyabet	3	0,0443
ErbB sinyal yolağı	4	0,0451
Gliserolipid metabolizması	3	0,0473

Çizelge 5.8. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-3188’e ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Wnt sinyal yolağı	7	0,0007
Oosit mayozu	4	0,0227
Malaria	3	0,0227
Melanogenez	4	0,0227
Kanser yolakları	7	0,0227
Bazal hücre kanseri	3	0,0227
Akson yönlendirmesi	4	0,0308
Adherens junction	3	0,0374
Peroksizom	3	0,0416
Tiroid kanseri	2	0,0449

Çizelge 5.9. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi azalan hsa-miR-4286’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Jak-STAT sinyal yolağı	12	0,0129
İnsülin sinyal yolağı	11	0,0129
N-Glikan biyosentezi	6	0,0155
Akson yönlendirmesi	10	0,0155
Fruktoz ve mannoz metabolizması	5	0,0215
Glikoliz	6	0,0290
D-Glutamin ve D-Glutamate metabolizması	2	0,0290
Glikozaminoglikan biyosentezi	4	0,0290
Lizin degradasyonu	5	0,0290
Wnt sinyal yolağı	9	0,0380
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	13	0,0380

Çizelge 5.10. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-4417’ye ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Antijen işlenmesi	9	0,0001
Endositoz	6	0,0038
Aktin hücre iskeletinin düzenlenmesi	6	0,0044
Gap junction	4	0,0051
ErbB sinyal yolağı	4	0,0051
GnRH sinyal yolağı	4	0,0072
MAPK sinyal yolağı	6	0,0083
Endometrial kanser	3	0,0083
İnsülin sinyal yolağı	4	0,0152
VEGF sinyal yolağı	3	0,0160
Wnt sinyal yolağı	4	0,0162
Jak-STAT sinyal yolağı	4	0,0170
Metabolik yollar	12	0,0228
Kalsiyum sinyal yolağı	4	0,0232
Fokal adezyon	4	0,0323
Karbonhidrat sindirimi ve emilimi	2	0,0352

Çizelge 5.11. PKOS’lu hastalarda normal bireylere göre ifadesi artan hsa-miR-4433’e ait tahmini hedeflerin yolak analizi sonuçları

Yolak İsmi	Hedef Gen Sayısı	p-değeri
Hücre döngüsü	5	0,0318
Kalsiyum sinyal yolağı	6	0,0318
Metabolik yollar	18	0,0318

miRNA’ların tahmini hedeflerinin ağırlıklı olarak rol aldıkları hedefler tespit edilmiştir. Sonuç olarak PKOS’la daha önce ilişkilendirilmiş olan yollarla rol alan genlerin eş-zamanlı PZR ile doğrulanan hsa-miR-3135b ve hsa-miR-4417’nin tahmini hedefleri arasında bulundukları tespit edilmiştir (Çizelge 5.12).

Çizelge 5.12. Tahmini miRNA hedeflerinin ortak olarak rol aldıkları yollar ve yollarda bulunan hedef gen sayıları

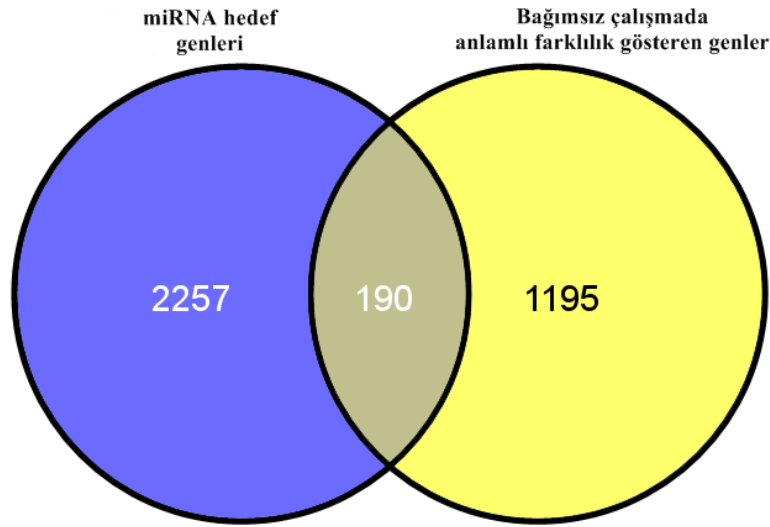
	hsa-miR-1587	hsa-miR-1909	hsa-miR-3135b	hsa-miR-3188	hsa-miR-4286	hsa-miR-4417	hsa-miR-4433
MAPK sinyal yolağı		5	12			6	
TGF- β sinyal yolağı		3					
İnsülin sinyal yolağı			8		11	4	
Wnt sinyal yolağı			6	7	9	4	
GnRH sinyal yolağı			6			4	
Jak-STAT sinyal yolağı			6		12	4	
VEGF sinyal yolağı			5			3	
Kalsiyum sinyal yolağı	7					4	6
Osteoclast farklılaşması		3	10				
Tip II diyabet			3				
Oosit mayozu				4			
Glikozaminoglikan biyosentezi					4		
Metabolik yollar			25			12	18
Hücre döngüsü							5
Endometrial kanser			4			3	
Karbonhidrat sindirimi ve emilimi			3			2	
Gliserolipid metabolizması			3				
ECM-reseptör etkileşimi			4				

5.7. miRNA Hedef Genlerinin Biyoinformatik Olarak Doğrulanmasına Ait Bulgular

miRNA hedef genlerinin *in-silico* doğrulama çalışmasının gerçekleştirilmesi için PKOS ve normal bireylerin çalışıldığı mRNA mikrodizin çalışmaları araştırılmıştır. Literatür taraması sonucunda GEO ve ArrayExpress veritabanlarında aynı erişim numarasına sahip olan GSE34526 veri setinin PKOS hastaları ve normal bireylere ait granüloza hücreleri kullanılarak mRNA ifade çipiyle (Affymetrix® GeneChip HG-U133 Plus 2.0) yapılmış tek çalışma olduğu tespit edilmiştir. İlgili veri 7 PKOS hastası ve 3 normal bireye ait ifade mikrodizin verisinden oluşmaktadır.

GSE34526 veri seti indirilerek BRB-ArrayTools programına yüklenmiştir. Gen ifade verileri 2 grup arasında (PKOS hastası ve normal bireyler) karşılaştırılarak farklılık gösteren (1,5 kat ve üzeri) 1385 gen tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

