



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİWİ-piRNA YOLAĞINDA ROL ALAN TDRD9 VE MİWİ
PROTEİNLERİNİN POLİKİSTİK OVER SENDROMU
OLUŞTURULMUŞ FARE MODELİNDE İNCELENMESİ**

ÖZLEM DELİBAŞ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

SİVAS-2017

**T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PIWI-piRNA YOLAĞINDA ROL ALAN TDRD9 VE MIWI
PROTEİNLERİNİN POLİKİSTİK OVER SENDROMU
OLUŞTURULMUŞ FARE MODELİNDE İNCELENMESİ**

ÖZLEM DELİBAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. HÜSEYİN ERAY BULUT**

SİVAS-2017

“PİWİ-piRNA Yolağında Rol Alan TDRD9 ve Miwi Proteinlerinin Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Fare Modelinde İncelenmesi.”

adlı Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Emel KOPTAGEL

Üye

Prof. Dr. Celal KALOĞLU

Üye (Danışman)

Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT

ONAY

Bu tez çalışması, tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyda AKIN POLAT

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak, akademik açıdan yetişmemde katkısı olan ve tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocam Prof. Dr. Emel KOPTAGEL'e, danışman hocam Prof. Dr. H. Eray BULUT'a, ve anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN'a, Prof. Dr. Celal KALOĞLU'na, Yrd.Doç.Dr. Z. Deniz ŐAHİN İNAN'a çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, akademik anlamda yetişmemde çok büyük katkısı olan gösterdiği sabır ve manevi desteği için değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Erkan GÜMÜŞ'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda katkılarından dolayı Yrd.Doç.Dr. İsmail SARI'ya ve Yrd.Doç.Dr. Gökhan ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitime aynı dönem başladığım, dostluğunu ve desteğini esirgemeyen Kübra BAŐOL'a ve Derya Gül SAĞCI'ya çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük katkıları olan tüm eğitim hayatım boyunca her zaman destek oldukları ve sağladıkları bütün imkanlar için sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

PIWİ-piRNA YOLAĞINDA ROL ALAN TDRD9 VE MİWİ PROTEİNLERİNİN POLİKİSTİK OVER SENDROMU OLUŞTURULMUŞ FARE MODELİNDE İNCELENMESİ

Özlem DELİBAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Eray BULUT

2017, 82 sayfa

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık yaşındaki kadınların yaklaşık %6-10'unda görülen ve farklı nedenlerden dolayı ortaya çıkan bir endokrin sistem bozukluğudur. PKOS'un fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, hastalarda ovaryan hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, artan luteinleştirici hormon (LH) sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu, hirsütizm ve infertilite gözlenmektedir.

piRNA'lar (piwi-interacting RNA) germ hücrelerinin genom bütünlüğünü sağlamada rol alan önemli RNA molekülleridir.

Bu çalışmada PKOS modeli oluşturulan farede, yüksek LH ve östrojen hormonuna bağlı olarak bozulan folikül içi mikroçevrede PIWİ-piRNA yolağının baskılanabileceğini veya etkisinin azalabileceğini bunun sonucunda oositle kümülüs hücreleri arasındaki etkileşimin bozularak oosit maturasyonunu negatif yönde etkileneceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda piRNA biyogenezinde yer alan TDRD9 ve MİWİ genlerinin ekspresyonları RT-PCR ve immünohistokimyasal yöntemlerle belirlendi.

Çalışmada 25 günlük *Swiss* albino dişi fareler kullanıldı ve 3 gruba ayrıldı. 20 gün süre ile intraperitoneal olarak 0,2 ml olacak şekilde, kontrol grubuna serum fizyolojik, PKOS oluşturulacak gruba susam yağı içinde çözdürülmüş dehidroepiandrosteron (DHEA, 6 mg/100g/gün) ve Sham grubuna susam yağı enjekte edildi. Enjeksiyon süresi sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan alınan ovaryum dokuları immünohistokimya ve immünofloresan

işaretleme yöntemleri için kullanıldı. Ayrıca RT-PCR için her 3 gruptan toplanan GV oosit, M2 oosit ve Kumulus hücresinde TDRD9 ve MİWİ'nin mRNA ekspresyonlarına bakıldı.

Kontrol grubunda ve PKOS grubunda MİWİ (PİWİL1) primodiyal folikül aşamasında zayıf bir ekspresyonla başlayıp primer folikül, sekonder folikül, antral folikül ve tersiyer foliküldeki oosit sitoplazmasında daha güçlü eksprese olduğu immünohistokimyasal ve immünofloresan tekniklerle belirlendi. Ayrıca hem kontrol grubunda hem de PKOS grubunda kumulus hücresinde PİWİL1 ekspresyonu saptanmadı. TDRD9 ise kontrol grubunda primordiyal foliküldeki oositte ekspresyonu izlenirken, PKOS grubundaki ovaryum kesitlerinde primordiyal foliküldeki oositte ekspresyonunun olmadığı immünohistokimyasal yöntemle belirlendi. RT-PCR sonuçlarında ise MİWİ (PİWİL1)'in oositte mRNA ekspresyonunun olduğunu belirledik. PİWİL1'in kontrol grubundaki GV oosit temel alınarak PKOS grubu GV oositte ekspresyonunun arttığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığını belirledik. RT-PCR sonuçlarına göre TDRD9'un oositte ve kumulus hücrelerinde mRNA ekspresyonunun olmadığını saptandı.

Sonuç olarak MİWİ (PİWİL1)'nin sağlıklı bir folikülogenez için ekspresyonunun olması gerekmektedir. PKOS'ta bozulan endokrin etkileşimde MİWİ (PİWİL1) geni ekspresyonu korunmaktaydı. PKOS'ta primordiyal folikül aşamasındaki oositte TDRD9'un ekspresyonunun olmaması, normal folikülogenezi bozabileceğini ve kadınlarda infertilite veya subfertiliteye neden olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Polikistik Over Sendromu, PKOS, piRNA, TDRD9, MİWİ, PİWİL1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF TDRD9 AND MIWI PROTEINS PLAYING ROLE IN A MOUSE MODEL WITH POLYCYSTIC OVARIAN SYNDROME

Özlem DELİBAŞ

Master's Thesis, Department of Histology & Embryology

Supervisor: Prof. Dr. H. Eray BULUT

2017, 82 Pages

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is an endocrine system disorder which is seen about 6-10% women in their reproductive ages and occurs because of different reasons. Although the physiopathology of PCOS is yet to be understood, ovarian hyperandrogenism, hyperinsulinemia, increasing secretion of LH, menstrual function disorders, hirsutism and infertility are commonly seen in those patients.

piRNAs (piwi-interacting RNA) are important RNA molecules that play crucial roles in preserving the genome integrity in germ cells.

In the present study, disrupted inner follicular microenvironment as a result of high levels of LH and estrogen could suppress the PIWI-piRNA pathway or could decrease its effects causing that the oocyte maturation was negatively affected in mice with PCOS. In the present study, the expressions of TDRD9 and MIWI genes taking place in piRNA biogenesis have been determined by RT-PCR and by immunohistochemical techniques.

Twenty five female Swiss albino mice were divided into 3 groups. While the control group mice were injected 0.2 ml serum physiologic, the PCOS group mice were injected dehydroepiandrosteron (DHEA) (6 mg/10 g/ day). On the other hand, the sham group animals were injected sesame oil only. At the end of the injection process, animals were sacrificed and ovarian tissues were collected for immunohistochemical and immunofluorescence techniques. In addition, GV oocytes, M2 oocytes and cumulus cells were

collected from 3 groups in order to detect TDRD9 and MIWI expressions using RT-PCR.

The control group and the PCOS group MIWI (PIWIL1) expressions started weakly in the primordial follicles and have stronger expressions in primary, secondary and tertiary follicles. On the other hand, there were no PIWIL1 expression in cumulus cells both in the control and the PCOS groups. While TDRD9 expression was detected in the control group primordial follicles, it had no expression in oocytes of primordial follicles in the PCOS group. MIWI (PIWIL1) mRNA expressions was detected in oocytes determined by RT-PCR. The PIWIL1 mRNA expression was increased in the PCOS group GV oocytes when compared to the control group, however, it was not statistically significant. TDRD9 mRNA expression was not detected neither in oocytes nor in cumulus cells in all groups.

In conclusion, it could be suggested that MIWI (PIWIL1) is necessary for a healthy folliculogenesis. MIWI (PIWIL1) gene expression was preserved in disrupted endocrine interaction in PCOS. Lacking TDRD9 expression in PCOS ovarial primordial follicle oocytes could block the normal folliculogenesis and could cause infertility or subfertility in those women with PCOS.

Key Words: Polycystic Ovarian Syndrome, PCOS, piRNA, TDRD9, MIWI, PIWIL1

İÇİNDEKİLER

ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.OVARYUMLAR	3
2.1.1. Ovaryumun Anatomisi	3
2.1.2. Ovaryumun Histolojisi	5
2.1.3. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)	5
2.1.3.1. Primordiyal Germ Hücreleri (PGH)	6
2.1.3.2. Primordiyal Foliküllerin Primer Foliküllere Gelişimi	7
2.1.3.3. Primer Foliküllerin Sekonder Foliküllere Gelişimi	8
2.1.3.4. Sekonder Foliküllerin Tersiyer Foliküllere Gelişimi	8
2.1.4. Foliküler Atrezi ve Ovulasyon	9
2.1.5. Oogenez	10
2.1.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS)	10
2.1.7. piRNA (piwi-interacting RNA).....	12
2.1.8. Hipotez	16
3. Gereç ve Yöntem.....	17
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	17
3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	17
3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar	18
3.3.1. Bouin Çözeltisi	18
3.3.2. %4'lük Parafolmaldehit (pH:7.4)	18
3.3.3. Na-Sitrat Tamponu	19
3.3.4. Tris-EDTA Tamponu	19
3.3.5. Yıkama Çözeltisi	19
3.4.Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı.....	19

3.5. Materyalin Toplanması.....	20
3.6. Histolojik Değerlendirme	21
3.7. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama.....	21
3.7.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü.....	21
3.7.2. İmmünofloresan Boyama Protokolü	22
3.8. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Yöntemi	23
3.9. Real Time PCR.....	24
3.9.1. Deney Gruplarında RNA İzolasyonu	24
3.9.1.1. Total RNA İzolasyonu.....	24
3.9.1.2. cDNA Eldesi.....	25
3.9.1.3. Primerler	26
3.9.1.4. RT-PCR Verilerinin Analizi.....	27
4. BULGULAR	27
4.1. Vajinal Smear Bulguları	27
4.2. Stereomikroskop Bulguları.....	29
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	29
4.4. İmmünohistokimya ve İmmünofloresan Bulguları	31
4.4.1. Kontrol Grubu MİWİ (PİWİL1) Bulguları	31
4.4.2. Kontrol Grubu TDRD9 Bulguları	36
4.4.3. PKOS Grubu MİWİ (PİWİL1) Bulguları.....	37
4.4.4. PKOS Grubu TDRD9 Bulguları.....	40
4.5. Real Time -PCR Bulguları	42
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇLAR	55
7. KAYNAKLAR.....	57
8.ÖZGEÇMİŞ.....	65
EK-1	66
ETİK KURUL KARARI.....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Deney gruplarının oluşturulması.....	20
Çizelge 2. RT-PCR Döngü Programı.....	26
Çizelge 3. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, üretici firma ve katalog numaraları.....	27
Çizelge 4. Kontrol ve PKOS gruplarında PİWİL1 ve TDRD9 immünolokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirilmesi.	42
Çizelge 5. RT-PCR verilerinin kontrol ve çalışma gruplarında ortalama Ct, kat değişim ve kat düzenlemesi değerleri ve Student's T-testi sonuçları.	46

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı.....	4
Şekil 2. 2. Farede ovaryumun yerleşimi.....	4
Şekil 2.3. Ovaryumun histolojisi.....	5
Şekil 4.1. Kontrol, Sham ve PKOS gruplarının östrus sikluslarının karşılaştırılması.	28
Şekil 4.2. Kontrol grup (A) ve PKOS grubu (B) overlerin Stereomikroskop görüntüsü.....	29
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait ovaryum görüntüsü.....	30
Şekil 4.4. PKOS grubuna ait ovaryum görüntüleri.....	31
Şekil 4.5. Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1 immunolokalizasyonu	33
Şekil 4.6. Kontrol grubu ovaryum kesitinde PİWİL1'in negatif kontrol boyanması.....	34
Şekil 4.7. Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in immünofloresan işaretleme ile ekspresyonunun görüntüsü.....	35
Şekil 4.8. Kontrol grubu ovaryum kesitinde PİWİL1'in negatif boyanması. .	35
Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde TDRD9'un immunolokalizasyonu	36
Şekil 4.10. Kontrol grubu ovaryum kesitinde TDRD9'un negatif kontrol boyanması.....	37
Şekil 4.11. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1 immunolokalizasyonu	38
Şekil 4.12. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in immünofloresan işaretleme ile ekspresyonunun görüntüsü.....	39
Şekil 4.13. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in negatif kontrol boyanması.....	40

Şekil 4.14. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde TDRD9 immunolokalizasyonu.	41
Şekil 4.15. PKOS grubu ovaryum kesitinde TDRD9'un negatif kontrol boyanması.....	41
Şekil 4.16. <i>GAPDH</i> , <i>PIWİL1</i> ve <i>TDRD9</i> geninin amplifikasyon eğrisi.....	43
Şekil 4.17. <i>GAPDH</i> genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.	43
Şekil 4. 18. <i>PIWİL1</i> genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.	44
Şekil 4.19. <i>TDRD9</i> genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.	44
Şekil 4.20. Kontrol grubu temel alınarak çalışma gruplarında <i>PIWİL1</i> ve <i>TDRD9</i> genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması.....	47

KISALTMALAR DİZİNİ

PKOS	: Polikistik Over Sendromu
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
LH	: Lüteinleştirici Hormon
Hcg	: İnsan Koryonik Gonadotropin
PMSG	: Pregnant mare's serum gonadotropin
GV	: Germinal vezikül
M2	: Metafaz 2
mRNA	: mesajcı Ribonükleik Asit
KOK	: Kumulus-oosit kompleksi
BMP2	: Bone Morfogenetic Protein-2
BMP8b	: Bone Morfogenetic Protein 8b
OMI	: Oocyte Maturation İnhibitor
AMH	: Anti-Müllarian Hormon
piRNA	: piwi-interacting RNA
BSA	: Sığır serum albümini
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
ÜYT	: Üremeye yardımcı teknikler
PBS	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PrF	: Primordiyal Folikül

PF : Primer Folikül
SF : Sekonder Folikül
AF : Antral Folikül
AtF : Atretik Folikül
KF : Kistik Folikül
M : Medulla
O : Oosit
Z : Zona Pellusida

1.GİRİŞ

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınların yaklaşık olarak %6-10'unda görülen bir endokrin sistem bozukluğudur. PKOS'un fizyopatolojisi tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte, hastalarda ovaryan hiperandrojenizm, hiperinsülinemi, artan LH sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu, hirsütizm ve infertilite görülmektedir (Fauser, B.C. et al. 2012). Yardımcı üreme teknikleri (ÜYT) tedavileri süresince PKOS'lu hastalarda tipik olarak toplanan oosit sayında azalma görülmekte, fazla sayıda folikül oluşmakta, fakat gelişen foliküllerin olgunlaşması erken evrede duraksamaktadır. Yapılan çalışmalar PKOS'lu hastalardan toplanan oositlerin kalitesinin düşük olduğunu ve bunun sonucunda da fertilizasyon ve implantasyon oranlarının düşük olduğunu göstermektedir (Qiao, J. ve Feng, H.L. 2011; Sander, V.A. et al. 2011).

piRNA' lar (piwi-interacting RNA) germ hücrelerinin genom bütünlüğünü sağlamada rol alan önemli RNA molekülleridir. İlk olarak, 2006 yılında birbirinden bağımsız çalışmalarla fare testisi ve *Drosophila* germ hücrelerinde tespit edilen piRNA' lar embriyonik gelişim, transpozon transkripsiyonunun baskılanması, germ hücre genom bütünlüğünün sağlanması ve heterokromatin oluşumunda oldukça etkili moleküler araçlardır (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). PİWİ-piRNA kompleksinin en iyi ortaya konan biyolojik rolleri transpozon mobilizasyonunun inhibisyonudur. piRNA' lar bu işlevini hem heterokromatin oluşumunun düzenlenmesi yoluyla transkripsiyonel hem de transpozon transkriptlerinin degradasyonunu sağlayarak post-transkripsiyonel seviyede gerçekleştirirler. Transpozonlar bir hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Transpozon mobilizasyonu ile potansiyel zararlı mutasyonlar, delesyonlar ve genomdaki DNA miktarında değişiklikler meydana gelebilir. Dolayısıyla gametogenez sırasında ve germ hücrelerinde de transpozonların susturulması hayati öneme sahiptir. Bu nedenle piRNA'lar ve PİWİ proteinleri, germ hücrelerinin genom bütünlüğünü koruma çabalarının merkezinde yer alırlar. Ayrıca, PİWİ-piRNA kompleksleri sadece transpozon susturulmasında rol almakla kalmaz aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla hem transkripsiyonel hem

de post-transkripsiyonel seviyede hedef genlerin ekspresyonunu düzenleme kapasitesine de sahiptirler. PİWİ-piRNA'ların bu fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda piRNA biyogenezi ve işlevinde rol alan PİWİ proteinleri ve diğer faktörler de germ hücre gelişimi ve gametogenezde oldukça önemli bir yere sahiptirler. piRNA yolağındaki gen mutasyonlarının germ hücre gelişim kusurlarına yol açmasının nedenlerinden birinin piRNA'ların işlevini tam olarak yerine getirememesi nedeni ile DNA hasarından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Thomson, T. ve Lin, H. 2009; Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

PİWİ proteinlerinin germ hücre gelişimdeki işlevleri diğer organizmalarda da korunmuş olarak mevcuttur. Örneğin farede spermatogenez sırasında eksprese edildiği gösterilen Miwi (PİWİL1, Piwi-like gene 1), Mili (PİWİL2) ve Miwi2 (PİWİL4) olmak üzere 3 adet murin PİWİ proteini bulunur (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

PİWİ proteinlerinin etkileşime girdiği proteinler arasında Tudor-domaini içeren proteinler (Tudor domain-ilişkili proteinler olarak da bilinirler, TDRD) PİWİ etkileşim partnerleri arasındadır. TUDOR ailesi üyelerinin protein-protein/RNA etkileşim ağlarına katıldıkları, RNA metabolizması, splisozom oluşumu, histon modifikasyonu, piRNA biyogenezi ve germ hücre gelişiminde rol aldıkları bildirilmektedir (Brahms, H. et al. 2001; Pek, J.W. et al. 2012). Farede Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd8, Tdrd9, Tdrd10, SND1/Tdrd11, Tdrd12 ve SetDB1' gibi birçok Tudor ailesi üyesi bulunmaktadır ve bunların germ hücrelerde eksprese edildiği rapor edilmiştir. Bunlar arasından Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd9 ve Tdrd12' nin PİWİ işlevleri için gerekli olduğu, spermatogenez ve piRNA yolağında rol aldıkları gösterilmiştir (Ku, H.Y. ve Lin, H.2014).

