

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PCOS)’NDA
mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN)
MEKANİZMASI

Aylin YABA

Doktora Tezi

Antalya, 2011

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

POLİKİSTİK OVER SENDROMU (PCOS)’NDA
mTOR (MAMMALIAN TARGET OF RAPAMYCIN)
MEKANİZMASI

Aylin YABA

Doktora Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Necdet DEMİR

Bu Çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No:2010.03.0122.004)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisanüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Yaba A, Kayisli UA, Johnson J, Demir R, Demir N. The abelson tyrosine kinase (c-Abl) expression on the mouse uterus and placenta during gestational period. J Mol Histol. 2011 Jan 20.
2. Yaba A, Bianchi V, Borini A, Johnson J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. Reprod Sci. 2008 Feb;15(2):128-38.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda,
Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. / / 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof . Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,

Üye : Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Münire ERMAN AKAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından
uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun / / 20011 tarih ve /
sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

PCOS yaygınlığı, farklı tanı kriterlerine göre değişmekle beraber, genel olarak doğurganlık çağında % 5-10 civarında izlenen, üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan reprodüktif endokrinopati olarak gösterilmiştir.

mTOR (The mammalian target of rapamycin), hücre içerisinde hücrenin büyümesi, çoğalması, metabolizma ve anjiyogenez gibi pekçok işlemde görev almaktadır. Yapılan son çalışmalarla mTOR yolağı ovaryum folliküllerinde de incelenmiş, granuloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasında görev aldığı belirlenmiştir.

Polikistik over sendromunda, foliküllerde yer alan granuloza hücreleri hızlı bir bölünme göstermektedir. Böylelikle foliküllerin ve dolayısıyla ovaryumun hacimsel bir artışı söz konusudur. PCOS olan hastaların overlerinde yüksek düzeyde granuloza ve teka hücresi proliferasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum bize; mTOR sinyal yolağının, PCOS'da granuloza ve teka hücrelerinin yüksek düzeydeki proliferasyonundan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmamızda, mTOR sinyal yollarından birinin ya da her ikisinin (TORC1 ve TORC2) PCOS mekanizmasında rol alabileceğini düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak, PCOS oluşturulan fare modelinde mTOR sinyal yolağının/yolaklarının etkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlıyoruz.

Çalışmamızda 25 günlük toplam 30 adet BalbC türü fare kullanılarak 3 grup oluşturuldu: İlk grup herhangi uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu (K) (n=10), ikinci grup PCOS grubu (P) (n=10) (6 mg/100g DHEA'nun 0.1 ml susam yağı içerisinde çözülerek günlük subkutan olarak verildiği grup), Üçüncü grup yalnızca çözücünün verildiği (sadece susam yağı verilen) (Ç) (n=10) grup. Çalışmamızda gruplar arasındaki morfolojik farkı ortaya koymak amacıyla hematoksilen-eozin boyaması yapıldı. Çoğalan granuloza hücrelerini göstermek amacıyla mTOR ve P-mTOR (serine 2448) antikorları ile çiftli immünohistokimya yöntemi uygulandı. mTORC1, mTORC2 kompleksleri ile P70S6K, P-P70S6K ve PKCalpha, P-PKCalpha antikorları için western blot ve RT-PCR yöntemleri uygulandı. Gruplar arasındaki östradiol ve progesteron seviyelerini karşılaştırmak amacıyla da ELISA tekniği kullanıldı. Tüm sonuçların istatistiksel analizleri Sigma Stat 3.0. Student t-testi kullanılarak yapıldı.

Çalışmamızda ilk defa PCOS fare modelinde mTORC1 ve mTORC2 kompleksleri ile bu komplekslerin ürünleri incelenmiştir. Sonuçlarımız PCOS fare modelinde mTORC1 ve mTORC2-aracılı sinyal yollarının aktivasyonunun PCOS'lu fare ovaryumunda önemli bir role sahip olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular her iki kompleksin de (TORC1 ve TORC2) PCOS'da artan granuloza ve teka hücre proliferasyonundan sorumlu olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak mTORC1 ve mTORC2 sinyal yollarının denetlenmesi; PCOS'un önemli bir semptomunu oluşturan ovaryal kistlerin oluşumunun engellenerek; folikül büyümesi ve oosit gelişimindeki sorunların çözülmesine ve anovulasyona bağlı kısırlık sorununa yaklaşımda, yeni stratejilerin geliştirilmesine katkıda bulunabilir.

Anahtar Kelimeler: mTOR, PCOS, fare, ovaryum

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is a common and complex endocrine disorder affecting 5-10% of women in reproductive age. It is characterized by hyperandrogenism, oligo- or anovulation and infertility. But the pathophysiology of PCOS still remains unknown.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a central component that regulates various processes including cell growth, proliferation, metabolism, and angiogenesis. mTOR signaling cascade has recently been examined in ovarian follicles where it regulates granulosa cell proliferation and differentiation. mTOR functions as two complexes, mTOR complex 1 and 2 (mTORC1 (mTOR, P-mTOR (Serine-2448), Raptor, GBetaL) and mTORC 2 (mTOR, P-mTOR (Serine-2481), Rictor, GBetaL)). mTORC1 phosphorylates p70S6 kinase (S6K1) and mTORC2 phosphorylates PKCalpha. We hypothesized that mTORC 1 and/or 2 may have role in proliferation of theca and granulosa cells in PCOS mouse model. In the present study, we sought to determine the mTOR signaling pathway in PCOS mouse ovary.

25 days old 30 BalbC female mice were used and designed 3 groups (n=10): Control (no treatment), PCOS (The injection of DHEA (6 mg/100g BW in 0.1 ml of sesame oil) (s.c) for 20 consecutive days), Vehicle (daily (s.c) sesame oil alone enjection). To show the morphological difference between PCOS and control mouse ovary, sections stained with haematoxylin and eosin for histological analysis of cyst formation. Mouse PCOS model were confirmed by ELISA technique. Serum samples from each animals before and after treatment were collected. Then we evaluated estradiol and progesterone levels. mTOR and P-mTOR (serine 2448) antibodies were used for immunohistochemistry showing proliferating ovarian follicular cells. We used mTORC1, mTORC2 and P70S6K, phospho- P70S6K and PKCalpha, phosphor-PKCalpha antibodies for western blott technique presenting mTOR signal protein complexes. PCNA were used as a proliferation marker. RT-PCR technique also used for present mTORC1 and mTORC2 mRNA levels. Statistical analyses were carried out using the Sigma Stat 3.0. Student *t*-test was used for comparisons between value of groups; *P* <0.05 was considered significant.

Here, we provide evidence for the first time mTORC1 and mTORC2 in PCOS mouse ovary. Our results showed that upregulating mTORC1 and mTORC2-mediated signaling may plays a crucial role in PCOS mouse ovary. All these findings provide an evidence that mTORC1 and mTORC2 affects increased ovarian follicular cell proliferation and growth in PCOS.

Consequently, these results suggest that the mTOR signaling pathways (mTORC1 and mTORC 2) may create new clinical strategies to optimize developmental competence of PCOS should target correction of the entire follicle growth, oocyte development process and anovulatory infertility in PCOS.

Keywords: mTOR, PCOS, mouse, ovary

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca yol göstericiliği ve tezimin gerçekleşmesi için göstermiş olduğu gerek maddi gerekse manevi desteği için sayın danışman hocam Prof. Dr. Necdet DEMİR'e,

Tez savunma sınavımda jüri üyeliği yapan sayın hocalarıma,

Çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her an yanımda oldukları için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Doktora tez çalışmam ile ilgili tüm emekleri için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalışanlarına,

Bu zorlu yolda gösterdiği anlayış, özveri ve desteği için, sevgili nişanlım Barış UÇAR'a,

Tüm eğitim yaşamım boyunca bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tüm imkânlar için sevgili ailemin tüm fertlerine, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

AYLİN YABA

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryumlar	3
2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi	3
2.1.2. Ovaryumun Anatomisi	4
2.1.3. Ovaryumun Histolojisi	5
2.1.4. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)	6
2.1.4.1. Primordiyal Folikül Seçilimi	
(Primordiyalden Primer Foliküle Geçiş)	7
2.1.4.2. Primer Folikül	8
2.1.4.3. Sekonder Folikül	9
2.1.4.4. Antral (Graaf) Folikül	9
2.1.4.5. Folikül Atrezisi	10
2.1.5. Ovulasyon	10
2.1.6. Oogenez	10
2.1.7. Korpus Luteum	11
2.2. Polikistik Over Sendromu (PCOS)'nun Tanımı	11
2.3. Polikistik Over Sendromu ve Oositin Gelişimsel	
Yeterliliği Üzerine Etkisi	15
2.4. PCOS ve Oosit Gelişimi	15
2.4.1. Ovaryum Dışından Kaynaklanan Faktörler	16
2.4.1.1. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)	17
2.4.1.2. Luteinleştirici Hormon (LH)	18
2.4.1.3. Hiperandrojenemi	18

2.4.1.4.	Hiperinsulinemi	19
2.4.2.	Ovaryum İçerisindeki Faktörler	20
2.4.2.1.	EGF (Epidermal Büyüme Faktörü)	20
2.4.2.2.	FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü)	21
2.4.2.3.	IGF (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü)	21
2.4.2.4.	NGF (Nörotropin Büyüme Faktörü)	21
2.4.2.4.	TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β)	22
2.4.2.6.	VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	22
2.4.2.7.	Sitokinler	22
2.5.	The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Ailesi	23
2.5.1.	mTOR'un Yapısı ve Aktivasyonu	24
2.5.2.	Subselüler Lokalizasyonu	25
2.5.3.	Ligandlar ve Diğer Proteinler ile İlişkileri	25
2.5.3.1.	mTORC1	25
2.5.3.2.	mTORC2	26
2.5.4.	Fenotipleri	26
2.5.5.	mTOR'un Rol Aldığı Görevler	27
2.5.5.1.	Translasyon	27
2.5.5.2.	Ribozom Biyogenezi	27
2.5.5.3.	Besin Taşınımı	28
2.5.5.4.	Otofaji	28
2.5.6.	mTOR'un Rapamisinle İnhibisyonu	29
2.6.	Hipotez	30
GEREÇ ve YÖNTEM		31
3.1.	PCOS Deney Modelinin Oluşturulması	31
3.2.	Ovaryum Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması	32
3.2.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	32
3.3.	Hematoksilen-Eozin Boyama ile Histolojik İnceleme	32
3.4.	mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) ile Çiftli İmmünohistokimya Yöntemi	30
3.5.	Western Blot Analizi	35
3.5.1.	Doku Ekstraktı Hazırlanması	36
3.6.	Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	39
3.7.	mRNA'nın Niceliğinin RT-PCR ile Ölçülmesi	39
3.7.1.	Total RNA İzolasyonu Basamakları	40
3.7.2.	İzole Edilen RNA Miktarının Ölçülmesi	40
3.7.3.	cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	40

3.7.4.	Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi	41
3.7.5.	%1,5'luk Agaroz Jelin Hazırlanması ve PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi	44
3.8.	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	44
3.8.1.	Deneklerden Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	45
3.8.2.	ELISA Yöntemi	45
3.9.	İstatistiksel Analiz	46
BULGULAR		47
4.1.	Hematoksilen-Eozin Boyama ile Grupların Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	47
4.2.	mTOR ve P-mTOR (Ser 2448) Çiftli İmmünohistokimya Yöntemi Bulguları	53
4.3.	Werstern Blot Analizi Bulguları	62
4.4.	Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi	65
4.5.	RT-PCR Bulguları	66
4.6.	ELISA Deneyinin Bulguları	66
TARTIŞMA		69
SONUÇLAR		75
KAYNAKLAR		76
ÖZGEÇMİŞ		93
EKLER		94
Ek 1.		
Ek 2.		

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PCOS	: Polikistik Over Sendromu
PCO	: Polikistik Over
mTOR	: The Mammalian Target of Rapamycin
P-mTOR	: Fosforile mTOR (Serin 2448)
TORC1	: TOR Kompleks 1
TORC2	: TOR Kompleks 2
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
LH	: Lüteinleştirici Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
DHEA	: Dihidroepiandrostenedion
DHEAS	: Dehidroepiandrosteron sülfat
E	: Embriyonal
BMP	: Kemik Morfojenik Protein
MIS	: Mülleriye İnhibe Edici Madde
GVBD	: Germinal Vezikül Yıkımı
MI	: Metafaz I
MII	: Metafaz II
NIH	: Ulusal Sağlık Enstitüsü
NICHHD	: Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü
CAH	: Konjenital Adrenal Hiperplazi
SHBG	: Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü-B
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
E2	: Östradiol
IVM	: İn vitro Maturasyon
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
IGF	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü
IGFBP	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein
IGF1R	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü Reseptör 1
IGF2R	: İnsüline Benzer Büyüme Faktörü Reseptör 2
NGF	: Nörotropin Büyüme Faktörü
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
KOK	: Kumulus-oosit Kompleksi

NGF	: Nörotropin Büyüme Faktörü
BDNF	: Beyinden Türevlenen Nörotropik Faktör
NT	: Nörotrofin
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
BMP-9	: Kemik Morfogenik Protein-9
GDF-9	: Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
IL	: İnterlökin
TNF-alfa	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
FRAP	: Rapamisin İlişkili Protein
RAPT1	: Rapamisin Hedef Protein
SEP	: Sirolimus Efektör Protein
PP2A	: Protein Fosfataz 2A
FAT	: FRAP-Ataksi-Telanjektizi
PI3K	: Fosfotidil İnoзит 3 Kinaz
PIKK	: PI3K İlişkili Kinaz
FRB	: Rapamisin Bağlayıcı Domeyin
PKCalpha	: Protein Kinaz C Alfa
P70S6K	: P70S6 kinaz
4E-BP1	: Ökaryotik Başlatıcı Faktör 4E-Bağlanma Proteinini 1
PDCD4	: Programlı Hücre Ölümü Protein 4
TOS	: TOR Sinyal Motifi
ATG1	: Otofaji Spesifik Gen 1
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
TBS	: Tris Tamponlu Tuz Solüsyonu
DAB	: 3,3' Diaminobenzidin
HRP	: Horse-Radish Peroksidaz
AP	: Alkalen fosfataz
DAPI	: 4,6-diamino-2-phenylindole
ELISA	: Enzim Aracılı İmmünosorbent Deneyi
PCNA	: Çoğalan Hücre Çekirdek Antijeni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
2.1.1.1.	Farede primordiyal folikülün gelişim süreci	3
2.1.2.1.	İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı	5
2.1.2.2.	Farede ovaryumların yerleşimi	5
2.1.3.1.	Ovaryumun histolojisi	6
2.1.4.1.	Foliküler gelişim (Folikülogenez)	7
2.1.4.1.1.	Primordiyal, primer ve sekonder foliküller görünümü	8
2.2.1.	PCOS'a sahip ovaryum ile normal ovaryum görüntüsünün karşılaştırılması	13
2.2.2.	Normal ve PCOS'lu ovaryumlarda LH ve FSH seviyeleri	13
2.4.1.1.1.	Normal ve PCOS'lu bir ovaryumdaki hormonal ilişkilerin karşılaştırılması	17
2.4.1.2.1.	Luteinleştirici hormonun teka hücresi aracılı androjen metabolizması kontrolü	18
2.5.1.	mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin karşılaştırılması	24
2.5.1.1.	mTOR'un yapısı	25
2.5.5.4.1.	mTOR'un ilişkide olduğu proteinler	29
4.1.1.	Kontrol grubu ovaryum örneğinin Hematoksilen-Eozin boyanması	48
4.1.2.	Kontrol grubu ovaryumda korpus luteum yapısı	49
4.1.3.	Çözgen verilen grupta ovaryum yapısı	50
4.1.4.	PCOS grubunda ovaryum yapısı	51
4.1.5.	PCOS grubundaki ovaryumda foliküler kist yapısı	52
4.1.6.	PCOS grubundan alınan ovaryum örneklerinde atretik folikül	52
4.1.7.	PCOS grubu ovaryumdan bir atretik folikül mikrografı	53
4.2.1.	Kontrol grubu ovaryumda çiftli immünohistokimya boyanması	55
4.2.2.	Kontrol grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) çiftli immünohistokimya boyanması	56
4.2.3.	Çözgen grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR	

	(Ser-2448) çiftli immünohistokimya boyanması	57
4.2.4.	PCOS grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR çiftli immünohistokimya boyanması	58
4.2.5.	mTOR ve P-mTOR çiftli immunohistokimya uygulanmış PCOS grubu ovaryumda antral folikül mikrografi	59
4.2.6.	mTOR ve P-mTOR çiftli boyaması yapılmış PCOS grubu ovaryumdan elde edilen tersiyer folikül	59
4.2.7.	PCOS grubu ovaryumdan alınan bir tersiyer folikülün mikrografi	60
4.2.8.	PCOS grubu ovaryumdan alınan bir multilaminar primer folikülün ve primordiyal folikülün mikrografi	61
4.2.9.	Kontrol grubu ovaryum örneğinde negatif kontrol boyanması	62
4.3.1.	mTORC1 ve mTORC2 proteinlerinin western blot bantları	63
4.3.2.	mTORC1 ve mTORC2 proteinlerinin western blot bantlarının istatistiksel değerlendirilmeleri	63
4.3.3.	LST8 (GβL) protein yoğunluğunun western bantları	64
4.3.4.	P70S6K ve P- P70S6K proteinlerinin western blot bantlarının analizi	64
4.3.5.	PKCalpha ve P-PKCalpha proteinlerinin western blot bantlarının analizi	65
4.4.1.	PCNA (SET8) proteininin western blot bantlarının analizi	65
4.5.1.	RT-PCR deneyinin sonuçları	66
4.6.1.	Östrojen için standart konsantrasyon eğrisi	67
4.6.2.	Gruplar arasında serum östrojen seviyelerinin karşılaştırılması	67
4.6.3.	Progesteron standart konsantrasyon eğrisi	68
4.6.4.	Gruplar arasında serum progesteron seviyelerinin karşılaştırılması	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No		Sayfa
2.2.1.	PCOS tanı kriterleri	12
3.1.1.	Deney modelinin oluşturulması	31
3.4.1.	Çiftli immünohistokimya deneyinde kullanılan antikorlar	34
3.5.1.1.	Western blot deneyinde kullanılan antikorlar	38
3.6.1.	Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılan primer antikor ve sekonder antikorlar	39
3.7.4.	cDNA eldesi için temel karışım	41
3.7.4.1.	PCR reaksiyonu için temel karışım	42
3.7.4.2.	PCR reaksiyonu için kullanılan primer çiftleri	43

GİRİŞ ve AMAÇ

Polikistik Over Sendromu (PCOS) ilk kez 1935'te Stein ve Leventhal tarafından amenore, obezite ve hirsutizm üçgeni olarak tanımlanmıştır. Ovariyan hiperandrojenizm olarak da adlandırılan bu sendromun yaygınlığı, farklı tanı kriterlerine göre değişmekle beraber, genel olarak doğurganlık çağında % 5-10 civarında izlenen, üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan reproduktif endokrinopati olarak gösterilmektedir.

Memeli ovaryumunda yer alan foliküller otokrin, parakrin ve jukstakrin sinyallerin tümünün birlikte çalıştığı bir mekanizmanın varlığında gelişim göstermektedirler. The mammalian target of rapamycin (mTOR), bir serin/tironin kinaz olup, hücre içerisinde çeşitli görevler üstlenmektedir. Genel olarak, beslenmenin bozulması ya da stress durumunda mTOR aktivitesinin ve hücrenin hacminin azaldığı, otofajinin indüklendiği gösterilmiştir.

mTOR hücre içerisinde iki farklı kompleks oluşturabilme ve farklı roller üstlenebilme yeteneğine sahiptir. Bu iki kompleks TORC1 (TOR Complex 1) ve TORC2 (TOR Complex 2) olarak adlandırılır. TORC1 kompleksi mTOR, Raptor ve GβL (LST8) moleküllerinden oluşurken; TORC2 kompleksi mTOR, Rictor (Rapamisin'e hassas olmayan mTOR komponenti), memeli stres aktive edici protein kinaz ilişkili protein 1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1) ve GβL (LST8) moleküllerinden oluşmaktadır.

Yapılan bir çalışmada mTOR'un Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)-aracılı olarak granuloza hücre proliferasyonunu artırdığı ve kültür ortamına FSH verilen granuloza hücrelerinde p70S6K kinaz fosforilasyonunun iki kat arttığı gösterilmiştir. Daha önce gerçekleştirdiğimiz bir çalışmamızda, normal fare folikül gelişiminde mTOR'un yeni bir mitotik yaşamsal kontrol noktası olarak rol aldığını göstermiştik. Çalışmamızda mTOR'un granuloza hücrelerinde sitoplazmik olarak ifade edildiği, serin-2448 fosforile formunun (P-mTOR) metafaz aşamasındaki granuloza hücrelerinde, mitotik iplikçiklerde ya da sitokinez esnasında bu bölgeye yakın olarak kasılma halkasında bulunduğunu göstermiştik. Rapamisin verilerek mTOR'un aktivasyonu engellendiğinde granuloza hücrelerinin çoğalmasının ve *in vitro*'da doza bağımlı olarak folikül

büyümesinin azaldığı tespit edilmişti. Böylelikle çalışma sonucunda stres ve beslenmeye bağlı bozuklukların ovaryumda folikül büyümesini doğrudan etkileyebileceği gösterilmişti.

Bilindiği üzere polikistik over sendromunda, foliküllerde yer alan granuloza hücreleri hızlı bir bölünme göstermektedir. Böylelikle foliküllerin ve dolayısıyla ovaryumun hacimsel bir artışı söz konusudur. Bu çalışmada, mTOR sinyal yollarından birinin ya da her ikisinin (TORC1 ve TORC2) PCOS mekanizmasında rol alabileceğini düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak, PCOS modeli oluşturulan farede mTOR sinyal yolağının/yolaklarının etkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlıyoruz.

Çalışmanın Hipotezi: PCOS olan hastaların overlerinde yüksek düzeyde granuloza ve teka hücresi proliferasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum bize; mTOR sinyal yolağının, PCOS'da granuloza ve teka hücrelerinin yüksek düzeydeki proliferasyonundan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir.

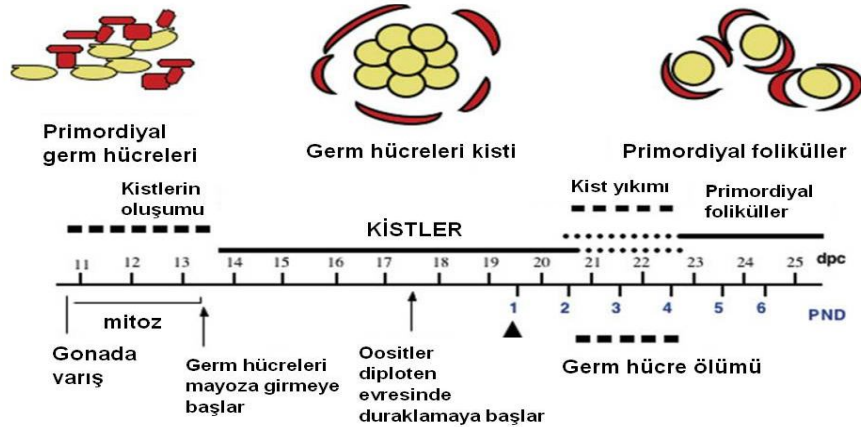
Hipotezimizi test etmek üzere; bu çalışmada immünohistokimya, western blot, RT-PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak, PCOS modeli oluşturulan farede ovaryum dokusunda mTORC1 ve mTORC2 ile P70S6K, fosfo-P70S6K, PKC α ve fosfo-PKC α moleküllerinin protein ve mRNA düzeyinde ekspresyonlarını göstermeyi amaçladık. Böylece farelerde oluşturulan PCOS deney modelinde etkili mTOR mekanizması ya da mekanizmalarını histolojik, immünohistokimyasal ve moleküler yöntemler kullanarak belirlenmeye çalıştık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumlar

2.1.1. Ovaryumun Embriyolojisi

Farede primordiyal germ hücreleri özelleşmeleri esnasında ekstraembriyonik ektodermdaki epiblast hücrelerinden köken alırlar. Primordiyal germ hücreleri embriyonal (E) 10.5. günde gonad yolunu aşarak ürogenital kabartı bölgesine ulaşırlar. Erken prenatal gelişim esnasında gonadlar ilk olarak ürogenital kabartı bölgesinden gelişir. Bu aşamada “bipotansiyel gonad” ya da “farklılaşmamış gonad” adını almaktadırlar. Bunun anlamı hem erkek gonad (testis) hem de dişi gonad (ovaryum) yönünde farklılaşabilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Farede primordiyal germ hücrelerinin ürogenital kabartıya göç etmesi ve orada kolonizasyona gitmelerine kadar olan süreçte gonadlar farklılaşmamıştır. Bu süreç prenatal hayatın 9,5-11,5 günleri arasında gerçekleşir. Dişi farelerde germ hücreleri önce çoğalırlar, ardından yaklaşık 13,5. günde mayoz bölünmeye girecek olan oositlere farklılırlar [1] (Şekil 2.1.1.1).



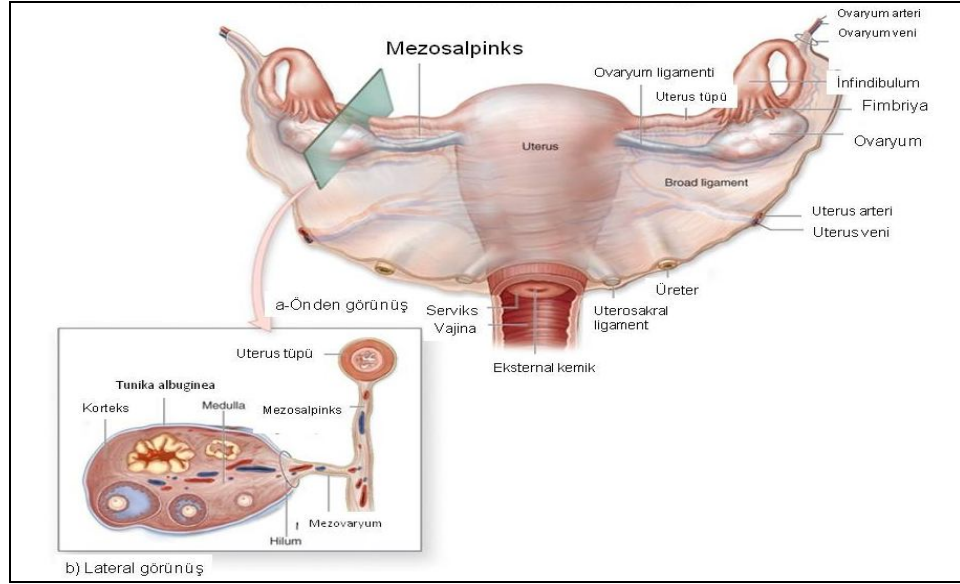
Şekil 2.1.1.1. Farede primordiyal germ hücrelerinden primordiyal folikülün gelişim süreci [2].

13,5. günde mitoza giren germ hücreleri yaklaşık 17.5. günde mayotik bölünmenin diploten evresine ulaşp beklemeye başlarlar. Oogonya mitotik olarak çoğalmaya başladığında, tamamlanmamış sitokinezin bir sonucu olarak mitotik köprüler geliştirirler. Bu sinsisyum daha sonra somatik hücre öncülleri ile cinsiyet kordonlarını oluşturmak üzere bir araya gelerek ovaryum foliküllerinin öncüllerine gelişirler [3, 4] (Şekil 2.1.1.1).

Ovaryumun embriyonal gelişimi esnasında başlangıçta germ hücrelerini ve prefoliküler hücreleri içeren ovarial kordonlar oluşmaktadır. Ovarial kordonların farklanması ile ovaryumun yüzey epiteli oluşurken, ovarial kordonların etrafındaki intersisyel bağ dokuda ise mezenşimal hücreler yer almaktadır. Ovarial kordonların yıkımı ile prefoliküler hücreler germ hücrelerinin etrafında yerleşmeye başlarlar. Germ hücrelerinin mayotik profaza girmesi ile eş zamanlı olarak çok sayıdaki germ hücresi de apoptoza gider. Sonuç olarak ovarial kordonların yıkımı ile mayotik profazda bekleyen germ hücreleri ve onları çevreleyen tek katlı yassı foliküler hücrelerden oluşan foliküller şekillenirler. Foliküllerin çevresinde bazal membran ve mezenşimal hücreler yer alır. Bu aşamadaki folikül, primordiyal folikül; oosit ise primer oosit adını almaktadır. Primer oosit ovulasyona kadar mayozun diploten evresinde beklemektedir [5, 6].

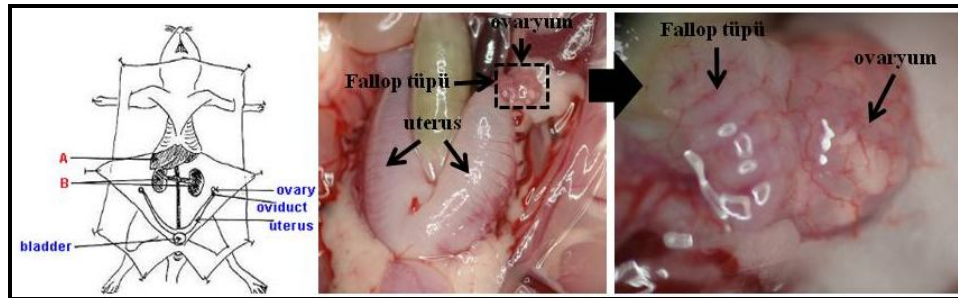
2.1.2. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar; insanda uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarika içinde konumlanmışlardır. Yaklaşık olarak 3 cm uzunluğunda, 1.5 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve 4-8 gr ağırlığında badem şeklinde organlardır. Erkeklerdeki testislerin karşılığı olan ovaryumlar, fallop tüplerinin altında yer alırlar, fallop tüplerine tutunmaksızın, ovaryan ligamentler aracılığıyla uterusun dış kısmına uzanırlar. Organa damar ve sinirlerin girip çıktığı yer olan hilusta bulunan, kan damarlarını ovaryumlara ileten özel bir periton katlantısı olan ve mezovaryum olarak adlandırılan bir askı ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılıdırlar. Ovaryumların yüzeyi ovulasyon başlamadan önce düzgündür, ovulasyondan sonra bu düzgünlük kaybolur [7-9] (Şekil 2.1.2.1).



Şekil 2.1.2.1.İnsanda ovaryumun yerleşimi ve yapısı [10].

Memeli türlerinden farede ise ovaryumlar; tüp şeklindeki uterus boynuzların son kısmında, fallop tüplerinin hemen üzerinde sağlı sollu olmak üzere yerleşim gösterirler (Şekil 2.1.2.2).

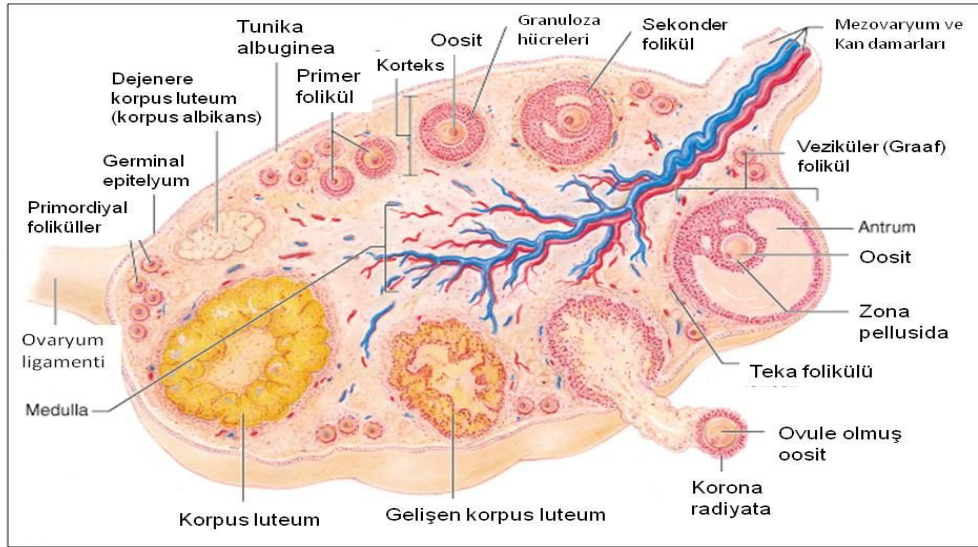


Şekil 2.1.2.2.Farede ovaryumların yerleşimi.

2.1.3. Ovaryumun Histolojisi

Memeli ovaryumunun yüzeyi, germinal epitel adı verilen tek katlı yassı veya kübik epitel hücre tabakası ile örtülüdür. Bu tabaka visceral peritonun mezotelyumu ile devam eder. Germinal epitelin altında yoğun düzensiz sıkı bağ dokusu olan tunika albuginea yer almaktadır. Organa genel olarak bakıldığında, korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluştuğu görülür. Korteks, tunika albugineanın hemen altında yer alan ve gelişmekte olan farklı aşamalarındaki çok sayıda folikülü içeren kısımdır [11].