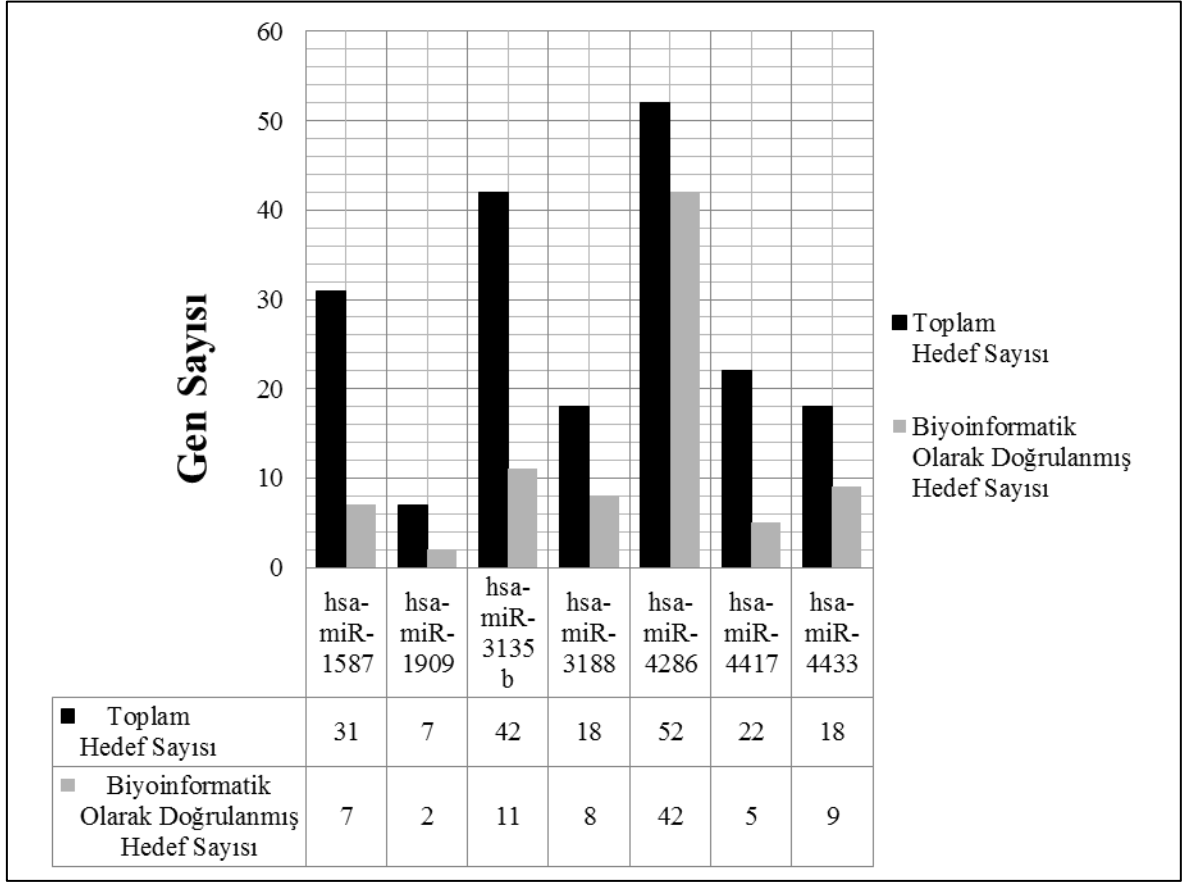
Anlamli olarak farklılık gösterdiği tespit edilen 7 adet miRNA'nın miRDB sitesinden indirilen toplam hedefleri (2447 gen) ile bağımsız çalışmanın (GSE34526) analizi sonucunda anlamli olarak farklılık gösteren genler (1385 gen) VENNY programı ile kesiştirilmiş ve 190 adet ortak gen tespit edilmiştir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. miRNA hedef genleri ile bağımsız çalışmada farklılık gösteren genleri ve iki grubun ortaklarını gösterir venn şeması. miRNA hedefleri ile bağımsız çalışmada farklılık gösteren genler arasında 190 adet gen ortak olarak tespit edilmiştir.

Tespit edilen ortak genlerin bağımsız çalışmada iki grup arasındaki değişimi (artış ya da azalış) hedef olduğu miRNA'nın tez çalışmasındaki değişimi (artış ya da azalış) ile karşılaştırılmıştır. miRNA'ların hedefledikleri mRNA'ların ifade düzeyini azaltarak etki ettikleri göz önünde bulundurulduğunda tez çalışmasında tespit edilen miRNA ifadesinin artması durumunda bağımsız çalışmada tespit edilen hedeflerin ifadesinin azalması, miRNA ifadesinin azalışı durumunda ise mRNA ifadesinin artması beklenmektedir. Bu doğrultuda 190 ortak hedefin (toplam hedef) bağımsız çalışmada iki grup arasındaki değişimi, miRNA değişimi ile karşılaştırılmıştır. miRNA ifadesi ile ters ifade değişimi

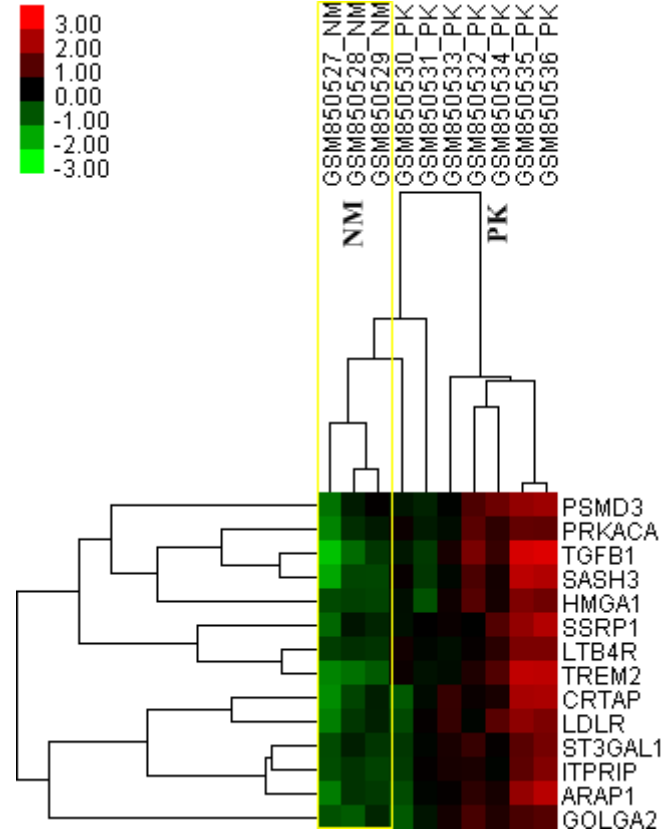
gösteren mRNA'lar (biyoinformatik olarak doğrulanmış hedefler), potansiyel hedef genler (84 gen) olarak seçilmiştir (Şekil 5.9).



Şekil 5.9. miRNA hedef genleri ile indirilen veride anlamlı olarak farklılık gösteren genlerin ortakları (toplam hedefler) ve miRNA ifade değişimine uygun olarak değişim gösteren genleri (biyoinformatik olarak doğrulanmış hedefleri) gösterir grafik

Tüm miRNA hedef genlerine ve doğrulanma sayılarına bakıldığında en yüksek sayıda doğrulanmış tahmini hedeflerin hsa-miR-4286'ya ait olduğu dikkat çekmektedir. Mikrodizin çalışması sonucunda PK grubunda NM grubuna göre ifadesi azalan tek miRNA olan hsa-miR-4286'ya ait biyoinformatik olarak doğrulanmış hedef genlerin bir kısmı ile GSE34526 veri seti üzerinde hiyerarşik kümeleme analizi yapılmıştır (Şekil 5.10). Kümeleme analizi sonucunda öncelikle PKOS'ta azalan hsa-miR-4286'nın hedeflerinin beklendiği gibi PKOS'ta arttığı ve bu hedef genlerin normal örnekleri PKOS'lu örneklerden net bir şekilde ayırdığı gözlenmiştir. İfadesi PKOS'ta artış gösteren hedef genler incelendiğinde bu

genlerin özellikle PKOS'un gelişiminde etkisi olduğu gösterilmiş insülin sinyal yolağı (PRKACA), ovaryuma ait steroidogenez yolağı (LDLR) ve TGF- β sinyal yolağında (TGFB1) rol aldıkları dikkat çekmektedir.



Şekil 5.10. PKOS hastalarında normal gruba göre ifadesi azalan hsa-miR-4286'nın hedeflerinin bağımsız çalışmada PKOS hastalarında (PK) normal gruba (NM) göre ifade artışını gösterir heatmap. Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir.

İki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'ların ve biyoinformatik olarak doğrulanmış hedef genlerin hizalama (alignment) ve mirSVR skorlarının hesaplanması için microrna.org veritabanı kullanılmıştır (Şekil 5.11).

hsa-miR-4286/LDLR Alignment	
3' ccAUGGUCCUCACCCCa 5' hsa-miR-4286 : 2131:5' ugUACAGAUAGUGGGGa 3' LDLR	mirSVR score: -0.6838 PhastCons score: 0.5036
hsa-miR-4286/PRKACA Alignment	
3' ccaUGGUCCUCACCCCa 5' hsa-miR-4286 : : 1286:5' cagGCCUGGGGUGGGGc 3' PRKACA	mirSVR score: -0.0005 PhastCons score: 0.6019
hsa-miR-4286/TGFB1 Alignment	
3' ccaugguccUCACCCCa 5' hsa-miR-4286 271:5' caggggaccAGUGGGGa 3' TGFB1	mirSVR score: -0.1096 PhastCons score: 0.4572

