

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

POLİKİSTİK OVER SENDROMU'NDA (PKOS) YUMURTA MİKROÇEVRESİNDEKİ
MOLEKÜLER DEĞİŞİKLİKLERİN MİKRORNA (miRNA) DÜZEYİNDE
ARAŞTIRILMASI

Alp AYDOS

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

ŞUBAT

2020

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

Doç. Dr. Bala Gür DEDEOĞLU danışmanlığında, Alp AYDOS tarafından hazırlanan bu çalışma 21/02/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Rıza Köksal ÖZGÜL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI

İmza:

Üye: Prof. Dr. Erkan YILMAZ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Yeşim AYDIN SON

İmza:

Üye: Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Polikistik Over Sendromu'nda (PKOS) Yumurta Mikroçevresindeki
Moleküler Değişikliklerin mikroRNA (miRNA) Düzeyinde Araştırılması

Alp Aydos

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Bala Gür Dedeoğlu

Polikistik over sendromu (PKOS), üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla görülen ve yumurtlama sorunlarına bağlı infertilitenin en önemli nedeni olan endokrin ve metabolik düzensizliktir. PKOS'un nedenleri tam anlaşılmamakla birlikte, sendromda folikülün ve yumurtanın tam olarak olgunlaşmadığı, sonucunda kistik foliküllerin yumurtalık içerisinde biriktiği ve metabolik düzensizlikleri beraberinde getirdiği bilinmektedir. Yumurta hücresi kümülüs granüloza hücreleri (KGH) ile çevrelenmiş durumdadır. Bu hücreler folikül içeriğini düzenlemekten ve steroid hormonların salgılanmasından sorumlu olan mural granüloza hücreleri (MGH) ile birlikte folikülü oluşturmaktadır.

Bu çalışmada aynı öncül hücreden köken alan (öncül granüloza hücreleri) bu iki somatik hücre grubu arasında PKOS'ta değişiklik gösteren mRNA ve miRNA ifadeleri incelenmektedir. Tez kapsamında literatürde bulunan bağımsız mikrodizin verileri naiv meta-analiz yöntemi ile analiz edilmiş, daha önceki çalışmada PKOS-kontrol grupları arasında MGH'lerde ifade farklılığı gösteren miRNA ifadeleri PKOS grubunda MGH-KGH sınıfları arasında araştırılmış ve mRNA-miRNA ilişkisinden yola çıkılarak PKOS'ta rol oynadığı bilinen yolların bu iki hücre grubu arasındaki ifade düzensizlikleri araştırılmıştır.

Tez çalışması sonucunda daha önce PKOS ile ilişkisi tespit edilmiş 7 miRNA'dan 5 tanesinin MGH-KGH sınıfları arasında ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'lara ait potansiyel hedefler biyoinformatik olarak tespit edilmiş, naiv meta-analiz sonucunda PKOS-spesifik olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen 1372 gen ile kesiştirilerek ortak bir mRNA listesi elde edilmiştir. Ortak liste ile yapılan yolak analizleri sonucunda genlerin literatürde PKOS ile ilişkilendirilmiş MAPK, insülin, Wnt, TGF- β gibi yollarında zenginleştiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler miRNA ve mRNA moleküllerinin yumurta mikroçevresindeki bu somatik hücrelerde değişen ifadelerinin, yumurta-folikül olgunlaşmasını etkileyerek PKOS'un gelişiminde rol oynayabileceğini göstermektedir.

2020, 101 sayfa

Anahtar Kelimeler: Polikistik over sendromu (PKOS), mikroçevre, mikroRNA (miRNA), mesajcı RNA (mRNA), mural granüloza hücresi, kümülüs granüloza hücresi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

Investigating the Molecular Changes in Oocyte Microenvironment in Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) at microRNA (miRNA) Level

Alp Aydos

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Bala Gur Dedeoglu

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine and metabolic disorder which is the most common cause of infertility due to ovulation problems. Although the causes of PCOS are not fully understood, it is known that the follicle and oocyte do not fully mature in the syndrome, as a result cystic follicle accumulate in the ovary and cause metabolic disorders. The oocyte is surrounded by the cumulus granulosa cells (CCs), which are responsible for regulating follicle content and secreting steroid hormones, and the mural granulosa cells (MGCs).

In this study, mRNA and miRNA expressions were identified between these two somatic cell groups originating from the same precursor cell (precursor granulosa cells) in PCOS. The independent microarray data in the literature were analyzed by naive meta-analysis method. Also, the expression profiles of miRNAs, which had been identified in our previous study between PCOS-control groups in MGCs, between MGCs and CCs in PCOS were identified. In addition, pathway dysregulations in PCOS between these somatic cells were investigated based on the mRNA-miRNA relationship.

As a result of this thesis, it was identified that 5 of 7 miRNAs that were previously associated with PCOS showed expression differences between MGC-CC classes. Potential targets of these miRNAs were bioinformatically identified, and a common list of mRNAs was obtained by crossing with 1372 PCOS-specific genes which were identified from naive met-analysis. As a result of the common list pathway analysis, genes were found to be enriched in pathways such as MAPK, insulin, Wnt, TGF- β , which were related with PCOS in the literature. The data obtained show that changing expressions of miRNA and mRNA molecules in these somatic cells in the oocyte microenvironment may play a role in the development of PCOS by affecting oocyte-follicle maturation.

2020, 101 pages

Keywords: Polycystic ovary syndrome (PKOS), microenvironment, microRNA (miRNA), messenger RNA (mRNA), mural granulosa cells, cumulus granulosa cells

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora sürecim boyunca, yalnızca akademik anlamda değil ihtiyacım olan her anda, hayatımdaki her dönüm noktasında yanımda olan çok değerli hocam Doç. Dr. Bala GÜR DEDEOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez savunmamdan itibaren jüri üyeliğimi yapan, tez izleme komitemde bulunarak değerli katkıları veren Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI'ya yol göstericiliği ve değerli katkıları için teşekkür ederim. Bilimsel desteği ve katkıları ile her zaman yanımda olan, tez izleme komitemde bulunarak değerli fikirlerini paylaşan Prof. Dr. Erkan YILMAZ'a teşekkür ederim.

Hayatımdaki vazgeçilmezim, yaşama sevincim, bir tanecik eşim Pelin AKSOY AYDOS'a her zaman yanımda olduğu, sonsuz güven duygusunu bana yaşattığı, hiç bitmeyen özverisi ve sabrı için sonsuz teşekkür ederim.

Canım dostlarım, Dr. Yasemin ÖZTEMUR ISLAKOĞLU ve Blm. Uzm. Ayşegül YÜCEL POLAT'a üniversite hayatımın başından beri benimle oldukları, bana akademik ve manevi anlamda her zaman destek oldukları için teşekkür ederim.

Süreç boyunca bana her aşamada yardım eden sevgili grup arkadaşım Dr. Senem NOYAN'a desteği için teşekkür ederim.

Arkadaşlarım Dr. Özge CUMAĞULLARI ve Dr. Gözde YALÇIN'a her zaman mutluluk ve neşe verici arkadaşlıkları için teşekkür ederim.

Annem Emiç AYDOS'a, kardeşim Sıla AYDOS'a, teyzem Aynur YILDIRIM'a ve dayım Vedat YILDIRIM'a her zaman koşulsuz sevgilerini hissettirdikleri, aile kelimesinin sıcacık anlamını bana yaşattıkları için teşekkür ederim.

Çalışma arkadaşlarım BGD Lab üyeleri Dr. Funda KAYA DEMİRİSOY'a ve Burcu DOLAPÇI'ya teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü hocalarına, çalışanlarına ve öğrencilerine yıllardır geçirdiğim güzel zamanlar için teşekkür ederim.

Alp AYDOS

Ankara, 2020

*Bu tez çalışması hayat arkadaşım, eşim Pelin AKSOY AYDOS'a
ve
bilimin her zaman yol göstericisi olması dileğiyle kardeşim Sıla AYDOS'a atfedilmiştir.*

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ONAY SAYFASI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
SEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. DIŞI ÜREME SİSTEMİ	3
2.2. YUMURTALIK FOLİKÜLER GELİŞİMİ	3
2.2.1. GEÇ ANTRAL FOLİKÜL (GRAAFIAN FOLİKÜL), MURAL GRANÜLOZA HÜCRELERİ (MGH'LER) VE KÜMÜLÜS GRANÜLOZA HÜCRELERİ (KGH'LER)	8
2.2.2. LUTEAL FAZ.....	9
2.3. POLİKİSTİK OVER SENDROMU	10
2.3.1. PKOS'UN NEDENLERİ (ETİYOLOJİSİ).....	10
2.3.2. PKOS'TA TANI (DİAGNOSTİK)	11
2.3.3. İNFERTİLİTE VE PKOS ARASINDAKİ İLİŞKİ	11
2.4. In-vitro FERTİLİZASYON YÖNTEMİ	12
2.5. MİKRORNA	13
2.5.1. MİKRORNA'LARIN SENTEZİ (BİYOGENEZİ).....	13
2.5.2. MİKRORNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI	14
2.5.3. MİKRORNA'LARIN FONKSİYONU.....	15
2.6. PKOS'TA DEĞİŞEN GEN İFADESİ	16
2.7. miRNA VE PKOS	16
2.8. MİKRODİZİN YÖNTEMİ	18
2.8.1. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİ	18
2.8.2. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİNİN KULLANIM ALANLARI.....	19
2.8.3. MİKRODİZİN PLATFORMLARI	19
2.8.4. MİKRODİZİN VERİTABANLARI	20
2.8.5. META-ANALİZ YÖNTEMİ	21

3. GEREKÇE VE AMAC	23
4. MATERYAL VE YÖNTEM	25
4.1. MATERYAL	25
4.1.1. VERİTABANLARINDAN TOPLANAN MİKRODİZİN ÇALIŞMALARI	25
4.1.2. PKOS'LU ÖRNEKLER.....	25
4.1.3. TAMAMLAYICI DNA (cDNA) SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ VE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR KİTLERİ	26
4.1.4. PRİMERLER	27
4.2. YÖNTEM	29
4.2.1. VERİTABANLARINDAN UYGUN MİKRODİZİN VERİ SETLERİNİ SEÇİLMESİ ...	30
4.2.2. SEÇİLEN MİKRODİZİN VERİ SETLERİNİN KORELASYONLARININ KONTROLÜ 30	
4.2.3. SEÇİLEN ÇALIŞMALAR AİT HAM VERİLER İLE MİKRODİZİN ANALİZLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	30
4.2.4. PKOS SPESİFİK GENLERİN İKİ GRUP ARASINDAKİ İFADE FARKLILIĞININ EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASI İLE DOĞRULANMASI	32
4.2.5. miRNA'LAR İLE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ	33
4.2.6. miRNA'LARA AİT POTANSİYEL HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ	35
4.2.7. META-ANALİZ ÇALIŞMASINDAN GELEN PKOS-SPESİFİK GENLER İLE miRNA HEDEF GENLERİNİN KESİŞTİRİLMESİ	35
4.2.8. YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZLERİ.....	35
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	36
5.1. META-ANALİZ ÇALIŞMASI İÇİN VERİTABANLARINDAN SEÇİLEN VERİ SETLERİ	36
5.2. VERİ SETLERİNİN KORELASYONUNA AİT BULGULAR	36
5.3. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLERE AİT BULGULAR (META-ANALİZ)	37
5.4. PKOS-SPESİFİK GENLER İLE YAPILAN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZLERİNE AİT BULGULAR	39
5.5. YOLAK ANALİZLERİNDEN SEÇİLEN PKOS-SPESİFİK GENLER İLE KÜMELE ANALİZLERİNİN YAPILMASI	40
5.6. RNA İZOLASYONUNA, SAFLIĞINA VE MİKTARINA AİT BULGULAR	41
5.7. PKOS-SPESİFİK GENLERİN EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR	42
5.8. miRNA'LAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR	45
5.8.1. miRNA'LARA AİT POTANSİYEL HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİNE AİT BULGULAR	46

5.9. META-ANALİZ ÇALIŞMASINDA PKOS GRUBUNDA İFADE FARKLILIĞI GÖSTEREN GENLER İLE miRNA HEDEF GENLERİNİN KESİŞTİRİLMESİNE AİT BULGULAR.....	47
5.10. ORTAK GEN LİSTELERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİNE AİT BULGULAR.....	48
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>50</u>
6.1. TARTIŞMA	50
6.2. SONUÇ.....	60
<u>KAYNAKLAR.....</u>	<u>63</u>
<u>EKLER.....</u>	<u>76</u>
EK-1.....	76
<u>ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>83</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>85</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kadınlarda üreme döngüleri ve zaman ilişkisi gösterir grafikler	7
Şekil 2.2. Graafian folikülün iç yapısı	9
Şekil 2.3. miRNA sentezini ve etki mekanizmasını gösterir şema.....	15
Şekil 4.1. Çalışmanın genel iş akış şeması	29
Şekil 5.1. Veri-tabanlarından indirilen 3 farklı veri setinde bulunan ham verilere ait korelasyon grafiği.....	37
Şekil 5.2. Yapılan meta-analiz çalışması sonucunda MGH ve KGH sınıfları arasında PKOS grubunda 1372 genin, kontrol grubunda 14 genin anlamlı olarak en az 4 kat ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$)	38
Şekil 5.3. KEGG figüründen alınmış MAPK sinyal yolağı (hsa04010) ($p<0,001$)	40
Şekil 5.4. Meta-veriden gelen örnekler ve MAPK sinyal yolağında yer alan, meta-analiz çalışmasında MGH (G) ve KGH'ler (C) arasında anlamlı olarak ($p<0,001$) ifade değişikliği gösterdiği tespit edilen genler ile yapılan hiyerarşik kümeleme çalışmasını gösterir heatmap.....	41
Şekil 5.5. Eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile doğrulamak için seçilen genlerin (FZD3, INSR, PTPRC, RUNX2, JUNB) bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik	43
Şekil 5.6. Eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile doğrulamak için seçilen MAPK sinyal yolağında rol alan genlerin (<i>MAPK1</i> , <i>MAPK14</i> , <i>FOS</i>) bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik.....	44
Şekil 5.7. Bağımsız örneklerde, seçilen genlerin ifade düzeylerini doğrulamak için eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması sonuçları ile gerçekleştirilen kümeleme analiz sonuçlarını gösterir heatmap	44
Şekil 5.8. Eş-zamanlı PZR çalışması sonucunda MGH'lerde KGH'lere göre ifade farklılığı gösteren miRNA'ları ve bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik ($n=11$).....	46
Şekil 5.9. VENNY ile yapılan kesiştirme analizi sonucunda, tahmini miRNA hedefleri, PKOS-spesifik genler ve bu listelerde ortak olarak yer alan genleri gösterir venn diagramı şeklidir	47
Şekil 5.10. hsa-miR-3188 ve potansiyel hedefi olan <i>MAPK1</i> genin MGH ve KGH'ler arasında bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik	49
Şekil 6.1. KEGG figüründen adapte edilen MAPK sinyal yolağı (hsa04010).....	53
Şekil 6.2. KEGG figüründen adapte edilen Wnt sinyal yolağı (hsa04310).....	56
Şekil 6.3. KEGG figüründen adapte insülin sinyal yolağı (hsa04910)	57

Şekil 6.4. KEGG figüründen adapte edilen tip 2 diyabet bağlantılı genleri belirtir gen ilişki haritası (hsa04930) 58

Şekil 6.5. KEGG figüründen adapte TGF- β (hsa04350)..... 60



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin örnek numaraları, yaş bilgisi ve toplanan öosit sayıları.....	26
Çizelge 4.2. Eş-zamanlı kantitatif PZR’de kullanılan ve laboratuvarımızda tasarlanan mRNA primerlerinin uzunlukları (baz çifti (bç) olarak), ürün boyları (bç olarak) ve sekans bilgilerinin gösterir çizelge.....	27
Çizelge 4.3. Eş-zamanlı kantitatif PZR’de kullanılan miRNA primerlerinin kısa adları (hsa-miR), katalog numaraları, sekans dizileri ve kullanılan marka katalogunda bulunan ürün adı bilgilerini gösterir çizelge.....	28
Çizelge 5.1. Seçilen mikrodizin verilerinde PKOS ve kontrol gruplarına ait KGH ve MGH örnek sayılarını gösterir çizelge (81).....	36
Çizelge 5.2. PKOS-spesifik 1372 gene ait yolak analiz sonuçları (81).....	39
Çizelge 5.3. RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerlerini gösterir çizelge.....	42
Çizelge 5.4. İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA’ları, istatistiksel anlamlılık düzeylerini (p-değeri) ve bu miRNA’ların MGH-KGH’ler arasındaki kat değişimini gösterir çizelge (81).....	45
Çizelge 5.5. İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA’lara ait tahmini hedeflerin sayısını ve bu miRNA’ların MGH-KGH sınıfları arasında ifade durumunu gösterir çizelge.....	47
Çizelge 5.6. Ortak gen listeleri ile yapılan yolak analizleri sonucu zenginleşme görülen yolaklar, yolaklarda zenginleşen gen sayıları ve istatistiksel anlamlılık düzeylerini (p-değeri) gösterir çizelge.....	48

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µl	Mikrolitre
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	İn-vitro fertilizasyon
KOK	Kümülüs-oosit kompleksi
LH	Lüteinleştirici hormon
mRNA	Mesajcı RNA
miRNA	MikroRNA
ng	Nanogram
PKOM	Polikistik over morfolojisi
PKOS	Polikistik over sendromu
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RISC	RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi
UTR	Translasyonu yapılmayan bölge

1. GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS) üreme çağındaki kadınları yüksek bir görülme sıklığı ile etkileyen, infertilite ve hirsutizm (kıllanma) gibi nedenlerle yaşam kalitesini düşüren, insülin direnci, diyabet, kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi sebeplerle uzun vadede hayati tehlikeler doğurabilen endokrin ve metabolik bir düzensizliktir. Yumurtlama sorunlarına bağlı infertilitenin en sık görülen nedenidir. PKOS; tanısı, tanımlaması kolay olmayan belirli kriterlere dayanan, tedavisi uzun süreli ve yüksek maliyetli metabolik bir sendromdur.

Yumurtlama (ovulasyon) ve folikül gelişimi süreçleri çevresel etmenlerden doğrudan etkilenen hassas ve hormonal-metabolik denge içinde gelişen bir süreçtir. Bu süreçler yumurtanın düzgün bir şekilde gelişmesi, olgunlaşması ve sonuç olarak folikülün çatlayarak olgun yumurtanın döllenmeye hazır halde kadın üreme sistemine bırakılmasıyla son bulmalıdır. Ancak folikülün ve yumurtanın gelişiminde folikül içerisinde yer alan ve dışarıdan gelen sinyalleri algılayarak iç katmanlara ileten, bu sinyallere göre folikül sıvısını düzenleyen ve folikül sıvısından iletilen bileşenler ile yumurtayı besleyen somatik hücrelerin rolü büyüktür. Bu hücrelerin tamamı folikül içerisinde “yumurta mikroçevresini” oluşturmaktadır.

Öncül foliküller gelişirken oositin etrafını çevreleyen primer mikroçevre elemanları (öncül granüloza hücreleri) gelişerek ve farklılaşarak daha spesifik görevler üstlenirler. Yumurtaya yakın olan hücreler yumurta ile doğrudan iletişimden sorumlu kümülüs granüloza hücreleri ve folikül içeriğini düzenleyen mural granüloza hücrelerine farklılaşırlar. Bu özelleşme yumurta gelişimi ve folikül olgunlaşması için elzemdir.

Bu durum, PKOS'un gelişiminde ve folikülün olgunlaşmadan-çatlamadan yumurtalıklar içerisinde kalmasına, bahsedilen mikroçevre elemanları içerisinde gelişebilen moleküler düzensizliklerin neden olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

mikroRNA (miRNA)'lar yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda, düzenleyici, endojen RNA molekülleridir. Bu küçük moleküllerin düzenleyici rolleri gen ifadesini sağlayan mesajcı RNA (messenger RNA) (mRNA)'lar üzerinde sağladıkları dejenerasyon veya translasyonun (protein sentezinin) baskılanması ile sağlanmaktadır.

PKOS'lu bireylerde yumurta mikroçevresini oluşturan mural granüloza ve kümülüs granüloza hücrelerinde oluşan moleküler düzensizlikleri miRNA ve mRNA düzeyinde tespit edebilmek, PKOS gibi metabolik ve kompleks bir sendromun gelişmesindeki etkenlerin daha iyi anlaşılabilmesini sağlayabileceği gibi tanısı ve tedavisi açısından da yeni umutlar doğuracaktır.



2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. DIŞI ÜREME SİSTEMİ

DiŐi üreme sistemi temelde insanlarda 2 bölüme ayrılmaktadır. Dış bölümde vajinal açıklık, klitoris ve iki çift dudaktan (labia) oluşur. Labialar bu yapıları çevrelemektedir. İç bölümde ise hormonların salgılanmasından sorumlu ve bu hormonlar aracılığıyla yumurta (oosit) olgunlaşmasını sağlayan yumurtalıklar (ovaryum) ile yumurta kanalları (oviduct), rahim (uterus) ve rahim duvarı (endometriyum) gibi yumurta ve spermin birleşmesini (döllenme) sağlayan yapılar bulunmaktadır. Uterus ve endometriyum tabakaları döllenme sonrasında embriyonun tutunmasını ve gelişmesini sağlayan yapılardır.

Ovaryumlar karın boşluğunun her iki yanında uterusu bağlı şekilde bulunur ve içinde olgunlaşmamıŐ folikülleri barındırır. Foliküllerin içerisinde ise her folikülde 1 adet olmak üzere henüz mayoz bölünmesinin tamamlanmamıŐ ve olgunlaşmamıŐ oosit bulunmaktadır (1).

2.2. YUMURTALIK FOLİKÜLER GELİŞİMİ

Ovaryumların (yumurtalıkların) temelde 2 önemli görevi vardır: Bunlar kadın üreme sisteminde görev yapan hormonları üretmek ve fertilizasyon için gerekli olan olgun yumurtanın seçilimini ve olgunlaşmasını kontrol etmektir (2).

Ovaryumlarda folikül gelişimi (oogenez) kadınlarda anne karnında (fetal dönemde) başlayan ve yetişkinlikte tamamlanan, birçok genin kontrolü altında karmaŐık bir süreçtir (3). Bu süreçte baskın folikülün seçilimi, oosit mayozunun tekrar aktivasyonu, folikül duvarının yıkımı, kümülüs-oosit kompleksinin oluşumu ve korpus luteum yapısının oluşumu için doku-modellemesi gibi sıkı denetim altında bulunan aşamalar rol oynamaktadır (4).

Fetal dönemde, hamileliğin beŐinci haftasında diŐi fetüs ovaryumları 500 ile 1300 arasında primordial eŐey hücreleri (PEH) içermektedir. Hamileliğin 20. haftasında PEH'lerin mitoz bölünmeleri sonucu fetüs 6-7 milyon arası eŐey hücrelerine (oogonyum) sahip olur. Mitozun tamamlanmasının ardından primer oosit denilen ve doğuma kadar mayoz bölünmenin profaz 1 evresinde duraklayacak olan eŐey hücreleri oluşur. Doğum öncesi (peripartum) dönemde primer oositlerin etrafında onları besleyen granüloza hücreleri ile sarılacak şekilde eŐey hücre keseleri (primordial folikül) oluşur ve doğuma kadar süren bir bekleme sürecine girilir.

Bu süre boyunca birçok e ey hücresi kaybedilir ve doğum esnasında diŐi bireylerde yaklaşık olarak 1-2 milyon arasında primordial folikül bulunur. Doğum sonrasında bu eksilme devam eder ve birey ergenlik çağına geldiğinde 400.000 ile 500.000 arasında primordial folikül geriye kalmıştır. Her adet döngüsünde birey aylık olarak yaklaşık 1000 folikül kaybeder ve 35 yaş sonrasında aylık kayıp sayısı giderek artmaktadır (5,6).

Ergenlik  ağında adet döngüsünün baŐlaması sırasında folikül uyarıcı hormon (Follicle-Stimulating Hormone – FSH) belirli aralıklarla salgılanmaya başlar. FSH'ın etkisi ile yumurtalıklarda bulunan bir grup folikül uyarılarak geliŐmeye devam etmeye baŐlarlar (7). Menopoza kadar ge  en süre öte her ay bir folikül i çerisinde bulunan yalnızca bir primer oosit mayozun birinci aŐamasını tamamlar ve olgunlaŐır. Olgunlaşan bu primer oosit, mayotik bölünmenin ikinci aŐamasına girer ve metafaz 2 aŐamasına kadar olgunlaŐır. Bu aşamadan sonra olgunlaşan ve sekonder oosit adını alan bu yumurta hücresinin folikülün hormonların etkisi ile çatlaması sonucu serbest kalması gerekmektedir. Serbest kaldığı bu aşamadan sonra bir sperm hücresi ile karŐılaŐması durumunda spermin baş kısmının i  eri girmesi ile olgunlaşmasını tamamlar. Oogenezin son ürünü sperm hücresinin baş kısmını da i  eren bir yumurta hücresidir (2).

Ovaryumlarda foliküler geliŐim; gonadotropin-bağımsız büyüme ve gonadotropin-bağımlı büyüme olarak veya pre-antral büyüme ve antral büyüme olarak 2 farklı fazda ele almak mümkündür. Gonadotropin olarak bilinen hormonlar, hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormonun (Gonadotropin-Releasing Hormone – GnRH) etkisiyle  n hipofizden salgılanan FSH ve luteinleŐtirici hormondur (Luteinizing Hormon – LH). FSH, granüloza hücrelerinin proliferasyonu aracılığıyla foliküler büyümeyi kontrol ederken, LH yumurtlamadan sorumludur (7,8).

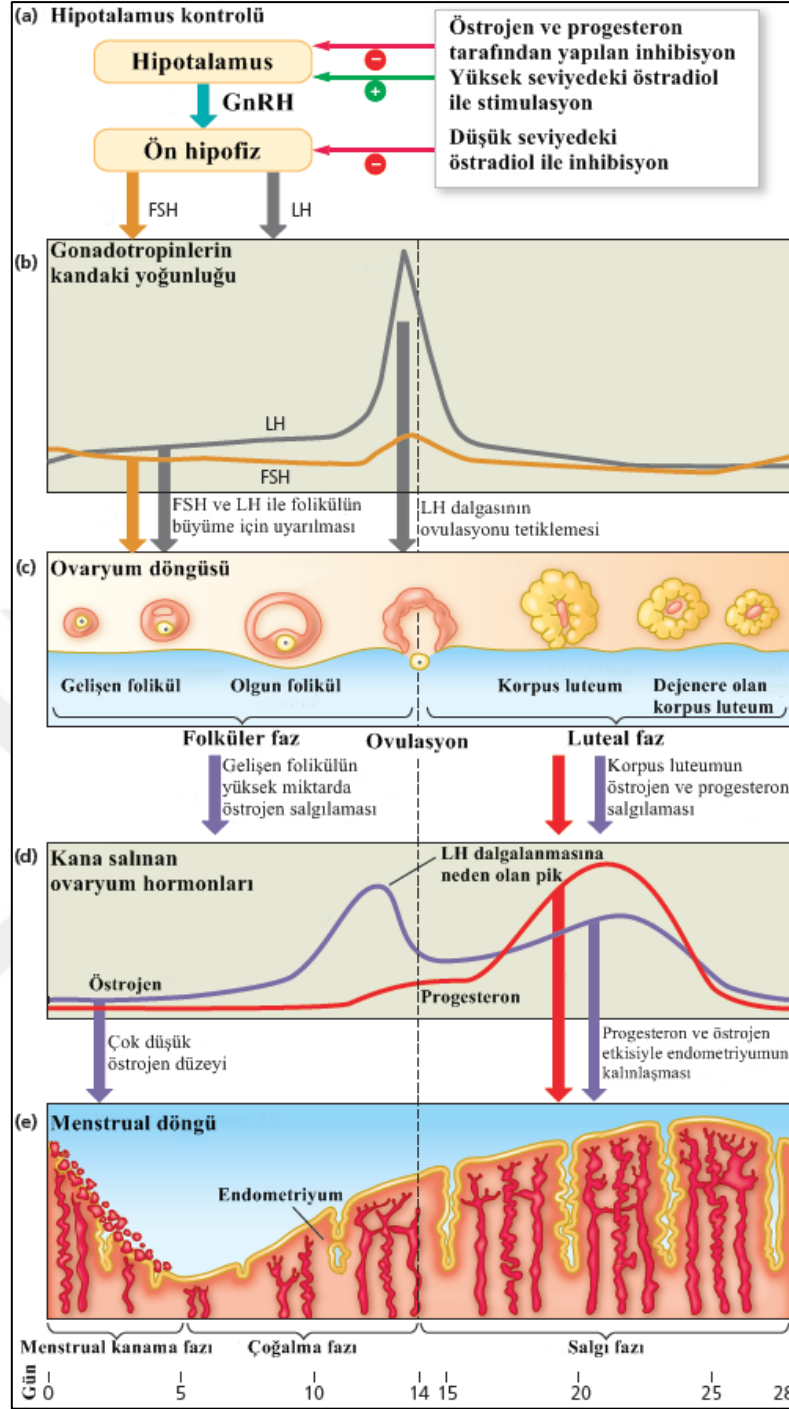
Foliküler geliŐim ovaryumun periferinde, korteks denilen kısımda baŐlamaktadır. Bir primordial folikülün ovulasyon öncesi aşamaya kadar olgunlaşması yaklaşık olarak 1 yıl almaktadır. Folikül, bu sürecin büyük bir kısmını pre-antral büyüme aşamasında (gonadotropin-bağımsız büyüme aşaması) ge  irmektedir. Bu aşamada büyüme mikro çevrede salgılanan büyüme faktörleri (Growth Factor – GF) aracılığıyla ger  ekleŐmektedir. Pre-antral büyümenin tamamlanması, yumurta hücresinin büyümesi ve öncül granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile son bulmaktadır. Granüloza hücreleri bu

proliferasyon sırasında FSH reseptörlerini ifade ederler ve bu aşamada folikül primer folikül adını almaktadır (9). Primer folikülün dış yapısında bulunan kübik yapıdaki epitel hücreleri dönüşüm geçirerek tabakalı koloner bir yapı oluştururlar. Periferik kanda bulunan hormonların da etkisi ile bu stromal tabakanın dış yüzeyindeki hücreler farklılaşarak teka eksterna, iç yüzeyindeki hücreler ise farklılaşarak teka interna adını alırlar. Folikül iç yüzeyine bakan teka interna hücreleri LH reseptörü ifade ederler. Granüloza hücrelerinde bulunan FSH reseptörü ve teka interna hücrelerinde bulunan LH reseptörleri sayesinde folikül FSH ve LH hormonlarına tepki verecek ve olgunlaşmasını devam ettirecek olan sekonder folikül halini almıştır (7,10).