Medulla ise mezovaryum ile süren, tipik düzensiz gevşek bağ dokusudur [12]. Medullada bulunan çok sayıdaki kan damarı, daha küçük damarlar ile korteksin bütün bölümlerine yayılmaktadır. Mezovaryum, ovaryumun germinal epiteli ve periton mezotelyumu ile kaplanmıştır [11, 12] (Şekil 2.1.3.1).



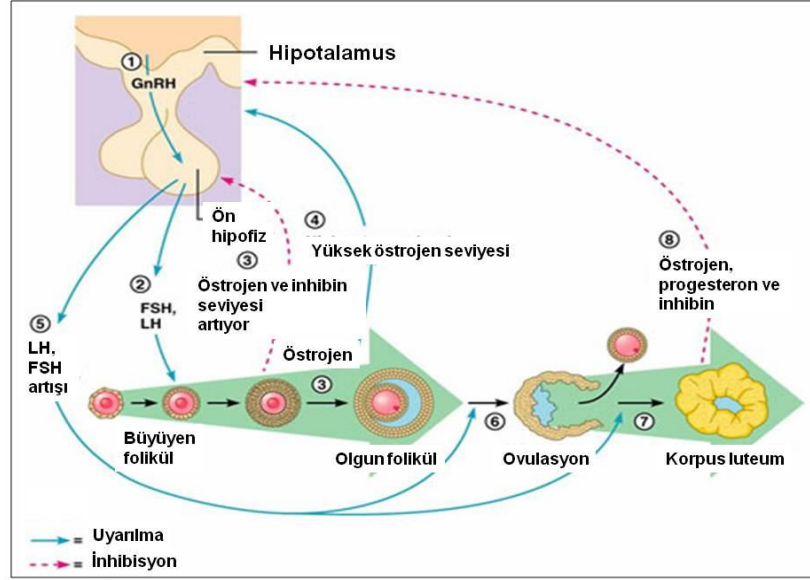
Şekil 2.1.3.1.Ovaryumun histolojisi [13].

2.1.4. Foliküler Gelişim (Folikülogenez)

Foliküler gelişim yani folikülogenez işlemi ovaryumun korteks tabakasında gerçekleşir. Fetal yaşamda ovaryumların farklılaşmasının ardından dişi germ hücreleri oogonia adını alır. Bu hücreler mitoz bölünme ile çoğalırlar ve insanda her bir overde yaklaşık 500.000 primordiyal folikülün bulunduğu bir rezerv oluştururlar [14].

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 [15] (Şekil 2.1.4.1).



Şekil 2.1.4.1.Foliküler gelişim (Folikülogenez) [16].

Folikülogenez, hücre proliferasyonu ve farklılaşması sayesinde üst düzey bir organizasyonun sağlanması olarak değerlendirilebilir. Folikülogenezin dört büyük gelişim evresi bulunmaktadır:

1. Primordiyal folikül seçilimi,
2. Preantral folikül gelişimi,
3. Antral (Graafian) folikül gelişimi ve seçimi,
4. Folikül atrezisi [15].

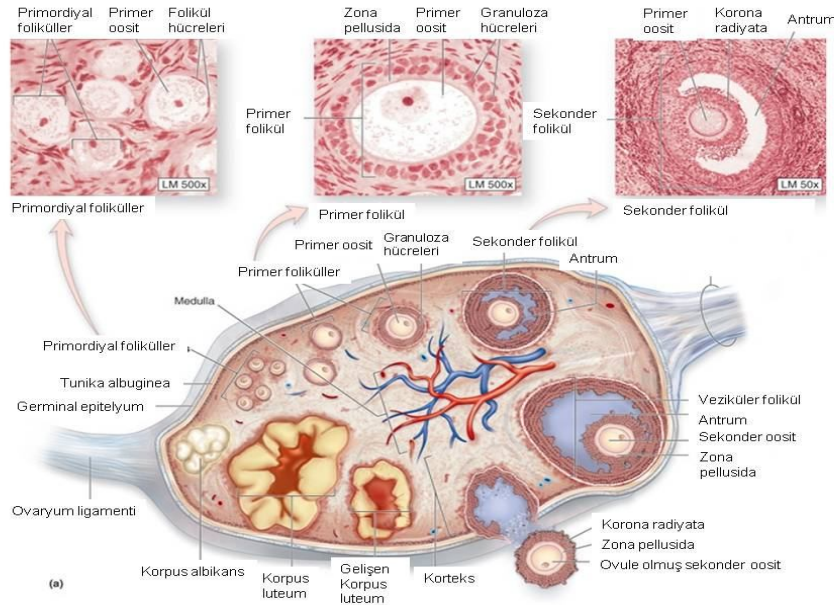
2.1.4.1. Primordiyal Folikül Seçilimi (Primordiyalden Primer Foliküle Geçiş)

Primordiyal foliküller, ovaryumun temel reproduktif birimleri olarak görülmektedir. Gelişim esnasında duraklamış olan primordiyal folikül aşamasındaki folikülün büyüyen foliküllerin olduğu havuza girmesi, seçim veya primordiyalden primer foliküle geçiş olarak adlandırılmaktadır.

Primordiyal folikül; mayozun profaz I evresinde duraklamış küçük bir primer oosit ve onun çevresindeki tek katlı yassı şekilde onu çevreleyen folikül hücreleri ve bazal laminadan oluşmaktadır. Bazal lamina sayesinde oosit ve folikül hücreleri,

mikroçevre ile direk olarak temasta olmazlar. Primordiyal foliküller bağımsız bir kanlanmaya sahip değildirler. Dolayısıyla endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenmektedirler [17].

Folikül hücrelerinin mitotik fonksiyon kazanması ve şekillerini yassıdan küboidal epitele dönüştürmeleri, folikül seçiliminin histolojik göstergeleri olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.1.4.1.1). Bunu gen aktivasyonu ve oositin gelişimi takip eder. Memelilerde granuloza hücresi kaynaklı kit-ligand, teka hücresi kaynaklı Bone Morphogenic Protein (BMP) ve yüksek pitüiter FSH düzeyi gibi aktivatörler ve Mullerian Inhibition Substance (MIS) gibi inhibitörler, seçilimi pozitif veya negatif yönde kontrol eden faktörlerdir. Klinik önemine rağmen kadında folikül seçiliminin nasıl kontrol edildiği hakkında henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır [15].



Şekil 2.1.4.1.1. Primordiyal, primer ve sekonder folikülün morfolojik görünümü [18].

2.1.4.2. Primer Folikül

Primer folikül, primer oosit ve onun etrafında dizilen tek katlı küboidal folikül hücreleri ile karakterizedir. Primer folikülde izlenen major gelişmeler FSH reseptörü ekspresyonu ve oosit büyümesi ve farklılaşmasıdır. Primer folikül kendi içerisinde unilaminar ve multilaminar primer folikül olmak üzere ikiye ayrılır. Unilaminar primer folikülde oosit çevresinde tek sıralı foliküler hücreler yer alırken, multilaminar primer folikülde folikül hücreleri oosit çevresinde en az 2 ve daha fazla sayıda sıra oluşturmaktadırlar [15] (Şekil 2.1.4.1.1).

2.1.4.3. Sekonder Folikül

Preantral folikül gelişimi esnasında folikülün yapısı değişmeye başlar. Sekonder folikül gelişimi sırasında major değişiklikler gösterir. Sayıca artış göstermiş folikül hücreleri artık granuloza hücresi adını alır. Sekonder folikülün oluşumu ile bazal lamina etrafında stroma hücresi benzeri bazı hücreler ortaya çıkar. Bu hücrelere teka hücreleri adı verilir. Primer folikülden tam gelişmiş bir sekonder folikül oluşumunda oosit tarafından üretilen, otokrin ve parakrin etki gösteren büyüme faktörleri rol oynamaktadır. Sekonder folikülün gelişiminin devamı ile birlikte teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki primer teka tabakası oluşmaktadır. Teka internanın hücreleri tamamen farklılaştığında steroid üreten hücreler ile benzer yapı gösterir. Bu hücreler granuloza hücre tabakasına taşınan bir steroid hormon olan androstenedion sentezler. Granuloza hücreleri FSH hormonu etkisi ile androstenedionu östrojene dönüştüren aromataz enzimini üretirler. Östrojen, folikülü saran stromaya dönerek kan damarları aracılığıyla kana geçer ve tüm vücuda yayılır. Teka eksterna ise, teka internayı çevreleyen organize fibroblast katmanlarından oluşmaktadır. İki teka tabakası arasındaki sınır belirgin değildir [12]. Bunlar; interstisyel hücrelere değişen içteki teka interna tabakası ve düz kas hücrelerine değişen dıştaki teka eksterna tabakasıdır. Teka tabakalarının gelişmesi ile anjiyogenez yoluyla çok sayıda küçük damar yapıları da gelişmektedir. Bu sayede; gonadotropinlerin ve besinlerin buraya ulaşmasına, atıklar ve sekrete edilen maddelerin buradan uzaklaştırılmasına olanak sağlayan folikül çevresi kan dolaşımı başlar [12, 17] (Şekil 2.1.4.1.1).

Preantral gelişim süresince oositin genomunun yeniden aktive olması ile oosit büyümeye başlar. Bazı oosit mRNA'larının genetik okunması sonucunda oluşan proteinler oositin büyüme ve farklılaşmasına katkıda bulunmaktadır. Örneğin zona pellusida (ZP) proteinlerini kodlayan ZP-1, ZP-2, ZP-3 ve ZP-4 genleri aktive edilir. Bu genlerin aktivasyonu ile sekrete edilen ZP proteinleri, oositin etrafında onu korumak üzere bir tabaka oluştururlar [14].

2.1.4.4. Antral (Graaf) Folikül

Foliküler gelişim devam ederken hipofizin ön lobundan salınan FSH hormonuna yanıt olarak, granuloza hücrelerinin sayısı ve büyüklüğünde artış izlenir. Buna eş zamanlı olarak folikül içerisinde granuloza hücreleri arasında oluşan aralıklara hyaluronik asitten zengin bir sıvı birikmeye başlar. Bu aşamadaki folikül, preantral foliküldür. Bu sıvının artması ile birlikte aralıklar genişler ve birbirleriyle birleşerek folikül içerisinde sıvı dolu büyük bir boşluk oluşur. Bu boşluk antrum adını almaktadır ve bu dönemde büyüyen foliküle de antral folikül adı verilmektedir. Foliküler kavite içerisinde oosit bir miktar hücre ile birlikte bulunur. Bu hücrelere kumulus hücreleri, folikül içerisinde oluşan bu yapıya da kumulus ooforus adı verilmektedir. Oositin hemen etrafında bulunun tek sıralı prizmatik hücreler ise korona radyata adını almaktadır. Olgunlaşma aşamasına gelen folikül artık graaf veya tersiyer folikül adını alır. Graaf

folikülünü çevreleyen teka interna tabakası kan damarlarından zengindir ve steroid salınımı yapmaktadır. Destek görevi yapan teka eksterna ise ovaryan stroma ile yakın ilişkidir [14, 17] (Şekil 2.1.4.1.1).

2.1.4. 5. Folikül Atrezisi

Gelişmekte olan bir folikülün, gelişiminin herhangi bir aşamasında, sağlıklı yapısını kaybederek gelişimini durdurması olayı foliküler atrezi olarak adlandırılmaktadır. Memelilerde foliküllerin %99'u atrezi ile yaşamlarını yitirmektedir. Atrezideki temel nokta, oosit ve granuloza hücrelerinde apoptozun aktivasyonudur. FSH'ın apoptozu önlemedeki önemi, FSH'ın folikülün yaşamasını sağlayıcı faktör olduğu düşüncesini doğurmuştur. Atreziyi yöneten mekanizma ya da mekanizmalar günümüzde halen tam olarak aydınlatılamamıştır [17].

2.1.5. Ovulasyon

Olgun bir oositin ovaryumda gelişimini tamamlayarak atılması olayına ovulasyon adı verilmektedir. Ovulasyon memelilerde pubertede başlayıp menopoza kadar devam eden siklik bir olaydır. Ovulasyon insanda menstrüasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerde gerçekleşir. Yaklaşık her 28 günde bir, her bir ovaryumdan bir oositin atılması ile tekrarlayan bu olaya ovarial siklus adı verilmektedir. Genellikle her ay yumurtalıklarda 7 ila 12 folikül gelişmeye başlar. Ancak bu foliküllerden yalnız bir tanesi dominant folikül olarak seçilir ve tam olgunluğa ulaşma şansına sahip olur. Diğerleri ise atreziye uğrar [19]. Dominant folikül siklusun foliküler fazı süresince östrojen üretiminden sorumludur. Ovulasyon sonrasında dominant folikül, menstrual siklusun luteal fazı boyunca progesteron sentezinden sorumlu olan korpus luteuma dönüşmektedir. Östrojen ve progesteron, embriyonun implantasyonu için uterus üzerinde etki göstermektedir [14].

2.1.6. Oogenez

Gelişmekte olan folikül, FSH'ın etkisi ile preantral aşamadan ovulasyon öncesi aşamaya geçer. Menstrual siklusun ortasına denk gelen geç foliküler evrede yine hipofizin ön lobundan salgılanan bir diğer hormon olan luteinleştirici hormonun (LH) ovulasyondan hemen önce pik yapması ile oositte germinal vezikül yıkılır (Germinal Vesicle Break Down (GVBD)). Kromozomlar metafaz I'den telofaz I evresine geçerler. Oosit 1.mayoz bölünmesini ovulasyondan hemen önce tamamlarlar. 1.mayoz bölünmenin ardından kromatin iki kardeş hücre arasında eşit olarak dağılırken biri hemen hemen tüm sitoplazmaya sahip büyük bir hücre olarak kalırken diğeri zona pellusida ile oosit arasındaki perivitellin aralıkta küçük bir hücre olarak kalır. Bu hücre 1.kutup cisimciği ya da 1. polar cisimcik olarak adlandırılmaktadır. Oosit artık sekonder oosit olarak adlandırılır. Meydana gelen sekonder oosit haploid kromozoma sahiptir ve çekirdek 2.mayoz bölünme evresine girer. Döllenme esnasında spermin oosite girmesi

ile birlikte oosit 2.mayoz bölünmesini tamamlar ve 2. kutup cisimciği atılır. Ovulasyon ile atılan oosit olgun oosit ya da metafaz II (MII) oosit olarak adlandırılır [14].

2.1.6. Korpus Luteum

Ovulasyonu takiben folikül duvarında kalan granuloza hücreleri ve teka interna hücreleri vaskülarize olurlar. Bu hücreler LH etkisi ile luteal hücrelere dönüşerek sırası ile granuloza lutein ve teka lutein hücreleri adını alırlar. Oluşan bu yapı korpus luteum adını almaktadır ve progesteron salgılamasından sorumludur. Ovulasyondan önce folliküllerden salınan östrojenin etkisi ile proliferasyona uğrayan endometriyum, ovulasyondan sonra salgılanan progesteronun etkisi ile sekretuar faza geçerek implantasyona hazırlanır. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse\ korpus luteum dejenere olarak fibrotik bir doku olan korpus albikansa dönüşür ve eş zamanlı azalan progesteron salgılamasına bağlı olarak implantasyon için hazırlanan endometriyum menstrual kanama ile dökülür (menstruasyon). Fertilizasyonun gerçekleşmesi durumunda ise gelişen embriyodaki trofoblast hücreleri tarafından üretilen hCG (Human Chorionic Gonadotrophin) hormonunun etkisi ile korpus luteum dejenerasyondan kurtulur ve gelişimini sürdürerek gebelik korpus luteumuna dönüşür [15].

2.2. Polikistik Over Sendromu (PCOS)'nun Tanımı

Polikistik Over Sendromu (PCOS) ilk kez 1935'te Stein ve Leventhal tarafından amenore, obezite ve hirsutizm üçgeni olarak tanımlanmıştır [20]. Ovariyan hiperandrojenizm olarak da adlandırılan bu sendromun, oldukça heterojen bir hasta grubunu kapsadığı belirtilmiştir. Heterojenlik klinik prezentasyon, serum androjen düzeyleri ve ovariyal morfolojide ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle PCOS'lu olgularda sendroma özgü tüm semptom ve bulgular bulunmamaktadır [15].

PCOS yaygınlığı, farklı tanı kriterlerine göre değişmekle beraber, genel olarak doğurganlık çağında % 5-10 civarında izlenen, üreme çağındaki kadınlarda en sık rastlanan reproduktif endokrinopati olarak gösterilmiştir [21].

PCOS tanı kriterleri konusunda, günümüzde tam bir fikir birliği sağlanamamıştır. ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health (NIH)) ve Ulusal Çocuk Sağlığı ve İnsan Gelişimi Enstitüsü ((NICHD) National Institute of Child Health and Human Development)'nın 1990 yılındaki PCOS konferansında tanı kriterleri olarak oligo ya da anovulasyon ile birlikte hiperandrojenizm ve/ya da hiperandrojenemi, diğer endokrin hastalıklar haricinde, konjenital adrenal hiperplazi (CAH), Cushing Sendromu, tiroid fonksiyon bozukluğu, hiperprolaktinemi, androjen üreten tümörler ve ilaç-indüklü androjen fazlalığını kapsayan tanı kriterlerinin olmasına karar verilmiştir [22, 23] (Çizelge 2.2.1).

Çizelge 2.2.1.PCOS tanı kriterleri [15].

Combination of signs and symptoms	Fulfills 1990 NIH, 2003 Rotterdam and 2006 AES criteria for PCOS (Classic PCOS)	Fulfills 2003 Rotterdam and 2006 AES criteria for PCOS (Ovulatory PCOS)	Fulfills 2003 Rotterdam criteria for PCOS only
Clinical/biochemical hyperandrogenism with	yes	yes	no
Oligoanovulation and	yes	no	yes
Polycystic ovaries	yes or no	yes	yes

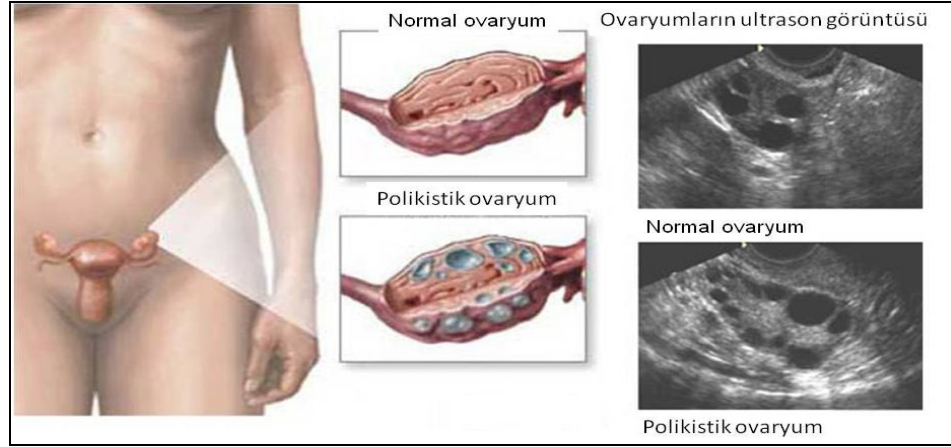
2003 ESHRE/ASRM Rotterdam PCOS konsensus toplantısında tanı kriterleri tekrar gözden geçirilmiş ve değiştirilmiştir [24]. Yeni tanımlamaya göre üç kriterden ikisinin bulunması tanı için yeterli görülmüştür;

1. Oligo ve/veya anovulasyon,
2. Hiperandrojenizmin klinik ve/veya biyokimyasal bulguları,
3. Polikistik overler ve diğer nedenlerin (konjenital adrenal hiperplazi, androjen salgılayan tümörler, Cushing sendromu) ekarte edilmesi.

Yapılan değerlendirmeler polikistik over sendromu ve polikistik over (PCO)'ın farklı kavramlar olduğunu vurgulanmaktadır. Polikistik over, morfolojik bir tanım olup ultrasonografik olarak 2 parametreyi kapsamaktadır:

1. Over korteksinde inci kolyesi gibi dizili, 2-8 mm çaplı 10-15'in üzerinde folikül varlığı,
2. Artmış stroma.

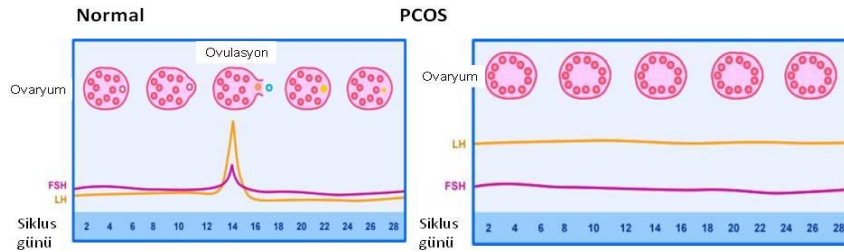
PCOS tanısında ultrasonografide polikistik over (PCO) görüntüsü muhtemel bir kriter olarak not edilmiştir ancak, bu parametrenin gerekliliği halen tartışma konusu olarak gösterilmektedir [24] (Şekil 2.2.1).



Şekil 2.2.1. PCOS'a sahip ovaryum ile normal ovaryum görüntüsünün karşılaştırılması ve PCOS'lu bir ovaryumun ultrason görüntüsü [25].

PCOS ise yukarıda sayılan tanı kriterlerini kapsayan heterojen bir sendrom olarak tanımlanmaktadır. PCOS'lu tüm olgularda PCO görünümü olmayabileceği gibi, her PCO'lu olgunun PCOS olmayabileceği belirtilmiştir. NIH/NICHHD kriterlerine göre PCOS tanısı olan olguların yaklaşık %70'inde morfolojik olarak PCO izlendiği ve normal menstrual siklus öyküsü olan olguların ise %20-30'unda PCO görüntüsü olabileceği bildirilmektedir.

PCOS'lu hastalarda izlenen bir diğer klinik bulgu da kandaki Luteinleştirici hormon (LH) seviyelerinin Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) seviyesine oranının yüksek olmasıdır. Kandaki FSH hormonu menstrüal kanamanın 3. gününde ölçülmekte ve 3-20 mIU/ml normal değer aralığı olarak kabul edilmektedir. Sağlıklı bir kadında LH/FSH oranı 1:1 iken, PCOS'lu hastalarda bu oranın 2:1 şeklinde izlendiği gösterilmiştir [26, 27] (Şekil 2.2.2).



Şekil 2.2.2. Normal ve PCOS'lu ovaryumlarda LH ve FSH dalgalanmaları [24].

Bununla birlikte kanda LH düzeyinin yüksekliği, LH/FSH oranının 2'nin üzerinde olması mutlak tanı kriteri olarak kabul edilmektedir. Bu hastalarda kan FSH seviyesinin düşük veya normal olduğu tespit edilmiştir. Olguların yaklaşık yarısında kan dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS) seviyesi yüksek bulunmuştur. Kanda prolaktin seviyesinin olguların %20-30'unda yüksek olduğu belirtilmiş ve bu yükseklikten hiperöstrojenizm sorumlu tutulmuştur [26].

PCOS'lu hastaların overleri normal overler ile karşılaştırıldığında;

1. Overlerin daha büyük,
2. Atretik folikül sayılarının daha fazla,
3. Tunika albuginea ve subkortikal stromanın daha kalın ve Hilar hücre sayılarının daha fazla olduğu tespit edilmiştir [28].

Günümüze kadar yapılan çalışmalar ile PCOS'un, çevresel ve genetik nedenler ile ortaya çıkabileceği gösterilmiştir [29]. İnsülin rezistansı ve hiperinsülinizmin PCOS için bir tanı aracı olarak kullanılmadığı ancak, sendromun fizyopatolojisinde önemli bir rol oynadığı da belirtilmektedir. Bazı hastalarda insülin kullanımındaki sorunlar neticesinde, çok fazla miktardaki insülin vücutta birikerek androjen üretiminin artmasına neden olmaktadır. Hiperinsülinemi, SHBG (sex hormone binding globulin) seviyesinin azalmasına böylece ovaryumlardan üretilen androjen miktarının artmasına neden olmaktadır [30]. Dolayısıyla insülin yalnız başına ya da LH ile sinerjistik olarak ovaryumda androjen üretimini artırmaktadır [31]. Androjen üretimindeki artışa bağlı olarak, düzensiz ya da nadir ya da hiç mens görülmemesi; ovulasyonun gerçekleşmemesinden dolayı gebe kalamama, insülin direnci ya da tip 2 diyabet izlenmektedir. Tanı testleri olarak kan şekeri ve hormon seviyesi ölçümü yapılmaktadır. Klinikte tip 2 diyabetin tedavisinde metformin kullanıldığı belirtilmiştir [28].

Androjen normalde vücutta yağ hücrelerinde ve adrenal bezlerde de üretilmektedir. Ovaryumda foliküllerin teka tabakasında, hipofiz bezinden salınan LH etkisi ile üretilmekte; çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler tarafından düzenlenmektedir. Normal bir foliküler gelişim ve östrojen sentezi için, ovaryumda üretilen belirli bir miktardaki androjene ihtiyaç duyulmaktadır. Bununla beraber, androjen sentezi gelişen folikül ile birlikte koordine bir şekilde gerçekleşmediğinde ve fazla üretilmesi durumunda, zayıf foliküler maturasyona ve ovaryumda foliküler atrezide artışa neden olduğu belirtilmiştir [32], [33].

Normal ovaryum dokusunda LH, teka hücreleri-interstisyel hücreler ve stromal hücreler üzerinde etki gösteren bir hormondur. FSH ise granuloza hücreleri üzerinde etkilidir. Tekal kompartmanlar LH'ya cevap olarak androjen üretirler, üretilen

androstenedion FSH'ın etkisi ile granuloza hücrelerinde aromataz aktivitesi ile östrojene dönüştürülmektedir. PCOS'a sahip bir ovaryumda ise teka hücre sayısı artmıştır, artan transkripsiyon ile steryojenik kapasiteleri ve steryojenik enzimlerin mRNA kapasiteleri de artmaktadır [32, 33].

2.3. Polikistik Over Sendromu ve Oositin Gelişimsel Yeterliliği Üzerine Etkisi

Polikistik over sendromu (PCOS) luteinize hormonun fazla salgılanması, ovarian hiperandrojenizm, polikistik ovaryumlar, insuline dirençten dolayı hiperinsülinemi ve azalmış doğurganlık ile karakterize heterojenöz bir sendrom olarak tanımlanmaktadır [34]. PCOS hastalarındaki üreme ve metabolik anomalilerdeki fenotipik değişiklikler, oositin gelişimsel yeterliliğinde örneğin mayozu tamamlama yeterliliğinde, döllenebilme, embriyogenez ve term gelişiminde farklılıklara neden olmaktadır [35-40]. PCOS'lu kadınlarda aşırı kilodan dolayı özellikle düşük oosit fertilizasyonu izlenmekte ve bu hastaların uteruslarına embriyonun implante olma şansında da azalma görülmektedir [41]. PCOS'da bozulmuş oosit yeterliliği, anormal folikül gelişimi ile kaçınılmaz olarak bağlantılıdır. Ovariyal hiperandrojenizm [42, 43], insuline dirençten dolayı gelişen hiperinsülinemi [44, 45] ve Transforme edici büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β (TGF- β))'yı içeren büyüme faktörlerinin parakrin düzensizliği [46, 47] foliküler çevreyi bozmakta, granuloza hücreleri ile oositin ilişkisini değiştirmekte ve oositin sitoplazmik ve/ya da çekirdek olgunlaşmasına zarar vermektedir.

2.4. PCOS ve Oosit Gelişimi

PCOS'lu hastaların ovaryumlarında çok sayıda oosit geliştirilmektedir. Ancak, üretilen oositin kalitesinin düşük olduğu, fertilizasyon, yarıklanma ve implantasyon şanslarının az olduğu ve bu hastaların gebelik kaybı ihtimallerinin yüksek olduğu belirtilmiştir [48, 49]. Günümüze kadar yapılan bazı çalışmaların oosit ve embriyo kalitesinin zayıf olmasının anöploidi riskini artırdığını söylemesine rağmen [50, 51], PCOS'lu hastalarda meydana gelen embriyo kayıplarının genetik olarak embriyonal anöploididen kaynaklanmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur [52].

PCOS'lu kadınlarda oosit maturasyonundaki ve embriyonik gelişimdeki başarısızlık;

- anormal endokrin/parakrin faktörlerden,
- metabolik fonksiyon bozukluklarından,
- folikülogenez esnasında folikül içerisindeki mikroçevrenin ve dolayısıyla folikül maturasyonunun değişmesinden kaynaklanmaktadır [53-55].

Bu durumda Polikistik Over Sendromunda kısırlığın nedenlerini

- Ovulasyonun gerçekleşmemesi ve
- Normale göre düşük oranının artması

şeklinde belirtmek mümkündür. Polikistik ovaryumlar anormal sayıda büyüyen immatür folikül içerirler. PCOS'lu kadınların ovaryumlarında, oosit ile oositi çevreleyen granuloza hücreleri arasındaki diyalog değişmektedir. Bu değişen sinyaller ile dominant folikülün seçilmesinde başarısızlık meydana gelmektedir [54].

Dominant folikülün seçilimindeki ve ovulasyonun gerçekleşmemesindeki nedenler iki başlık altında derlenebilir:

1. Ovaryum Dışından Kaynaklanan Faktörler
2. Ovaryum İçerisinden Kaynaklanan Faktörler

2.4.1. Ovaryum Dışından Kaynaklanan Faktörler

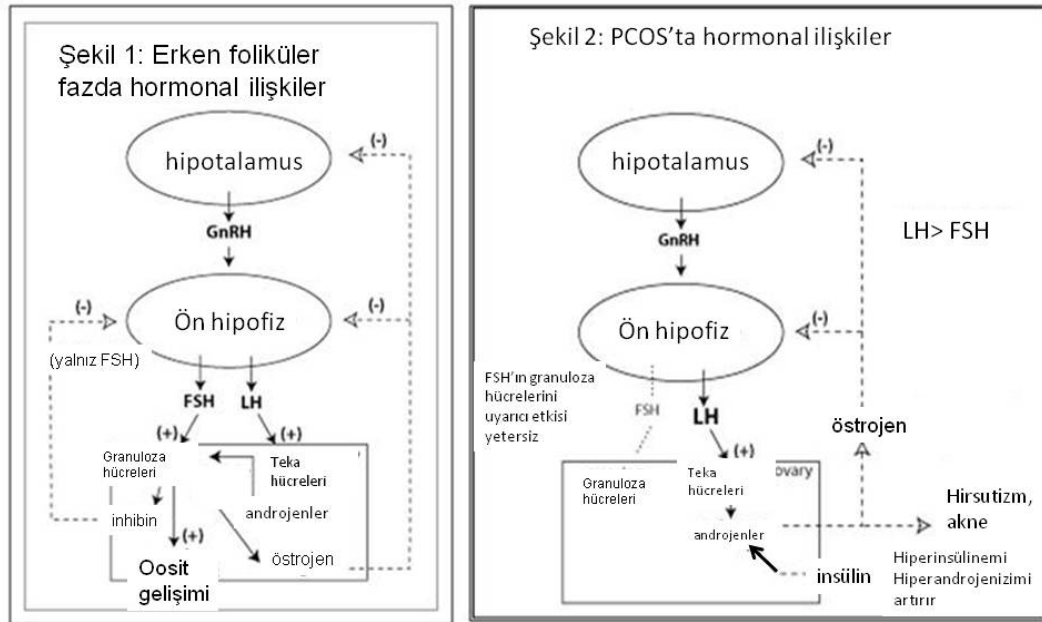
PCOS ve oositin gelişebilme yeteneğinin belirlenmesi, ilk başta biyomedikal araştırmalarda insan oositi ve embriyosu ile çalışılmasının etik açıdan deneysel kısıtlamalar getirilmesi nedeniyle sınırlanmaktadır. Buna ek olarak her bir folikülün mikroçevresinin tek olması ve gelişen oosit üzerinde kendi etkilerine sahip olmaları, oositin gelişimsel yeteneğinin belirlenmesinde sınırlayıcı olan ikinci bir etkidir [56]. Diğer bir problem ise örneğin mayozun tamamlanması, mitoz girilmesi, bir embriyonik genom oluşturulması, kendi kromatin yapısının modifiye edilmesi ve doğru genlerin transkripsiyonu ile gelişim programına başlaması için gerekli olan komponentlerin aşamalı olarak tamamlanmasıdır [57]. İnsan oositindeki maternal mRNA'ların, proteinlerin ve diğer moleküler bileşenlerin aşamalı olarak kullanılması gibi çalışmalar, özellikle erken dönem foliküler gelişim, bu sebeplerden dolayı araştırılması sınırlı alanlardır [58, 59]. Bundan dolayı PCOS'daki oosit gelişiminin anlaşılması, oosit gen ekspresyonu çalışmaları, steroid seviyeleri ve folikül sıvısı arasındaki korelasyonlar, oosit gelişiminin *in vivo*'da görüntülenmesi ve seks steroidlerinin *in vitro*'da oosit gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması, insan oositi gelişimi hakkında bizleri bilgilendirmektedir [55, 60, 61].

Ovaryum dışından kaynaklanan faktörler:

- FSH eksikliği
- LH'nın fazla salınımı
- Hiperandrojenemi
- Hiperinsülinemi olarak sıralanabilir.