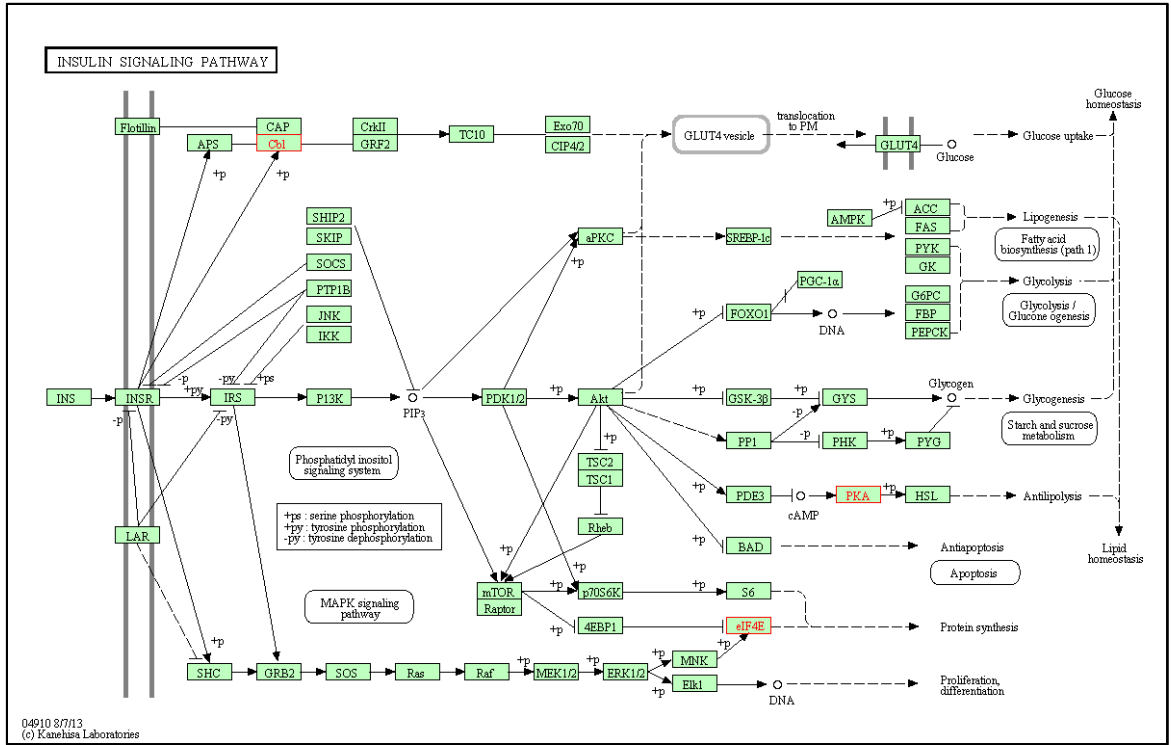
Şekil 5.11. hsa-miR-4286'nin biyoinformatik olarak doğrulanan hedeflerinin bazılarına (LDLR, PRKACA, TGFB1) ait hizalama analizi sonuçları ve mirSVR skorları

5.7.1. Doğrulanmış miRNA hedeflerinin yer aldığı yollar

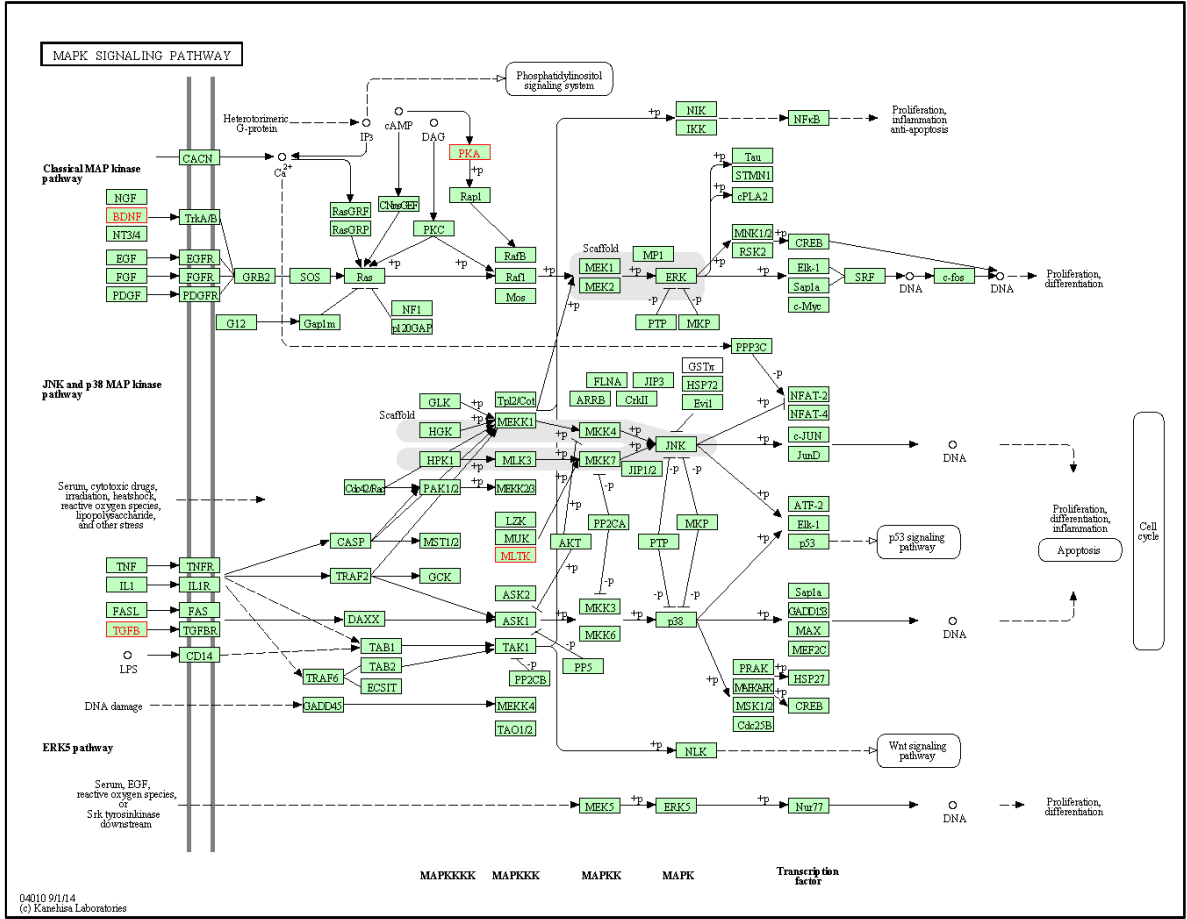
Biyoinformatik olarak doğrulanmış miRNA hedeflerinin rol aldığı yollar web tabanlı WebGestalt yollar analiz programı kullanılarak KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) (69) ve WikiPathways (<http://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways>) (70) veritabanları üzerinde tespit edilmiştir. Analiz sonucunda biyoinformatik olarak doğrulanmış miRNA hedeflerinin literatürde daha önce de PKOS ile ilişkisi gösterilmiş FSH sinyal yolağı, insülin sinyal yolağı (Şekil 5.12), MAPK sinyal yolağı (Şekil 5.13), TGF- β sinyal yolağı ve immün sistem cevabının oluşmasında rol oynayan yollarda yer aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 5.13).

Çizelge 5.13. Doğrulanmış hedeflerin yer aldığı yolak isimleri, yolaklarda rol alan gen sayıları ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri (p-değerleri)

Yolak İsmi	Gen Sayısı	p-değeri
Sitokin-sitokin reseptör etkileşimi	5	0,004
Endositoz	4	0,006
Osteoclast farklılaşması	3	0,007
MAPK sinyal yolağı	4	0,007
İnsülin sinyal yolağı	3	0,008
Jak-STAT sinyal yolağı	3	0,009
Kemokin sinyal yolağı	3	0,014
Safra sekresyonu	2	0,016
TGF- β sinyal yolağı	2	0,018
IL-3 sinyal yolağı	3	0,001
FSH sinyal yolağı	2	0,005
İnterferon tip 1	3	0,001



Şekil 5.12. Doğrulanmış miRNA hedefleri arasında yer alan PRKACA, Cb1 ve eIF4E genlerinin KEGG yolak analiz sonucu (İnsülin sinyal yolağı, p=0,0076). miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.