Polikistik over sendromu (PKOS) olan insanlarda ve deney hayvanlarında yüksek östrojen ve LH hormonuna bağlı olarak folikül içi mikroçevrenin bozulması sonucu oositin gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir. Bu nedenle farelerde uygulanan deneysel PKOS modelleri, infertiliteye neden olan PKOS'un patogenezinin aydınlatılması ve yeni terapötik girişimlerin denenmesi için yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada;

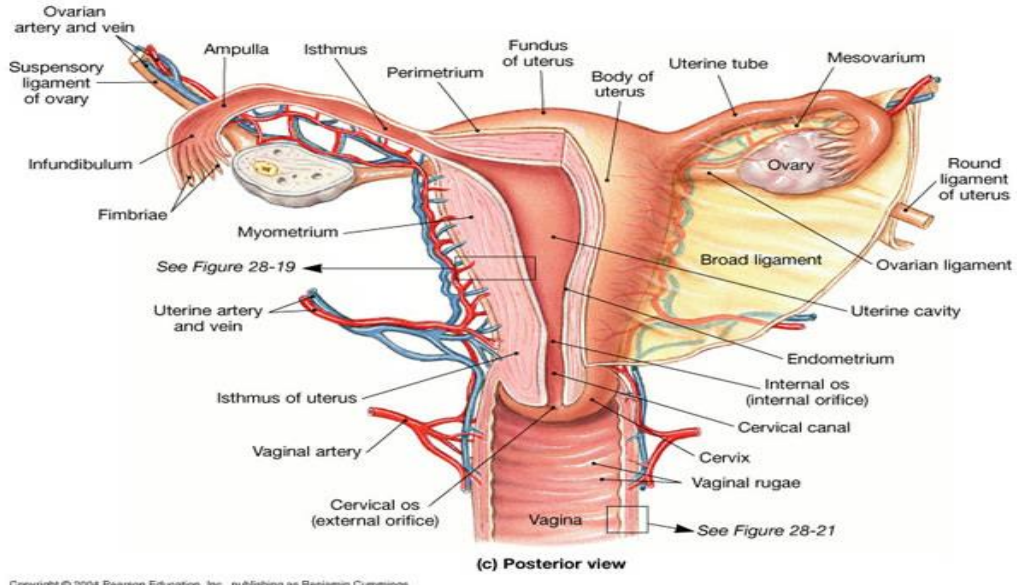
dehidroepiandrosteron (DHEA) ile deneysel olarak PKOS oluşturulmuş farelerin ovaryumunda, oositte ve kümülüs hücrelerinde PIWI-piRNA yolağında bulunan TDRD9 ve MIWI'nin ekspresyonunu ve PKOS'taki hormonal değişikliğin bu genler üzerine etkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.OVARYUMLAR

2.1.1. Ovaryumun Anatomisi

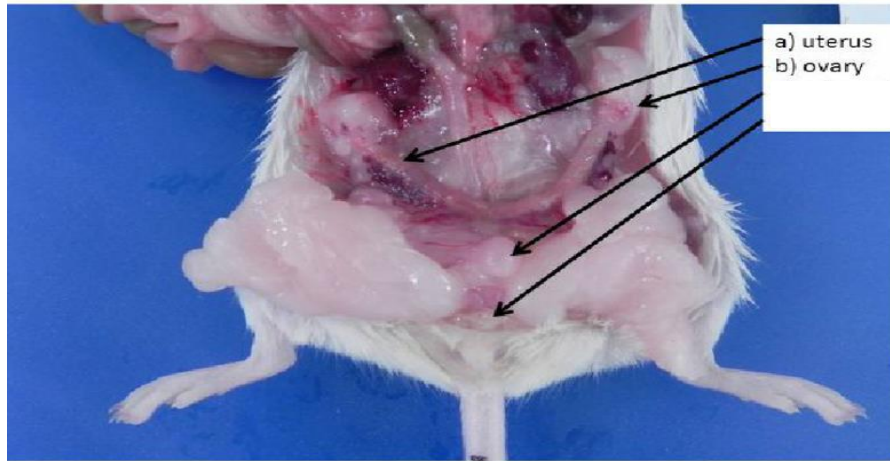
Dişi üreme hücresi olan ovumu ve dişiye özgü seks hormonlarını (progesteron ve östrojen) üretmekle görevli olan ovaryumlar erkekteki testislerin karşılığıdır. Pelvis'te fossa ovarica'da yerleşmiş bir çift organdır, Fossa ovarica A. İliaca interna ile externa arasındadır. Ovaryum'lar 3 cm uzunluğunda, 1,5 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve 4-6 g ağırlığındadır. Pembemsi gri renkli olan ovaryumların dış yüzü buluş çağından önce düzgün görümlü iken buluş çağından sonra ovulasyona bağlı olarak pürüzlü bir görünüm alır. Ovaryumun facies lateralis ve medialis olmak üzere iki yüzü, extremitas tubaria (üst uç) ve uterina (alt uç) olmak üzere iki ucu ve margo mesovaricus (ön kenar) ve liber (arka kenar) olmak üzere iki kenarı vardır. Üst ucuna fimbria ovarica ve lig. Suspensorium ovarii tutunur. Bu bağ içerisinde a.v. ovarica ile plexus ovaricus'tan gelen sinirler bulunur. Alt uçtan başlayan lig. Ovarii proprium (uteroovaricum) uterus'un dış köşesine yapışır. Ön kenarda damar ve sinirlerin girip çıktığı hilum ovarii yer alır. Buraya ligamentum mesovarium ile ligamentum latum uteri tutunur. Peritonla örtülü değildir. Ovaryumları, lig. Ovarii proprium, lig. Suspensorium ovarii ve lig. Mesovarium yerinde tutan oluşumlardır (Çimen, M. 2014) (Şekil 2. 1.).



Şekil 2. 1. İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı

(<http://humansk.blogspot.com.tr/2015/03/human-ovary-diagram.html>)

Memeli türlerinden farede ise ovaryumlar, tüp şeklindeki uterus kollarının son kısmında, fallop tüplerinin hemen üzerinde sağlı sollu olarak yerleşim gösterirler (Şekil 2.2.).

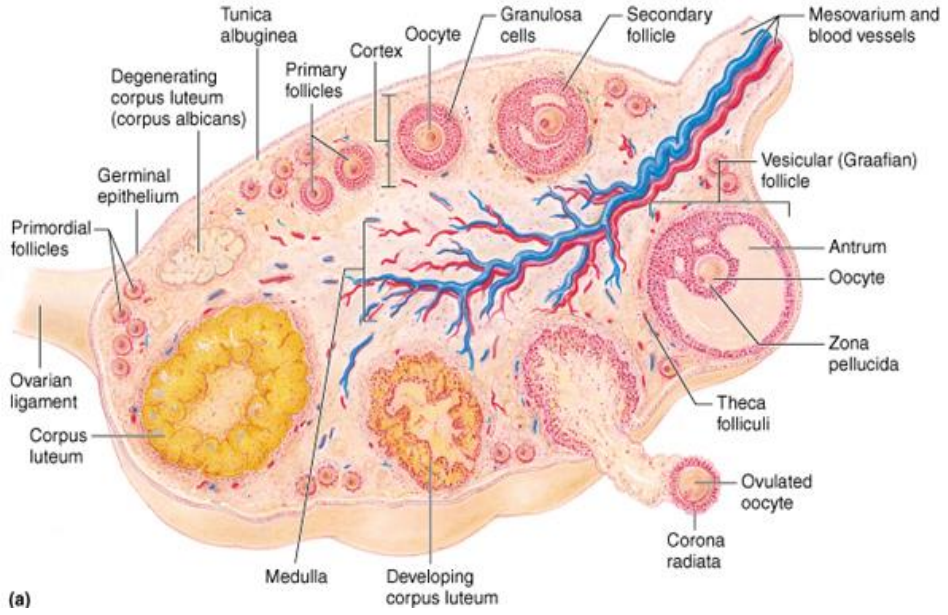


Şekil 2. 2. Farede ovaryumun yerleşimi

(https://www.researchgate.net/figure/51576510_fig4_Figure-4-Female-reproductive-organs-a-non-gravid-uterus-mice-and-rats-have-a).

2.1.2. Ovaryumun Histolojisi

Memeli ovaryumunun yüzeyi, germinal epitel adı verilen tek katlı yassı veya alçak kübik epitel hücre tabakası ile örtülüdür. Bu tabaka, viseral peritonun mezotelyumu ile devam eder. Germinal epitelin altında, sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktadır. Ovaryumun çevresel yerleşimli bir korteksi ve merkezi yerleşimli, çok sayıda kan damarı, sinir ve lenfatikler bulunan medullası vardır. Foliküllere ek olarak korteks, fibrositleri kollajen ve retiküler lifleri içerir. Tipik düzensiz bağ dokusu yapısında olan medulla, ovaryumu askıya alan mesovaryum ile devam eder (Şekil 2.3.). Medulladaki geniş kan damarları, daha küçük damarlarla korteksin bütün bölümlerine yayılır. Mezovaryum, ovaryumu germinal epiteli ve peritonun mezoteli ile kaplanmıştır (Eroschenko, 2013).



Şekil 2.3. Ovaryumun histolojisi.

<http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>

2.1.3. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)

Foliküler gelişim ya da folikülogenez ovaryumun korteks tabakasında meydana gelir. Oogenezis, oogonia olarak adlandırılan primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesidir. Hücredeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlayıp, puberte sonrasında tamamlanır. Puberte döneminden başlayarak,

kadınlar üreme yaşamı boyunca sürekli olarak aylık üreme siklusuna girerler ve bu siklus hipofiz, hipotalamus, ovaryumlar, uterus, vajina, uterin tüpler ve meme bezlerini ilgilendirir (Moore, K.L. ve Persaud, T.V.N. 2009).

Hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizde üretilen FSH ve LH'ı uyararak ovaryum üzerindeki etkisini başlatmış olur. Esas olarak, FSH folikül hücrelerinden östrojen salınımını ve ovaryum folikülünün gelişimini sağlarken, LH ovulasyonu tetikler ve folikül hücreleri ile korpus luteumu uyararak progesteron üretimini sağlar. Folikülogenez, büyüyen foliküllerin havuzundan primordiyal folikülün seçilmesi ile başlayan ve ovulasyon veya atrezi ile sonuçlanan bir işlemdir. Birinci faz, preantral folikül veya gonadotropinden bağımsız faz olarak adlandırılır ve oositin büyümesi ve farklılaşması ile karakterizedir. Preantral faz, otokrin ve parakrin mekanizmalar ile lokal olarak sentezlenen büyüme faktörleri tarafından kontrol altında tutulmaktadır. İkinci faz, antral veya gonadotropin bağımlı faz olarak adlandırılır ve folikülün boyutunda oldukça fazla bir artışın olması ile karakterizedir. Gonadotropin bağımlı faz, FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Lüteinleştirici Hormon) ile büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Folikülogenez hücre farklılaşması ve proliferasyonu ile üst düzey bir organizasyonun sağlanması olarak değerlendirilebilir (Jonard ve ark. 2003; Walters ve ark. 2012).

2.1.3.1. Primordiyal Germ Hücreleri (PGH)

Primordiyal germ hücreleri ilk olarak insanda 3. ve 4. gebelik haftaları arasında allantoise yakın vitellüs kesesinin dorsal duvarının endoderminde 100 kadar hücre olarak ortaya çıkarlar. PGH ekstraembriyonik ektoderme komşu proksimal epiblasttan ekstraembriyonik ektodermal hücrelerinden sentezlenen Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP 4) ve Bone Morphogenetic Protein 8b (BMP 8b) ve ekstraembriyonik endodermal hücrelerden sentezlenen Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2) sinyali ile gelişmektedir. BMP4 'e yanıt olarak epiblast kilit transkripsiyonel düzenleyicileri harekete geçirmekte ve germ hücre özellikleri kazanmaktadır (Motta, A.B. ve ark. 1997; Oktem ve Oktay 2008; Oktem ve Urman 2010).

PGH gelişmekte olan gonadlara yerleştiğinde oogoniumlara farklılıklar, sonrasında mitoz bölünmeyle hızlı bir şekilde çoğalarak sayılarını arttırlar. Hücreler pre-mayotik DNA sentezinin başlaması ile oogonial evrelerini tamamlarlar ve oosit evresine geçerler. Oluşan oositlere primer oosit denir. Bu evrede yassı epitel hücreleri oogoniumların etrafını tek bir tabaka halinde sarak primordiyal folikülleri oluşturur. Folikül oluşumunun temel amacı primer oositin atreziden korunmasıdır. Primer oositlerin ileri gelişimi folikül hücrelerince salgılanan Oocyte Maturation İnhibitor (OMI) aracılığıyla puberteye kadar engellenir. Böylelikle primer oositler I. Mayozun profazında bölünmelerini duraksatır (Oktem ve Urman 2010).

2.1.3.2. Primordiyal Foliküllerin Primer Foliküllere Gelişimi

Primordiyal foliküllerin primer foliküle gelişimi için gerekli sinyal mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olsada, gonadotropinlerin etkisinin büyük olduğu düşünölmektedir. Her primordiyal folikül profaz I'ın diploten evresinde bekleyen bir oosit içermektedir ve bu folikül yassı granöloza hücreleri ile çevrelenmiştir. Öncelikle oositte mRNA sentezlenmeye başlar. Folikül, primordiyal evreyi terk ederken büyüme safhasına başlar, oositte ve granöloza hücrelerinde birçok spesifik değişiklikler gerçekleşir. Granöloza hücreleri kübik forma değişir ve teka hücre formasyonu oluşur, ayrıca bu aşamada zona pellusida yapısı belirir (Trombly, T.J. ve ark. 2009; Dumesic ve Richards 2013). Granöloza hücrelerinde, Anti-müllerian Hormon (AMH) sentezi primer folikül aşamasında başlar. AMH'nin sentezi oosit kaynaklı faktörlere de cevap olmakta ve primer folikül gelişimini engelleyerek gerekenden fazla folikülün olgunlaşmasını engellemektedir (Hartshorne, G.M. ve ark. 2009; Qiao ve Feng 2011).

Primer foliküldeki teka hücre tabakasının oluşumu kritik olarak, büyüme ve farklılaşma faktör-9 (GDF-9) ve granöloza hücresi kaynaklı Kit Ligand (Mallappa, A. ve ark. 2015) faktörüne bağlıdır (Dumesic, D.A. ve Richards, J.S. 2013). GDF-9 teka hücrelerinin androjen üretimini düzenleyerek androjen miktarını artırır. Teka hücreleri kaynaklı androjen, FSH reseptörünün artmasını sağlamaktadır (Trombly, D.J. 2009). İnsan ve farede primer folikülde androjen reseptörleri bulunmakta ve farelerle yapılan çalışmalar göstermektedir ki androjen

reseptörlerinin yapısı bozulursa FSH reseptörünün de ekspresyonu azalmakta, folikülogenez bozulmakta ve prematür ovaryan başarısızlığı gerçekleşmektedir (Uzumcu, M. 2007; Bonnet, A. 2013). Dahası, androjen reseptörü kaybı hedef alınırsa, murin preantral ve antral granüloza hücrelerinde verimlilik azalmakta, foliküler atrezi oluşmakta ve oositin fertilizasyonu negatif olarak etkilenmektedir (Lei, L. 2010).

2.1.3.3. Primer Foliküllerin Sekonder Foliküllere Gelişimi

Sekonder folikül gelişimi sırasında foliküller ilave olarak steroid reseptörler kazanmakta ve gap junction sayısı artmaktadır. Sekonder folikül gelişimi esnasında gonadotropinlere daha bağımlıdır. Bunun nedeni reseptör aktivitesinin ve düzeyinin değişmesidir (Dumesic, D.A. and Richards, J.S. 2013). Granüloza hücrelerinin sayısı artmakta, granüloza ve teka hücreleri foliküldeki yerlerini almakta ve çeşitli faktörler salgılamaktadır, antrum oluşmaktadır. Sekonder folikülün karakteristik özelliği granüloza hücre tabakaları arasında sıvı dolu boşlukların oluşup birleşerek antral boşluğu oluşturmalarıdır (Larsen, W.J. 1997). AMH, granüloza hücrelerinden sentezlenmektedir ve primer folikül oluşumunu kontrol etmektedir, fazla sayıda primer folikül oluşumuna FSH ile birlikte engel olmaktadır. Normal AMH düzeyi granüloza hücrelerindeki FSH etkisini negatif yönde etkilemekte ve prematür maturasyonu engellemektedir. FSH dominant folikül seçiminde kilit rol oynamaktadır (Gleicher, N. 2011; Bonnet, A. 2013).

2.1.3.4. Sekonder Foliküllerin Tersiyer Foliküllere Gelişimi

Tersiyer folikül gelişimi oosit büyümesinin yavaşlaması (maksimum çapı 140 µm), granüloza hücre farklılaşması, ekstraselüler sıvı birikimi ve antrumun büyümesiyle karakterizedir. Bu aşamadan sonra gelişmekte olan foliküller arasından dominant folikül seçimi gerçekleşmektedir (Hartshorne, G.M. 2009). Tersiyer folikül oluşumunun erken evrelerinde FSH daha etkindir. 6-8 mm büyüklüğe ulaştığında folikülde granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesi başlar, teka kaynaklı androjen üretilir ve FSH tarafından uyarılan granüloza hücreleri östrojen öncüllerini östrojene çevirmeye başlar (Sander, V.A. 2011). LH tarafından uyarılan teka hücrelerinden androjen sentezlenmektedir. Foliküler

antrumu dolduran sıvı, kan damarlarında plazmanın sızmasıyla oluşup bölgesel salgılar ve metabolizma ürünleri ile modifiye edilir. Antrum sıvısı, hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir (Jonard, S. 2003; Dumesic, D.A. ve Richards, J.S. 2013). Ekzantrik yerleşim gösteren oosit çevresindeki granüloza hücreleri daha yoğun bir şekilde birikerek bir tepelik meydana getirir. Foliküler boşluk içerisinde oosit bir miktar hücre ile bulunur. Oositi çevreleyen hücrelere kumulus ooforus denilir. Ovulasyondan sonra oosit, çevresindeki korona radiata tabakası ile birlikte kumulus-oosit kompleksi (KOK) şeklinde atılır.

2.1.4. Foliküler Atrezi ve Ovulasyon

Overin varlığını ve gelişimini devam ettirmesi hipofizer gonadotropinlere bağlı olmasına rağmen, uykudaki primordial foliküllerin gelişme süreçlerine geçiş oranları gonadotropinlerden bağımsız faktörlere bağlıdır. Uyuyan folikülün gelişme aşamasına geçişi birincil olarak hem folikül hücreleri hem de oositler tarafından üretilen intraovariyan parakrin faktörlere bağlıdır. Germ hücreleri ile somatik hücreler arasında işlev gören intraovariyan parakrin faktörler; sitokinler, büyüme faktörleri (İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal ve fibroblast büyüme faktörleri ve interlökin-1 β) olarak sıralanabilir ve bu hücreler arasında gap junction aracılığı ile bilgi ve madde alışverişi olur. Foliküller 2-5 mm büyüklüğüne ulaştığında %50'si apoptozisten kurtulur ve seçilmiş büyüme dönemine girer. Bir hafta veya daha uzun süreli büyümeden sonra, ovulasyon öncesinde foliküllerden bir tanesi daha hızlı büyümeye başlayarak geriye kalan 5-11 folikülü baskılatarak apoptozisle onları atreziye uğrattır. 33 yaşında genç kadınlarda seçilmiş büyüme dönemine giren folikül sayısı yirmi civarında olabilir. Bu sayı yaşlanmaya bağlı olarak azalabilir. Aynı anda gelişen 6-12 folikülden sadece birinin gelişmesi diğerlerinin ise gerilemesi tam izah eden mekanizma bilinmemektedir. Fakat büyüyen folikülün kendisi pozitif geri bildirimdeki fazlalığa cevap olarak daha fazla östrojen salgılar. Artan bu östrojen salgısı hipofizin FSH salgısını azaltır, böylece diğer foliküllerin apoptozisine neden olur (Çelik, Ö. 2011).

Olgun bir oositin ovaryumda gelişimini tamamlayarak atılması olayına ovulasyon denir. Ovulasyon memelilerde puberteden başlayıp menapoza kadar devam eden siklik bir olaydır. Ovulasyon, insanda menstürasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerde gerçekleşir. Yaklaşık her 28 günde bir, her bir ovaryumdan bir oositin atılması ile tekrarlayan bu olaya ovariyal siklus denilir. Genelde her ay yumurtalıklarda 7 ile 12 folikül gelişmeye başlar. Fakat bu foliküllerden sadece bir tanesi dominant folikül olarak seçilir ve tam olgunluğa ulaşma şansına sahip olur. Diğerleri ise atreziye uğrar. Dominant folikül siklusun foliküler fazı süresince östrojen üretiminden sorumludur. Ovulasyon sonrasında dominant folikül, menstrüal siklusun luteal fazı boyunca progesteron sentezinden sorumlu olan korpus luteuma dönüşmektedir (Delilbaş, L. 2008).

2.1.5. Oogenez

Gelişmekte olan folikül, FSH'nın etkisi ile preantral aşamadan ovulasyon öncesi aşamaya geçer. Menstrüal siklusun ortasına denk gelen geç foliküler evrede hipofizinin ön lobundan salgılanan bir diğer hormon Luteinleştirici hormon (LH)'dur, LH ovulasyondan hemen önce pik yapar oositte germinal vezikül yıkılır (Germinal Vesicle Break Down (GVBD)). Kromozomlar metafaz I'den telofaz I evresine geçerler. Oosit I. Mayoz bölünmesini ovulasyondan hemen önce tamamlar. I.mayoz bölünmenin ardından kromatin iki kardeş hücre arasında eşit olarak dağılır. Biri hemen hemen bütün sitoplazmaya sahip büyük bir hücre olarak kalırken diğeri oosit ile zona pellusida perivitellin aralığında küçük bir hücre olarak kalır. Bu hücreye 1. Kutup cisimciği ya da 1. Polar cisimcik denilir. Oosit artık sekonder oosit olarak adlandırılır. Meydana gelen sekonder oosit haploid kromozoma sahiptir ve çekirdek ikinci mayoz bölünme evresine girer. Döllenme sırasında spermin oositte girmesi ile birlikte oosit ikinci mayoz bölünmesini tamamlar ve ikinci kutup cisimciği atılır. Ovulasyon ile atılan oosit olgun oosit ya da metafaz II (MII) oosit olarak adlandırılır (Delilbaş, L. 2008).

2.1.6. Polikistik Over Sendromu (PKOS)

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda, prevalansı % 6-10 oranında görülen ve farklı nedenlerden dolayı oluşan bir endokrin sistem bozukluğudur. PKOS'lu hastalarda karakteristik olarak oligo

veya anovulasyon, büyük polikistik overler ve ovaryan hiperandrogenizm gözlenmektedir (Fauser, B.C. 2012). İlk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal tarafından amenore, hirsutizm, anovulasyon ve büyük polikistik overlerle karakteristik semptom kompleksi olarak tanımlanmıştır (Lakhani, K. 2002). Tanı kriterleri konusunda tam fikir birliği sağlanamamıştır. Fakat yeni tanımlamaya göre; oligo-anovulasyon, klinik veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları, ultrasonografide polikistik overlerin gözlenmesi kriterlerinden ikisinin varlığı ile PKOS tanısı konulabilmektedir (Dumesic, D.A. 2008).

PKOS'lu hastalarda oligo ya da anovulasyon, kistik overler ve hiperandrojenizmin yanısıra hiperinsülinemi, artan luteinleştirici hormon (LH) sekresyonu, menstrual fonksiyon bozukluğu, hirsutizm ve kısırlık gözlenmektedir. PKOS'lu anovulator kadınlarda endokrin sistemdeki dengenin bozulması nedeniyle foliküler gelişim durur (Wood, J.R. 2007). Yardımcı üreme teknikleri (ÜYT) tedavileri süresince PKOS'lu hastalarda tipik olarak toplanan oosit sayısında azalma gözlenmekte, fazla sayıda folikül oluşmakta fakat gelişen foliküllerin olgunlaşması erken evrede duraksamaktadır. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki PKOS'lu hastalardan toplanan oositlerin kalite değeri düşüktür. Buna bağlı olarak fertilizasyon ve implantasyon oranları PKOS olmayan kadınlara göre azalmaktadır (Qiao, J. ve Feng, H.L. 2011; Sander, V.A. 2011). PKOS'lu hastalarda folikül gelişimini düzenleyen mekanizmalar bozulmaktadır (Dumesic, D.A. 2008). Ovaryan faktörlerdeki herhangi bir düzensizlik, oositi çevreleyen granüloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi, oosit olgunlaşmasını ve embriyonik gelişimi negatif yönde etkilemektedir. ÜYT tedavisi gören PKOS'lu hastalarda bu durum gözlenmiştir. Bunun sebebinin PKOS'lu hastalardaki yüksek östrojen seviyesinin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca LH seviyesinin de yüksek olması oosit olgunlaşmasını ve fertilizasyon oranını düşürürken, embriyo kalitesini bozar ve doğum oranının azalmasına ve düşüklerin artmasına neden olur (Wood, J.R. 2007; Qiao, J. ve Feng, H.L. 2011). PKOS'lu hastalarda LH hormonunun fazla salgılanması folikül stimüle edici hormonun (FSH) işlevini baskılar ve bu da granüloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi bozarak foliküllerin olgunlaşmadan dejenere olmasına ve oluşan antral foliküllerinde küçük kalmasına neden olur (Franks, S. 2008).