2.4.1.1. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)

FSH hormonu folikül havuzundan foliküllerin seçiminde ve foliküler büyümede rol almaktadır. FSH, folikülogenez ve folikül seçilimi ile foliküler atrezinin dengede tutulması açısından oldukça önemli bir role sahiptir. Geç foliküler fazda gelişen folikül ile birlikte östradiol (E2) ve inhibin B seviyesi artar [54], FSH seviyesi azalmaya başlar. En iyi gelişme gösteren seçilmiş folikül ovulasyona hazırlanır. Luteal fazın sonunda, FSH biraz artış gösterir, bu artış bir sonraki ovulatuvar siklusun başlaması için önemlidir [62, 63]. Bu duruma zıt olarak PCOS hastalarında serum FSH seviyesi normal kadınlarınkine oranla daha düşüktür [64]. Sonuç olarak FSH eksikliği ile antral folikül sayısında artış meydana gelmektedir [65]. Bu foliküllerin büyük bir kısmı olgunlaşmalarını tamamlayamadan duraklamaya gidecektir. Ayrıca FSH eksikliği, dominant folikülün seçiminde başarısızlık olacağının da bir göstergesidir. Ancak PCOS'lu kadınların oositlerinin normal olduğunu, fertilizasyon ve kümülatif gebelik oranlarının da normal kadınlar ile karşılaştırıldığında fark bulunmadığı gösteren çalışmalar da mevcuttur [66-69] (Şekil 2.4.1.1.1).



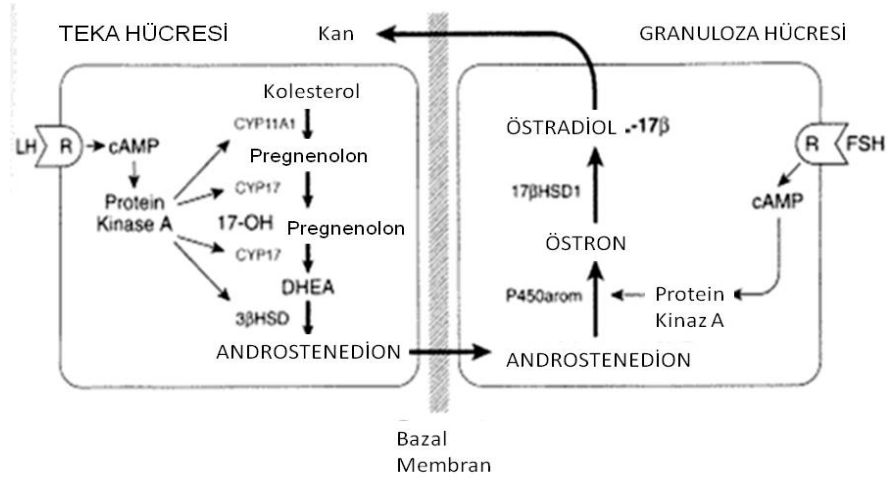
Şekil 2.4.1.1.1. Normal ve PCOS'lu bir ovaryumdaki hormonal ilişkilerin karşılaştırılması [70].

Tüp bebek tedavisi gören PCOS'lu hastalarda yüksek östradiol (E2) seviyesi ile çok fazla sayıda oosit toplanmasına rağmen [71], elde edilen oositlerden de çok azının iyi kalitede olduğu, döllenme şanslarının düşük, embriyonik fragmentasyonlarının fazla olduğu, blastosiste gelişebilme yeteneklerinin az ve implantasyon şanslarının da az olduğu belirtilmiştir [72, 73]. PCOS-ilişkili kısırlık sorunu yaşayan kadınlarda

olgunlaşmasını tamamlayamayan foliküller için *in vitro* maturasyon (IVM) tedavisi potansiyel olarak kullanılmaktadır.

2.4.1.2. Luteinleştirici Hormon (LH)

PCOS'lu hastalarda LH seviyesinin yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek LH seviyesinin bu hastalarda; oosit maturasyonu ve fertilizasyon oranlarını, embriyo kalitesini ve gebelik oranlarını düşürdüğü ve gebelik kayıplarının artmasına neden olduğu bilinmektedir [73-75]. Folikülogenez esnasında LH'nın fazla salınımı FSH'ı baskılamakta, anormal granuloza hücre fonksiyonu meydana gelerek prematüre granuloza hücre luteinizasyonu, foliküler atrezi, oosit maturasyonu inhibitörlerinin baskılanması ile premature oosit maturasyonuna neden olmaktadır [65, 75-77] (Şekil.2.4.1.2.1).



Şekil.2.4.1.2.1. Luteinleştirici hormonun teka hücresi aracılı androjen metabolizması kontrolü [78].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda LH'nın yüksek seviyede salınması sonucu oosit çekirdeğine zarar vererek mayotik işlemin premature aktivasyonuna neden olduğu [79]; mayozun endokrin kontrolünü bozarak birinci polar cisimin atılımında hataya neden olduğu ve bu nedenle PCOS'lu hastalarda anoploidi izlendiği belirtilmiştir [52]. Artan LH uyarımına karşı anormal ve prematüre oosit kaynaklı embriyogenez hatalarının PCOS hastalarında düşük yapma riskindeki artışı açıklayıcı olduğu düşünülmektedir [73] (Şekil.2.4.1.2.1).

2.4.1.3. Hiperandrojenemi

Hiperandrojenemi, androjen miktarının normal değerinin üzerinde olması durumudur. Folikül sıvısındaki androjen miktarının artması serumda LH seviyesinin

yüksek olması ile ilişkilidir. Androjen seviyesinin normalden fazla olması, dominant folikül gelişimini engelleyerek folliküler duraklamaya ve dejenerasyona neden olmaktadır [79, 80]. PCOS hastalarında karaciğerden Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG) sentezi inhibe olmaktadır. Gerek ovaryum tarafından üretilen biyoaktif androjenin dolaşımdaki miktarının artması gerekse insüline karşı gösterilen direnç ile birlikte SHBG seviyesinin azalması hiperandrojenemiye neden olmaktadır [75, 81, 82]. Androjen seviyesinin yüksek olması, oosit gelişimini olumsuz etkilemektedir [68]. Oosit androjen ile birlikte *in vitro* kültüre edildiğinde oosit maturasyonunun azaldığı belirlenmiştir [61].

Testesteron, androjen metabolizmasının ara ürünlerinden biridir. Mayotik maturasyonda ve embriyonal gelişimde güçlü bir inhibisyon sağlamaktadır. PCOS'lu hastalarda izlenen yüksek miktardaki testesteron direk ya da indirek olarak *in vitro* maturasyonu (IVM)'u, fertilizasyon ve embriyonal gelişimi azaltmaktadır [77, 83]. Testesteron aktivitesinin yüksek olması; oositte germinal vezikülün yıkımı esnasında gerçekleşen Ca^{++} salınımını azaltır, oositin sitoplazmik maturasyonunu inhibe eder ve mayotik maturasyonun olumsuz etkilenmesine neden olarak oosit üzerinde olumsuz etkilere sahiptir [68]. Yapılan çalışmalarda artan testesteron konsantrasyonunun PCOS'lu kadınlarda normal kadınlara oranla daha fazla düşüğe neden olduğu gösterilmiştir [75]. Çalışmalar göstermiştir ki androjenler, folikülogenez ve endometriyal fonksiyonlar üzerinde zararlı etkilere sahip olabilmektedirler [84].

2.4.1.4. Hiperinsülinemi

Hiperinsülinemi, insülin seviyesinin normal değer aralığının üzerinde olması durumudur. PCOS'lu kadınlarda insülin direnci oluşmaktadır. İnsülin direnci vücudun insülin mekanizmasının normal aktivitelerini gerçekleştirememesi anlamına gelmektedir. İnsülin direnci olan insanlarda, kan şekerinin kas, yağ ve karaciğer hücrelerine girmesi daha zordur ve bu da yüksek düzeyde şekerin kanda birikmesine sebep olur. Bu durum hem uzun hem de kısa süreli sorunların ortaya çıkmasına neden olabilir. Çok kısa sürede, hücreler enerjisiz kalacak ve vücut gereken şekilde işleyemeyecek hale gelecektir. Pankreas hücrelere daha fazla şeker almak için daha çok insülin üretmeye ve normalden daha fazla çalışmaya bile başlayabilir. Pankreas kendini yıpratarak yeterli insülin sağlama yeteneğini kaybedebilir.

İnsülin seviyesinin kanda normalden daha fazla bulunması oositin gelişme yeteneğini bozan, fertilizasyon oranını düşüren, embriyonal gelişimi olumsuz olarak etkileyerek implantasyon şansını azaltan bir etkidir [49, 85].

Kandaki yüksek insülin seviyesi; ovaryumlardaki androjen üretimini tetiklemekte ve karaciğerde SHBG'nin üretimini azaltarak androjenlerin serbest kalmasını sağlayıp kandaki androjen seviyesinin yükselmesine sebep olmaktadır. Yükselen androjen, estron

üretimini artırmakta ve böylelikle kandaki estrojen miktarı artmaktadır. Bu durum FSH salınımını baskılayarak LH salınımının artmasına neden olmaktadır. İnsülin lokal olarak da androjen üretimini indükleyebilir. Bunun neticesinde PCOS'lu hastalarda oosit kalitesinin azalmasına ve oosit post-maturitesine neden olmaktadır [72].

Günümüzde hiperinsülinemi nedeni ile gelen PCOS'lu hastaların tedavisinde metformin kullanılmaktadır. Metformin; kandaki insülin, LH ve serbest testosteron seviyesini düşürerek, menstrual siklusun düzene girmesine ve fertilitateye yardımcı olmaktadır [86].

2.4.2. Ovaryum İçerisindeki Faktörler

Ovaryal folikülogenez ovaryum içerisindeki ve ovaryum dışındaki faktörler arasında kurulan güzel bir denge tarafından düzenlenmektedir [64]. Oogenez folikül içerisindeki faktörlere özellikle folikül sıvısının içerdiği faktörlerin serumdaki seviyelerine bağlıdır [63, 87, 88]. Ovaryum içerisindeki ve ovaryum dışındaki faktörler arasındaki herhangi bir dengesizlik ya da fonksiyon bozukluğu anormal folikülogenez ve oogenezdeki bozukluklar ile sonuçlanabilmektedir [46].

1. Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor (EGF))
2. Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor (FGF))
3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor (IGF))
4. Nörotropin Büyüme Faktörü (Neurotrophin Growth Factor (NGF))
5. Transforme Edici Büyüme Faktörü β (Transforming Growth Factor β (TGF- β))
6. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF))
7. Sitokinler

2.4.2.1. EGF (Epidermal Growth Factor)

Epidermal büyüme faktörü (EGF), çözünebilir bir büyüme faktörüdür. Kumulus hücrelerindeki EGFR sinyal ileti sistemi ile, EGF reseptörüne bağlandığında hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşmasında rol oynamaktadır [88]. EGF, foliküler gelişimin ve oositin mayotik bölünmesinin düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir [88, 89]. EGF; kumulus-oosit kompleksi (KOK)'nde kumulus hücrelerinin yayılmasını, oositin nükleer ve sitoplazmik maturasyonunu düzenlemektedir (MI'den MII'ye geçiş) [90]. Ayrıca fertilizasyon ve embriyo gelişiminin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır [91]. PCOS'lu hastalarda, EGF seviyesindeki artışın, granuloza hücrelerinde östrojen sentezini inhibe ettiği belirlenmiştir. Bu nedenle EGF, PCOS hastalarında antral folikül büyümesini engelleyerek foliküler duraklamaya neden olmaktadır [64]. PCOS'lu kadınlarda, EGF sentezini düzenleyen mekanizmada ve/ya da EGF'nin fizyolojik fonksiyonunda meydana gelebilecek hatada ovulasyonun gerçekleşmemesinden dolayı infertilite izlenebilmektedir.

2.4.2.2. FGF (Fibroblast growth factor)

Fibroblast büyüme faktörü (FGF), hücre büyümesinde, gelişimde, doku tamirinde ve transformasyonda rol oynayan önemli bir polipeptid grubudur [92]. Büyüyen folikülde granuloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde eksprese edilmektedir ve FSH tarafından kontrolü gerçekleştirilmektedir [93]. Ayrıca FGF, oosit maturasyonunda da rol almaktadır [64, 94]. Yapılan çalışmalarda, PCOS'lu hastalarda FGF seviyesinin düşük olduğu gösterilmiştir [92].

2.4.2.3. IGF (Insulin-like Growth Factor)

İnsüline Benzer Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor (IGF)), insülin benzeri aktivite gösteren çok fonksiyonlu polipeptidlerdir. Bu kompleks sistem 2 yüzey reseptörü (IGF1R ve IGF2R), 2 reseptör ligandı (IGF-1 ve IGF-2), 6 adet yüksek afinitede IGF bağlayıcı protein (IGFBP 1-6) ve onların özgül proteazlarından oluşmaktadır [95-97].

IGF'ler ovaryumda foliküler gelişim için oldukça önemlidirler [97]. Dolaşımdaki IGF'ler karaciğerden üretilmektedir. Ancak IGF-2 granuloza hücreleri tarafından sentezlenirken, IGF-1 teka hücreleri tarafından sentezlenmektedir. IGFBP'ler granuloza ve teka hücreleri tarafından üretilip folikül sıvısı içerisine verilmektedir [62, 97]. IGF'lerin PCOS'un patogenezinde nasıl bir rol aldığı bilinmemekle beraber insülin konsantrasyonundaki artış ve IGF'lerin üretimindeki değişiklikten kaynaklanabileceği düşünülmektedir [97]. Yapılan bir çalışmada PCOS'lu hastaların folikül sıvısında IGF-2 ve IGFBP-1 seviyesi normalden daha düşükken, IGF-1 seviyesi yüksek bulunmuştur. Ancak, IGFBP-2 ve -4 seviyeleri önemli oranda normalden yüksek iken buna zıt olarak IGFBP-1 seviyeleri daha düşük tespit edilmiştir [97, 98]. Bu durum PCOS'lu hastalarda foliküler gelişimin duraklaması şeklinde izlenmektedir. Yapılan çalışmalar IGF sistemindeki değişikliklerin PCOS'lu kadınlarda oligo-ovulasyon ile direkt olarak ilişkili olduğunu göstermektedir [98].

2.4.2.4. NGF (Neurotrophin growth factor)

Nörotrofin büyüme faktörü ailesi (NGF (Neurotrophin growth factor)); beyinden türevlenen nörotrofik faktör (Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)), sinir büyüme faktörü (Nerve Growth Factor (NGF)), Nörotrofin (neurotrophin (NT))-3 ve NT-4/5 gibi üyelerden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda merkezi ve periferel sinir sisteminin gelişiminde önemli rollere sahip oldukları gösterilmiştir [99, 100]. NT'ler, folikülogenezde ve oositin gelişiminde de önemli role sahiptirler [100]. BDNF ile birlikte inkübe edilen oositlerde nükleer ve sitoplazmik maturasyonun ilerlediği, başarılı bir oosit ve preimplantif dönem embriyonal gelişimi için BDNF'nin gerekli olduğu

gösterilmiştir [101, 102]. PCOS'lu hastalarda ise folikül sıvısında BDNF ve NGF seviyesinin arttığı belirlenmiştir [64, 103].

2.4.2.5. TGF- β (Transforming growth factor- β)

Transforme edici büyüme faktörü- β ailesi folikül büyümesi ve oositin gelişimi için gerekli olan önemli bir ailedir. Bu aile aşağıda belirtilen üyelerden oluşmaktadır:

- Anti-Müllerian Hormon (AMH)/Mullerian inhibiting substance (MIS),
- aktivin, follistatin ve inhibin,
- Kemik Morfogenik Protein-15 (Bone Morphogenetic Protein (BMP)-15)
- Büyüme Farklılaşma Faktörü 9 (Growth Differentiation Factor (GDF)-9) [54].

PCOS'lu kadınların serum ve folikül sıvısında AMH seviyesi artmaktadır. Yükselen AMH seviyesi direk olarak artan testosteron ve/ya da LH seviyesi ile koreledir. Bu durum oosit gelişiminde başarısızlığa ve embriyo kalitesinin bozulmasına neden olmaktadır [46, 77, 83, 104]. Folikül sıvısında PCOS'lu hastalarda AMH seviyesinin yüksek olması immatür oosit yüzdesinin fazla olmasına ve fertilizasyon oranlarının düşmesine neden olmaktadır. PCOS'lu kadınlarda folikül sıvısında artan AMH seviyesinin, oosit kalitesi ve matürasyonu için zararlı olduğu ancak gebelik oranları üzerinde etkili olmadığı belirtmiştir [105]. PCOS'lu hastaların folikül sıvısında inhibin A ve B seviyeleri düşük bulunmuştur [106].

2.4.2.6. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor))

Folikül sıvısında izlenen VEGF foliküler olgunlaşmanın dinamik bir göstergesidir. Oosit maturasyonu, fertilizasyon başarısı ve embriyo gelişimi hakkında bilgi verir [64]. PCOS'lu hastalarda VEGF seviyesi yüksek bulunmuştur, buna ek olarak immatür oosit ve düşük fertilizasyon oranı da izlenmektedir [107].

2.4.2.7. Sitokinler

PCOS'lu hastalarda, interlökinlerden (IL) IL-12 seviyesinin azaldığı ve IL-13 seviyesinin arttığı belirlenmiştir. Buna bağlı olarak oosit maturasyonu ve fertilizasyonda meydana gelecek başarısızlık neticesinde PCOS'lu hastaların gebelik şanslarının da azaldığı belirlenmiştir [108].

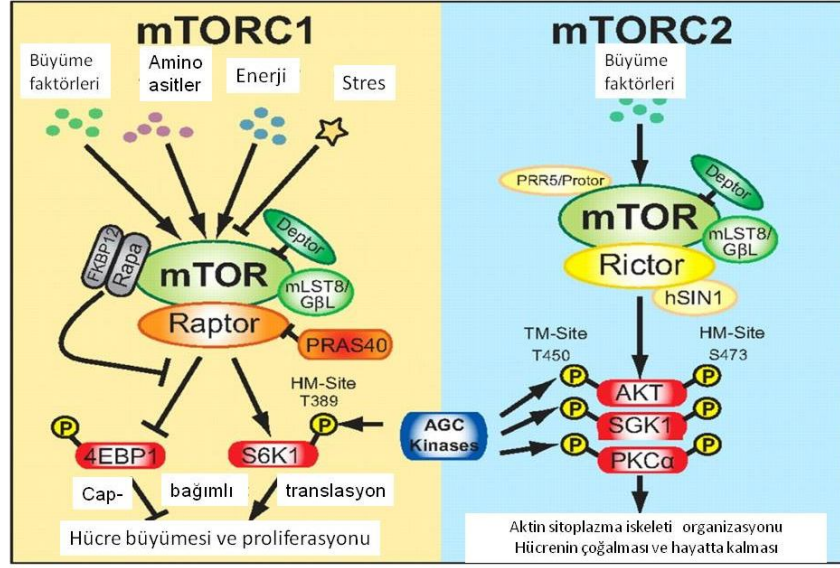
TNF-alfa (Tümör nekroz faktör alfa); çoğalma, farklılaşma, foliküler maturasyon ve apoptozda görev alarak ovarial fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. PCOS'lu hastalarda TNF-alfa seviyesinin arttığı, buna bağlı olarak oosit ve embriyo kalitesinin azaldığı belirlenmiştir.

PCOS hastalarında; sFas seviyesi azalmaktadır. Bu hastalarda sFas–sFasL sistemi teka ve granuloza hücrelerinin apoptozunda rol alır ve luteinize granuloza hücrelerinde DNA fragmentasyonun artmasına neden olmaktadır.

2.5. The Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Ailesi

The mammalian target of rapamycin, mTOR bir serin-trionin protein kinazdır. TOR, fosfatidilinozitol 3 kinaz ilişkili kinazlar ailesinin bir üyesidir [109]. TOR yolağı, maya dan memeli hücrelerine kadar evrimsel süreç içerisinde iyi korunmuştur [31, 39]. Büyüme faktörleri, değişen besin şartları ve enerji dalgalanmaları gibi çevresel olaylara karşı geniş spektrumlu bir cevap oluşturmaktadır [31, 110]. Genel olarak, beslenmenin bozulması ya da stress durumunda mTOR aktivitesinin [31] ve hücrenin hacminin azaldığı [32], otofajinin indüklendiği gösterilmiştir [33]. mTOR aktivitesinin azalmasının aynı zamanda proliferasyonu da azalttığı [34], bunun bir sonucu olarak da mTOR'un anti-kanser terapisi için bir hedef niteliği taşıdığı belirtilmiştir. Günümüzde transplantasyon hastalarında rejeksiyonu önlemek amacıyla kullanılan mTOR inhibitörleri kanser tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır [35].

mTOR, 2 adet multiprotein kompleksi oluşturabilme (mTOR kompleks 1 (mTOR complex 1 (mTORC1)) ve mTOR kompleks 2 (complex 2 (mTORC2)) [111] ve farklı roller üstlenebilme yeteneğine sahiptir. Bu iki kompleks TORC1 (TOR Complex 1) (mTOR, Raptor ve GβL (LST8) [36, 37] ve TORC2 (TOR Complex 2) (mTOR, Rictor (Rapamisin'e hassas olmayan mTOR komponenti), memeli stres aktive edici protein kinaz ilişkili protein 1 (mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1) ve GβL (LST8)) olarak adlandırılmaktadır [38-41] (Şekil 2.5.1).



Şekil 2.5.1.mTORC1 ve mTORC2 komplekslerinin komponentlerinin karşılaştırılması [112].

2.5.1. mTOR'un Yapısı ve Aktivasyonu

mTOR aynı zamanda Rapamisin ilişkili protein (FRAP) olarak, rapamisin hedef protein (rapamycin target (RAPT1)) ya da sirolimus efektör protein (sirolimus effector protein (SEP)) olarak da bilinmektedir. 289 kDa ağırlığında serin/tironin özgül kinazdır. İnsan, fare ve sıçanda TOR proteinleri amino asit seviyesinde %95 oranında korunmuştur. Bu korunma Huntingtin, elongation factor 3, protein fosfataz 2A'nın bir alt ünitesi (PP2A) ve TOR (HEAT motifleri)'dan oluşan amino terminalindeki 20 ardışık amino asitten kaynaklanmaktadır.

Bir FRAP-ataxia-teleangiectasia (FAT), bir transformasyon/trans-kripsiyon domeyin-iliskili protein domeyini, bir FKBP12 rapamisin bağlayıcı (rapamycin binding (FRB)) domeyini, bir katalitik kinaz domeyini, muhtemel bir otoinhibitör ya da baskılayıcı domeyini ve bir FAT karboksil-terminal domeyini bulundurmaktadır. C terminalindeki katalitik kinaz domeyini PI3K'nın lipid kinaz domeyini ile oldukça homoloji gösterir. Bu nedenle mTOR, PI3K ilişkili kinaz (PI3K-related kinase (PIKK)) ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir. Bu ailenin üyeleri hücre büyümesinin kontrolü, hücre siklusu, DNA hasarı kontrol noktaları, ve rekombinasyon ya da telomer uzunluğunun korunması gibi temel hücresel fonksiyonlarda rol alırlar. PI3K ilişkili kinazlarda meydana gelebilecek bir fonksiyon bozukluğu neticesinde çeşitli kanser türlerinden immün yetmezlik kadar çok sayıda hastalık ile karşılaşmaktadır [113-115].



Şekil 2.5.1.1. mTOR'un yapısı [116].

mTOR'un yapısındaki farklı bölgelerin fosforile olması ile mTOR aktif hale geçmekte ve P-mTOR adını almaktadır [42]. mTOR'un farklı aktivasyonlarında bir tirozin (T2446) ve iki serin (S2448 ve S2481) bölgesi fosforile olabilme yeteneğindedir. Serin-2448'in fosforilasyonu TORC1 kompleksinde, Serin-2481'in fosforilasyonu TORC2 kompleksinde görev almaktadır. TORC1'deki aktif formu Rapamisin tedavisine hassastır [43]. mTOR'un fosforilasyonu PI3K yolağının akışını ve mTOR yolağında P70S6 kinaz (p70S6K) oluşmasını ve diğer taraftan Rho, PKC α ve Akt oluşmasını sağlamaktadır (Şekil 2.5.1).

2.5.2. Subselüler Lokalizasyonu

mTOR hücre içerisinde golgi aparatı, endoplazmik retikulum, mitokondri, çekirdek ve sitoplazma gibi pekçok bölgede yerleşim göstermektedir. mTOR farklı kompleksler oluşturarak farklı bölgelerde lokalize olmakta ve hücrede farklı görevleri yerine getirmektedir. Biyokimyasal olarak total membranlardan pürifiye edilebilmektedir [117]. mTOR'daki FRB domeyini fosfatidik asite bağlanabilir ve fosfatidik asit de mTOR'un membrana lokalizasyonuna aracılık edebilir [118]. Aynı zamanda mTOR, HEAT tekrarları sayesinde golgi/endoplazmik retikulumda da yerleşim gösterebilir [119]. mTOR bilinmeyen bir mekanizma ile çekirdek ve sitoplazma arasında taşıyıcı göreve sahiptir [120]. mTOR'un farklı hücresel kompartmanlardaki lokalizasyonu mTOR'un pekçok farklı hücresel işlemin kontrolünde rol aldığının göstergesi kabul edilmektedir.

2.5.3. Ligandlar ve Diğer Proteinler ile İlişkileri

2.5.3.1. mTORC1

mTOR kompleks 1 ana komponentleri: mTOR, Raptor [34, 121, 122] ve mLST8'dir [122, 123]. mTORC1 aynı zamanda negative düzenleyicileri PRAS40 [124-126] ve FKBP38 [127] ve pozitif düzenleyicileri Rheb [128] ve Rag [129, 130] ile ilişki kurmaktadır. mTORC1 aynı zamanda eIF3 ve YY1/PGC-1 α transkripsiyonel komplekse de bağlanabilmektedir.

2.5.3.2. mTORC2

mTOR complex 2 ana komponentleri: mTOR, Rictor (mAVO3) [37, 41, 122], Sin1 [131, 132] ve mLST8. mTORC2 aynı zamanda PRR5/PRR5L (Protor 1/Protor 2) ile de ilişki kurmaktadır [125, 133, 134].

mTOR'un dahil olduğu Fosfotidil İnozitol Kinaz (PIK)-ilişkili kinazlar (PIKK), Tel2 ile ilişki kurlarlar [135]. Ancak Tel2'nin mTORC1 ile mi yoksa mTORC2 ile mi ya da her iki kompleks ile mi ilişkide olduğu bilinmemektedir.

2.5.4. Fenotipleri

Farede mTOR'un ya da mTORC'nin silinmesi ölümcüldür. Bu durum mTORC1 ve mTORC2 için büyüme ve gelişmede gerekli bir rol ileri sürmektedir.

mTOR Geni Çıkarılmış:

Farede mTOR geni tüm vücutta silindiği zaman embriyonik dönemde ölüm izlenmektedir. Homozigot olarak (mTOR^{-/-}) bu gen farede silindiğinde embriyonik (E) E5,5. ya da E6,5. [136, 137] günde ölüm görülmektedir.

Raptor Geni Çıkarılmış:

mTOR'a benzer olarak, Raptor geni homozigot olarak silinmiş fareler de embriyonik E5,5. ya da E6,5. günde ölmektedirler. Bu durum mTORC1 komponentlerinin embriyonik gelişimin aynı evrelerinde gerekli olduğunu göstermektedir [138].

Sin1 Geni Çıkarılmış:

Sin1 geninin silinmesi farede E10. günden sonra embriyonal ölüm ile sonuçlanmaktadır. Sin1 geninin eksikliğinde Rictor ilişkili mTORC2 bozulmaktadır. İlginç olarak, Sin1'in çıkarılması ile Akt/PKB HM fosforilasyonu (Ser 473'de) eksikliği meydana gelmektedir. Foxo1/3a'nın Akt/PKB tarafından fosforile olabilmesi için de Sin1'e ihtiyaç duyulmaktadır [131, 132].

Rictor Geni Çıkarılmış:

Farede Rictor geninin çıkarılması ile E10,5. günde ölüm gerçekleşmektedir ve PKB HM fosforilasyonunda eksiklik izlenmektedir. Bu durum, Rictor ve Sin1'in mTORC2 fonksiyonu için gerekliliğini göstermektedir. Foxo1/3a'nın fosforilasyonu Rictor, Sin1 ve mLST8'ye ihtiyaç duyarken, Akt/PKB'nin hedefleri GSK3 ve TSC2'nin fosforilasyonu Rictor'un eksikliği üzerinde etkisizdir. Rictor ya da mLST8 genlerinden birinin silinmesi PKC α protein seviyesinde düşüş meydana getirmektedir [138, 139].

mLST8 Geni Çıkarılmış:

Şaşırtıcı olarak, mLST8'in hem mTORC1'in hem de mTORC2'nin komponenti olmasına rağmen, mLST8 geni silinmiş fareler, fenotipik olarak Rictor geni homozigot olarak silinmiş farelere benzemekte ve E10,5. günde ölmektedirler. Ayrıca mLST8'in, Akt/PKB HM fosforilasyonu için gerekli iken S6K sinyal yolağı için gerekli olmadığı belirlenmiştir. Bu veriler, mLST8'in yalnız mTORC2 için gerekli bir role sahip olabileceğini ileri sürmektedir. Yine Rictor geni homozigot olarak silinmiş farelere benzer olarak, mLST8 geninin çıkarılması PKC α protein seviyesinde düşüş medana getirmektedir [138].

2.5.5.mTOR'un Rol Aldığı Görevler

2.5.5.1. Translasyon

mTOR translasyonun başlamasını ve uzamasını aktive etmektedir. mTORC1; eIF4E bağlayıcı proteinler (4E-BPs)'in fosforilasyonu ve inhibisyonu ile cap-bağımlı translasyonun başlatılmasını sağlar [140-142]. Fosforile olan 4E-BP1, eIF4E'yi serbest bırakır. Daha sonra eIF4E, eIF4G ile ilişki kurarak translasyonu uyarır [143]. Buna ek olarak mTORC1, S6K'yı C-terminal hidrofobik motif bölgesinden fosforiller [144]. Komple bir aktivasyon için; S6K'nın mTORC1 tarafından fosforilasyonu ve fosfoinozotid-bağımlı kinaz 1 (phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)) tarafından loopun aktivasyonu gereklidir. Aktive olan S6K, eIF4B'nin fosforilasyonunu, programlı hücre ölümü protein 4 (programmed cell death protein 4 (PDCD4)) [145] ve eEF2 kinaz (eEF2K) [146] ile translasyonu başlatır.

eIF4B ve PDCD4'nin fosforilasyonu translasyonun başlatılmasını aktive eder, halbuki eEF2K'nin fosforilasyonu translasyonun uzamasını upregüle etmektedir. S6K, 40S ribozomal protein S6'yı da fosforillemektedir, ancak bu fosforilasyonun önemi bilinmemektedir. mTORC1, kendi substratları 4E-BP1 ve S6K ile Raptor ve 4E-BP1 ve S6K'da bir TOR sinyal motifi (TOS) aracılığıyla ilişki kurar [147, 148]. TOS motifi korunmuş bir beş aminoasit dizisine sahiptir (4E-BP1'in C-terminal bölgesinde FEMDI ve S6K1'in N terminal bölgesinde FDIDL), bu dizi mTORC1'in bu proteinleri fosforilleyebilmesi için gereklidir.

2.5.5.2. Ribozom Biyogenezi

mTORC1 ribozomların sentezini ve RNA'ların (tRNA'lar) taşınımını sağlamaktadır. Rapamisin; RNA polimeraz I (Pol I)-bağımlı rRNA genlerini, Pol II-bağımlı ribozomal protein genlerini (RP genleri) ve Pol III-bağımlı tRNA genlerinin transkripsiyonunu inhibe ederek ribozomal biyosentezi inhibe etmektedir [149]. mTOR, gerekli transkripsiyon başlatıcı faktör TIF-1A (Transcriptional Intermediary Factor 1A) ile Pol I'i kontrol etmektedir [150]. Rapamisin uygulaması TIF-1A inaktivasyonuna

neden olur ve böylece transkripsiyon başlatıcı kompleksin oluşması bozulur. mTOR aynı zamanda ribozom biyogenezi de translasyon seviyesinde kontrol eder [151].

2.5.5.3. Besin Taşınımı

Spesifik besin taşıyıcılarının TOR-aracılı düzenlenmesi, maya dan insana kadar korunmuş bir fonksiyondur. Maya da, TORC1 aminoasit ve glukoz taşıyıcılarını onların geri dönüşümlerini bloklayarak devam ettirmektedir [152]. Benzer olarak, mTOR besin taşıyıcılarının trafiğini de kontrol etmektedir ve böylece pekçok farklı tipte besin alımını sağlamaktadır. Memelilerde, Akt/PKB-mTORC1 yolu; glukoz, aminoasitler, demir ve lipoproteinler için spesifik taşıyıcıların hücre yüzey ekspresyonlarını kontrol etmektedir [153]. *Drosophila melanogaster*'de, TORC1'in aminoasit transportunda bir rolü olduğu henüz gösterilmemiştir. Bu nedenle sadece TORC2, sineklerde aminoasit transferi için önemli olabilir [154]. mTOR'daki regülasyon bozukluğu, fazla glukoz alımı ile tümörlerde sıklıkla görülen artmış glukoz transportu nedeniyle tümör geneze katılabilmektedir.