Şekil 5.13. Doğrulanmış miRNA hedefleri arasında yer alan BDNF, TGFB, MLTK ve PRKACA genlerinin KEGG yolak analiz sonucu (MAPK sinyal yolağı, p=0,0072). miRNA hedefleri kırmızı ile gösterilmektedir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. Tartışma

Anovulatuvar infertilitenin en sık rastlanan sebeplerinden biri olan polikistik over sendromu (PKOS), kadınların ortalama %8-18'ini etkileyen ve infertiliteye de sebep olan bir endokrin hastalıdır ve hirsutizm, obezite, insulin direnci ve hiperinsülinemi ile alaka gösterdiği bilinmektedir (25). PKO vakalarının ailesel dağılımları incelendiğinde sendromun sebebinde genetik faktörlerin rol alabileceğine dikkat çekmektedir. Son yıllarda hızla gelişen yüksek işlem hacimli mikrodizin teknikleri (mikrodizin, yeni nesil sekanslama) PKOS'un moleküler boyutta incelenmesine olanak sağlamıştır. Oosit gelişiminde oosit hücresinin ve teka hücreleri ve granüloza hücreleri gibi somatik hücrelerin oluşturduğu mikroçevrenin birbirine olan etkisi bilinmektedir. Bu bilgi ışığında gerçekleştirilen moleküler çalışmalarda gerek oosit hücresi gerekse granüloza ve teka hücreleri deney materyali olarak kullanılmıştır ve moleküler farklılıklar araştırılmıştır. Bugüne kadar yapılan mikrodizin çalışmalarında 50'den fazla aday genin hastalık ile ilişkisi saptanmış ancak hiçbirinin doğrudan rolü ispatlanamamıştır (71–73). Mutasyon analizleri, bağlantı analizleri ve hasta-kontrol çalışmaları bu yollardaki PKOS'tan sorumlu genleri bulmak için kullanılmıştır. Yapılan çalışmalar PKOS'un patojenitesindeki asıl elemanları bulmaya yeterli olmamıştır. PKOS'un kompleks ve heterojen yapısı hastalığın sebebine birçok genin birlikte sebep olabileceğine işaret etmektedir.

miRNA'ların yumurtalık dokusundaki ifade düzeyleri ve fonksiyonları yeni yeni aydınlatılmaya başlanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda granüloza hücrelerinde ifade edilen ancak fonksiyonu bilinmeyen birkaç miRNA bulunmuş ve seçilen bazı miRNA'ların hormon ile uyarıldığında ifadelerinde farklılıklar gözlenmiştir (74–76). Bu bulgular miRNA'ların yumurtalık dokusunda ve oosit hücrelerinde hormonların etkisi altında olabileceğine dikkat çekmektedir. Ayrıca miRNA biyogenezinde kilit bir role sahip olan Dicer 1 proteininin, yumurtalık dokusunda delesyona uğratıldığı fare çalışmalarında yumurtalık fonksiyonunun ve ovulasyon oranının azaldığı (77) ve infertilitenin arttığı (78) gözlenmiştir. Bu bulgular miRNA'ların yumurtalık fonksiyonunda, yumurta gelişiminde ve

infertilitede etkin rol alabileceğini işaret etmektedir. PKOS ile ilgili bugüne kadar yapılan moleküler çalışmalarda, oosit mikroçevresinde çok önemli düzenleyici rolü olan granüloza hücrelerinin miRNA profillemesi yapılmamıştır ve PKOS ile normal durumlar arasında farklılık ortaya konmamıştır. **Bu çalışma PKOS ve normal bireylerin granüloza hücrelerindeki miRNA profilini ortaya koyan ilk çalışmadır.**

PKOS spesifik miRNA'lar ve hedefledikleri yollar

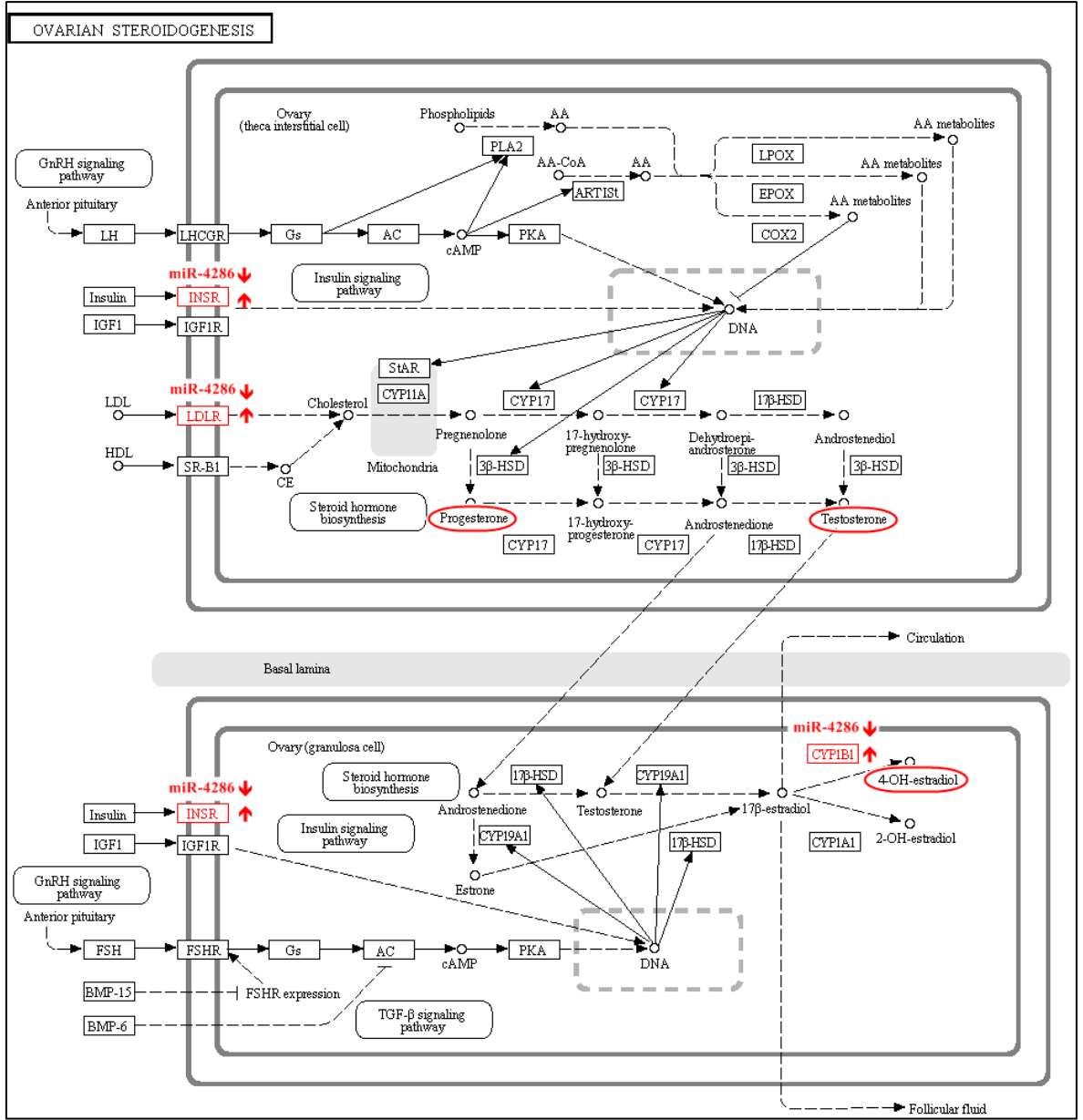
14 PKOS hastası ve 9 normal bireyden toplanan granüloza hücreleri ile gerçekleştirilen mikrodizin çalışması sonucunda PKOS'ta normal bireylere göre ifadesi farklılık gösteren 7 adet miRNA saptanmıştır (hsa-miR-3188, hsa-miR-4417, hsa-miR-3135b, hsa-miR-1909, hsa-miR-4433, hsa-miR-1587, hsa-miR-4286). Bu miRNA'lerden 6 tanesinin ifadesi artarken yalnızca bir tanesinin ifadesinin azaldığı gözlenmiştir (hsa-miR-4286). PK grubunda NM grubuna göre ifadesi farklılık gösteren miRNA'ların kat değişimleri 1,71 ile 2,43 arasında değişmektedir. miRNA ifadelerinde gözlenen kat değişimleri incelendiğinde çok az kat değişimlerinin bile önemli olduğu bilinmektedir (79). Mikrodizin sonucunda ifadesi anlamlı olarak farklılık gösterdiği bulunan 2 adet miRNA (hsa-miR-3135b ve hsa-miR-4417) eş zamanlı PZR ile doğrulanmıştır. Eş zamanlı PZR ile doğrulanan miRNA'ların kat değişimlerinin mikrodizin çalışması ile çok yakın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.7).