2.1.7. piRNA (piwi-interacting RNA)

piRNA'lar (piwi-interacting RNA) germ hücrelerinin genom bütünlüğünü sağlamada rol alan önemli RNA molekülleridir. İlk olarak, birbirinden bağımsız çalışmalarda fare testis ve *Drosophila* germ hücrelerinde tespit edilen piRNA'lar embriyonik gelişim transpozon transkripsiyonunun baskılanması, germ hücre bütünlüğünün sağlanması ve heterokromatin oluşumunda oldukça etkili moleküler araçlardır. Bu RNA molekülleri 5' uçta urasil ile başlayan (yaklaşık %86'sında) 26-33 nükleotit uzunluğunda kısa kodlanmayan tek zincirli RNA'ların yeni bir sınıfıdır. piRNA'lar çok hücreli organizmalarda kodlanan ve kodlanmayan RNA'ların tüm tipleri arasında çoğunlukla germ hücrelerinde olmak üzere yüzbinlerce türü ile en fazla sayıda bulunan RNA molekülleridir. Bu sayı miRNA'lar ve siRNA'lar da dahil olmak üzere bilinen diğer tüm RNA tiplerinin toplam sayısını aşar. piRNA'ların bazı noktalarda yapısal ve işlevsel özellikleri yine küçük kodlanmayan RNA sınıfına ait miRNA ve siRNA'larla benzerlik gösterse de piRNA'larla miRNA ve siRNA'lar arasında bazı temel farklılıklar vardır. miRNA ve siRNA oluşum sürecinde bu moleküllerin çift zincirli öncülleri ve stem-loop prekürsörleri bir RNAes III enzimi olan Dicer tarafından proses edilirken, piRNA'lar çoğunlukla uzun (200 kb'ye kadar) tek zincirli bir prekürsör olarak transkribe edilir ve bunlar Dicer'den bağımsız olarak proses edilir. piRNA'lar ARGONAUTE (AGO)/PIWI ailesi proteinlerinin PİWİ alt ailesine, buna karşın miRNA'lar ve siRNA'lar AGO/PİWİ ailesinin AGO alt ailesine spesifik olarak bağlanırlar. AGO ailesi proteinleri yüksek oranda korunmuş Piwi-Argonaute-Zwille (PAZ) ve PİWİ domainleri ek olarak daha az korunmuş N-terminal ve Middle (Walters, K.A. 2012) domainlerinin varlığı ile tanımlanır (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

piRNA'lar 1-100 kb'lık nispeten kısa genom bölgelerinde kümelenmiş olarak bulunurlar ve bu bölgelere piRNA kümeleri denir. piRNA dizilerinin büyük bir kısmı transpozonlarla eşleşen dizilerde (ovaryumda % 34 ve testiste %21) ve bir kısmı ise genomda intergenik eksonik ve intronik bölgelerde haritalanmıştır. piRNA'lar çoğunlukla hayvan testis spermatogon hücrelerinde ve ovaryum oositlerinde dağılım göstermektedir. Az sayıda piRNA ovaryum somatik hücrelerinde (folikül hücreleri) de bulunmaktadır. AGO protein ailesine dahil olan

PİWİ proteininin *Drosophila* gonadal somatik hücrelerinde eksprese olduğu tespit edilirken, yine bir AGO ailesi üyesi olan Aubergine (Aub) ve Ago3' ün bu hücrelerde eksprese olmadığı gözlenmiştir (Cox, D.N. 2000; Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). Bu nedenle somatik hücrelerde, piRNA' lar PİWİ bağımlı, AUB ve AGO3 bağımsız bir yolla oluşturulurken (primer yolak) germ hücrelerinde AUB ve AGO3 bağımlı bir yol olan ping pong amplifikasyon döngüsü (sekonder yolak) ile üretilirler. Dolayısıyla, piRNA' lar germ hücrelerinde ve somatik hücrelerde farklı yollarla oluşturulurlar. Bu piRNA biyogenezi yolları ökaryotik canlılar arasında korunmuştur ve süreçlerde rol alan proteinler değişse de hemen hemen aynı mekanizmlarla işler (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). piRNA biyogenezi kısaca özetleyecek olursak; ilk olarak "küçük RNA' yı oluşturucu lokus" olarak da bilinen, genomdaki piRNA kümelerinden nükleusta uzun tek zincirli transkriptler oluşturulur. Daha sonra, bu uzun tek zincirli RNA' lar sitoplazmaya salınır ve gerek primer gerek sekonder yolakta piRNA biyogenezinde rol alan bir takım proteinlerin aracılığı ile kesilip, 3' ucundan metillenerek olgun piRNA' lar oluşturulur. Daha sonra bu olgun piRNA molekülleri PİWİ veya AUB proteinlerine bağlanırlar (ovaryum somatik hücrelerinde sadece PİWİ eksprese edilir ve bu nedenle sadece bu proteine bağlanırlar). Bu proteinlerle kompleks halinde bulunan piRNA' lar dizi komplementerliğine göre transpozon ve bazı genlere ait mRNA' ların PİWİ ve AUB proteinlerinde bulunan endonükleaz aktivitesi ile kesimine rehberlik ederler. Ayrıca, PİWİ-piRNA kompleksleri transpozon susturulması ve gen regüle edici işlevler göstermek üzere nükleusa da transfer edilebilirler. piRNA' ya bağlı olmayan PİWİ nükleusa geçemez (Ross, R.J. 2014). PİWİ-piRNA kompleksinin en iyi ortaya konan biyolojik rolleri transpozon mobilizasyonunun inhibisyonudur. piRNA' lar bu işlevini hem heterokromatin oluşumunun düzenlenmesi yoluyla transkripsiyonel hem de transpozon transkriptlerinin degradasyonunu sağlayarak post-transkripsiyonel seviyede gerçekleştirirler (Han, B.W. ve Zamore, P.D. 2014). Transpozonlar bir hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Transpozon mobilizasyonu ile potansiyel zararlı mutasyonlar, delesyonlar ve genomdaki DNA miktarında değişiklikler meydana gelebilir. Dolayısıyla gametogenez sırasında ve germ hücrelerinde de

transpozonların susturulması hayati öneme sahiptir. Bu nedenle piRNA' lar ve PİWİ proteinleri, germ hücrelerinin genom bütünlüğünü koruma çabalarının merkezinde yer alırlar (Nishida, K.M. 2009; Haase, A.D. 2010; Moyano, M. 2015). Ayrıca, PİWİ-piRNA kompleksleri sadece transpozon susturulmasında rol almakla kalmaz aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel seviyede hedef genlerin ekspresyonunu düzenleme kapasitesine de sahiptirler. Sitoplazmada PİWİ-piRNA kompleksleri protein kodlayan genleri ve transpozon transkriptlerini dizi komplementerliğine göre keserler ve böylece post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık ederler. Ayrıca, PİWİ-piRNA kompleksleri polizomlar, mRNA cap-binding kompleks (farede, CBC) (Grivna, S.T. 2006; Unhavaithaya, Y. 2009), ve mRNA deadenilaz (Rouget, C. 2010) ile etkileşime girerek translasyonel düzenlemelere de dahil olurlar. Ek olarak, PİWİ-piRNA kompleks halinde nükleusa girebilir, heterokromatin oluşumu (Pal-Bhadra, M. 2004; Yin, H. ve Lin, H. 2007; Ashe, A. 2012; Huang, X.A. 2013) ve hedef genlerin promotor bölgelerinde DNA metilasyonuna (Watanabe, T. 2011; Rajasethupathy, P. 2012) dahil olarak epigenetik mekanizmalar aracılığı ile de gen transkripsiyonunu düzenlerler. PİWİ-piRNA'ların bu fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda piRNA biyogenezi ve işlevinde rol alan PİWİ proteinleri ve diğer faktörler de germ hücre gelişimi ve gametogenezde oldukça önemli bir yere sahiptirler (Thomson, T. ve Lin, H. 2009). Nitekim mutant *PİWİ* modeli oluşturulan *Drosophila*, *C. elegans*, fare ve zebra balığında germ hücre oluşumunda kusur, germ kök hücrelerinin mayotik baskılanmasının kaybı ve kısırlığa neden olan spermiyogenezde blokaj gibi gametogenik defektlerin ortaya çıktığı bildirilmiştir (Juliano, C. 2011). piRNA yolağındaki gen mutasyonlarının germ hücre gelişim kusurlarına yol açmasının nedenlerinden birinin piRNA' ların işlevini tam olarak yerine getirememesi nedeni ile DNA hasarından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir (Klattenhoff, C. 2007; Carmell, M.A. 2007; Ku, H.Y ve Lin, H. 2014). piRNA biyogenez ve işlevinde rol olan bir diğer protein olan aub' yi kodlayan *aub* geninde meydana gelen bazı mutasyonların germ hücrelerinde transpozon baskılanmasının inhibisyonuna ve DNA hasarında artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu problemlerin ise sonuçta kısırlığa yol açtığı bildirilmiştir

(Vagin, V.V. 2004; Vagin, V.V. 2006; Gunawardane, L.S. 2007; Klattenhoff, C. et al. 2007). Benzer şekilde *ago3* mutant dişi sineklerin kısır olduğu bildirilmiştir. Homozigot *ago3* mutant dişilerinin yabancıl tip veya heterozigot kardeş kontrollerine göre daha az yumurtladığı ve bu yumurtalardan yavru çıkarma durumunun kusurlu olduğu gösterilmiştir (Li, C. et al. 2009). Ayrıca, *Drosophila*' da yapılan çalışmalarda *PIWI* mutant erkek ve dişilerin germ kök hücrelerinin kendini yenileme kapasitesinin kusurlu olduğu, germ hücre dejenerasyonun görüldüğü ve bu durumun da kısırlığa neden olduğu bildirilmiştir (Lin, H. 1997; Cox, D.N. et al. 1998).

PIWI proteinlerinin germ hücre gelişimdeki işlevleri diğer organizmalarda da korunmuş olarak mevcuttur. Örneğin farede spermatogenez sırasında eksprese edildiği gösterilen Miwi (PIWIL1, Piwi-like gene 1), Mili (PIWIL2) ve Miwi2 (PIWIL4) olmak üzere 3 adet murin PIWI proteini bulunur (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

PIWI proteinlerinin piRNA biyogenezi ve işlevindeki önemi kadar bu proteinlerle etkileşime giren bazı proteinlerin de piRNA' ların oluşumu ve etkileri üzerinde önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. PIWI proteinlerinin etkileşime girdiği proteinler arasında Tudor-domaini-içeren proteinler (Tudor domain-ilişkili proteinler olarak da bilinirler, TDRD) yoğun bir şekilde araştırmalara konu olan PIWI etkileşim partnerleri arasındadır (Boswell, R.E. ve Mahowald, A.P. 1985; Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). TUDOR ailesi üyelerinin protein-protein/RNA etkileşim ağlarına katıldıkları, RNA metabolizması, splisozom oluşumu, histon modifikasyonu, piRNA biyogenezi ve germ hücre gelişiminde rol aldıkları bildirilmektedir (Brahms, H.L. et al. 2001; Pek, J.W. et al. 2012). Tudor domaini fisyon mayası, mantarlar, bitkiler ve hayvanların dahil olduğu ökaryotların geniş bir kısmında saptanmıştır. Farede Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd8, Tdrd9, Tdrd10, SND1/Tdrd11, Tdrd12 ve SetDB1' gibi birçok Tudor ailesi üyesi bulunmaktadır ve bunların germ hücrelerinde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). Bunlar arasından Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd9 ve Tdrd12' nin PIWI işlevleri için gerekli olduğu, spermatogenez ve piRNA yolağında rol aldıkları gösterilmiştir (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). Ayrıca, tudor mutant' larda Aub- ve

Ago3' e bağlanan piRNA' ların yabancı tip kontrolden farklı diziler olduğu belirlenmiştir. Bunun üzerine Tudor' un PİWİ proteinleri olan Aub ve Ago3' e bağlanarak doğru piRNA' ların bu proteinlere bağlanmasında adeta seçici bir görev üstlendiği iddia edilmiştir (Nishida, K.M. et al. 2009; Ku, H.Y.ve Lin, H. 2014).

Son olarak, östrojen uygulamasının fare testis ve erkek germ hücrelerinde mili ve miwi ekspresyonunu azalttığı belirlenirken (Pan, Y. et al. 2012), testosteron uygulanmasının ise sıçan testis dokusunda piwi proteini ve piRNA' ların ekspresyonun artırdığı saptanmıştır (Kang, H.J. et al. 2014). Bu bulgular PİWİ-piRNA yolağının çeşitli hormonal mekanizmalarla düzenlendiğine işaret etmektedir. Polikistik over sendromu (PKOS) olan insanlarda ve deney hayvanlarında yüksek östrojen ve LH hormonuna bağlı olarak folikül içi mikroçevrenin bozulması sonucu oositin gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği belirtilmiştir. Bu nedenle farelerde uygulanan deneysel PKOS modelleri, infertiliteye neden olan PKOS'un patogenezinin aydınlatılması ve yeni terapötik girişimlerin denenmesi için yapılan araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu çalışmada; dehidroepiandrosteron (DHEA) ile deneysel olarak PKOS oluşturulmuş farelerde ovaryumda, oositte ve kümülüs hücrelerinde PİWİ-piRNA yolağının ekspresyonunu ve PKOS'taki hormonal değişikliğin PİWİ-piRNA yolağı üzerine etkisinin olup olmadığını göstermeyi amaçladık.

2.1.8. Hipotez

PKOS'da yüksek olan östrojen ve LH seviyesi PİWİ-piRNA yolağının baskılanmasına ya da etkisinin azalmasına neden olabilir ve piRNA' ların transpozonları susturucu, genom bütünlüğünü sağlayıcı etkilerini azaltabilir. Çalışmamızda PKOS modeli oluşturduğumuz farede, yüksek LH ve östrojen hormonuna bağlı olarak bozulan folikül içi mikroçevrede PİWİ-piRNA yolağının baskılanabileceğini veya etkisinin azalabileceğini bunun sonucunda oositle kümülüs hücreleri arasındaki etkileşimin bozularak oosit maturasyonunun negatif yönde etkilenebileceğini düşünerek, bu yolda bulunan TDRD9 ve MİWİ (PİWİL1) molekülerinin protein ve mRNA ekspresyonunu RT-PCR, immünohistokimya ve immunofloresans teknikleriyle göstermeyi amaçladık.

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Kullanılan Cihazlar

- Santrifüj (Msc Micro Centaur, UK)
- Hassas tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Manyetik karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Vorteks (Clifton Cyclone, UK)
- PH metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Mikrodalga fırını (Arçelik MD 554 Intellwave, Türkiye)
- Mikropipetler -10 µl, 20 µl, 200 µl ve 1000 µl- (Gilson, USA)
- Thermal cycler (Gen Amplifikasyon PCR 9700 applied biosystems, USA)
- Rotor Gene 6000 (Qiagen, Germany)
- Maestro Nanodrop (Green Bioresearch, USA)
- Laminar flow kabin (Steril-Vbh)
- Ben Mari (Leica, Germany)
- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- Mikrotom (Leica, Germany)

3.2. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

- Etil Alkol (Merck, Germany)
- Ksilol (Merck, Germany)
- Formaldehit (Merck, Germany)
- Hematoksilen (Biooptica, Italy)
- Eozin-Y (Biooptica, Italy)
- Pikrik Asit (Merck, Germany)
- Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- Di sodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Sodyum sitrat (Merck, Germany)

- Tween-20 (Merck, Germany)
- Hidrojen peroksit (Merck, Germany)
- Normal Goat Serum (Invitrogen, USA)
- PİWİL1 (Abcam, ab12337, United Kingdom)
- TDRD9 (Abcam, ab118427, United Kingdom)
- Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Cy3) (Abcam, ab6939, United Kingdom)
- DAPI (Fluka, USA)
- UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/AEC kit (Thermo Scientific, USA)
- Large Volume Vision Mount (Thermo Scientific, USA)
- Entellan (Merck, Germany)
- RNeasy mini kit (Qiagen, Germany)
- RT First cDNA synthes kit (Qiagen, Germany)
- RT² SYBR Green FAST Mastermix (Qiagen, Germany)
- RT² qPCR Primer Assay (Qiagen, Germany)
- RNAlater (Qiagen, Germany)

3.3. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar

3.3.1. Bouin Çözeltisi

- Suda doyurulmuş pikrik asit.....300 cc
- %37 Formalin.....100 cc
- Glasiyal astik asit.....20 cc

3.3.2. %4'lük Paraformaldehit (pH:7.4)

- Paraformaldehit.....4 g
- PBS.....100 cc
- 10M NaOH.....100 µl

3.3.3. Na-Sitrat Tamponu

- Tri Na- Sitrat (dihidrat).....2,94 g
- Distile su.....1000 ml
- pH=6.0 olacak biçimde hazırlandı ve çözeltiliye 0,5 ml Tween-20 eklendi.

3.3.4. Tris-EDTA Tamponu

- Tris.....1,21 g
- EDTA.....0,37 g
- Distile su.....1000 ml
- pH=9.0 olacak biçimde hazırlandı ve çözeltiliye 0,5 ml Tween-20 eklendi.

3.3.5. Yıkama Çözeltilisi

- 1000 ml PBS içinde 5 ml Tween-20 çözünerek hazırlandı.

3.4. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Deney Planı

Bu çalışma için, Cumhuriyet Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 05.05.2016 tarih ve 65202830-050.04.04-63 karar numarası ile onay alınmıştır (EK-1). Çalışmamızda, Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvar'ında normal diyetle beslenen, oda ısısında, 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık periyotlar oluşturularak yetiştirilmiş 24 adet 25 günlük *Swiss* albino türü dişi fareler kullanıldı.

Çalışmada oluşturulan üç grupta toplam 24 adet *Swiss* albino türü prepubertal 25 günlük dişi fareler kullanıldı. İlk grubumuzu serum fizyolojik verilen kontrol, ikinci grubumuzu ise PKOS fare modeli oluşturmaktadır. PKOS fare modelinin oluşturulması için prepubertal 25 günlük 8 tane *Swiss* albino cinsi fareye 20 gün süreyle intraperitoneal olarak DHEA (dehidroepiandrosteron, 6mg/100g/gün) (MerckMillipore) susam yağında (ZADE VITAL) çözündürülerek 0.2 ml olarak enjekte edildi. Üçüncü grubu ise 0.2 ml susam yağı enjekte edilen Sham grup oluşturmaktadır (Çizelge 1.).

Çizelge 1. Deney gruplarının oluşturulması

Kontrol Grup (K) (n=8)	20 gün süre ile 0.2 ml serum fizyolojik intraperitoneal olarak enjekte edildi.
PKOS Grup (P) (n=8)	20 gün süre ile intraperitoneal DHEA (6mg/100g/gün) susam yağında çözündürülerek 0.2 ml olarak enjekte edildi.
Sham Grup (S) (n=8)	20 gün boyunca intraperitoneal olarak 0.2 ml susam yağı enjekte edildi.

Üç deney grubu içinde deney süresinin sonunda, immatür (GV) oosit toplanacak fareler gerek süperovulasyon sonrası matür (MetafazII (M2)) oosit, kumulus hücresi ve ovaryum dokusu toplanması için fareler 200 mg/kg pentotal sodyum intraperitoneal yoldan enjekte edilerek ötenazi ile öldürmüştür

3.5. Materyalin Toplanması

Çıkarılan dokular steril petrilere transfer edilip çevre bağ ve yağ dokuları disekte edilerek temizlendi. İmmatür oositler (GV oosit), ovaryum dokusundan 27 Ga'luk iğne kullanılarak M2 medyumu içerisinde ağız pipeti ile toplandı. Matür oositler ovaryum stimülasyonunun ardından tuba uterinanın ampulla bölgesinden yıkanarak alındı. Ovaryum stimülasyonu, intraperitoneal yolla uygulanan 5 I.U PMSG (Pregnantmare's serum gonadotropin) (PMSG, Sigma G-4877) enjeksiyonu ardından 48 saat sonra 5 I.U. hCG (human chorionic gonadotropin) (hCG, Sigma C-8554) enjeksiyonuyla gerçekleştirildi. HCG enjeksiyonundan 16 saat sonra matür (olgun, M2) oositler, kumulus-oosit kompleksi (KOK) şeklinde tuba uterina'nın ampulla bölgesinden M2 medyumu içerisinde ağız pipeti kullanılarak alındı. Hiyaluronidaz çözeltisiyle muamele edilen ve sonrasında kumulus hücrelerinden arındırılan matür oosit ve kumulus hücreleri mekanik olarak cam ağız pipeti ile yıkanarak toplandı. Stereomikroskop ile toplanan GV ve M2 aşamasındaki oosit ve kümülüs hücreleri RNAlater içerisine alınarak RT-PCR analizi için çalışılana kadar -20 °C' ye kaldırıldı.

3.6. Histolojik Değerlendirme

Kontrol, Sham ve PKOS gruplarından alınan ovaryum dokuları ışık mikroskopik inceleme için 24 saat Bouin çözeltisinde fikse edildikten sonra dehidratasyon ve şeffaflandırma basamaklarını takiben parafinde bloklandı.

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica mikrotom ile alınan 3-4 µm kalınlığında seri kesitler, gruplar arasındaki histolojik farklılıkları göstermek amacıyla hematoksilin-eozin boyama uygulaması yapıldı. Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobu ile uygun görüntüler alındı.