Sekonder foliküller arasından gonadotropin düzeyine en iyi tepki veren foliküller baskın hale geçerler. FSH'ın granüloza hücrelerinde bulunan FSH reseptörlerine bağlanması ile foliküller büyümelerine devam ederler. Bu büyümenin etkisi ile folikül içerisinde sıvı dolu bir boşluk belirmeye başlar. Bu boşluk antrum adını almaktadır ve büyüyen yumurta ve granüloza hücrelerinden salgılanan materyallerden oluşmaktadır. Bu aşamada folikül erken antral folikül adını almaktadır. LH teka interna üzerinde bulunan LH reseptörlerine bağlanarak androjenlerin teka interna hücreleri tarafından üretimini tetikler. Androjenler folikül gelişimini tetiklerken aynı zamanda folikül içerisinde oluşan boşluğun büyümesini de apoptoz aracılı olarak tetiklemektedir (11). Olgunlaşan foliküller içerisinde bulunan granüloza hücreleri androjenleri aromataz enzimler aracılığıyla östrojene dönüştürürler. Östrojen düzeyi kanda yavaş yavaş artmaya başlar. Daha fazla folikülün östrojen üretmesi sonucunda kandaki östrojen düzeyi belirli bir seviyenin üzerine çıkar ve hipotalamus-hipofiz salgı mekanizması üzerinde bir negatif geri besleme (feedback) oluşur. Bu geri besleme mekanizması kandaki FSH düzeyinde ani bir düşüşe neden olur. FSH düzeyindeki bu ani düşüşe tepki olarak en gelişmiş folikül dominant halde kalır ve diğer foliküllerin gelişimi durur. Azalan FSH miktarı ile baş edemeyen küçük foliküller dejenere olarak kaybolurlar. Dominant folikülde granüloza ve teka hücrelerinin proliferasyonu hızlı bir şekilde devam eder ve antrum hızla genişlemeye başlar (2). Granüloza hücrelerinin hızlı proliferasyonu ve antrumun genişlemesi sırasında granüloza hücreleri farklılaşarak mural granüloza hücreleri (MGH'ler) ve kümülüs granüloza hücreleri (KGH'ler) olarak 2 gruba ayrılırlar. MGH'ler antrum içindeki maddelerin salgılanması ve östrojen üretiminden sorumluyken, KGH'ler yumurtanın beslenmesi ve enerji metabolizmasından sorumludur (12).

Granüloza hücreleri farklılaşırken ve antral folikül olgunlaşırken MGH'ler LH'a duyarlı hale gelecek şekilde LH reseptörleri ifade ederler. Bu sırada artan östrojen miktarı belirli bir seviyenin üzerine çıkar. Bu dalgalanma hipotalamus üzerindeki negatif geri besleme etkisini ortadan kaldırır ve hızlı bir GnRH salınımına neden olur. Yüksek östrojen düzeyi hipofiz bezindeki LH salgılayıcı mekanizmaları indüklediğinden GnRH'a bağımlı LH salınımı FSH salınımından daha yüksek düzeyde olmaktadır ve kandaki LH düzeyinde bir pik yaratmaktadır. LH ve FSH düzeyindeki ani artış nedeniyle oositi çevreleyen KGH'ler dejenere olarak folikülün çatlamasına neden olurlar. Çatlama sonucunda sekonder oosit halinde bulunan yumurta fallop tüplerine bırakılır ve foliküller faz sona erer (Şekil 2.1.) (1,2).



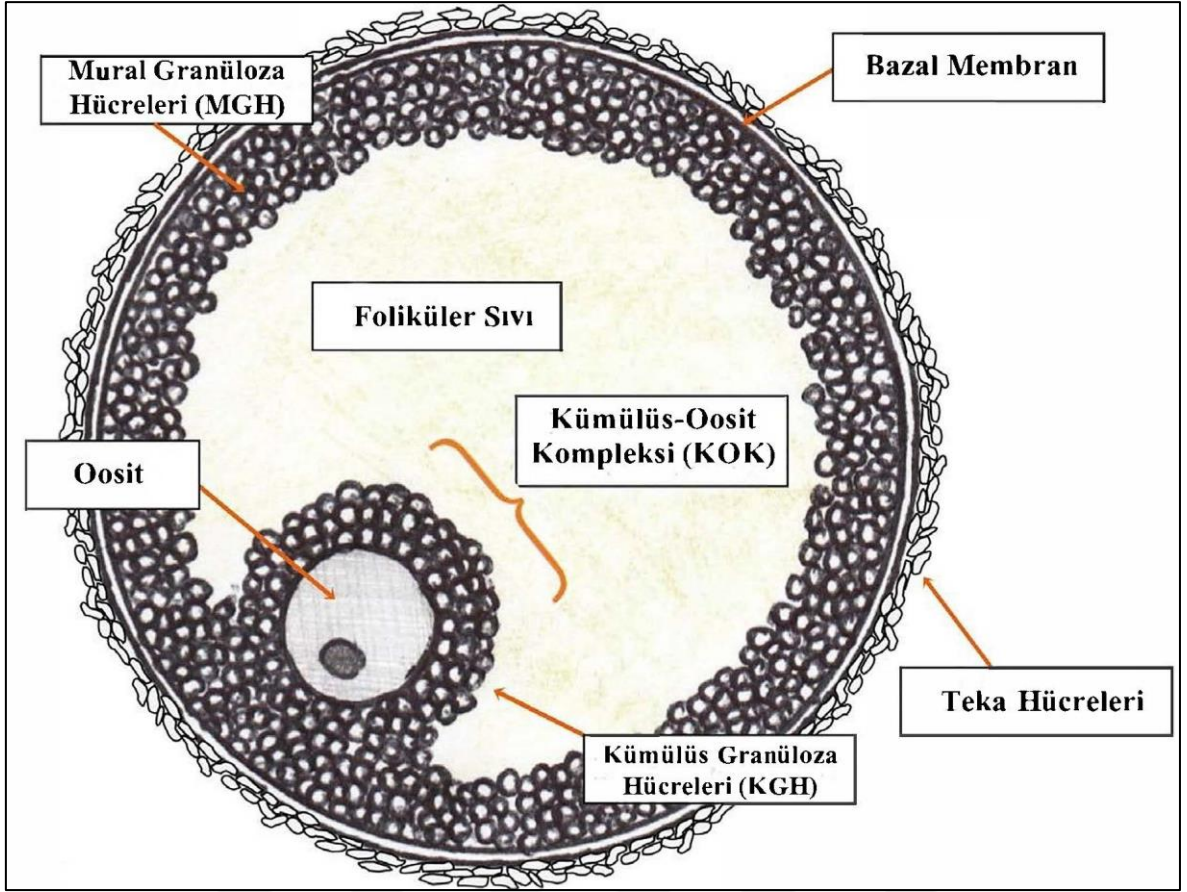


Şekil 2.1. Kadınlarda üreme döngüleri ve zaman ilişkisi gösterir grafikler. Şekilde (a) hipotalamus etkisi ile ön hipofizden salgılanan GnRH, (b) GnRH etkisi ile salgılanan gonadotropinler ve (d) ovaryumlardan salgılanan steroid hormonlar tarafından düzenlenen (c) ovaryum döngüsünün ve (e) menstrual döngünün 28 günlük değişimi gösterilmektedir (Reece ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (1).

2.2.1. GEÇ ANTRAL FOLİKÜL (GRAAFIAN FOLİKÜL), MURAL GRANÜLOZA HÜCRELERİ (MGH'LER) VE KÜMÜLÜS GRANÜLOZA HÜCRELERİ (KGH'LER)

Geç antral folikülün oluşumu; kadınlarda hormonal sistemin kontrolü ve düzenlemesi, oositin olgunlaşabilmesi ve serbest kalarak başarılı bir döllenmenin sağlanabilmesi için en önemli adımlardan bir tanesidir. Graafian folikülü; bazal membranın dış yüzeyini kaplayan, folikülü koruyan ve folikülün vücuttan gelen sinyalleri almasını sağlayan teka hücrelerinden, bazal membranın iç yüzeyini kaplayan, folikül içerisinde antral boşlukta bulunan foliküler sıvıyı beslemekle sorumlu olan, hormonlar, enzimler, elektrolitler ve steroid hormonları salgılayan mural granüloza hücrelerinden (MGH'ler), oosit ile doğrudan iletişimde olan, oositin enerji metabolizmasından ve büyümesinden sorumlu kümülüs granüloza hücrelerinden (KGH'ler) oluşur. KGH'ler ve oosit; kümülüs-oosit kompleksi (KOK) denilen bir yapı içerisinde folikül duvarına bağlı şekilde bulunurlar (Şekil 2.2.) (13).

Folikülün büyümesi ve olgunlaşması sırasında, primordial folikül içerisinde bulunan öncül granüloza hücreleri farklılaşarak folikül duvarını kaplayan MGH'leri ve oosit ile yakın ilişkide bulunan KGH'leri oluşturmaktadır (14). Oositin ve folikülün olgunlaşması birden fazla faktörün (endokrin ve parakrin faktörlerin) koordineli bir şekilde gerçekleşmesi ile oluşabilecek kompleks olaylardır. Burada en büyük roller oositin olgunlaşmasını sağlayan genleri ifade eden MGH'lere ve oositin beslenmesi ile oosite ulaşan makromolekül trafiğinden sorumlu olan KGH'lere düşmektedir. Folikül olgunlaşmasının son aşamalarına doğru MGH'ler ve KGH'ler arasındaki gen ifade farklılığı radikal olarak değişmektedir. MGH'ler ve KGH'ler arasındaki gen ifade farklılığı ve bu iki hücre grubunun farklılaşması son yıllarda iyi araştırılmış konulardır. Olgun ve fertilizasyona hazır bir yumurtanın oluşumu için bu iki hücre grubunun farklılaşarak spesifik rollerini üstlenmeleri büyük bir önem teşkil etmektedir (14).



Şekil 2.2. Graafian folikülün iç yapısı (Hennet ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (13)

2.2.2. LUTEAL FAZ

Ovaryum döngüsünde, folikülün gelişmesi ve çatlamasını luteal faz izlemektedir. Yumurtanın serbest kalması (yumurtlamadan) sonra geriye kalan folikül dokusu LH'nin etkisi ile lüteinleşir ve korpus luteuma dönüşür. Lüteinleştirici hormon (LH) ismini kalan foliküler doku üzerindeki lüteinleştirici etkisinden almaktadır. Korpus luteum salgı yapan bir bezdir ve LH etkisi ile kandaki östrojen ve progesteron düzeyini tekrar yükseltir. Ancak kandaki östrojen düzeyi daha önceki pik noktasına ulaşmaz fakat negatif geri besleme ile FSH ve LH düzeyini düşürecek kadar etkisi bulunmaktadır. Düşen FSH ve LH düzeyleri yeni foliküllerin gelişmesini engeller. Bu sırada kandaki progesteron düzeyi yükselir ve gebelik için gerekli ortamın oluşması sağlanır (endometriyum kalınlaşması). Gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda gonadotropinlerin düşük olması nedeniyle luteal fazın sonunda korpus luteum dejenere olur ve bu dejenerasyon sonucunda kandaki östrojen ve progesteron düzeylerinde ani bir düşüş gerçekleşir. Bu düşüş sonucunda ön hipofiz-hipotalamus salgı mekanizması üzerindeki etki kalkar ve FSH düşük düzeylerde tekrar salgılanmaya başlar.

Bu salgı sonucunda yeni foliküller tekrar olgunlaşmaya başlar ve ovaryum döngüsü başa döner (Şekil 2.1) (1).

2.3. POLİKİSTİK OVER SENDROMU

Üreme çağındaki kadınları en çok etkileyen endokrinolojik düzensizlik tanı kriterine göre %8 ile %18 arasında prevalans gösteren polikistik over sendromudur (PKOS) (15). PKOS; 12 veya daha fazla sayıda 2-9 mm çapında değişen çatlamamış folikülleri içeren ovaryum morfolojisi için kullanılan polikistik over morfoloji (PKOM) (16) ve beraberinde gelen heterojen ve etiyolojisi kesin olmayan kompleks endokrin düzensizliği ifade eden bir sendromdur. Bu nedenlerle PKOS ve PKOM kavramları birbirinden farklı kavramlar olarak kabul edilmektedir (17).

Stein ve Leventhal tarafından yapılan çalışma, PKOS ile ilgili yayınlanmış ilk çalışmadır. Çalışmada genişlemiş çok sayıda kist içeren overlere sahip, kıllanma (hirsutizm) sorunu olan ve oligo/amenorrhea (adet kanamasının çok seyrek veya hiç olmaması) şikayetleri bulunan 7 kadın kullanılarak ilk defa kistik overler ile ilgili tanımlamalar ve sendromik sorunlar ele alınmıştır (18).

Genellikle PKOM, kronik yumurtlama bozukluğu, hiperandrojenizm (androjen yüksekliği), hirsutizm (erkek tipi kıllanma), insülin direnci, glikoz intoleransı ve hiperinsulinaemia (kandaki insülin düzeyinin aşırı yükselmesi) ile karakterize olan PKOS, hem hastaların yaşam kalitesini düşürmekte hem de uzun dönemde kanser, diyabet, hipertansiyon, obezite gibi hastalıklar ile birlikte infertilitenin en sık gösterilen nedenlerindedir (19).

2.3.1. PKOS'UN NEDENLERİ (ETİYOLOJİSİ)

Sendromun etiyolojisi ile ilgili kesin bir açıklama ve neden-sonuç ilişkisi bulunmamaktadır. Ancak çevresel ve genetik etkenlerden köken aldığını savunan çok sayıda hipotez mevcuttur (20). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda PKOS ile birlikte görülen fenotipin çocukluktan ergenliğe ve ergenlikten yetişkinliğe kadar çok farklı zamanlarda görülebildiği tespit edilmiştir. PKOS'ta genetik faktörlerin rolünün olduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır ancak poligenik bir sendrom olduğu bu nedenle de tek bir gen ile ilişkilendirilemediği düşünülmektedir (21–23). PKOS için beklenen klinik belirtilerin, erkeklik hormonlarının (androjenlerin) genetik olabilecek nedenlerden dolayı fazla salgılanması sonucunda

çocukluk çağı veya sonrasında ortaya çıktığına dair kanıtlar mevcuttur (24). Genetik faktörlerin yanında çevresel faktör olarak fetal dönemde (anne karnında) androjenlere maruz kalınması veya düşük doğum ağırlığı gibi nedenler de sendromun gelişmesinde rol oynayabilmektedir (25). Yapılan çalışmalarda PKOS ile birlikte sıklıkla gözlenen insülin direnci ve obezite de düşük doğum ağırlığı ile ilişkilendirilmiştir (17).

2.3.2. PKOS'TA TANI (DİAGNOSTİK)

PKOS'ta tanı koyulurken kullanılan kriterler ilk olarak 1990 yılında Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institute of Health - NIH) tarafından belirlenmiştir. Sonrasında yapılan çeşitli toplantılarda geliştirilerek günümüzde kullanılan tanı kriterleri belirlenmiştir. PKOS tanısı günümüzde 2004 yılında Rotterdam'da belirlenen ESHRE/ASRM (European Society of Human Reproduction and Embryology/American Society for Reproductive Medicine) konferansında alınan kararlara veya 2008 yılında AE-PCOS Society (Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society) konferansında alınan kararlara istinaden konulmaktadır.

İlk toplantı NIH, 1990 (26) kriterlerine göre;

- Klinik ve/veya biyokimyasal androjen yüksekliği (hiperandrojenizm)
- Yumurtlama düzensizliği veya eksikliği (oligo-ovulation) (oligo/amenorrhea)
- PKOS'un neden olabileceği diğer herhangi bir durum ile birlikte yukarıdaki kriterlerinden hepsinin sendromlu bireylerde görülmesi gerekmektedir.

2004 yılı ESHRE/ASRM (Rotterdam) (27) kriterlerine göre;

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

2008 yılı AE-PCOS Society (28) kriterlerine göre;

- Klinik ve/veya biyokimyasal androjen yüksekliği (hiperandrojenizm)
- Yumurtlama düzensizliği ve/veya PKOM kriterlerinin hastada görülmesi yeterlidir.

2.3.3. İNFERTİLİTE VE PKOS ARASINDAKİ İLİŞKİ

PKOS tanısı görülen kadınlarda %40 oranında PKOS bağlantılı infertilite görülmektedir (29). Anovulasyon (yumurtlayamama) sorunu olan kadınlarda PKOS teşhisi koyulma oranı %90-

95 düzeyine çıkmaktadır. Bu nedenlerle PKOS yumurtlama sorunlarına bağılı infertilitenin en yaygın neden olarak belirlenmiştir. PKOS teşhisi koyulmuş bir kadında primordial folikül sayısı normal düzeylerde iken primer ve sekonder foliküllerin sayısı ciddi oranda artmıştır. Foliküler olgunlaşma için gerekli olan faktörlerin (hormonlar ve diğere faktörler) salgılanmasındaki düzensizlik nedeniyle foliküller 2-9 mm büyüklüğe ulaştıklarında foliküler olgunlaşmada duraksamalar ve aksamalar meydana gelir. Normal süreç için gerekli olan baskın folikülün gelişmemesi nedeniyle yumurtlama gerçekleşemez. Bu durum çatlamamış foliküllerin yumurtalıklar içinde birikmesine (yani PKOM gelişmesine), aynı zamanda da olgun bir yumurta hücresinin serbest kalamaması nedeniyle infertiliteye neden olmaktadır (30).

2.4. *In-vitro* FERTİLİZASYON YÖNTEMİ

İlk “test tüpü bebeği”nin doğumundan bu zamana kadar geçen 25 yılda *in-vitro* fertilizasyon (IVF) yöntemi yani *in-vitro* (vücut dışı) koşullarda fertilizasyonun gerçekleştirilmesi oldukça geliştirilmiştir. Özellikle oositin folikül içerisinde mikroçevresiyle (mural ve kümülüs granüloza hücreleri ile ve folikül sıvısının sağladığı ortam ile) etkileşimine ait mekanizmaların bir kısmı aydınlatıldıktan sonra yöntem üzerinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir.

İn-vitro fertilizasyon yöntemi geçmişte fallop tüplerinden kaynaklanan “tübal faktörlü kısırlık” durumu için geliştirilmiş bir yöntemdir. Ancak günümüzde birçok farklı infertilite durumunda yönetime başvurulmaktadır. IVF yönteminin ilk defa kullanıldığı dönemlerde menstürasyon döngüsü sırasında rastgele gelişen tek bir baskın folikül seçilerek kullanılır ancak bu durumun fertilitte oranlarının düşük olmasına neden olduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle bireylere gonadotropin hormonlar verilerek normalden fazla yumurtlama (süperovülasyon) sağlanmış ve çok sayıda embriyo arasından transfere en uygun olanlar seçilmeye başlanmıştır. Bu durum fertilitte oranları artırırken transfer edilmeyen embriyoların özel yöntemlerle dondurulması sonucu sonraki transfer denemeleri için saklanabilmesine olanak vermiştir.

Gonadotropin salgılatıcı hormonun (GnRH) ve gonadotropinlerin (FSH ve LH) belirli aralıklarla hastaya verilmesi sonucunda birden fazla oositin ve folikülün olgunlaşması tetiklenir (süperovülasyon). Olgunlaşan oositler ise Graafian folikül yapısı içerisinde

laparoskopik yöntem folikül içerisinde toplanır. Toplama işlemi (oosit pick-up – OPU) işlemi sırasında folikül sıvısı, mural ve kümülüs granüloza hücreleri oosit ile birlikte alınır. Her OPU sırasında yaklaşık olarak 10-20 adet oosit elde edilir. MGH ve KGH'lerden ayrılan oosit fallop tüpleri ile aynı özelliklere sahip steril kültür ortamında 37 °C'de inkübe edilirler. Kültür ortamına 100.000 ile 200.000 arasında sperm hücresi bırakılır veya her bir yumurtaya sperm doğrudan sitoplazma için enjeksiyon (intrasisitoplazmik sperm enjeksiyonu – ICSI) ile verilir ve döllenme gerçekleşir.

En iyi durumda (morfolojik olarak) olduğu düşünülen embriyolar döllenme sonrasındaki 3-5 gün içerisinde transfer işlemi için seçilir. Embriyo transferinden sonra rahim duvarının (endometriyum) duyarlılığının artması ve embriyonun kolay tutunabilmesi için dışarıdan progesteron hormonu verilir (31).

2.5. MİKRORNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar) küçük, endojen, 21-25 baz uzunluğunda RNA molekülleridir. Protein kodlamayan miRNA'lar, gen ifadesinin düzenlenmesinde translasyonun baskılanmasını ve mesajcı RNA'ların (messenger RNA – mRNA) degradasyonunu sağlayarak rol oynarlar (32).

2.5.1. MİKRORNA'LARIN SENTEZİ (BİYOGENEZİ)

MikroRNAların sentezi 3 aşamada gerçekleşmektedir. Başlangıç olarak miRNA'ların DNA üzerinde bulunan gen bölgelerinden primer miRNA (pri-miRNA) olarak transkripsiyonu gerçekleşmektedir. Daha sonra sentezlenen bu pri-miRNA molekülleri, nükleus içerisinde prekürsör miRNA (pre-miRNA)'lara ve son olarak da sitoplazmaya taşınarak burada olgun miRNA'lara dönüşmektedirler (Şekil 2.3.) (33).

RNA polimeraz II enzimi miRNA'ları primer transkript (pri-miRNA) olarak sentezlemektedir. 500-3000 baz arasında uzunluğu değişen pri-miRNA'lar, cap (şapka) ve poly (A) kuyruğuna (çok sayıda Adenin bazı içeren kuyruk yapısı) sahip sap-ilmik yapılarındadır. Çekirdek içerisinde pri-miRNA'lar bir endonükleaz olan Drosha (RNA III enzim ailesinin bir üyesi) ve kofaktörü Pasha (DGCR8) (çift iplikli RNA bağlayıcı bir protein) aracılığıyla yaklaşık 70 nükleotid uzunluğunda olan pre-miRNA şekline dönüştürülürler. Pasha ve Drosha'dan oluşan yapıya mikroişlemci (microprocessor) kompleks adı verilmektedir (34).

Pre-miRNA halini alan molekül bir taşıma reseptörü olan Exportin 5 aracılığıyla RAN-GTP'ye bağımlı olarak çekirdek zarından sitoplazmaya taşınır (35). Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar RNAaz III enzim ailesinden bir endonükleaz olan Dicer enzimi tarafından kesilerek 18-24 nükleotid uzunluğunda çift zincirli miRNA:miRNA ikili yapısına dönüştürülür (36). Dicer, miRNA:miRNA dubleksinin sap-ilmliğini keserken RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (RNA-induced silencing complex; RISC) oluşumunu da başlatır (37) ve kesim sonrasında oluşan miRNA zincirlerinden yalnızca bir tanesi oluşan RISC yapısına katılır. RISC yapısı içerisinde bulunan Argonaute enziminin (RNaz) (AGO) etkisiyle iki miRNA zincirinden bir tanesi seçilir (kılavuz iplik). Diğer zincir, anti-kılavuz iplik olarak adlandırılır. RISC kompleksi, yolcu iplik olarak da adlandırılan anti-kılavuz ipliği substratı olarak sindirir. mikroRNA moleküller RISC kompleksi ile bütünleşerek AGO proteinleri ile birlikte translasyonunun (protein sentezinin) baskılanmasına veya mRNA moleküllerinin yıkımına neden olarak etki gösterirler (38).

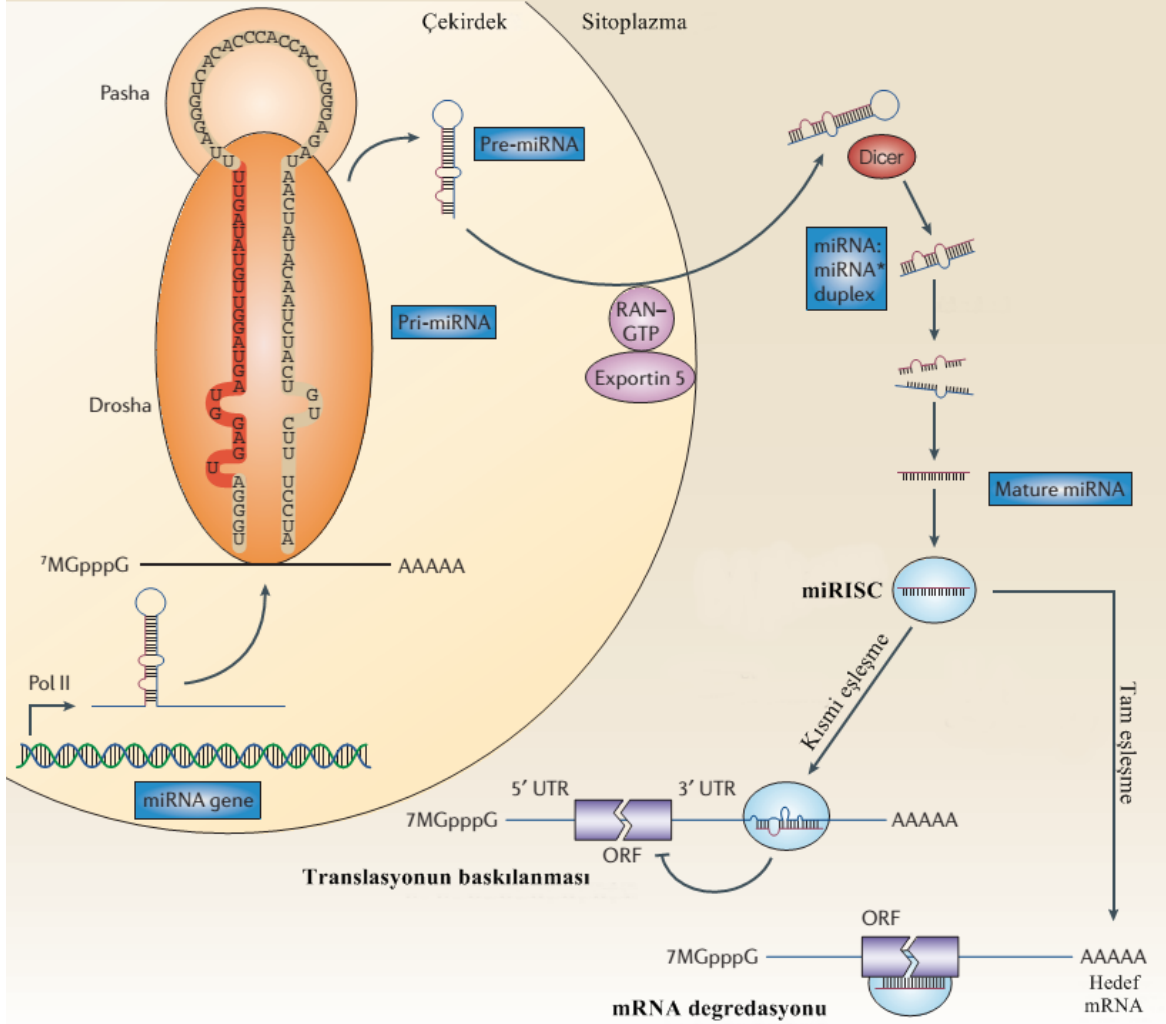
miRNA biyogenezi sonucunda oluşan her iki zincir de aynı etkinlikte değildir. Oluşan zincirlerden hangisinin olgunlaşacağı ve aktif miRNA molekülü olacağı miRNA zincirinin genetik kodu ve termodinamik etkileşimleri ile belirlenmektedir (39). Yeni nesil sekanslama yöntemleri ile yapılan çalışmalar miRNA* olarak ifade edilen anti-kılavuz ipliğin de yıkıma uğramadığını ve aktivite gösterebildiğini göstermiştir (40).

2.5.2. MİKRORNA'LARIN ETKİ MEKANİZMASI

miRNA molekülleri olgunlaşmalarının ardından 2 farklı mekanizma aracılığıyla gen ifadesini düzenlerler; mRNA ile tam komplementerite durumunda mRNA zincirinin degradasyonu şeklinde veya düşük bağlanma yüzdelinde regülasyon translasyonun baskılanması şeklindedir (Şekil 2.3.) (41,42).

miRNA'lar gen ifadesinin regülasyonunu yukarıda bahsedilen 2 farklı mekanizma aracılığıyla ancak biyokimyasal olarak birkaç farklı yolla gerçekleştirmektedir; 1) miRISC kompleksinin mRNA molekülüne bağlanması sonucunda poly (A) kuyruğundaki Adenin molekülleri kopar (deadenilasyon) ve deadenile olan mRNA molekülleri işlem cisimcikleri (processing bodies – p-bodies) içine taşınır ve degradasyona uğrar veya depolanır, 2) miRISC yapısının mRNA'ya yapışmasından sonra mRNA'nın şapka (cap) yapısını değiştirir protein sentezinin başlamasını durdurur, 3) miRISC'in mRNA'ya bağlanmasının etkisi ile

translasyon sırasında oluşan polipeptid zinciri yıkıma (proteolizis) uğrar, 4) miRISC mRNA'ya bağlanarak translasyon için mRNA'ya bağlanan ribozomların mRNA zinciri üzerinden düşmesine ve protein sentezinin yavaşlamasına neden olmaktadır (43).



Şekil 2.3. miRNA sentezini ve etki mekanizmasını gösterir şema. (He ve ark.'dan adapte edilmiştir.) (44)

2.5.3. MİKRORNA'LARIN FONKSİYONU

Yapılan çalışmalar *Lin-4* ve *Let-7* gibi miRNA'ların fonksiyonunun gelişimsel zamanlamadaki rolü hakkında fikir vermektedir. Bununla birlikte bu rol moleküllerin hücre içerisindeki birçok görevinden yalnızca bir tanesidir. Pek çok model organizma üzerinde miRNA'ların sentezi (biyogenez) sırasında önemli rollere sahip Dicer enziminin ve AGO proteininin durdurulması ile yapılan çalışmalar bu küçük RNA moleküllerinin embriyo gelişimi, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz, tümör oluşumunun baskılanması gibi birçok

yolakta aktif rol aldıklarını göstermektedir. Bu durum miRNA aktivitesinin canlıların biyolojik süreçleri için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (44).

2.6. PKOS'TA DEĞİŞEN GEN İFADESİ

Yapılan çalışmalar PKOS gibi metabolik bir sendromun birden fazla faktörden ve farklı aşamalarda etkilendiğini göstermiştir. PKOS metabolik olarak bireyin hormonal dengesini bozarak hirsutizm, insülin direnci gibi düzensizlikler gelişmesine neden olurken, özellikle yumurtalık dokusunda ve foliküllerde hücresel-moleküler düzeyde değişimler ile ilişkilendirilmiştir. Hücresel boyutta PKOS'lu kadınlarda folikülü oluşturan teka, mural granüloza (MG) ve kümülüs granüloza (KG) gibi hücrelerde çeşitli genlerde kontrol grubundaki bireylere göre ifade farklılığı olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu değişimlerin PKOS sonucu mu olduğu yoksa bu değişimler sonucu mu bireyde PKOS geliştiği tam olarak netlik kazanamamaktadır (14).

Wood ve arkadaşlarının 2004 yılında PKOS'lu kadınlardan aldıkları örnekleri kontrol grubuna göre kıyaslayarak yaptıkları çalışma teka hücrelerinde Wnt sinyal yolağında yer alan genlerin PKOS'lu bireylerde ifadelerinin değiştiğini göstermiştir (45). Wnt sinyal yolağı hücrenin proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini etkileyen gelişimsel bir yoldur. Bu nedenle bu yolaktaki bozulmaların folikül olgunlaşmasını etkileyerek PKOS gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmüştür (46).

Benzer olarak yapılan çalışmalarda MAPK (47), TGF- β (48), insülin (49), GnRH (50) gibi sinyal yollarında yer alan genlerin PKOS'ta ifade değişimi gösterdiği ve bu yollardaki sinyal bozulması ile PKOS'un ilişkili olabileceği gösterilmiştir.