miRNA'lara ait tahmini hedefler bağımsız çalışma ile karşılaştırılmış ve 190 hedef genin bağımsız çalışmada anlamlı olarak farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu hedeflerin iki grup arasındaki değişimleri ile miRNA'ların iki grup arasındaki değişimleri karşılaştırıldığında hedeflerin miRNA'lara göre ters ifade göstermesi beklenmektedir. 190 hedeften 84 tanesi miRNA'lara ters ifade gösterdiği için biyoinformatik olarak doğrulanan hedefler olarak saptanmıştır. Biyoinformatik olarak doğrulanan olası 84 hedeften 42 tanesinin hsa-miR-4286'nın olası hedefi olduğu tespit edilmiştir. Bu hedeflerden TGFB1, LDLR, CYP11B1 ve PRKACA genlerinin bağımsız çalışmada da doğrulanması çalışmanın güvenilirliği açısından önem taşımaktadır. hsa-miR-4286'nın olası hedefi olan bu genlerin ovaryumlarda steroid hormonların sentezi, lipid metabolizmasının düzenlenmesi ve

ovaryum stromasını oluşturan moleküllerin düzenlenmesi gibi fonksiyonları olduğu bilinmektedir.

miRNA'ların hedeflerinin 3' UTR bölgelerine bağlanarak hedeflerini mRNA ya da protein seviyesinde baskıladığı sürecinden yola çıkarak her zaman olmasa da çoğunlukla ifadesi azalan miRNA'ların hedeflerinin ifadesinin artması beklenebilir. Bu bilgi doğrultusunda hsa-miR-4286'nın PKOS grubunda azalan ifadesi nedeniyle tahmini hedefleri arasında bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünün (LDLR) ifadesinin arttığı tahmin edilmektedir. Bu reseptör teka hücrelerinde erkeklik hormonu olan testosteronun üretilme mekanizmasının ilk basamağında bulunmaktadır. Teka ve granüloza hücreleri birbirleri ile sıkı etkileşim halindedir. Reseptörün hücre zarında fazla bulunması ve genellikle PKOS ile birlikte görülebilen LDL yüksekliği (80) nedeniyle ilgili yolağın sürekli açık kalarak normal durumdan fazla miktarda testosteron hormonu üretebileceği ve granüloza hücrelerindeki hsa-miR-4286 ifadesindeki düşüşün bu duruma neden olabileceği ve PKOS'un en önemli kriterlerinden biri olarak görülen hiperandrojenizm durumunun bu nedenle ortaya çıkabileceği düşünülebilir (Şekil 6.1).

İfadesi PKOS grubunda azalan hsa-miR-4286'nın olası hedefi olan, granüloza hücre zarında bulunan insülin reseptörünün (INSR) ifadesindeki artış genellikle PKOS ile birlikte görülebilen hiperinsülinemi (81) ile birlikte granüloza hücrelerinde insülin sinyal yolağının aktivitesini artırabilir. Granüloza hücrelerinde insülin sinyal yolağı androjenlerin östrojene dönüşümünü indüklemektedir. Aynı miRNA nedeniyle LDLR artışı aracılığıyla androjen sentezinin olası artışı da bu durumu desteklemektedir. Yine hsa-miR-4286'nın olası hedefi olan cAMP bağımlı protein kinaz alfa enzimini kodlayan PRKACA geni, ön hipofizden yüksek östrojen etkisi ile salgılanan FSH hormonunun granüloza hücresi üzerindeki etkisi ile indüklenerek östrojen üretimini artırıcı yönde etki etmektedir. hsa-miR-4286 ifadesindeki düşüş nedeniyle dolaylı olarak gerçekleşebilecek PRKACA geninin ifadesindeki artış kandaki östrojen seviyesinin belirli bir seviyenin altına inmemesinin nedenleri arasında gösterilebilir. PRKACA geninin yüksek ifadesi ile östrojen-FSH hormonlarının birbirlerinin sentezini kısır bir döngü içerisinde artırdıkları düşünülebilir (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Ovaryumda steroid hormonlarının sentez yolağı. Yolakta miRNA'lar ve olası hedef ifadelerinin değişim durumları kırmızı ile gösterilmektedir.

PRKACA geni insülin sinyal yolağında lipid metabolizmasının ve iç dengesinin düzenlenmesi ile ilgili basamakta da rol oynamaktadır. PRKACA geninin yüksek ifadesi antilipolizi (yağ hücrelerinde lipidlerin yıkılmamasını) indüklemektedir. miRNA'ların kan ve diğer vücut sıvılarına veziküller içinde salınabildikleri göz önünde bulundurulduğunda (82) granuloza hücrelerinde ifadesi değişen hsa-miR-4286'nın yağ hücrelerindeki

PRKACA geni ifadesini etkileyebileceği akla gelmektedir (Şekil 6.3). Obezite ve PKOS arasındaki ilişki henüz tam anlamıyla açıklanamamaktadır ancak PKOS hastası bireylerde yüksek sıklıkla obezite gözlenmektedir (81). hsa-miR-4286 ve olası hedefi olan PRKACA geninin lipid mekanizmaları üzerindeki etkilerinin incelenmesi PKOS-obezite ilişkisinin aydınlatılması için önem taşımaktadır. Bağımsız çalışma ile yapılan analiz sonucunda PKOS hastalarında PRKACA geninin ifadesinde artış gözlenmektedir. Bu durum miRNA-hedef ilişkisini güçlendirmektedir.

Şekil 6.2. İnsülin sinyal yolağı. Yolakta miRNA’lar ve olası hedef ifadelerinin değişim durumları kırmızı ile gösterilmektedir.

TGF- β sinyal yolağının PKOS'un gelişmesinde kilit role sahip mekanizmalardan biri olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda yolaktaki düzensizlikler sonucu ovaryumlarda artan kollajen miktarı ile stromal dokunun arttığı, sertleştiği ve fibrozisin geliştiği gözlemlenmiştir (83). Stromadaki sertleşme arttığında ise gelişen foliküllerin çatlayamama sorunları yaşadıkları tespit edilmiştir (84). Bu durum PKOS'ta önemli rol oynayan TGF- β 'nın anovulasyon ile bağlantısını göstermektedir. PKOS grubunda ifadesi azalan hsa-miR-4286'nın olası hedeflerinden olan TGFB1 bu yolağın ilk basamağında yer almaktadır. Bu miRNA tarafından hedeflendiği tahmin edilen TGFB1 geninin ve dolayısıyla bütün sinyal yolağının hsa-miR-4286 ifadesindeki azalıştan etkilenerek düzensizleştiği düşünülebilir. Bu bilgiler ışığında ovaryum stromasındaki değişimler ve kollajen birikimi sonucunda PKOS'ta karşımıza çıkan anovulasyonun nedenlerinden bir tanesinin hsa-miR-4286 ifadesindeki değişim olduğu akla gelmektedir.

Gonadotropinlerin (FSH ve LH) salgılanma mekanizmaları da TGF- β sinyal yolağındaki düzensizliklerden etkilenir ve PKOS-anovulasyon durumları ile bağlantılı olabilecek potansiyele sahiptir. Gonadotropinlerin sürekli salgısı anovulasyonla sonuçlanmaktadır. TGF- β sinyal yolağındaki düzensizliklerin insülin direnci, tip 2 diyabet ve artan glikoz intoleransı gibi metabolik sorunlarla da ilişkisi tespit edilmiştir. Bu sorunlar genelde PKOS ile birlikte görülebilmektedir ve bu durum PKOS-insülin direnci-TGF- β ilişkisini desteklemektedir. PKOS ve insülin direnci arasındaki neden sonuç ilişkisi aydınlatılamamakla birlikte yüksek bir korelasyona sahip oldukları bilinmektedir (83). Bu bilgiler doğrultusunda bu iki metabolik sorun ve sürekli gonadotropin salgısı sonucu anovulasyon; TGF- β sinyal yolağındaki düzensizlikler ve bu yolakta rol alan TGFB1'i hedefleyen hsa-miR-4286 ile ilişkilendirilebilir.

Angiotensin II reseptörü olan AGTR2'nin ifadesindeki artış akciğer gibi farklı dokularda fibrozis ile ilişkilendirilmektedir (85). hsa-miR-4286'nın olası hedefi olan AGTR2'nin ovaryum stromasındaki olası ifade artışı ile stromanın fibrotik bir yapı kazanmasında rol oynadığı ve bu nedenle anovulasyona neden olabileceği düşünülebilir.