3.7. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresan Boyama

Kontrol, Sham ve PKOS deney gruplarına ait dokular %4'lük paraformaldehid içerisinde 6-7 saat süre ile tespit edildi. Dokular dehidrasyon, şeffaflandırma ve parafine gömme ardından + 4 °C'ye kaldırıldı, mikrotomla (Leica Germany) kesit almadan birkaç saat önce bloklar -20 °C' ye alınıp 3-4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler poli-L-lizin kaplı lam üzerine alındıktan sonra bir gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi. Alınan kesitlerde MİWİ (PİWİL1) ve TDRD9 ekspresyonları immünohistokimya ve immünofloresan işaretleyiciler kullanılarak belirlendi. Her boyamada, negatif kontrol için primer antikorların uygulanmadığı kontrol kesitleri kullanıldı.

3.7.1. İmmünohistokimya Boyama Protokolü

1. 10 dk 2 değişim ksilolde deparafinizasyon
2. %100'lük etil alkol 2 dk.
3. %100'lük etil alkol 2 dk.
4. %96'lik etil alkol 2 dk.
5. %80'lik etil alkol 2 dk.
6. %70'lik etil alkol 2 dk.
7. Distile su 5 dk.
8. Endojen peroksidaz aktivitesi, kesitler hidrojen peroksit (H₂O₂, Thermo scientific, USA) çözeltisinde 15 dakika oda ısısında bekletilerek giderildi.
9. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
10. Mikrodalga fırında 2 defa 10'ar dakika sırasıyla maksimum güçte ve 600W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH:6.0) içerisinde epitoplara açığa

çıkarılması gerçekleştirildi. MİWİ (PIWİL1) antikoruna için uygun Tris-Edta tamponu (pH:9.0) kullanıldı.

11. Pappen (Dako, Glostrup, Denmark) ile örneklerin etrafı çizildi.
12. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
13. Kesitler serum bloklama çözeltisi (Ultra V Block) ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. (Thermo Scientific, USA).
14. Kesitler uygun primer antikor ilave edilerek MİWİ (PIWİL1) (Abcam, ab12337) antikoruna ve TDRD9 (Abcam, ab118427) antikoruna için 60 dakika oda ısısında inkübe edildi. İki antikorda 1/100 seyreltilerek kullanıldı.
15. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
16. Sekonder antikor, biyotinle konjuge keçi anti-polivalent ile oda ısısında 20 dakika nemli karanlık ortamda inkübe edildi.
17. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
18. HRP-Streptavidin oda ısısında 20 dakika nemli karanlık ortamda inkübe edildi.
19. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
20. AEC (Thermo scientific, USA) substrat çözeltisi ile 5-10 dakika (mikroskopik kontrollü gerçekleştirildi).
21. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 3 kez 2'şer dakika yıkandı.
22. Zıt boyama, Mayer's Hematoksilen (Merck) içinde 1 dakika yapıldı.
23. Akarsu altında hematoksilenin fazlası yıkandı.
24. Preparatlar kurulanıp kapatici (Thermo, Large Volume Vision Mount) ile kapatıldı.

3.7.2. İmmüno Floresan Boyama Protokolü

1. 10 dk. 2 değişim ksilolde deparafinizasyon
2. %100 'lük etil alkol 2 dk.
3. %100'lük etil alkol 2 dk.
4. %96'lik etil alkol 2 dk.
5. %80'lik etil alkol 2 dk.
6. %70'lik etil alkol 2 dk.
7. Distile su 5 dk.

8. Mikrodalga fırında 2 defa 10'ar dakika sırasıyla maksimum güçte ve 600W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH:6.0) içerisinde epitoplarmn açığa çıkarılması gerçekleştirildi. MİWİ (PİWİL1) antikoru için uygun Tris-Edta tamponu (pH:9.0) kullanıldı.
9. Pappen (Dako, Glostrup, Denmark) ile örneklerin etrafı çizildi.
10. Yıkama çözeltisi (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
11. Kesitler hidrojen peroksit (H₂O₂, Thermo scientific, USA) çözeltisiyle oda ısısında 30 dakika nemli karanlık ortamda endojen peroksidaz bloklama.
12. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 2 kez 3'er dakika yıkandı.
13. Serum Bloklama: Kesitlerin immunoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için normal keçi serumu bloklama çözeltisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
14. Kesitler primer antikolarla +4 °C'de nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar ve kullanıldıkları seyrelme oranları; MİWİ(PİWİL1) 1/100 ve TDRD9 1/100. Primer antikolar antibody diluent reagent (Invitrogen, USA) çözeltisiyle seyreltildiler.
15. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
16. Sekonder antikor (Goat Anti-Rabbit IgG H&L-CY3 konjuge, ab6939) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
17. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
18. 0,5 µg/mL DAPI ile oda ısısında 10 dakika çekirdek boyaması yapıldı.
19. Yıkama çözeltisinde (PBS-Tween 20) 2 dakika yıkandı.
20. Kapatma medyumuyla kapatma yapıldı.

3.8. İmmunohistokimyasal Değerlendirme Yöntemi

Kontrol, PKOS ve Sham grupları, incelenen PİWİL1 ve TDRD9 antikoları için immunoreaktivite açısından değerlendirildi. Antikoların ekspresyon şiddeti semikantitatif skora yoluyla belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Her gruptan denek başına ardışık olmayan ve rastgele seçilmiş ortalama üç histolojik kesit birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelendi. Ovaryum dokularında, çalışılan antikoların boyanma

derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif (-), zayıf boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++) ve kuvvetli boyanma olmuş ise (+++) şeklinde ovaryum dokuları değerlendirildi.

3.9. Real Time-PCR

3.9.1. Deney Gruplarında RNA İzolasyonu

Oluşturulan üç deney grubundan toplanan GV oosit, M2 oosit ve kümülüs hücresi yaklaşık 20 adet olacak şekilde, içerisinde 20 µl RNAlater içeren ayrı ayrı ependorf tüplere alındı çalışma anına kadar -80°C’de saklandı. MİWİ ve TDRD9 proteininin ekspresyonunun belirlenmesi için RNA izolasyon kiti (RNeasy Plus Micro Kit-Qiagen) kullanılarak total RNA eldesi gerçekleştirildi. GV oosit, M2 oosit ve kümülüs hücresinden elde edilen RNA'lardan cDNA kiti (RT²HT First Strand kit-Qiagen) kullanılarak cDNA’ lar elde edildi ve MİWİ ile TDRD9 ekspresyonu relatif kantitasyon kullanılarak RT-PCR yöntemiyle belirlendi. PCR amplifikasyonu RT²SYBR Green qPCR Mastermix kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Deneylerde tüm cDNA örnekleri aynı şartlarda ve aynı grup içerisinde 3'er kez çalışıldı. Bu üç ölçümün ortalaması analizlerde kullanıldı. Bunun amacı, deneysel hataları ve farkları en aza indirmektir. Çalışmada housekeeping gen (GAPDH) iç kontrol olarak kullanıldı.

3.9.1.1. Total RNA İzolasyonu

Buz içerisine çalışmak koşulu ile toplanmış 20'şer adet GV oosit, M2 oosit ve kümülüs hücresinin bulunduğu ependorf tüpler -80°C'den alınarak çalışma ortamına kondu.

- 350 µl Buffer RLT Plus eklendi ve bir enjektörle oositler ve kümülüs hücreleri homojenize edildi.
- Homojenat, bir 2 ml toplayıcı tüp içerisine yerleştirilmiş gDNAelimator kolon tüp içerisine pipet yardımıyla kondu. $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) 30 saniye santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüp içerisindeki süpernatanta 1 volüm (yaklaşık 350 µl) %70'lik Etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.

- Bu karışım bir 2 ml toplayıcı tüp içerisine yerleştirilmiş kolona pipetle kondu ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüp atılıp yeni bir toplayıcı tüp takılan kolona 700 μ l Buffer RW1 eklendi ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüp atılıp yeni bir toplayıcı tüp takılan kolona 500 μ l Buffer RPE eklendi ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de 15 saniye santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüp atılıp yeni bir toplayıcı tüp takılan kolona 500 μ l %80 etanol ve $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm)'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Toplayıcı tüp atılıp yeni bir toplayıcı tüp takılan kolon maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- RNeasyMiniElutespin kolon yeni bir 2 ml ependof tüpe yerleştirilip üzerine 14 μ l RNase-free su tüpün direk merkezine eklenerek maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilerek total RNA elde edildi. Çalışma anına kadar örnekler 80°C'de saklandı.

3.9.1.2. cDNA Eldesi

1. Kit içerisinde GE2 buffer ve BC4 reverstranskriptaz karışımının bulunduğu iki tüp bulunmaktadır.
2. -20°C'de saklanan bu ürünler buz içerisine yerleştirilerek burada çözümleri beklendi.
3. Çözünen ürünlerin tüpleri $1000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj yapılarak tüp kenarındaki damlacıkların toplanması sağlandı.
4. RNA konsantrasyonları spektrofotometre ile ölçülerek hesaplandı. Herbir tüpe eşit RNA konabilmesi için gerekli seyreltme işlemi yapıldı.
5. 2 μ l ependorf tüpler örneklerin kodları ile işaretlendi. Herbir tüpe 8 μ l elde edilen RNA örnekleri (konsantrasyonları eşitlenmiş) ve 6 μ l GE2 buffer eklendi. Tüplere parmakla vurularak içeriğin karışması sağlandı. $1000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj yapılarak tüp kenarındaki damlacıkların toplanması sağlandı.
6. Tüpler thermalcycler cihazına (Tehne) yerleştirilerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi.

7. Cihazdan alınan tüplere 6 µl BC4 Reverstranskriptaz (RT Master Mix) eklenerek 1000 × g'de 1 dakika santrifüj yapılarak tüp kenarındaki damlacıkların toplanması sağlandı.

8. Tüpler thermalcycluser cihazına yerleştirilerek 42°C 15 dakika 95°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA örnekleri cihazdan çıkarılarak -20°C'de saklandı.

Polimeraz zincir reaksiyonu: Numunelere ait cDNA'lar aşağıda miktarları ve içerikleri belirtilen reaksiyon bileşenleriyle pipetlenerek her numune için toplamda 25 µl'lik reaksiyon karışımları elde edildi.

qRT-PCR koşulları: 12,5 µl RT-PCR Master mix, 6,5µl dd H₂O, 3 µl cDNA, 1 µl Primer, 25 µl'lik reaksiyon karışımları elde edildikten sonra, RT-PCR reaksiyonu Rototor Gene 6000 marka cihazda aşağıdaki döngü programı uygulanılarak gerçekleştirildi (Çizelge 2).

Çizelge 2. RT-PCR Döngü Programı

Sıcaklık	Süre	Döngü
95°C	10 dakika ¹	1
95°C	15 saniye	45
60°C	1 dakika ²	45

¹ HotStart DNA polimerazın aktivasyonu

²Her döngünün uzama basamağında her bir örnek için SYBR Green floresans belirlenmesi ve kaydedilmesi.

3.9.1.3. Primerler

RT-PCR, reaksiyona giren PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan floresan boyadan alınan sinyalin miktarı arasındaki orantı esasına göre çalışır ve sonuçlar PCR analizi sırasında elde edilir.

Bu çalışmada floresan boya olarak SYBRGreen kullanıldı. RT-PCR tekniğinin sorunsuz çalışması için uygun primer seçimi çok önemlidir. Primerlerin, cDNA'ya özgül olarak bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu çalışmada, üretici firmanın daha önceden optimize ettiği primerler kullanıldı. Gen ekspresyonları incelenen genlere ait özgül primerlerin üretildiği katalog numaraları ve firma numaraları Çizelge 3. 'te verilmiştir.

Çizelge 3. RT-PCR yönteminde kullanılan primerler, katalog numaraları ve üretici firma.

Primerler	Katalog Numarası	Firma
TDRD9	PPM29652A-200	Qiagen
PIWIL1	PPM36573A-200	Qiagen

RT-PCR reaksiyonu sonrasında amplifiye edilen PCR ürünlerinin özgüllüğü RT-PCR cihazında Erime Eğrisi Analizi kullanılarak değerlendirilmiştir.

3.9.1.4. RT-PCR Verilerinin Analizi

RT-PCR sonuçlarının veriler $\Delta\Delta C_T$ metodu ile istatistiksel analizi RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Bu çalışmada yapılan tüm ölçümler, deneyler ve incelemeler *Rotor-gene 6000 series software version 1.7* yazılımı kullanılarak yapıldı.

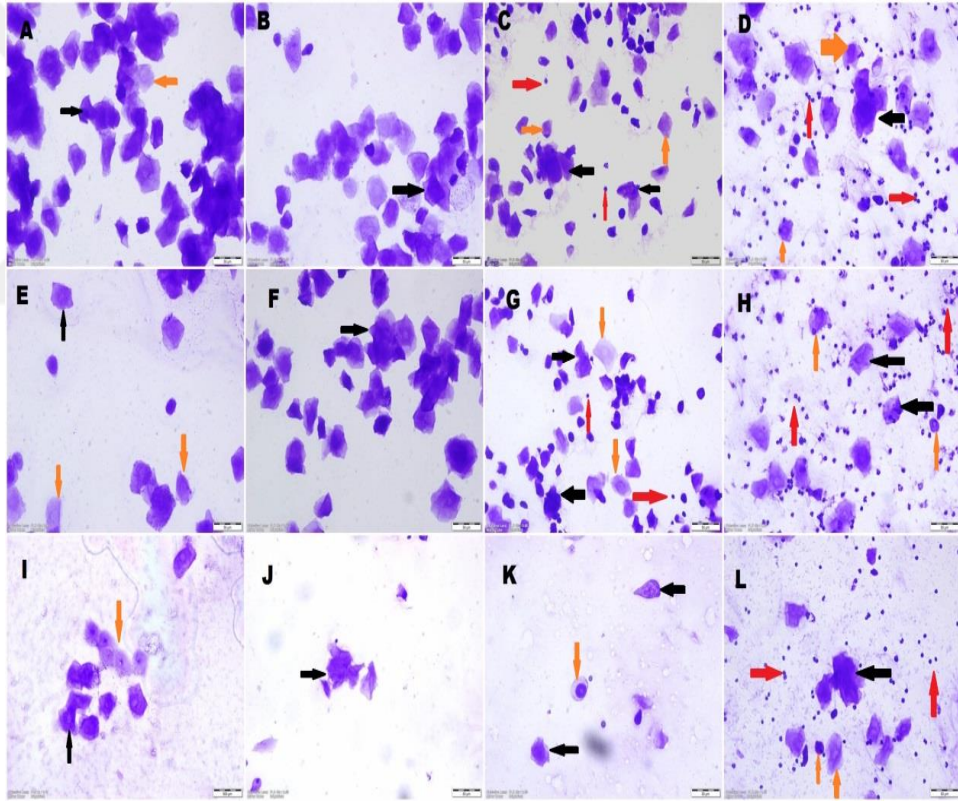
4. BULGULAR

4.1. Vajinal Smear Bulguları

Kontrol grubu ve Sham grubunda östrus siklusunun tüm evreleri benzerlik göstermekteydi. Proöstrus aşamasında, her alanda kornifiye epitel hücreleri ve yüzeyel epitel hücreleri görüldü (Şekil 4.1.A ve 4.1.E). Östrus aşamasında, çok sayıda gruplar halinde kornifiye epitel hücreleri görülmekteydi (Şekil 4.1.B ve 4.1.F). Metaöstrus aşamasındaysa, dağınık halde bulunan kornifiye ve yüzeyel hücreler arasında lökositler gözlemlendi (Şekil 4.1.C ve 4.1.G). Diöstrus aşamasında

ise, her alanda fazla sayıda lökosit gözlenirken bunların arasında kornifiye hücelere rastlandı (Şekil 4.1.D ve 4.1.H).

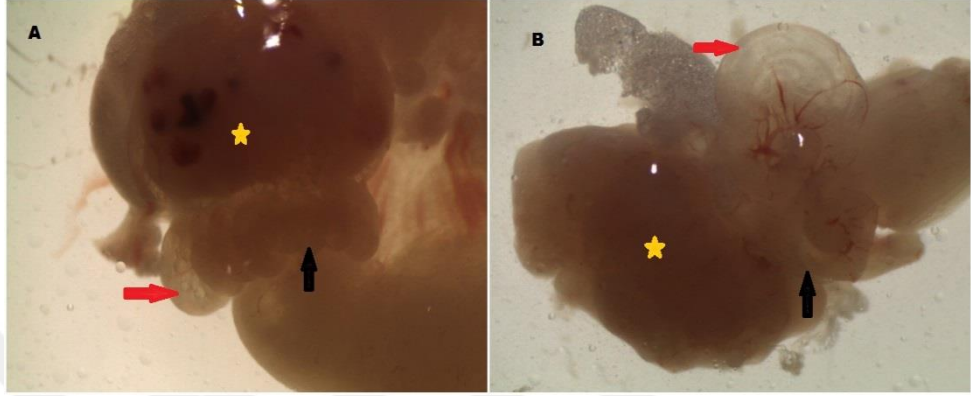
PKOS grubunda, kontrol ve Sham grubuna göre proöstrus aşamasında kornifiye ve yüzeyel epitel hüceleri oldukça az sayıda gözlemlendi (Şekil 4.1.I). Östrus aşamasında az sayıda gruplar oluşturmuş kornifiye epitel hüceleri bulunmaktaydı (Şekil 4.1.J). Metaöstrus aşamasındaysa, dağınık halde bulunan kornifiye ve yüzeyel hücelere arasında lökositler gözlemlendi (Şekil 4.1.K). Diöstrus aşamasında her alanda fazla sayıda lökosit gözlenirken bunların arasında kornifiye hücelere rastlandı (Şekil 4.1.L). Ayrıca PKOS grubunda siklus düzensizliği ve siklus sürelerinde uyumsuzluk görüldü. PKOS grubundaki deneklerde diöstrus aşamasının ya uzun sürdüğü ya da bazı sikluslarda hiç bulunmadığı gözlemlendi.



Şekil 4.1. Kontrol, Sham ve PKOS gruplarının östrus sikluslarının karşılaştırılması. A-D kontrol grubu, A) proöstrus, B) östrus, C) metaöstrus, D) diöstrus aşamaları. E-H Sham grubu E) proöstrus, F) östrus, G) metaöstrus, H) diöstrus aşamaları. I-L PKOS grubu , I) proöstrus, J) östrus, K) metaöstrus, L) diöstrus aşamaları. Yüzeyel hücelere (turuncu ok), kornifiye hücelere (siyah ok), lökositler (kırmızı ok).

4.2. Stereomikroskop Bulguları

Kontrol ve Sham gruplarına ait overlerin, boyutları normal sınırlarda ve ovaryum yüzeyinin düzgün görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.A). PKOS'lu grupta ise over boyutlarının arttığı ve over yüzeyinin girintili çıkıntılı, kistik bir görünüm kazandığı izlendi (Şekil 4.2.B).

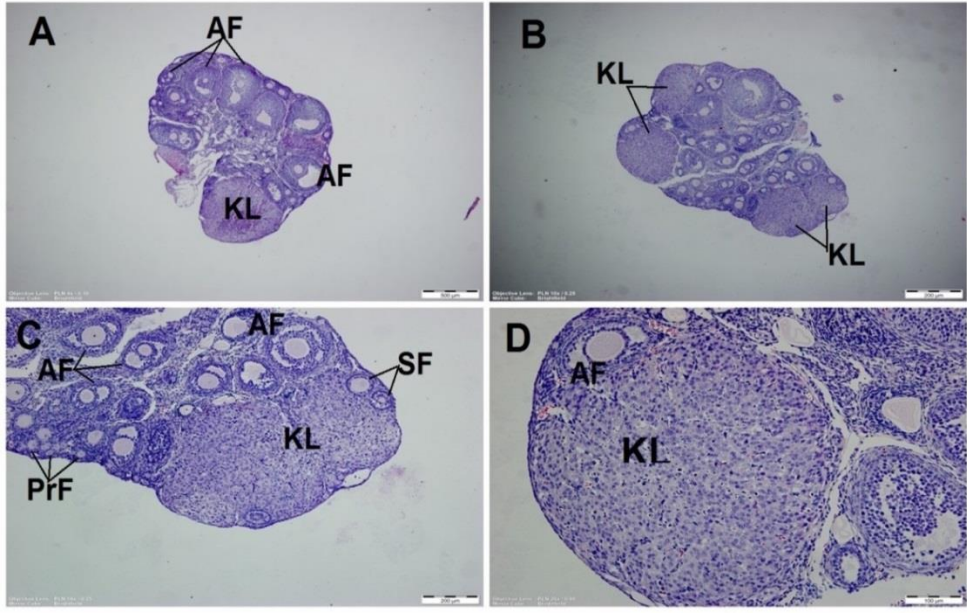


Şekil 4.2. Kontrol grup (A) ve PKOS grubu (B) overlerin stereomikroskop görüntüsü. Ovaryum (sarı yıldız), tuba uterina (siyah ok) ve tuba uterinanın ampulla bölgesi (kırmızı ok).