2.5.5.4. Otofaji

TOR, makrotofajinin bir upstream inhibitörüdür, sitoplazmada meydana gelen bir açlık indüklü katabolik işlem ile etrafı çift membran yapısı ile çevrilir ve yıkım için vakuollere dağıtılır. Maya da TOR, protein kinaz ATG1 (autophagy-specific gene 1)'i inhibe ederek negatif olarak makrotofajiyi kontrol etmektedir [155]. *D.melanogaster*'de, TOR mutant larvalar, aktif TOR tarafından inhibe edilen makrotofaji göstermektedirler [156]. Fare ve insan doku kültüründe, rapamisin makrotofajiyi indükler, mTORC1 bir otofaji inhibitörü gibi rol oynar [157]. Buna ek olarak, tümör hücreleri zayıf büyüme şartlarının üstesinden gelebilmek için besin azaldığında geçici olarak otofajiyi aktive edebilirler. Bu durum mTOR düzensizliğinin hastalık işlemine katıldığını göstermektedir (Şekil 2.5.5.4.1).

2.6. Hipotez

Polikistik over sendromunda, foliküllerde yer alan granuloza hücreleri hızlı bir bölünme göstermektedir. Böylelikle foliküllerin ve dolayısıyla ovaryumun hacimsel bir artışı söz konusudur. PCOS'a sahip olan hastaların overlerinde yüksek düzeyde granuloza ve teka hücresi proliferasyonu gerçekleşmektedir. Bu durum bize; mTOR sinyal yolağının, PCOS'da granuloza ve teka hücrelerinin yüksek düzeydeki proliferasyonundan sorumlu olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmamızda, mTOR sinyal yollarından birinin ya da her ikisinin (TORC1 ve TORC2) PCOS mekanizmasında rol alabileceğini düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak, PCOS oluşturulan fare modelinde mTOR sinyal yolağının/yolaklarının etkili olup olmadığını belirlemeyi amaçlıyoruz.

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. PCOS Deney Modelinin Oluşturulması

Çalışmada üç grupta toplam 30 adet Balb/C fare kullanılmıştır. İlk grubumuzu hiçbir şey verilmeyen kontrol grubu ve ikinci grubumuzu ise PCOS fare modeli oluşturmaktadır [47, 161]. PCOS fare modelinin oluşturulması için prepubertal 25 günlük 10 adet Balb/C türü fareye 20 gün süre ile subkutan DHEA (Dihidroepiandrosteronedion) (0.01ml 95% etanol içerisinde çözülerek [162, 163] ve 0.09ml susam yağı ile karıştırılarak) (IL,USA) (6mg/100g) verimiştir. Üçüncü grup 10 adet Balb/C türü fareye 0.01ml 95% etanol ve 0.09ml susam yağı karışımı verilerek Çözgen grubu oluşturulmuştur (Çizelge 3.1.1).

Çizelge 3.1.1.Deney modelinin oluşturulması.

Grup 1 (Kontrol) (K)	Hiçbir uygulama yapılmayan grup
Grup 2 (PCOS) (P)	20 gün DHEA (6mg/100g vücut ağırlığı dozda 0.01ml 95% etanol içerisinde çözülen ve 0.09ml susam yağı ile karıştırılan) verilen grup
Grup 3 (Çözgen) (Ç)	20 gün 0.01ml 95% etanol ve 0.09ml susam yağı karışımı verilen grup

Deneye başlama aşamasında ve gruplar oluşturulup deney tamamlandığında, doku diseksiyonu yapılmadan önce hormon düzeylerini belirlemek amacıyla deneklerden kan örnekleri alındı. Daha sonra deneklerden alınan ovaryum örnekleri

1. Rutin paraffin doku takibi ve Hematoksilen-Eozin boyaması,
2. İmmunohistokimya,

3. Western blot ve
4. RT-PCR teknikleri uygulanmak üzere ayrıldı.

3.2. Ovaryum Örneklerinin Alınması ve Hazırlanması

3.2.1 Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi

Alınan ovaryum örnekleri tamponlanmış %4'lük Paraformaldehid fiksatifine içine alınarak 6 saat tespit (fikse) edildi. Tespitten sonra, dokular sırasıyla %70, %80, %90 ve %100 şeklinde artan derecelerdeki etil alkol serilerinden her birinde 24 saat tutularak suyu alındı. Örnekler ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra 55°C'de eriyen paraffin içerisine gömülerek bloklandı [164].

3.3. Hematoksilen-Eozin Boyama ile Histolojik İnceleme

Çalışmamızda farede PCOS oluşturulan grup ile çözelti ve kontrol gruplarını morfolojik olarak karşılaştırmak ve gruplar arasındaki histolojik farklılıkları ortaya koymak amacıyla Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi gerçekleştirildi [164].

3.4. mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) ile Çiftli İmmünohistokimya Yöntemi

PCOS oluşturulan gruptan ve kontrol gruplarından alınan ovaryum dokularında proteinlerin varlığını ve yerleşimlerini göstermek amacıyla çiftli immünohistokimya yöntemi kullanıldı.

Bu yöntemde aynı kesit üzerinde iki farklı antijenin iki farklı immünohistokimyasal sistem (Peroksidaz (HRP) ve Alkalen Fosfataz (AP) sistemleri) kullanılarak farklı iki renkte görünür hale getirilmesi sağlandı. Bu yöntemle mTOR ve P-mTOR (Serin-2448) antikorları çiftli immünohistokimya için kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar:

• PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz Solüsyonu):

- 7.2 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck)
- 0.8 gr KH_2PO_4 (Merck)
- 16 gr NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve 2N NaOH ile pH'sı pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

- **1 mM EDTA Tamponu:**

0,372gr EDTA (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂.2H₂O) (Sigma) 1000 ml distile su içerisinde çözüldü ve 2N NaOH ile pH'sı pH=8.0 olacak şekilde ayarlandı.

- **%3'lük H₂O₂ Solüsyonu:**

63 ml distile su ve 7 ml %30 H₂O₂ (Merck) ilave edilerek şale içerisinde hazırlandı.

- **Bloklama Solüsyonu:** %5 Normal Keçi Serum

50µl normal keçi serumu (vector), 950µl PBS içerisinde çözülerek hazırlandı.

- **Antikor Dilüent Solüsyonu:** Large Volume UltrAb Diluent (#TA-125-UD;LabVision)

- **Streptavidin Peroksidaz Kiti:** UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use) Kit (#TP-060-HL; LabVision)

- **Alkalen Fosfataz Kiti:** Dako Cytomation LSAB2 System-AP (#K0676; Dako)

- **HRP sistemi için Kromojen:** 3, 3' diaminobenzidine (DAB, #K3466; Dako)

- **AP sistemi için Kromojen:** Fast Red Substrate System (#K0699; Dako)

- **Mayer'in Hematoksileni:** Mayer's Hematoxylin (#S3309; Dako)

- **Kapatma Solüsyonu:** Gliserol Jelatin; Kaiser's Glycerol Gelatine (#1.04095; Merck)

Gözlem:

- **Işık Mikroskobu:** Zeiss Axioplan ve Olympus BX53

İmmunohistokimya boyaması için kesitler 5 µm kalınlığında superfrost-manyetik olarak statik olan lamalar üzerine alındı. Bu kesitler 54°C'lik etüvde gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitler 2 defa yirmişer dakika ksilolden geçirilerek parafinden kurtarıldı. Daha sonra kesitler 2 defa onar dakika azalan alkol serilerinden (%100, %95) geçirilerek rehidrate edildi. Ardından, önce distile suda sonra PBS'te beşer

dakika yıkandı ve taze hazırlanan 250 ml EDTA (pH: 8.0) tamponunda ilk olarak 6 dakika 700 Watt'lık mikrodalga ışınlamaya, ardından 15 dakika 300 Watt'lık mikrodalga ışınlamaya maruz bırakılarak antijenik epitoplara açığa çıkması sağlandı. Kesitler mikrodalga uygulaması sonrasında distile su ile üç kere beşer dakika oda ısısında yıkandı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini doyumak için, kesitler %3'lük H₂O₂ solüsyonu içinde oda ısısında 10 dakika bekletildi. Kesitler 2 kere beşer dakika distile su ile ardından 5 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanmaları engellemek (bloke etmek) için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine mTOR anti tavşan primer antikoruna eklendi ve +4 °C'de nemli ortamda gece boyu inkübe edildi. PBS'le yıkama işleminden sonra biyotinlenmiş birinci sekonder antikorla (LabVision) oda ısısında 1 saat inkübe edildi. TBS-T ile yıkandıktan sonra streptavidin-peroksidaz (HRP) ile 30 dakika muamele edildi. Yıkama işlemlerinden sonra kesitlerin üzerine peroksidazın substratı olan DAB kromojeni damlatılarak oluşan reaksiyon görünür hale getirildi. DAB kromojeni ile antijenin bulunduğu yapılar kahverengi olarak izlendi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra hemen alkalen fosfataz (AP) sisteminin kullanıldığı ikinci immünohistokimyasal boyamaya geçildi. Kesitler, bloklama yapmadan ikinci primer antikor ile P-mTOR anti tavşan primer antikoru ile gece boyu +4 °C'de inkübe edildi. Yıkamaların ardından biyotinlenmiş ikinci sekonder antikor ile 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. Yıkama işlemlerinden sonra streptavidin-Alkalen fosfataz (AP) ile 30 dakika oda ısısında tutuldu. Tekrar yıkanan kesitlerdeki reaksiyon, alkalen fosfatazın substratı olan Fast Red kromojeni ile geliştirildi. Fast Red kromojeni reaksiyon alanlarında pembe renk oluşumuna neden oldu. Fast red kromojeni alkolde çözündüğü için kesitler dehidrate edilmeden gliserol jelatin ile kapatıldı.

Primer antikorlar, negatif kontrol, sekonder antikorlar ve bunlara ait dilüsyon oranları Çizelge 3.4.1'de verilmiştir. mTOR ile P-mTOR çiftli boyamaya tabi tutuldu.

Çizelge 3.4.1. Çiftli immünohistokimya deneyinde kullanılan primer antikor, sekonder antikor ve izotip kontroller.

PRIMER ANTİKOR	KATALOG NUMARASI	DENEY	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	İZOTİP KONTROL
mTOR	#2983 Cell Signaling	Çiftli immünohistokimya	1/100	#AI-1000 Vector	Fare IgG
P-mTOR	#2976 Cell Signaling	Çiftli immünohistokimya	1/100	#AI-1000 Vector	Fare IgG

3.5. Western Blot Analizi

Kullanılan Solüsyonlar

10X Yürütme Tamponu:

- 25 mM Tris (Sigma)
- 192 mM Glisin (Sigma)
- %0.1 SDS (Sigma)

1 litre bidistile su içerisinde çözöldü ve oda ısısında saklandı. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

5gr. süt tozu (Bio-Rad) 100 ml. TBS-T içerisinde çözöldü ve +4°C'de saklandı.

10X TBS-T Tamponu:

- 24.4 gr. Tris
- 80 gr. NaCl

1 litre bidistile su içerisinde çözöldü ve oda ısısında saklandı. Distile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

TBS-T Solüsyonu:

1 litre 1X TBS içerisine 1000µl Tween-20 (Bio-Rad) eklendi ve oda ısısında saklandı.

Transfer Tamponu:

- 14.4gr. Glisin (Sigma)
- 3.05 gr. Tris (Sigma)

700 ml. bidistile su içerisinde çözöldü. Bu solüsyona 200 ml. Metanol (Merck# 1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim 1000 ml. olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

%10'luk Poliakrilamid Jel

1.Jel: Aşağıda belirtilen karışım hazırlanarak ilk jel 2 cam plaka arasına dököldü. Yaklaşık 45 dakika oda ısısında donmaya bırakıldı.

- 3,75ml Protein Gel Mix (American Bioanalytical#AB00147-00500)
- 3,75ml 4X Tris-HCL/SDS ph:8,8

Sodyumdodesilsulfat (SDS) (Sigma#L-4390)

- 7,5 ml H₂O
- 50 µl %10 APS

Amonyumpersulfat (APS) (Sigma#A9164)

- 10 µl Temed

TEMED (Tetramethylethylenediamine) BioRad#161-0801)

2.Jel: Birinci jelin donmasının ardından aşağıda belirtilen karışım hazırlanarak birinci jelin üzerinde eklendi. Ardından uygun genişlikteki tarak jel içerisine yerleştirildi.

- 650 µl Protein Gel Mix
- 1250 µl 4X Tris-HCL/SDS ph:6,8
- 3050 µl H₂O
- 25 µl %10 APS
- 5 µl Temed

Membranın Soyulma (stripping) Aşaması için:

TBS-T içerisinde %2'lik SDS hazırlandı. Kullanmadan önce her mililitre için 70 µl β-merkaptetanol eklendi. 65°C'de 30 dk. inkübe edildi. Ardından membran TBS-T ile birkaç defa yıkandı.

Enhanced Chemiluminiscent Solüsyonu (ECL, Perkin Elmer#NEL103001EA)

İmmun-blot™ PVDF Membran (BioRad# 162-01177)

3.5.1. Doku Ekstraktı Hazırlanması:

- a. Tüm gruplardan alınan doku örnekleri T-PER (Pierce) örnek tamponu eklenerek homojenizatörde 5 dakika parçalanarak homojenize edildi.
- b. Örneklerin içerdikleri protein miktarları tespit edildi.
- c. Yükleme solüsyonu ile 1/1 oranında karıştırıldıktan sonra 5 dakika 95 °C'de su banyosunda kaynatıldılar.

Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak %10'luk jel hazırlandı ve 30 mikrogram/ml oranında protein içeren numuneler yüklendi. Elektroforezde numuneler ilk önce 120V 30mA'de 20 dakika, sonrasında ise 80V 30mA'de jelin sonuna kadar yürütüldü. Elektrofezin ardından jeldeki proteinleri membrana aktarmak için immunoblotting yapıldı. Blotlama işlemi 15V 90mA'de gece boyu +4°C'de gerçekleştirildi. Proteinlerin PVDF transferinden sonra, pH'sı 7.4 olan, % 0.1 Tween-20

ilaveli Tris Buffer Solüsyonu (TBS-T) ile yıkama yapılarak membran 1,5 saat süre ile oda ısında TBS-T ile hazırlanan % 5'lik yağsız süt tozu ile bloklandı. Bloklamanın ardından 5 dakika TBS-T ile yıkandı. Membran daha sonra belirli oranlarda %5'lik BSA (5 gr bovin serum albumin 100ml TBS-T içerisinde çözülerek hazırlandı) içerisinde dilüe edilmiş primer antikor ile +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanarak, % 5'lik yağsız süt tozu ile hazırlanan sekonder antikorla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10 dakika yıkanıp chemiluminisans ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip karanlık odada membrandaki protein bantları hiperfilme aktarıldı. Film developer ve fiksatiften geçirilip, distile su ile yıkanıp ardından kurutuldu. Tüm bu işlemler ayrı ayrı mTOR, P-mTOR (Serin-2448), P-mTOR (Serin-2481), Raptor, Rictor, P70S6K, fosfo-P70S6K, PKC α , fosfo-PKC α ve β -aktin antikorları için de tekrarlandı.

Çizelge 3.5.1.1. Western blot deneyinde kullanılan primer antikor ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	Katalog Numarası	Deney	Dilüsyon	Sekonder Antikor
mTOR	#2983 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
P-mTOR (Serin-2448)	# 2971 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
P-mTOR (Serin-2481)	# 2974 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
Raptor	#2280 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
Rictor	#2114 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
P70S6K	#2708 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
P-P70S6K	#9234 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
PKCalpha	#2056 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
P-PKCalpha	#9375 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
GBetaL	#3274 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific
Beta aktin	#A1978 Sigma	Western blot	1/1000	#PI-2000 Vector

3.6. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

PCOS deney modelinde ovaryumlarda meydana gelen yüksek hücre proliferasyonunun gösterilmesi için SET8 (PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Cell signaling)) antikoru ile tüm örneklerle western blot analizi yapılarak gruplar arasındaki proliferasyon farkı gösterilmiştir.

Çizelge 3.6.1. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi için kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Primer Antikor	Katalog Numarası	Deney	Dilüsyon	Sekonder Antikor
SET8 (PCNA)	#2996 Cell Signaling	Western blot	1/1000	#31460 Thermo Scientific

3.7. mRNA'nın Niceliğinin RT-PCR ile ölçülmesi

Kullanılan Malzemeler

TRIzol (İnvitrogen)

Kloroform (Baker)

%100 İzopropanol Alkol (Baker)

%70'lik Alkol (steril)

Steril su (DEPC (Diethylpyrocarbonate)-Treated Water, Ambion#AM9915G)

Supertaq (Ambion#2052 (250U)).

RNaz inhibitörü Roche-03335399001(2000 unit)

Oligo (dT)12-18mer primer (Invitrogen-18418-012)

RNaz içermeyen H₂O

Revers Transkriptaz (Omniscript)- Qiagen 205111

dNTP karışımı (10mM, Roche)

dNTP karışımı (5mM, Roche)

Taq polimeraz enzimi (Roche)

Agaroz (Amerikan Bioanalitik)

Etidyum bromid (Bio-Rad)

50X TAE (Tris Asetik asit EDTA) solüsyonu:

242 gr. Tris-Base

57.1 ml. Asetik Asit

100 ml. 0.5M EDTA (pH: 8.0)

1 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve 1X olacak şekilde dilüe edilerek kullanıldı.

3.7.1. Total RNA İzolasyonu Basamakları:

1. Ovaryum dokuları tartılıp ağırlıkları not edildi, ardından bistürü ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra, homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Ardından steril 1.5 ml'lik tüplere alınarak üzerine 1 ml TRIzol eklenip 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
2. İnkübasyonun sonunda tüplere 200 µl kloroform eklenerek 2-3 dakika oda ısısında bekletildi.
3. Süre sonunda tüpler, 15 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminden sonra tüplerin üstünde RNA'nın bulunduğu şeffaf kısım, mikropipetle ile dikkatli bir şekilde steril 1.5 ml'lik tüplere alındı.
5. Tüplere, 500 µl izopropanol eklenip yavaşça çalkalandı ve oda ısısında 10 dakika bekletildi.
6. Süre sonunda, 10 dakika 15000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
7. Santrifüj sonrası süpernatant atılıp geriye kalan pelet üzerine %70'lik etanolden 1 ml konuldu. Sonra 7 dakika 12000 rpm'de santrifüj gerçekleştirildi ve süpernatant atıldı.
8. Yedinci basamakta gerçekleştirilen işlemler, 1 ml %100 etanol ile tekrarlandı.
9. Santrifüjden sonrası elde edilen pelet oda ısısında 20 dakika kurumaya bırakıldı, ardından 25 µl steril distile su ile çözüldü.
10. Çözülmüş olan RNA'yı içeren tüpler, 50°C'de 10 dakika inkübe edildikten sonra -80°C'de saklandı.

3.7.2. İzole Edilen RNA Miktarının Ölçülmesi

Her bir grup için hazırlanan örneklerin RNA miktarları spektrofotometre ile ölçüldü.

3.7.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

cDNA eldesi aşağıda belirtilen basamaklarla gerçekleştirildi.

1. Her tüpe 8 µl konulan temel karışım, aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 3.7.4. cDNA eldesi için temel karışım.

Komponent	Miktar/Reaksiyon	Final Konsantrasyon
Master miks		
10X Tampon RT	2.0 µl	1X
dNTP miks (5 mM her bir dNTP)	2.0 µl	0.5 mM her bir dNTP'den
Oligo-dT primer (10 µM)	2.0 µl	1 µM
RNase inhibitör (10 units/µL)	1.0 µl	10 ünite (her 20 µl reaksiyona)
Omniscript reverse transcriptase	1.0 µl	4 ünite (her 20 µl reaksiyona)
RNase-free su	Değişken	
Template RNA		
Total volüm		-

- Her bir tüpe 8 µl temel karışımdan konulup, karıştırıldı ve kısa süre döndürüldü.
- 0.2 µl'lik reaksiyon tüpüne izole edilmiş olan RNA'dan 10 µl konulup, 2 µl RNase-free su eklenerek total miktar 20 µl'ye tamamlandı.
- Reaksiyon tüpleri, 42 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
- Daha sonra, 92 °C'de 10 dakika inkübasyon işlemi sonunda elde edilen cDNA'lar, -20 °C'de saklandı.

3.7.4. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan Reverse Transcriptase PCR tekniği, gen ekspresyonu çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Çalışmada, her hücrede sabit miktarda eksprese olduğu bilinen beta aktin geninin ekspresyonu temel alınarak ovaryum dokusunda mTOR, Raptor, Rictor, P70S6K, PKCα ve β-aktin genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi.

- Yukarıda elde edilen cDNA bu aşamada kullanıldı.

2. Aşağıdaki tabloda belirtilen reaktantlar konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Çizelge 3.7.4.1. PCR reaksiyonu için temel karışım.

Komponent	Miktar/Reaksiyon	Final Konsantrasyon
Master mix		
Distile su	12µl	
10X PCR Tamponu	2µl	1X
dNTP (2.5mM her bir dNTP)	1.6µl	0.2mM her bir dNTP'den
Supertaq (5U/µl)	0.4µl	2U/20 µl reaksiyon
Primer İleri (10 µM)	1µl	0.5 µM
Primer Geri (10 µM)	1µl	0.5 µM
Kalıp DNA	1µl	
Total	20 µl	

3. Referans DNA olarak beta aktin kullanıldı. Çizelge 3.7.4.2.'de RT-PCR tekniğinde kullanılan primerler verilmiştir.

Çizelge 3.7.4.2. PCR reaksiyonu için kullanılan primer çiftleri.

Dizinin adı	Dizinin büyüklüğü	Dizinin açılımı
mTOR	150bp	sense, TTG GAG TGG CTG GGT GCT GA antisense, AAG GGC TGA ACT TGC TGG AA
Raptor	148 bp	sense, GCC ATC ACAGAT ACC ATC GC antisense, CTG CTT ACT GGGGTG CAG TT
Rictor	110 bp	sense, GAG AAC GTC CCG CTC GAT CT antisense, TGG CCCAGC TTT CTC ATA TT
LST8 (GβL)	138 bp	sense, GAC TAA GGC AGA GTG CAG AG antisense, AAA AGC GCA CCG TGT GGT CA
P70S6K	300 bp	sense, CTTGGCGAAT TAAGGGCTGC antisense, GCATAGGCCAGTTCTACAAT
PKCalpha	300 bp	sense, GTCCTGCACCGGTTGGCGAA antisense, GACCCACAGTGATCACAGAA
β-aktin	399bp	sense, GAT GAC GAT ATC GCT GCG CTG antisense, GTA CGA CCA GAG GCA TAC AGG

PCR Programı

Kullanılan PCR programlarının basamakları ve her basamakta kaç tekrar yapılacağı aşağıda belirtilmiştir. mTOR, Raptor, Rictor, P70S6K ve Beta aktin için 1. program; LST8 (GBetaL), PKCalpha ve Beta aktin için 2. program kullanılmıştır.

1.Program

- | | |
|------------------------|--|
| 1. basamak (1 tekrar) | 95 °C’de 5 dakika |
| 2. basamak (35 tekrar) | 95 °C’de 45 saniye
59 °C’de 1.15 saniye
72 °C’de 45 saniye |
| 3. basamak (1 tekrar) | 72 °C’de 7 dakika |
| 4. basamak | 14 °C’de istenildiği kadar. |

2.Program

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| 1. basamak (1 tekrar) | 95 °C’de 5 dakika |
| 2. basamak (35 tekrar) | 95 °C’de 45 saniye |
| | 58 °C’de 1.15 saniye |
| | 72 °C’de 45 saniye |
| 3. basamak (1 tekrar) | 72 °C’de 7 dakika |
| 4. basamak | 14 °C’de istenildiği kadar. |

3.7.5. %1,5’luk Agaroz Jelin Hazırlanması ve PCR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

Deney düzeneğimizde %1,5’luk agaroz jel kullanıldı. Bunun için 1,5 gr agaroz 100 ml 1X TBE Tiris Buffer EDTA) (2X TBE: 20 L 432 g Tris + 220 g Borik asit + 38 g EDTA, pH= 8-8.5) ile karıştırılıp, mikrodalga fırında agaroz eriyip solüsyon şeffaf bir görüntü alana kadar kaynatıldı. Biraz soğuduktan sonra içerisine her 100 ml için 1 µl Etidyum Bromid eklenerek jel kabı içerisine dökülerek içerisine örnek sayısına göre seçilen bir tarak yerleştirilerek donmaya bırakıldı. Jelimiz soğuduktan sonra örneklerimiz 6X yükleme tamponu ile belirli oranlarda karıştırılarak jelimizin kuyucuklarına yüklendi. Uygun görülen voltteki elektrik akımı ile yürütülüp ardından görüntüleme cihazında görüntüleme yapıldı.

3.8. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Deney grupları oluşturulmadan önce ve oluşturulduktan sonra hayvanlardan kan alınıp kanda östradiol ve progesteron düzeylerine bakılarak PCOS oluşturduğumuz grupları hormon seviyeleri açısından da doğrulamak için ELISA yöntemi gerçekleştirildi.

Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar:

- Estradiol ELISA kiti (#ERK R7005, Endocrine Technologies)
- Progesteron ELISA kiti (#ERK R7011, Endocrine Technologies)
- µQuant BioTek Spektrofotometre

Estradiol kiti içerisindekiler:

- Sekonder antibadi ile kaplı 96 kuyucuklu test kabı
- Anti E2 antibadi
- Enzim konjuge solüsyon
- TMB renk ajanı

- Durdurma solüsyonu
- 20X Yıkama solüsyonu
- Örnek dilüsyon solüsyonu
- E2 standartları seti:0, 10, 30, 100, 300, 1200, 5000pg/mL

Progesteron kiti içerisindeki:

- Progesteron antitadisi kaplı 96 kuyucuklu test kabı
- Enzim konjuge solüsyon
- Örnek/standart dilüsyon solüsyonu
- TMB renk ajanı
- Durdurma solüsyonu
- 20X Yıkama solüsyonu
- Progesteron standartları seti: 0,1.0, 2.5, 5.0, 10, 30ng/mL

3.8.1.Deneklerden Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Deney grupları oluşturulmadan önce hayvanların tümünden, vajinal simir ile bakılarak, estrus siklusa kan örnekleri alındı. Kan örnekleri heparin enjektörü ile kalp içerisine (intrakardiyak olarak) girilerek alındı. Her bir hayvandan yaklaşık 5cc kan alınarak, kanlar 12000 rpm’de 10 dakika sentrifüj edildi. Alınan süpernatantlar -80 °C’de saklandı. Gruplar oluşturulduktan sonra hayvanlara, Rompun (1-1,5 ml/10 kg) ve Ketalar (10-15 mg/kg) kombinasyonunun kas içi enjeksiyonu ile anestezi yapıldı. Gruplar oluşturulduktan sonra her bir gruptaki hayvanlardan da sakrifiye etmeden önce hormon seviyelerini belirlemek için yine kan örnekleri alındı. Hayvanların anestezisi ardından boyun kırma işlemi ile hayatları sonlandırıldı. Alınan kan örnekleri 12000 rpm’de 10 dakika sentrifüj edildi ve toplanan süpernatantlar -80 °C’de saklandı.

3.8.2. ELISA Yöntemi

Örnekler -80 °C’deki derin dondurucudan çıkarıldı ve buz üstünde erimeleri beklendi. östrojen ve progesteron ELISA kiti üreticinin tavsiyesi doğrultusunda oda ısısına getirildi. Konsantre halde gelen yıkama solüsyonu sulandırıldı. Her kuyucuğa hangi örneğin ve hangi standardın konacağı önceden belirlendi ve kayıt edildi. Her örnek ve standart ikiyeşerli olarak çalışıldı.

Standardlar, örnekler, dilüent ve yıkama solüsyonu hazırlandıktan sonra ELISA testi için aşağıdaki basamaklar uygulandı:

Östrojen:

1. Standart, örnek ve QC solusyonlarının her birinden 25µl alınarak uygun kuyucuklara koyuldu.
2. Her kuyucuk üzerine enzim konjuge solüsyonundan 100µl eklendi (boş kuyucuk hariç).
3. Tüm kuyucuklara anti-tavşan östrojen antikorundan 50µl eklendi ve 30 saniye çalkalandıktan sonra 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 5 kez her defasında 250-300µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.
5. Tüm kuyucuklara (boş kuyucuk da dahil) 100µl TMB substrat solüsyonundan eklendi ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi.
6. Ardından 50µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.
7. Kuyucuklar µQuant BioTek Spektrofotometrede 450nm dalga boyunda okundu.

Progesteron:

1. Standart, örnek ve QC solusyonlarının her birinden 25µl alınarak uygun kuyucuklara koyuldu.
2. Her kuyucuk üzerine progesteron enzim konjuge solüsyonundan 100µl eklendi (boş kuyucuk hariç). 30 saniye iyice karıştırıldı ve 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Petri kabının üzeri parafilm ile kaplandı.
3. Daha sonra kuyucukların içeriği boşaltıldı ve tüm kuyucuklar 5 kez her defasında 250-300µl ile olacak şekilde yıkama solüsyonu ile yıkandı.
4. Tüm kuyucuklara (boş kuyucuk da dahil) 100µl TMB substrat solüsyonundan eklendi ve 10 dakika oda ısısında çalkalamadan inkübe edildi.
5. Ardından 50µl durdurma solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı.
6. Kuyucuklar µQuant BioTek Spektrofotometrede 450nm dalga boyunda okundu.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Proje neticesinde Western blot deneyi sonucunda elde edilen bantlar NIH’in ImageJ program kullanılarak ölçüldü ve bu sonuçlardan elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları Windows için SigmaStat sürüm 3.0 (Jandel Scientific Corp. San Rafael, CA) kullanılarak yapıldı. $p < 0.05$; istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

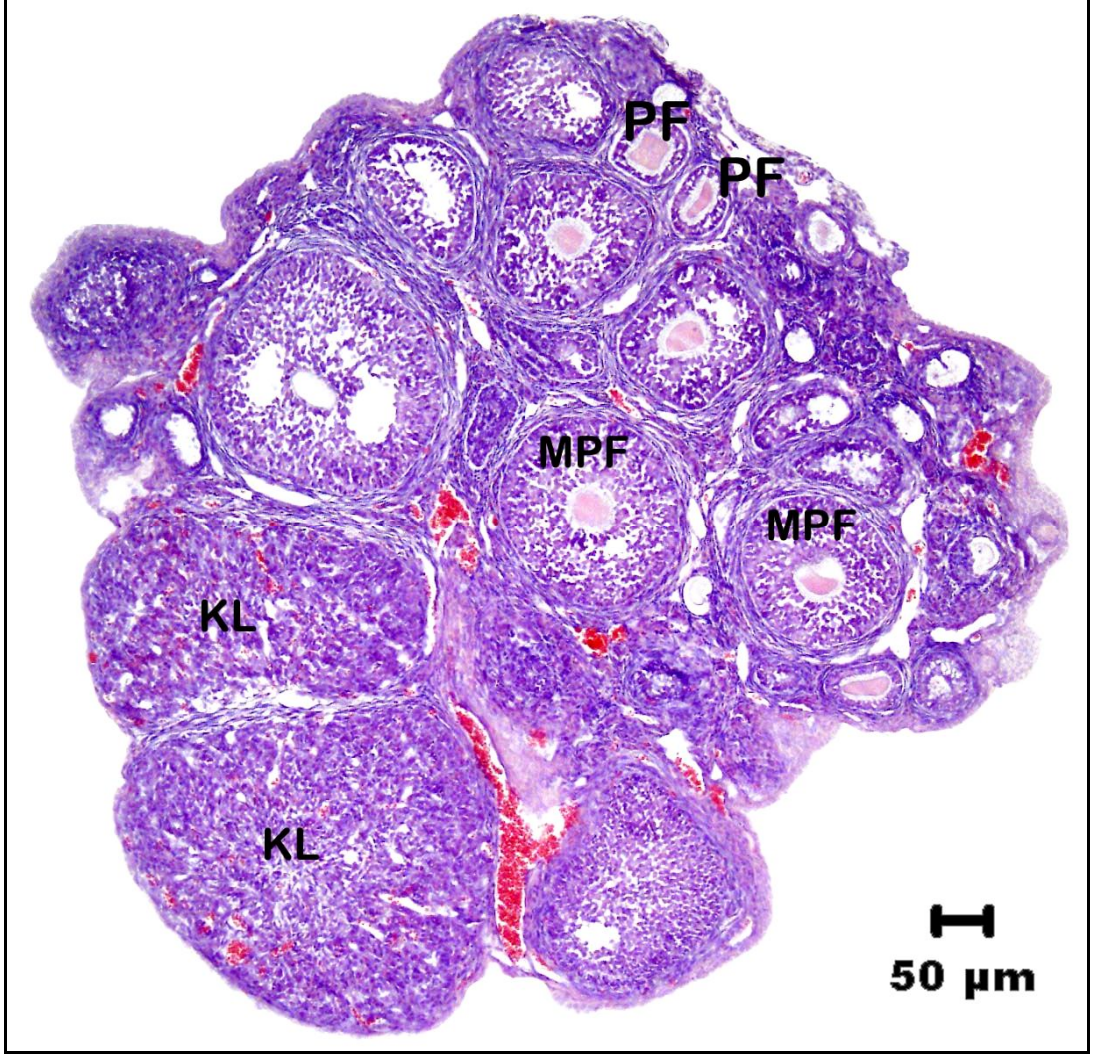
BULGULAR

Oluşturulan PCOS fare modeli ile kontrol grupları makroskobik olarak değerlendirildikten sonra, diseke edilen ovaryum örneklerinde, immünohistokimyasal yöntemlerle mTOR ve P-mTOR analizleri yapıldı. mTORC1 ve mTORC2 protein komplekslerindeki proteinlerin ve ilişkide oldukları sinyal yolağı proteinlerinin değerlendirilmesi için Western blot tekniğı uygulandı. Aynı sinyal yolağı genlerinin ekspresyonlarına ise RT-PCR tekniğı kullanılarak, mRNA düzeyinde bakıldı ve istatistiksel değerlendirmeleri yapıldı. Deney modelimizi biyokimyasal olarak doğrulamak amacıyla, alınan kan örneklerinde ELISA yöntemi ile estradiol ve progesteron hormonları düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

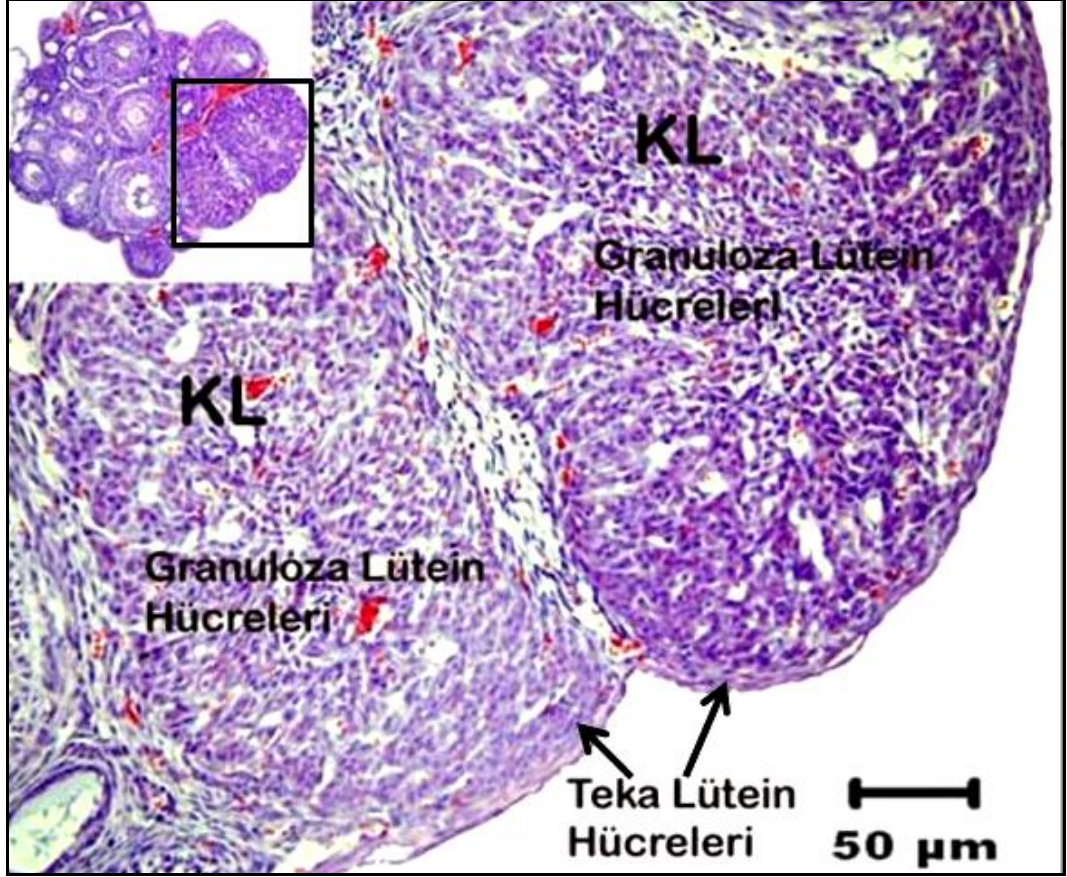
4.1.Hematoksilen-Eozin Boyama ile Deney Gruplarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

PCOS'lu fare ovaryumlarını kontrol grubu ile karşılaştırmak için Hematoksilen-Eozin boyama ile morfolojik değerlendirme yapıldı.