Heparan sülfat (HS) gibi glikozaminoglikanlar (GAG) ovaryum stroması, endometriyumun ekstrasellüler matriksi (ECM) gibi dişi üreme sistemini oluşturan ekstrasellüler yapılarda yer almakta ve üremede rol oynamaktadırlar (86). PKOS'ta endometriyal ECM'de HS seviyesindeki değişiklikler sonucunda, ECM yapısının bozulduğu bu nedenle de endometriyumda fonksiyonel bozuklukların meydana geldiği bilinmektedir (87). HS granüloza hücreleri tarafından salgılanmaktadır (86). N-sülfotransferaz enzimini kodlayan NDST geni ve heparan sülfat 6-O sülfotransferaz 1 enzimini kodlayan HS6ST1 geni hsa-miR-4286'nın olası hedefleri arasında bulunmaktadır. Granüloza hücrelerinde ifadesi değişen hsa-miR-4286'nın endometriyum ECM'sindeki, ovaryum stromasındaki ve folikül sıvısındaki HS seviyesini etkileyebileceği söylenebilir. Ovaryum stromasındaki değişim sonucu anovulasyon görülebilir. Bu durum PKOS ile birlikte görülen infertilite ile ilişkilendirilebilmektedir. Yine endometriyumun yapısındaki bozulmalar nedeniyle ovulasyon gerçekleşse ve dölleme gerçekleşse dahi embriyonun endometriyuma tutunamaması sonucunda infertilite görülebilir.

PKOS'ta normal bireylere göre ifadesinin artış gösterdiği belirlenen hsa-miR-1587'nin olası hedefleri arasında yer alan BDNF geni, hsa-miR-4417'nin olası hedefi olan SOS1 geni ve hsa-miR-3135b'nin olası hedefleri olan MRAS, ELK1, SRF genleri ve hem hsa-miR-3135b'nin hem de hsa-miR-4433'ün olası hedefi olan NTRK2 geni MAPK sinyal yolağında yer almakta ve hücre farklılaşmasında rol oynamaktadırlar. Yapılan eş zamanlı PZR çalışması sonucunda da hsa-miR-4417 ve hsa-miR-3135b ifadelerinin PKOS grubunda normal gruba göre ifadesinin arttığı doğrulanmıştır. Folikül olgunlaşması sırasında granüloza hücrelerinin farklılaşma durumları göz önüne alındığında artan hsa-miR-1587, hsa-miR-4417 ve hsa-miR-3135b ifadeleri nedeniyle bu gen ifadelerinin olası düşüşünün granüloza hücrelerinin farklılaşmasının azalması (diferensiye olamamaları) ve PKOS'ta foliküllerin olgunlaşmaması ile ilişkilendirilebileceği söylenebilir (Şekil 6.3).

The diagram illustrates the MAPK signaling pathway, showing the flow from various growth factors (NGF, BDNF, NT3/4, EGF, FGF, PDGF) through receptors (TrkA/B, EGFR, FGFR, PDGFR) to the Ras/MAPK cascade. Key components include Ras, Raf, MEK, ERK, and downstream effectors like CREB, Elk-1, and c-fos. The diagram also shows the involvement of the Phosphatidylinositol signaling system (IP3, DAG, PKA, Ral) and the role of microRNAs (miR-4433, miR-3135b, miR-4417, miR-1587) in regulating various steps. The final outcome is Proliferation and differentiation.

6.2. Sonuç

Bu çalışma sonucunda;

- PKOS hastası ve normal bireylerden elde edilen granüloza hücrelerinin miRNA profili çıkartılmış ve iki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'lar tespit edilmiştir.
- PKOS'ta ifadesi artış gösteren 2 adet miRNA (hsa-miR-3135b ve hsa-miR-4417) eş zamanlı PZR yöntemi ile doğrulanmıştır.
- Farklılık gösteren miRNA'ların hedeflediği genler bulunmuş, yolak analizleri gerçekleştirilmiş ve bağımsız bir mikrodizin verisi ile biyoinformatik olarak doğrulanmıştır.
- İki grup arasında anlamlı olarak farklılık gösteren miRNA'ların tahmini hedeflerinin PKOS gelişiminde ve infertilitede önemi bilinen insülin sinyal yolağında, TGF- β sinyal yolağında, MAPK sinyal yolağında ve steroidogenez yolaklarında rol aldıkları tespit edilmiştir.
- İfadesi anlamlı olarak değişen miRNA'lara ait tahmini hedeflerin bazılarının PKOS ile birlikte görülebilen insülin direnci ve lipid metabolizmasının bozulması gibi metabolik sorunlarla ilgili yolaklarda rol aldıkları tespit edilmiştir.
- PKOS gelişiminde rolü olduğu bilinen pek çok geni hedefleyen ve PKOS'ta normal bireylere göre ifadesi azalan tek miRNA olarak tespit edilen miR-4286 PKOS tanısı ve gelişimi için potansiyel belirteç miRNA adayı olarak belirlenmiştir.
- Bağımsız çalışma kullanılarak yapılan analizler sonucunda folikül olgunlaşması ve ovulasyonda görev alan BDNF geninin (miR-1587'nin tahmini hedefi) ifadesinin PKOS grubunda normal bireylere göre azalması ile biyoinformatik olarak PKOS grubundaki artışı doğrulanan hsa-miR-1587'nin folikül gelişimindeki aksamalara neden olabileceği ve anovulasyonda rol oynayabileceği gösterilmiştir.

İleride yapılması düşünölen çalışmalar aşağıda sıralanmıştır;

- PKOS hastası ve normal birey sayısı arttırılacaktır.
- Seçilecek olan miRNA hedef genleri eř zamanlı PZR ile doğrulanacaktır.
- Seçilecek olan hedef proteinler Western Blot tekniği ile doęrulanacaktır.
- İfadesi azalan tek miRNA olan miR-4286 ve eř zamanlı PZR ile doğrulan ve ifadesi artış gösteren miR-3135b ve miR-4417 ile fonksiyonel çalışmalar gerçekleştirilecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky P V, B JR. *Campbell Biology*. 10th ed. (Wilbur B, ed.). San Francisco: Benjamin Cummings; 2013:1488.
2. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update*. 2005;11(5):461–71.
3. Skinner MK, Schmidt M, Savenkova MI, Sadler-Riggelman I, Nilsson EE. Regulation of granulosa and theca cell transcriptomes during ovarian antral follicle development. *Mol. Reprod. Dev*. 2008;75(9):1457–72.
4. Hennet ML, Combelles CMH. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int. J. Dev. Biol*. 2012;56(10-12):819–31.
5. Magoffin DA. Ovarian theca cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2005;37(7):1344–9.
6. Wickenheisser JK, Nelson-DeGrave VL, McAllister JM. Human ovarian theca cells in culture. *Trends Endocrinol. Metab*. 2006;17(2):65–71.
7. Webb R, Garnsworthy PC, Gong J-G, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci*. 2004;82 E-Suppl:E63–74.
8. Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL. Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology*. 1987;121(2):786–92.
9. Richards JS, Midgley AR. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod*. 1976;14(1):82–94.
10. Berger JJ, Bates GW. Optimal management of subfertility in polycystic ovary syndrome. *Int. J. Womens. Health*. 2014;6:613–21.
11. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, Escobar-Morreale HF. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum. Reprod. Update*. 2014;20(3):334–52.

12. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, Kelestimur F, Macut D, Micic D, Pasquali R, Pfeifer M, Pignatelli D, Pugeat M, Yildiz BO. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur. J. Endocrinol.* 2014;171(4):P1–29.
13. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1935;29:181–191.
14. Daniilidis A, Dinas K. Long term health consequences of polycystic ovarian syndrome: a review analysis. *Hippokratia.* 2009;13(2):90–2.
15. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2007;8(2):127–41.
16. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil. Steril.* 2012;97(1):2–6.
17. Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 2007;3(2):103–11.
18. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr. Rev.* 2005;26(2):251–82.
19. Abbott DH, Barnett DK, Bruns CM, Dumesic DA. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum. Reprod. Update.* 2005;11(4):357–74.
20. Ezech U, Yildiz BO, Azziz R. Referral bias in defining the phenotype and prevalence of obesity in polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(6):E1088–96.
21. Huang A, Brennan K, Azziz R. Prevalence of hyperandrogenemia in the polycystic ovary syndrome diagnosed by the National Institutes of Health 1990 criteria. *Fertil. Steril.* 2010;93(6):1938–41.