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

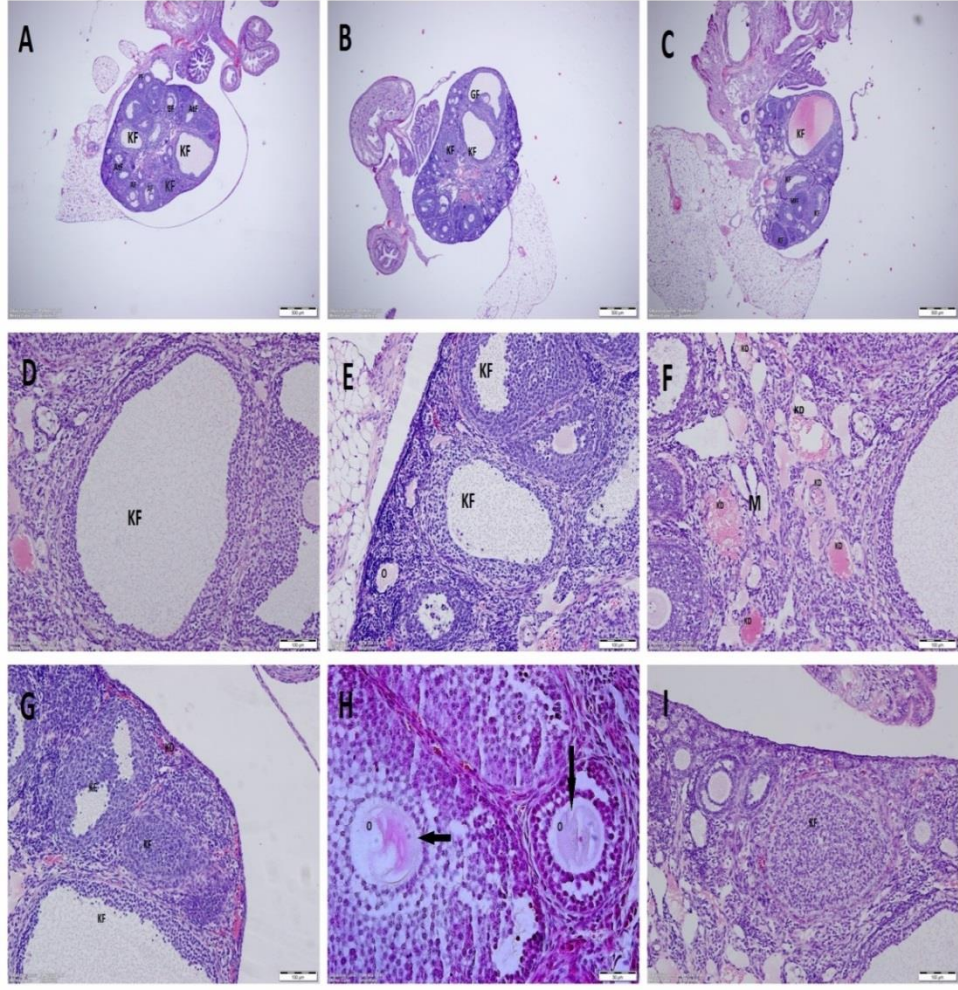
PKOS'lu fare ovaryumlarını kontrol grup ile karşılaştırmak için Hematoksilen&Eozin boyaması ile morfolojik bir değerlendirme yapıldı.

Kontrol ve Sham gruplarındaki ovaryumların morfolojik yapılarının benzer olduğu gözlemlendi. Kontrol grubundaki ovaryum preparatlarında normal görümlü foliküler gelişimin farklı aşamalarında foliküller görüldü (Şekil 4.3.A, B ve C). Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde ovulasyon sonrası oluşan korpus luteum yapıları gözlemlendi. (Şekil 4.3.C ve D).



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait ovaryum görüntüsü. PrF: Primordiyal folikül, AF: Antral folikül, SF: Sekonder folikül, KL: Korpus luteum (Boyama: Hematoksilen&Eozin).

PKOS grubundaki ovaryumların korteksinde farklı gelişim aşamalarında foliküller görüldü (Şekil 4.4.A, B ve C). Atretik folikül miktarının oldukça fazla olduğu belirlendi. PKOS grubuna ait ovaryum dokularından alınan kesitlerde ovaryumların korpus luteum yapısına sahip olmadıkları gözlemlendi. Preantral aşamadaki folikül sayısında artış görülmekteydi. PKOS'lu grupta ovulasyonun gerçekleşmediği, foliküllerin bir kısmının atrofiye olarak geriledikleri ve oositlerini kaybederek boş kistik yapılar şeklinde kortekste yer aldığı görüldü (Şekil 4.4.D, E ve I). PKOS'lu ovaryumda oosit morfolojisinin bozulduğu gözlemlendi (Şekil 4.4.H). Ayrıca PKOS'lu ovaryumların korteksinde çok sayıda farklı gelişim evrelerinde ovule olamayan foliküllerin oluşturduğu kistik yapılara bağlı olarak hacminin artmış olduğu gözlemlendi. Kortekste bulunan foliküllerin teka tabakasında ve medullada vaskularizasyonun artmış olduğu belirlendi (Şekil 4.4.E, F, G ve I).



Şekil 4.4. PKOS grubuna ait ovaryum görüntüleri. PrF: Primordiyal folikül, PF: Primer folikül, GF: Graaf folikül, AF: Antral folikül, KF: Kistik folikül, AtF: Atretik folikül, KD: Kan damarı, M: Medulla, O: oosit. Dejenere oosit (siyah ok) (Boyama: Hematoksilen&Eozin).

4.4. İmmunohistokimya ve İmmunofloresan Bulguları

Kontrol ve PKOS gruplarına ait ovaryum dokularında MİWİ (PİWİL1) ve TDRD9'un immunolokalizasyonları belirlendi.

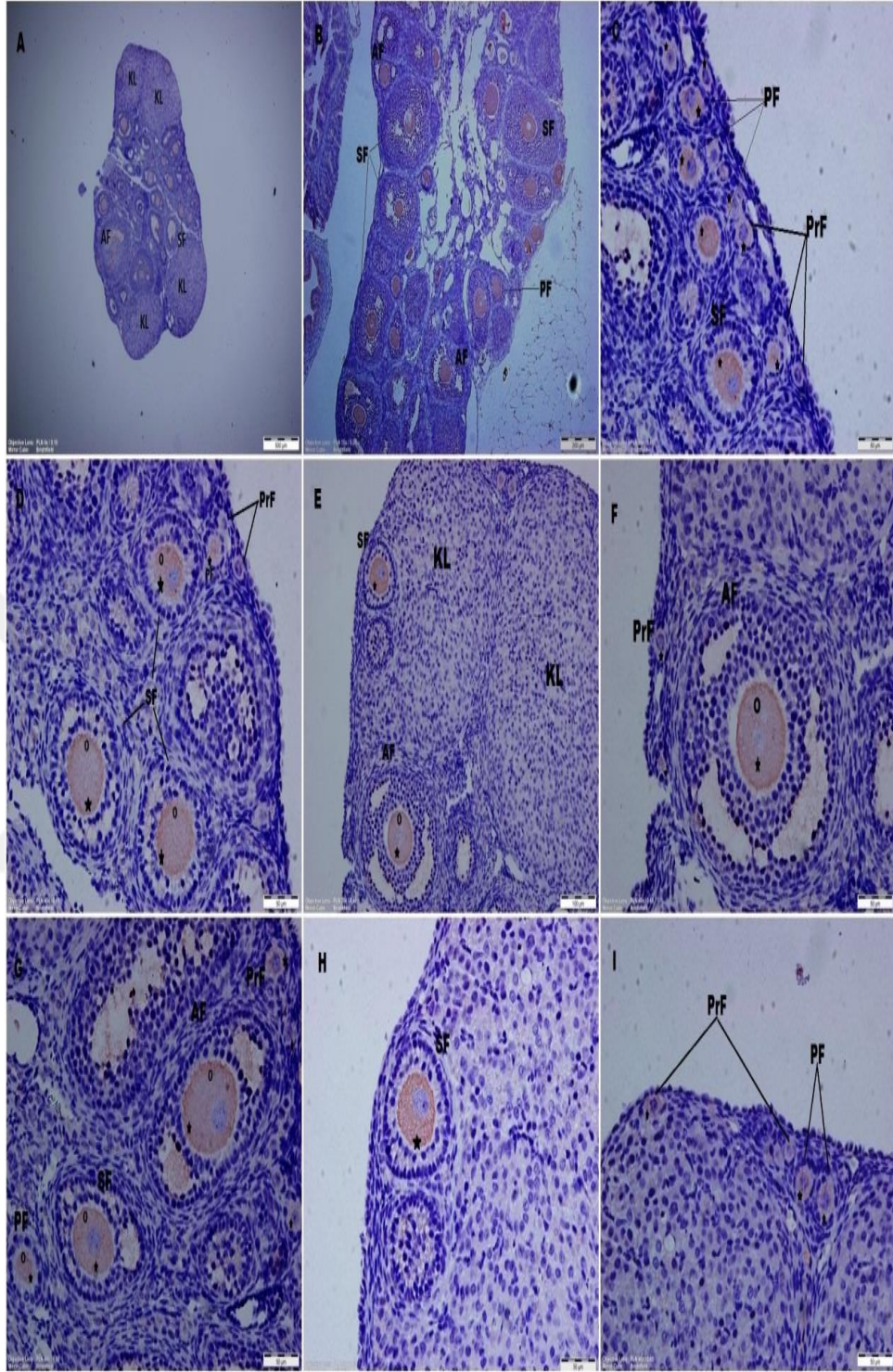
4.4.1. Kontrol Grubu MİWİ (PİWİL1) Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde PİWİL1 proteininin immünohistokimyasal işaretleme ile genel ovaryum görüntüsünde oosit sitoplazmasında (Şekil 4.6.A ve B) eksprese olduğu görülmektedir. Boyanma şiddetine bakıldığında, primordiyal foliküllerdeki oosit sitoplazmasında zayıf bir

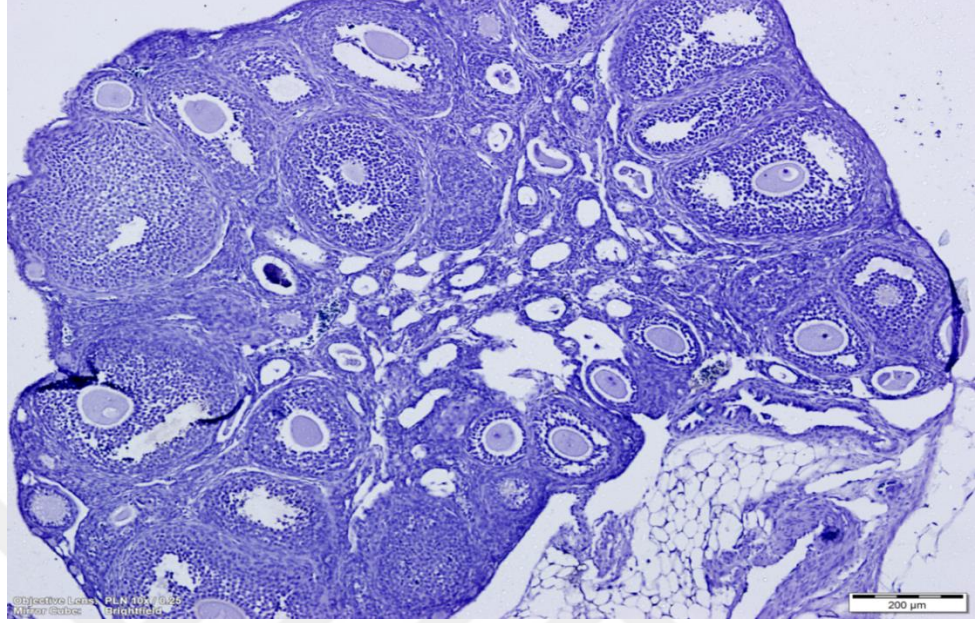
ekspresyonunun olduğu belirlendi (Şekil 4.5.C, D ve I). Primer, sekonder ve antral foliküllere ait oosit sitoplazmalarında ise daha güçlü boyanma gözlemlendi (Şekil 4.5. D, E, F, G ve H).

Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in immünofloresan işaretlenmesinde de foliküler gelişimin erken aşamasından (primordiyal folikül) itibaren tüm folikül aşamalarında (primer, sekonder ve tersiyer) oosit sitoplazmasında ekspresyonu izlendi (Şekil 4.7.A, B ve C). Primordiyal foliküllerde oosit sitoplazmasında PİWİL1 immün işaretlenme yoğunluğu azdı (Şekil 4.7. J, K ve L) ve ovaryum epitelinde de zayıf bir ekspresyon gözlemlendi. Primer, sekonder, ve antral folikül aşamalarına doğru oosit sitoplazmalarında PİWİL1'in immün işaretlenme yoğunluğu artmıştır (Şekil 4.7. D, E, F, G, H ve I).

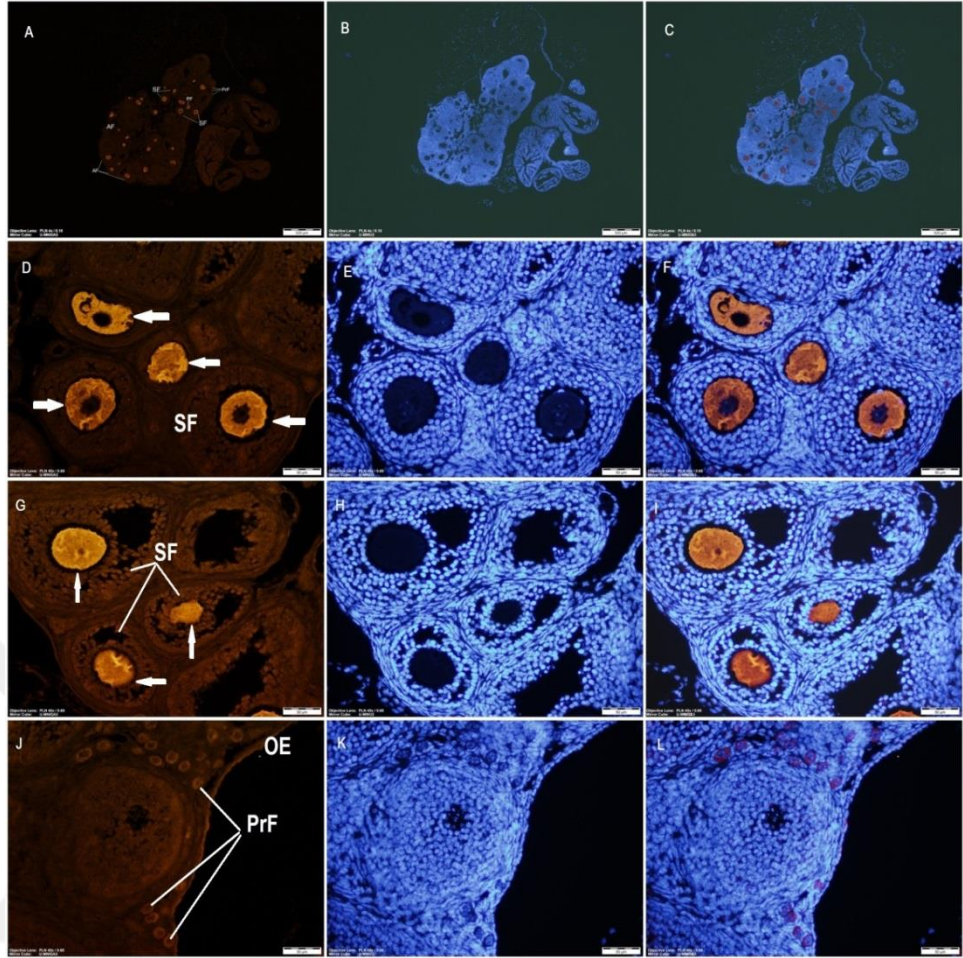
PİWİL1 primer antikoru kullanılmadan yapılan negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immün işaretlenme izlenmemiştir (Şekil 4.6. ve Şekil 4.8.).



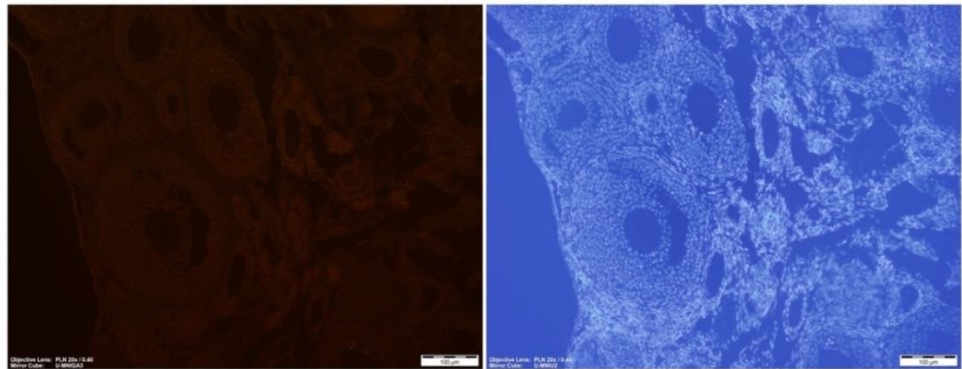
Şekil 4.5. Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde PİWIL1 immunolokalizasyonu (*). PrF: primordiyal folikül, PF: primer folikül, SF: sekonder folikül, AF: antral folikül, KL: korpus luteum. Yıldızlar pozitif immün boyanma gösteren oosit sitoplazmaları.



Şekil 4.6. Kontrol grubu ovaryum kesitinde PIWIL1'in negatif kontrol boyanması.



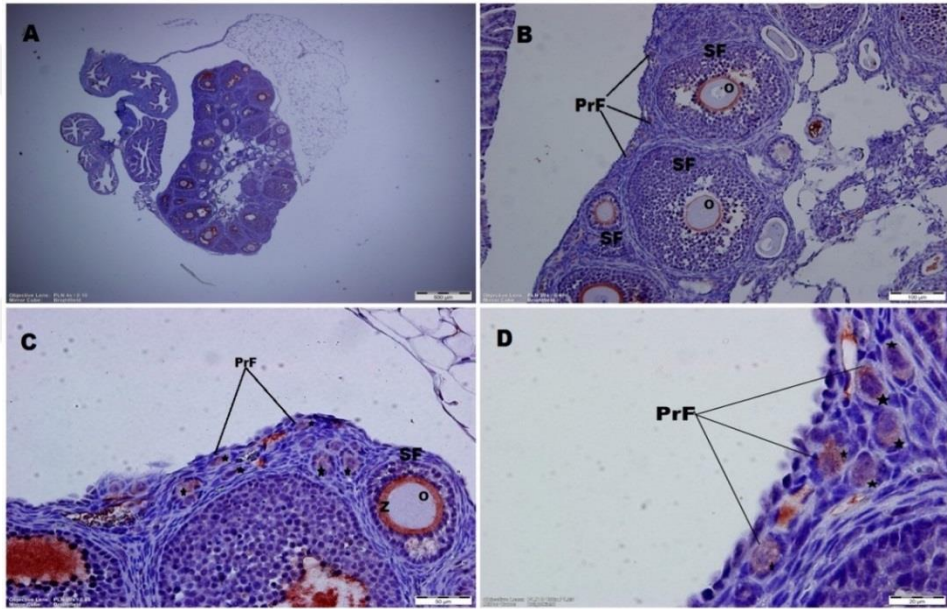
Şekil 4.7. Kontrol Grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in immünofloresan işaretleme ile ekspresyonunun görüntüsü. PİWİL1 ekspresyonunun olduğu yerler (Beyaz ok).



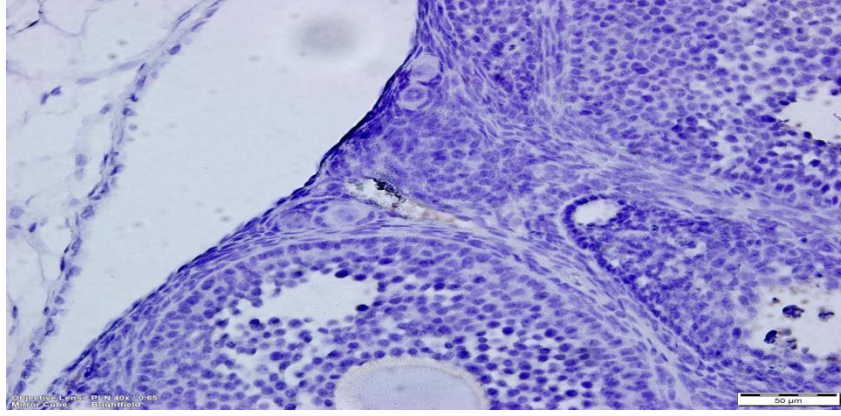
Şekil 4.8. Kontrol grubu ovaryum kesitinde PİWİL1'in negatif boyanması.

4.4.2. Kontrol Grubu TDRD9 Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde TDRD9 proteininin foliküler gelişimin erken evresi olan primordiyal folikül aşamasında oosit sitoplazmasında eksprese olduğu saptandı (Şekil 4.9. A, B, C, D). Sekonder folikül ve antral foliküllerde zona pellusida da ekspresyon saptandı. Kortekste primordiyal folikül dışında farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerde veya granüloza hücrelerinde ekspresyon gözlenmedi. Kortekste ve medullada bulunan kan damarlarında ekspresyon saptandı. Negatif kontrol kesitinde herhangi bir immün işaretlenme saptanmadı (Şekil 4.10).



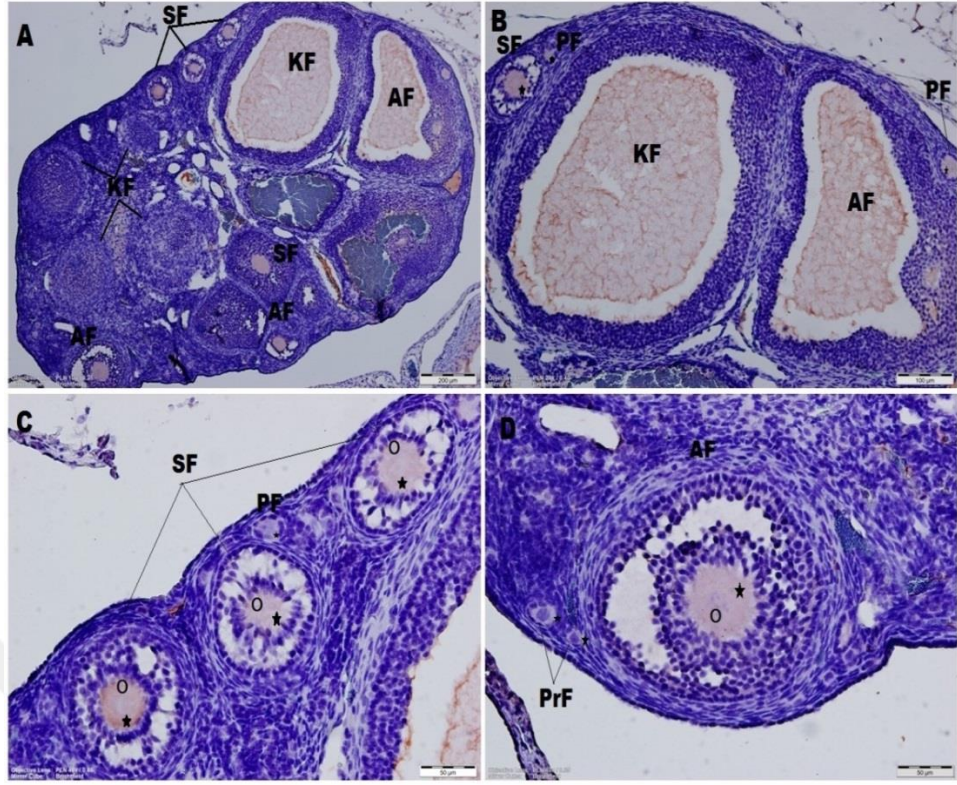
Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde TDRD9'un immunolokalizasyonu (*). PrF: primordiyal folikül, SF: sekonder folikül, O: oosit, Z: zona pellusida.