Kontrol grubunda, ovaryum preparatlarında kortekste foliküler gelişimin farklı aşamalarında normal görünümlü gelişmekte olan foliküller izlendi. Kontrol grubu ovaryumlarda foliküller arasında yeralan stroma kompakt yapısıyla dikkat çekiciydi. Kontrol grubundaki ovaryumun korteksinde yeralan foliküllerin teka tabakasındaki ve ovaryumun medulla bölgesindeki damarların normal yoğunlukta olduğu belirlendi. Foliküllerin büyük bölümü gelişim evresi bakımından senkronizasyon göstermekteydi. Foliküller içerisindeki primer oositlerin morfolojik olarak sağlıklı bir görünüme sahip olduğu gözlemlendi. Foliküler gelişimin yoğunluğu nedeniyle medulla çok dar alanda izlenebildi (Şekil 4.1.1). Bir önceki siklusta ovulasyonun ardından gelişmiş birkaç korpus luteum yapısı henüz deformasyon izleri göstermeksizin normal yapılarını göstermekteydi (Şekil 4.1.2).

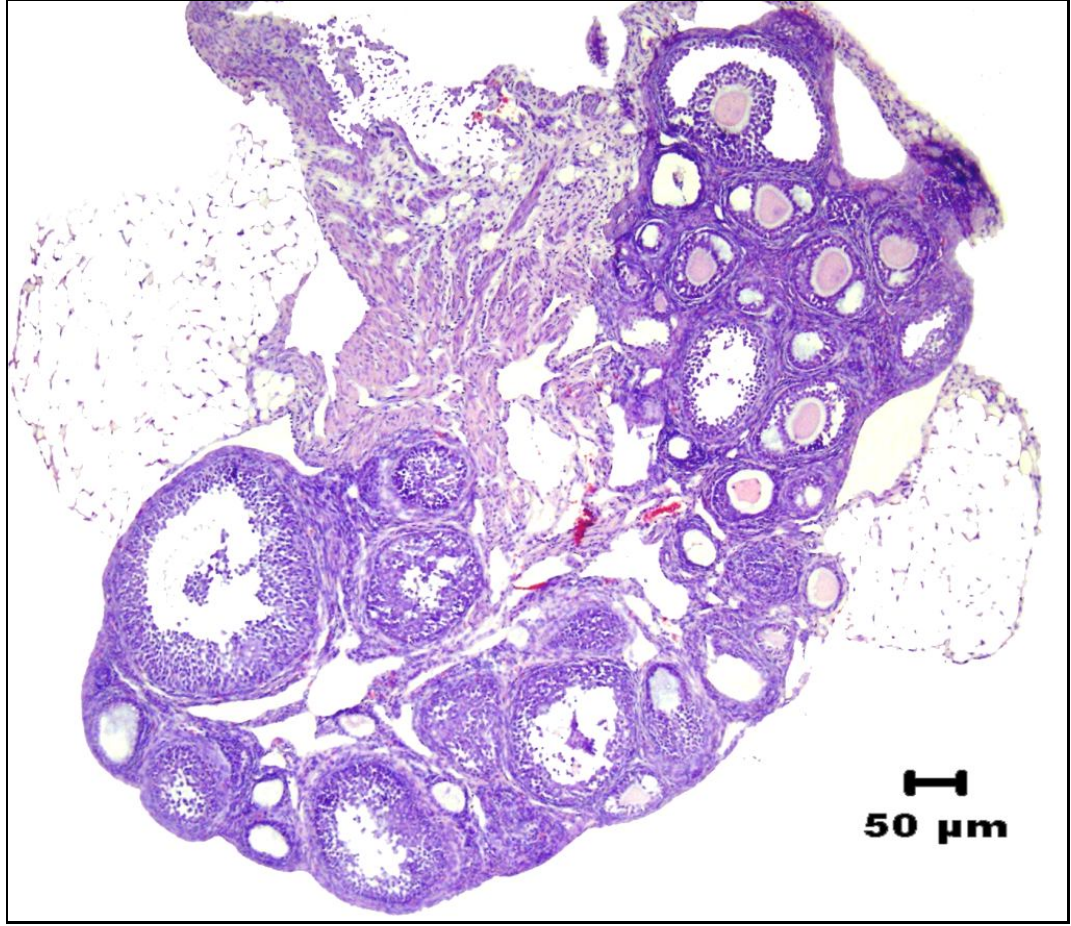


Şekil 4.1.1. Kontrol grubu ovaryumun ışık mikrosafı. Primer (PF) ve sekonder (MPF) düzeyde folikül örnekleri sağılıklı yapılarıyal izlenmekte. Periferde bir önceki döngüde ovulasyonu takiben gelişmiş korpus luteum (KL) yapıları hala net olarak görölmekte. Hematoksilen-Eozin (H-E).



Şekil 4.1.2. Kontrol grubu ovaryumda izlenen korpus luteumların (KL) normal yapılarını koruduğu henüz deformasyon izleri göstermedikleri görülüyor. Korpus luteumda yeralan granuloza lutein hücreleri ve teka lutein hücreleri de izlenmektedir. Küçük şekil ovaryumun genel görüntüsünü göstermektedir (H-E).

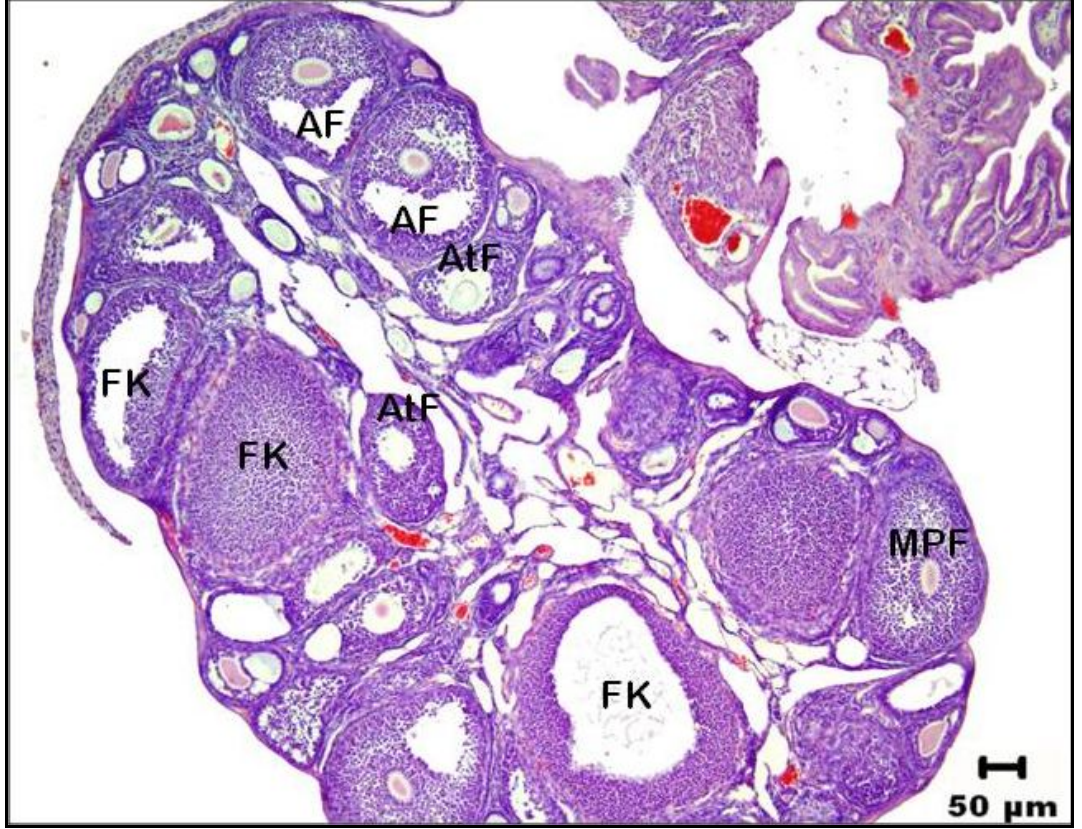
Çözgen verilen gruptaki ovaryumların morfolojik yapılarının kontrol grubu ile benzer olduğu belirlendi. Bu gruptaki ovaryumlarda gelişimin farklı aşamalarında sağlıklı foliküllerin yer aldığı izlendi (Şekil 4.1.3).



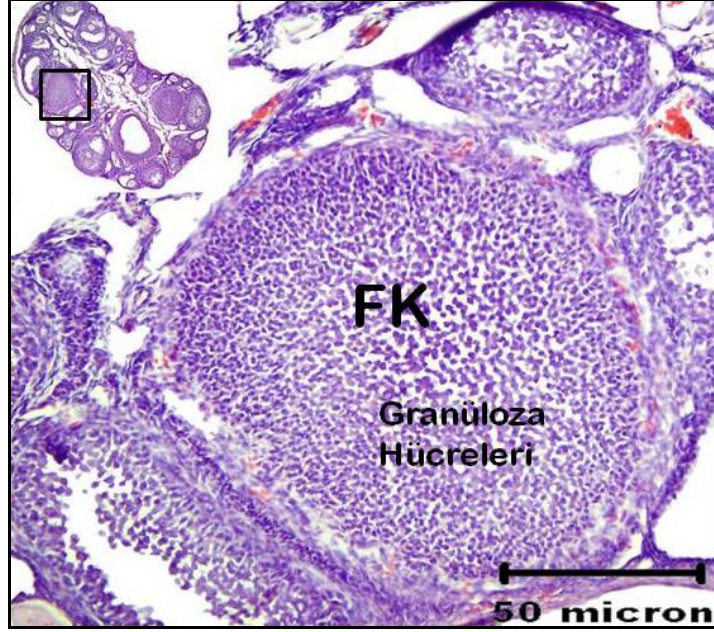
Şekil 4.1.3. Çözgen verilen gruptaki ovaryum mikrofrafı. Ovaryum farklı evrelerde foliküller içermekte. (H-E).

PCOS grubu ovaryumları korteksde farklı gelişim aşamasında bulunan foliküller sergiliyordu.(Şekil 4.1.4). Ancak; foliküller içerisindeki primer oositlerin genel görünümünde morfolojik olarak sağlıklı bir görünüme sahip olmadıkları gözlemlendi. Diğer gruplara göre atretik folikül miktarının daha fazla olduğu belirlendi (Şekil 4.1.6 ve 7). PCOS grubuna ait tüm ovaryum bloklarından seri kesitler alınarak incelendiğinde bu gruptaki ovaryumların korpus luteum yapısına sahip olmadıkları belirlendi. Böylece bu grupta ovulasyonun gerçekleşmediği, foliküllerin bir bölümünün atrofiye olarak geriledikleri ve oositlerini kaybederek boş kistler şeklinde korteksde yer aldıkları görüldü. Ayrıca korteksde farklı gelişim evrelerinde çok sayıda gelişmekte olan folikülün yanısıra, ovule olamayan foliküllerin kistik yapılar oluşturmalarına bağlı olarak hacminin artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1.5). Foliküller arasında yeralan stromanın daha gevşek, ödemöz yapıda olduğu dikkat çekti. Korteksde foliküllerin teka

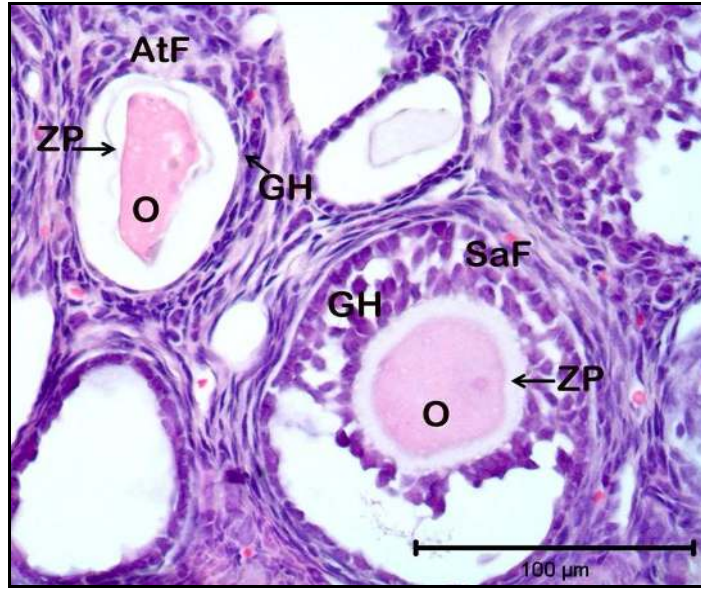
tabakasında ve medullada vaskularizasyonun artmış, damarların genişlemiş olduğu belirlendi (Şekil 4.1.4).



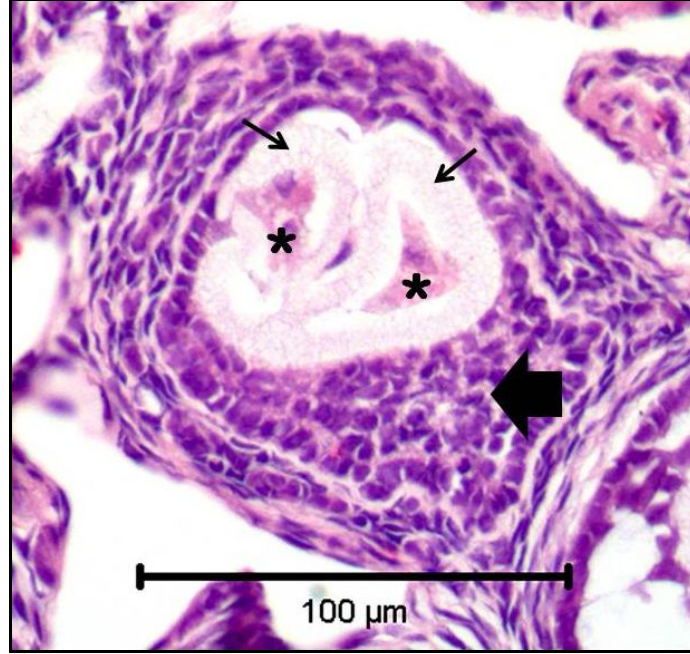
Şekil 4.1.4. PCOS grubu ovaryum mikrofrafı. Farklı evrelerde ve çok sayıda folikül nedeniyle ovaryum hacminin artmış olduğu izlenmekte. Medullada labirentler şeklinde birbiriyle bağlantılı genişlemiş sinuslar göstermekte. FK: Foliküler Kist, MPF: Multilaminar Primer Folikül, AtF: Atretik Folikül (H-E).



Şekil 4.1.5. PCOS grubundaki ovaryumda foliküler kist (FK) yapısı izleniyor. İçerisindeki küçük şekil PCOS'lu ovaryumun genel görüntüsüdür (H-E).



Şekil 4.1.6. PCOS grubundan alınan ovaryum örneklerinde atretik folikül sayısında artış belirlendi. Soldaki atretik folikülde (AtF) sağdaki sağlıklı folikül ile karşılaştırıldığında (SaF); oosit morfolojisinin (O) ve granuloza hücrelerinin (GH) morfolojilerinin bozulduğu, zona pellusidanın (ZP) dejenere olmaya başladığı izlenmektedir. AtF: Atretik Folikül, SaF: Sağlıklı Folikül (H-E).



Şekil 4.1.7. PCOS grubu ovaryumdan bir atretik folikül mikrofotografı. Folikül hücreleri tabakalarında düzensizlik (kalın ok) parçalanmış sitoplazması (*) ve zona pellusidasiyla (oklar) oosit dikkat çekici olarak görülüyor (H-E).

4.2. mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) Çiftli İmmünohistokimya Bulguları

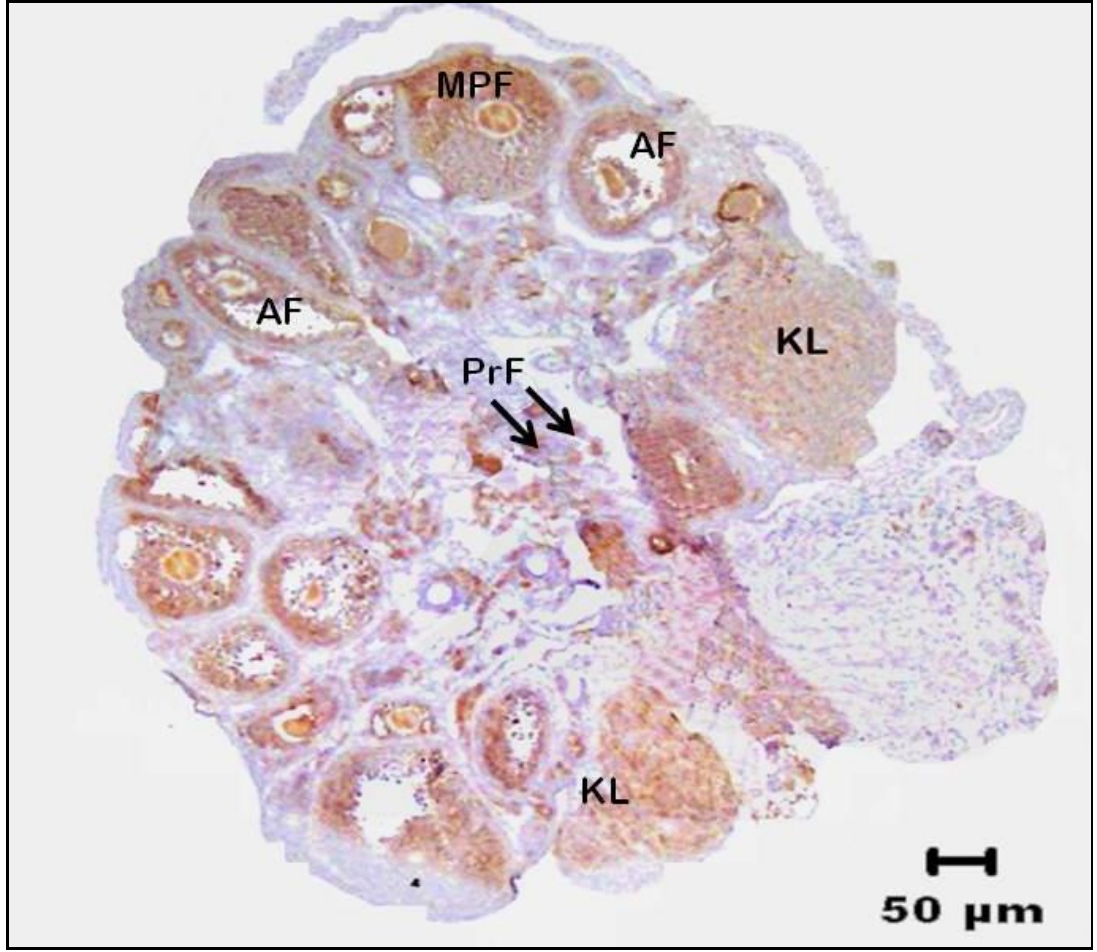
Farklı gruplardan elde edilen ovaryum dokularından alınan kesitlerde mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) proteininin nerelerde bulunduğunu gösterebilmek için immunohistokimyasal boyanmalar yapıldı. İmmünohistokimya boyanmaları sonucunda ovaryumlarda mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) proteinlerinin tespit edildiği yerler karşılaştırıldı.

Çiftli immünohistokimya yapılarak incelenen tüm gruplardaki ovaryum örneklerinde mTOR immünopozitivitesi foliküler gelişimin tüm evrelerindeki foliküllerde, granuloza hücrelerinin sitoplazmalarında izlendi. P-mTOR (Ser-2448) ise büyüyen foliküllerde yalnızca bölünmekte olan granuloza hücrelerinde ve teka interna hücrelerinde çekirdeklerinde immünopozitif olarak izlendi (Şekil 4.2.9).

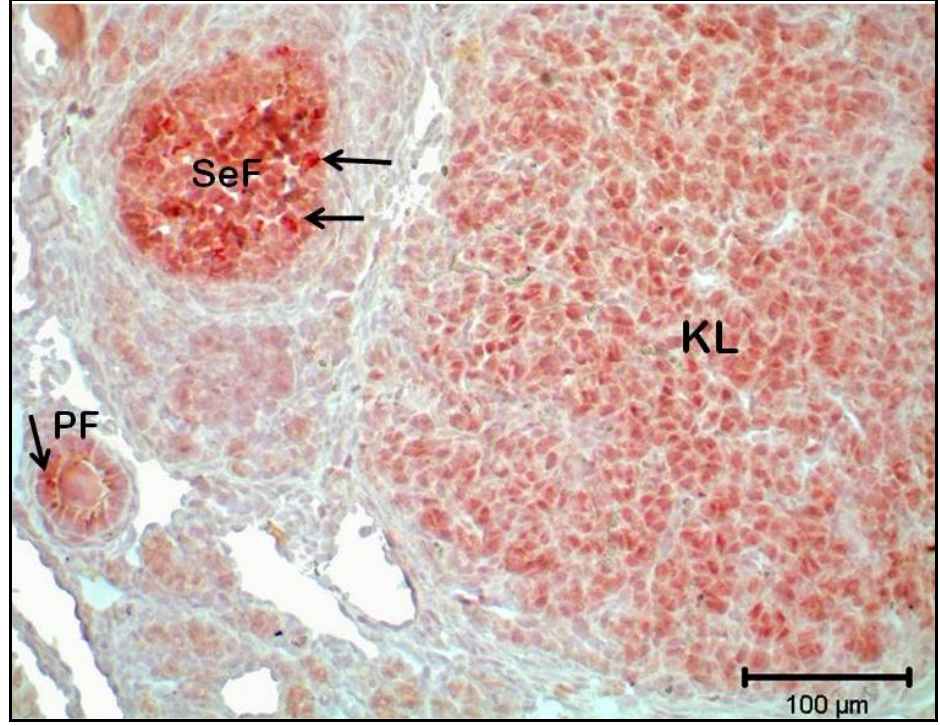
Foliküler gelişimin farklı aşamalarında folikül içerisinde yeralan primer ve sekonder oositler ise mTOR için sitoplazmik bir immün boyanma gösterdi (Şekil 4.2.1-4). P-mTOR (Ser-2448), oositte izlenmedi.

Kontrol ve çözgen grubu ovaryum örneklerinde izlenen korpus luteumdaki granuloza lutein hücrelerinde, foliküllerde yeralan granuloza hücrelerine kıyasla daha zayıf bir sitoplazmik mTOR ümmünoreaktivitesi gözlemlendi (Şekil 4.2.1 ve 4.2.2).

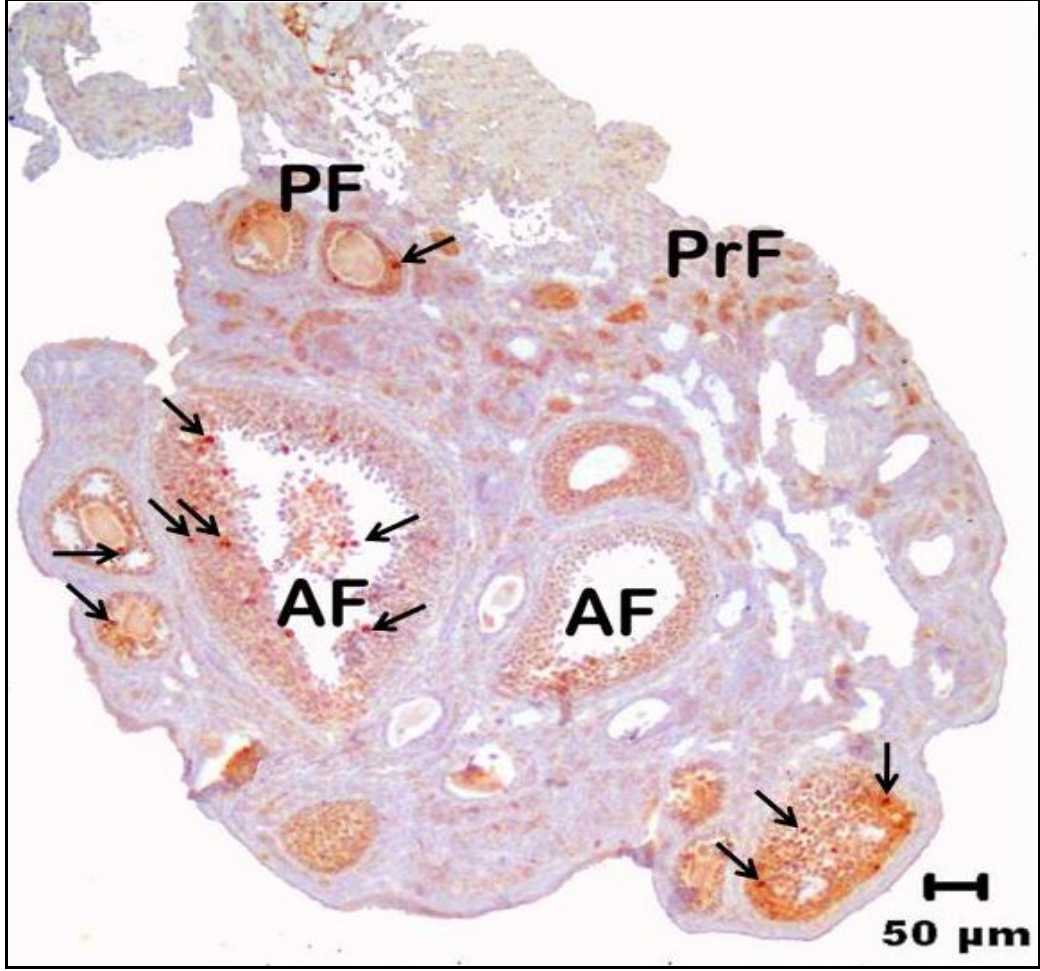
Değerlendirilen kontrol, PCOS ve çözgen grupları çiftli immünohistokimyasal boyama sonuçlarına göre; mTOR granuloza hücrelerinin tümünde varlığını korurken, P-mTOR (Ser 2448) bu hücrelerden sadece bölünmekte olanlarında immünopozitif boyanma göstermiştir. Bu gruplardan PCOS'lu ovaryumda P-mTOR (Ser-2448) protein immünoreaktivitesinin kesit düzeyinde diğer gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.1-4).



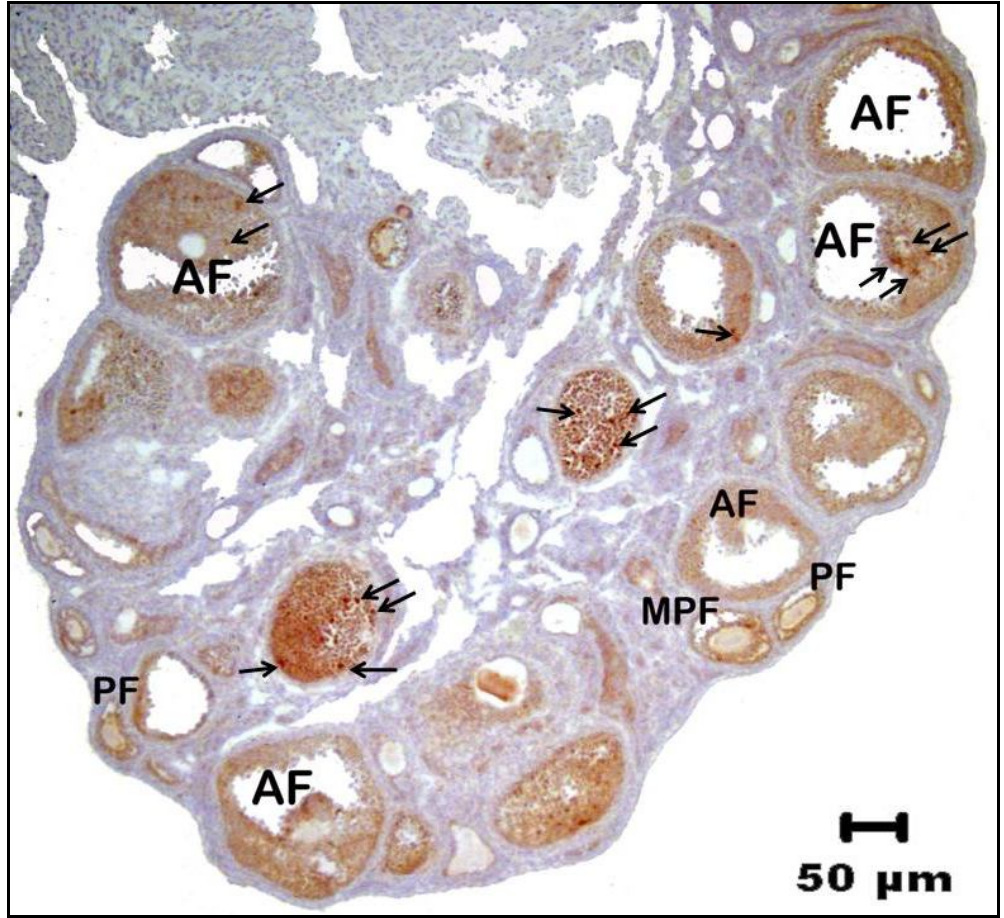
Şekil 4.2.1. Kontrol grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) çiftli immünohistokimya boyanması mikrofrafı. Genel olarak bakıldığında foliküler gelişimin farklı evrelerindeki büyüyen foliküllerde ve ovulasyonun ardından görülen korpus luteum yapısı izlenmektedir. Foliküllerde yeralan granuloza hücreleri ve oosit sitoplazmik olarak mTOR immünoaktivitesi gösterirken, bölünmekte olan granuloza hücreleri çekirdeksel olarak P-mTOR (Ser-2448) boyanması göstermektedir. Korpus luteumdaki granuloza lutein hücrelerinde, foliküllerde yeralan granuloza hücrelerine kıyasla daha zayıf bir sitoplazmik mTOR ümmünoaktivitesi belirlendi. KL: Korpus Luteum, PrF: Primordiyal foliküller (oklarla işaretli), MPF: Multilaminar Primer Folikül, AF: Antral Folikül.