2.7. miRNA VE PKOS

Günümüzde miRNA'ların yumurtalıklarda folikül gelişiminde, oosit olgunlaşmasında ve fertilizasyonda oynadıkları roller ile ilgili makaleler bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar sayesinde PKOS gibi metabolik bir düzensizlikte teka hücre tabakası, mural granüloza hücreleri, kümülüs granüloza hücreleri ve foliküler sıvı gibi oosit mikroçevresini oluşturan katmanlarda değişen miRNA ifadesi ve etkileri aydınlatılmaya başlanmıştır (51–53). 2019 yılı itibarıyla yapılan çalışmalar ve bu çalışmaların derlenmesi ile yazılan makaleler

sayesinde PKOS'un pato-fizyolojisi ve miRNA moleküllerinin burada rolü hakkında daha detaylı bilgiler açığa çıkmaktadır (54–56).

Sang ve ark. tarafından 2013 yılında AE-PCOS kriterine göre PKOS teşhisi konulmuş kadınlarda kontrol grubuna göre 2 miRNA'nın (hsa-miR-132 ve hsa-miR-320) ifadesinin anlamlı olarak düştüğü tespit edilmiştir. Çalışma yapılırken insan vücut sıvılarında ortak olarak bulunan ve diğer memelilerin yumurtalıkları ile yapılan çalışmalarda tanımlanan miRNA'lar'dan yola çıkılmıştır. Yine ilgili miRNA'lar daha önce yapılan çalışmalarda da PKOS bağlantılı tip-2 diyabet ve insülin direnci (Insulin resistance – IR) ile ilişkilendirilmişlerdir (51).

Rotterdam kriterlerine göre teşhis edilen PKOS'lu kadınlar ile kontrol grubundan folikül sıvısı alınarak 2014 yılında Roth ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada miRNA ifade profilleri kıyaslanmıştır. Yapılan analizler sonucunda 5 farklı miRNA ifadesinin 2 grup arasında anlamlı olarak artış gösterdiği belirlenmiştir (52).

Song ve arkadaşlarının 2019 yılında yayınladığı makalede 6 aday miRNA'dan 2 tanesinin (hsa-miR-135a ve hsa-miR-186) PKOS'lu kadınlardan alınan mural granüloza hücrelerinde ifadesinin arttığı raporlanmıştır. Çalışmada 83 kadından alınan örnekler kullanılmıştır ve bu kadınlardan 63 tanesine Rotterdam kriterlerine göre PKOS teşhisi koyulmuştur. Bu iki miRNA'nın MGH proliferasyonu ve apoptozunda rol oynayan *ESR2* ve *CDKN1A* genlerine etki ettiği tespit edilmiştir (54).

2019 yılında Che ve arkadaşları yapılan çalışmada 20 tanesi PKOS teşhisi konulmuş 20 tanesi kontrol olmak üzere 40 kadın üzerinde yapılan mikrodizin çalışmasında analizler sonucunda 1032 miRNA benzeri fonksiyon gösteren ve circRNA'nın (circular RNA) PKOS ve kontrol grubu arasında ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (56).

Laboratuvarımızda 2014 yılında tarafımdan savunulan yüksek lisans tezi ve 2015 yılında tamamlanan 112S579 numaralı TÜBİTAK 3501 projesi sonucunda da 7 adet miRNA'nın PKOS ve kontrol grubu arasında ifade farklılığı gösterilmiş, bu miRNA'lar'dan 2 tanesinin (hsa-miR-3135b ve hsa-miR-4417) ifade farklılığı mikrodizin yöntemi ile birlikte eş-zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Eş-zamanlı kantitatif PZR) (quantitative real-time polymerase chain reaction - qRT-PCR) ile doğrulanmıştır. Bu miRNA'ların

fonksiyonları hedefledikleri potansiyel genler ile birlikte değerlendirildiğinde ifade düzensizliklerinin PKOS gelişiminde rol oynayabileceği düşünülmektedir (57).

PKOS'ta miRNA'lar'ın rolünün daha iyi anlaşılması ve PKOS'un moleküler mekanizmalarının aydınlatılması için Graafian folikülünü, yumurta mikroçevresini, folikül sıvısını oluşturan ve aynı öncül granüloza hücrelerinden köken alan mural granüloza hücreleri ve kümüls granüloza hücrelerindeki miRNA ifade profillerinin gösterdiği değişikliklerin tespit edilebilmesi gerekmektedir (58). Literatürde günümüze kadar yapılan çalışmalarda PKOS'ta MGH ve KGH'ler kullanılarak yapılan böyle bir çalışma bulunmamaktadır.

2.8. MİKRODİZİN YÖNTEMİ

Moleküler biyolojide kullanılan metotların çoğunluğunda deney başına tek bir gen lokusunun analizi mümkündür. Bu durum her deneyde bir veya bir grup mRNA veya miRNA ifadesinin tespit edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Gen ve miRNA gibi moleküllerin tamamının bir hastalık veya düzensizlik durumunda değişimini görmek bu geleneksel metotlar ile oldukça zor ve uzundur. Organizmalara ait binlerce genin bilgisi bir çip üzerinde mikrodizin teknolojisi sayesinde görüntülenebilmektedir. Bu genomik veya transkriptomik bilgi sayesinde aynı anda binlerce genin etkileşimleri tespit edilebilmektedir (59).

2.8.1. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİ

Mikrodizin yöntemi genellikle çip adı verilen cam, silikon veya naylon membranlar üzerinde bulunan küçük alanlara (mikro) yerleştirilmiş tek iplikli çok sayıda DNA parçacıkları (dizin) ile genomda depolanmış bilgileri taşıyan hedef nükleik asit zincirlerinin hibridize olması temeline dayanan ve bu hibridizasyon sonucu açığa çıkan bilginin incelenmesi ile yorumlanan bir tekniktir. Yöntem sayesinde bir organizmadaki belirli bir grup molekülün veya o molekül ailesinin tamamının ifade seviyeleri veya eşleşme durumları çok küçük bir alanda incelenebilmektedir. Amaç ve uygulanan yöntem açısından farklılıklar olabilirken "DNA çip", "DNA array" ve "mikroçip" kavramları da benzer uygulamaları ifade edebilmektedir.

2.8.2. MİKRODİZİN TEKNOLOJİSİNİN KULLANIM ALANLARI

Aynı anda binlerce genin genomik ve transkriptomik verisinin tespitini sağlayan yüksek işlem hacimli bir yöntem olarak mikrodizin; iki grup arasındaki gen ifade farklılıklarının tespitinde, hastalıkların tanısında, patojenite analizlerinde, polimorfizm ve/veya mutasyonların tespitinde, toksikogenomik ve farmakogenetikte kullanılan bir teknolojidir (60).

2.8.3. MİKRODİZİN PLATFORMLARI

Mikrodizin yönteminde kullanılan çipler üretim teknolojileri ve kullandıkları temel materyale (cam, silikon vb.) göre çeşitlilik göstererek farklı üreticiler tarafından üretilmektedir. Üretici firmalar aynı zamanda araştırmacıların isteklerine göre özel tasarım çipler de üretebilmektedir. Günümüzde Agilent, Affymetrix (Thermo Sci.) ve Illumina gibi firmalar bilinen çip üreticileri olarak anılmaktadır.

Her üretici tarafından tasarlanan her model çip “platform” olarak adlandırılmaktadır. Yeni platform terimi hem marka bilgisini hem de spesifik bir iş için tasarlanmış model bir çipi ifade etmektedir. Klinik tanıya kullanıma uygun olarak tasarlanmış platformlar olduğu gibi araştırmacıların sıklıkla başvurduğu mRNA ifade profillemesi çıkartılabilen platformlar da bulunmaktadır. Yukarıda daha önce de belirtildiği gibi özel bir sebep ile araştırmacıların isteği üzerine üretici firmalar özel platformlar da tasarlayabilmektedir (60).

Bir çalışmada kullanılan mikrodizin çiplerinin aynı platformda yapılması çalışma içerisinde güvenilirliği artırmak ve sonuçları daha kıyaslanabilir hale getirmek açısından önemlidir. Mikrodizin verilerinin teknik ve sistemik sorunlardan arındırılarak gerçek biyolojik verinin açığa çıkarılması ve bu biyolojik verinin kıyaslanabilmesi adına “ön-işleme” olarak adlandırılan özel işlemlerden geçmektedir. Ön işleme temel olarak 3 aşamadan oluşmaktadır (61).

Çip üzerinde dizin kümelerinin bulunduğu noktalara spot adı verilmektedir. Çalışma sonrasında bu spot bölgelerinden gelen sinyallerin bir kısmı gerçek biyolojik veriye ait değildir. Bu sinyaller floresan boya ile işaretlenmiş nükleik asitlerin spesifik olmayan bağlanmaları, yıkama aşaması sonrasında çip üzerinde kalan floresan boya artıkları veya çipi tarayan sistemden kaynaklı arka plan gürültüsünden oluşabilmektedir. Birinci aşama olan

arka plan düzeltmesinde (Background correction) bu teknik sorunlardan kaynaklı kirlilik ve gürültü matematiksel olarak elenir ve düzenlenir. İkinci aşama olarak normalizasyon (normalization) adımı gelir ve örnekler matematiksel olarak kıyaslanabilir bir düzleme çekilir. Bu aşamada amaç örneklerdeki farklı koşullardan kaynaklı ifade farklılıkları yerine gerçek biyolojik ifade farklılık ortaya çıkarılması için bir düzlem oluşturmaktır. Son aşama olan özetlemede (summarization) ise prob seti denilen ve 11-20 arasında probdan oluşan bölgeler birden çok ışımadan kaynaklanan çoklu değerden tek bir ışımaya değerine matematiksel olarak indirgenir (62). Bu işlemlere örnek vermek gerekirse Affymetrix firmasının geliştirdiği MAS5.0 ve farklı platformlarda oldukça sağlıklı sonuç verebilen RMA (robust multiarray algorithm) algoritmalarından bahsedilebilir (61).

2.8.4. MİKRODİZİN VERİTABANLARI

Mikrodizin çalışmaları sonucu çıkan verilerin saklanabilmesi, bütün bilim insanlarının kullanımına açık hale gelmesi ve çiplere yüklenen örneklerin özelliklerinin, klinik veya patolojik verilerinin paylaşabilmesi için internet tabanlı büyük veri-tabanları kullanılmaktadır. Bu veri-tabanları ilgili verileri belirli bir standartta depolayabilmek ve kullanıcılara ulaştırabilmek adına “mikrodizin çalışmasının en temel bilgileri” (Minimum information about a microarray experiment – MIAME) olarak isimlendirilen kriterler ile kabul etmekte ve depolamaktadırlar (63).

Bu kriterlere göre; ham veri, veri-örnek bağlantıları ve platform bilgisi gibi temel bilgiler başta olmak üzere ek olarak deney ile ilgili temel bilgiler, deneysel tasarım bilgileri, platform ile ilgili tanımlama bilgileri ve koordinatlar gibi kimliklendirme (anotasyon) bilgileri, kullanılan veri işleme protokolleri (ön işleme basamakları) ilgili veri-tabanlarından ulaşılabilir formatta olmalıdır (63).

MIAME kriterlerine göre çalışan ve açık veri-tabanlarından en çok kullanılanları aşağıda sıralanmıştır:

2.8.4.1. ArrayExpress

İnternet sitesi linki: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

The European Bioinformatics Institute (EBI); kapsamı büyük ve Avrupa kökenli bir veri-tabanıdır. ArrayExpress ise mikrodizin verilerinin tutulduğu bir proje olarak EBI'nın altında yer almaktadır.

Güncel olarak (2019 yılı Aralık ayı verilerine göre) ArrayExpress üzerinde 2.409.630 örnek ve bu örneklerin bulunduğu 72.633 veri-seti bulunmaktadır ve bu biyolojik veri 55.83 terabayt (TB) depolama alanı kaplamaktadır (64).

2.8.4.2. GEO (Gene Expression Omnibus)

İnternet sitesi linki: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Açık adı Gene Expression Omnibus olan GEO; dünyanın en kapsamlı biyolojik veri-tabanı olan Amerika Birleşik Devletleri (ABD) kökenli NCBI'nın (National Center for Biotechnology Information) altında bulunan mikrodizin veri-tabanı projesidir.

Güncel bilgiler kontrol edildiğinde GEO'da günümüzde (2019 yılı Aralık ayı verilerine göre) 3.354.009 adet örnek, 20.465 çeşit platform ile çalışılmıştır ve ortaya 122.453 çalışma çıkmıştır. Bu çalışmalardan 4.348 tanesi ise GEO araştırmacıları tarafından kontrol ve analiz edilerek veri-setleri (data-set) haline getirilmiştir (65).

Hem GEO hem de ArrayExpress veri-tabanlarında bulunan araçlar ve bağlantılar ile verilerin bulunduğu çalışmalar ve bu çalışmaların yapıldığı farklı platformlar hakkında bilgi edinilebilmekte ve temel araçlar sayesinde basit analizler yapılabilmektedir (64,65).

2.8.5. META-ANALİZ YÖNTEMİ

Meta-analiz istatistiksel bir yöntem olmakla birlikte bir konu üzerinde farklı zaman dilimlerinde ve farklı merkezlerde yapılan araştırmalara ait sonuçları niteliksel ve niceliksel olarak birleştirmek için kullanılmaktadır. Birçok veri meta-analiz yöntemi ile birleştirilebilmektedir ancak mikrodizin veri-tabanlarında bulunan verinin düzenli oluşu ve MIAME kriterleri ile sağlanan veri detayları yöntemin mikrodizin çalışmaları için daha uygulanabilir olmasını mümkün kılmıştır.

Meta-analiz yöntemi ile farklı yer ve zamanda yapılan mikrodizin çalışmalarının bir araya getirilmesi ile ortaya çıkan bilgi, verilerin kendi içlerinde yapılan analizler sonucu çıkan

bilgiden daha geniş kapsamlı, örneklem kümesinin büyümesinden dolayı daha genellenebilir ve anlamlı olmaktadır. Bu durum meta-analiz yönteminin istatistiksel bir güç getirdiğini göstermekte ve veri-tabanlarına yüklenen veriler ile yöntemin kullanılması durumunda daha önce tespit edilemeyen biyolojik verilerin açığa çıkmasına olanak sağlamaktadır.

Meta-analiz yöntemlerini temelde iki farklı gruba ayırarak incelemek mümkündür. Çalışmaların kendi içlerinde analiz edilmesi ve çıkan sonuçların istatistik bilimi kullanılarak bir araya getirilmesi bir grubu oluştururken, ikinci yöntem farklı merkezlerde farklı zamanlarda yapılan çalışmalara ait ham verilerin herhangi bir işlemde geçmeden bir araya koyularak tek bir çalışma gibi analiz edilmesidir (Naiv meta-analiz yöntemi). Bu gruplandırmalara rağmen bu yöntemleri her çalışmanın kendisine özgü olarak değerlendirmek gerekmektedir. Her iki yöntemde de farklı çalışmalarda farklı avantajlar ve dezavantajlar ortaya çıkmaktadır. Buna örnek vermek gerekirse, mikrodizin yöntemine ait verilerin kullanıldığı bir meta-analiz çalışmasında, aynı platformun kullanıldığı veri setlerinde naiv meta-analiz yöntemini kullanmak örneklem kümesini genişleteceği için ve teknik farklılardan en alt düzeyde etkileneceği için avantaj sağlarken, farklı platformların kullanıldığı veri setlerinde birçok teknik farkı beraberinde getirecek ve gerçek biyolojik verinin bundan etkilenmesine neden olacaktır (66).

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Üreme çağındaki kadınları yüksek bir prevalans (%8-18) ile etkileyen PKOS; anovulatuvar infertilitenin en sık rastlanan sebeplerinden biri olan endokrin bir düzensizliktir. miRNA'lar ise gen regülasyonunda; transkripsiyonun baskılanması veya mRNA molekülün degradasyonu şeklinde rol oynayan, küçük endojen RNA molekülleridir. Bu küçük düzenleyici RNA moleküllerinin kadın üreme sistemindeki rolleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak yapılan çalışmalar yumurtalıklarda ve yumurta mikroçevresinde gerçekleşen gen ifade düzensizliklerinin PKOS gibi metabolik sendromlar ve infertilite ile ilişkisi olduğunu göstermektedir. Bu durum da miRNA'ların kadın üreme sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılması konusunun önemine dikkat çekmektedir. Bu önem; Dicer 1 proteininin (miRNA biyogenezinde kilit bir role sahiptir) farelerde yumurtalık dokusunda delesyona uğratılması sonucu infertilite artışı ile daha da dikkat çekici bir hale gelmiştir. Bu bulgular bir yumurta hücresinin, çevresindeki somatik hücreler ile etkileşime girdiğini, bu hücrelerden gelen sinyaller doğrultusunda gelişerek olgunlaştığını ve miRNA'ların bu süreçte etkin bir rolünün olduğunu göstermektedir. Yumurta mikroçevresinde yer alan ve yumurta ile doğrudan temas halinde olan kümülüs granüloza hücreleri ile dışarıdan gelen sinyallere göre mikroçevre şartlarını düzenleyen MGH'lerin PKOS durumundaki ifade değişikliklerinin aydınlatılması önem taşımaktadır.

Daha önce yapılan yüksek lisans tez çalışmamda PKOS grubu ve kontrol grubu bireyler arasında mural granüloza hücrelerinde miRNA ifade farklılıklarına bakılmış ve 7 adet miRNA'nın iki grup arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların hedef analizleri ve bu hedeflere ait yolak analizleri yapıldığında bu hedeflerin özellikle hücre farklılaşması (diferansiyasyon) ve hücre proliferasyonunda yer alan yolaklarda zenginleştiği bulunmuştur. Bu durum; KGH ve MGH'lerin öncül granüloza hücrelerinden köken aldığı bilgisinden yola çıkarak PKOS durumunda iki hücre grubu arasında farklılaşma ile ilgili yolakların düzensizleşmesi ile ilgili soru işaretlerini aklımıza getirmiştir. Dolayısıyla PKOS'ta bu iki somatik hücre grubunda gerçekleşen moleküler değişikliklerin aydınlatılması sendromun tanı ve tedavisine katkı sağlayacaktır.

Elde ettiğimiz ön verilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında; PKOS'lu bireylere ait MGH'ler ile KGH'ler arasındaki mRNA ve miRNA ifade profillerini karşılaştırmak ve

mikroçevreyi oluşturan bu iki önemli hücre grubundaki mRNA ve miRNA ifade değişikliklerini tespit ederek PKOS'u moleküler düzeyde aydınlatabilmek amaçlanmıştır.

Günümüze kadar infertilitenin en önde gelen sebeplerinden bir tanesi olan PKOS'ta yumurta mikroçevresindeki değişiklikleri mural ve kümülüs granüloza hücrelerinin etkileşimleri, farklılaşma (diferansiyasyon) durumları ile ele alarak bu süreçte rol oynadığı düşünülen genlerin ve miRNA'ların ifade profillerini aydınlatan bir çalışma rapor edilmemiştir. Bu çalışmada, literatürde şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kullanılan mural ve kümülüs granüloza hücrelerinin mikrodizin mRNA ifade profilleri ile bağımsız olarak tarafımızdan toplanan örneklerle ait miRNA ifade profilleri beraber değerlendirilmiş ve PKOS'un yumurta mikroçevresinde bulunan bu somatik hücreler ile ilişkisine ait moleküler temeller aydınlatılmaya çalışılmıştır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

4.1.1. VERİTABANLARINDAN TOPLANAN MİKRODİZİN ÇALIŞMALARI

GEO ve ArrayExpress veri-tabanlarında PKOS'lu bireylerden ve kontrol gruplarından toplanmış MGH ve KGH'lere ait mikrodizin ifade verileri seçilmiştir. Veri setleri ile ilgili daha detaylı bilgi "Araştırma Bulguları" bölümünde verilmektedir.

4.1.2. PKOS'LU ÖRNEKLER

Bu çalışmada Özel HRS Ankara Kadın Hastanesi'nde ve Ankara Liv Hospital'da *in-vitro* fertilizasyon (IVF) işlemi için uygulanan oosit toplama (oocyte pick-up - OPU) işlemi sırasında aspire edilen folikül sıvısından izole edilen MGH'ler ve KGH'ler kullanılmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri;

- Çalışmaya katılmayı kabul etmek
- PKOS haricinde infertiliteye neden olabilecek başka bir hastalığa sahip olmamak
- Açıklanamayan infertiliteye sahip olmamak

Çalışmadan dışlanma kriterleri;

- Çalışmaya katılmayı reddetmek
- PKOS haricinde infertiliteye neden olabilecek başka bir sendrom veya hastalığa veya 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 2) ve folikül sıvısı 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 10	PKOS	-	-
PK 11	PKOS	-	-
PK 12	PKOS	-	-
PK 16	PKOS	-	-
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

4.1.3. TAMAMLAYICI DNA (cDNA) SENTEZ REAKSİYONU KİTLERİ VE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR KİTLERİ

mRNA'lardan cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, 04379012001) kullanılmıştır.

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

mRNA'lar ile eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu için LightCycler 480 Syber Green Master Kit (Roche, 4707516001) kullanılmıştır.

miRNA'lar ile eş-zamanlı kantitatif PZR reaksiyonu için miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen, 218073) kullanılmıştır.

Tüm eş-zamanlı kantitatif PZR çalışmaları LightCycler 480 (Roche, 05015243001) cihazında gerçekleştirilmiştir.

4.1.4. PRİMERLER

4.1.4.1. mRNA Primerleri

Çizelge 4.2. Eş-zamanlı kantitatif PZR’de kullanılan ve laboratuvarımızda tasarlanan mRNA primerlerinin uzunlukları (baz çifti (bç) olarak), ürün boyları (bç olarak) ve sekans bilgilerinin gösterir çizelge.

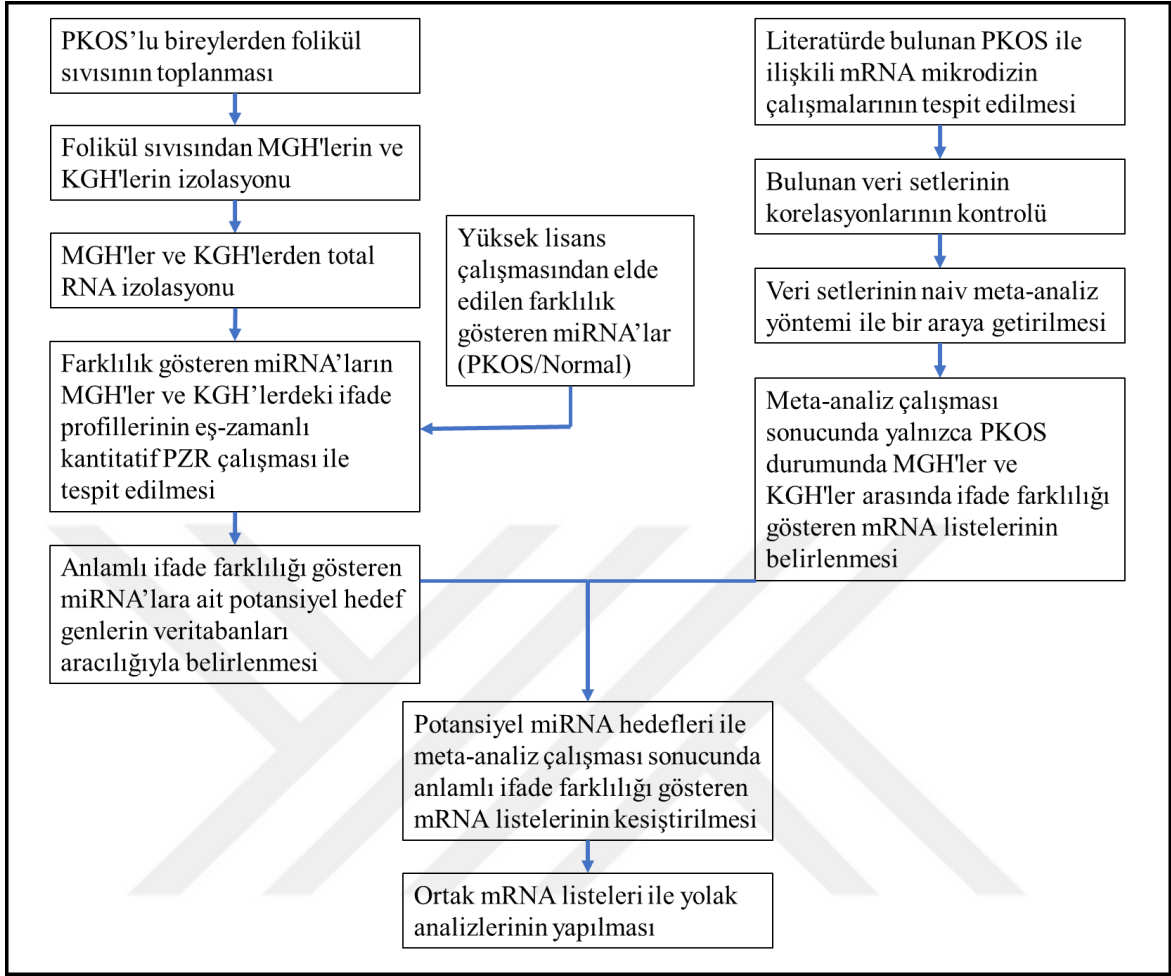
Gen İsmi	D/T	Primer Uzunluğu (bç)	Ürün Boyu (bç)	Sekans
ACTB	D	20	125	CCAACCGCGAGAAGATGACC
	T	20		GGAGTCCATCACGATGCCAG
INSR	D	20	191	TGGATTCCGTGGAGGATAAT
	T	20		GCCGTGTGACTTACAGATGG
FZD3	D	20	179	GGCATATAGGTGGGCACAGT
	T	20		GAAATCCCGAGAACAATCCA
MAPK1	D	19	189	ATCGCCGAAGCACCATTCA
	T	20		CAGGGGTCAAGAACTGGGAA
MAPK14	D	21	198	TATGCGTCTGACAGGAACACC
	T	20		TGGGCCGCTGTAATTCTCTT
RUNX2	D	19	217	GACAGCCCCAACTTCCTGT
	T	22		CCACAAATCTCAGATCGTTGAA
PTPRC	D	20	155	TTAGGGACACGGCTGACTTC
	T	20		GAACACTGGGCATCTTTGCT
JUNB	D	20	101	AACAGCCCTTCTACCACGAC
	T	20		CAGGCTCGGTTTCAGGAGTT
FOS	D	20	181	GGGGCAAGGTGGAACAGTTA
	T	20		AGGTTGGCAATCTCGGTCTG

4.1.4.2. miRNA Primerleri

Çizelge 4.3. Eş-zamanlı kantitatif PZR’de kullanılan miRNA primerlerinin kısa adları (hsa-miR), katalog numaraları, sekans dizileri ve kullanılan marka kataloğunda bulunan ürün adı bilgilerini gösterir çizelge.

miRNA	Kat. No.	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	UGAGUGCCGGUGCCUGCCUG
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.

PKOS'lu bireylerden folikül sıvısının toplanması, folikül sıvısından MGH'lerin ve KGH'lerin izolasyonu ve bu hücre gruplarından total RNA izolasyonunun yapılması, izole edilen RNA miktarının belirlenmesi, RNA bütünlüğünün kontrolü işlemlerinde Yüksek Lisans Tezi'mde uygulanan aynı süreç ve yöntemler izlenmiştir. Bu yöntemlere ilişkin detaylar Ek-1'de belirtilmiştir.

Çalışmada izlenen aşamalara ait basamaklar Şekil 4.1.'de iş akış şeması olarak sunulmaktadır.

4.2.1. VERİTABANLARINDAN UYGUN MİKRODİZİN VERİ SETLERİNİ SEÇİLMESİ

GEO ve ArrayExpress veri-tabanlarından çalışmaya uygun veri setlerinin seçilmesi için “kümüllüs granüloza hücreleri (cumulus granulosa cells), mural granüloza hücreleri (mural granulosa cells), PKOS (PCOS)” anahtar kelimeleri ile arama yapılmıştır. Çıkan verisetlerinin planlanan çalışma ile uyumlu olması adına sadece insandan alınan biyolojik örnekler ile yapılan çalışmalar “Organizma: İnsan (Organism: Human)” filtresi ile filtrelenmiştir. Platform tabanlı farklardan etkilenmemek adına çıkan sonuçlar aynı mikrodizin platformu (GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA)) kullanılarak yapılan çalışmaları seçecek şekilde yeniden filtrelenmiştir. Kullanılan platform dünyada ifade çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir. Platform GEO’da Platform No (Platform ID): GPL570, ArrayExpress’te A-AFFY-44 platform numaraları kullanılarak filtrelenmiştir ve bu sayede yalnızca bu platform kullanılarak yapılan çalışmalar elde edilmiştir. Affymetrix markasına ait ham veriler “.CEL” formatında saklanmaktadır. Filtrelenen her veri setine ait .CEL ham veri dosyaları veri-tabanlarından elde edilmiştir.

4.2.2. SEÇİLEN MİKRODİZİN VERİ SETLERİNİN KORELASYONLARININ KONTROLÜ

Veri-tabanlarından seçilen veri setleri içinde bulunan her örneğe ait ham veriler (.CEL uzantılı dosyalar) ArrayAnalysis (67) (<http://www.arrayanalysis.org/>) internet sitesine yüklenerek mikrodizin çiplerinin korelasyonları ve sinyal-çip kıyaslanabilirlik analizleri yapılmıştır. Pearson korelasyon analizinde yüksek korelasyon gösteren örneklerin katsayı değerlerinin 0,8’den büyük olması beklenmektedir ve bu katsayı 1’e yaklaştıkça örneklerin korelasyonları yani kıyaslanabilirlik düzeyleri artmaktadır.

4.2.3. SEÇİLEN ÇALIŞMALARA AİT HAM VERİLER İLE MİKRODİZİN ANALİZLERİNİN GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Bu tez çalışmasında seçilen ve yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilen 3 farklı mikrodizin çalışmasına ait ham verilerin beraber analiz edilebilmesi (naiv meta-analiz) (66) için BRB-ArrayTools (v4.6.0) (68) yazılımı kullanılmıştır. BRB-ArrayTools programı “R” yazılım

dilinde “Bioconductor” paketini kullanarak “Microsoft Excel” eklentisi olarak mikrodizin analizi yapılmasına olanak sağlamaktadır.

4.2.3.1. Verilerin BRB-ArrayTools Programına Yüklenmesi ve Normalizasyonu

Seçilen ve yüksek korelasyon gösterdiği tespit edilen 3 farklı mikrodizin çalışmasına ait ham veriler BRB-ArrayTools programına tek bir veri seti olarak (meta-veri), Robust Multi-Array Average (RMA) normalizasyon yöntemini kullanarak yüklenmiş ve normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi yıkama-boyama nedeniyle ortaya çıkabilecek farklılıklar, spesifik olmayan (non-spesifik) bağlanmalar veya arka plan gürültüsü gibi farklardan dolayı ortaya çıkabilecek teknik farklılıkları elemine ederek gerçek biyolojik farklılığın ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır. RMA normalizasyonu; arka-plan düzeltmesi (background correction), quantile normalizasyon işlemi ve matematiksel bir düzenleme olan logaritma 2 tabanına dönüştürmesini (log2 transformasyonu) içeren paket bir normalizasyon işlemidir (69).