22. Azziz R, Tarlatzis R, Dunaif A, Ibanez L, Pugeat M, Taylor A, Fauser CJM, Medicine R. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* 2004;81(1):19–25.
23. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, Janssen OE, Legro RS, Norman RJ, Taylor AE, Witchel SF. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil. Steril.* 2009;91(2):456–88.
24. Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med.* 2010;8:41.
25. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin. Epidemiol.* 2013;6:1–13.
26. Goldberg JM, Falcone T, Attaran M. In vitro fertilization update. *Cleve. Clin. J. Med.* 2007;74(5):329–338.
27. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim. Biophys. Acta.* 2010;1803(11):1231–43.
28. Wightman B, Bürglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev.* 1991;5(10):1813–24.
29. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993;75(5):843–54.
30. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993;75(5):855–62.
31. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000;403(6772):901–6.

32. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86–9.
33. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862–4.
34. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci*. 2010;101(11):2309–15.
35. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415–9.
36. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95–8.
37. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002;21(21):5875–85.
38. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 2001;409(6818):363–6.
39. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*. 2005;123(4):631–40.
40. Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, Gordon A, Perrimon N, Hannon GJ. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol. Cell*. 2009;36(3):445–56.
41. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol. Cell*. 2010;38(3):323–32.

42. Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, Chen KC, Lai EC. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA*. 2011;17(2):312–26.
43. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
44. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Curr. Top. Med. Chem.* 2013;13(13):1493–502.
45. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 2008;9(2):102–14.
46. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 2004;5(7):522–31.
47. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, Xing Q, Jin L, He L, Wu L, Wang L. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2013;98(7):3068–79.
48. Roth LW, McCallie B, Alvero R, Schoolcraft WB, Minjarez D, Katz-Jaffe MG. Altered microRNA and gene expression in the follicular fluid of women with polycystic ovary syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2014;31(3):355–62.
49. Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT. MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes (Basel)*. 2014;5(3):684–708.
50. Yulug IG, Gur-Dedeoglu B. Functional genomics in translational cancer research: focus on breast cancer. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 2008;7(1):1–7.
51. Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. *Nature*. 2002;416(6883):885–91.
52. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014;15(8):509–24.

53. Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. *Cancer Inform.* 2007;3(301):11–7.
54. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003;4(2):249–64.
55. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95(25):14863–8.
56. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics.* 2004;20(17):3246–8.
57. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann. Math. Stat.* 1947;18(1):50–60.
58. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;10(6):R64.
59. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8.
60. Wang X, El Naqa IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics.* 2008;24(3):325–32.
61. Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA.* 2008;14(6):1012–7.
62. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W77–83.
63. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(1):207–10.

64. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, Farne A, Hastings E, Ison J, Keays M, Kurbatova N, Malone J, Mani R, Mupo A, Pedro Pereira R, Pilicheva E, Rung J, Sharma A, Tang YA, Ternent T, Tikhonov A, Welter D, Williams E, Brazma A, Parkinson H, Sarkans U. ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Database issue):D987–90.
65. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. 2007. Available at: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>.
66. Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Database issue):D149–53.
67. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 2010;11(8):R90.
68. Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnol.* 2009;9:102.
69. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):27–30.
70. Kelder T, van Iersel MP, Hanspers K, Kutmon M, Conklin BR, Evelo CT, Pico AR. WikiPathways: building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(Database issue):D1301–7.
71. Kaur S, Archer KJ, Devi MG, Kriplani A, Strauss JF, Singh R. Differential gene expression in granulosa cells from polycystic ovary syndrome patients with and without insulin resistance: identification of susceptibility gene sets through network analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012;97(10):E2016–21.
72. Wood JR, Ho CKM, Nelson-Degrave VL, McAllister JM, Strauss JF. The molecular signature of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells defined by gene expression profiling. *J. Reprod. Immunol.* 2004;63(1):51–60.

73. Wood JR, Nelson VL, Ho C, Jansen E, Wang CY, Urbanek M, McAllister JM, Mosselman S, Strauss JF. The molecular phenotype of polycystic ovary syndrome (PCOS) theca cells and new candidate PCOS genes defined by microarray analysis. *J. Biol. Chem.* 2003;278(29):26380–90.
74. Suh N, Baehner L, Moltzahn F, Melton C, Shenoy A, Chen J, Blelloch R. MicroRNA function is globally suppressed in mouse oocytes and early embryos. *Curr. Biol.* 2010;20(3):271–7.
75. Ma J, Flemr M, Stein P, Berninger P, Malik R, Zavolan M, Svoboda P, Schultz RM. MicroRNA activity is suppressed in mouse oocytes. *Curr. Biol.* 2010;20(3):265–70.
76. Fiedler SD, Carletti MZ, Hong X, Christenson LK. Hormonal regulation of MicroRNA expression in periovulatory mouse mural granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2008;79(6):1030–7.
77. Hong X, Luense LJ, McGinnis LK, Nothnick WB, Christenson LK. Dicer1 is essential for female fertility and normal development of the female reproductive system. *Endocrinology.* 2008;149(12):6207–12.
78. Nagaraja AK, Andreu-Vieyra C, Franco HL, Ma L, Chen R, Han DY, Zhu H, Agno JE, Gunaratne PH, DeMayo FJ, Matzuk MM. Deletion of Dicer in somatic cells of the female reproductive tract causes sterility. *Mol. Endocrinol.* 2008;22(10):2336–52.
79. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA.* 2008;14(5):844–52.
80. Wild RA. Dyslipidemia in PCOS. *Steroids.* 2012;77(4):295–9.
81. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002;26(7):883–96.
82. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin. Chem.* 2014;61(1).

83. Raja-Khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS. The role of TGF- β in polycystic ovary syndrome. *Reprod. Sci.* 2014;21(1):20–31.
84. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials.* 2007;28(30):4439–48.
85. Königshoff M, Wilhelm A, Jahn A, Sedding D, Amarie OV, Eul B, Seeger W, Fink L, Günther A, Eickelberg O, Rose F. The angiotensin II receptor 2 is expressed and mediates angiotensin II signaling in lung fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2007;37(6):640–50.
86. De Agostini A. An unexpected role for anticoagulant heparan sulfate proteoglycans in reproduction. *Swiss Med. Wkly.* 2006;136(37-38):583–90.
87. Giordano MV, Giordano LA, Gomes RCT, Simões RS, Nader HB, Giordano MG, Baracat EC, Soares Júnior JM. The evaluation of endometrial sulfate glycosaminoglycans in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* 2014;3590:1–4.
88. Kawamura K, Kawamura N, Mulders SM, Sollewijn Gelpke MD, Hsueh AJW. Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(26):9206–11.

8. EKLER

EK 1: Etik kurul onayı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

BASVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Polikistik over sendromlu (PKOS) hastaların ve normal kontrollerin granüloza hücrelerinde mikroRNA (miRNA) ifade profillerinin araştırılması				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Bala Gür Dedoğlu				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü				
	DESTEKLEYİCİ					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
	ARAŞTIRMANIN FAZİ	FAZ 1	☐			
		FAZ 2	☐			
		FAZ 3	☐			
FAZ 4		☐				
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Yeni Bir Endikasyon	☐				
	Yüksek Doz Araştırması	☐				
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar Çalışması					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐		


07 Haz 2019


Sayfa 1

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	☐			
	SİGORTA	☐			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	TÜBİTAK		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐			
	HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	☐			
	ILAN	☐			
	YILLIK BİLDİRİM	☐			
	SONUÇ RAPORU	☐			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐			
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:04-120-12 Tarih: 27 Şubat 2012				
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri bilgilendirilmiş gönüllü olur formu dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul Üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.				