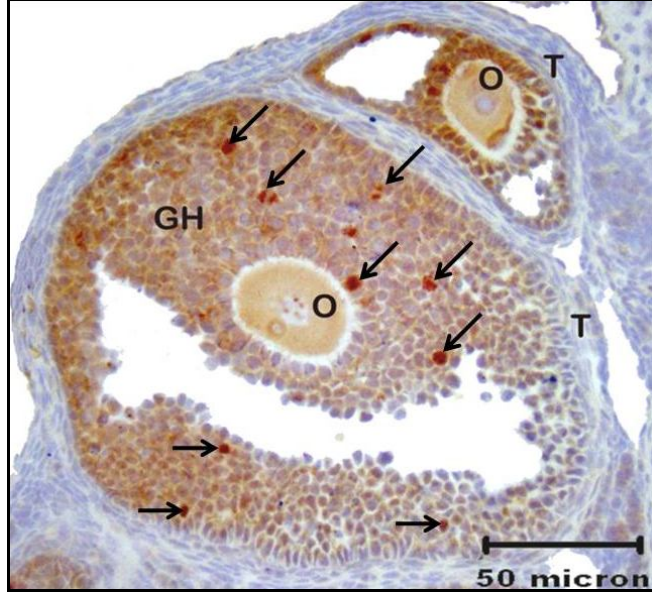
Şekil 4.2.2. Kontrol grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) çiftli immünohistokimya boyanması mikrofrafı. Oklar: P-mTOR (Ser-2448) pozitif immün boyanma gösteren folikül ve granuloza hücrelerini göstermektedir. PF: Primer Folikül, SeF: Sekonder Folikül, KL: Korpus Luteum.



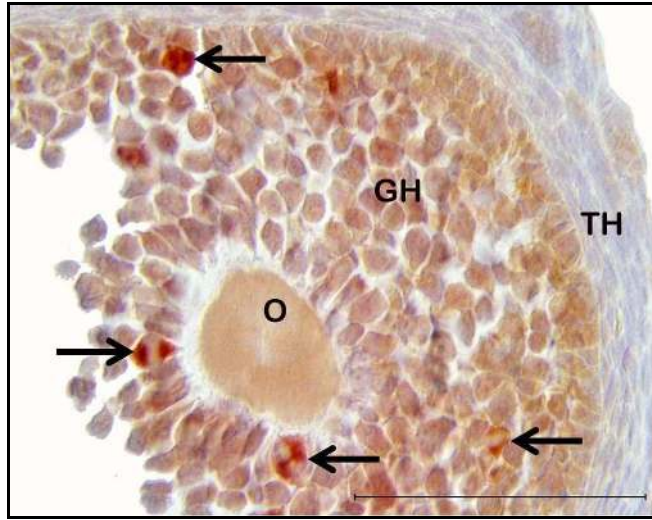
Şekil 4.2.3. Çözgen grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR (Ser-2448) çiftli immünohistokimya boyanması mikrofrafı. Foliküllerde yeralan granuloza hücreleri ve oosit sitoplazmik olarak mTOR immünoaktivitesi gösterirken, bölünmekte olan granuloza hücreleri çekirdeksel olarak P-mTOR (Ser-2448) boyanması göstermektedir (oklar). PrF: Primordiyal Folikül, PF: Primer Folikül, AF: Antral Folikül.



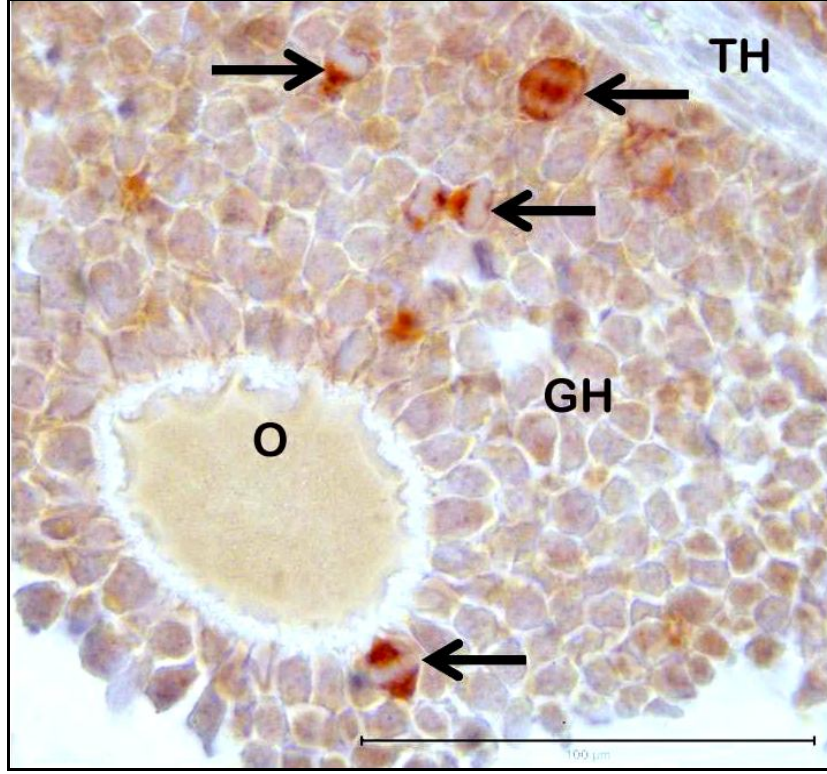
Şekil 4.2.4. PCOS grubu ovaryumda mTOR ve P-mTOR çiftli immünohistokimya boyanması mikrofrafı. PCOS grubu ovaryumda gelişmekte olan ve ovule olamamış çok sayıdaki folikülde granuloza hücrelerinde ve oositte sitoplazmik mTOR boyanması izlenirken, bölünmekte olan granuloza hücrelerinde çekirdeksel P-mTOR (Serin-2448) immünreaktivitesi (oklar) izlenmektedir. AF:Antral Folikül, MPF: Multilaminar Primer Folikül, PF: Primer Folikül.



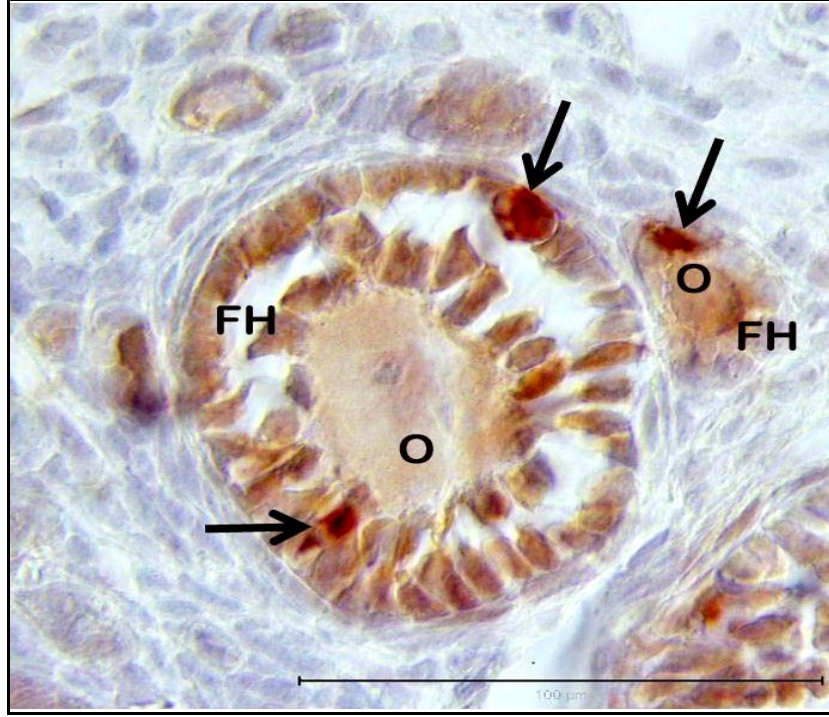
Şekil 4.2.5. mTOR ve P-mTOR çiftli immunohistokimya uygulanmış PCOS grubu ovaryumda antral folikül mikrografı. mTOR'un granuloza hücrelerinde sitoplazmik olarak yer aldığı kahverengi kromojenle izlenirken, P-mTOR (Serin-2448) kırmızı renkte kromojen reaksiyonuyla (oklar), mitotik hücrelerde oldukça güçlü bir immünreaktivite vermekte. O: Oosit, T: Teka hücre tabakası, GH: Granuloza Hücreleri.



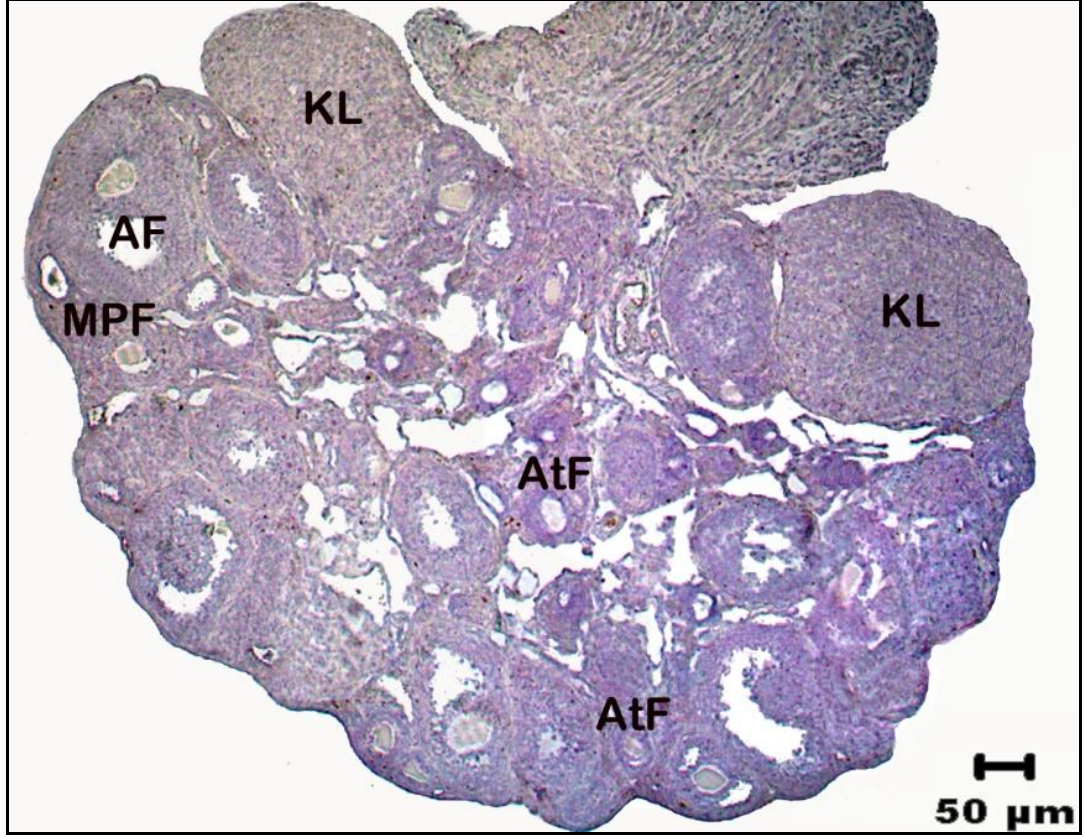
Şekil 4.2.6. mTOR ve P-mTOR çiftli boyaması yapılmış PCOS grubu ovaryumdan alınan bir tersiyer folikülün KOK (kumulus-oosit kompleksi) bölgesinin 100X büyütmedeki mikrografı. P-mTOR (Serin-2448) pozitif immün boyanması gösteren, hücrelerin (oklar) mitoz geçirmekte oldukları net olarak izlenmekte. O: Oosit, T: Teka hücre tabakası, GH: Granuloza Hücreleri.



Şekil 4.2.7. PCOS grubu ovaryumdan alınan bir tersiyer folikülün 100X büyütmedeki mikrosafı. Mitotik bölünmenin farklı aşamalarındaki granuloza hücreleri pozitif P-mTOR (Serin-2448) immünoreaktivitesi göstermektedir. O: Oosit, T: Teka hücre tabakası, GH: Granuloza Hücreleri. Oklar: P-mTOR (Serin-2448) pozitif immün boyanması gösteren, bölünmekte olan granuloza hücrelerini işaret etmektedir.



Şekil 4.2.8. PCOS grubu ovaryumdan alınan bir multilaminar primer folikülün (soldaki folikül) ve primordiyal folikülün (sağdaki folikül) 100X büyütmedeki mikrografı. Oklar: P-mTOR (Serin-2448) pozitif immün boyanması gösteren, bölünmekte olan folikül hücrelerini işaret etmektedir. O: Oosit, T: Teka hücre tabakası, FH: Folikül Hücreleri. Oklar: P-mTOR (Serin-2448) pozitif immune boyanması gösteren, bölünmekte olan folikül hücrelerini işaret etmektedir.



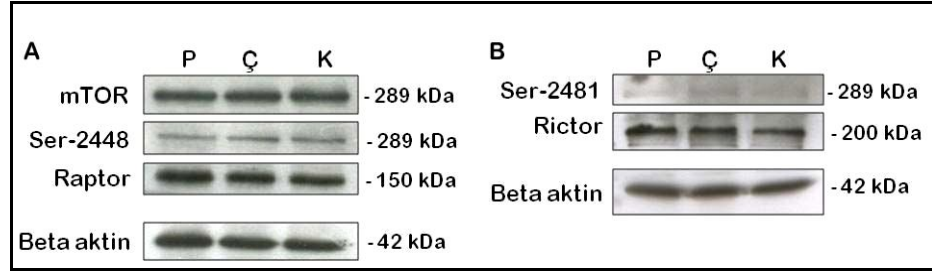
Şekil 4.2.9. Kontrol grubu ovaryum örneğinde negatif kontrol boyanması mikrografı. İmmünohistokimya boyanmasında negatif kontrol olarak kullanılan kesitte herhangi bir immün boyanma izlenmedi.

4.3. Western Blot Analizi Bulguları

Deney gruplarından alınan ovaryum dokularından T-PER ile protein izolasyonu yapıldı. Ardından PCOS deney grubunda ve kontrol grubundaki mTORC1 ve mTORC2 protein kompleksleri ve bu komplekslerin sırasıyla aktive ettiği P70S6K ile P-P70S6K ve PKCalpha ile P-PKCalpha proteinlerinin yoğunlukları western blot yöntemi ile belirlendi. Sonuçları kontrol etmek amacıyla β -aktin antikoru ile eşit miktarda protein kullanıp kullanılmadığı teyid edildi. Gruplardaki proteinlerin western blot bantları NIH'in ImageJ program ile okutularak değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

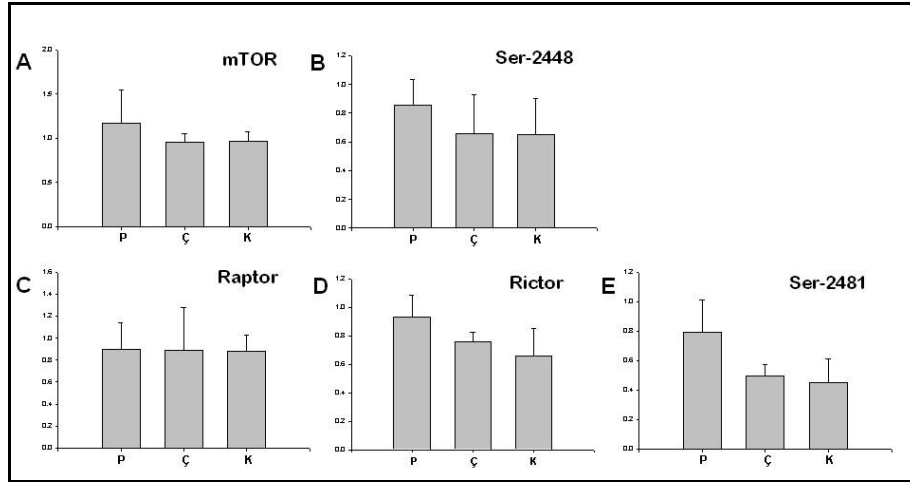
mTORC1 protein kompleksini oluşturan mTOR, P-mTOR (Serin-2448) ve Raptor proteinlerinin PCOS, çözgen ve kontrol gruplarındaki ekspresyonları şekil 4.3.1.A'da izlenmektedir. Gruplar arasında mTORC1 proteinlerinin bantları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.

mTORC2 protein komplekslerini oluşturan mTOR, P-mTOR (Serin-2481) ve Rictor proteinlerinin PCOS, çözgen ve kontrol gruplarındaki ekspresyonları şekil 4.3.1.B’de izlenmektedir. Gruplar arasında mTORC2 proteinlerinin bantları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark izlenmemiştir.



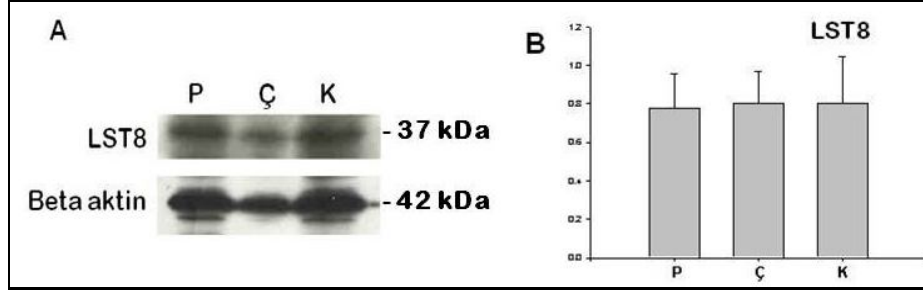
Şekil 4.3.1. mTORC1 ve mTORC2 proteinlerinin western blot bantları izlenmektedir. P: PCOS grubu, Ç:Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

PCOS deney grubundan alınan ovaryum dokularından izole edilen proteinlerdeki; mTOR, P-mTOR (Serin-2448), Rictor ve P-mTOR (Serin-2481) western blot bantlarının kontrol ve çözgen grubuna göre daha yoğun olduğu ancak bu yoğunluk farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Raptor için elde edilen bantların yoğunluğu ise gruplar arasında farklılık göstermedi (Şekil 4.3.2).



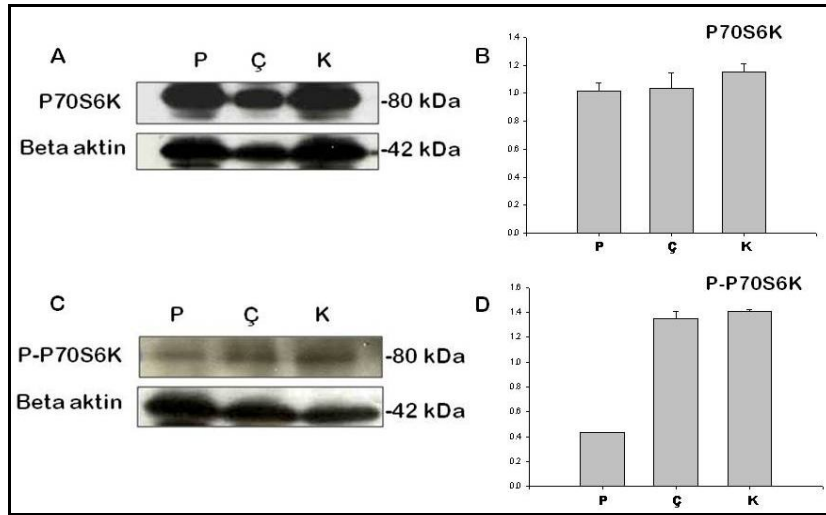
Şekil 4.3.2. mTORC1 ve mTORC2 proteinlerinin western blot bantlarının istatistiksel değerlendirilmeleri izlenmektedir. A, mTOR; B, P-mTOR (Serin-2448); C, Raptor; D, Rictor ve E, P-mTOR (Serin-2481).

mTORC1 ve mTORC2 omak üzere her iki kompleksin de üyesi olan LST8 (GβL) protein yoğunluğunun gruplar arasında fark göstermediği belirlendi (Şekil 4.3.3).



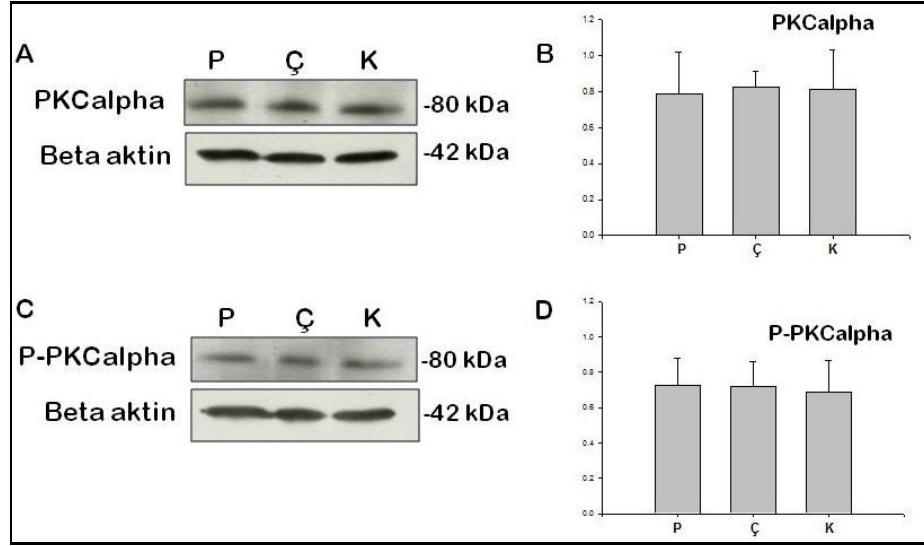
Şekil 4.3.3. LST8 (GβL) protein yoğunluğunun western bantları izlenmekte (A). LST8 (GβL) protein yoğunluğu gruplar arasında fark göstermemektedir (B). P: PCOS grubu, Ç: Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

mTORC1 sinyal yolağının son ürünlerinden biri olan P70S6K ve fosforile olan aktif formu P-P70S6K proteinlerinin western blot bantları değerlendirildiğinde; P70S6K için gruplar arasında bant yoğunluğu açısından herhangi bir farklılık gözlenmezken (Şekil 4.3.4.A ve B), P-P70S6K için PCOS grubunda kontrole göre azalma olduğu belirlendi (Şekil 4.3.4.C ve D) Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu değerlendirmede her üç grupta da, P70S6K'ın aktif formu olan P-P70S6K'dan daha yoğun bir ekspresyon gösterdiği belirlendi (Şekil 4.3.4.A ve C).



Şekil 4.3.4. P70S6K proteininin western blot bantlarının (A ve B) ve fosforile olan aktif formu P-P70S6K proteininin western blot bantlarının (C ve D) değerlendirilmesi. P: PCOS grubu, Ç: Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

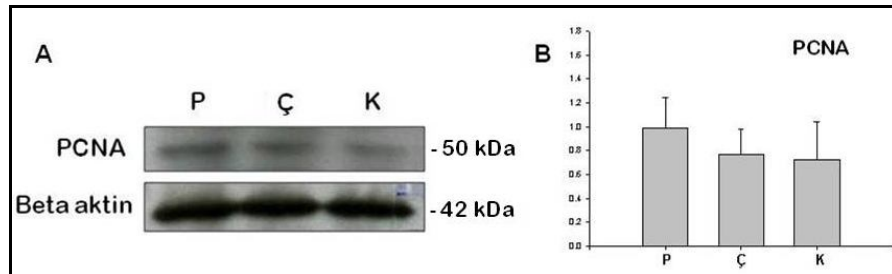
mTORC2 sinyal yolağının son ürünlerinden biri olan PKC α ve P-PKC α için her üç grupta da bant izlendi (Şekil 4.3.5.A-D). Bu bantların yoğunlukları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında PKC α ve fosforile formu olan P-PKC α için herhangi bir farklılık izlenmedi (Şekil 4.3.5.A-D).



Şekil 4.3.5. PKC α proteininin western blot bantlarının (A ve B) ve fosforile olan aktif formu P-PKC α proteininin western blot bantlarının (C ve D) değerlendirilmesi. P: PCOS grubu, Ç: Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

4.4. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

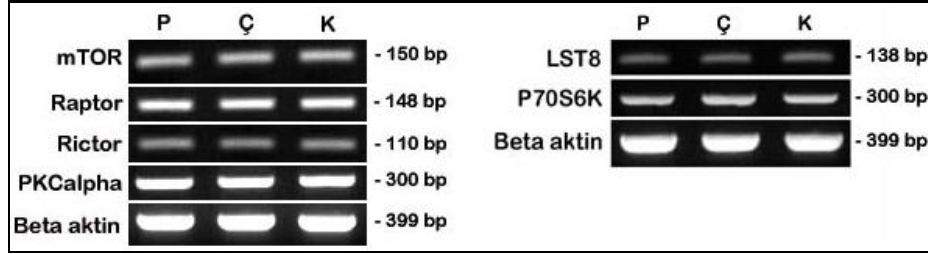
PCOS, çözgen ve kontrol gruplarındaki hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla PCNA antikoru ile western blot tekniği kullanılarak işaretleme yapıldı. Gruplar arasındaki bant yoğunlukları karşılaştırıldığında PCOS deney grubundaki proliferasyon olan hücre yoğunluğunun kontrole göre daha fazla olduğu belirlendi. Ancak gruplar arasındaki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. PCNA (SET8) proteininin western blot bantlarının (A) gruplar arasındaki değerlendirilmesi (B). P: PCOS grubu, Ç: Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

4.5. RT-PCR Bulguları

Deney gruplarından alınan ovaryum dokularından elde edilen mRNA'lar RT-PCR yöntemiyle cDNA'ya çevrilip çoğaltıldı. PCOS deney grubunda ve kontrol grubundaki mTORC1 ve mTORC2 gen kompleksleri ve bu komplekslerin sırasıyla aktive ettiği P70S6K ve PKCalpha genlerinin ekspresyonları belirlendi. RT-PCR tekniği uygulanırken iki farklı PCR program kullanıldı. Sonuçlar β -aktin primeri kullanılarak doğrulandı. Western yöntemi ile belirlenen sinyal yolağı proteinlerinin bulunma yoğunluklarına ek olarak deney gruplarında aynı sinyal moleküllerinin varlığı mRNA düzeyinde de belirlenmiş oldu (Şekil 4.5.1).



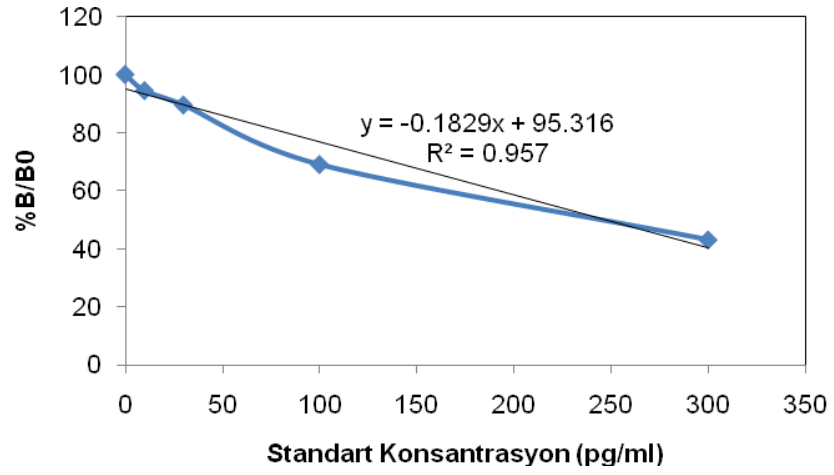
Şekil 4.5.1. RT-PCR deneyinin sonuçları. P: PCOS grubu, Ç: Çözgen grubu, K: Kontrol grubu.

RT-PCR yöntemi sonuçlarına göre gruplar arasında mTORC1 ve mTORC2 gen kompleksleri ve bu komplekslerin sırasıyla aktive ettiği P70S6K ve PKCalpha genlerinin ekspresyonları açısından bir farklılık izlenmedi (Şekil 4.5.1).

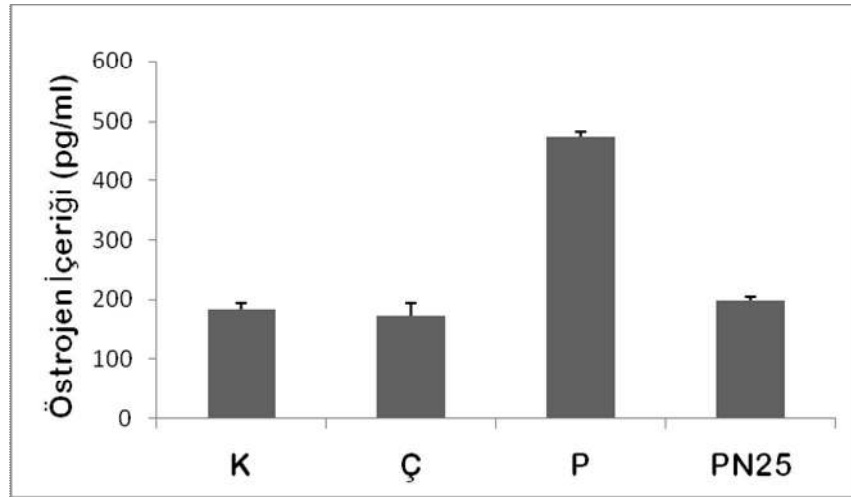
4.6. ELISA Deneyinin Bulguları

Farede PCOS deney modelini test etmek için, serum östrojen ve progesteron seviyeleri ELISA yöntemi uygulanarak belirlendi.

Çalışmamızda PCOS fare modelini oluşturduğumuz grupta östradiol (E2) seviyesi, kontrol grubuna oranla yaklaşık 2,5 kat artış göstermektedir (Şekil 4.6.1 ve 2).

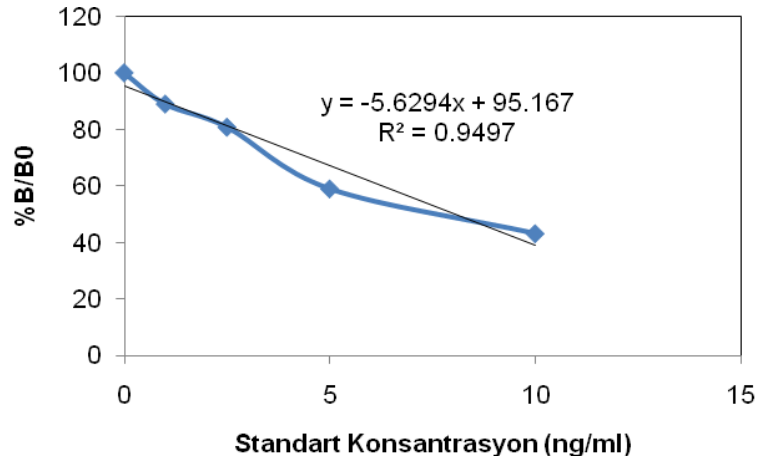


Şekil 4.6.1. Östradiol için standart konsantrasyon eğrisi.

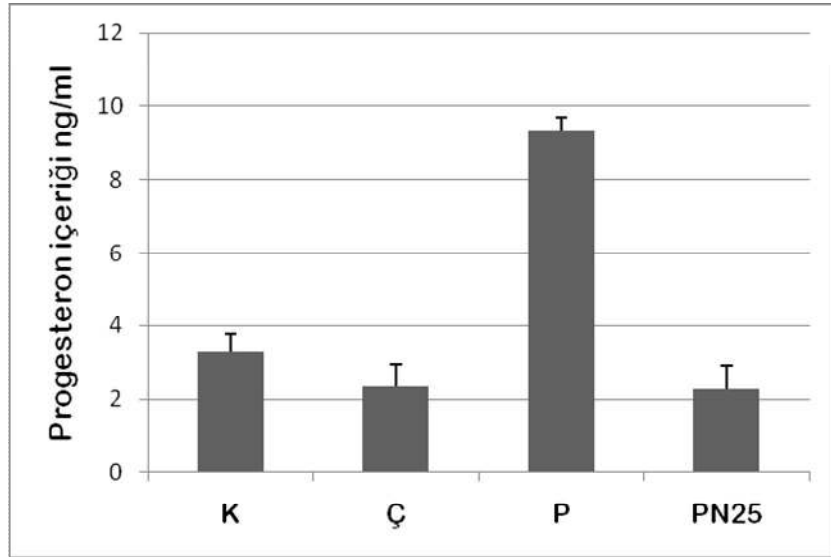


Şekil 4.6.2. Gruplar arasında serum östrojen seviyelerinin karşılaştırılması.K: Kontrol grubu, Ç: Çözgen grubu, P: PCOS grubu, PN25: Postnatal 25.gün.