4.2.3.2. Mikrodizin Veri Analizi ve İstatistiksel Analizler

Meta-verinin normalizasyonundan sonra PKOS (PK) ve kontrol (NM) grupları olarak örnekler 2 farklı gruba ayrılmıştır. PK grubu içerisinde MGH’lerden ve KGH’lerde gelen çipler 2 ayrı sınıf olarak belirlenmiştir. NM grubu içerisinde de yine aynı şekilde MGH’lerden ve KGH’lerden gelen çipler 2 ayrı sınıf olarak tanımlanmıştır. PK ve NM gruplarında ayrı ayrı MGH ve KGH’ler arasında sınıf karşılaştırması (class comparison) işlemi yapılmıştır. Bu işlem için eşleştirilmemiş t-test (unpaired t-test) istatistik yöntemi kullanılmıştır ve her iki grupta (PK ve NM) sınıflar arasında (MGH ve KGH) 4 kat ve üzerinde istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı gösteren ($p \leq 0,001$) genler tespit edilmiştir.

4.2.3.3. Yalnızca PKOS Grubunda MGH ve KGH’ler Arasında İfade Farklılığı Gösteren Genlerin Tespit Edilmesi

Her iki gruptan da elde edilen MGH ve KGH’ler arasında ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen gen listeleri PKOS ve Kontrol grubu olarak VENNY (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) (70) internet tabanlı programına yüklenmiştir. Bu sayede yalnızca PKOS durumunda bu iki somatik hücre grubu arasında

anlamli ifade farklılığı gösteren gen listesi (PKOS spesifik ifade farklılığı gösteren genler – PKOS-spesifik DE mRNA'lar) tespit edilmiştir.

4.2.3.4. Kümeleme Analizi

İstatistiksel olarak anlamli ve ifade farklılığı gösteren genler kümeleme analizine alınmıştır. Kümeleme analizinde genler ve meta-veriden gelen örnekler hiyerarşik olarak kümelenmişlerdir ve uzaklığ değerleri (distance value) "Average linkage" metodu ile belirlenmiştir. Yapılan analizlerde kümeleme işlemi için BRB-ArrayTools içerisine gömülü olarak da çalışabilen Cluster (v3.0) (<http://bonsai.ims.u-tokyo.ac.jp/~mdehoon/software/cluster/>) (71) programı kullanılmıştır. Kümeleme analiz sonuçlarının görüntülenmesi için yine BRB-ArrayTools üzerinden alışan Java yazılım dili tabanlı TreeView (v1.1.6r4) (72) programı kullanılmıştır.

4.2.3.5. Mann-Whitney Testi

Mann-Whitney testi (U-test) iki grubun birbirinden farklı olup olmadığını belirlemek için kullanılan bir istatistiksel analiz yöntemidir (73). Çalışmada parametrik değerlere dayanmadan yapılan (non-parametric) bir test olan Mann-Whitney testi Minitab (v19.2.0) programı kullanılarak yapılmıştır.

4.2.4. PKOS SPESİFİK GENLERİN İKİ GRUP ARASINDAKİ İFADE FARKLILIĞININ EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASI İLE DOĞRULANMASI

4.2.4.1. mRNA'lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

Laboratuvarımızda kullanılan örneklere ait total RNA'lardan mRNA'lar için tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezi için 500 ng total RNA kullanılmıştır. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kiti (Roche, 04379012001) kullanılarak üreticinin kit içerisinden çıkan yönergeleri doğrultusunda cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

4.2.4.2. Belirlenen Genler ile Eş-Zamanlı Kantitatif PZR Çalışmasının Gerçekleştirilmesi

Yolak zenginleştirme analizleri sonucunda PKOS ve hücre farklılaşması ile ilgili olduğu düşünülen genler seçilerek laboratuvarımızda bulunan bağımsız örneklerde ifade doğrulaması yapılmıştır. Bu doğrulama işlemi için seçilen genlere spesifik olarak dizayn edilmiş uygun primerler kullanılmıştır.

İfade analizlerinde normalizasyon amacıyla *ACTB* (Beta-Actin) geni kullanılmış, analiz metodu olarak da yaklaşım yöntemi olarak da adlandırılan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılarak ifade verileri ortaya çıkarılmıştır (74). Çalışmada 2 grup arasında ifade farklılığı gösteren genlerin ifade farklarının anlamlılık düzeyleri MGH ve KGH'lerin aynı bireyden gelmesi nedeniyle eşleştirilmiş t-test (paired t-test) kullanılarak tespit edilmiştir. p-değeri 0,05'ten küçük olan gen ifade farkları anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.2.5. miRNA'LAR İLE EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASININ GERÇEKLEŞTİRİLMESİ

Laboratuvarımızda daha önce tamamlanan Yüksek Lisans Tezi'mde MGH'lerde arasında 7 adet miRNA'nın PKOS ve kontrol grupları arasında ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda bu miRNA'ların PKOS gelişiminde ve yumurta olgunlaşmasında rol oynayabileceği düşünülen genleri potansiyel olarak hedefledikleri gösterilmiştir.

MGH'lerde PKOS-Kontrol grupları arasında bu miRNA'ların ifade farklılığı göstermesi aynı miRNA'ların PKOS'lu bireylerde MGH ve KGH'ler arasında da ifade farklılığı gösterip göstermediği sorusunu akla getirmiştir. Bu nedenle aynı bireylerden gelen (PKOS tanısı almış) MGH ve KGH'ler arasında bu miRNA'ların ifade farklılığı gösterip göstermediği araştırılmıştır.

Ancak özellikle KGH'lerden elde edilen RNA miktarının az olması nedeniyle mRNA validasyon çalışmasında kullanılan 5 örnek bu aşamada çalışmadan çıkartılmak zorunda kalmıştır. Bu örnekler yerine 4 farklı örnek eklenmiştir. Ancak her örnek için MGH ve KGH'lerin tek bir bireyden gelmesi ve bu nedenle eşleştirilmiş t-test (paired t-test) kullanılması nedeniyle teknik farklılıkların elemine edildiği düşünülmektedir.

4.2.5.1. miRNA’lardan Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

İzole edilen total RNA’dan yalnızca mRNA’lar kullanılarak cDNA sentezlenebilmesi için mRNA moleküllerinin 3’ ucunda bulunan poly (A) kuyrukları (poly Adenin tail) kalıp olarak kullanılmaktadır. Ancak olgun miRNA moleküllerinin 3’ uçlarında poly (A) kuyruğu bulunmamaktadır ve moleküllerin toplam uzunluğu 20-22 nükleotid olduğundan primer çiftlerine kalıp olacak uzunlukta değildirler. miRNA’lardan cDNA sentezi için kullanılan miScript II RT Kiti (Qiagen, 218161) ile öncelikle miRNA’ların 3’ uçlarına hedef olarak kullanılabilmesi için poly (A) kuyruğunu da içeren bir “universal tag” eklenmiştir. Sonraki aşamada eklenen universal tag’e spesifik bir primer aracılığıyla cDNA sentez reaksiyonu üreticinin yönergelerine uyularak tamamlanmıştır. 300 ng total RNA miRNA’lardan cDNA sentez reaksiyonu için kullanılmıştır.

4.2.5.2. MGH’ler ve KGH’ler Arasında İfade Farklılığı Gösteren miRNA’ların Eş-Zamanlı Kantitatif PZR ile Tespit Edilmesi

MGH ve KGH’ler arasında farklılık gösterebileceği düşünülen miRNA’ların ifadeleri eş-zamanlı kantitatif PZR tekniği ile araştırılmıştır. Aynı bireylerden alınan MGH ve KGH’lerden izole edilen miRNA’lardan sentezlenen cDNA’lar PZR reaksiyonunda kalıp olarak kullanılmıştır. miRNA’lara olarak üretilen ve materyal kısmında tablo ile sunulan primerler ilgili üretici firma tarafından hazır olarak temin edilmiştir. cDNA sentez reaksiyonunda kullanılan universal tag’e komplementer (tamamlayıcı) olan universal primer, geri primer olarak kullanılmıştır. Kullanılan miRNA spesifik eş-zamanlı kantitatif PZR kitlerinin laboratuvarımızda bulunan LightCycler® 480 (Roche, 05015243001) cihazı ile uyumlu olduğu bilinmektedir.

miRNA ifadelerinin belirlenmesi ve normalizasyonu için literatürde de daha önce kullanıldığı şekilde referans bir gen kullanmak yerine çalışmada kullanılan tüm örnekler için tüm miRNA ifadelerinin Ct değerlerinin geometrik ortalamaları kullanılmıştır (75). MGH ve KGH’ler arasında ifade farklılığı gösteren miRNA’ların tespit edilebilmesi için yaklaşım yöntemi olarak da bilinen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu (74), istatistiksel anlamlılık düzeylerinin tespiti için ise paired t-test yönetimi kullanılmıştır. İki grup arasındaki p-değeri 0,05’ten küçük olan miRNA ifade değişimleri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.2.6. miRNA'LARA AİT POTANSİYEL HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİ

miRNA'ların potansiyel olarak hedefleyebilecekleri genlerin bulunması için farklı şekillerde çalışan biyoinformatik araçlar bulunmaktadır. Bu araçlar, genellikle internet (web) tabanlıdır. Yapmış olduğumuz çalışmada miRNA'lara ait hedefler bulunurken web tabanlı olarak çalışan miRDB (<http://mirdb.org/>) (76,77) veri-tabanı kullanılmıştır.

4.2.7. META-ANALİZ ÇALIŞMASINDAN GELEN PKOS-SPEŞİK GENLER İLE miRNA HEDEF GENLERİNİN KESİŞTİRİLMESİ

PKOS'lu bireylerden alınan örnekler ile yapılan eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması sonucunda KGH'ler ve MGH'ler arasında anlamlı ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA'lara ait biyoinformatik hedef listesi ile meta-analiz çalışmasında PKOS grubunda MGH-KGH sınıfları arasında anlamlı ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen genlere ait ortak liste yine VENNY programı kullanılarak tespit edilmiştir.

4.2.8. YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZLERİ

Yalnızca PKOS durumunda MGH ve KGH'ler arasında ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen genlerin yer aldığı yolaklar ve miRNA hedef gen listesi ile PKOS-spesifik gen listesinin kesleştirilmesi ile elde edilen genlerin yer aldığı yolaklar WebGestalt (WEBbased GEne SeT AnaLysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) (78) internet tabanlı yolak zenginleştirme programının 2013 versiyonu aracılığıyla tespit edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. META-ANALİZ ÇALIŞMASI İÇİN VERİTABANLARINDAN SEÇİLEN VERİ SETLERİ

Yöntem bölümünde belirtilen uygun arama filtreleri kullanılarak GEO veri-tabanında yapılan arama sonucunda GSE34526 (79) ve GSE10946 (80) veri setleri, ArrayExpress veri-tabanında ise E-MEXP-3641 veri seti çalışmamız için uygun bulunmuştur.

GSE10946 veri seti 23 adet KGH örneği içermektedir. Bu örneklerden 12 tanesi PKOS'lu bireylerden almış olup 11 tanesi kontrol grubundan gelmektedir.

GSE34526 veri seti 10 adet MGH örneği içermektedir. Bu örneklerden 7 tanesi PKOS'lu bireylerden alınmış olup 3 tanesi kontrol grubundan gelmektedir.

E-MEXP-3641 veri seti ise 25 adet kontrol grubu örneği içermektedir. Bu örneklerden

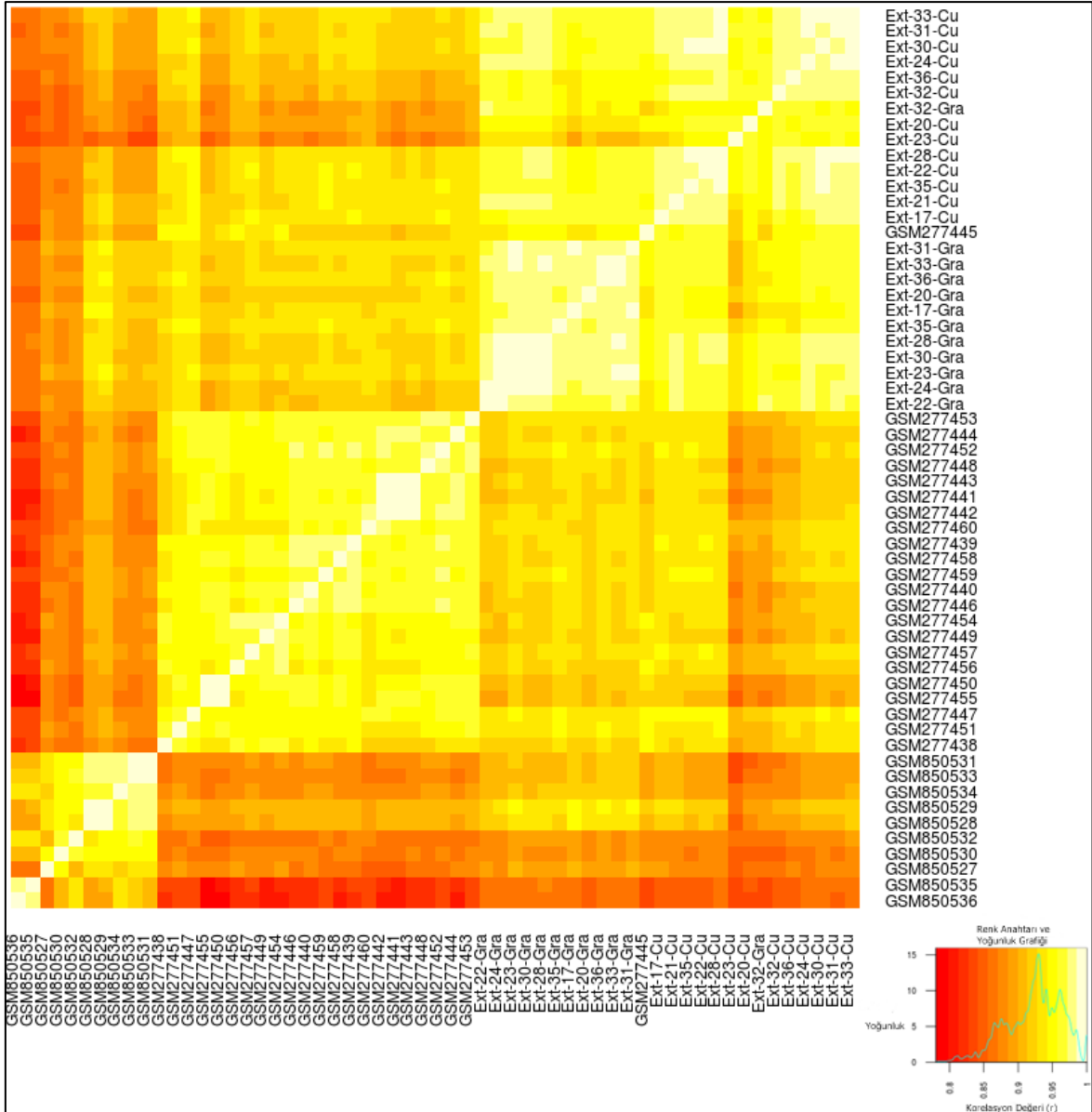
Toplamda 19 adet PKOS'lu bireylerden gelen ifade verisi (PK grubu), 39 adet kontrol grubundan gelen ifade verisi (NM grubu) elde edilmiştir (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. Seçilen mikrodizin verilerinde PKOS ve kontrol gruplarına ait KGH ve MGH örnek sayılarını gösterir çizelge (81).

	PKOS (PK)		Kontrol (NM)	
	MGH	KGH	MGH	KGH
GSE10946	-	12	-	11
GSE34526	7	-	3	-
E-MEXP-3641	-	-	12	13
Toplam	7	12	15	24

5.2. VERİ SETLERİNİN KORELASYONUNA AİT BULGULAR

Veri tabanlarından indirilen 3 çalışmaya ait .CEL uzantılı ham veriler tek bir veri seti olarak (meta-veri) ArrayAnalysis programına yüklenmiştir. Yapılan analiz sonucunda bu 3 veri setinde bulunan mikrodizin verilerinin yüksek oranda korelasyon gösterdikleri (Pearson r katsayısı $\geq 0,8$) ve meta-veri olarak analiz edilebilir oldukları tespit edilmiştir (Şekil 5.1.).



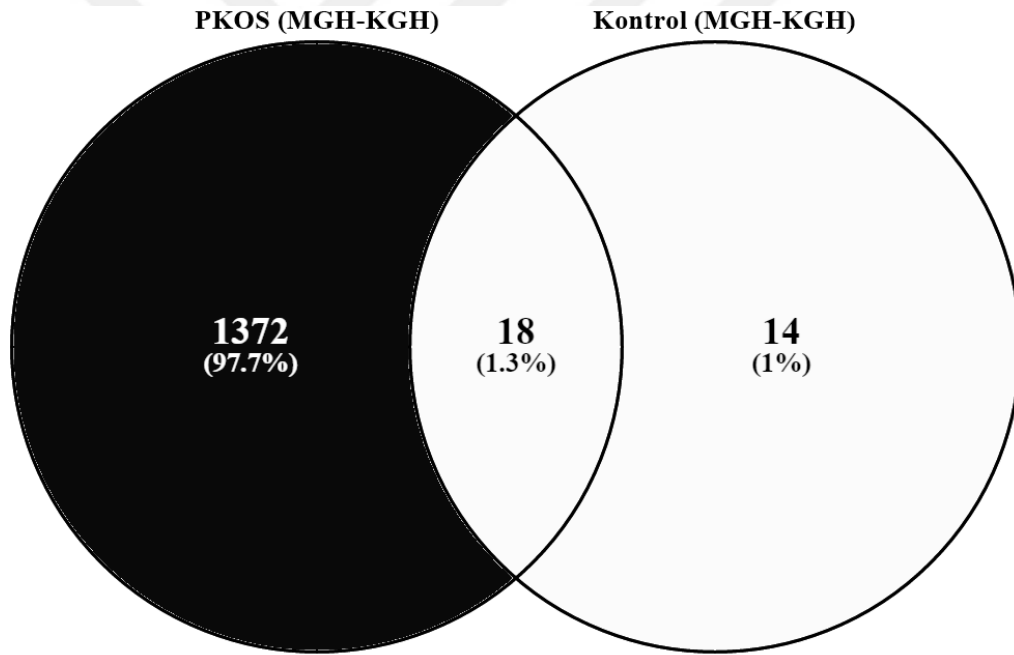
Şekil 5.1. Veri-tabanlarından indirilen 3 farklı veri setinde bulunan ham verilere ait korelasyon grafiği. Çalışmada kullanılan mikrodizin verileri yüksek oranda korelasyon göstermektedir (Pearson korelasyon; $r \geq 0,8$) (81).

5.3. MİKRODİZİN VERİ ANALİZİ VE İSTATİSTİKSEL ANALİZLERE AİT BULGULAR (META-ANALİZ)

Yüksek korelasyon gösteren mikrodizin verilerinin bir araya getirilmesi ile PKOS grubunda 7 adet MGH örneğinden, 12 adet KGH örneğinden ve kontrol grubunda ise 15 adet MGH örneğinden ve 24 adet KGH örneğinden oluşan bir meta-veri seti oluşturulmuştur. BRB-ArrayTools yazılımı kullanılarak meta-veri seti ile mikrodizin ifade analizleri gerçekleştirilmiştir.

Yapılan mikrodizin veri analizi ve istatistiksel analizler sonucunda PKOS grubunda MGH ve KGH sınıfları arasında 1.390 genin istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) 4 kat ve üzerinde ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise yalnızca 32 genin anlamlı olarak ($p<0,001$) 4 kat ve üzerinde ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir.

Hem kontrol grubunda hem de PKOS grubunda ortak olarak ifade farklılığı gösteren genlerin belirlenebilmesi için VENNY Venn diagramı çizme programı kullanılmıştır. VENNY analizi sonucunda 18 tane genin hem PKOS grubunda hem de kontrol grubunda MGH ve KGH sınıfları arasında ortak olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. 14 genin ise yalnızca kontrol grubunda bu iki hücre tipi arasında ifade farklılığı gösterdiği, bununla birlikte 1372 genin PKOS grubunda MGH ve KGH sınıfları arasında PKOS-spesifik olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.2.). Bu aşamadan sonra bu genlerden **“PKOS-spesifik genler”** olarak bahsedilecektir.



Şekil 5.2. Yapılan meta-analiz çalışması sonucunda MGH ve KGH sınıfları arasında PKOS grubunda 1372 genin, kontrol grubunda 14 genin anlamlı olarak en az 4 kat ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0,001$). 18 gen ise her iki grupta da ifade farklılığı göstermektedir (81).

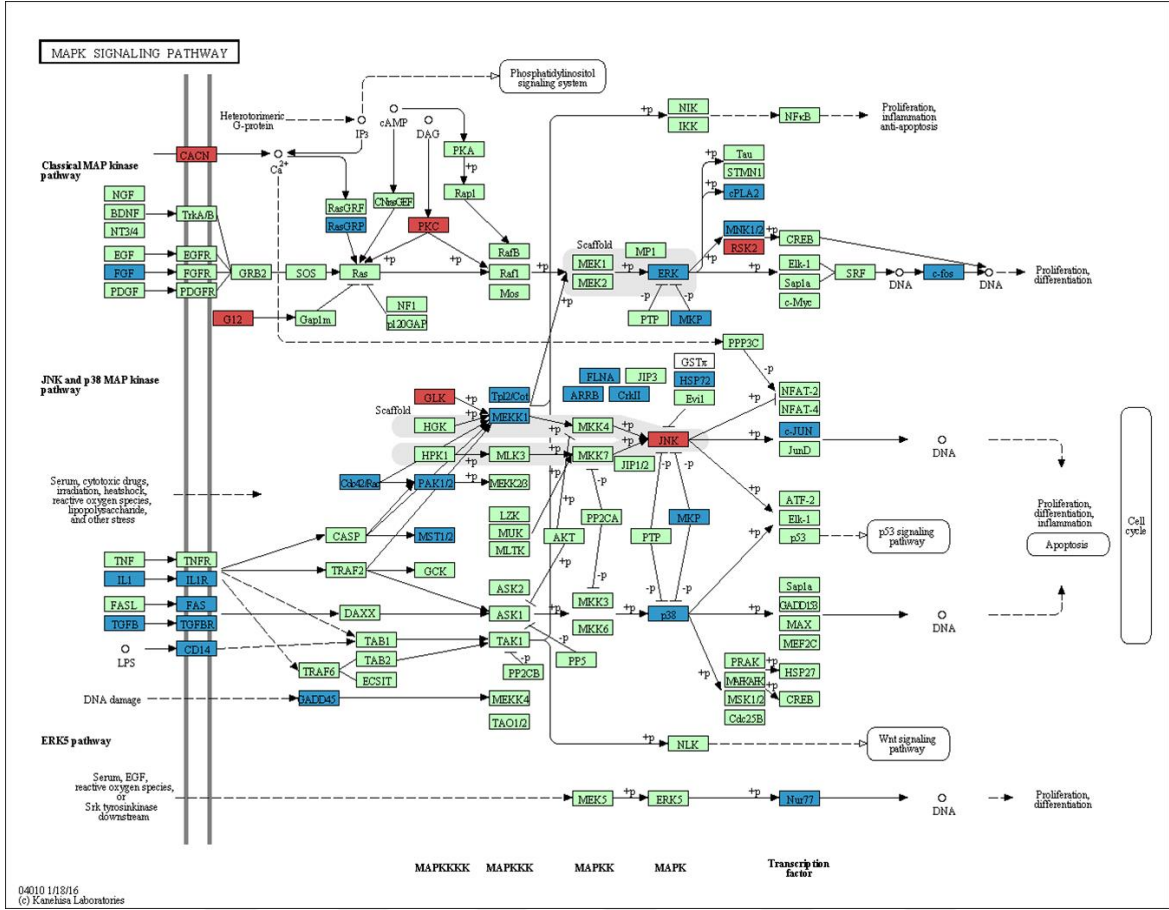
5.4. PKOS-SPEŞİFİK GENLER İLE YAPILAN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZLERİNE AİT BULGULAR

PKOS-spesifik genler ile WebGestalt programı kullanılarak yolak zenginleştirme analizleri yapılmıştır. WebGestalt aracılığıyla veri sunulan ve genlerin rol aldığı yolların belirlenmesinde etkin bir araç olan KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (82) yolak zenginleştirme analizi sonuçları PKOS-spesifik genlerin özellikle daha önce literatürde PKOS ile ilişkilendirilmiş MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) sinyal yolağı (47), TGF- β (Transforming Growth Factor) sinyal yolağı (48), diyabet ile ilişkili sinyal yolları (83), insülin sinyal yolağı (49), Wnt sinyal yolağı (45), oosit-hücre olgunlaşması sinyal yolları (84) ve hormonal sinyal yollarında (85) anlamlı olarak ($p < 0,0225$) zenginleştiğini göstermiştir (Çizelge 5.2.).

Çizelge 5.2. PKOS-spesifik 1372 gene ait yolak analiz sonuçları (81).

Yolak ismi	Gen sayısı	p-değeri
MAPK sinyal yolağı	37	0,000000
TGF- β sinyal yolağı	17	0,000000
Tip 1 diyabet	11	0,000000
Wnt sinyal yolağı	19	0,000001
İnsülin sinyal yolağı	17	0,000004
Tip 2 diyabet	10	0,000005
Progesteron aracılı oosit olgunlaşması	11	0,000200
GnRH sinyal yolağı	12	0,000200
Oosit mayozu	11	0,001400
Hücre döngüsü	9	0,022500

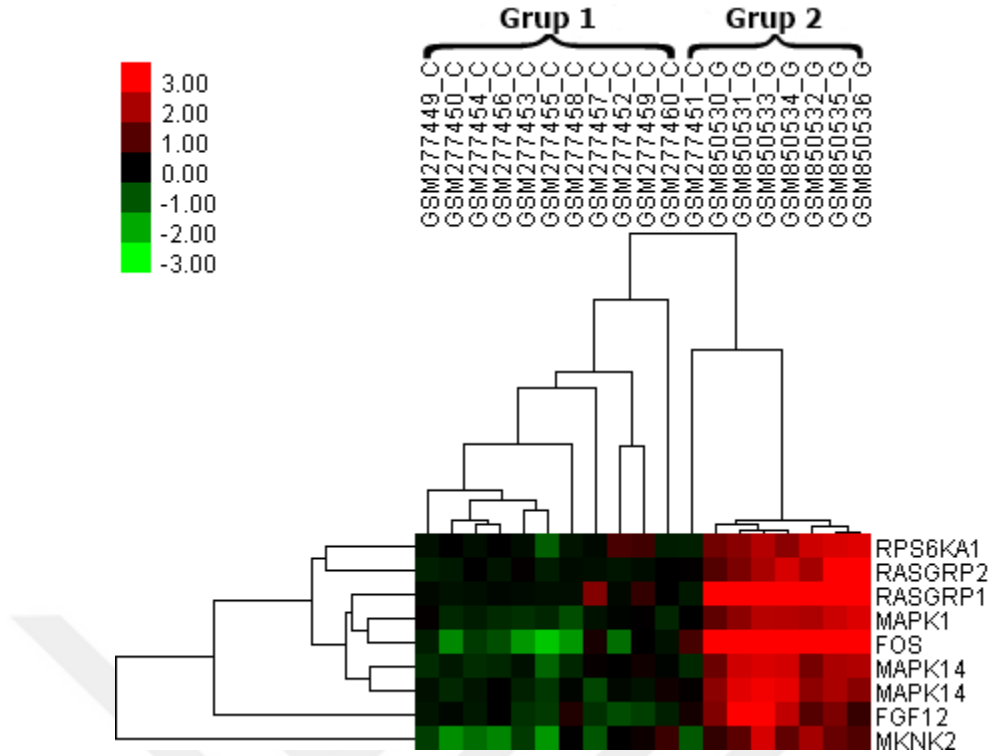
PKOS-spesifik genler ile yapılan yolak analizi sonuçları bu genlerden 37 tanesinin MAPK sinyal yolağında zenginleştiğini göstermiştir. Bu durum MAPK sinyal yolağının hücre farklılaşması ve gelişiminde rol oynadığı düşünüldüğünde özellikle bu yolda rol alan bu genlere odaklanılmasına neden olmuştur (Şekil 5.3.).



Şekil 5.3. KEGG figüründen alınmış MAPK sinyal yolağı (hsa04010) ($p < 0,001$). Kırmızı ile işaretlenen genler KGH’lerde MGH’lere göre azalan gen ifadesini, mavi ile işaretlenen genler ise artan gen ifadesini göstermektedir (81).

5.5. YOLAK ANALİZLERİNDEN SEÇİLEN PKOS-SPESİFİK GENLER İLE KÜMELE ANALİZLERİNİN YAPILMASI

Meta-veriye ait PKOS grubunda yer alan örnekler ile yapılan hiyerarşik kümele analizleri sonucunda *RPS6KA1* (Ribosomal Protein S6 Kinase, Polypeptide 1), *RASGRP1* (RAS Guanyl Releasing Protein 1), *RASGRP2*, *MAPK1*, *FOS* (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog), *MAPK14* (*p38*), *FGF12* (Fibroblast Growth Factor 12) ve *MKNK2* (MAP Kinase Interacting Serine/Threonine Kinase 2) gibi MAPK sinyal yolağı elemanlarının gen ifade profillerinin PKOS’ta KGH’leri MGH’lerden başarılı bir şekilde ayırdığı tespit edilmiştir. Bu genlerin ifadelerinin KGH’lerde MGH’lere göre ciddi bir şekilde düştüğü görülmüştür (Şekil 5.4.).



Şekil 5.4. Meta-veriden gelen örnekler ve MAPK sinyal yolağında yer alan, meta-analiz çalışmasında MGH (G) ve KGH'ler (C) arasında anlamlı olarak ($p < 0,001$) ifade değişikliği gösterdiği tespit edilen genler ile yapılan hiyerarşik kümeleme çalışmasını gösterir heatmap. Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir. KGH'ler Grup 1'de kümelenirken, MGH'ler Grup 2'de kümelenmiştir. MAPK sinyal yolağı ilişkili gen ifadelerinin Grup 1'de azaldığı tespit edilmiştir (81).

5.6. RNA İZOLASYONUNA, SAFLIĞINA VE MİKTARINA AİT BULGULAR

Aşağıda çizelgede verilen örneklerin RNA izolasyonları yapılmış ve izole edilen total RNA'ların NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) cihazında saflık oranları (A_{260}/A_{280}) ve konsantrasyonları ölçülmüştür (Çizelge 5.3.).

Çizelge 5.3. RNA örneklerine ait konsantrasyon ve saflık değerlerini gösterir çizelge.