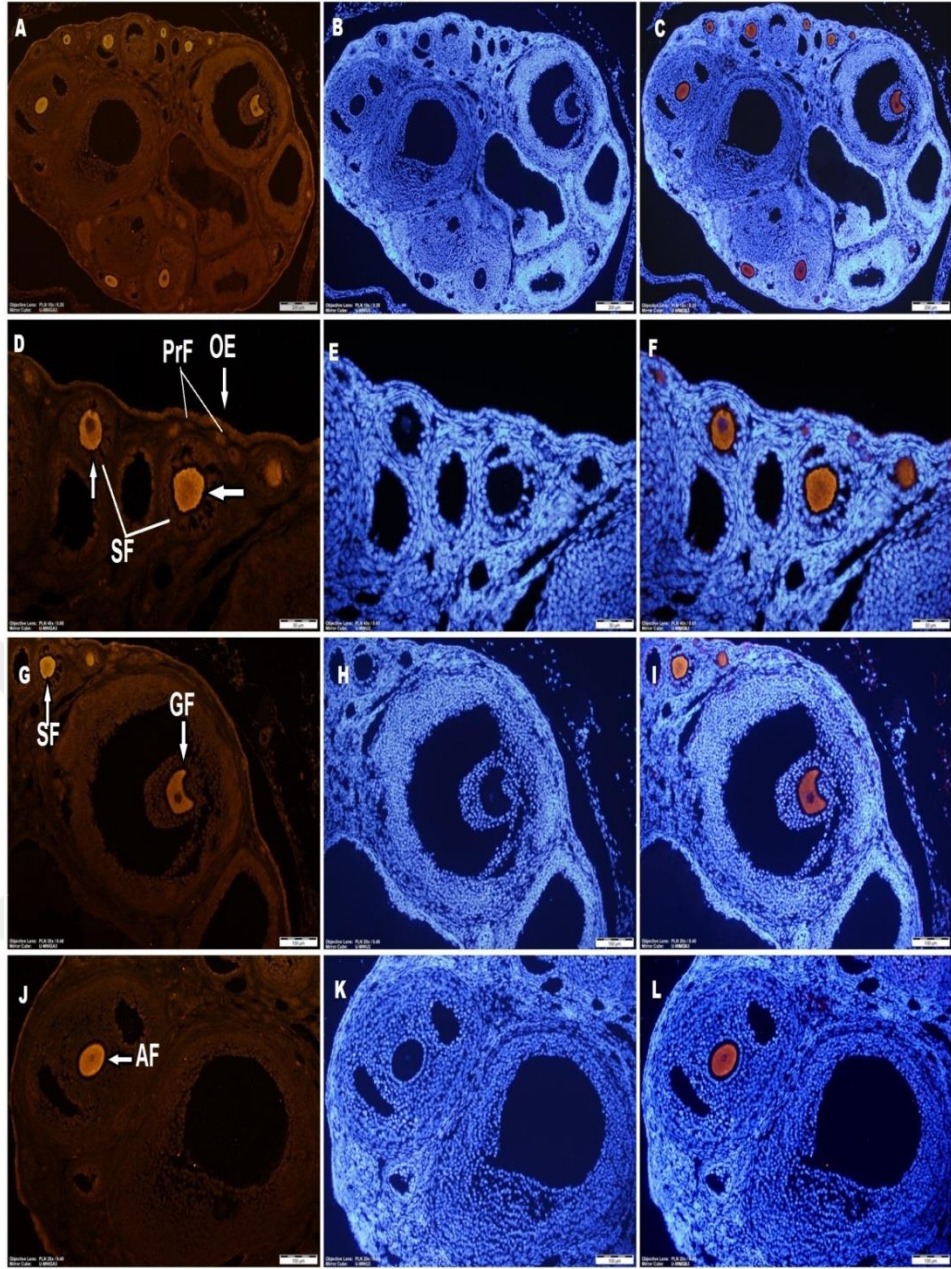
Şekil 4.10. Kontrol grubu ovaryum kesitinde TDRD9'un negatif kontrol boyanması.

4.4.3.PKOS Grubu MİWİ (PİWİL1) Bulguları

PKOS grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1 antikorunun immünohistokimyasal ve immünofloresan işaretleme ile ekspresyonuna baktığımızda, PKOS'lu ovaryumdaki kistik yapılarda herhangi bir ekspresyon izlenmedi (Şekil 4.11. A, B ve Şekil 4.12. A, B, C). Bu grupta da gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllere ait oositlerde ekspresyonu saptandı. Erken foliküler gelişim aşaması olan primordiyal foliküle ait oosit sitoplazmasında kontrol grubu ile karşılaştırınca burada da zayıf bir ekspresyon görüldü (Şekil 4.11. D ve Şekil 4.12. D, E, F). Ovaryum epitelinde zayıf bir ekspresyon izlendi (Şekil 4.12. A,D,G,J). Primer folikül, sekonder folikül, antral folikül ve graff foliküldeki oosit sitoplazmalarında ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.11. A-D ve Şekil 4.12. D-L).

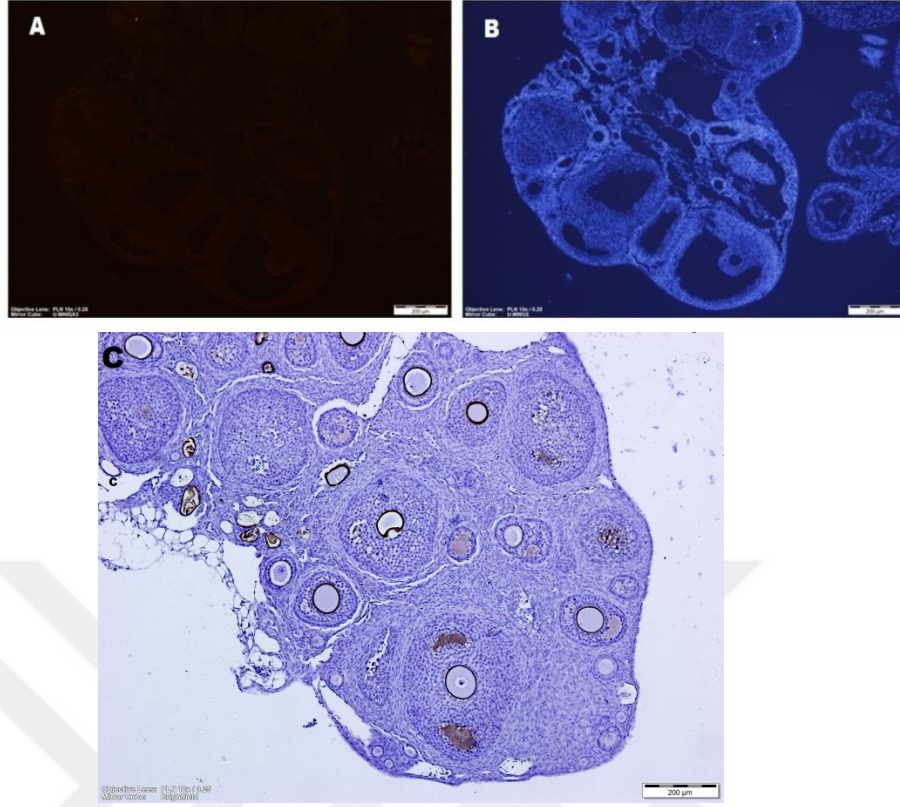


Şekil 4.11. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde P1WIL1 immunolokalizasyonu (*). PrF: primordiyal folikül, PF: primer folikül, SF: sekonder folikül, AF: antral folikül, KF: kistik folikül, O: oosit.



Şekil 4.12. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde P1WIL1'in immüno Floresan işaretleme ile ekspresyonunun görüntüsü. P1WIL1 ekspresyonun olduğu yerler (Beyaz ok).

PKOS grubu P1WIL1 antikoru için negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immün işaretleme görülmedi (Şekil 4.13. A, B ve C).

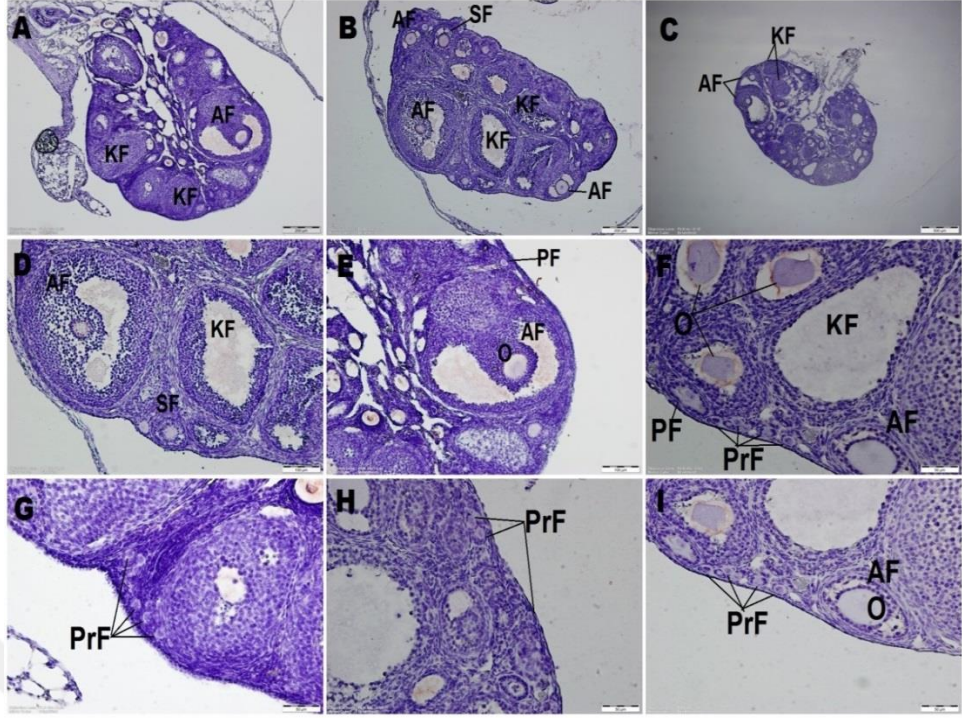


Şekil 4.13. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde PİWİL1'in negatif kontrol boyanması.

4.4.4. PKOS Grubu TDRD9 Bulguları

PKOS grubuna ait ovaryum kesitlerinde TDRD9 antikorunun ekspresyonuna foliküler gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllere ait oositlerde rastlanmadı (Şekil 4.14. A, B, C, D, E, F). Kontrol grubunda primordiyal foliküllerdeki oosit sitoplazmalarında izlenen ekspresyon, PKOS grubundaki primordiyal foliküldeki oosit sitoplazmasında saptanmadı (Şekil 4.14. G, H ve I).

PKOS grubu TDRD9 antikoru için negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir immün işaretlenme görülmedi (Şekil 4.15.).



Şekil 4.14. PKOS grubu ovaryum kesitlerinde TDRD9 immunolokalizasyonu. PrF: primordiyal folikül, PF: primer folikül, SF: sekonder folikül, AF: antral folikül, KF: kistik folikül, O: oosit.



Şekil 4.15. PKOS grubu ovaryum kesitinde TDRD9'un negatif kontrol boyanması.

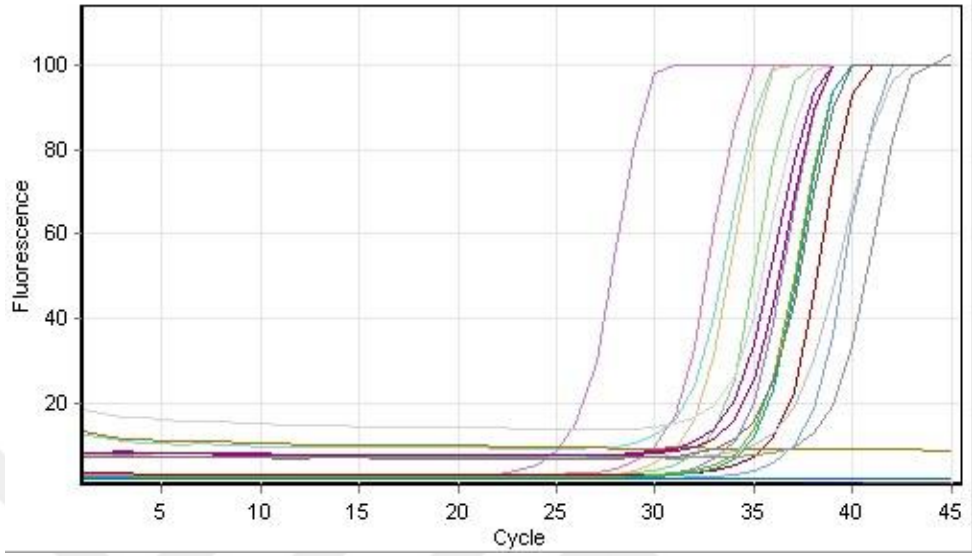
Çizelge 4. Kontrol ve PKOS gruplarında PİWİL1 ve TDRD9 immüno lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirilmesi. (Ovaryum dokularında, çalışılan antikörlerin boyanma derecelerine göre; boyanma olmamış ise negatif (-), zayıf boyanma olmuş ise (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++) ve kuvvetli boyanma olmuş ise (+++) şeklinde ovaryum dokuları değerlendirildi.)

	Kontrol PİWİL1	PKOS PİWİL1	Kontrol TDRD9	PKOS TDRD9
Epitel	+	+	-	-
Korteks Kan Damarı	-	-	++	-
Medulla Kan Damarı	-	-	++	-
Primordiyal Folikül				
Primordiyal Folikül Hücreleri	-	-	-	-
Oosit	+	+	+++	-
Primer Folikül				
Oosit	+++	+++	-	-
Granüloza Hücreleri	-	-	-	-
Sekonder Folikül				
Oosit	+++	+++	-	-
Zona Pellucida	-	-	+++	-
Granüloza Hücreleri	-	-	-	-
Teka İnterna	-	-	-	-
Teka Eksterna	-	-	-	-
Antral Folikül				
Oosit	+++	+++	-	-
Zona Pellucida	-	-	+++	-
Granüloza Hücreleri	-	-	-	-
Teka İnterna	-	-	-	-
Teka Eksterna	-	-	-	-
Kistik folikül				
Granüloza hücreleri	-	-	-	-

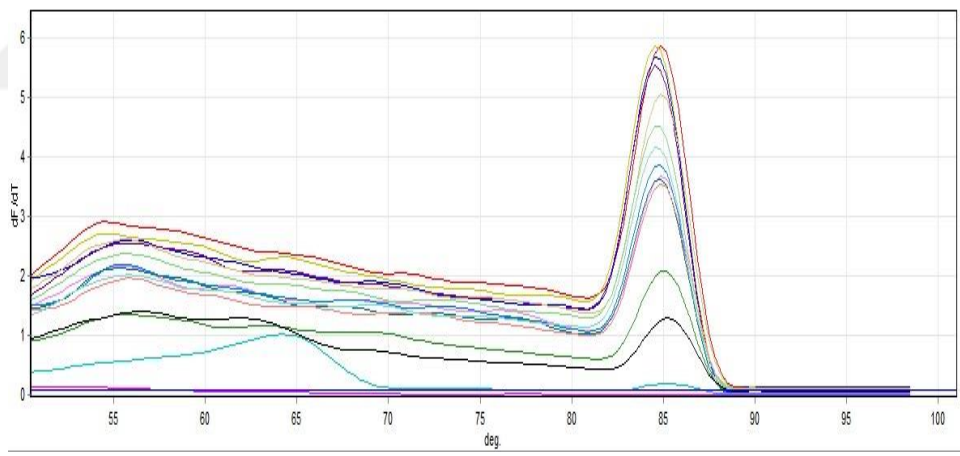
4.5. Real Time -PCR Bulguları

PKOS, Sham ve Kontrol gruplarından toplanan kumulus hücresi, GV ve M2 aşamasındaki oositlerde *MIWI* (*PİWİL1*) ve *TDRD9* gen ifadelerinin düzeyleri RT-PCR tekniğiyle analiz edilmiş ve referans gen olarak kullanılan *GAPDH* ile

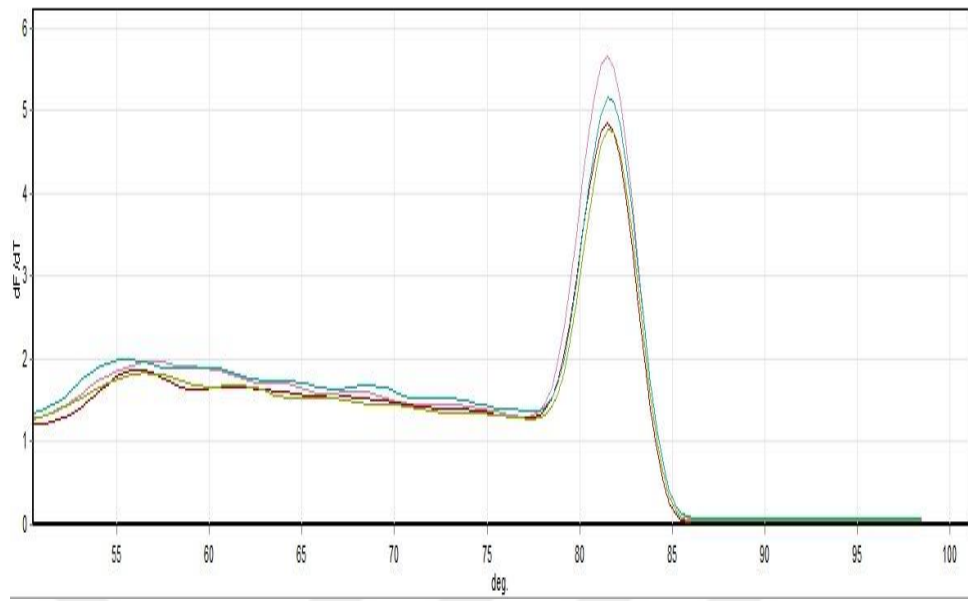
normalize edilmiştir. RT-PCR reaksiyonu sonucunda her gen için spesifik amplifikasyon eğrisi (Şekil 4.16.) ve erime eğrileri gözlemlendi (Şekil 4.17., Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.).



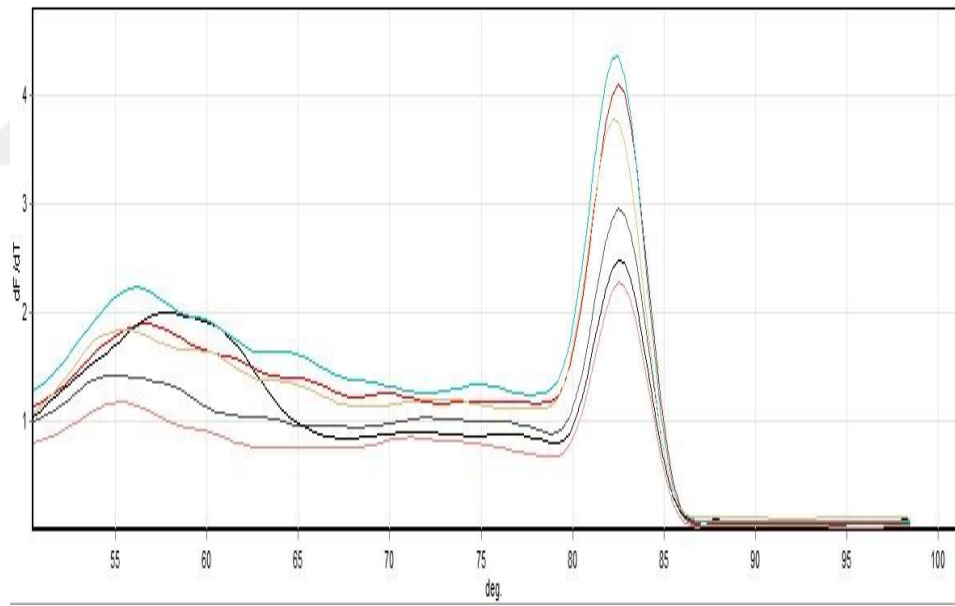
Şekil 4.16. *GAPDH*, *PIWIL1* ve *TDRD9* geninin amplifikasyon eğrisi



Şekil 4.17. *GAPDH* genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.



Şekil 4.18. *PIWIL1* genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.



Şekil 4.19. *TDRD9* genine ait elde edilen bazı PCR ürünlerinin erime eğrisi analizi.

Elde edilen ölçümler ve değerlendirmelerde RT-PCR sonuçları Rotor-Gene 6000 yazılımı ile kantite edildi. Verilerin istatistiksel analizi RT² profiler RT-PCR Array Data Analysis version 3.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Veriler $\Delta\Delta C_t$ metodu temel alınarak analiz edildi. RT² profiler RT-PCR Array

Data Analysis version 3.5 programında Student's T-testi gerçekleştirilerek çalışılan her gen için ifade düzeyleri değerlendirmede kontrol grubu (kontrol grubu GV oosit) temel alınarak grup1 (Kontrol grup M2 oosit), grup2 (PKOS grup GV oosit) ve grup3 (PKOS grup M2 oosit) belirlendi (Çizelge 5).