Çalışmamızda PCOS fare modelini oluşturduğumuz grupta progesteron (P) seviyesi, kontrol grubuna oranla yaklaşık 3 kat artış göstermektedir (Şekil 4.6.3 ve 4).



Şekil 4.6.3. Progesteron standart konsantrasyon eğrisi.



Şekil 4.6.4. Gruplar arasında serum progesteron seviyelerinin karşılaştırılması. K: Kontrol grubu, Ç: Çözgen grubu, P: PCOS grubu, PN25: Postnatal 25.gün.

TARTIŞMA

PCOS, kronik anovülasyon, yani ovulasyon olmaması ve ovaryum dokusu içinde yeralan çok miktarda foliküler kist ile karakterizedir. Bunun yanı sıra PCOS'da tüylenme artışı (hirsutizm), kilo alma, ciltte yağlanma, şişmanlık, sivilcelerde artma ve gebe kalamama gibi şikayetler söz konusudur. Ayrıca PCOS'da puberte döneminden itibaren başlayan bir adet düzensizliği izlenebilir. Bu düzensizlik seyrek adet, adet görememe veya çok düzensiz kanamalar şeklinde olabilir. Bu düzensizliklerin arkasında duran neden aslında yumurtlama düzensizlikleridir. Bu sendrom; beyindeki hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH hormonlarının anormal şekillerde üretilmesi ile ortaya çıkmaktadır. Bu dengesizlik sonucu, her ay ovaryumlardan düzenli olarak gerçekleşmesi gereken ovulasyon gerçekleşemez. Bunun neticesinde de ovaryumlardan androjen üretimi artmaktadır. Günümüzde nedeni tam olarak bilinmemekle beraber kabul edilen PCOS mekanizmasında LH çok büyük önem taşımaktadır. LH'daki artış overlerde androjen üretimini artırmakta, üretilen androjen yağ dokusunda östrojene dönüşmekte, bu östrojen artışı da LH uyarımını artırarak bir kısır döngü meydana gelmektedir.

PCOS'da yumurtlama bozukluklarının olması ve adet düzensizliğinin görülmesi nedeni ile kısırılık bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Kısırılık bu hastaların tümünde izlenen bir bulgu değildir. Ancak PCOS'lu hastalar genelde gebe kalmak için tedaviye gereksinim duymaktadırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PCOS'lu hastaların yaklaşık %60'ında bir gen bozukluğu olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu hastalarda sitokrom P450/C17 enziminin yapımını kodlayan genin bozukluğu söz konusudur ve dominant olarak nesilden nesile aktarılmaktadır. Bu durum PCOS'un kalıtılabildiğini göstermektedir [165, 166].

Küçük antral foliküllerde yeralan granuloza hücreleri, LH stimülasyonuna prematüre olarak bir cevap oluşturabilirler [75]. Bu durum hem LH stimülasyonundaki anormallikten, hem de LH uyarımının artmasına bağlı olarak hiperinsülinemi ve/ya da hiperandrojenemiye neden olmasından kaynaklanmaktadır. Granuloza hücrelerinin insülin ile stimülasyonunun ardından da, küçük antral foliküllerin LH uyarımına hücrel cevapları arttığı belirlenmiştir [75].

Günümüzde PCOS için tanı kriterleri; hiperandrojenizm, ovulasyon düzensizliği ya da ovulasyonun gerçekleşmemesidir. Polikistik ovaryumlarda ovarial stromada artış ve kapsül altındaki alanda foliküler kistler izlenir [167]. PCOS; dolaşımda yüksek LH, düşük FSH, foliküler atrezi, insüline karşı direnç oluşması ve kısırlık nedeniyle oldukça heterojen bir hastalık olarak tanımlanmaktadır [168]. Son yıllarda yapılan insan ve hayvan çalışmaları bu sendromun tedavisine yardımcı ipuçları elde edilmesini sağlamıştır. PCOS hayvan modelleri üzerine yapılan çalışmalar [168-171] patolojinin farklı yönleri üzerine odaklanılarak çalışma imkanı sağlamaktadır.

Mahesh ve Greenblatt (1962) ilk kez dihidroepiandrosteronu (DHEA) PCOS'lu kadınların ovaryumundan izole ederek karakterize etmiştir. [172]. Ardından Roy ve arkadaşları (1962), DHEA kullanarak PCOS hayvan modelini oluşturmuştur [173]. Bu aşamadan itibaren yapılan çalışmalarda DHEA kullanılarak oluşturulan PCOS kemirgen modelinin, insandaki PCOS'un birçok özelliğini taklit edebildiği gösterilmiştir [174, 175]. Bu nedenle çalışmamızda deney modeli olarak PCOS fare modeli kullanılarak mTOR sinyal mekanizmaları çalışıldı. Ovulasyonun gerçekleşmediği PCOS'lu kadınlarda granuloza hücrelerinin artan aromataz aktivitesi sonucunda, FSH ve LH'a cevap olarak östrojen ve progesteron hormon seviyelerinde artış izlenmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, ovaryumda kistlerin oluşarak ovulasyon fonksiyonunun bozulduğunu göstermek için, serum östradiol (E2) ve progesteron (P) seviyeleri değerlendirildi. ELISA yöntemi kullanarak yaptığımız değerlendirmede, daha önceki çalışmalara paralel olarak [176], E2 ve P seviyesinin PCOS deney modelinde kontrol grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlendi. Aromataz aktivitesindeki artış, östrojen ve progesteron seviyelerindeki artış ile paralellik gösterir [75]. DHEA vererek oluşturduğumuz PCOS deney modelinde serum östrojen ve progesteron hormon düzeylerinin kontrol grubuna oranla artış göstermesi, deney modelimizin kadınlardaki PCOS bulgularını taklit ettiğinin kanıtı olarak değerlendirildi.

Oluşturduğumuz fare PCOS modelinde ovulasyonun ardından gelişen korpus luteum yapısı izlenmezken, gelişimlerinin erken evresinde dejenere olmuş çok sayıda folikül gözlemlendi. Buna ek olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, primordiyal folikül yoğunluğunun azaldığını ve atretik folikül yoğunluğunun da arttığını tespit ettik. Bu bulgularımız daha önce bu modelin kullanıldığı çalışmalar ile paraleldi [46, 177]. Ayrıca, ovaryumda foliküllerin teka tabakasındaki ve medulla bölgesindeki, damarların PCOS'da daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu durum daha önce belirtilen PCOS'lu kadınlarda meydana gelen asiklik hipervaskülerite bulgusunu desteklemektedir [75].

Farede polikistik ovaryumlar, anormal sayıda büyüyen immatür folikül içerirler. Bu ovaryumlarda oosit ile oositi çevreleyen granuloza hücreleri arasındaki diyalog değişmektedir. Bu değişen sinyaller ile dominant folikülün seçilmesinde başarısızlık

meydana gelmekte [46] ve ovaryumda çok sayıda hormon üretebilen ancak gelişimsel olarak duraklamış folikül izlenmektedir [75]. Çalışmamızda gözlemlediğimiz farklı evrelerdeki immatür ve atretik foliküller, deney modelimizin bu anlamda da PCOS'a sahip insan ovaryumunu taklit ettiğinin kanıtı olarak kabul edildi [178].

mTOR, hücre büyümesi ve çoğalmasında görev alan, aynı zamanda hücrenin enerji durumunu kontrol eden bir sensör olarak çalışan, bir serin/trionin kinazdır. Hücrede enerji metabolizmasında rol alarak hücre içi enerji dengesinin korunmasından sorumludur. Stres ya da beslenmeye bağlı gelişen bozukluklar, ovaryumda folikül büyümesini direkt olarak etkileyebilir [45]. Bilindiği üzere PCOS'da lipid metabolizmasında meydana gelen düzensizlikler kadınların aşırı kilo almasına neden olmaktadır. PCOS'daki bu bulgular, hücrenin enerji metabolizması ile direkt ilişkide olan mTOR sinyal mekanizmasını akla getirmektedir. PCOS'da gerek stress ve beslenme bozukluğu (PCOS'lu hastalarda yaygın olarak izlenen obezite sorunu) gerekse hormonal dengenin bozulması, mTOR mekanizmasını etkileyerek kistik yapıların gelişmesine ve ovulasyonun gerçekleşmemesine neden olabilir.

İnsülin, periferik dokulardaki glikoz kullanımını düzenleyerek glikoz homeostasisini kontrol etmektedir. Besin alımının kontrolünde görev alan mTOR, insülin direncini ve glikoz metabolizmasını da kontrol ederek Tip II diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklarda yeni tedaviler sağlamaktadır [179]. Dahası P70S6K gen eksikliği olan farelerde insülin hassasiyeti bildirilmiştir [180]. Bu durum bize mTORC1 sinyali yolağının ve P70S6K ile aktif formu olan P-P70S6K'nın, PCOS ile izlenebilen insülin direncinden ve obeziteden de sorumlu olabileceğini düşündürmüştür.

mTOR inhibitörleri günümüzde kanser hastalarında ve organ transplantasyonu hastalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bu ilaçlar ile gonadal fonksiyon bozukluklarının kronik tedavisi üzerine yapılan çalışmalar ise halen devam etmektedir [181]. mTOR sinyalinin dişi farelerde pubertenin başlangıcının kontrol edilmesinde ve LH salınımında rol aldığı bilinmektedir. mTOR sinyali rapamisin kullanılarak engellendiğinde; pubertedeki gonadotropik kontrolün inhibe edildiği, vajinal açılmanın geciktiği, LH ve östradiol hormon seviyesinin azaldığı ve ovaryum ile uterus dokularında atrofiye neden olduğu belirtilmiştir [182]. Çalışmamızda oluşturduğumuz PCOS fare modeli ile artan LH'ya karşılık PCOS'lu ovaryum örneklerinde belirlediğimiz artan mTOR sinyali, mTOR'un LH ile pozitif bir etkileşim içerisinde olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle mTOR sinyalinin ovaryumda enerji dengesinin korunması ve ovarial fonksiyonlar için önemli olduğunu düşünmekteyiz.. LH uyarımlı olarak mTOR sinyalinin aktive edilmesinin gonadotropik bir marker olarak düşünülmesi [183], PCOS'da da mTOR sinyal yolağına önem kazandırmaktadır.

Daha önceki bir çalışmamızda mTOR ve P-mTOR (Serin-2448) boyanmalarını normal fare ovaryumunda granuloza hücrelerinde göstermiştik [45]. Bu çalışmamızda ilk defa PCOS fare modelinden alınan ovaryum örneklerinde mTOR ve P-mTOR (Serin-2448) çiftli immünohistokimya boyanmaları yapıldı. Western blot ve çiftli immünohistokimya sonuçlarımızı kontrol grubu ovaryum örnekleri ile karşılaştırdığımızda; PCOS'lu ovaryumlarda P-mTOR (Serin-2448) pozitif reaksiyon veren hücre yoğunluğunun daha fazla olduğunu belirledik. Bu durum, mTOR sinyal yollarından mTORC1'in, PCOS'da gerçekleşen artan granuloza hücre proliferasyonundan sorumlu olabileceğini göstermektedir.

mTORC1'in komponentlerinden Raptor ve LST8 (GBetaL) hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol alan iki önemli komponenttir. Western blot çalışmamızın bantlarının yoğunluklarına bakıldığında, her iki proteinin de gruplar arasında fark göstermediği belirlenmiştir. Bu durum bize Raptor ve LST8 (GBetaL) proteinlerinin mTORC1 kompleksinin oluşmasında ve ardından bu kompleksin sinyal yollarında stimulator protein kompleksi pozisyonuna geçmesinde rol alabileceklerini düşündürmüştür.

P70S6K, mTORC1'in en iyi tanımlanmış alt sinyal yolağı ürünüdür. mTOR hücre büyümesi ve çoğalması fonksiyonunu P70S6K gibi sitoplazmik hedefleri aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalarda mTOR'un hücre içerisinde çekirdek ile sitoplazma arasında taşıyıcı olarak görev aldığı gösterilmiş [184] ve mTOR'un nükleositoplazmik taşıyıcı görevinin P70S6K'nın maksimum aktivasyonunu sağlayarak yerine getirdiği belirtilmiştir [184]. mTOR'un protein sentezini düzenleyebilmesi için P70S6K ve 4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1) proteinlerinin gerekli olduğu ileri sürülmüştür [185]. Bu moleküllerin her ikisi de mitojen-indüklü transkripsiyonun başlatılmasında düzenleyici olarak rol oynamaktadır [186]. mTOR, P70S6K ve 4E-BP1 proteinlerini fosforile ederek regüle etmektedir [186-188]. Raptor ise P70S6K ve 4E-BP1 ile mTOR arasında köprü görevini üstlenmektedir [147, 148, 189]. mTOR, P70S6K'nın fosforilasyonunu stimüle ederek transkripsiyonu ve sonuç olarak 40S ribosomal protein S6'yı uyarmaktadır. Bu yolağın aktivasyonu, pekçok foliküler farklılaşma belirteçlerinin (luteinize hormon reseptörü, inhibin alpha, mikrotübül ilişkili protein 2D) FSH-aracılı indüksiyonuna ihtiyaç duymaktadır. Ayrıca FSH transkripsiyon faktörü HIF-1 (transcription factor hypoxia-inducible factor-1)'in aktivasyonunu da sağlamaktadır [190]. Tüm bu literatür bilgileri ışığında, P70S6K ve P-P70S6K western blot sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde, mTORC1 kompleksinin aktivasyonu ile sinyal yolağı alt ürünü olan P70S6K'nın stimülasyonunun gerçekleştiğini söyleyebiliriz. Dolayısıyla P-P70S6K'nın western bant yoğunluğunun, PCOS deney grubunda azalma göstermesi, PCOS'da folikülogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmemesinden kaynaklanıyor olabilir. Şöyleki, FSH'nin etkisi ile ortaya çıkan foliküler farklılaşma belirteçleri PCOS'da FSH seviyesinin azalması ile yeterince etki gösterememekte, dolayısıyla P70S6K'nın yeterince aktive olamamasına ve foliküler gelişimin duraklamasına neden olmaktadır. Bu nedenle PCOS deney modelinde P70S6K'nın aktivasyonunda azalma olduğunu düşünmekteyiz .

mTORC2, aktin sitoskeletonun düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. mTORC1'de Serin-2448 fosforilasyonu gerçekleşirken, mTORC2'de ise Serin-2481 fosforilasyonu gerçekleşmektedir. Bazı çalışmalarda mTORC2 rapamisinine duyarsız olarak bilinmesine karşın [191], bazı kanser türleri hücrelerinde mTORC2'nin uzun süreli rapamisin uygulanmasına karşı duyarlı olduğu ve rapamisin uygulanan hücre kültürü örneklerinde mTORC2'nin bloke edildiği belirtilmiştir [43]. Çalışmamızda ilk kez, western blot yöntemi kullanılarak P-mTOR (Serin-2481) varlığı PCOS fare modelinden alınan ovaryum örneklerinde gösterilmiştir. Bu sonuca göre PCOS'lu ovaryumda, kontrol grubuna oranla P-mTOR (Serin-2481) bant yoğunluğu az da olsa bir artış göstermiştir. Ayrıca; mTORC2 kompleksinin diğer bir üyesi olan Rictor proteinin de PCOS deney grubunda, kontrol grubuna oranla artış gösterdiği izlenmiştir. Bu veriler değerlendirildiğinde, mTOR sinyal yollarından mTORC2'nin de PCOS'da rol alabileceği düşünülmektedir.

PKC α , hücrede proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi pekçok yaşamsal olayda önemli rollere sahiptir. PKC'nin fonksiyon görebilmesi için aktif hale geçmesi gerekmektedir. mTORC2, PKC α 'nın fosforilasyonunda görev almaktadır. mTORC2'nin komponentlerinin (mTOR, Rictor ya da Sin1) ortadan kaldırılması sonucu PKC α fosforile olamayarak post-translasyonel işlemlerde rol alamamaktadır [192]. PKC α ve onun fosforile formu P-PKC α , PCOS deney modelinden alınan ovaryum örneklerinde ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PCOS deney grubunda PKC α ve onun aktif formu olan P-PKC α western blot bant yoğunluğunda arasında fark olmadığını belirledik. Bu durum bize mTORC2 kompleksinin PCOS'da PKC α sinyal yolağının yanısıra, farklı bir sinyal molekülünü de uyarak etkisini göstermiş olabileceğini düşündürdü. Bu anlamda mTORC2 yolağı ürünlerinden Rho ve Akt'nin de ileriki çalışmalarda araştırılmasının PCOS'lu ovaryumda tedaviye yönelik yaklaşımlara yeni bir ufuk açabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada mTORC1'in rapamisin ile inhibisyonunun ardından, PI3 kinaz ve Akt aktivasyonlarının da inhibe edildiği belirtilmiştir. Böyle bir durumda mTORC2 upregüle olmaktadır. Aktive olan mTORC2, Akt ve HIF2- α (hypoxia-inducible factor 2 α)'yı aktive ederek mTORC1 sinyal yolağına alternatif bir yolak oluşturmaktadır [193]. Çalışmamızda gösterdiğimiz mTORC2 kompleksi proteinlerinin ve bu sinyal yolağı ürünü olan PKC α 'nın PCOS deney modeli ovaryumlarında izlenmesi bize, PCOS'da mTORC1 yolağının yanısıra mTORC2 yolağının da alternatif bir yolak olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak, oluşturduğumuz PCOS fare modelinde, PCOS olan hastaların ovaryumlarında olduğu gibi yüksek düzeyde granuloza ve teka hücresi proliferasyonu belirledik. mTOR'un ve fosforile formlarının (Serin-2448 ve Serin-2481) artışı; mTOR

sinyal yolağının, PCOS'da granuloza ve teka hücrelerinin yüksek düzeydeki proliferasyonundan sorumlu olabileceğini akla getirmektedir. mTOR sinyal yollarının ve bu yolların ürünlerinin PCOS'a sahip ovaryumlardaki muhtemel rollerini araştırdığımızda, mTOR sinyal yollarından her ikisinin de (TORC1 ve TORC2) farede PCOS mekanizmasında etkili olduğunu düşünmekteyiz..

PCOSlu kadınlarda endometriyal hiperplazi ve endometriyal kanser riski [194], insüline karşı oluşan dirençten dolayı Tip II diyabet izlenmesi [195], kan basıncının artması, depresyon, kardiyovasküler hastalıkların ve kalp krizi riskinin artması [196], lipid metabolizmasının bozulması [197], kilo alma, düşük yapma [49] ve otoimmün tiroiditis riskinin artması gibi olumsuz sonuçlarla karşılaşmaktadır. PCOS'lu kadınlarda üreme problemleri subfertilite, anovulasyon ve erken gebelik kaybı olarak tanımlanır [75]. Bu durum gerek temel araştırmalar gerekse klinik araştırmalar açısından oldukça dikkat çekici bulgulardır. PCOS hakkında çok fazla bilgiye sahip olmamıza rağmen, heterojen bir sendrom olması nedeniyle, üreme fonksiyonundaki bozukluğun nedeni halen tam olarak belirlenebilmiş değildir. PCOS'da folikülogenez, oosit olgunlaşması ve hormonal denge bozuk, hiperinsülinemi ve obezite yaygındır. Tüm bunlar endometriyal cevabın oluşumunda da anormalliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak ovulasyonun gerçekleşmemesi ya da gebelik kayıpları ile karşılaşmaktadır. Günümüzde ovulasyon bozuklukları nedeniyle gebelik elde edemeyen hastalarda yumurta gelişimini sağlamak için Klomifensitrat, Metformin, gonadotropinler, GnRH agonistleri veya antagonistleri kullanılmaktadır. Ovaryan drilling denen yumurtalıkların kabuk kısmının lazer veya elektrik enerjisi kullanılarak tahrip edilmesi işleminin kullanımı çok sınırlı olarak da olsa bazı vakalarda kullanılabilmektedir. mTOR komplekslerinden mTORC1'in inhibitörü olarak bilinen Rapamisin, bazı hücre gruplarında hem mTORC1'i hem de mTORC2'yi baskılamaktadır. PCOS oluşturulan fare modeline rapamisin tedavisi uygulandığında, granuloza ve teka hücresi proliferasyonu durdurulabilir. Ayrıca PCOS'da yüksek düzeyde olan ve ovulasyona izin vermeyen LH seviyesi, Rapamisin tedavisi uygulanması ile düşürülebilir. Dolayısıyla, PCOS'un tedavisine yardımcı olunarak anovulasyona bağlı dişi infertilitesine yeni bir yaklaşım sağlanabileceğini ileri sürmekteyiz. Bu nedenden dolayı, PCOS fare modeli kullanılarak Rapamisin'in *in vivo* etkisini değerlendirecek başka fonksiyonel çalışmalara gereksinim olduğu kanısındayız.

SONUÇLAR

Bu tezde, farede Polikistik Over Sendromu modelinde mTORC1 ve mTORC2 sinyal yolağı proteinlerinin hücresel işlevlerinin anlaşılmasına yönelik elde ettiğimiz sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1. Farede oluşturulan PCOS deney modeli, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; gelişmekte olan foliküllerin, ovule olamamış foliküllerin (foliküler kistlerin) ve atreziye giden foliküllerin PCOS deney grubunda daha yoğun olduğu belirlendi.
2. Fare PCOS ve kontrol grubu ovaryum dokularından alınan örneklerle uygulanan çiftli immunohistokimyasal analizler sonucunda, tüm gruplarda mTOR, granuloza hücreleri ve oositin sitoplazmasında yerleşim gösterirken, P-mTOR (Serin-2448) bölünmekte olan granuloza hücrelerinde mitotik mekikte yerleşim gösterdi. Granuloza hücrelerinin mitotik aktivitelerinde rol oynayan P-mTOR (Serin-2448) protein ekspresyonunun PCOS'lu ovaryumda daha fazla olduğu belirlendi.
3. Western blot yöntemi sonucunda mTORC1 ve mTORC2 protein komplekslerinin her ikisinin de PCOS ve kontrol grubu ovaryumlarda rol aldığı belirlendi. Ancak ilk kompleks olan mTORC1'in yoğunluğunun daha fazla olduğu izlendi. Bu durum ovaryumda mTORC1'in daha fazla role sahip olduğu hipotezini güçlendirmiştir.
4. RT-PCR yöntemi ile değerlendirilen mTOR, Raptor, Rictor, LST8 (GBetaL), P70S6K ve PKCalpha genlerinin gruplar arasında, mRNA düzeyleri bakımında fark bulunmadığı belirlendi.
5. ELISA yöntemi ile PCOS deney grubunda östradiol (E2) ve progesteron (P) hormonları seviyelerinin kontrol ve çözgen grubuna oranla daha yüksek olduğu belirlendi.
6. Bu çalışma, PCOS fare modelinde mTOR komplekslerini ve sinyal yolları ürünlerini gösteren orjinal bir çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Richards, J.S. and S.A. Pangas, The ovary: basic biology and clinical implications. J Clin Invest. 120(4): p. 963-72.
2. Pepling, M.E., From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. Genesis, 2006. 44(12): p. 622-32.
3. Gondos, B., Germ cell degeneration and intercellular bridges in the human fetal ovary. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1973. 138(1): p. 23-30.
4. Gondos, B., Comparative studies of normal and neoplastic ovarian germ cells: 1. Ultrastructure of oogonia and intercellular bridges in the fetal ovary. Int J Gynecol Pathol, 1987. 6(2): p. 114-23.
5. Peters, F.D. and H.A. Hirsch, [Comparison between intra and para cervical anaesthesia in therapeutic abortion (author's transl)]. Geburtshilfe Frauenheilkd, 1978. 38(11): p. 946-9.
6. Sawyer, H.R., et al., Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. Biol Reprod, 2002. 66(4): p. 1134-50.
7. Arıncı, K.E., A. , Anatomi. 1995, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti.
8. Dere, F., Anatomi Atlası ve Ders Kitabı. 1999, Adana: Adana Nobel Tıp Kitabevi.
9. Gartner, L.P.H., J.L., Color Textbook of Histology. 2001, Philadelphia: W.B. Saunders comp.
10. Companies, M.-H.
11. Eroschenko, V.P., di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11 ed. 2008, Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins.

12. Junqueira, L.C.C., J, Temel Histoloji, text and atlas, ed. S.A. Solakoğlu, Y. 2009, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
13. <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>.
14. Delilbaş, L., In Vitro Fertilizasyon (IVF) Labaratuvar Yöntemleri. 2008, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi.
15. Colgar, U., in PCOS ve İnfertilite. 2006, Medikal Yayıncılık, İstanbul.
16. <https://courses.stu.qmul.ac.uk/smd/kb/microanatomy/humandev/answers/indexa.htm>.
17. Colgar, U., in Reprodktif Endokrinoloji ve İnfertilite. 2006, İstanbul Medikal Yayıncılık: İstanbul.
18. http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f28-4a-d_ovary_c.jpg.
19. Gardner, D.K., Texbook of Assisted Reproductive Teechniques, Labratory and Clinical Perspectives. 2001, London and New York: Taylor and Francis Group.
20. Stein, I.F.L., M.L., Amenorrhoea associated with bilateralpolycystic ovaries. Am J Obst Gynecol 1935. 29.
21. Asuncion, M., et al., A prospective study of the prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected Caucasian women from Spain. J Clin Endocrinol Metab, 2000. 85(7): p. 2434-8.
22. Belosi, C., et al., Is the PCOS diagnosis solved by ESHRE/ASRM 2003 consensus or could it include ultrasound examination of the ovarian stroma? Hum Reprod, 2006. 21(12): p. 3108-15.
23. www.fertilityplus.org.
24. www.youngwomenshealth.org.
25. http://www2.massgeneral.org/pcos/pcos_what.html.

26. Eilerman, B.T., Y. , The Genetics of Polycystic Ovary Syndrome, in *Diagnosis and Management of Polycystic Ovary Syndrome* 2009, Springer Science+Business Media, LLC: Cincinnati, USA.
27. Sharpe, R.M. and S. Franks, Environment, lifestyle and infertility--an inter-generational issue. *Nat Cell Biol*, 2002. 4 Suppl: p. s33-40.
28. Barbieri, R.L., et al., Insulin stimulates androgen accumulation in incubations of ovarian stroma obtained from women with hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986. 62(5): p. 904-10.
29. Azziz, R.N., J.E.; Dewailly, D., *Androgen excess disorders in Women. Polycystic Ovary Syndrome and Other Disorders*. 2006, Totowa, New Jersey, USA: Humana Press.
30. Georgopoulos, N.A., Hyperandrogenism in PCOS, in *Diagnosis and Management of Polycystic Ovary Syndrome*: Greece.
31. Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall, TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 2006. 124(3): p. 471-84.
32. Eskelinen, E.L., et al., Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic*, 2002. 3(12): p. 878-93.
33. Wiederrecht, G.J., et al., Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res*, 1995. 1: p. 53-71.
34. Kim, D.H., et al., mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 2002. 110(2): p. 163-75.
35. Easton, J.B. and P.J. Houghton, mTOR and cancer therapy. *Oncogene*, 2006. 25(48): p. 6436-46.
36. Kim, D.H. and D.M. Sabatini, Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004. 279: p. 259-70.
37. Jacinto, E., et al., Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, 2004. 6(11): p. 1122-8.

38. Wullschleger, S., et al., Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem*, 2005. 280(35): p. 30697-704.
39. Sarbassov, D.D., et al., Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*, 2006. 22(2): p. 159-68.
40. Frias, M.A., et al., mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol*, 2006. 16(18): p. 1865-70.
41. Sarbassov, D.D., et al., Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*, 2004. 14(14): p. 1296-302.
42. Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall, Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*, 1991. 253(5022): p. 905-9.
43. Copp, J., G. Manning, and T. Hunter, TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res*, 2009. 69(5): p. 1821-7.
44. Kayampilly, P.P. and K.M. Menon, Follicle-stimulating hormone increases tuberlin phosphorylation and mammalian target of rapamycin signaling through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 2007. 148(8): p. 3950-7.
45. Yaba, A., et al., A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reprod Sci*, 2008. 15(2): p. 128-38.
46. Franks, S., J. Stark, and K. Hardy, Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 2008. 14(4): p. 367-78.
47. Elia, E., et al., The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Mol Hum Reprod*, 2006. 12(8): p. 475-81.
48. Sahu, B., et al., Comparison of oocyte quality and intracytoplasmic sperm injection outcome in women with isolated polycystic ovaries or polycystic ovarian syndrome. *Arch Gynecol Obstet*, 2008. 277(3): p. 239-44.
49. Boomsma, C.M., B.C. Fauser, and N.S. Macklon, Pregnancy complications in women with polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*, 2008. 26(1): p. 72-84.

50. Gianaroli, L., et al., Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. *Hum Reprod*, 2007. 22(1): p. 241-9.
51. Gianaroli, L., et al., Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril*, 2003. 80(2): p. 341-9.
52. Weghofer, A., et al., Lack of association between polycystic ovary syndrome and embryonic aneuploidy. *Fertil Steril*, 2007. 88(4): p. 900-5.
53. Franks, S., R. Roberts, and K. Hardy, Gonadotrophin regimens and oocyte quality in women with polycystic ovaries. *Reprod Biomed Online*, 2003. 6(2): p. 181-4.
54. Dumesic, D.A. and D.H. Abbott, Implications of polycystic ovary syndrome on oocyte development. *Semin Reprod Med*, 2008. 26(1): p. 53-61.
55. Wood, J.R., et al., Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007. 92(2): p. 705-13.
56. Dumesic, D.A., et al., Reduced intrafollicular androstenedione and estradiol levels in early-treated prenatally androgenized female rhesus monkeys receiving follicle-stimulating hormone therapy for in vitro fertilization. *Biol Reprod*, 2003. 69(4): p. 1213-9.
57. Latham, K.E., Epigenetic modification and imprinting of the mammalian genome during development. *Curr Top Dev Biol*, 1999. 43: p. 1-49.
58. Moor, R.M., et al., Oocyte maturation and embryonic failure. *Hum Reprod Update*, 1998. 4(3): p. 223-36.
59. Albertini, D.F., A. Sanfins, and C.M. Combelles, Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reprod Biomed Online*, 2003. 6(4): p. 410-5.
60. Tesarik, J. and C. Mendoza, Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update*, 1997. 3(2): p. 95-100.
61. Tesarik, J. and C. Mendoza, Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995. 80(4): p. 1438-43.

62. Erickson, G.F. and S. Shimasaki, The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril*, 2001. 76(5): p. 943-9.
63. Padhy, N., et al., Antral follicle size in the downregulated cycle and its relation to in vitro fertilization outcome. *J Hum Reprod Sci*, 2009. 2(2): p. 68-71.
64. Qiao, J. and H.L. Feng, Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update*. 17(1): p. 17-33.
65. Franks, S., Polycystic ovary syndrome in adolescents. *Int J Obes (Lond)*, 2008. 32(7): p. 1035-41.
66. Hardy, K., et al., Normal development and metabolic activity of preimplantation embryos in vitro from patients with polycystic ovaries. *Hum Reprod*, 1995. 10(8): p. 2125-35.
67. Ludwig, M., et al., Oocyte quality and treatment outcome in intracytoplasmic sperm injection cycles of polycystic ovarian syndrome patients. *Hum Reprod*, 1999. 14(2): p. 354-8.
68. Jabara, S. and C. Coutifaris, In vitro fertilization in the PCOS patient: clinical considerations. *Semin Reprod Med*, 2003. 21(3): p. 317-24.
69. Heijnen, E.M., et al., A meta-analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update*, 2006. 12(1): p. 13-21.
70. <http://courses.washington.edu/conj/bess/reproductive/pcos.htm>.
71. Balen, A.H., et al., Miscarriage rates following in-vitro fertilization are increased in women with polycystic ovaries and reduced by pituitary desensitization with buserelin. *Hum Reprod*, 1993. 8(6): p. 959-64.
72. Cano, F., et al., Oocyte quality in polycystic ovaries revisited: identification of a particular subgroup of women. *J Assist Reprod Genet*, 1997. 14(5): p. 254-61.
73. Urman, B., B. Tiras, and K. Yakin, Assisted reproduction in the treatment of polycystic ovarian syndrome. *Reprod Biomed Online*, 2004. 8(4): p. 419-30.
74. Santos, M.A., E.W. Kuijk, and N.S. Macklon, The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction*. 139(1): p. 23-34.