Örnek No.	Mural Granüloza Hücreleri		Kümüls Granüloza Hücreleri	
	Konsantrasyon (ng/µL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konsantrasyon (ng/µL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
PK 1	397,3	2,00	64,4	2,01
PK 2	951,9	2,08	205,5	1,99
PK 3	1840,2	2,07	326,3	2,01
PK 5	156,6	2,00	259,6	2,02
PK 6	1930,0	2,08	96,3	1,93
PK 7	194,0	2,01	54,1	1,89
PK 8	250,8	2,01	59,2	1,75
PK 9	204,2	1,98	44,0	1,83
PK 10	719,6		74,6	
PK 11	4328,6		99,9	
PK 12	1646,1		156,7	
PK 16	173,5		83,4	
PK 17	52,8	1,97	22,7	1,79
PK 19	261,7	2,04	204,9	2,10
PK 20	25,2	1,94	147,1	2,09
PK 21	45,0	1,79	54,5	1,94

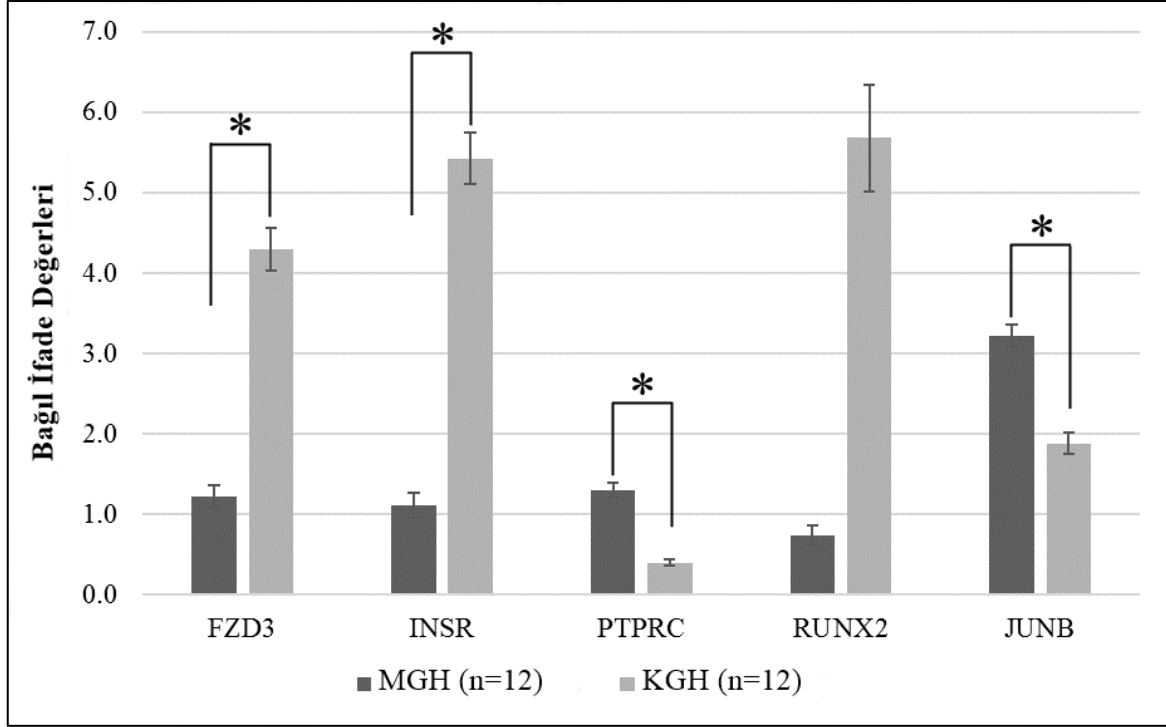
5.7. PKOS-SPEŞİİK GENLERİN EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR İLE DOĞRULANMASINA AİT BULGULAR

PKOS-spesifik genlerin MGH ve KGH sınıflarında gösterdiği ifade farklılığı laboratuvarımızda toplanan PKOS'lu 12 bireye ait örnek ile eş-zamanlı kantitatif PZR kullanılarak doğrulama çalışmasına alınmıştır. Bu çalışmada KGH ve MGH'ler arasındaki gerçek biyolojik farklılığın ortaya çıkması için her iki hücre grubunun da sağlanabildiği eş-örnekler denek olarak seçilmiş ve istatistiksel analizlerde paired t-test yöntemi kullanılmıştır.

Meta-analiz çalışması sonucunda PKOS grubunda MGH ve KGH sınıfları arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilen, MAPK sinyal yolağında bulunan 3 gen (*MAPK1*, *MAPK14*, *FOS*) ve PKOS ile ilişkisi daha önce tespit edilen 5 gen (*FZD3* (Frizzled Class Receptor 3), *INSR* (Insulin Receptor), *PTPRC* (Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, C), *RUNX2* (Runt-related Transcription Factor 2), *JUNB* (Jun B proto-oncogene)) doğrulama analizleri için seçilmiştir.

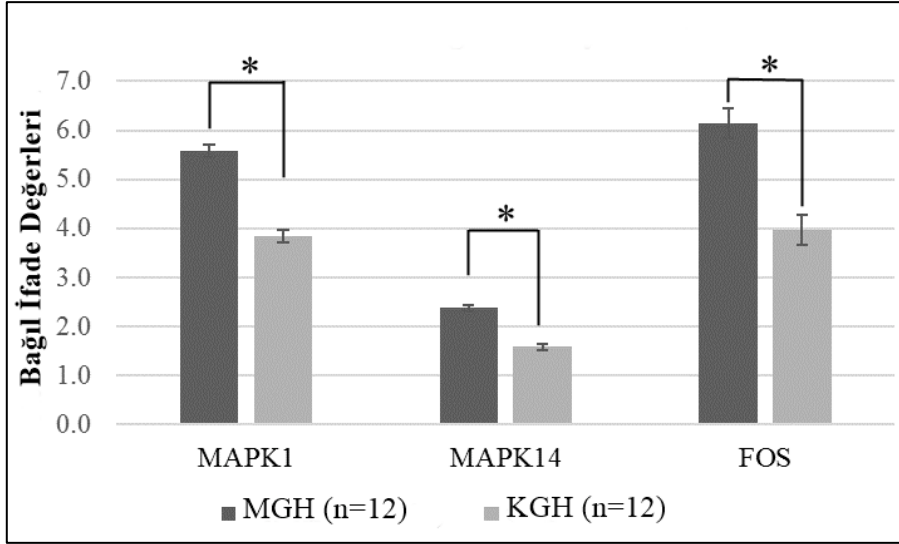
FZD3 ve *INSR* genlerinin ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p < 0,028$) KGH'lerde MGH'lere göre arttığı (*FZD3* için 3,53 kat, *INSR* için 4,86 kat), *RUNX2*

ifadesinin de istatistiksel olarak anlamlı olmasa da KGH'lerde 7,68 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. *PTPRC* ve *JUNB* genlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,045$) KGH sınıfında azaldığı (*PTPRC* için 3,23 kat, *JUNB* için 1,71 kat) tespit edilmiştir (Şekil 5.5.).



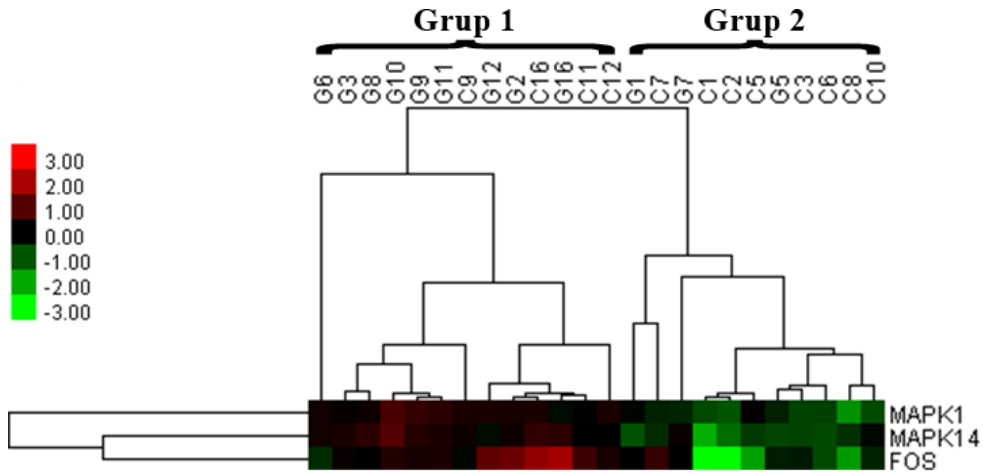
Şekil 5.5. Eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile doğrulamak için seçilen genlerin (FZD3, INSR, PTPRC, RUNX2, JUNB) bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik. Çalışma aynı bireylerden elde edilen MGH ve KGH'ler ile yapılmıştır (n=12). Asteriks (*) ile işaretlenen genler MGH ve KGH'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı ($p<0,05$) göstermektedir. Standart sapmalar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (81).

Yine aynı 12 bağımsız örnek ile yapılan çalışmada MAPK sinyal yolağında yer alan *MAPK1*, *MAPK14* ve *FOS* genlerinin MGH ve KGH'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde ($p<0,05$) ifade farklılığı gösterdiği (*MAPK1* için 1,46 kat, *MAPK14* için 1,5 kat, *FOS* için 1,55 kat) tespit edilmiştir. İfade profilleri çıkarılan 3 genin de ifadesinin KGH'lerde MGH'lere göre düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile doğrulamak için seçilen MAPK sinyal yolağında rol alan genlerin (*MAPK1*, *MAPK14*, *FOS*) bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik. Çalışma aynı bireylerden elde edilen MGH ve KGH'ler ile yapılmıştır (n=12). Asteriks (*) ile işaretlenen genler MGH ve KGH'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı ($p < 0,05$) göstermektedir. Standart sapmalar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (81).

Eş-zamanlı kantitatif PZR çalışmasının sonuçlarına göre MAPK sinyal yolağında rol alan bu genler ve laboratuvarımızda izole edilen örnekler kullanılarak yapılan hiyerarşik kümeleme analizleri sonucunda bu genlerin örneklerimizi istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde 2 gruba (Grup 1 ve Grup 2 olarak) ayırdığı tespit edilmiştir (Mann-Whitney; $W=132,5$; $p=0,049$).



Şekil 5.7. Bağımsız örneklerde, seçilen genlerin ifade düzeylerini doğrulamak için eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması sonuçları ile gerçekleştirilen kümeleme analiz sonuçlarını gösterir heatmap. Örnekler ilgili mRNA ifade profillerine göre Grup 1 ve Grup 2 olarak anlamlı kümelenmişlerdir (Mann-Whitney; $W=132,5$, $p=0,049$). Kırmızı renk artan ifadeyi, yeşil renk azalan ifadeyi temsil etmektedir (81).

5.8. miRNA'LAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN EŞ-ZAMANLI KANTİTATİF PZR ÇALIŞMASINA AİT BULGULAR

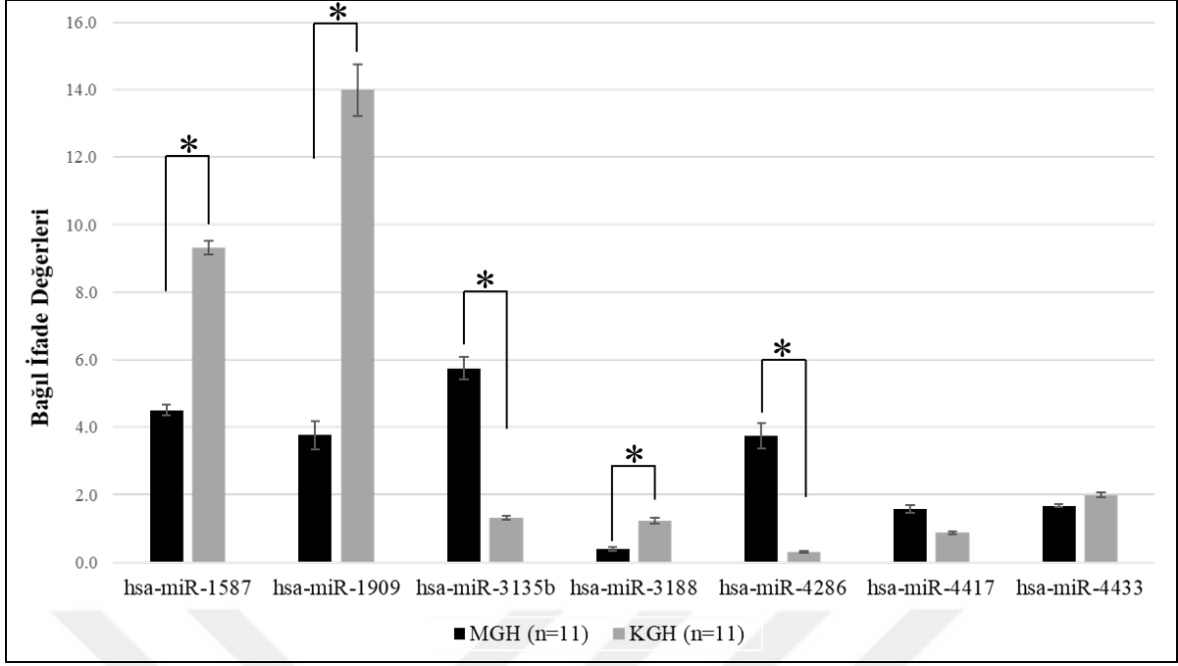
Laboratuvarımızda daha önceden tamamlanan ve Yüksek Lisans Tezi olarak tarafımdan sunulan çalışmada MGH'lerde PKOS'lu bireyler ile kontrol grubu arasında 7 adet miRNA'nın ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların PKOS durumunda MGH ve KGH'ler arasında ifade farklılığı gösterip göstermediği bu çalışmada eş-zamanlı kantitatif PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

PKOS'lu bireylerden alınan 11 örnek ile KGH ve MGH'ler arasında 7 adet miRNA'ya ait ifade farklılıkları eş-zamanlı kantitatif PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda 5 adet miRNA'nın iki grup arasında anlamlı olarak ($p < 0,05$) ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5.4.).

Çizelge 5.4. İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA'ları, istatistiksel anlamlılık düzeylerini (p-değeri) ve bu miRNA'ların MGH-KGH'ler arasındaki kat değişimini gösterir çizelge (81).

miRNA	p-değeri	Kat değişimi (MGH-KGH)
hsa-miR-1587	0,00001	0,48
hsa-miR-1909	0,00217	0,27
hsa-miR-3135b	0,00095	4,38
hsa-miR-3188	0,03079	0,33
hsa-miR-4286	0,01240	12,51
hsa-miR-4417	0,12534	1,80
hsa-miR-4433	0,27667	0,84

İfade farklılığı gösteren 7 adet miRNA'ya ait MGH-KGH sınıfları arasında ifade değişikliğini gösteren bağıl ifade düzeyleri ve örnek sayıları Şekil 5.8.'de sunulmaktadır.



Şekil 5.8. Eş-zamanlı PZR çalışması sonucunda MGH'lerde KGH'lere göre ifade farklılığı gösteren miRNA'ları ve bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik (n=11). Asteriks (*) ile işaretlenen miRNA'lar MGH ve KGH'ler arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı ($p < 0,05$) göstermektedir. Standart sapmalar ortalama \pm SEM olarak verilmiştir (86).

5.8.1. miRNA'LARA AİT POTANSİYEL HEDEF GENLERİN BELİRLENMESİNE AİT BULGULAR

İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA'ların potansiyel hedefleri miRDB veri-tabanı kullanılarak tespit edilmiştir. Çizelge 5.5.'te ilgili miRNA'lara ait tahmini hedef gen sayıları ve miRNA'ların MGH'lerdeki ifade düzeyinin KGH'lerdeki ifade düzeyine göre artış-azalış durumları sunulmuştur.

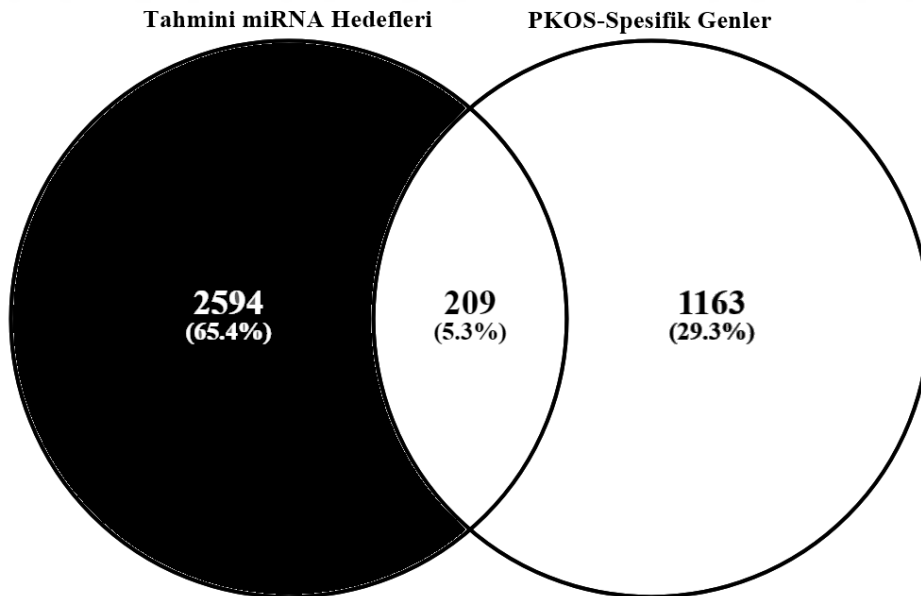
Laboratuvarımızda daha önce KGH'lerde PKOS-kontrol sınıfları arasında gerçekleştirilen miRNA ifade analizi çalışmasında ilgili miRNA'lara ait potansiyel hedefler, bu hedeflerin bazılarına ait deneysel ve biyoinformatik doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Bu nedenlerle miRNA-hedef analizi ve bu hedeflerin yer aldığı yollar ile ilgili tekrar bir çalışma yapılmamıştır. Ancak bu miRNA'ların PKOS ile ilişkisi daha önce ekibimiz tarafından tartışılmış ve bu ilişkinin potansiyeli açıklanmıştır.

Çizelge 5.5. İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen miRNA'lara ait tahmini hedeflerin sayısını ve bu miRNA'ların MGH-KGH sınıfları arasında ifade durumunu gösterir çizelge.

miRNA	MGH-KGH ifade durumu	Tahmini hedef gen sayısı
hsa-miR-1587	Azalış	459
hsa-miR-1909	Azalış	800
hsa-miR-3135b	Artış	685
hsa-miR-3188	Azalış	451
hsa-miR-4286	Artış	798

5.9. META-ANALİZ ÇALIŞMASINDA PKOS GRUBUNDA İFADE FARKLILIĞI GÖSTEREN GENLER İLE MİRNA HEDEF GENLERİNİN KESİŞTİRİLMESİNE AİT BULGULAR

İfade farklılığı gösteren miRNA'ların hedeflerine ait toplam 2803 genden oluşan liste (tekrarlayan genler ihmal edilmiştir) ile PKOS-spesifik gen listesi (1372 genden oluşan liste) VENNY aracı kullanılarak kesleştirilmiştir. Yapılan bu kesleştirme işlemi sonucunda genlerin %5,3'ünün (209 gen) her iki listede de ortak olduğu, %65,4'ünün (2594 gen) sadece tahmini miRNA hedefi olarak kaldığı, %29,3'lük kısmının (1163 gen) ise yalnızca PKOS-spesifik genler arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Her iki grupta da yer alan 209 genden oluşan liste ile tekrar yolak zenginleştirme analizlerine gidilmiştir (Şekil 5.9.).



Şekil 5.9. VENNY ile yapılan kesleştirme analizi sonucunda, tahmini miRNA hedefleri, PKOS-spesifik genler ve bu listelerde ortak olarak yer alan genleri gösterir venn diagramı şeklindedir. Her grubun toplam gen listelerinde yer aldığı sayıları yüzde (%) olarak da sunulmaktadır.

5.10. ORTAK GEN LİSTELERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN YOLAK ZENGİNLEŞTİRME ANALİZİNE AİT BULGULAR

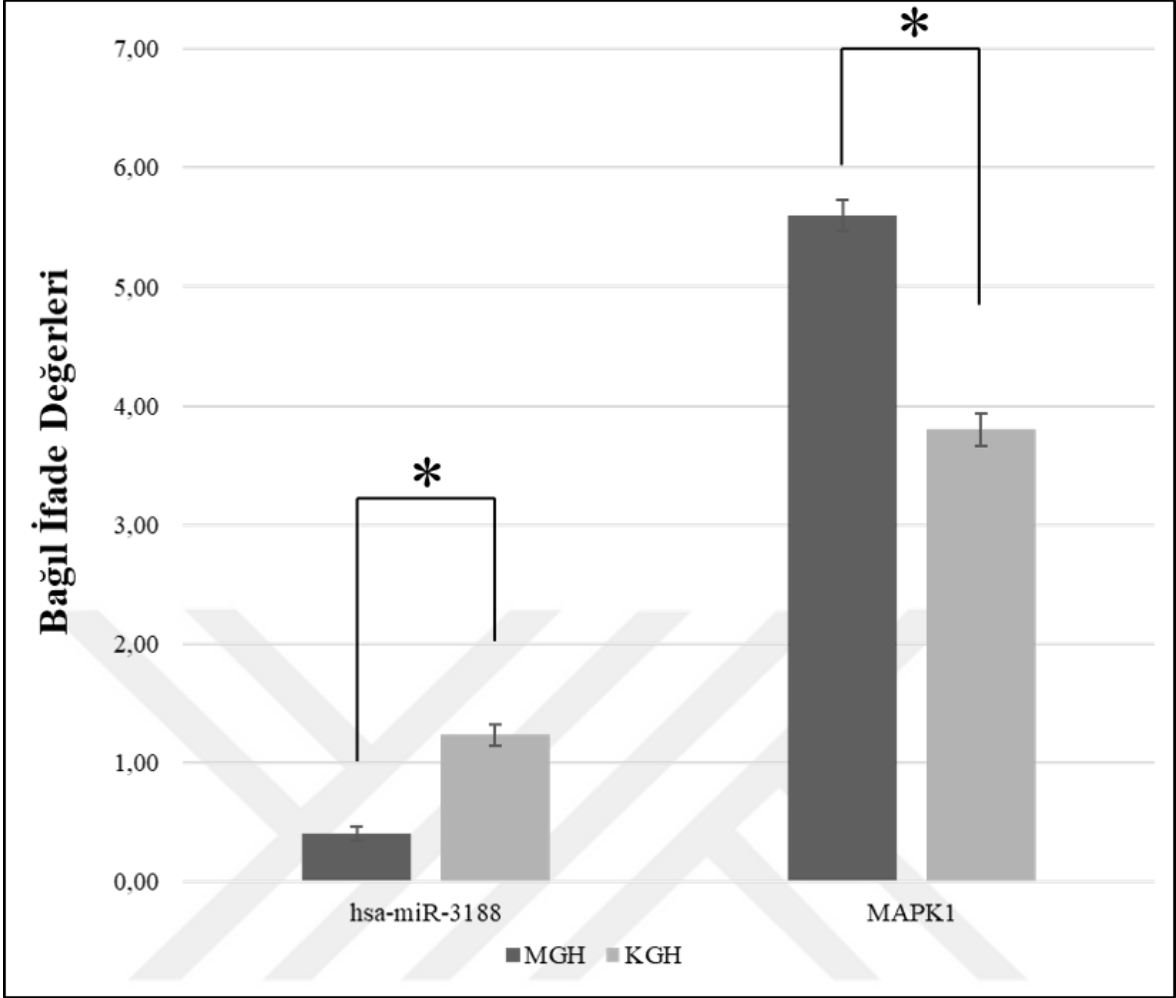
Ortak gen listesinde yer alan 209 gen ile WebGestalt programı kullanılarak tekrar yolak analizlerine gidilmiştir. Yapılan yolak analizleri sonucunda ilgili genlerin anlamlı olarak ($p < 0,05$) yine PKOS'la yakın ilişkisi bilinen MAPK, Wnt, İnsülin, TGF- β , tip 2 diyabet ve GnRH sinyal yollarında zenginleştiği dikkat çekmektedir (Çizelge 5.6.).

Çizelge 5.6. Ortak gen listeleri ile yapılan yolak analizleri sonucu zenginleşme görülen yollar, yollarda zenginleşen gen sayıları ve istatistiksel anlamlılık düzeylerini (p-değeri) gösterir çizelge.

Yolak ismi	Gen sayısı	p-değeri (FDR)
MAPK sinyal yolağı	11	1,48e-06
Wnt sinyal yolağı	4	0,0113
İnsülin sinyal yolağı	5	0,0016
TGF- β sinyal yolağı	5	0,0002
Tip 2 diyabet	3	0,0040
GnRH sinyal yolağı	3	0,0193

Bu yollarda yer alan genlerin miRNA'lar tarafından düzenlenebileceği düşünüldüğünde genleri tek tek araştırmak ve daha önce yapılan mRNA çalışması ile benzer sonuçları arama gerekliliğine istinaden her yolak kendi içerisinde değerlendirilmiştir.

Yapılan tüm analizler ve birbirinden bağımsız bu verilerden elde edilen bilgi ele alındığında, en dikkat çekici sonuçlar MAPK sinyal yolağında yer alan *MAPK1* ve *RASGRP1* genlerine ait verilerdir. *MAPK1* geninin KGH'lerde azalan ifadesi mRNA'lar ile yapılan eş-zamanlı PZR çalışması ile de doğrulanmış, aynı zamanda *MAPK1*'i hedefleyen-regüle eden hsa-miR-3188'in ifadesinin ise yine KGH'lerde MGH'lere göre arttığı deneysel olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.10.). miRNA ifadesi artarken hedeflediği mRNA'nın ifadesinin azaldığı düşünüldüğünden bu bilgi MAPK1'in PKOS'ta KGH'lerde ifadesinin düşmesinin hsa-miR-3188'in artan ifadesi nedeniyle olabileceğine dair fikir sunmaktadır.



Şekil 5.10. hsa-miR-3188 ve potansiyel hedefi olan *MAPK1* genin MGH ve KGH'ler arasında bağıl ifade düzeylerini gösterir grafik. miR-3188 ifadesi KGH'lerde anlamlı olarak artarken hedefi *MAPK1* ifadesi anlamlı olarak azalmaktadır.

Hem insülin sinyal yolağında hem de MAPK sinyal yolağında bulunan *MKNK2* geninin ifadesinin ve geni potansiyel olarak hedefleyen hsa-miR-4286'nın MGH ve KGH'lerdeki ifade düzensizliği de çıkan sonuçlar arasında dikkat çekmektedir.

Yolaklara ait şekiller ve diğer yolaklardaki potansiyel gen-miRNA ilişkisi ile ilgili daha detaylı bilgi tezin "6.1 TARTIŞMA" kısmında sunulmaktadır.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Folikülogenez-oogenez sırasında MGH ve KGH'lerin öncül granüloza hücrelerinden farklılaştıkları bilinmektedir. Bu hücreler farklılaştıkça ayrı roller üstlenmektedirler ve bu farklılaşma ile birlikte gen ifade profilleri de değişmektedir. Literatürde MGH ve KGH'lerin ifade profillerini karşılaştıran yalnızca bir adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışma da erkek faktörlü infertilite nedeniyle IVF tedavisine başvuran ve normal bir ovulasyon sürecine sahip kadınlardan toplanmış örnekler ile yapılmıştır (E-MEXP-3641) (14). Ancak daha önce PKOS'lu bireylerden alınan MGH ve KGH örneklerinin ifade profillerini kıyaslayan bir çalışma yapılmamıştır. Literatürde mikrodizin verileri bulunan GSE34526 GEO erişim numarasına sahip çalışma yalnızca PKOS'lu bireylerden ve kontrol grubundan alınan MGH'ler ile (79), GSE10946 GEO erişim numarasına sahip çalışma ise yine PKOS'lu bireylerden ve kontrol grubundan alınan KGH'ler ile (80) mRNA düzeyinde yapılmıştır. Laboratuvarımızda yüksek lisans tezi olarak tamamlanan çalışma ise yine PKOS'lu bireylerden ve kontrol grubundan alınan MGH'ler ile tamamlanmış ve 7 adet miRNA'nın PKOS-Kontrol grupları arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösterdiği bulunmuştur.

Tamamlamış olduğumuz bu doktora tez çalışması ve tezden çıkan yayın; **bu iki somatik hücre grubu arasında yalnızca PKOS durumunda ifade farklılığı gösteren gen profilini mRNA ve miRNA düzeyinde ortaya koyan ilk çalışmadır.** Biyoinformatik olarak tespit edilen gen listelerinden PKOS ile ilişkisi olduğu bilinen genler seçilerek laboratuvarımızda bağımsız örnekler ile ifade profilleri doğrulanmıştır. Ek olarak **PKOS'lu bireylerde kontrol grubuna göre ifadesi değişen miRNA'ların, hücre farklılaşması ve gelişmesi gibi yolaklar üzerinde etkisi olduğu düşünüldüğünde PKOS'lu bireylerde MGH ve KGH'lerde ifadelerinin değişiklik gösterebileceği öngörülmüştür.** Yapılan çalışmalarda bu miRNA'lardan 5 tanesinin PKOS'lu bireylerde MGH ve KGH'ler arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir.

Meta-analiz çalışmalarında platform farklılıkları gibi teknik farklılıklardan kaynaklı sorunlara oldukça sık rastlanılmaktadır. Tez çalışmasında literatürde bulmuş olduğumuz çalışmaların aynı platformdan geliyor olması (Affymetrix HumanGenome U133 Plus 2.0 çipini) ve daha sonra yapılan analizler ile bu çalışmalardan elde edilen örneklerin

normalizasyon sonrasında yüksek düzeyde korelasyon göstermesi ($r>0,8$), naiv meta-analiz yapmamıza olanak sağlamıştır.

Yapılan çalışmalarda yalnızca PKOS'ta MGH ve KGH'ler arasında anlamlı ($p<0,001$) ifade farklılığı (en az 4 kat) gösteren 1372 adet gen tanımlanmıştır. Bu genler ile gerçekleştirilen yolak zenginleştirme çalışmaları sonucunda ilgili genlerin PKOS ile ilişkisi olduğu bilinen MAPK sinyal yolağı (47), TGF- β sinyal yolağı (48), insulin sinyal yolağı (49) ve Wnt sinyal yolağında (45) zenginleştikleri tespit edilmiştir.

MAPK Sinyal Yolağı ve Olgunlaşma

Yapılan çalışmalar LH ve FSH stimülasyonu sonrasında folikülün ve KOK'un MAPK sinyal yolağının aktivasyonuna bağlı olarak olgunlaşmaya devam ettiğini ve oositin mayoz sürecine devam ederek KGH'lerin farklılaşmasını tamamladığını göstermiştir. Ek olarak oositi etkileyecek ve olgunlaşmasını sağlayacak parakrin faktörlerin KGH'ler tarafından yine MAPK sinyal yolağının tetiklemesi ile sentezlendiği bilinmektedir (87). Ayrıca MAPK sinyal yolağında yer alan *ERK1/2* (*MAPK1*) ve *p38* (*MAPK14*) genlerinin MGH'lerde aktive olmasının oosit matürasyonu (olgunlaşması) ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (88). Yamashita ve arkadaşlarının domuzlardan alınan KOK'lar ile yaptığı çalışmada bu iki proteinin ifadelerinin MGH ve oosit olgunlaşmasında etkin rol oynadığı tespit edilmiştir (89).