Kat değişimi değeri ($\text{Fold change}=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$), birden büyükse genin ifade düzeyinin arttığı anlamına gelir. Eğer kat değişim değeri birden azsa gen ifade düzeyinin azaldığı anlamına gelir. Kat düzenlemesi (Fold regulation), kat değişim sonuçlarının biyolojik sistemlere uyarlanmasıdır. Eğer kat değişimi değeri ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) birden büyükse kat düzenlemesi değerine eşittir. Ancak kat değişimi değeri ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) birden azsa kat düzenlemesi değeri kat değişimi değerinin negatif tersidir. Verilerin analiz sonucunda her gen bölgesinin ortalama Ct, kat değişim ve kat düzenlemesi değerleri Çizelge 5' de gösterilmiştir.

PIWIL1 geni ifade düzeylerinde, grup1'de 14.18 kat azalma ve grup3'de 3.88 kat azalma olduğu izlendi. Bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0,05$). Grup2'de 1.38 kat artma olduğu izlendi ve bu artmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$).

TDRD9 geni ifade düzeylerinde, grup1'de 804 kat azalma, grup2'de 331 kat azalma, grup3'de ise 211 kat azalma olduğu izlendi. Ancak bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$).

Çizelge 5. RT-PCR verilerinin kontrol ve çalışma gruplarında ortalama Ct, kat değişim ve kat düzenlemesi değerleri ve Student's T-testi sonuçları.

Genler	Gruplar	Ct(\bar{X})	Kat değişimi (Fold Change)*	Kat Düzenlemesi (Fold Regulation)**	P değeri
Miwi(PiwiL1)	Kontrol GV oosit	26.25	-	-	
	Konrol M2 oosit	31.44	0.07	-14.18	0.004964
	Kontrol kumulus	-	-	-	-
	PKOS GV oosit	28.43	1.38	1.38	0.323704
	PKOS M2 oosit	31.50	0,26	-3.88	0.030275
	PKOS kumulus	-	-	-	-
TDRD9	Kontrol GV oosit	-	-	-	-
	Konrol M2 oosit	-	0.0012	-804	0.234471
	Kontrol kumulus	-	-	-	-
	PKOS GV oosit	-	0.003	-331	0.234785
	PKOS M2 oosit	-	0.0047	-211	0.235206
	PKOS kumulus	-	-	-	-
GAPDH	Kontrol GV oosit	27.75	-	-	-
	Konrol M2 oosit	29.12	1	1	0
	Kontrol kumulus	29.49	-	-	-
	PKOS GV oosit	30.40	1	1	0
	PKOS M2 oosit	31.04	1	1	0
	PKOS kumulus	22.25	-	-	-

p<0,05 anlamlı.

* Kat Değişimi (Fold Change)= 2(- $\Delta\Delta Ct$)

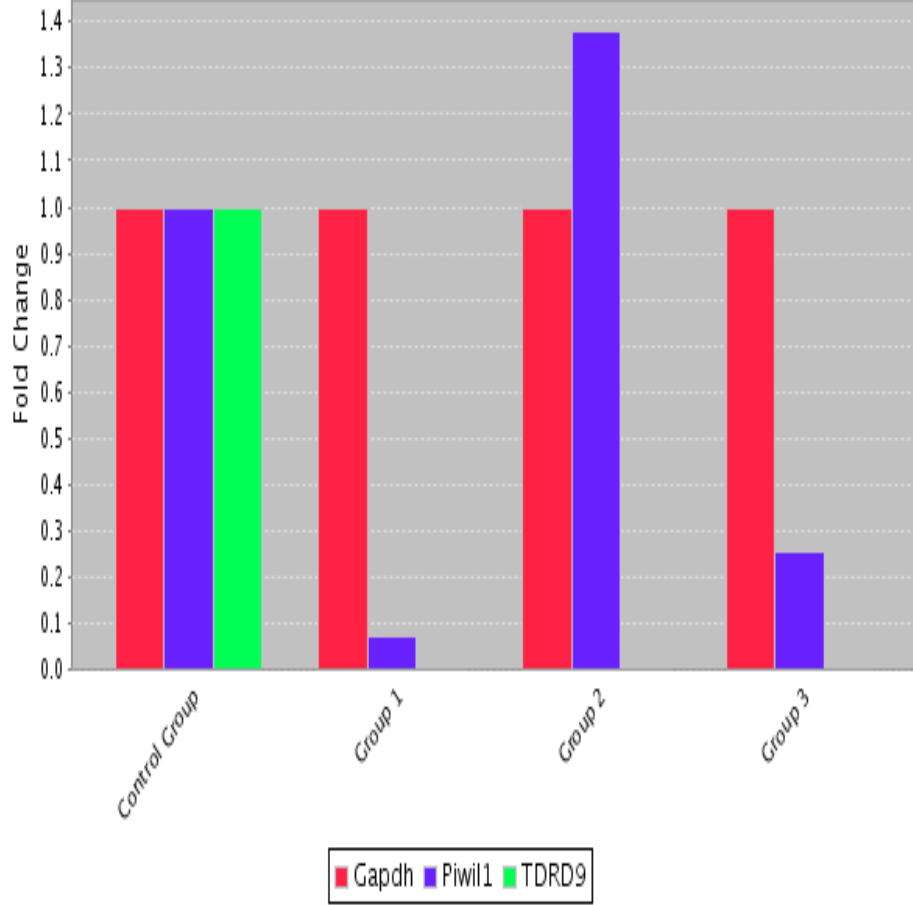
** Kat düzenlemesi (Fold Regulation)= -1/ $\Delta\Delta Ct$

ΔCt çalışma= Ort Ct hedef gen çalışma - Ort Ct Gapdh çalışma

ΔCt kontrol= Ort Ct hedef gen kontrol - Ort Ct Gapdh kontrol

$\Delta\Delta Ct$ = ΔCt (hedef gen çalışma – Gapdh çalışma) – ΔCt (hedef gen kontrol – Gapdh kontrol)

PIWIL1 ve *TDRD9* genlerinin kontrol grubuna göre çalışma grubunda gen ifade düzeyleri Şekil 4.20.'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Kontrol grubu temel alınarak çalışma gruplarında *PIWIL1* ve *TDRD9* genlerinin ifade düzeylerinin karşılaştırılması. Kontrol Grup (kontrol GV aşamadaki oosit), Grup1 (kontrol M2 aşamasındaki oosit), Grup2 (PKOS GV aşamasındaki oosit), Grup3 (PKOS M2 aşamasındaki oosit).

5. TARTIŞMA

Polikistik over sendromu (PKOS), doğurganlık çağındaki kadınlarda, prevalansı % 6-10 oranında görülen ve farklı nedenlerden dolayı oluşan bir endokrin sistem bozukluğudur. PKOS'lu hastalarda karakteristik olarak oligo veya anovulasyon, büyük polikistik overler, ovaryan hiperandrogenizm gözlenmektedir (Fauser, B.C. et al. 2012). PKOS'lu anovulator kadınlarda endokrin sistemdeki dengenin bozulması nedeniyle foliküler gelişim durur (Wood, J.R. et al. 2007). ÜYT tedavisi görmekte olan PKOS'lu hastalarda toplanan oosit sayısında tipik olarak azalma gözlenmekte, fazla sayıda folikül oluşmakta fakat gelişen foliküllerin olgunlaşması erken evrede duraksamaktadır. Yapılan çalışmalarda PKOS'lu hastalardan toplanan oositlerin kalite değerinin düşük olduğu gözlenmektedir. Buna bağlı olarak da fertilizasyon ve implantasyon oranları PKOS olmayan kadınlara göre azalmaktadır (Qiao, J. ve Feng, H.L. 2011; Sander, V.A. et al. 2011). PKOS'lu hastalarda folikül gelişimini düzenleyen mekanizmalar bozulmaktadır (Dumesic, D.A. et al. 2008). Ovaryan faktörlerdeki herhangi bir düzensizlik, oositi çevreleyen granüloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi, oosit olgunlaşmasını ve embriyonik gelişimi negatif yönde etkilemektedir. Histolojik olarak PKOS'lu ovaryumun, primordiyal folikül sayısının normal ovaryumdakinden farklı olmadığı, primer ve sekonder folikül sayısının ise normal ovaryumdakinden anlamlı olarak yüksek olduğu saptanmıştır (van der Spuy, Z.M. 2004). Fakat folikülogenezin hangi evrelerinde folikül mikroçevresindeki otokrin ve parakrin etkiye sahip hangi faktörlerin değişkenlik gösterdiği bilinmemektedir. Yaygınlığına rağmen, sendromun etiyolojisi ve patolojisi hakkında çok az şey bilinmektedir. Bununla birlikte son on yılda ortaya çıkmış tedavide önemli etkileri olabilecek birçok ipucu insan ve hayvan çalışmalarından ortaya çıkmıştır.

Mahesh ve Greenblatt (Mahesh, V.B. 1962), ilk kez dehidroepiandrosteron (DHEA) 'yi PKOS'lu kadınların yumurtalıklarından izole ettiler. Bundan sonra Roy, S. ve ark. 1962'de PKOS çalışmaları için DHEA enjekte ederek bir hayvan modeli oluşturdular. Daha sonraki çalışmalar, DHEA-PKOS kemirgen modelinin, hiperandrojenizm, insülin direnci, anormal folikül olgunlaşması ve anovulasyon gibi insandaki PKOS'un göze çarpan özelliklerinin çoğunu taklit edebildiğini

gösterilmiştir (Motta, A.B. 2010). Bu çalışmada da deney modeli olarak PKOS fare modelini kullanılarak, PİWİ-piRNA yolağındaki PİWİL1 ve TDRD9'un etki mekanizması çalışıldı.

Çalışmamızda her gruptaki bireylerden hergün vajinal smear alınmış ve incelenmiştir. Kontrol grubu ve Sham grubu vajinal smear bulguları benzerlik göstermekte ve menstrual sikluslarının düzenli olduğu görülmektedir. Ancak PKOS grubuna ait bireylerin tamamında menstrual sikluslarında düzensizlik belirlenmiş ve diğer gruplara göre siklus evrelerinde bulunan hücre yoğunlukları azaldığı görülmüştür. Bu durum bize intraperitoneal olarak uygulanan DHEA ile over gelişiminin etkilendiğini ve bununda vajinal smear bulgularındaki hücre yoğunluğuna yansıdığını düşündürmektedir.

Deneyel olarak oluşturduğumuz PKOS fare modelinde morfolojik değerlendirmemizde kontrol grubuna göre ovaryumlarda korpus luteum yapısının olmadığı belirlenirken, primer folikül, sekonder folikül, antral folikül ve kistik foliküllerin sayısında bir artış tespit ettik. Bu bulgular daha önce yapılan PKOS hayvan modeli çalışmaları ile paralellik gösteriyordu (Okutsu, Y. et al. 2010; Motta, A.B. 2010). Çalışmamızda, PKOS'lu gruba ait ovaryum dokusunda foliküllerin kistik yapılara dönüşümü sırasında oositlerini kaybettiklerini saptadık. PKOS'lu hastalarda LH hormonunun fazla salgılanması folikül stimüle edici hormonun (FSH) işlevini baskılar ve bu da granüloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi bozarak foliküllerin olgunlaşmadan dejenere olmasına ve oluşan antral foliküllerinde küçük kalmasına neden olur (Franks, S.J. et al. 2008). Ayrıca gelişen foliküllerdeki bazı oositlerin dejenerasyona uğradığını belirledik. Preovulator foliküllerden oositin çıkarılması kendiliğinden granüloza hücrelerinin luteinizasyonu ile sonuçlanır ve oositten salınan Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) mural granüloza hücre luteinizasyonunu önler. Androjen reseptörleri oosit üzerinde bulunur. Fazla androjen, granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu stimüle ederek oosit ile granüloza hücreleri arasındaki iletişimin kaybına neden olur ve oosite direk etki ederek oosit dejenerasyonuna neden olur (Okutsu, Y. et al. 2010). Sonuç olarak bizim çalışmamızda da DHEA uygulamasının ovaryumda kistik foliküllerin oluşmasına ve folikülogenez mekanizmasının bozulmasına neden olduğu görüldü.

piRNA'lar (piwi-interacting RNA) germ hücrelerinin genom bütünlüğünü sağlamada rol alan önemli RNA molekülleridir. İlk olarak, birbirinden bağımsız çalışmalarda fare testis ve *Drosophila* germ hücrelerinde tespit edilen piRNA'lar embriyonik gelişim, transpozon transkripsiyonunun baskılanması, germ hücre bütünlüğünün sağlanması ve heterokromatin oluşumunda oldukça etkili moleküler araçlardır. Bu RNA molekülleri 5' uçta urasil ile başlayan (yaklaşık %86'sında) 26-33 nükleotit uzunluğunda kısa kodlanmayan tek zincirli RNA'ların yeni bir sınıfıdır. piRNA'lar çok hücreli organizmalarda kodlanan ve kodlanmayan RNA'ların tüm tipleri arasında çoğunlukla germ hücrelerinde olmak üzere yüzbinlerce türü ile en fazla sayıda bulunan RNA molekülleridir.

piRNA'lar ARGONAUTE (AGO)/PIWI ailesi proteinlerinin PIWI alt ailesine spesifik olarak bağlanırlar. piRNA'lar ve PIWI proteinleri, germ hücrelerinin genom bütünlüğünü koruma çabalarının merkezinde yer alırlar (Nishida, K.M. et al. 2009; Haase, A.D. et al. 2010; Moyano, M. ve Stefani, G. 2015).

PIWI-piRNA kompleksinin en iyi ortaya konan biyolojik rolleri transpozon mobilizasyonunun inhibisyonudur. piRNA'lar bu işlevini hem heterokromatin oluşumunun düzenlenmesi yoluyla transkripsiyonel hem de transpozon transkriptlerinin degradasyonunu sağlayarak post-transkripsiyonel seviyede gerçekleştirirler. Transpozonlar bir hücrenin genomunda farklı yerlere, transpozisyon olarak adlandırılan bir süreçle hareket edebilen DNA dizileridir. Transpozon mobilizasyonu ile potansiyel zararlı mutasyonlar, delesyonlar ve genomdaki DNA miktarında değişiklikler meydana gelebilir (Han, B.W. ve Zamore, P.D. 2014). Dolayısıyla gametogenez sırasında ve germ hücrelerinde de transpozonların susturulması hayati öneme sahiptir. PIWI-piRNA kompleksleri sadece transpozon susturulmasında rol almakla kalmaz aynı zamanda çeşitli mekanizmalarla hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel seviyede hedef genlerin ekspresyonunu düzenleme kapasitesine de sahiptirler. Sitoplazmada PIWI-piRNA kompleksleri protein kodlayan genleri ve transpozon transkriptlerini dizi komplementerliğine göre keserler ve böylece post-transkripsiyonel seviyede gen ekspresyonunun düzenlenmesine aracılık ederler (Han, B.W. ve Zamore P.D. 2014; Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

PİWİ proteinlerinin germ hücre gelişimdeki işlevleri diğer organizmalarda da korunmuş olarak mevcuttur. Örneğin farede spermatogenez sırasında eksprese edildiği gösterilen Miwi (PİWİL1, Piwi-like gene 1), Mili (PİWİL2) ve Miwi2 (PİWİL4) olmak üzere 3 adet murin PİWİ proteini bulunur (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

Memeli oositlerinde PİWİL1'in varlığı yakın zamanlarda araştırılmış ve dokuya özgü izoformlarının varlığı henüz tespit edilememiştir. PİWİL1'in oosit ve erken embriyo gelişimi sırasındaki ekspresyonlarına bakılmış ve oosit maturasyonu sırasında stabil bir ekspresyonu varken, embriyo gelişimi sırasında iki hücreli aşamada ekspresyon pik yapmış ve blastosist aşamasına doğru ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı izlenmiştir (Russell, S.J. et al. 2016).

PİWİL1 ovaryum dışında başka dokularda da ekspresyonuna bakılmıştır. Kolorektal kanserli hastalarda PİWİL1'in ekspresyonuna bakılmıştır. Kolorektal kanserli hastaların PİWİL1 ekspresyonu ile klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişki analiz edilmiş. Kanserli dokudaki PİWİL1 ekspresyonu yakın dokulardakinden açıkça daha yüksek bulunmuştur. PİWİL1'in ekspresyonu tümör farklılaşma derecesi, infiltrasyon derinliği, lenfovasküler invazyon ve lenf nodu metastazı ile yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür. Yüksek PİWİL1 ekspresyonu görülen kolorektal kanserli hasta grubunun hayatta kalma süreleri, düşük PİWİL1 ekspresyonu görülen kolorektal kanserli hasta grubundan belirgin şekilde düşük olduğu görülmüştür. Yüksek PİWİL1 ekspresyonunun kolorektal kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğu görülmüş ve PİWİL1'in kolorektal kanser hastalarının prognozunu öngörmeye önemli bir moleküler belirteç olabileceğini göstermişlerdir (Sun, R. et al. 2017).

Biz de çalışmamızda PİWİL1 proteininin PKOS üzerine bir etkisinin olup olmadığını inceledik. İmmünohistokimya ve immunofloresan boyama bulgularımızda PİWİL1 proteini foliküler gelişimin erken evrelerinden itibaren primordiyal folikül aşamasından başlayarak, primer, sekonder, antral ve tersiyer foliküllerdeki oosit sitoplazmasında ekspresyonunun olduğunu saptadık. RT-PCR bulgularımızda topladığımız oositlerin total RNA'sında PİWİL1 mRNA ekspresyonunun olduğu belirlendi. Kontrol grubu GV aşamasındaki oositler

kıyasladığımızda, kontrol grubu M2 aşamasındaki oositte ve PKOS grubu M2 aşamasındaki oositte PİWİL1'in mRNA ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı, ayrıca PKOS grubu GV oositte PİWİL1 ekspresyonunun arttığı fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Kumulus hücrelerinde PİWİL1'in ekspresyonunun olmadığı belirlendi. Daha önce yapılan bir çalışmada yetişkin fare ovaryumunda PİWİL1 ekspresyonu saptanamamış, fakat bazı genlerin transkripsiyonunun oogenezin farklı evrelerinde başladığı varsayılırsa ve oositin ovaryumdaki hücre yoğunluğunun küçük bir kısmını oluşturduğu göz önüne alınırsa ovaryum total RNA'sında PİWİL1 mRNA'sı tespit edilemeyecek kadar azdır. Daha sonra yaptıkları başka bir çalışmada oosit ve granüloza hücrelerinde RT-PCR ile PİWİL1 mRNA ekspresyonunu incelemişler ve bizim çalışmamızla benzer sonuçlar tespit edilmiştir oositte PİWİL1'in mRNA ekspresyonu varken, granüloza hücrelerinde ekspresyon bulunmamıştır (Ding, X. et al. 2013; Kabayama, Y. et al. 2017). Bu sonuçlar bizim bulgularımızı da doğrulamaktadır. PİWİL1, traspozonları baskılayarak gametogenez sırasında DNA bütünlüğünü muhafaza etmektedir. Çalışmamızda PKOS grubunun PİWİL1 ekspresyonunu kontrol grubuyla karşılaştırdığımızda, immünohistokimya ve immunofloresan boyama yöntemlerinde kontrol grubuna benzer protein ekspresyonu gözlenmektedir. Primordiyal foliküldeki oosit sitoplazmasında daha zayıf bir ekspresyon gözlenirken, primer folikül, sekonder folikül, antral ve tersiyer foliküldeki oosit sitoplazmasında daha güçlü ekspresyon izlenmektedir.

Bir çalışmada, östrojen uygulamasının erkek testisinde Miwi ve Mili'nin ekspresyonunu azalttığı sonucuna varılmıştır (Pan, Y. et al. 2012). Çalışmamızda PKOS'da bozulan hormonal mekanizmasının PİWİL1'in ekspresyonuna belirgin bir etkisinin olmadığını gözlemledik.

Bu durum bize PİWİL1'in ekspresyonunun PKOS'da korunduğunu ayrıca PİWİL1'in genom bütünlüğünü sağlaması, traspozonların susturulması ve bazı hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemedeki işlevi göz önünde bulundurulduğunda oosit maturasyonu ve folikülogenez için ekspresyonunun önemli olduğunu düşündürmektedir.

PİWİ proteinlerinin piRNA biyogenezi ve işlevindeki önemi kadar bu proteinlerle etkileşime giren bazı proteinlerin de piRNA' ların oluşumu ve etkileri üzerinde önemli rollere sahip oldukları bilinmektedir. PİWİ proteinlerinin etkileşime girdiği proteinler arasında Tudor-domaini-içeren proteinler (Tudor domain-ilişkili proteinler olarak da bilinirler, TDRD) yoğun bir şekilde araştırmalara konu olan PİWİ etkileşim partnerleri arasındadır (Boswell, R.E. ve Mahowald, A.P. 1985; Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014). TUDOR ailesi üyelerinin protein-protein/RNA etkileşim ağlarına katıldıkları, RNA metabolizması, splisozom oluşumu, histon modifikasyonu, piRNA biyogenezi ve germ hücre gelişiminde rol aldıkları bildirilmektedir (Brahms, H.L.et al. 2001; Pek, J.W. et al. 2012). Farede Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd8, Tdrd9, Tdrd10, SND1/Tdrd11, Tdrd12 ve SetDB1' gibi birçok Tudor ailesi üyesi bulunmaktadır ve bunların germ hücrelerinde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Ku, H.Y. and Lin, H. 2014). Bunlar arasından Tdrd1, Tdrd2, Tdrd4, Tdrd5, Tdrd6, Tdrd7, Tdrd9 ve Tdrd12' nin PİWİ işlevleri için gerekli olduğu, spermatogenez ve piRNA yolağında rol aldıkları gösterilmiştir (Ku, H.Y. ve Lin, H. 2014).

Yapılan bir çalışma; fertilitiyi sağlamak için erkek germ hattındaki line-1 retrotranspozonunun susturulmasıyla ilişkili olduğu bilinen TDRD9 geninin önemini ortaya koyan ilk çalışmadır. Bu aynı zamanda insanlarda erkek fertilitesine TDRD protein ailesinin bir üyesinin katıldığı ilk rapordur. TDRD9 germ hücrelerinde DNA stabilitesinin korunmasında işlev görür (Arafat, M. et al. 2017).