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	M. Melli
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	C. Yurdaydin
Prof.Dr.Ahmet DEMİRKAZIK	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	A. Demirkazik
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	T. Özçelikay
Prof.Dr.Nuhan PURALI	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	N. Puralı
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	C. Atbaşoğlu
Prof.Dr.Hakan UNCÜ	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	H. Üncü
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	S. Öztürk
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	S. Sivri
Prof.Dr.Muharrem ÖZEN	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	M. Özen
Prof.Dr.Danu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	D. Çakır
Yrd.Doç.Dr.Nüket K. ÇAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	N. Çay
Yrd.Doç.Dr.Deniz ÖZTÜRK	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	D. Öztürk
Öğr.Gör.Dr. Volkan KAYMAZ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	V. Kaymaz
Gülşüm AŞLAK	Arkeoloji	-	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	G. Aşlak

* Toplantıda Bulunma

* Üniversitemiz Biyoteknoloji Enstitüsünün, böyle bir bilimsel edim için eğitim, faaliyetleri olmayan bir özel merkez yerine Üniversitemiz Kadın Hast. ve Doğum B.D. 'de de yapılmam, en uygun olan bir araştırma alanı ile gerçekleştirilerek üzere bakımının uygun olacağı görülmüştür. Dr.Hakan Üncü

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alp AYDOS

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 08.04.1989

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Hacı Ömer Tarman Anadolu Lisesi - İngilizce (2006)

Lisans: Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (2011)

İş Tecrübesi

Kurumu: Medisa Dış Ticaret ve Pazarlama Ltd. Şti. (2009-2011)

Yayınlar

Öztemur Y, **Aydos A**, Gür Dedeoğlu B. Meme kanseri mikrodizin verilerinin biyoinformatik yöntemler ile bir araya getirilmesi – Meta-analiz yaklaşımları. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2014 (Kabul edildi)

Aydos A, Öztemur Y, Gür Dedeoğlu B. Polikistik over sendromuna moleküler yaklaşımlar. *Türk Hij Den Biyol Derg.* 2014 (Kabul edildi)

Uluslararası kongrelerde sunulan bildiriler:

Yasemin Öztemur, Tufan Bekmez, Alp Aydos, Işık Yuluğ, Betül Bozkurt, Bala Gür Dedeoğlu. “miRNA-mRNA integrated analysis in breast cancer: Let-7 cluster as a meta-signature for grade classification”, *23rd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Munich, 2014, Poster Sunum*

Yasemin Öztemur, Tufan Bekmez, Alp Aydos, Vilda Purutçuoğlu, Bala Gür Dedeoğlu. “Let-7 cluster as a meta-signature for grade classification in breast cancer”, *8th International Symposium on Health Informatics and Bioinformatics, Ankara, 2013, Poster Sunum*

Ulusal kongrelerde sunulan bildiriler:

Alp Aydos, Yasemin Öztemur, Bala Gür Dedeoğlu. “Polikistik over sendromunda kumulus ve granüloza hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi”, *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Aydın, 2013, Poster Sunum*

Yasemin Öztemur, Tufan Bekmez, Alp Aydos, Vilda Purutçuoğlu, Bala Gür Dedeoğlu. “Meme kanserinin patolojik alt tiplerinin meta-analiz yöntemine dayalı miRNA imzaları ile sınıflandırılması”, *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Aydın, 2013, Poster Sunum*

10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

1. **Alp Aydos**, Yasemin Öztemur, Bala Gür Dedeoğlu. “Polikistik over sendromunda kumulus ve granüloza hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi”, *XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi*. Aydın, 2013, Poster Sunum
2. **Aydos A**, Öztemur Y, Gür Dedeoğlu B. Polikistik over sendromuna moleküler yaklaşımlar. *Turk Hij Den Biyol Derg.* 2014 (Kabul edildi)

PS-06 37

Polikistik over sendromunda kumulus ve granülosa hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi

Alp Aydos, Yasemin Öztumur, Bala Gür Dedeoğlu

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınları etkileyen bir endokrin hastalıktır ve anovulatuvar infertilitenin en sık rastlanan sebeplerinden biridir. Kumulus ve granülosa hücreleri yumurta mikroçevresini oluşturan, steroid hormonlarını ve oosit hücrelerinin gelişiminde rol alan pek çok büyüme hormonunu üretmekle görevli somatik hücrelerdir. Bu çalışmada, PKOS'ta kumulus ve granülosa hücreleri arasındaki gen ifade farklılıklarının meta-analiz yöntemi ile biyoinformatik olarak bulunması ve bu genlerin bulunduğu yolların ortaya çıkartılması amaçlanmıştır. Bugüne kadar PKOS'lu ve kontrol örneklerinden elde edilen kumulus ve granülosa hücreleri ile yapılan mikrodizin çalışmaları GEO ve ArrayExpress mikrodizin veritabanları kullanılarak araştırılmış ve 3 mikrodizin çalışması (GSE34526, GSE10946, E-MEXP-3641) birbirleri ile yüksek korelasyon ($r > 0.8$, $p < 0.001$) gösterdikleri için naiv meta-analiz yöntemi ile bir araya getirilmiştir (meta-veri). Meta-veri; farklılık gösteren gen setlerini bulmak amacıyla BRB Array Tools kullanılarak analiz edilmiştir. Kumulus ve granülosa hücreleri arasında farklılık gösteren gen setleri t-test kullanılarak belirlenmiş, istatistiksel olarak anlamlı olup ($p < 0.001$) 4 kat farklılık gösteren genler meta-gen seti olarak seçilmiş ve yolak analizi yapılmıştır. Kumulus ve granülosa hücreleri arasında farklılık gösteren meta-gen setlerine bakıldığında 3289 genin PKOS'lu hastalarda, 994 genin kontrollerde farklılık gösterdiği bulunmuş ve bu genlerden 592 tanesinin ortak olduğu saptanmıştır. PKOS'a özel meta-gen listesine ulaşmak için 3289 genden her iki durumda ortak olan genler (592) çıkartılmış, 2697 adet meta-gen belirteç adayı olarak belirlenmiştir. Yapılan yolak analizleri sonucunda bazı aday genlerin bugüne kadar PKOS ile ilgisi kurulmuş olan MAPK ve Wnt sinyal yolları ile PKOS ile yakından ilgisi olduğu bilinen insülin yolağında yer aldıkları bulunmuştur. Bu çalışmada bulunacak olan aday genlerin PKOS-infertilite ilişkisini moleküler boyutta aydınlatılabileceği düşünülmektedir.

Identification of gene expression profiles of cumulus and granulosa cells in polycystic ovary syndrome

Alp Aydos, Yasemin Öztumur, Bala Gür Dedeoğlu

Ankara University, Biotechnology Institute, Ankara, Turkey

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder that affects the women at reproductive age. Cumulus

and granulosa cells are the somatic cells that make up the oocyte microenvironment, secrete steroid hormones and produce growth hormone that take part in oocyte development. The aim of this study is to identify the differentially expressed genes between cumulus and granulosa cells by meta-analysis and to identify pathways that the genes take part in. For this study microarray studies related with cumulus and granulosa cells studied in PCOS and control samples were searched in two microarray databases, GEO and ArrayExpress, and 3 studies were selected to be combined with naiv meta-analysis (meta-data) since they were found to be highly correlated with each other ($r > 0.8$, $p < 0.001$). Raw meta-data was processed and the genes differentially expressed between cumulus and granulosa cells were identified by t-test. The significant genes ($p < 0.001$) that were found to be differentially expressed more than 4 fold were selected as meta-gene set and pathway analysis was performed with it. As a result 3289 genes were found to be differentially expressed between cumulus and granulosa cells in PCOS while it was 994 genes for control samples and 592 of these genes were found to be common. To find out PCOS specific genes common genes were eliminated from 3289 genes and the reminder 2697 genes were defined as candidate marker meta-genes. The pathway analysis conducted with the candidate genes showed that MAPK, Wnt and insulin signaling pathways were significant pathways.

PS-06 38

Ailesel akdeniz ateşi'nin klinik tanısında vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) polimorfizminin etkisi

Melek Önder Yüce, Hasan Bağcı

Ondokuzmayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Samsun

Ailesel Akdeniz Ateşi(AAA,FMF)'nin akut inflamasyonunda yer alan ana hücre grubunun nötrofiller olduğu ve Vasküler Endotel Büyüme Faktörü(VEGF)'nin doğrudan nötrofillerde aktive olduğu bilinmektedir. VEGF gen polimorfizmleri romatizmal artrit'de dahil olmak üzere kronik inflamatuvar hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Biz bu çalışmada VEGF geninin 936C/T fonksiyonel polimorfizminin FMF hastalığında fenotipik özelliklerin ortaya çıkmasında etkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Bu çalışmaya Tel-Hashomer kriterlerine göre kesin tanı alan ve çift mutasyon taşıyan 223 hasta ile kesin tanı alan fakat mutasyon taşımayan 209 kontrol grubu dahil edildi. Genotiplendirme PCR-RFLP yöntemi ile yapıldı. Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre kesin tanı alan ve çift mutasyon taşıyan 223 hastanın 152'si (%68.2) CC, 60'ı (%26.9) CT ve 11'i (%4.9) TT genotipinde; kesin tanı alan ve mutasyon taşımayan 209 kontrol grubunun 166'sı (%79.4) CC, 36'sı (%17.2) CT ve 7'si (%3.3) TT genotipinde olduğu belirlendi. FMF hastalarında VEGF geni 936C/T polimorfizmi genotip ve alel