Laboratuvarımızda tamamlanan meta-analiz çalışması sonucunda MAPK sinyal yolağında zenginleşen 37 genin PKOS grubundaki bireylere ait örneklerde MGH ve KGH sınıfları arasında anlamlı olarak ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.3.). MAPK sinyal yolağı aktivasyonunun proliferasyon, farklılaşma ve hücre döngüsü ile doğrudan ilişkili olduğu düşünüldüğünde yolda yer alan bazı kilit genlerin (*RASGRP* (RAS Guanyl Nucleotide-Releasing Protein), *MAPK1* (*ERK1/2*), *MAPK14* (*p38*) ve yolda yer alan bir transkripsiyon faktörü olan *FOS* (*c-FOS*)) ifadelerinin KGH'lerde MGH'lere göre düşmesinin, yolağın aktivitesinin azalması veya sınırlanması sonucunda KGH farklılaşmasının ve oosit olgunlaşmasının engellenmesi ile ilişkilendirilebileceğini akla getirmiştir. Bu durum *MAPK1*, *MAPK14*, *FOS* ve *FOS* ile dimer oluşturarak aktivite gösteren *JUNB* genlerinin ifadelerinin eş-zamanlı kantitatif PZR ile doğrulanması için aday olarak seçilmelerine neden olmuştur. Yapılan çalışmalar sonucunda bu genlerin laboratuvarımızca toplanan bağımsız örneklerde de meta-analiz çalışması sonucunda olduğu

gibi KGH grubunda MGH'lere göre ifade düşüklüğü gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 5.6. ve Şekil 5.7.).

miRNA'lara ait potansiyel hedefler ve PKOS-spesifik genler kullanılarak yapılan analiz sonucunda ortak olarak bulunan gen listesi ile yapılan yolak analizinde 11 genin MAPK sinyal yolağında zenginleştiği tespit edilmiştir. MAPK sinyal yolağında zenginleşen 11 gen miR-1909, miR-3135b, miR-3188 ve miR-4286'nın potansiyel hedefleri arasında yer almaktadır (Şekil 6.1.). MAPK sinyal yolağı hücre farklılaşması ve proliferasyonunda rol oynayan en önemli yolaklardan bir tanesidir. Çalışma kapsamında MGH-KGH'ler arasında PKOS'ta ifade farklılığı araştırılan 7 miRNA'dan 4 tanesi potansiyel olarak yolda yer alan 11 gen ile ilişkilendirilmektedir. Bu durum MAPK sinyal yolağındaki sinyal bozulmasına bağlı olarak öncül granüloza hücrelerinden farklılaşması gereken MGH ve KGH'lerin tam olarak bu farklılaşmayı tamamlayamaması ve folikül-yumurta olgunlaşmasının bu nedenle tamamlanamaması ile ilişkilendirilebilir.

Laboratuvarımızda bulunan bağımsız örnekler ile yapılan eş-zamanlı PZR çalışmasında miR-3188'in ifadesinin KGH'lerde MGH'lere göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. Meta-analiz çalışmasında ise MAPK1 geninin ifadesinin KGH'lerde MGH'lere göre azaldığı gösterilmiş ve kendi örneklerimiz ile doğrulanmıştır. miRNA ifadesindeki artışın hedefi olan mRNA molekülünün ifadesini azaltacağı bilgisinden yola çıkarak KGH'lerdeki MAPK1 ifade azalışının artan miR-3188 ifadesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Daha önce de bahsedildiği üzere literatürde *MAPK1* ifadesinin oosit matürasyonu ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. KGH'lerde miR-3188'deki artışın yumurta ile en yakın ilişkide olan bu hücrelerin *MAPK1* ifade azalışı nedeniyle proliferasyon ve farklılaşma süreçlerini etkileyebileceği söylenebilir.

Wnt Sinyal Yolağı ve KGH'ler

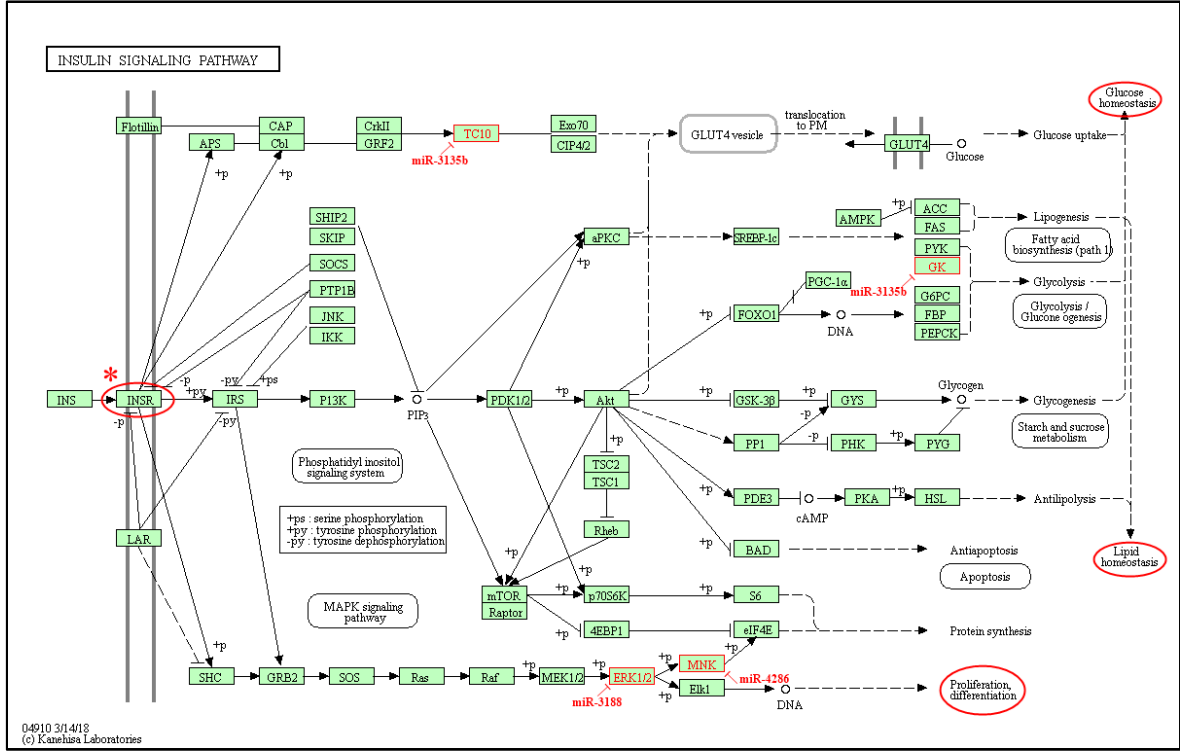
Wnt sinyal yolağı hücrenin kaderini proliferasyon veya farklılaşma aracılığıyla belirleyen gelişimsel bir sinyal yolağıdır (46). Yolağın 3 farklı tipi bulunmaktadır; 1) Standart Wnt Yolağı (Wnt/ β -CATENIN yolağı), 2) Standart Olmayan Düzlemsel Hücre Kutuplaşması Yolağı, 3) Wnt/ Ca^{2+} yolağıdır. Yolak tiplerinin üçü de Wnt proteinlerinin ilgili reseptörlerine (Frizzled reseptörlere) bağlanması ile aktive olmaktadır. Frizzled reseptörler (*FZD*'ler) N-terminal uçlarında Wnt proteinlerinin bağlanabilmesi için ekstraselüler bir sistince zengin domain (CRD) bulundurulur. Standart Wnt yolağı, yolak için anahtar bir role sahip β -CATENIN molekülünün sitoplazmada bulunan bir düzenleyici kompleks tarafından ifadesinin düzenlenmesi ile kontrol edilir. Bu kompleks APC (Adenomatous polyposis coli), GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3), CKI α (Casein kinase I- α), ve AXIN moleküllerinden oluşmaktadır. Standart Wnt yolağı Wnt proteinlerinin *FZD*'lere ve ko-reseptörü olan LRP5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5) veya LRP6'ya (Low-density lipoprotein receptor-related protein 6) bağlanması ile aktive olmaktadır. Bu aktivasyondan sonra kontrol altında tutulan β -CATENIN molekülü düzenleyici kompleks tarafından serbest bırakılır ve ardından çekirdeğe giderek Wnt-bağlantılı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu tetikler (91). Yapmış olduğumuz meta-analiz çalışmasında PKOS-spesifik olarak MGH ve KGH'ler arasında ifadesi değişen 19 genin Wnt sinyal yolağında zenginleştiiği tespit edilmiştir. Bu genler arasında *FZD3*, *FZD5* ve *LRP5* gibi Wnt sinyal aktivasyonunda kilit öneme sahip genler de bulunmaktadır.

Wnt sinyal yolağının ilk adımında yer alan moleküllerden bir tanesi olan *FZD3* reseptörü ligandı *WNT2*'nin (Wingless-type MMTV integration site family member 2) bağlanması ile aktive olmaktadır (92). Memeliler ile yapılan çalışmalar Wnt sinyalizasyonunun normal ovaryum gelişimindeki rolünü göstermiştir (46,93). Bununla birlikte Wnt sinyalizasyonundaki bozulmalar (disregülasyon) ise PKOS ile ilişkilendirilmektedir (92). Bu çalışmalar Wnt sinyal yolağı reseptörleri olan *FZD*'lerin kontrol gruplarında MGH'lerde normal düzeylerde ifade edildiklerini göstermektedir. Laboratuvarımızda yapılan meta-analiz çalışması *FZD3* geninin kontrol grubunda MGH ve KGH'ler arasında yakın seviyelerde ifade edildiğini göstermektedir. Ancak meta-analiz çalışmasının sonuçlarından yola çıkarak eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile de gösterildiği üzere PKOS grubunda *FZD3* ifade düzeyi KGH'lerde MGH'lere göre 3,53 kat artış göstermektedir. KGH'lerin

ovulasyondan hemen önce tamamen farklılaşmış ve özelleşmiş olmaları gerekmektedir ki bu durum oosit gelişimi için en önemli hususlardan bir tanesidir. Ancak KGH'lerde artan FZD3 düzeyi hala süren bir farklılaşma süreci olabileceğini gösterebilir. Bu durumun da oosit-folikül gelişiminin tam olarak gerçekleşmemesi ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Laboratuvarımızda yapılan eş-zamanlı kantitatif PZR çalışmasında MGH-KGH sınıfları arasında miR-3135b, miR-4286 ve miR-1909 ifadelerinin anlamlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Bu miRNA'ların potansiyel hedefleri ile yapılan yolak analizleri sonucunda PKOS'ta önemli rol oynadığı bilinen Wnt sinyal yolağının tiplerinden biri olan Standart Olmayan Düzlemsel Hücre Kutuplaşması (Planar Cell Polarity – PCP) yolağının ortasında bulunan *RAC2*, *RHOA* ve *DAAMI* genlerinin anlamlı olarak zenginleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 6.2.). PCP yolağında yer alan bu genlerin miRNA ifadelerindeki değişikliğe bağlı olarak ifade değişikliği göstermesi sonucunda PKOS ile ilişkisi bilinen hücre iskelet değişikliklerine ve fokal adezyonda değişikliğe neden olabileceği akla gelmektedir. KGH ve MGH'lerde oluşabilecek bu hücre iskelet değişimlerinin PKOS'ta gözlemlenen oosit-folikül olgunlaşamama durumu ile ilişkisi olduğu bilinmektedir (94). Bu nedenle çalışmamızda üzerinde durulan, PCP yolağında yer alan bu genler ve ilgili miRNA'ların PKOS'un moleküler temellerinin açıklanması açısından önem teşkil ettiği düşünülmektedir.

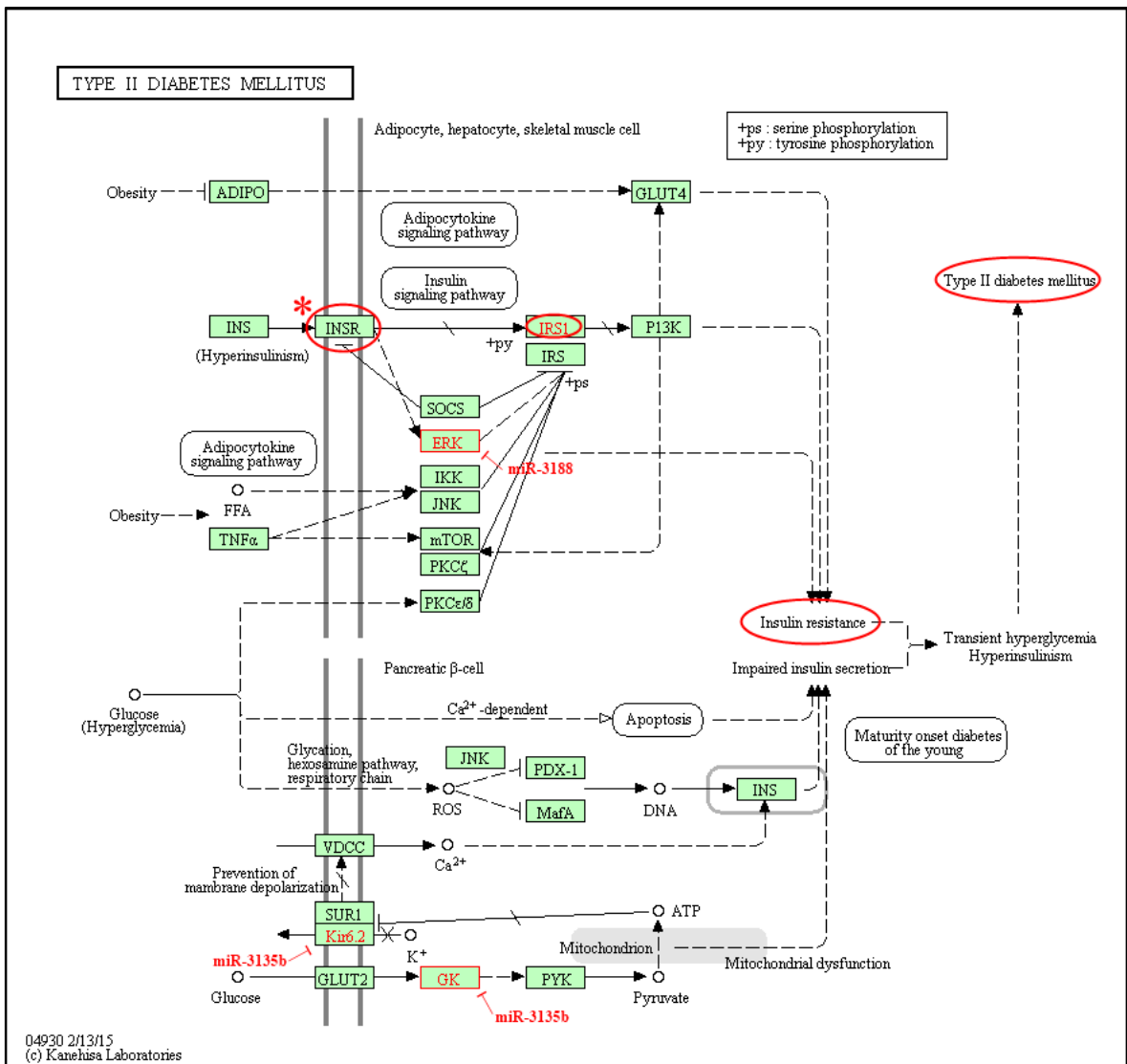
bağımlı glikoz alımında düzenleyici olarak görev aldığı göstermiştir (99). Bu tez çalışmasında, *INSR* ifadesinin KGH'lerde MGH'lere göre anlamlı olarak 3,03 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Yumurtanın enerji metabolizmasından sorumlu KGH'lerde PKOS durumunda *INSR* ifadesindeki artışın tespit edilmesi, bu hücrelerde insülin-glikoz alımını bozularak yumurtanın olgunlaşmasını etkileyebileceğini ve bu durumun PKOS'ta görülen olgunlaşmama veya folikülün çatlayamaması ile ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir.



Şekil 6.3. KEGG figüründen adapte insülin sinyal yolağı (hsa04910). Ortak listede yer alan mRNA'lar ve potansiyel olarak bu mRNA'ları hedefleyen miRNA'lar kırmızı renk ile belirtilmiştir.

İnsülin sinyal yolağında rol alan *HK2* (Hexokinase 2) ve *RHOQ* (Ras Homolog Family Member Q) genleri miR-3135b'nin potansiyel hedefleri arasında yer almaktadır. Şekil 6.3.'te yer alan yolak incelendiğinde bu genlerin miR-3135b'nin ifadesindeki değişiklikten etkilenerek ifadelerinin düzensizleşmesi durumunda PKOS'ta rastlanan glikoz dengesinin bozulması ve insülin direnci ile ilişkilendirilebileceği düşünülmektedir. Aynı şekilde özellikle miR-3135b'nin potansiyel hedeflerinin Şekil 6.4.'te bulunan tip 2 diyabet yolağında da yer alması bu miRNA'nın insülin direnci-PKOS ilişkisinin açıklanması için önem teşkil ettiğini göstermektedir.

Bu bilgiler ışığında insülin direnci-PKOS ilişkisinin yumurtaya en yakın hücreler olan KGH ve MGH'lerden başlayarak metabolik bir şekilde bireyleri etkilediği söylenebilir. KGH ve MGH'ler üzerindeki bu etkilerin oositin olgunlaşmasına ve folikülün son safhaya geçerek ovulasyonun gerçekleşmemesine neden olması da mümkün gözükmektedir. İnsülin sinyal yolağı MAPK sinyal yolağı gibi farklılaşma ve proliferasyonu düzenleyen yollarla yakın ilişkiindedir ve bu yollarda yer alan genler miR-3135b ve miR-3188 gibi ortak miRNA'lar tarafından potansiyel olarak hedeflenmektedir. MGH ve KGH'lerde bu miRNA'ların ifade düzensizlikleri potansiyel olarak hedefledikleri genler de dikkate alındığında insülin direnci-PKOS arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir.

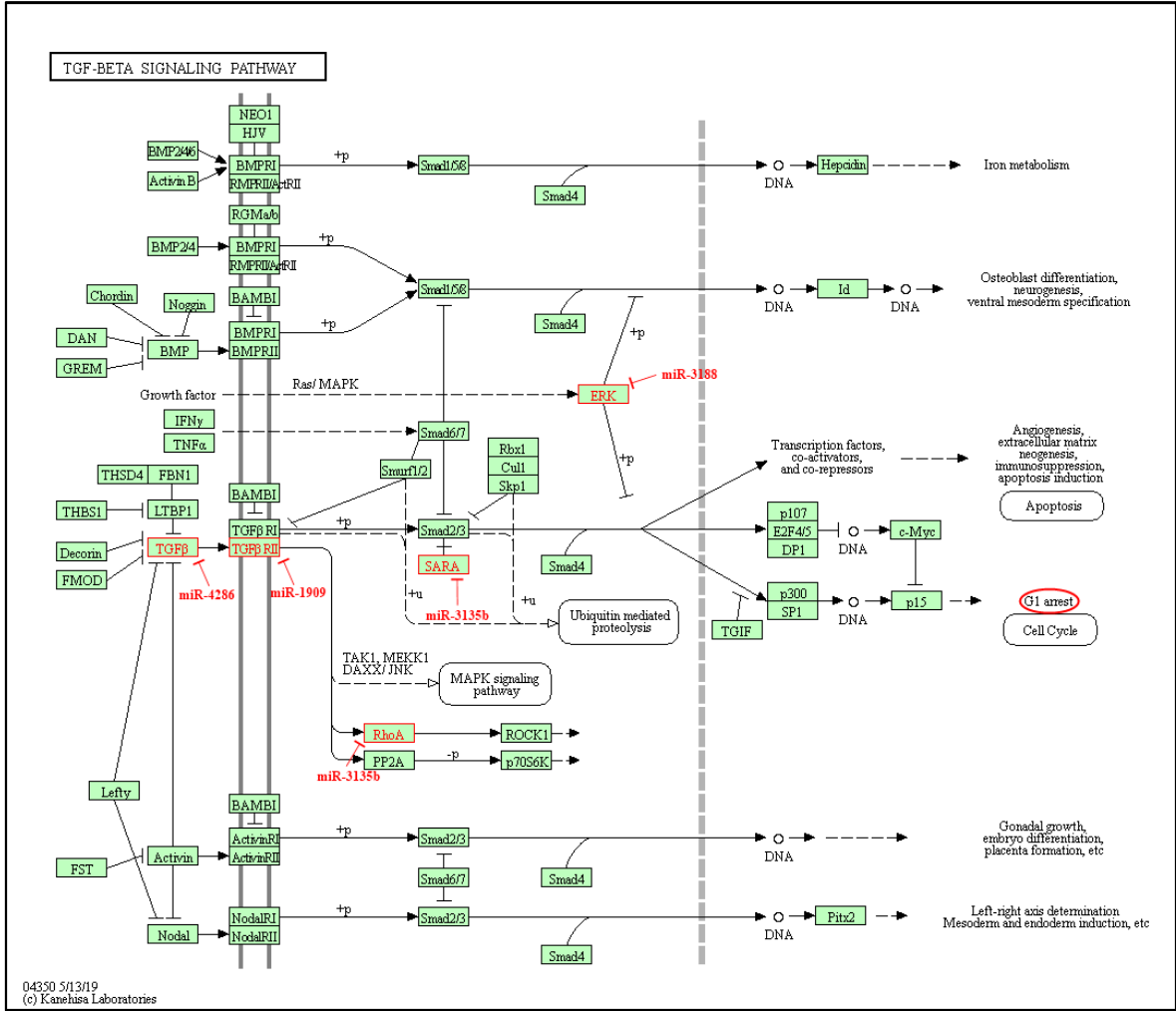


Şekil 6.4. KEGG figüründen adapte edilen tip 2 diyabet bağlantılı genleri belirtir gen ilişki haritası (hsa04930). Ortak listede yer alan mRNA'lar ve potansiyel olarak bu mRNA'ları hedefleyen miRNA'lar kırmızı renk ile belirtilmiştir.

TGF-β Sinyal Yolağı ve Mikroçevre

PKOS'un gelişmesinde en önemli mekanizmalardan bir tanesinin TGF-β sinyal yolağı olduğu bilinmektedir. Literatürde TGF-β sinyal yolağındaki düzensizlikler sonucunda yumurtalıklar içerisinde stromal dokunun serleştiğı, artış gösterdiği ve fibrozisin geliştiğı artan kollajen miktarıyla birlikte gösterilmiştir (100). Stroma dokusundaki bu sertleşmeye bağılı olarak da foliküllerin çatlayamadan over içerisinde biriktikleri tespit edilmiştir (101).

TGF-β sinyal yolağıının en başında bulunan *TGFBI* (Transforming Growth Factor, Beta 1) ve *TGFBR2* (Transforming Growth Factor, Beta Receptor II) genleri Şekil 6.5.'te de belirtildiğı üzere miR-4286'nın (*TGFBI* için) ve miR-1909'un (*TGFBR2* için) potansiyel hedefleri arasında bulunmaktadır. Aynı zamanda bu genlerin meta-analiz sonucunda da anlamlı olarak ifade farklılığı gösterdikleri tespit edilmiştir. TGF-β sinyal yolağıının hem daha önce belirtildiğı üzere ovaryum stroması aracılığıyla PKOS'a etkisi hem de hücre döngüsü ve apoptoz süreçlerinde oynadığı roller düşünüldüğünde KGH-MGH sınıfları arasında *TGFBI* ve *TGFBR2* genlerinin ifade düzensizliklerinin önemi dikkat çekmektedir. *TGFBI* sinyalinin foliküler olgunlaşmada rol oynadığı bilinmektedir (3). Bu durum molekülü potansiyel olarak hedefleyen miR-4286 ve yolakta rol alan diğer molekülleri hedefleyen miR-1909, miR-3135b ve miR-3188'in ifade düzensizliklerinin PKOS ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir (Şekil 6.5.).



Şekil 6.5. KEGG figüründen adapte TGF- β (hsa04350). Ortak listede yer alan mRNA'lar ve potansiyel olarak bu mRNA'ları hedefleyen miRNA'lar kırmızı renk ile belirtilmiştir.

6.2. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda;

- Literatürde şimdiye kadar yapılmış PKOS-kontrol gruplarına ait mikrodizin verisi kullanılarak yapılan meta-analiz çalışması ile PKOS-spesifik olarak MGH ve KGH'ler arasında 4 kat ve üzeri anlamlı ($p < 0,001$) ifade farklılığı gösteren mRNA'lar tespit edilmiştir.
- Bu PKOS-spesifik genler ile yapılan yolak analizleri sonucunda PKOS ile ilişkisi olduğu bilinen yollarda zenginleştiği tespit edilen genler seçilmiş ve laboratuvarımızda toplanan bağımsız örnekler ile 7 adet mRNA'nın ifade değişimi eş-zamanlı kantitatif PZR çalışması ile doğrulanmıştır. Bu aşamaya kadar tamamlanan çalışma ekibimiz tarafından 2016 yılında PLoS One dergisinde

akademik makale olarak yayınlanmıştır. İlgili yayın “TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR” kısmında sunulmaktadır.

- Laboratuvarımızda daha önce tanımlanan, MGH’lerde PKOS-kontrol grubunda ifade farklılığı mikrodizin yöntemi ile gösterilen 7 adet miRNA’nın PKOS grubunda MGH ve KGH’ler arasında ifadelerinin nasıl değiştiği araştırılmış, 5 adet miRNA’nın MGH-KGH arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) ifade farklılığı gösterdiği tespit edilmiştir.
- İfade farklılığı gösterdiği tespit edilen 5 miRNA’ya ait potansiyel hedefler tespit edilerek, PKOS-spesifik genler ile kesiştirilmiştir. Çıkan ortak gen listesi ile yolak zenginleştirme analizlerine gidilmiştir.
- PKOS’ta rol oynadığı bilinen MAPK sinyal yolağında yer alan ve çalışmada ifade farklılığı gösterdiği deneysel ve biyoinformatik olarak tespit edilen *MAPK1* geni ile gen ifadesine ters olarak ifade gösteren ve geni potansiyel olarak hedefleyen hsa-miR-3188’in PKOS gelişiminde mikroçevre elemanlarını etkileyerek aktif rol oynayabileceği gösterilmiştir. İleride *MAPK1* ve miR-3188 ifadelerinin fonksiyonel olarak araştırılmasının PKOS gelişiminin moleküler düzeyde aydınlatılması için büyük önem teşkil ettiği, somatik MGH ve KGH’lerde bu ifadelerin düzenlenmesinin PKOS’un tedavisi için bir potansiyel oluşturabileceği fikri ortaya çıkarılmıştır.

İleride bu ilişkinin daha net olarak gösterilebilmesi için granüloza hücre hatlarında miR-3188 ifadesinin artırılarak ve azaltılarak *MAPK1* ve yolakta bu genin altında yer alan genlerin (*c-FOS-JUNB* gibi) ifade düzeyindeki değişikliklerin belirlenmesi bu ilişkinin aydınlatılması için önemli olacaktır. Ek olarak PKOS geliştirilmiş fare modelinden elde edilebilecek MGH’lerin ve KGH’lerin bulunduğu ortamda miR-3188’in ifadesinin artırılarak hücresel boyuttaki değişikliklerin tespit edilerek farklılaşma sürecinin gözlemlenmesi ve karakterizasyonlarının belirlenmesi değerli olacaktır.

- PKOS ile ilişkisi daha önce gösterilmiş Wnt sinyal yolağındaki düzensizliklerin KGH-MGH’ler arasında ifadesi değişen *FZD3* ile bağlantılı olarak farklılaşma sürecini etkileyebileceği düşünülmektedir. Ayrıca standart ve standart olmayan Wnt sinyal yolaklarında yer alan birçok genin çalışmamızda ifade gösterdiği tespit edilen 5 adet miRNA tarafından potansiyel olarak hedeflendiği gösterilmiştir. Bu durum bu

miRNA'ların Wnt sinyal yolağı aracılığıyla PKOS için önemli bir rol oynayabileceklerini göstermektedir.

- PKOS-insülin direnci arasındaki ilişki KGH ve MGH'ler açısından da ele alınmış ve insülin direncinde kilit role sahip *INSR* geninin ifadesinin bu iki hücre arasında değıştiğı tespit edilmiştir. Ek olarak insülin sinyal yolağı ve tip 2 diyabet mekanizmasında miR-3135b'nin aktif role sahip bir miRNA olabileceğı gösterilmiştir.