Yapılan başka bir çalışmadan elde edilen sonuçlarda MVH, MILI, TDRD9 ve GASZ proteinlerinin, doğumdan hemen sonra primordiyal foliküllerde oosit sitoplazmasında belirgin bir şekilde, kısa süreli agrega olarak (kümeleşerek) bulunduğu sonucuna varmaktadır (Lim, A.K. et al. 2013).

Biz de kendi çalışmamızda TDRD9'un kontrol grubu ovaryumunda foliküler gelişimin erken aşaması olan primordiyal folikülde oosit sitoplazmasında eksprese olduğunu saptadık. Bu sonuç daha önce yapılan bir çalışmayla paralellik göstermektedir. RT-PCR bulgularımızda, hem kontrol grubu hem de PKOS grubunda GV ve M2 aşamasındaki oositte ve kumulus hücrelerinde TDRD9'un

anlamli bir mRNA ekspresyonunun olmadigini belirledik. İmmünohistokimyasal boyamada TDRD9 proteininin sadece primordiyal folikül oosit sitoplazmasında ekspresyonu görüldü. PKOS grubunda ise primordiyal folikül oosit sitoplazmasında TDRD9'un ekspresyonunun olmadigini belirledik. Bu durum bize, primordiyal folikül aşamasında TDRD9'un ekspresyonu erken gelişim aşamasında oositteki retrotraspozonların susturulup, bazı hedef genlerin ekspresyonunu düzenlediğini ve böylece folikülogenezin sağlıklı devam ettiğini düşündürmektedir. Fakat PKOS'da primordiyal folikül aşamasında TDRD9 ekspresyonunun olmaması bozulan hormonal mekanizmadan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. PKOS'da TDRD9'un ekspresyonunun olmaması oosit maturasyonun erken aşamasında transpozon aktivasyonunun baskılanamayıp, oositlerde genom bütünlüğünün sağlanmadığını ve PKOS hastalarındaki kalitesiz oosit ve bozulmuş folikülogeneze neden olabileceğini düşündürmektedir.

6. SONUÇLAR

Deneysel olarak oluşturduğumuz PKOS fare modelinde, ovaryumda piRNA sinyal yolağındaki PİWİL1 ve TDRD9 proteinlerinin hücresel işlevlerinin anlaşılmasına yönelik elde ettiğimiz bilgileri sıralayacak olursak;

1) Farede oluşturduğumuz PKOS deney modelini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gelişmekte olan foliküller ve ovule olamayıp kistik yapılar halinde kalan foliküller, atreziye uğramış foliküller PKOS deney grubunda daha fazlaydı. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla korpus luteum yapısı bulunmamaktaydı.

2) PKOS grubu ve kontrol grubundan alınan ovaryum örneklerine uygulanan immünohistokimya ve immünofloresan analizleri sonucunda, PİWİL1 proteini kontrol grubunda folikülogenezin her aşamasında, primordiyal folikül aşamasında daha zayıf bir ekspresyonla başlayarak primer folikül, sekonder folikül, antral folikül ve tersiyer folikül aşamasındaki oosit sitoplazmasında eksprese olduğu belirlendi. PKOS grubunda da kontrol grubundaki gibi bir ekspresyon belirlendi. Sadece immünofloresan boyama analizinde kontrol grubu ve PKOS grubunda ovaryum epitelinde zayıf bir PİWİL1 ekspresyonu görüldü. TDRD9 proteininin ise kontrol grubunda immünohistokimyasal analiz sonucunda, ovaryumda primordiyal folikülün oosit sitoplazmasında ve kan damarlarında ekspresyonu belirlendi. PKOS grubunda ise TDRD9'un primordiyal foliküldeki oosit sitoplazmasında ekspresyonunun olmadığı belirlendi.

3) RT-PCR analizi sonucunda, kontrol grubu ve PKOS grubundan toplanılan GV oosit, M2 oosit ve kumulus hücrelerinde PİWİL1 ve TDRD9 geninin ifade düzeyleri karşılaştırıldı. PİWİL1 geni ifade düzeylerinde, kontrol grup (kontrol grubu GV oosit) temel alınarak yapılan kıyaslamada, grup1 (kontrol grubu M2 oosit) ve grup3 (PKOS grubu M2 oosit)'te PİWİL1 ekspresyonunda anlamlı bir azalma belirlendi. Ayrıca grup2 (PKOS grubu GV oosit)'de PİWİL1 ekspresyonundaki artmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. TDRD9 gen ifadesinin ise GV oosit , M2 oosit ve kümülüs hücresinde istatistiksel olarak anlamlı bir ekspresyonunun olmadığı belirlendi.

4) Sonuç olarak bu çalışmada; Polikistik over sendromu (PKOS) ile MİWİ (PİWİL1) ve TDRD9'un ekspresyonları arasındaki ilişki incelenmiştir. Literatürde PKOS'da MİWİ (PİWİL1) ve TDRD9 genlerinin ekspresyonuyla ilgili

herhangi bir çalışma bulunmadığından elde ettiğimiz sonuçları karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Germ hücrelerinde genom bütünlüğünün sağlanması, DNA stabilitesinin korunması, retrotranspozonların aktivasyonu sonucu oluşan genetik istikrarsızlığın baskılanması ve bazı hedef genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesi gibi TDRD9 ve MİWİ (PIWİL1)'in olası işlevleri düşünüldüğünde ekspresyonlarının folikülogenez ve oosit maturasyonu için önemli olabileceği sonucuna varılmıştır.



7. KAYNAKLAR

- Arafat, M., I. Har-Vardi, A. Harlev, E. Levitas, A. Zeadna, M. Abofoul-Azab, V. Dyomin, V. C. Sheffield, E. Lunenfeld, M. Huleihel and R. Parvari (2017). "Mutation in TDRD9 causes non-obstructive azoospermia in infertile men." *J Med Genet*, **0**:1-7.
- Ashe, A., A. Sapetschnig, E. M. Weick, J. Mitchell, M. P. Bagijn, A. C. Cording, A. L. Doebley, L. D. Goldstein, N. J. Lehrbach, J. Le Pen, G. Pintacuda, A. Sakaguchi, P. Sarkies, S. Ahmed and E. A. Miska (2012). "piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*." *Cell* **150**(1): 88-99.
- Bonnet, A., C. Cabau, O. Bouchez, J. Sarry, N. Marsaud, S. Foissac, F. Woloszyn, P. Mulsant and B. Mandon-Pepin (2013). "An overview of gene expression dynamics during early ovarian folliculogenesis: specificity of follicular compartments and bi-directional dialog." *BMC Genomics* **14**: 904.
- Boswell, R. E. and A. P. Mahowald (1985). "tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*." *Cell* **43**(1): 97-104.
- Brahms, H., L. Meheus, V. de Brabandere, U. Fischer and R. Luhrmann (2001). "Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein." *RNA* **7**(11): 1531-1542.
- Carmell, M. A., A. Girard, H. J. van de Kant, D. Bourc'his, T. H. Bestor, D. G. de Rooij and G. J. Hannon (2007). "MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline." *Dev Cell* **12**(4): 503-514.
- Cox, D. N., A. Chao, J. Baker, L. Chang, D. Qiao and H. Lin (1998). "A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal." *Genes Dev* **12**(23): 3715-3727.

- Cox, D. N., A. Chao and H. Lin (2000). "piwi encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells." *Development* **127**(3): 503-514.
- Çelik, Ö., (2011).Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Adana, Nobel Kitabevi, s:37.
- Çimen, M., (2014). Anatomi. Sivas, Öz Emek Matbaa, s:209.
- Delilbaş, L., (2008). In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. İstanbul. Güneş Tıp Kitabevi.
- Ding, X., H. Guan and H. Li (2013). "Characterization of a piRNA binding protein Miwi in mouse oocytes." *Theriogenology* **79**(4): 610-615.
- Dumesic, D. A., V. Padmanabhan and D. H. Abbott (2008). "Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence." *Obstet Gynecol Surv* **63**(1): 39-48.
- Dumesic, D. A. and J. S. Richards (2013). "Ontogeny of the ovary in polycystic ovary syndrome." *Fertil Steril* **100** (1): 23-38.
- Eroschenko, Victor P., Çeviri Editörü; Demir, R.,(2013). diFIORE' nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle. Ankara, Onikinci Baskı, Palme Yayıncılık, s: 505-508.
- Fauser, B. C., B. C. Tarlatzis, R. W. Rebar, R. S. Legro, A. H. Balen, R. Lobo, E. Carmina, J. Chang, B. O. Yildiz, J. S. Laven, J. Boivin, F. Petraglia, C. N. Wijeyeratne, R. J. Norman, A. Dunaif, S. Franks, R. A. Wild, D. Dumesic and K. Barnhart (2012). "Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): the Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group." *Fertil Steril* **97** (1): 28-38.
- Franks, S., J. Stark and K. Hardy (2008). "Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome." *Hum Reprod Update* **14** (4): 367-378.

- Gleicher, N., A. Weghofer and D. H. Barad (2011). "The role of androgens in follicle maturation and ovulation induction: friend or foe of infertility treatment?" *Reprod Biol Endocrinol* **9**: 116.
- Grivna, S. T., B. Pyhtila and H. Lin (2006). "MIWI associates with translational machinery and PIWI-interacting RNAs (piRNAs) in regulating spermatogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(36): 13415-13420.
- Gunawardane, L. S., K. Saito, K. M. Nishida, K. Miyoshi, Y. Kawamura, T. Nagami, H. Siomi and M. C. Siomi (2007). "A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*." *Science* **315**(5818): 1587-1590.
- Haase, A. D., S. Fenoglio, F. Muerdter, P. M. Guzzardo, B. Czech, D. J. Pappin, C. Chen, A. Gordon and G. J. Hannon (2010). "Probing the initiation and effector phases of the somatic piRNA pathway in *Drosophila*." *Genes Dev* **24**(22): 2499-2504.
- Han, B. W. and P. D. Zamore (2014). "piRNAs." *Curr Biol* **24**(16): R730-733.
- Hartshorne, G. M., S. Lyrahou, H. Hamoda, E. Oloto and F. Ghafari (2009). "Oogenesis and cell death in human prenatal ovaries: what are the criteria for oocyte selection?" *Mol Hum Reprod* **15**(12): 805-819.
- Huang, X. A., H. Yin, S. Sweeney, D. Raha, M. Snyder and H. Lin (2013). "A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs." *Dev Cell* **24**(5): 502-516.
- Jonard, S., Y. Robert, C. Cortet-Rudelli, P. Pigny, C. Decanter and D. Dewailly (2003). "Ultrasound examination of polycystic ovaries: is it worth counting the follicles?" *Hum Reprod* **18** (3): 598-603.
- Juliano, C., J. Wang and H. Lin (2011). "Uniting germline and stem cells: the function of Piwi proteins and the piRNA pathway in diverse organisms." *Annu Rev Genet* **45**: 447-469.
- Kabayama, Y., H. Toh, A. Katanaya, T. Sakurai, S. Chuma, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Saga, T. Nakano and H. Sasaki (2017). "Roles of MIWI,

- MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes." *Nucleic Acids Res* **45**(9): 5387-5398.
- Kang, H. J., M. J. Moon, H. Y. Lee and S. W. Han (2014). "Testosterone alters testis function through regulation of piRNA expression in rats." *Mol Biol Rep* **41**(10): 6729-6735.
- Klattenhoff, C., D. P. Bratu, N. McGinnis-Schultz, B. S. Koppetsch, H. A. Cook and W. E. Theurkauf (2007). "Drosophila rasiRNA pathway mutations disrupt embryonic axis specification through activation of an ATR/Chk2 DNA damage response." *Dev Cell* **12**(1): 45-55.
- Ku, H. Y. and H. Lin (2014). "PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression." *Natl Sci Rev* **1**(2): 205-218.
- Lakhani, K., A. M. Seifalian, W. U. Atiomo and P. Hardiman (2002). "Polycystic ovaries." *Br J Radiol* **75**(889): 9-16.
- Larsen, W. J. (1997). *Human Embryology*. 2nd. Ed., New York. Churchill Livingstone Inc. s:1-21.
- Lei, L., S. Jin, K. E. Mayo and T. K. Woodruff (2010). "The interactions between the stimulatory effect of follicle-stimulating hormone and the inhibitory effect of estrogen on mouse primordial folliculogenesis." *Biol Reprod* **82**(1): 13-22.
- Li, C., V. V. Vagin, S. Lee, J. Xu, S. Ma, H. Xi, H. Seitz, M. D. Horwich, M. Syrzycka, B. M. Honda, E. L. Kittler, M. L. Zapp, C. Klattenhoff, N. Schulz, W. E. Theurkauf, Z. Weng and P. D. Zamore (2009). "Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies." *Cell* **137**(3): 509-521.
- Lim, A. K., C. Lorthongpanich, T. G. Chew, C. W. Tan, Y. T. Shue, S. Balu, N. Gounko, S. Kuramochi-Miyagawa, M. M. Matzuk, S. Chuma, D. M. Messerschmidt, D. Solter and B. B. Knowles (2013). "The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles." *Development* **140**(18): 3819-3825.

- Lin, H. and A. C. Spradling (1997). "A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary." *Development* **124**(12): 2463-2476.
- Mahesh, V.B., Greenblatt, R.B. (1962) Isolation of dehydroepiandrosterone and 17-hydroxy-pregnenolone from polycystic ovaries of the Stein–Leventhal syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (**22**) 441–448.
- Mallappa, A., N. Sinaii, P. Kumar, M. J. Whitaker, L. A. Daley, D. Digweed, D. J. Eckland, C. Van Ryzin, L. K. Nieman, W. Arlt, R. J. Ross and D. P. Merke (2015). "A phase 2 study of Chronocort, a modified-release formulation of hydrocortisone, in the treatment of adults with classic congenital adrenal hyperplasia." *J Clin Endocrinol Metab* **100**(3): 1137-1145.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N. (2009). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. İkinci Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 15-39.*
- Motta, A. B. (2010). "Dehydroepiandrosterone to induce murine models for the study of polycystic ovary syndrome." *J Steroid Biochem Mol Biol* **119**(3-5): 105-111.
- Motta, P. M., S. Makabe and S. A. Nottola (1997). "The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary." *Hum Reprod Update* **3**(3): 281-295.
- Moyano, M. and G. Stefani (2015). "piRNA involvement in genome stability and human cancer." *J Hematol Oncol* **8**: 38.
- Nishida, K. M., T. N. Okada, T. Kawamura, T. Mituyama, Y. Kawamura, S. Inagaki, H. Huang, D. Chen, T. Kodama, H. Siomi and M. C. Siomi (2009). "Functional involvement of Tudor and dPRMT5 in the piRNA processing pathway in *Drosophila* germlines." *EMBO J* **28**(24): 3820-3831.
- Oktem, O. and K. Oktay (2008). "The ovary: anatomy and function throughout human life." *Ann N Y Acad Sci* **1127**: 1-9.

- Oktem, O. and B. Urman (2010). "Understanding follicle growth in vivo." *Hum Reprod* **25**(12): 2944-2954.
- Okutsu, Y., M. T. Itoh, N. Takahashi and B. Ishizuka (2010). "Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary." *Fertil Steril* **93**(3): 927-935.
- Pal-Bhadra, M., B. A. Leibovitch, S. G. Gandhi, M. R. Chikka, U. Bhadra, J. A. Birchler and S. C. Elgin (2004). "Heterochromatic silencing and HP1 localization in *Drosophila* are dependent on the RNAi machinery." *Science* **303**(5658): 669-672.
- Pan, Y., M. Hu, H. Liang, J. J. Wang and L. J. Tang (2012). "The expression of the PIWI family members miwi and mili in mice testis is negatively affected by estrogen." *Cell Tissue Res* **350**(1): 177-181.
- Pek, J. W., A. Anand and T. Kai (2012). "Tudor domain proteins in development." *Development* **139**(13): 2255-2266.
- Qiao, J. and H. L. Feng (2011). "Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence." *Hum Reprod Update* **17**(1): 17-33.
- Rajasethupathy, P., I. Antonov, R. Sheridan, S. Frey, C. Sander, T. Tuschl and E. R. Kandel (2012). "A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity." *Cell* **149**(3): 693-707.
- Ross, R. J., M. M. Weiner and H. Lin (2014). "PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma." *Nature* **505**(7483): 353-359.
- Rouget, C., C. Papin, A. Boureux, A. C. Meunier, B. Franco, N. Robine, E. C. Lai, A. Pelisson and M. Simonelig (2010). "Maternal mRNA deadenylation and decay by the piRNA pathway in the early *Drosophila* embryo." *Nature* **467**(7319): 1128-1132.
- Roy, S., Mahesh, V.B. Greenblatt, R.B. (1962) Effect of dehydroepiandrosterone and androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary, *Nature* **196**: 2-6.

- Russell, S. J., L. Stalker, G. Gilchrist, A. Backx, G. Molledo, R. A. Foster and J. LaMarre (2016). "Identification of PIWIL1 Isoforms and Their Expression in Bovine Testes, Oocytes, and Early Embryos." *Biol Reprod* **94**(4): 75.
- Sander, V. A., M. B. Hapon, L. Sicaro, E. P. Lombardi, G. A. Jahn and A. B. Motta (2011). "Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome." *J Steroid Biochem Mol Biol* **124**(1-2): 58-64.
- Sun, R., Gao, C. L., Li, D. H., Li, B. J., & Ding, Y. H. (2017). Expression Status of PIWIL1 as a Prognostic Marker of Colorectal Cancer. *Disease Markers*: 7.
- Thomson, T. and H. Lin (2009). "The biogenesis and function of PIWI proteins and piRNAs: progress and prospect." *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 355-376.
- Trombly, D. J., T. K. Woodruff and K. E. Mayo (2009). "Roles for transforming growth factor beta superfamily proteins in early folliculogenesis." *Semin Reprod Med* **27**(1): 14-23.
- Unhavaithaya, Y., Y. Hao, E. Beyret, H. Yin, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano and H. Lin (2009). "MILI, a PIWI-interacting RNA-binding protein, is required for germ line stem cell self-renewal and appears to positively regulate translation." *J Biol Chem* **284**(10): 6507-6519.
- Uzumcu, M. and R. Zachow (2007). "Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function." *Reprod Toxicol* **23**(3): 337-352.
- Vagin, V. V., M. S. Klenov, A. I. Kalmykova, A. D. Stolyarenko, R. N. Kotelnikov and V. A. Gvozdev (2004). "The RNA interference proteins and vasa locus are involved in the silencing of retrotransposons in the female germline of *Drosophila melanogaster*." *RNA Biol* **1**(1): 54-58.
- Vagin, V. V., A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev and P. D. Zamore (2006). "A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline." *Science* **313**(5785): 320-324.

- Van der Spuy, Z. M. and S. J. Dyer (2004). "The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **18**(5): 755-771.
- Walters, K. A., C. M. Allan and D. J. Handelsman (2012). "Rodent models for human polycystic ovary syndrome." *Biol Reprod* **86**(5): 149, 141-112.
- Walters, K. A., L. J. Middleton, S. R. Joseph, R. Hazra, M. Jimenez, U. Simanainen, C. M. Allan and D. J. Handelsman (2012). "Targeted loss of androgen receptor signaling in murine granulosa cells of preantral and antral follicles causes female subfertility." *Biol Reprod* **87**(6): 151.
- Watanabe, T., S. Tomizawa, K. Mitsuya, Y. Totoki, Y. Yamamoto, S. Kuramochi-Miyagawa, N. Iida, Y. Hoki, P. J. Murphy, A. Toyoda, K. Gotoh, H. Hiura, T. Arima, A. Fujiyama, T. Sado, T. Shibata, T. Nakano, H. Lin, K. Ichianagi, P. D. Soloway and H. Sasaki (2011). "Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrf1* locus." *Science* **332**(6031): 848-852.
- Wood, J. R., D. A. Dumesic, D. H. Abbott and J. F. Strauss, 3rd (2007). "Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis." *J Clin Endocrinol Metab* **92**(2): 705-713.
- Yin, H. and H. Lin (2007). "An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*." *Nature* **450**(7167): 304-308.

8.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Özlem DELİBAŞ
DoğumYeri ve Tarihi	Lefkoşa/KKTC - 06.03.1989
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	ozlemdlbs392@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 2014.
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı, 2017.

İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Yüksek Lisans Öğrencisi, 2014 –

EK-1

ETİK KURUL KARARI

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Sayı : 65202830-050.04.04-63
Konu : Etik Kurul Kararı.

05.05.2016

Sayın
Prof..Dr H.Eray BULUT
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.05.2016 tarihinde Prof. Dr. Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Prof..Dr H.Eray BULUT' un yürüttüğü ve Proje Yardımcıları, Yrd.Doç.Dr.Erkan GÜMÜŞ Yüksek Lisans Öğrencisi Özlem DELİBAŞ 'ın yapmış olduğu 03.05.2016 tarih ve 68 sayılı "PIWI-piRNA Yolağında Rol Alan TDRD9 ve Miwi Proteinlerinin Polikistik Over Sendromu Oluşturulmuş Fare Modelinde İncelenmesi. " isimli Yüksek Lisans Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Katılmadı

Prof. Dr. Eray BULUT
Üye

Prof. Dr. Mustafa TLKAN
Üye

Prof. Dr. Zübeyda Akin POLAT
Üye

Prof. Dr. İnan HUBBEZOĞLU
Üye

Doç. Dr. Bülent SARAC
Üye

Doç. Dr. Mehmet TUZCU
Üye

Katılmadı
Doç. Dr. Gülay YILDIRIM
Üye

Yrd. Doç. Dr. Hakan İSİDAN
Üye

Uz. Vet. Hek. Yücel YALMAN
Üye – Başkanvekili

Özcan KARATAŞ
Sivil Üye

Katılmadı
Hilmi GÜL
Sivil Üye

Prof. Dr. Haki KARA
Başkan