İleride miR-3135b-insülin sinyal yolağı ilişkisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için farelerde insülin direnci ve PKOS geliştirilmesi sonucunda insülin sinyal yolağındaki ve miR-3135b ifadesindeki değışikliklerin MGH ve KGH düzeyinde araştırılması anlamlı olacaktır. Bu ilişkinin aydınlatılmasının henüz tam olarak hangisinin hangisine yol açtığı bilinmeyen PKOS-insülin direnci döngüsünün aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

- PKOS ve foliküler olgunlaşma ile ilişkisi iyi bilinen TGF- β sinyal yolağı ve yolakta anahtar role sahip *TGFBI* geni ile yolağı hedefleyen potansiyel miRNA'lar gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky P V, B JR. Campbell Biology. 10th ed. Wilbur B, editor. San Francisco: Benjamin Cummings; 2013. 1488 p.
2. Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development [Internet]. StatPearls. 2019. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30335333>
3. Yerushalmi GM, Salmon-Divon M, Ophir L, Yung Y, Baum M, Coticchio G, et al. Characterization of the miRNA regulators of the human ovulatory cascade. Sci Rep [Internet]. 2018 Oct 23;8(1):15605. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-33807-y>
4. Li Q, McKenzie LJ, Matzuk MM. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. Mol Hum Reprod [Internet]. 2008 Dec;14(12):673–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18996952>
5. Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. Hum Reprod Update [Internet]. 12(5):537–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728463>
6. Sun YC, Sun XF, Dyce PW, Shen W, Chen H. The role of germ cell loss during primordial follicle assembly: A review of current advances. Int J Biol Sci. 2017;13(4):449–57.
7. Macklon NS, Fauser BC. Follicle-stimulating hormone and advanced follicle development in the human. Arch Med Res [Internet]. 32(6):595–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11750735>
8. Williams CJ, Erickson GF. Morphology and Physiology of the Ovary. Endotext [Internet]. 2000;(1):1–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905186>
9. Hillier SG. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. Mol Cell Endocrinol [Internet]. 2001 Jun 20;179(1–2):39–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420129>

10. Macklon NS, Fauser BC. Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas* [Internet]. 1998 Oct 12;30(2):181–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9871911>
11. Clarke H. Control of Mammalian Oocyte Development by Interactions with the Maternal Follicular Environment. *Results Probl Cell Differ* [Internet]. 63:17–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28779312>
12. Andrei D, Nagy RA, van Montfoort A, Tietge U, Terpstra M, Kok K, et al. Differential miRNA Expression Profiles in Cumulus and Mural Granulosa Cells from Human Pre-ovulatory Follicles. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)* [Internet]. 2019;8(1):61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207252>
13. Hennet ML, Combelles CMH. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 23];56(10–12):819–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23417404>
14. Grøndahl ML, Andersen CY, Bogstad J, Borgbo T, Boujida VH, Borup R, et al. Specific genes are selectively expressed between cumulus and granulosa cells from individual human pre-ovulatory follicles. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Nov 22];18(12):572–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923488>
15. Berger JJ, Bates GW. Optimal management of subfertility in polycystic ovary syndrome. *Int J Womens Health* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Nov 23];6:613–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4063802&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
16. Dewailly D, Lujan ME, Carmina E, Cedars MI, Laven J, Norman RJ, et al. Definition and significance of polycystic ovarian morphology: a task force report from the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2014 [cited 2014 Nov 18];20(3):334–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345633>
17. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2014 Oct [cited 2014

- Oct 30];171(4):P1-29. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24849517>
18. Stein IF, Leventhal ML. Amenorrhea associated with bilateral polycystic ovaries. *Am J Obstet Gynecol.* 1935;29:181–91.
 19. Daniilidis A, Dinas K. Long term health consequences of polycystic ovarian syndrome: a review analysis. *Hippokratia* [Internet]. 2009 Apr [cited 2014 Dec 2];13(2):90–2. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2683463&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 20. Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord* [Internet]. 2007 Jun [cited 2014 Nov 23];8(2):127–41. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935197&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 21. Franks S, Berga SL. Does PCOS have developmental origins? *Fertil Steril* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Nov 15];97(1):2–6. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3263824&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 22. Urbanek M. The genetics of the polycystic ovary syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Feb [cited 2014 Nov 23];3(2):103–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncpendmet0400>
 23. Escobar-Morreale HF, Luque-Ramírez M, San Millán JL. The molecular-genetic basis of functional hyperandrogenism and the polycystic ovary syndrome. *Endocr Rev* [Internet]. 2005 Apr [cited 2014 Nov 23];26(2):251–82. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15561799>
 24. Abbott D, Barnett D, Bruns C, Dumesic D. Androgen excess fetal programming of female reproduction: a developmental aetiology for polycystic ovary syndrome? *Hum Reprod Update* [Internet]. 2005 [cited 2014 Nov 23];11(4):357–74. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15941725>
 25. Ezeh U, Yildiz BO, Azziz R. Referral bias in defining the phenotype and prevalence

- of obesity in polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2013 Jun [cited 2014 Nov 23];98(6):E1088-96. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3667270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
26. 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* [Internet]. 2010 Apr [cited 2014 Dec 2];93(6):1938–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2859983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
27. Azziz R, Tarlatzis R, Dunaif A, Ibanez L, Pugeat M, Taylor A, et al. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Nov 11];81(1):19–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711538>
28. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):456–88.
29. 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* [Internet]. 2010 Jan [cited 2014 Nov 16];8:41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2909929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clin Epidemiol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Nov 22];6:1–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3872139&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
31. Goldberg JM, Falcone T, Attaran M. In vitro fertilization update. *Cleve Clin J Med* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2014 Nov 28];74(5):329–38. Available from: <http://www.ccjm.org/cgi/doi/10.3949/ccjm.74.5.329>

32. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010 Nov [cited 2014 Nov 6];1803(11):1231–43. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910001837>
33. Kwak PB, Iwasaki S, Tomari Y. The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2010 Nov [cited 2014 Nov 22];101(11):2309–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726859>
34. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* [Internet]. 2003 Sep 25 [cited 2014 Nov 2];425(6956):415–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508493>
35. Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* [Internet]. 2004 Jan 2 [cited 2014 Aug 4];303(5654):95–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14631048>
36. 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* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2014 Nov 12];21(21):5875–85. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=131079&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* [Internet]. 2001 Jan 18 [cited 2014 Nov 8];409(6818):363–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11201747>
38. Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* [Internet]. 2005 Nov 18 [cited 2014 Sep 6];123(4):631–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271387>
39. Czech B, Zhou R, Erlich Y, Brennecke J, Binari R, Villalta C, et al. Hierarchical rules for Argonaute loading in *Drosophila*. *Mol Cell* [Internet]. 2009 Nov 13 [cited 2014 Nov 14];36(3):445–56. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2795325&tool=pmcentr>

ez&rendertype=abstract

40. Yang J-S, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, Siepel AC, et al. Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* [Internet]. 2011 Feb [cited 2014 Nov 22];17(2):312–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3022280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
41. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* [Internet]. 2004 Jan 23 [cited 2014 Jul 17];116(2):281–97. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867404000455>
42. Gargalionis AN, Basdra EK. Insights in microRNAs biology. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Nov 23];13(13):1493–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23745801>
43. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008 Feb [cited 2014 Jul 10];9(2):102–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18197166>
44. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2004 Jul [cited 2014 Nov 9];5(7):522–31. Available from: <http://www.readcube.com/articles/10.1038/nrg1379>
45. 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* [Internet]. 2004 Aug [cited 2014 Nov 22];63(1):51–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284005>
46. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology* [Internet]. 2002 Mar;143(3):898–908. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861511>
47. Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, et al. Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production

- in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol*. 2005;19(2):379–90.
48. Raja-Khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS. The role of TGF- β in polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Nov 22];21(1):20–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23585338>
 49. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev*. 2012 Dec;33(6):981–1030.
 50. Muasher SJ, Abdallah RT, Hubayter ZR. Optimal stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertil Steril* [Internet]. 2006 Aug [cited 2014 Nov 28];86(2):267–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16753157>
 51. Sang Q, Yao Z, Wang H, Feng R, Wang H, Zhao X, et al. 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* [Internet]. 2013 Jul [cited 2014 Nov 22];98(7):3068–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666971>
 52. 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* [Internet]. 2014 Mar [cited 2014 Nov 22];31(3):355–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390626>
 53. Sørensen AE, Wissing ML, Salö S, Englund ALM, Dalgaard LT. MicroRNAs Related to Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Genes (Basel)* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Nov 22];5(3):684–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25158044>
 54. Song Y, Yu G, Xiang Y, Li Y, Wan L, Tan L. Altered miR-186 and miR-135a contribute to granulosa cell dysfunction by targeting ESR2: A possible role in polycystic ovary syndrome. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2019 Aug 20;494(May):110478. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720719301807>
 55. Hou Y, Wang Y, Xu S, Qi G, Wu X. Bioinformatics identification of microRNAs

- involved in polycystic ovary syndrome based on microarray data. *Mol Med Rep* [Internet]. 2019 Jul;20(1):281–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31115532>
56. Che Q, Liu M, Xu J, Liu Y, Cao X, Dong X, et al. Characterization of circular RNA expression profiles in cumulus cells from patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* [Internet]. 2019 Jun;111(6):1243-1251.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30979425>
57. Aydos A. Normal Bireylerde ve Polikistik Over Sendromlu (PKOS) Hastalarda Granüloza Hücrelerinin MikroRNA (miRNA) Profillerinin Belirlenmesi. Ankara University; 2014.
58. Chen Z, Ou H, Wu H, Wu P, Mo Z. Role of microRNA in the Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome. *DNA Cell Biol* [Internet]. 2019 Aug;38(8):754–62. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/dna.2019.4622>
59. Yulug IG, Gur-Dedeoglu B. Functional genomics in translational cancer research: focus on breast cancer. *Brief Funct Genomic Proteomic* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Nov 22];7(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18326545>
60. Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. *Nature* [Internet]. 2002 Apr 25 [cited 2014 Nov 22];416(6883):885–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11976691>
61. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2003 Feb 15;31(4):e15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12582260>
62. Russell S, Meadows L, Russell R. *Microarray Technology in Practice*. Academic Press; 2008. 464 p.
63. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* [Internet]. 2001 Dec;29(4):365–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726920>
64. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, et al.

- ArrayExpress update--trends in database growth and links to data analysis tools. [Internet]. Vol. 41, Nucleic acids research. 2013 [cited 2014 Jul 20]. p. D987-90. Available from: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
65. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. [Internet]. Vol. 30, Nucleic acids research. 2002 [cited 2014 Nov 14]. p. 207–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
 66. Campain A, Yang YH. Comparison study of microarray meta-analysis methods. BMC Bioinformatics [Internet]. 2010 Aug 3;11:408. Available from: <http://www.doaj.org/doaj?func=abstract&id=584025>
 67. Eijssen LMT, Jaillard M, Adriaens ME, Gaj S, de Groot PJ, Müller M, et al. User-friendly solutions for microarray quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org. Nucleic Acids Res [Internet]. 2013;41(Web Server issue):W71-6. Available from: [/pmc/articles/PMC3692049/?report=abstract](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811441/)
 68. Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menenzes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. [Internet]. Vol. 3, Cancer informatics. 2007 [cited 2014 Nov 22]. p. 11–7. Available from: <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>
 69. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. Biostatistics [Internet]. 2003 Apr [cited 2014 Oct 14];4(2):249–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925520>
 70. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams [Internet]. 2007. Available from: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>
 71. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. [Internet]. Vol. 95, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1998 [cited 2014 Oct 22]. p. 14863–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24541&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 72. Saldanha AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. [Internet].

- Vol. 20, *Bioinformatics* (Oxford, England). 2004 [cited 2014 Oct 24]. p. 3246–8. Available from: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/20/17/3246.abstract?keytype=ref&ijkey=31ed76d5EFKWk>
73. Mann H, Whitney D. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat* [Internet]. 1947 Mar 1 [cited 2014 Oct 14];18(1):50–60. Available from: <http://projecteuclid.org/euclid.aoms/1177730491>
 74. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2014 Jul 9];25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
 75. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, et al. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Dec 15];10(6):R64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2718498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 76. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015 Jan;43(Database issue):D146-52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25378301>
 77. Liu W, Wang X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol* [Internet]. 2019;20(1):18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30670076>
 78. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. [Internet]. Vol. 41, *Nucleic acids research*. 2013 [cited 2014 Aug 13]. p. W77-83. Available from: <http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>
 79. 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 Oct;97(10):E2016-21.

80. Kenigsberg S, Bentov Y, Chalifa-Caspi V, Potashnik G, Ofir R, Birk OS. Gene expression microarray profiles of cumulus cells in lean and overweight-obese polycystic ovary syndrome patients. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2009 Feb [cited 2014 Nov 22];15(2):89–103. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141487>
81. Aydos A, Gurel A, Oztemur Islakoglu Y, Noyan S, Gokce B, Ecemis T, et al. Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells. *PLoS One* [Internet]. 2016;11(12):e0168875. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27997581>
82. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. [Internet]. Vol. 28, *Nucleic acids research*. 2000 [cited 2014 Jul 10]. p. 27–30. Available from: <http://www.genome.ad.jp/kegg/>
83. Wild RA. Long-term health consequences of PCOS. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2014 Nov 30];8(3):231–41. Available from: <http://humupd.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/humupd/8.3.231>
84. Coskun S, Otu HH, Awartani K a, Al-Alwan L a, Al-Hassan S, Al-Mayman H, et al. Gene expression profiling of granulosa cells from PCOS patients following varying doses of human chorionic gonadotropin. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2013 Mar [cited 2014 Aug 6];30(3):341–52. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3607681&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
85. Wood JR, Dumesic DA, Abbott DH, Strauss JF. Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2007 Feb [cited 2014 Dec 3];92(2):705–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17148555>
86. Oztemur Y, Bekmez T, Aydos A, Yulug IG, Bozkurt B, Dedeoglu BG. A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 May 18];10(5):e0126837. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25978727>
87. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2009

- Jul;15(7):399–409. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19443606>
88. Su Y-Q, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol* [Internet]. 2003 Nov 1;263(1):126–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14568551>
 89. Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ovarian Res* [Internet]. 2009;2:20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2803446&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 90. Sharma SC, Richards JS. Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Oct 27;275(43):33718–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10934195>
 91. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell* [Internet]. 2009 Jul;17(1):9–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619488>
 92. Wang H-X, Tekpetey FR, Kidder GM. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2009 Jan;15(1):11–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038973>
 93. Ricken A, Lochhead P, Kontogiannea M, Farookhi R. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* [Internet]. 2002 Jul;143(7):2741–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072409>
 94. Kitasaka H, Kawai T, Hoque SAM, Umehara T, Fujita Y, Shimada M. Inductions of granulosa cell luteinization and cumulus expansion are dependent on the fibronectin-integrin pathway during ovulation process in mice. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(2):e0192458. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29420611>

95. Corbould A, Kim Y-B, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, et al. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2005 May 7 [cited 2014 Dec 13];288(5):E1047-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5613682>
96. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev* [Internet]. 1997 Dec;18(6):774–800. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/edrv.18.6.0318>
97. Feng C, Lv P-P, Yu T-T, Jin M, Shen J-M, Wang X, et al. The association between polymorphism of INSR and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015;16(2):2403–25. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/16/2/2403/>
98. Gangopadhyay S, Agrawal N, Batra A, Kabi BC, Gupta A. Single-Nucleotide Polymorphism on Exon 17 of Insulin Receptor Gene Influences Insulin Resistance in PCOS: A Pilot Study on North Indian Women. *Biochem Genet* [Internet]. 2016 Apr;54(2):158–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26721804>
99. Purcell SH, Chi MM, Lanzendorf S, Moley KH. Insulin-stimulated glucose uptake occurs in specialized cells within the cumulus oocyte complex. *Endocrinology* [Internet]. 2012 May;153(5):2444–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22408172>
100. Yu H, Königshoff M, Jayachandran A, Handley D, Seeger W, Kaminski N, et al. Transgelin is a direct target of TGF-beta/Smad3-dependent epithelial cell migration in lung fibrosis. *FASEB J* [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 Apr 20];22(6):1778–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245174>
101. West ER, Xu M, Woodruff TK, Shea LD. Physical properties of alginate hydrogels and their effects on in vitro follicle development. *Biomaterials* [Internet]. 2007 Oct [cited 2014 Dec 12];28(30):4439–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2034204&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

EKLER

EK-1 YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASINDA KULLANILAN YÖNTEMLER

PKOS'lu Bireylerden Folikül Sıvısının Toplanması

IVF tedavisi için başvuran kadınlarda öncelikle yumurtalıklar uyarılarak birden fazla folikülün olgunlaşması tetiklenmektedir. Daha sonra hCG (İnsan Koryonik Gonadotropini – Human Chorionic Gonadotropin) verilerek foliküller çatlama öncesi duruma kadar olgunlaştırılır. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra (foliküller kendileri çatlamadan 12 saat önce) birey 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 kümülüs-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 KGH'ler ayrıca toplanarak bir diğer tüpe alınır ve bir sonraki aşama olan RNA izolasyonu için -80 °C'ye kaldırılmışlardır. 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.

Folikül Sıvısından MGH'lerin İzolasyonu

MGH'lerin 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. MGH'leri 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 MGHler pipet yardımı ile toplanmıştır. Ara fazdaki doku kalıntıları da pipet yardımı ile toplanarak uzaklaştırılmıştır. Toplanan MGH'ler bir sonraki aşama olan RNA izolasyonu için ve ileride protein çalışmalarında kullanılmak üzere 2'ye ayrılarak -80 °C'ye kaldırılmışlardır.

MGH ve KGH'lerden Total RNA İzolasyonu

-80 °C'de muhafaza edilen MGH'ler ve KGH'ler RNA izolasyon protokolünün uygulanması için 1 ml QIAzol'e (Qiagen, 79306) alınmıştır. QIAzol içeriğinde bulunan guanidinium thiocyanate proteinleri parçalar ve RNA'yı RNaz'lardan korur. Hücrelerin gruplanma ve yapışma ihtimaline karşı QIAzol içerisindeki hücreler vortekslenmiştir ve ince uçlu enjektörden geçirilmişlerdir. Böylece homojenizasyon sağlanır, QIAzol bütün hücrelere 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 dibe 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 çözülmüş ve buz üzerine alınmıştır.

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 bç DNA ladder)

Gene Ruler 100 bç 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.



EK-2 ETİK KURUL KARARI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Polikistik over sendromu'nda (PKOS) yumurta mikroçevresindeki moleküler değişikliklerin mikroRNA (miRNA) düzeyinde araştırılması	
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhiye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Bala GÜR DEDEOĞLU		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü		
	DESTEKLEYİCİ			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>	
		FAZ 4	<input type="checkbox"/>	
		Gözlemsel ilaç çalışması	<input type="checkbox"/>	
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>		
	Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar ve Vaka-kontrol Araştırması			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TÉK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

9.11.2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Polikistik over sendromu'nda (PKOS) yumurta mikroçevresindeki moleküler değişikliklerin mikroRNA (miRNA) düzeyinde araştırılması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU			
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU		
	OLGU RAPOR FORMU		
			Dili
			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
	İLAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
DİĞER:	<input type="checkbox"/>		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:04-156-16	Tarih: 22 Şubat 2016	
	Yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyasına ait: Çalışma başlığının "Polikistik over sendromu'nda (PKOS) yumurta mikroçevresindeki moleküler değişikliklerin mikroRNA (miRNA) düzeyinde araştırılması" olarak değiştirilmesi, çalışma süresinin Eylül 2016-Eylül 2019 tarihlerini kapsayacak şekilde düzenlenmesi hakkında yapılan bildirim (16.02.2016) incelenerek toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile uygun bulundu.		

27 Şubat 2016



ASLI GİBİDİR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Polikistik over sendromu'nda (PKOS) yumurta mikroçevresindeki moleküler değişikliklerin mikroRNA (miRNA) düzeyinde araştırılması
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları 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	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>M. Mellî</i>
Prof.Dr.Irfan SOYKAN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Irfan Soykan</i>
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Serdar Öztürk</i>
Prof.Dr.Seher DEMİRER	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Seher Demirer</i>
Prof.Dr.Şule ŞENGÜL	Nefroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Şule Şengül</i>
Prof.Dr.Inci İLHAN	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>İnci İlhan</i>
Prof.Dr.Serap SIVRI	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Serap Sivri</i>
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Zarife Şenocak</i>
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Banu Çakır</i>
Doç.Dr.Süha YAĞCIOĞLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Süha Yağcıoğlu</i>
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyostatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Derya Öztuna</i>
Doç.Dr.Selami Koçak TOPRAK	Hematoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Selami Koçak Toprak</i>
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<i>Nüket Kutlay</i>
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>Önder İlgili</i>
Mühürbe SUTAY	İşletme	-	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<i>M. Sutay</i>

*.Toplantıda Bulunma

24 Şubat 2016

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
ASLI GIBIDIR

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

M. Mellî

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alp AYDOS

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 08.04.1989

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

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

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

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı (2014)

İş Tecrübesi

Kurumu:

Ürün ve Uygulama Uzmanı

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

Laboratuvar Birim Yöneticisi

Medisa Dış Ticaret ve Pazarlama Ltd. Şti. (2016-)

Yayınlar

Oztemur-Islakoglu Y, Noyan S, Aydos A, Gur-Dedeoglu B. Meta-microRNA Biomarker Signatures to Classify Breast Cancer Subtypes. OMICS. 2018 Nov 2.

Ozdogan H, Gur-Dedeoglu B, Oztemur-Islakoglu Y, Aydos A, Kose S, Atalay A, et al. DICER1 gene and miRNA dysregulation in mesenchymal stem cells of patients with

myelodysplastic syndrome and acute myeloblastic leukemia. Leuk Res. 2017 Dec;63:62–71.

Aydos A, Oztemur Y, Gur-Dedeoglu B. Polycystic ovary syndrome and molecular approaches. Turk Hij ve Deney Biyol Derg. 2016;73(1):81–8.

Oztemur Y, Bekmez T, **Aydos A**, Yulug IG, Bozkurt B, Gur-Dedeoglu B. A ranking-based meta-analysis reveals let-7 family as a meta-signature for grade classification in breast cancer. PLoS One. 2015 Jan [cited 2015 May 18];10(5):e0126837.

Coskunpinar E, Arkan H, Gur-Dedeoglu B, Aksoz I, Polat E, Araz T, **Aydos A**, et al. Determination of effective miRNAs in wound healing in an experimental Rat Model. Cell Mol Biol. 2015;61(8):89–96.

Oztemur Y, **Aydos A**, Gur-Dedeoglu B. Combination of breast cancer microarray data by using bioinformatic methods - Meta-analysis approaches. Turk Hij ve Deney Biyol Derg. 2015;72(2):155–62.

Uluslararası kongrelerde sunulan bildiriler:

Oztemur Y, Bekmez T, **Aydos A**, Yulug IG, Bozkurt B, Gur-Dedeoglu B. 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*

Oztemur Y, Bekmez T, **Aydos A**, Purutcuoglu V, Gur-Dedeoglu B. 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:

Aydos A, Oztemur Y, Gur-Dedeoglu B. Polikistik over sendromunda kumulus ve granüloza hücrelerinin gen ifade profillerinin belirlenmesi. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Aydın. 2013. *Poster Sunum*

Oztemur Y, Bekmez T, **Aydos A**, Purutcuoglu V, Gur-Dedeoglu B. Meme kanserinin patolojik alt tiplerinin meta-analiz yöntemine dayalı miRNA imzaları ile sınıflandırılması. XIII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Aydın. 2013. *Poster Sunum*

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Aydos A, Gurel A, Oztemur-Islakoglu Y, Noyan S, Gokce B, Ecemis T, et al. Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells. PLoS One. 2016;11(12):e0168875.



RESEARCH ARTICLE

Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells

Alp Aydos¹, Aykut Gurel², Yasemin Oztemur Islakoglu¹, Senem Noyan¹, Bagdagul Gokce³, Tolga Ecemis⁴, Cemil Kaya⁵, Arif Tarik Aksu⁶, Bala Gur Dedeoglu^{1*}

1 Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey, **2** Test Tube Babies Unit, HRS Women Hospital, Ankara, Turkey, **3** Test Tube Babies Unit, Medicana International Ankara Hospital, Ankara, Turkey, **4** Department of Gynecology and Obstetrics, Liv Hospital, Ankara, Turkey, **5** Department of Gynecology and Obstetrics, TOBB ETU Hospital, Ankara, Turkey, **6** Department of Gynecology and Obstetrics, HRS Women Hospital, Ankara, Turkey

* gurbala@yahoo.com



 OPEN ACCESS

Citation: Aydos A, Gurel A, Oztemur Islakoglu Y, Noyan S, Gokce B, Ecemis T, et al. (2016) Identification of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) Specific Genes in Cumulus and Mural Granulosa Cells. *PLoS ONE* 11(12): e0168875. doi:10.1371/journal.pone.0168875

Editor: Andrew Wolfe, John Hopkins University School of Medicine, UNITED STATES

Received: August 31, 2016

Accepted: December 7, 2016

Published: December 20, 2016

Copyright: © 2016 Aydos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The Medicana International Hospital provided support in the form of salaries for the author [BG], HRS Women Hospital provided support in the form of salaries for the authors [AG], [ATA], Liv Hospital provided support in the form of salaries for the author [TE], TOBB ETU Hospital provided support in the form of salaries for the author [CK] but did not have any additional role in

Abstract

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a metabolic and endocrine disorder which affects women of reproductive age with prevalence of 8–18%. The oocyte within the follicle is surrounded by cumulus cells (CCs), which connect with mural granulosa cells (MGCs) that are responsible for secreting steroid hormones. The main aim of this study is comparing gene expression profiles of MGCs and CCs in PCOS and control samples to identify PCOS-specific differentially expressed genes (DEGs). In this study, two microarray databases were searched for mRNA expression microarray studies performed with CCs and MGCs obtained from PCOS patients and control samples. Three independent studies were selected to be integrated with naive meta-analysis since raw meta-data from these studies were found to be highly correlated. DEGs in these somatic cells were identified for PCOS and control groups. This study enabled us to reveal dysregulation in MAPK (mitogen activated protein kinase), insulin and Wnt signaling pathways between CCs and MGCs in PCOS. The meta-analysis results together with qRT-PCR validations provide evidence that molecular signaling is dysregulated through MGCs and CCs in PCOS, which is important for follicle and oocyte maturation and may contribute to the pathogenesis of the syndrome.

Introduction

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the most common endocrine disorder affecting women of reproductive age [1]. The syndrome has heterogeneous clinical characteristics, including hyperandrogenemia, ovulatory dysfunction, polycystic ovarian morphology (PCOM) and metabolic disorders (obesity, insulin resistance and diabetes). Additionally, it is a common cause of anovulation and female infertility through impairing oocyte-follicle maturation [2].

Mural granulosa cells (MGCs) and cumulus cells (CCs), which are the somatic cells that make up the oocyte microenvironment, secrete steroid hormones and produce growth

the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: Commercial affiliations, Medicana International Hospital, HRS Women Hospital, Liv Hospital and TOBB ETU Hospital do not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

hormone involved in oocyte development. One of the basic functions of MGCs is arresting the oocyte in the meiotic phase until ovulation by secreting oocyte maturation inhibitor (OMI) [3]. At the beginning of the menstrual cycle, MGCs receive external hormone signals to resume oocyte maturation. This activation signal is then transmitted to the CCs, which are in direct contact with the oocyte. This cumulus-oocyte complex (COC) has gap junctions for establishing a network linking CCs and oocyte. The CCs supply the oocyte with pyruvate needed to meet its energy requirements, and supply nucleotides and amino acids [4].

Microarray technology allows gene expression profiles to be identified, which is important for understanding and revealing the molecular mechanisms of diseases. However, only one study has used this method to compare MGC and CC gene expression profiles in control samples [5]. Assembling microarray datasets from different sources, known as meta-analysis, provides an extended perspective with improved statistical power due to increased sample size by including robust, replicable and accurate information from separate data sources [6]. In this study, our meta-analysis combined expression data for MGCs and CCs obtained from both PCOS and control samples. This allowed us to explore PCOS-specific differentially expressed genes (DEGs) between MGCs and CCs. Comparing the gene expression profiles of MGCs and CCs helped us to identify the important specific functions of these two somatic cell types in PCOS. The aim of the study was to compare gene expression profile data provided from the Gene Expression Omnibus [7] (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) and ArrayExpress [8] (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) databases, comparing MGCs and CCs in PCOS without differentially expressed genes in women with normal ovarian function.

Materials and Methods

The main flowchart of the study is given in Fig 1.

Microarray studies extracted from databases and *in-silico* subjects

Expression data of MGCs and CCs for PCOS patients and controls were searched for in the GEO and ArrayExpress databases. We used "cumulus cells, granulosa cells, PCOS" key words and their combinations. Database interfaces were filtered by "Organism: Human" and "Platform: Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0 (Platform ID: GPL570 for GEO, A-AFFY-44 for ArrayExpress)". The expression data were chosen from studies performed using the same microarray platform (GeneChip HG-U133 Plus 2.0 (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA)) to eliminate platform based variabilities. Using these criteria, we chose three datasets for the meta-analysis: two with GEO accession numbers GSE34526 [9], GSE10946 [10] and one ArrayExpress accession number E-MEXP-3641 [5].

Experimental subjects

MGCs and CCs were obtained from a total sample of 12 PCOS patients diagnosed according to the 2003 Rotterdam revised criteria during oocyte pick up for *in vitro* fertilization. The IVF protocol was as follows. In all patients, controlled ovarian hyperstimulation was performed using a single dose of 150 IU gonadotropin β on cycle day 2 or 3. To prevent premature ovulation, all patients received the antagonist from the sixth stimulation day before ovulation was induced 10 days after stimulation using 5,000 IU hCG. In case of risk of overhyperstimulation syndrome, 0.2 mg GnRH-agonist was used. Follicular puncture was performed exactly 35 hours after induction of ovulation [11].

This study and the use of the tissue material in the project were approved by the Research Ethics Committee of Ankara University School of Medicine. Written consent was obtained from all patients in accordance with the Helsinki Declaration.



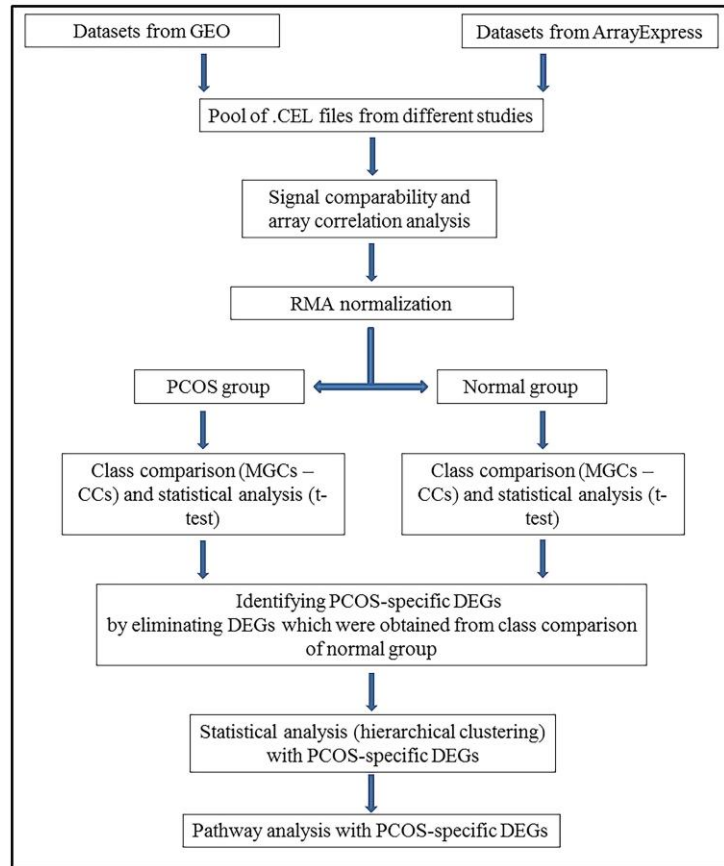


Fig 1. Flowchart of the process for identifying PCOS-specific differentially expressed genes (DEGs) and related pathways.

doi:10.1371/journal.pone.0168875.g001

Isolation of MGCs and CCs from follicular fluid. MGCs and CCs were collected from follicular fluid (FF) during oocyte pick-up (OPU) 36 hours after hCG injection. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were taken to culture medium for IVF procedure. The remaining follicular fluid from the same patient was pooled for MGC extraction. Oocytes were extracted by dissection from the COC with the remaining cumulus cells being pooled and collected for our study. Pooled CCs and FF were transferred to our laboratory at 4°C within an hour to prevent cell death. After transfer, MGCs were isolated from FF using Biocoll phase-gradient separating solution (Biochrom AG) at 600 g for 15 min at 4°C. The interphase layers, which were

granulosa cells, were collected and washed twice with 1X Phosphate Buffered Saline (PBS) (Lonza).

After GCs extraction, total RNA was extracted from cumulus and granulosa cells using TRIzol Reagent (Life Technologies, Inc.). The concentration and purity of the extracted total RNA was assessed using an ND-1000 Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop) before storage at -80°C until further analysis. Finally, complementary DNA (cDNA) was synthesized using 500 ng total RNA with Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche), according to the manufacturer's instructions.

Signal comparability and array correlation analysis for combining datasets

Each dataset obtained from the databases was uploaded to ArrayAnalysis [12] (<http://www.arrayanalysis.org/>) for array correlation and signal-array comparability analysis. Highly correlated (Pearson's $r \geq 0.8$) array datasets were selected after array correlation analysis.

Microarray data normalization and rearrangement of the meta-data

Since the normalized data obtained from the three independent microarray studies were found to be highly correlated with each other, all three datasets were combined and normalized as a single dataset by Robust Multi-Array Average (RMA) method using BRB-ArrayTools (v4.4.1) [13]. Since this combination protocol is known as naive meta-analysis [14], so we refer to the data generated from the meta-analysis as meta-data.

Microarray data analysis

After normalization of the meta-data, two classes were defined for identifying DEGs between CCs and MGCs for PCOS and control groups. A class comparison (unpaired t-test with random variance model [15]) was performed with minimum 4 fold-change ($p \leq 0.001$) for each PCOS and control group.

DEGs between MGC and CC in the control group were differentiated from those in the PCOS group using VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) [16] to identify those genes expressed only in PCOS (PCOS-specific DEGs).

Pathway enrichment analysis

We performed pathway enrichment analysis to determine the biological importance and functional classification of PCOS-specific DEGs. GeneCodis (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) [17–19] and WebGestalt (WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit) (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/>) [20] web-based enrichment analysis tools were used for this pathway analysis.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

PCOS-specific DEGs between MGCs and CCs were validated with quantitative real-time PCR (qRT-PCR). qRT-PCR analysis was performed on the Roche LightCycler[®] 480 using gene-specific primers and SYBR Green I Master mix (Roche). Gene-specific primers are listed in S1 Table. The $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method [21] was used to analyze the qRT-PCR results with ACTB as a normalization factor.

Statistical analysis

Unpaired Student's t-test was used to test the statistical significance of differentially expressed genes between MGCs and CCs for both PCOS and control groups. Paired Student's t-test was



used to test the statistical significance of PCOS-specific DEGS validated by qRT-PCR. $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

PCOS-specific DEGs were clustered using hierarchical clustering and their distance values were calculated using the average linkage method.

Results

Correlation of datasets

Applying our search filtering criteria, we found three microarray datasets (GSE10946, GSE34526 and E-MEXP-3641) that had been performed with Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays.

GSE10946 (Kenigsberg *et al.*) [10] contained 23 cumulus samples (12 from PCOS patients, 11 from controls). GSE34526 (Kaur *et al.*) [9] contained 10 granulosa samples (7 from PCOS patients, 3 from controls). E-MEXP-3641 (Grøndahl *et al.*) contained 25 control samples (12 with granulosa cells, 13 with cumulus cells). Thus, the three studies provided a total of 58 samples, comprising 7 granulosa samples, 12 cumulus samples from PCOS patients and 15 granulosa, 24 cumulus samples from controls (Table 1). We also confirmed that all patients in the studies were of reproductive age (between 26–39) and had all received the same IVF treatment.

Identification of PCOS-specific differentially expressed genes

Raw data were normalized and analyzed using BRB-ArrayTools to identify differentially expressed genes between CCs and MGCs. The two groups were defined as PCOS and control. In the PCOS group, 1,390 genes were differentially expressed in CCs compared to MGCs with a minimum 4-fold change ($p < 0.001$). In the control group, 32 genes for CCs compared to MGCs were also significantly differentially expressed with a minimum 4-fold change ($p < 0.001$). DEG lists for each group are given in S2 Table.

To identify common DEGs between PCOS and control group, the two datasets were intersected using the Venny Venn's diagrams drawing tool with 18 genes listed as common DEGs. After eliminating these common DEGs, 1372 genes were identified as PCOS-specific DEGs (Fig 2).

Pathway enrichment analysis with PCOS-specific DEGs

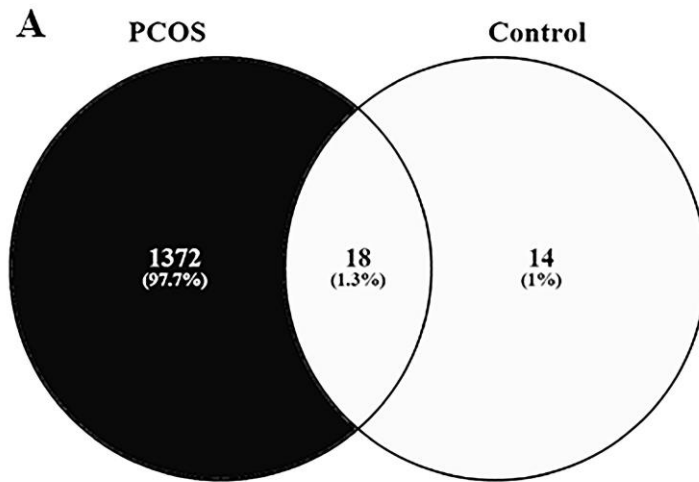
Pathway enrichment analysis with PCOS-specific DEGs was performed using the WebGestalt pathway analysis toolkit. The KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [22] pathway enrichment results showed that most PCOS-specific DEGs were significantly enriched ($p < 0.0225$) in PCOS-related pathways like MAPK (Mitogen-Activated Protein

Table 1. Datasets used for meta-analysis.

	PCOS		Control	
	Granulosa	Cumulus	Granulosa	Cumulus
GSE10946	-	12	-	11
GSE34526	7	-	3	-
E-MEXP-3641	-	-	12	13
Total	7	12	15	24

The raw data files for the samples were combined and uploaded to the ArrayAnalysis web tool for correlation analysis. The combined datasets were found to be highly correlated (Pearson's $r \geq 0.8$) (S1 Fig).

doi:10.1371/journal.pone.0168875.t001



B

Pathway Name	Gene	p-value
MAPK signaling pathway	37	0.000000
TGF-beta signaling pathway	17	0.000000
Type I diabetes mellitus	11	0.000000
Wnt signaling pathway	19	0.000001
Insulin signaling pathway	17	0.000004
Type II diabetes mellitus	10	0.000005
Progesterone-mediated oocyte maturation	11	0.000200
GnRH signaling pathway	12	0.000200
Oocyte meiosis	11	0.001400
Cell cycle	9	0.022500

Fig 2. (A) Venn diagram of DEGs for PCOS and control groups obtained from meta-analysis with 1372 genes defined as PCOS specific and 18 genes in common. (B) Pathway enrichment analysis of the 1372 PCOS-specific DEGs.

doi:10.1371/journal.pone.0168875.g002

Kinase) signaling pathway, TGF-beta signaling pathway, diabetes mellitus related pathways, insulin signaling pathway, oocyte-cell maturation pathways and hormonal signaling pathways (Fig 2).

Since 37 of the PCOS-specific DEGs were enriched in the MAPK signaling pathway (S2 Fig), we specifically focused on those genes that are members of this pathway to perform further analysis.

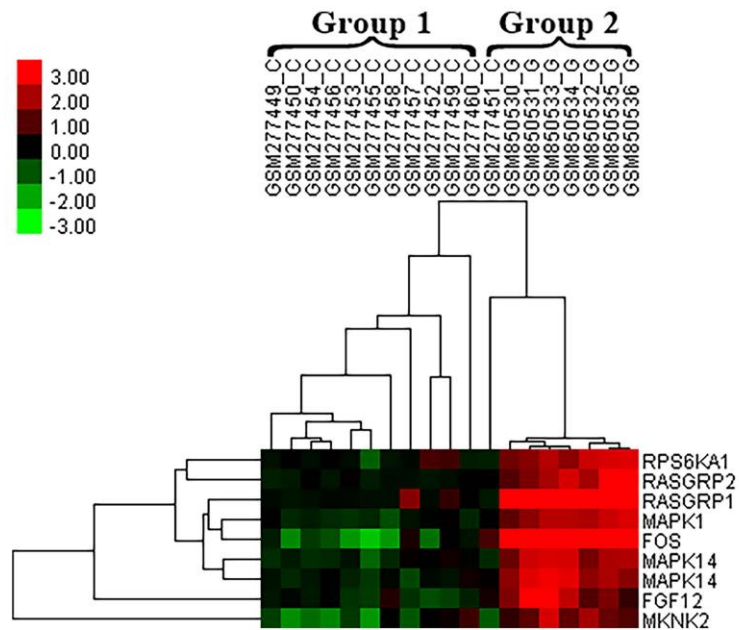


Fig 3. Hierarchical clustering of samples from meta-data and MAPK signaling pathway-related genes, differentially expressed in the meta-analysis study between MGCs and CCs in PCOS group. Cumulus cells were successfully grouped in Group 1, in which expression of MAPK signaling pathway related genes was downregulated.

doi:10.1371/journal.pone.0168875.g003

Hierarchical clustering analysis demonstrated that the expression profiles of some MAPK signaling pathway members, such as MAPK1 (Mitogen-Activated Protein Kinase 1), MAPK14 (p38) (Mitogen-Activated Protein Kinase 14), FGF12 (Fibroblast Growth Factor 12), MKNK2 (MAP Kinase Interacting Serine/Threonine Kinase 2), RPS6KA1 (Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 1), FOS (FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog) and RASGRP1-2 (RAS Guanyl Releasing Protein 1–2), enable CCs to be successfully distinguished from MGCs in PCOS. The expression of these members was also drastically downregulated in group 1, in which CCs are located, whereas they were upregulated in MGCs (Fig 3). On the basis of these results, we further investigated MAPK signaling pathway members (p38 (MAPK14), ERK (MAPK1) and FOS) in independent PCOS samples using qRT-PCR. This confirmed that their expression was downregulated in CCs compared with MGCs.

Validation of PCOS-specific DEGs by qRT-PCR

Differential transcription levels of PCOS-related genes between CCs and MGCs were tested using qRT-PCR in independent PCOS patients (n = 12) to validate the PCOS-specific DEGs. CCs and MGCs were obtained from the same patients. Eight PCOS-specific DEGs were selected for validation. Four PCOS-related genes and 3 MAPK signaling pathway-related

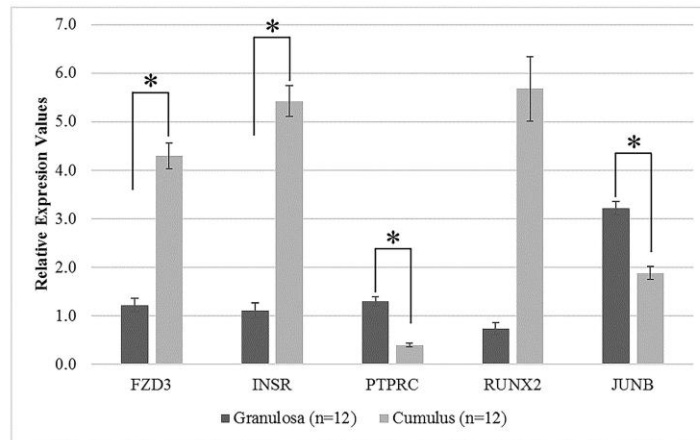


Fig 4. Relative expression of candidate genes (FZD3, INSR, PTPRC, RUNX2 and JUNB) obtained from qRT-PCR analysis. The validation study was performed with 12 independent patients who provided two somatic cell types: CC and MGC. Relative expression values for each gene is shown on the y-axis in arbitrary units. The data are presented as mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in gene expression between granulosa and cumulus cells.

doi:10.1371/journal.pone.0168875.g004

genes (MAPK1, MAPK14 and FOS) were significantly differentially expressed ($fc > 1.5$; $p < 0.05$) between MGCs ($n = 12$) and CCs ($n = 12$).

Transcript levels of FZD3 (Frizzled class receptor 3) and INSR (Insulin receptor) genes were found to be significantly increased in CCs (3.53-fold and 4.86-fold respectively; $p < 0.028$) while RUNX2 expression increased 7.68-fold in CCs compared with MGCs. Expression of two genes (PTPRC; 3.23-fold and JUNB (Jun B proto-oncogene); 1.71-fold) were significantly ($p < 0.045$) decreased in CCs compared with MGCs (Fig 4).

Both the enrichment results and clustering profiles of MAPK signaling-related genes were remarkably significant for PCOS that qRT-PCR validation of MAPK signaling pathway-related genes (MAPK1, MAPK14 and FOS) was performed exclusively with independent PCOS samples ($n = 12$). The transcription levels of MAPK signaling pathway-related genes were decreased (MAPK1; 1.46-fold, MAPK14; 1.50-fold, FOS; 1.55-fold) significantly ($p < 0.05$) in CCs compared with MGCs (Fig 5).

Discussion

It is known that granulosa cells (GCs) differentiate into CCs and MGCs during folliculogenesis-oogenesis [5]. As differentiated states of GCs, CCs have different functions, hence different gene expression profiles. In the literature, only one study has compared the gene profiles of MGCs and CCs, and this study only included control samples with normal ovulation functions that were undergoing IVF because of male factor infertility (E-MEXP-3641) [5]. Thus, no previous studies have investigated gene expression differences between these cells in PCOS. Two studies have identified gene expression differences exclusively for MGCs (GSE34526) [9] and CCs (GSE10946) [10] in PCOS and normal samples. The present study was able to identify DEGs between the two cell types specific to PCOS by combining these three studies

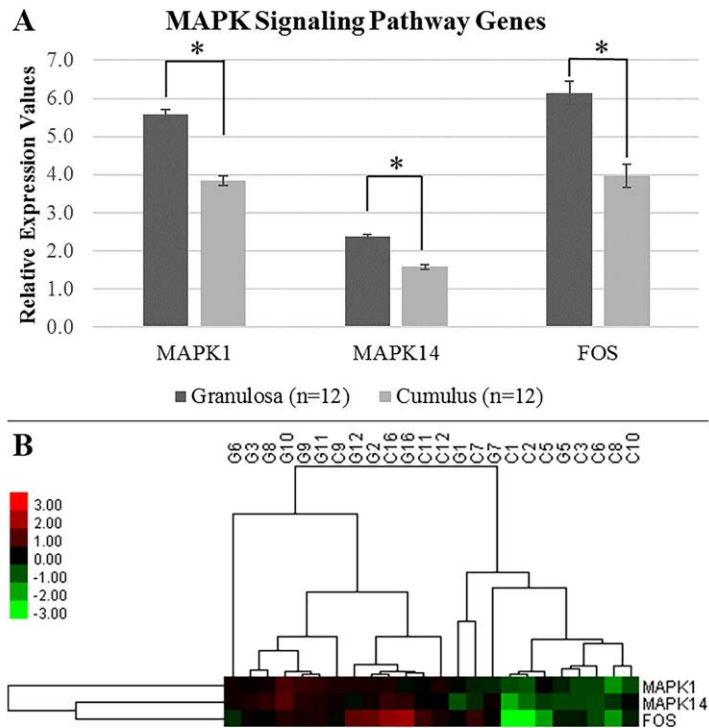


Fig 5. Relative expression values and heatmap figure of MAPK signaling pathway-related genes. (A) Relative expression values obtained from qRT-PCR analysis for each gene are shown on the y-axis in arbitrary units. The data were obtained from 12 independent PCOS patients. Each patient provided both cell types, CC and MGC. The data are presented as mean ± SEM. Asterisk (*) indicates a significant difference ($p < 0.05$) in gene expression between granulosa and cumulus cells. (B) Hierarchical clustering analysis was performed with qRT-PCR data. The CCs (C) and MGCs (G) were grouped according to the expression profiles of three MAPK signaling genes. Their expression levels were lower in CCs than MGCs.

doi:10.1371/journal.pone.0168875.g005

bioinformatically through meta-analysis. Meta-analysis is a valuable tool for combining raw or processed data from many different, independent studies. While methodological differences, like platform differences, are a common problem for many meta-analyses, we were lucky enough to find sufficient data generated using the same platform (Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus 2.0). In addition, after normalization, these datasets were found to be highly correlated ($r > 0.8$), which allowed us to compare them directly. To the best of our knowledge, this is the first meta-analysis study that identifies differentially expressed genes between MGCs and CCs in PCOS.

We identified PCOS-specific DEGs by eliminating those genes that were differentially expressed in the control group between MGCs and CCs. This showed that 32 genes were differentially expressed ($fc \geq 4$, $p < 0.05$) between MGCs and CCs in the control group. However, the number of DEGs in the PCOS group increased to 1390, with 18 being common with the

control group. Thus, the increased number of DEGs in these cell types from PCOS patients may indicate changes in the regulation of molecular mechanisms in the PCOS state compared to control samples.

The pathway enrichment analysis conducted with the 1372 PCOS specific DEGs showed that these genes were specifically enriched in oocyte-follicle maturation and PCOS related pathways, such as MAPK signaling [23], TGF β signaling [24], insulin signaling [25], GnRH signaling [26] and Wnt signaling [27] pathways.

Wnt signaling and CCs

The Wnt signaling pathway is a developmental pathway that determines cell fate by leading the cell to proliferation or differentiation [28]. There are three types of Wnt signaling pathway: the canonical Wnt pathway, the non-canonical planar cell polarity pathway and the non-canonical Wnt/Ca²⁺ pathway. The three pathways all start activation of the signal by binding WNTs to their specific receptors (FZDs). Frizzled receptors (FZDs) have the N-terminal extracellular cysteine-rich domain (CRD) for binding WNTs as ligands. The canonical Wnt pathway is related to regulation of gene transcription. The key element in this pathway is β -CATENIN, which is regulated by a regulator complex in the cytoplasm. This complex includes GSK3 (Glycogen synthase kinase 3), APC (Adenomatous polyposis coli), CKI α (Casein kinase I- α) and AXIN. The canonical Wnt/ β -CATENIN pathway is activated by ligands (WNTs) that bind to FZD and its co-receptor LRP6 (low-density lipoprotein receptor-related protein 6) or LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5). After this activation, regulated β -CATENIN is released from the regulator complex before traveling to the nucleus to activate Wnt-related transcription factors [29]. Our meta-analysis study showed that 19 of PCOS-specific DEGs, including FZD3, FZD5 and LRP5, were enriched in the Wnt signaling pathway and overexpressed, which is important for Wnt signaling activation.

Among the FZDs, FZD3 binds to the ligand WNT2 (Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 2), located at the top of the Wnt signaling pathway [30]. Mammalian studies have revealed the role of Wnt signaling for normal ovarian development [28,31], while its dysregulation was related to PCOS [30]. Moreover, these experiments have shown that Wnt signaling pathway receptors (FZD) have normal expression values in MGCs in control samples [31]. Our meta-analysis showed that FZD3 gene expression is at the same level in CCs and MGCs for control samples. However, according to our qRT-PCR results, FZD3 expression level was increased in CCs 3.53-fold compared to MGCs in PCOS patients. CCs have to be fully differentiated just before ovulation, which is an important step in oocyte development. Thus, the high level of FZD3 in CCs may indicate ongoing differentiation activity, which may be the reason for immature oocyte-follicle development.

INSR and PCOS

It has been well studied that insulin resistance, diabetes and obesity are closely related with PCOS [32–34]. Concordant with the literature, many of the PCOS-specific DEGs obtained from our meta-analysis were enriched in insulin and glucose-related pathways like Type 1 and 2 diabetes mellitus, and insulin signaling pathways. Until now, studies have mostly focused on one of the common key players in these pathways, INSR and related INSR-specific SNPs, and dysregulation in the expression of this gene in PCOS [35,36]. Additionally, Purcell *et al.* report that INSR is a regulator of insulin-dependent glucose uptake in CCs, which are responsible for providing pyruvate as an energy source to oocytes [37]. In our study, INSR expression was found to be up-regulated (3.03-fold) in CCs compared to MGCs while we also confirmed that INSR expression was up-regulated in CCs using qRT-PCR. One might speculate that increased

expression of INSR in CCs may be the reason why more energy is supplied to immature oocytes that are unable to complete their developmental process.

MAPK signaling pathway, JUNB and maturation

Previous studies have revealed that, following luteinizing hormone and follicle stimulating hormone stimulation in the follicle and COC, activation of MAPK signaling initiates meiotic resumption and CC expansion. It is also known that secretion of oocyte paracrine factors for maturation process is triggered by MAPK signaling activation in CCs [38]. Other studies have shown that MAPK signaling is related to oocyte maturation via ERK1/2 and p38 (MAPK14) activation in CCs [39,40]. Yamashita *et al.* report that, during *in vitro* maturation of porcine COCs, induction of ERK1/2 and p38 expression may cause cumulus growth and oocyte maturation [39]. As shown in Fig 2 and S2 Fig respectively, 37 of the genes that this study found to be differentially expressed in CCs compared to MGCs in PCOS were enriched in the MAPK signaling pathway with most being downregulated. Since activation of the MAPK signaling pathway is closely related to proliferation, differentiation and the cell cycle, it can be proposed that downregulation of key members of the pathway, such as TGF- β 1 and its receptor TGFBR2, p38 (MAPK14), Ras activating protein RasGRP, ERK (MAPK1) and transcription factor c-FOS, may block the pathway or diminish its activity, thereby preventing CC differentiation and oocyte maturation.

In immature GCs, JUNB and FOS (a member of the MAPK signaling pathway) expression levels increase in response to FSH and LH induction. JUNs are related to GCs' terminal differentiation into luteinized GCs while these transcription factors (JUN/FOS) also play a key role in terminal differentiation of somatic cells and follicle development [41]. Our study validates that JUNB and FOS expression levels are slightly decreased (1.71 and 1.55-fold respectively) in CCs in PCOS. Lower levels of JUNB and FOS expression may be related with the aforementioned blocking of terminal differentiation in cumulus and granulosa cells and the prevention of oocyte maturation.

In conclusion, the present meta-analysis study allows us to suggest that especially the MAPK signaling pathway, and the insulin and WNT signaling pathways are dysregulated pathways between CCs and MGCs in PCOS. Our qRT-PCR analysis performed with independent PCOS patients further validates these results. Taking our meta-analysis results together with the qRT-PCR validations provides evidence that molecular signaling is dysregulated through MGCs, CCs and the oocyte in PCOS, which is important for follicle and oocyte development and may contribute to the pathogenesis of PCOS.

These results will help to further clarify the molecular basis and functional significance of several pathways and which pathway member genes are involved in PCOS pathogenesis.

Supporting Information

S1 Fig. Correlation plot of arrays. 58 samples from 3 studies were found to be highly correlated with each other ($r \geq 0.8$).
(TIF)

S2 Fig. MAPK signaling pathway. Reprinted from KEGG MAPK Signaling Pathway figure (map04010) [22] under a CC BY license, with permission from KEGG/GenomeNet, original copyright 2016. This figure was obtained from KEGG. Genes, which were labeled with red were found to be down-regulated in CCs and blue were found to be up-regulated in CCs in our study.
(TIF)

S1 Table. The list of differentially expressed genes. PCOS-specific DEGs, Common DEGs and Control-specific DEGs were given in 3 independent sheets. Each sheet includes the p-value, fold change and annotation of each DEG.
(XLSX)

S2 Table. The list and the sequences of the primers used in the validation study.
(XLSX)

Author Contributions

Conceptualization: AA BGD.

Data curation: AA YOI SN.

Formal analysis: AA BGD YOI SN.

Funding acquisition: BGD.

Investigation: AA BGD.

Methodology: AA AG BG CK TE.

Project administration: BGD.

Resources: BGD.

Supervision: BGD TE CK ATA.

Validation: BGD YOI SN.

Visualization: AA.

Writing – original draft: AA BGD.

Writing – review & editing: YOI SN.

References

1. Franks S. Polycystic Ovary Syndrome. *Med Prog.* 1995; 333: 853–861.
2. Dumesic DA, Padmanabhan V, Abbott DH. Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv.* 2008; 63: 39–48. doi: [10.1097/OGX.0b013e31815e85fc](https://doi.org/10.1097/OGX.0b013e31815e85fc) PMID: [18081939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18081939/)
3. Kawamura K, Cheng Y, Kawamura N, Takae S, Okada A, Kawagoe Y, et al. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod.* 2011; 26: 3094–101. doi: [10.1093/humrep/der282](https://doi.org/10.1093/humrep/der282) PMID: [21865234](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21865234/)
4. Fragouli E, Lalioti MD, Wells D. The transcriptome of follicular cells: biological insights and clinical implications for the treatment of infertility. *Hum Reprod Update.* 2014; 20: 1–11. doi: [10.1093/humupd/dmt044](https://doi.org/10.1093/humupd/dmt044) PMID: [24082041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24082041/)
5. Grøndahl ML, Andersen CY, Bogstad J, Borgbo T, Boujida VH, Borup R. Specific genes are selectively expressed between cumulus and granulosa cells from individual human pre-ovulatory follicles. *Mol Hum Reprod.* 2012; 18: 572–84. doi: [10.1093/molehr/gas035](https://doi.org/10.1093/molehr/gas035) PMID: [22923488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22923488/)
6. Yang Z, Chen Y, Fu Y, Yang Y, Zhang Y, Chen Y, et al. Meta-analysis of differentially expressed genes in osteosarcoma based on gene expression data. *BMC Med Genet.* 2014; 15: 80. doi: [10.1186/1471-2350-15-80](https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-80) PMID: [25023069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023069/)
7. Edgar R, Domrachev M, Lash AE. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. In: *Nucleic acids research* [Internet]. 1 Jan 2002 [cited 14 Nov 2014] pp. 207–10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

8. Rustici G, Kolesnikov N, Brandizi M, Burdett T, Dylag M, Emam I, et al. ArrayExpress update—trends in database growth and links to data analysis tools. In: *Nucleic acids research* [Internet]. Jan 2013 [cited 20 Jul 2014] pp. D987–90. doi: [10.1093/nar/gks1174](https://doi.org/10.1093/nar/gks1174) PMID: [23193272](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193272/)
9. 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: E2016–21. doi: [10.1210/jc.2011-3441](https://doi.org/10.1210/jc.2011-3441) PMID: [22904171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22904171/)
10. Kenigsberg S, Bentov Y, Chalifa-Caspi V, Potashnik G, Ofir R, Birk OS. Gene expression microarray profiles of cumulus cells in lean and overweight-obese polycystic ovary syndrome patients. *Mol Hum Reprod.* 2009; 15: 89–103. doi: [10.1093/molehr/gan082](https://doi.org/10.1093/molehr/gan082) PMID: [19141487](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19141487/)
11. Lesoine B, Regidor P-A. Prospective Randomized Study on the Influence of Myoinositol in PCOS Women Undergoing IVF in the Improvement of Oocyte Quality, Fertilization Rate, and Embryo Quality. *Int J Endocrinol.* 2016; 2016: 4378507. doi: [10.1155/2016/4378507](https://doi.org/10.1155/2016/4378507) PMID: [27635136](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27635136/)
12. Eijssen LMT, Jaillard M, Adriaens ME, Gaj S, de Groot PJ, Müller M, et al. User-friendly solutions for microarray quality control and pre-processing on ArrayAnalysis.org. *Nucleic Acids Res.* 2013; 41: W71–6. doi: [10.1093/nar/gkt293](https://doi.org/10.1093/nar/gkt293) PMID: [23620278](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23620278/)
13. Simon R, Lam A, Li M, Ngan M, Menezes S, Zhao Y. Analysis of gene expression data using BRB-ArrayTools. [Internet]. *Cancer informatics.* 2007. pp. 11–7. <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html> PMID: [19455231](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19455231/)
14. Campain A, Yang YH. Comparison study of microarray meta-analysis methods. *BMC Bioinformatics.* 2010; 11: 408. doi: [10.1186/1471-2105-11-408](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-408) PMID: [20678237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20678237/)
15. Wright GW, Simon RM. A random variance model for detection of differential gene expression in small microarray experiments. *Bioinformatics.* 2003; 19: 2448–55. PMID: [14668230](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668230/)
16. Oliveros JC. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams [Internet]. 2007. <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>
17. Nogales-Cadenas R, Carmona-Saez P, Vazquez M, Vicente C, Yang X, Tirado F, et al. GeneCodis: interpreting gene lists through enrichment analysis and integration of diverse biological information. In: *Nucleic acids research* [Internet]. Jul 2009 [cited 22 Nov 2014] pp. W317–22. doi: [10.1093/nar/gkp416](https://doi.org/10.1093/nar/gkp416) PMID: [19465387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19465387/)
18. Tabas-Madrid D, Nogales-Cadenas R, Pascual-Montano A. GeneCodis3: a non-redundant and modular enrichment analysis tool for functional genomics. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: W478–83. doi: [10.1093/nar/gks402](https://doi.org/10.1093/nar/gks402) PMID: [22573175](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22573175/)
19. Carmona-Saez P, Chagoyen M, Tirado F, Carazo JM, Pascual-Montano A. GENECODIS: a web-based tool for finding significant concurrent annotations in gene lists. In: *Genome biology* [Internet]. Jan 2007 [cited 26 Aug 2014] p. R3. doi: [10.1186/gb-2007-8-1-r3](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-1-r3) PMID: [17204154](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17204154/)
20. Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. In: *Nucleic acids research* [Internet]. Jul 2013 [cited 13 Aug 2014] pp. W77–83. doi: [10.1093/nar/gkt439](https://doi.org/10.1093/nar/gkt439) PMID: [23703215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23703215/)
21. 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: 402–8. doi: [10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262) PMID: [11846609](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/)
22. Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. In: *Nucleic acids research* [Internet]. 1 Jan 2000 [cited 10 Jul 2014] pp. 27–30. <http://www.genome.ad.jp/kegg/> PMID: [10592173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10592173/)
23. Nelson-Degrave VL, Wickenheisser JK, Hendricks KL, Asano T, Fujishiro M, Legro RS, et al. Alterations in mitogen-activated protein kinase kinase and extracellular regulated kinase signaling in theca cells contribute to excessive androgen production in polycystic ovary syndrome. *Mol Endocrinol.* 2005; 19: 379–390. doi: [10.1210/me.2004-0178](https://doi.org/10.1210/me.2004-0178) PMID: [15514033](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15514033/)
24. Raja-Khan N, Urbanek M, Rodgers RJ, Legro RS. The role of TGF-β in polycystic ovary syndrome. *Reprod Sci.* 2014; 21: 20–31. doi: [10.1177/1933719113485294](https://doi.org/10.1177/1933719113485294) PMID: [23585338](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23585338/)
25. Diamanti-Kandaraki E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocr Rev.* 2012; 33: 981–1030. doi: [10.1210/er.2011-1034](https://doi.org/10.1210/er.2011-1034) PMID: [23065822](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23065822/)
26. Muasher SJ, Abdallah RT, Hubayter ZR. Optimal stimulation protocols for in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006; 86: 267–73. doi: [10.1016/j.fertnstert.2005.09.067](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.09.067) PMID: [16753157](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16753157/)
27. 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: 51–60. doi: [10.1016/j.jri.2004.01.010](https://doi.org/10.1016/j.jri.2004.01.010) PMID: [15284005](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284005/)

28. Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology*. 2002; 143: 898–908. doi: [10.1210/endo.143.3.8684](https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8684) PMID: [11861511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11861511/)
29. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009; 17: 9–26. doi: [10.1016/j.devcel.2009.06.016](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016) PMID: [19619488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619488/)
30. Wang H-X, Tekpetey FR, Kidder GM. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15: 11–7. doi: [10.1093/molehr/gan070](https://doi.org/10.1093/molehr/gan070) PMID: [19038973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038973/)
31. Ricken A, Lochhead P, Kontogiannea M, Farookhi R. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*. 2002; 143: 2741–9. doi: [10.1210/endo.143.7.8908](https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8908) PMID: [12072409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12072409/)
32. Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. *Endocr Rev*. 1997; 18: 774–800. doi: [10.1210/edrv.18.6.0318](https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0318) PMID: [9408743](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9408743/)
33. Corbould A, Kim Y-B, Youngren JF, Pender C, Kahn BB, Lee A, et al. Insulin resistance in the skeletal muscle of women with PCOS involves intrinsic and acquired defects in insulin signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005; 288: E1047–54. doi: [10.1152/ajpendo.00361.2004](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00361.2004) PMID: [15613682](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15613682/)
34. Gambineri A, Pelusi C, Vicennati V, Pagotto U, Pasquali R. Obesity and the polycystic ovary syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2002; 26: 883–96. doi: [10.1038/sj.ijo.0801994](https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801994) PMID: [12080440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12080440/)
35. Feng C, Lv P-P, Yu T-T, Jin M, Shen J-M, Wang X, et al. The association between polymorphism of INSR and polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 2403–25. doi: [10.3390/ijms16022403](https://doi.org/10.3390/ijms16022403) PMID: [25622255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622255/)
36. Gangopadhyay S, Agrawal N, Batra A, Kabi BC, Gupta A. Single-Nucleotide Polymorphism on Exon 17 of Insulin Receptor Gene Influences Insulin Resistance in PCOS: A Pilot Study on North Indian Women. *Biochem Genet*. Springer US; 2016; 54: 158–68.
37. Purcell SH, Chi MM, Lanzendorf S, Moley KH. Insulin-stimulated glucose uptake occurs in specialized cells within the cumulus oocyte complex. *Endocrinology*. 2012; 153: 2444–54. doi: [10.1210/en.2011-1974](https://doi.org/10.1210/en.2011-1974) PMID: [22408172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22408172/)
38. Zhang M, Ouyang H, Xia G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod*. 2009; 15: 399–409. doi: [10.1093/molehr/gap031](https://doi.org/10.1093/molehr/gap031) PMID: [19443606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19443606/)
39. Yamashita Y, Hishinuma M, Shimada M. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ovarian Res*. 2009; 2: 20. doi: [10.1186/1757-2215-2-20](https://doi.org/10.1186/1757-2215-2-20) PMID: [20034375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20034375/)
40. Su Y-Q, Denegre JM, Wigglesworth K, Pendola FL, O'Brien MJ, Eppig JJ. Oocyte-dependent activation of mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) in cumulus cells is required for the maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex. *Dev Biol*. 2003; 263: 126–38. PMID: [14568551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14568551/)
41. Sharma SC, Richards JS. Regulation of AP1 (Jun/Fos) factor expression and activation in ovarian granulosa cells. Relation of JunD and Fra2 to terminal differentiation. *J Biol Chem*. 2000; 275: 33718–28. doi: [10.1074/jbc.M003555200](https://doi.org/10.1074/jbc.M003555200) PMID: [10934195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10934195/)