75. Van der Spuy, Z.M. and S.J. Dyer, The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2004. 18(5): p. 755-71.
76. Filicori, M., G.E. Cognigni, and W. Ciampaglia, Effects of LH on oocyte yield and developmental competence. *Hum Reprod*, 2003. 18(6): p. 1357-8; author reply 1358-60.
77. Dumesic, D.A., D.H. Abbott, and V. Padmanabhan, Polycystic ovary syndrome and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007. 8(2): p. 127-41.
78. Carr, B., Diseases of the ovary and Reproductive Tract, in *Williams Textbook of Endocrinology* W. Saunders, Editor: Philadelphia,. p. p.751-817.
79. Kurzawa, R., et al., Comparison of embryological and clinical outcome in GnRH antagonist vs. GnRH agonist protocols for in vitro fertilization in PCOS non-obese patients. A prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet*, 2008. 25(8): p. 365-74.
80. Billig, H., I. Furuta, and A.J. Hsueh, Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*, 1993. 133(5): p. 2204-12.
81. Balen, A.H., et al., Polycystic ovary syndrome: the spectrum of the disorder in 1741 patients. *Hum Reprod*, 1995. 10(8): p. 2107-11.
82. Nisenblat, V. and R.J. Norman, Androgens and polycystic ovary syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009. 16(3): p. 224-31.
83. Patel, S.S. and B.R. Carr, Oocyte quality in adult polycystic ovary syndrome. *Semin Reprod Med*, 2008. 26(2): p. 196-203.
84. Tuckerman, E.M., et al., Do androgens have a direct effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril*, 2000. 74(4): p. 771-9.
85. Wijeyaratne, C.N., et al., Clinical manifestations and insulin resistance (IR) in polycystic ovary syndrome (PCOS) among South Asians and Caucasians: is there a difference? *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2002. 57(3): p. 343-50.
86. Tang, T., et al., Insulin-sensitising drugs (metformin, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for women with polycystic ovary syndrome, oligo amenorrhoea and subfertility. *Cochrane Database Syst Rev*, (1): p. CD003053.

87. Andreani, C.L., et al., Effect of follicular fluid on granulosa luteal cells from polycystic ovary. *Hum Reprod*, 1996. 11(10): p. 2107-13.
88. Hsieh, M., A.M. Zamah, and M. Conti, Epidermal growth factor-like growth factors in the follicular fluid: role in oocyte development and maturation. *Semin Reprod Med*, 2009. 27(1): p. 52-61.
89. Jamnongjit, M., A. Gill, and S.R. Hammes, Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(45): p. 16257-62.
90. De La Fuente, R., M.J. O'Brien, and J.J. Eppig, Epidermal growth factor enhances preimplantation developmental competence of maturing mouse oocytes. *Hum Reprod*, 1999. 14(12): p. 3060-8.
91. Goff, A.K., et al., Protein synthesis during maturation of bovine oocytes, effect of epidermal growth factor. *Reprod Domest Anim*, 2001. 36(1): p. 19-24.
92. Hammadeh, M.E., et al., Fibroblast growth factor (FGF), intracellular adhesion molecule (sICAM-1) level in serum and follicular fluid of infertile women with polycystic ovarian syndrome, endometriosis and tubal damage, and their effect on ICSI outcome. *Am J Reprod Immunol*, 2003. 50(2): p. 124-30.
93. Artini, P.G., et al., Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in polycystic ovary syndrome during controlled ovarian hyperstimulation. *Gynecol Endocrinol*, 2006. 22(8): p. 465-70.
94. Skinner, M.K., Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, 2005. 11(5): p. 461-71.
95. Adashi, E.Y., Intraovarian regulation: the proposed role of insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 687: p. 10-2.
96. Frattali, A.L. and J.E. Pessin, Molecular defects of insulin/IGF-1 receptor transmembrane signaling. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 687: p. 77-89.
97. Yen, S.S., G.A. Laughlin, and A.J. Morales, Interface between extra- and intraovarian factors in polycystic ovarian syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 1993. 687: p. 98-111.

98. Kwintkiewicz, J. and L.C. Giudice, The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin Reprod Med*, 2009. 27(1): p. 43-51.
99. Snider, W.D., Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell*, 1994. 77(5): p. 627-38.
100. Buyuk, E. and D.B. Seifer, Follicular-fluid neurotrophin levels in women undergoing assisted reproductive technology for different etiologies of infertility. *Fertil Steril*, 2008. 90(5): p. 1611-5.
101. Martins da Silva, S.J., et al., Brain-derived neurotrophic factor promotes bovine oocyte cytoplasmic competence for embryo development. *Reproduction*, 2005. 129(4): p. 423-34.
102. Kawamura, K., et al., Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(26): p. 9206-11.
103. Dissen, G.A., et al., Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*, 2009. 150(6): p. 2906-14.
104. Dumesic, D.A., et al., Impaired developmental competence of oocytes in adult prenatally androgenized female rhesus monkeys undergoing gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(3): p. 1111-9.
105. Desforges-Bullet, V., et al., Increased anti-Mullerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 94(1): p. 198-204.
106. Welt, C.K., et al., Follicular arrest in polycystic ovary syndrome is associated with deficient inhibin A and B biosynthesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005. 90(10): p. 5582-7.
107. Artini, P.G., et al., Vascular endothelial growth factor and its soluble receptor in patients with polycystic ovary syndrome undergoing IVF. *Hum Fertil (Camb)*, 2009. 12(1): p. 40-4.
108. Gallinelli, A., et al., Correlations between concentrations of interleukin-12 and interleukin-13 and lymphocyte subsets in the follicular fluid of women with and without polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 2003. 79(6): p. 1365-72.

109. Manning, G., et al., The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 2002. 298(5600): p. 1912-34.
110. Martin, D.E., T. Powers, and M.N. Hall, Regulation of ribosome biogenesis: where is TOR? *Cell Metab*, 2006. 4(4): p. 259-60.
111. Vieyra, D., et al., Human ING1 proteins differentially regulate histone acetylation. *J Biol Chem*, 2002. 277(33): p. 29832-9.
112. Foster, K.G. and D.C. Fingar, Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem*. 285(19): p. 14071-7.
113. Bjornsti, M.A. and P.J. Houghton, The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(5): p. 335-48.
114. Panwalkar, A., S. Verstovsek, and F.J. Giles, Mammalian target of rapamycin inhibition as therapy for hematologic malignancies. *Cancer*, 2004. 100(4): p. 657-66.
115. Mita, M.M., A. Mita, and E.K. Rowinsky, The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. *Cancer Biol Ther*, 2003. 2(4 Suppl 1): p. S169-77.
116. Smolewski, P., Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anticancer Drugs*, 2006. 17(5): p. 487-94.
117. Withers, D.J., et al., Expression, enzyme activity, and subcellular localization of mammalian target of rapamycin in insulin-responsive cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997. 241(3): p. 704-9.
118. Fang, Y., et al., Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 2001. 294(5548): p. 1942-5.
119. Liu, X. and X.F. Zheng, Endoplasmic reticulum and Golgi localization sequences for mammalian target of rapamycin. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(3): p. 1073-82.
120. Kim, J.E. and J. Chen, Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(26): p. 14340-5.
121. Hara, K., et al., Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, 2002. 110(2): p. 177-89.

122. Loewith, R., et al., Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*, 2002. 10(3): p. 457-68.
123. Kim, D.H., et al., GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, 2003. 11(4): p. 895-904.
124. Sancak, Y., et al., PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell*, 2007. 25(6): p. 903-15.
125. Thedieck, K., et al., PRAS40 and PRR5-like protein are new mTOR interactors that regulate apoptosis. *PLoS One*, 2007. 2(11): p. e1217.
126. Wang, L., et al., PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem*, 2007. 282(27): p. 20036-44.
127. Bai, X., et al., Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science*, 2007. 318(5852): p. 977-80.
128. Garami, A., et al., Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell*, 2003. 11(6): p. 1457-66.
129. Kim, E., et al., Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol*, 2008. 10(8): p. 935-45.
130. Sancak, Y., et al., The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*, 2008. 320(5882): p. 1496-501.
131. Jacinto, E., et al., SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell*, 2006. 127(1): p. 125-37.
132. Yang, Q., et al., Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev*, 2006. 20(20): p. 2820-32.
133. Pearce, L.R., et al., Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J*, 2007. 405(3): p. 513-22.
134. Woo, S.Y., et al., PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *J Biol Chem*, 2007. 282(35): p. 25604-12.

135. Takai, H., et al., Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases. *Cell*, 2007. 131(7): p. 1248-59.
136. Gangloff, Y.G., et al., Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(21): p. 9508-16.
137. Murakami, M., et al., mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(15): p. 6710-8.
138. Guertin, D.A., et al., Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, 2006. 11(6): p. 859-71.
139. Shiota, C., et al., Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell*, 2006. 11(4): p. 583-9.
140. Beretta, L., et al., Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *Embo J*, 1996. 15(3): p. 658-64.
141. Hara, K., et al., Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*, 1997. 272(42): p. 26457-63.
142. Gingras, A.C., et al., 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev*, 1998. 12(4): p. 502-13.
143. Holz, M.K. and J. Blenis, Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem*, 2005. 280(28): p. 26089-93.
144. Pearson, R.B., et al., The principal target of rapamycin-induced p70s6k inactivation is a novel phosphorylation site within a conserved hydrophobic domain. *Embo J*, 1995. 14(21): p. 5279-87.
145. Dorrello, N.V., et al., S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth. *Science*, 2006. 314(5798): p. 467-71.
146. Wang, X., et al., Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo J*, 2001. 20(16): p. 4370-9.

147. Nojima, H., et al., The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *J Biol Chem*, 2003. 278(18): p. 15461-4.
148. Schalm, S.S., et al., TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol*, 2003. 13(10): p. 797-806.
149. Martin, D.E. and M.N. Hall, The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol*, 2005. 17(2): p. 158-66.
150. Mayer, C., et al., mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*, 2004. 18(4): p. 423-34.
151. Schwab, M.S., et al., p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(4): p. 2485-94.
152. Schmelzle, T., et al., Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(1): p. 338-51.
153. Edinger, A.L. and C.B. Thompson, Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(7): p. 2276-88.
154. Hall, D.J., et al., Rheb-TOR signaling promotes protein synthesis, but not glucose or amino acid import, in *Drosophila*. *BMC Biol*, 2007. 5: p. 10.
155. Kamada, Y., et al., Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, 2000. 150(6): p. 1507-13.
156. Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld, Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell*, 2004. 7(2): p. 167-78.
157. Paglin, S., et al., Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res*, 2005. 65(23): p. 11061-70.
158. www.cellsignal.com.
159. Hidalgo, M. and E.K. Rowinsky, The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*, 2000. 19(56): p. 6680-6.

160. Rowinsky, E.K., Targeting the molecular target of rapamycin (mTOR). *Curr Opin Oncol*, 2004. 16(6): p. 564-75.
161. Sander, V., et al., Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction*, 2006. 131(3): p. 591-602.
162. Aragno, M., et al., Dehydroepiandrosterone administration prevents the oxidative damage induced by acute hyperglycemia in rats. *J Endocrinol*, 1997. 155(2): p. 233-40.
163. Aragno, M., et al., Dehydroepiandrosterone modulates nuclear factor-kappaB activation in hippocampus of diabetic rats. *Endocrinology*, 2002. 143(9): p. 3250-8.
164. Demir, R., *Histolojik Boyama Teknikleri*. 2001, Ankara: Palme Yayıncılık.
165. Xita, N. and A. Tsatsoulis, Review: fetal programming of polycystic ovary syndrome by androgen excess: evidence from experimental, clinical, and genetic association studies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. 91(5): p. 1660-6.
166. Hughes, C., et al., Genomic and post-genomic approaches to polycystic ovary syndrome--progress so far: Mini Review. *Hum Reprod*, 2006. 21(11): p. 2766-75.
167. Franks, S., Polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 1995. 333(13): p. 853-61.
168. Abbott, D.H., D.A. Dumesic, and S. Franks, Developmental origin of polycystic ovary syndrome - a hypothesis. *J Endocrinol*, 2002. 174(1): p. 1-5.
169. Billiar, R.B., et al., The effect of chronic and acyclic elevation of circulating androstenedione or estrone concentrations on ovarian function in the rhesus monkey. *Endocrinology*, 1985. 116(6): p. 2209-20.
170. Szukiewicz, D. and J.T. Uilenbroek, Polycystic ovary syndrome--searching for an animal model. *J Med*, 1998. 29(5-6): p. 259-75.
171. Weil, S., et al., Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999. 84(8): p. 2951-6.
172. Mahesh, V.B. and R.B. Greenblatt, Isolation of dehydroepiandrosterone and 17alpha-hydroxy-delta5-pregnenolone from the polycystic ovaries of the Stein-Leventhal syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1962. 22: p. 441-8.

173. Roy, S., V.B. Mahesh, and R.B. Greenblatt, Effect of dehydroepiandrosterone and delta4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature*, 1962. 196: p. 42-3.
174. Lee, M.T., E. Anderson, and G.Y. Lee, Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *Anat Rec*, 1991. 231(2): p. 185-92.
175. Anderson, E., M.T. Lee, and G.Y. Lee, Cystogenesis of the ovarian antral follicle of the rat: ultrastructural changes and hormonal profile following the administration of dehydroepiandrosterone. *Anat Rec*, 1992. 234(3): p. 359-82.
176. Luchetti, C.G., et al., Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *J Reprod Immunol*, 2004. 64(1-2): p. 59-74.
177. Okutsu, Y., M.T.; Takahashi, N.; Ishizuka, B., Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary. *Fertil Steril*, 2010. 93(3): p. 927-35.
178. Webber, L.J., et al., Formation and early development of follicles in the polycystic ovary. *Lancet*, 2003. 362(9389): p. 1017-21.
179. Lian, J., et al., The mammalian target of rapamycin pathway and its role in molecular nutrition regulation. *Mol Nutr Food Res*, 2008. 52(4): p. 393-9.
180. Um, S.H., et al., Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 2004. 431(7005): p. 200-5.
181. Kaczmarek, I., et al., Sirolimus impairs gonadal function in heart transplant recipients. *Am J Transplant*, 2004. 4(7): p. 1084-8.
182. Roa, J., et al., The mammalian target of rapamycin as novel central regulator of puberty onset via modulation of hypothalamic Kiss1 system. *Endocrinology*, 2009. 150(11): p. 5016-26.
183. Castellano, J.M., et al., Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology*, 2005. 146(9): p. 3917-25.

184. Bachmann, R.A., et al., A nuclear transport signal in mammalian target of rapamycin is critical for its cytoplasmic signaling to S6 kinase 1. *J Biol Chem*, 2006. 281(11): p. 7357-63.
185. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev*, 2001. 15(7): p. 807-26.
186. Gingras, A.C., B. Raught, and N. Sonenberg, eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem*, 1999. 68: p. 913-63.
187. Brunn, G.J., et al., Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science*, 1997. 277(5322): p. 99-101.
188. Burnett, P.E., et al., RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(4): p. 1432-7.
189. Choi, K.M., L.P. McMahon, and J.C. Lawrence, Jr., Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. *J Biol Chem*, 2003. 278(22): p. 19667-73.
190. Alam, H., et al., Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/Ras homolog enriched in brain (Rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem*, 2004. 279(19): p. 19431-40.
191. Peterson, R.T., et al., FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem*, 2000. 275(10): p. 7416-23.
192. Ikenoue, T., et al., Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *Embo J*, 2008. 27(14): p. 1919-31.
193. Rini, B.I. and M.B. Atkins, Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*, 2009. 10(10): p. 992-1000.
194. Hardiman, P., O.C. Pillay, and W. Atiomo, Polycystic ovary syndrome and endometrial carcinoma. *Lancet*, 2003. 361(9371): p. 1810-2.

195. Moran, L.J., et al., Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 16(4): p. 347-63.
196. Mather, K.J., F. Kwan, and B. Corenblum, Hyperinsulinemia in polycystic ovary syndrome correlates with increased cardiovascular risk independent of obesity. *Fertil Steril*, 2000. 73(1): p. 150-6.
197. Rocha, M.P., et al., Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins and lipid transfer to high-density lipoprotein in young obese and normal-weight patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 93(6): p. 1948-56.

ÖZGEÇMİŞ

Aylin YABA 1980 yılında Samsun’da doğdu. İlköğrenimini 1990 yılında İstiklal İlkokulu, Orta öğrenimini 1993 yılında Samsun Atatürk Ortaokulu ve Lise öğrenimini de 1997 yılında Samsun Atatürk Süper Lisesi’nde tamamladı. Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Lisans eğitimini 2002 yılında bitirdi. Aynı yıl, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde “Üreme Biyolojisi” yüksek lisans programına başladı. Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans eğitimini 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda tamamladı. Sonrasında, Amerika-Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Bölümü’nde Doç. Dr. Emre SELİ ve Yrd. Doç. Dr. Joshua JOHNSON ile birlikte yüksek lisans sonrası bursiyeri olarak 24 ay çalıştı. Daha sonra Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı ve bu program içerisinde Prof. Dr. Necdet DEMİR danışmanlığında tez çalışmalarını tamamladı. Aylin YABA’nın Science Citation Index’te kayıtlı 7 makale ve yurtiçi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 22 adet kongre bildirisi bulunmaktadır.

E K L E R

The abelson tyrosine kinase (c-Abl) expression on the mouse uterus and placenta during gestational period

Aylin Yaba · Umit Ali Kayisli · Joshua Johnson ·
Ramazan Demir · Necdet Demir

Received: 21 November 2010 / Accepted: 6 January 2011 / Published online: 20 January 2011
Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract c-Abl is a protein tyrosine kinase which has very important roles in signal transduction, control of the cell cycle, cell motility, proliferation, and inhibition of apoptosis. We hypothesized that c-Abl may play an important role on uterine remodeling during pre-receptive, receptive and non-receptive endometrium. Our aim is to investigate the expression of c-Abl protein tyrosine kinase in uterine remodeling and placental development in mouse gestational stage. We performed c-Abl immunohistochemistry on mouse uterine tissue sections on days 1–9, 11, 13, and 15 of pregnancy. c-Abl was highly upregulated in the uterine luminal epithelium and other endometrial structures including glands and blood vessels in pre-receptive and receptive endometrium. Therefore these results demonstrate a role for c-Abl in uterine remodeling during decidualization, implantation, and placentation throughout gestation.

Keywords c-Abl · Mouse · Uterus · Decidua · Placentation

c-Abl protein tyrosine kinase expression suggests that it may play a role in uterine remodeling during decidualization, implantation, and placentation in the mouse from the 1st to the 15th day of gestation.

A. Yaba · R. Demir · N. Demir (✉)
Department of Histology and Embryology, Akdeniz University
Faculty of Medicine, Campus, 07070 Antalya, Turkey
e-mail: ndemir@akdeniz.edu.tr

U. A. Kayisli · J. Johnson
Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive
Sciences, Yale University School of Medicine,
New Haven, CT 06510, USA

Introduction

Abelson Tyrosine Kinase (c-Abl) gene is a member of the family of non-receptor protein tyrosine kinase (Laneuville 1995) and it has been identified as the cellular homologue of Abelson Murine Leukemia Virus protein. The mammalian c-Abl is a highly evolutionarily conserved gene (Abelson and Rabstein 1970; Shaul and Ben-Yehoyada 2005) with two isoforms due to alternative splicing within its amino terminal region. These isoforms are referred to as type I and type IV c-Abl proteins in mouse and type 1a and type 1b proteins in the human (Van Etten 1999; Daniel et al. 2001). c-Abl localizes in various part of the cell including the nucleus, cytoplasm, and cell membrane (Taagepera et al. 1998; Shaul 2000). c-Abl can interact with a variety of cellular proteins and to have very crucial roles in different signaling pathways that control cell morphogenesis, motility (Hernandez et al. 2004), growth and proliferation (particularly at the G1/S checkpoint), modulation of apoptosis (Plattner et al. 1999; Hantschel and Superti-Furga 2004) and the development of female and male mouse germ cells (Iwaoki et al. 1993).

Previous studies showed that c-Abl knockout mice have reduced fertility (Li et al. 2000) and a variety of defects in their hematopoietic and embryonal development (Lanier and Gertler 2000; Hantschel and Superti-Furga 2004; Hernandez et al. 2004). In light of this information we hypothesized that c-Abl protein tyrosine kinase may have an important role in pre-receptive, receptive, and non-receptive endometrium. Therefore, our aim was to localize full-length c-Abl protein tyrosine kinase within the uterus and determine the role of this tyrosine kinase at decidualization, implantation and during placental development. The dynamic expression of c-Abl in the uterus is

suggestive of important role(s) during pre-receptive, receptive, and non-receptive endometrium.

Materials and methods

Animals

8 week old female Balb/c mice ($n = 5$ for each group and total $n = 60$) were used to evaluate *in vivo* expression of c-Abl in pre-receptive (day 1–4), receptive (late 4 to late day 5), and non-receptive (refractory) endometrium for day 1–9 and in placenta for day 11, 13 and 15. Adult Balb/C mice were obtained from The Laboratory Animal Center of Akdeniz University of Medical Faculty. Mice were housed under temperature- and light-controlled conditions (12 h light and 12 h dark, 22°C temperature and % 30–60 humidity) with food and water. Females were mated with fertile males of the same strain to induce pregnancy. The first morning in which a vaginal plug was evident, or sperm was evident in vaginal smear was considered as day 0.5 of pregnancy. The studies included in this work were performed in accordance with the Akdeniz University Institutional Animal Care and Use Committee Policies for Animal Use under an approved animal protocol. Handling and euthanasia of mice were performed per the Akdeniz University Institutional Animal Care and Use Ethical Committee. The experimental protocol for animal use was approved by the Akdeniz University Animal Resources Center.

Immunohistochemistry

We determined total uterine (uterus and embryo) c-Abl expression from pre-receptive, receptive and non-receptive endometrium and, day 11, 13, and 15 placental samples with immunohistochemical technique. To detect implantation areas in uterine horns on day 5 of pregnancy, we injected 3 ml 1% Evans Blue into the femoral artery of each female mouse. After 1–2 min we euthanized the animal under ether anesthesia and dissected the uterine tissue. Mouse uterine tissues from the implantation areas were dissected, and fixed in Holland fixative for 6 h. Afterwards, they were washed with tap water for 2 h. They were dehydrated in a graded series of ethanol, were then placed in xylenes. We then embedded the tissues into paraffin blocks. Sections were deparaffinized in xylenes and were rehydrated in a graded series of ethanol, distilled water, and PBS. They were subjected to antigen retrieval by boiling the sections in citrate buffer (10 mM Sodium Citrate, pH = 6.0) in a microwave set on medium–high for 4 min and then cooled to room temperature (RT). After rinsing in PBS, the sections were incubated in antibody

blocking solution for 5 min at RT to prevent non-specific binding, and then incubated with anti-rabbit c-Abl (Labvision, Fremont, CA, USA) and rabbit IgG (negative control) at 4°C for overnight. The sections were incubated in secondary antibody for 20 min at RT. The alkaline phosphatase kit and fast red tablets (Roche) were used in accordance with the manufacturer's specification to reveal the c-Abl staining. The sections were lightly counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated and mounted using mounting medium.

Results

c-Abl expression in gestational days

In this study, we detected total c-Abl protein tyrosine kinase via immunohistochemical staining in the uterus over a time course of pregnancy. During the pre-receptive period, in first day of pregnancy, we detected very weak c-Abl immunolabelling in the apical surface of uterine luminal epithelial cells (LE) (Fig. 1a). When we evaluated endometrial glandular epithelial cells (GE) and endothelial cells of endometrial vessels (EV), we detected the same low c-Abl staining intensity. There was no staining in endometrial stromal cells, but myometrial cells showed weak c-Abl immunoreactivity (data not shown). On the second day of pregnancy, we defined c-Abl expression in the basal pole of LE and GE as well as the apical pole. The number of glands in the endometrium that were immunoreactive increased compared to the 1st day of pregnancy (Fig. 1b). In the following days, the apical surface of LE cells, endometrial glands, and endothelial cells, all showed increasing c-Abl immunostaining through 2nd–4th days of pregnancy (Fig. 1b–d). Negative control immunostaining with normal rabbit IgG confirmed the specificity of c-Abl staining patterns.

On day 5, a non-implanted blastocyst was detected in the receptive uterus (Fig. 2b, c) of one sample. Interestingly, the luminal surface had a smooth, more regular appearance than seen in the days before implantation. This change in morphology may relate to the attachment of the blastocyst at this site. We observed increased c-Abl immunoreactivity on the apical and basal poles of uterine LE cells (Fig. 2a, b). The immunoreactivity was stronger in the apical poles of epithelial cells than in basal poles in LE and GE (Fig. 2b, c). c-Abl immunostaining in endothelial cells of endometrial vessels was observed to be strong as in luminal and glandular epithelial cells (Fig. 2d). When we evaluated the c-Abl immunoreactivity in blastocyte, we observed weak immunostaining in the trophoblast cells and in the inner cell mass of the blastocyst (Fig. 2b) to compare with LE and GE in receptive endometrium.

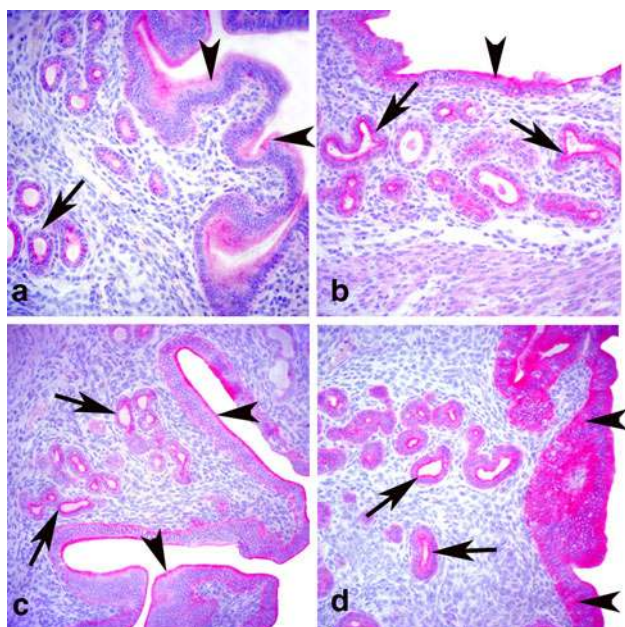


Fig. 1 Expression of c-Abl protein tyrosine kinase in mouse pre-receptive endometrium (day 1–4). c-Abl immunoreactivity in mouse uterine tissue on luminal epithelium (LE) and endometrium (E). **a** c-Abl immunoreactivity expressed luminal (arrow head) and glandular epithelium (arrows) during the 1st day of pregnancy. **b** Luminal epithelium has strong c-Abl immunoreactivity during 2nd, **c** 3rd and **d** 4th day of pregnancy. Apical and basal poles of glandular (arrows) and luminal epithelial cells (arrow head) were showed increased c-Abl immunoreactivity through 1–4 day of pregnancy. Endometrial stromal cells have no c-Abl expression. L: Lumen, E: Endometrium. (Objective magnifications; **a–d** 40 $\times$)

On day 6 (non-receptive endometrium) we detected an embryo that had implanted into the endometrial wall. On the same day, for the first time the amniotic cavity was seen

in the center of the embryo (data not shown). c-Abl immunoreactivity for some of the cells was decreased in uterine LE cells, endometrial GE cells and endothelial cells compared to day 5 of pregnancy. The proamniotic cavity was also observed for the first time on this day. We further detected c-Abl immunoreactivity in parietal and visceral endoderm cells. c-Abl revealed an intense immunoreaction in primary trophoblast cells at the ectoplacental cone in non-receptive endometrium (data not shown).

On day 7, c-Abl immunostaining exhibited strong immunoreactivity in regressed uterine LE, endometrial GE cells and endometrial vessels (EV) as to day 6. Furthermore, by this time some of the epithelial cells entirely lost c-Abl immunoreactivity (data not shown) completing the decreasing trend seen above. Parietal endoderm cells showed more intense immunoreactivity than visceral endoderm cells on the 7th day of pregnancy. Moreover, the ectoplacental cone area enlarged on this day. The number of primary trophoblastic cells increased and they showed very intense c-Abl immunostaining (data not shown).

c-Abl expression was found to decrease in residual lumen epithelium and endometrial GE cells on the 8th (Fig. 3b, c, e) and 9th days of pregnancy (data not shown). c-Abl immunoreactivity in endothelial cells of endometrial vessels (EV) was decreased as seen in epithelial cells (Fig. 3f). However, trophoblastic cells showed very intense membrane staining at ectoplacental cone in non-receptive endometrium (Fig. 3d).

c-Abl expression in placental tissues

We evaluated placental expression of c-Abl within the three placental layers; the labyrinth zone-the fetal part of

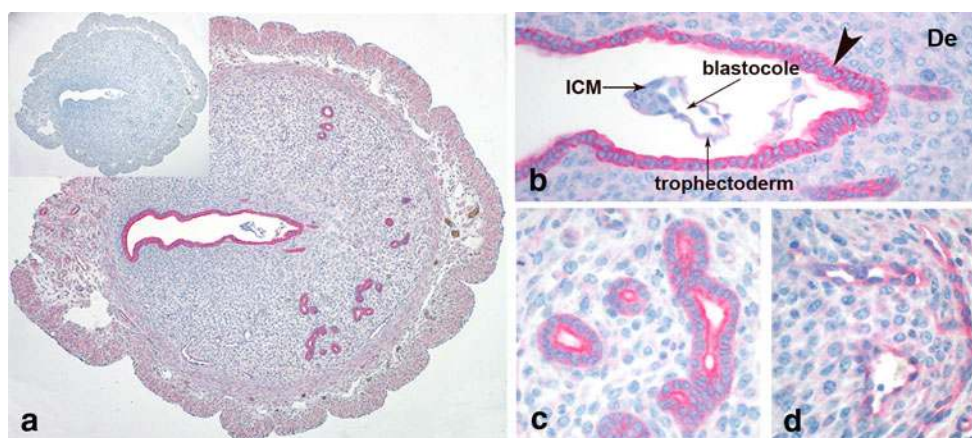


Fig. 2 c-Abl immunoreactivity in decidua (De) of mouse uterus in receptive endometrium (day 5) (**a**); in uterine luminal epithelium (arrow head, **b**) and glandular epithelium (**c**) have a strong c-Abl immunoreactivity. In the myometrium, longitudinal and transverse muscular layers have moderate immunoreactivity. It was the first time in this day, decidua area was seen and decidua cells showed weak

c-Abl expression. Preimplantation blastocyst that trying to attach to luminal epithelium has weak c-Abl expression. Inner cell mass (ICM) and trophoblast cells showed weak c-Abl expression (arrow) (**b**), Endometrial vessels endothelial cells exhibit c-Abl immunoreactivity in this stage (**d**). Insert: Negative control (**a**). De: Decidua (Objective magnifications; **a** 10 $\times$, **b–d** 40 $\times$)

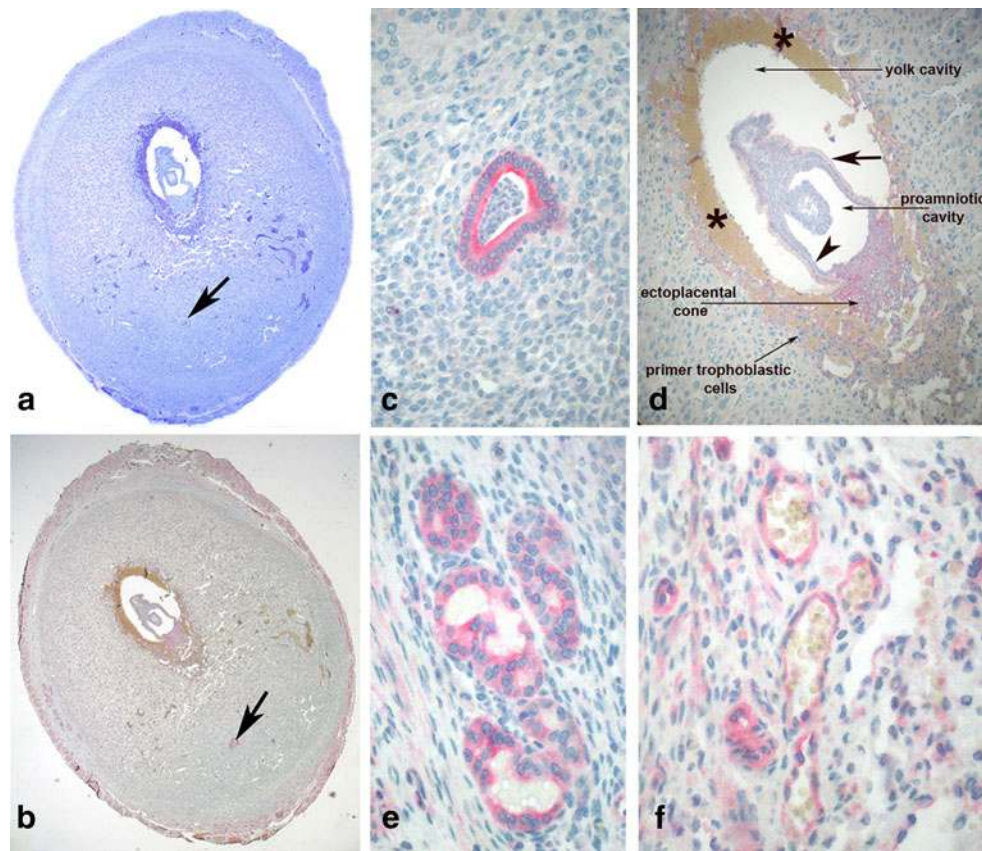


Fig. 3 c-Abl immunoreactivity in mouse uterine tissue during non-receptive endometrium (day 8). Residual lumen (*arrow*) is seen at mesometrial pole (**a**, **b**). c-Abl expression observed, in residual lumen epithelium (**c**) and in embryo (**d**). Ectoplacental area display very strong c-Abl immunoreactivity (**d**). Glandular epithelial cells (**e**) and

endothelial cells of mesometrial vessels (**f**) showed c-Abl expression. Negative control (**a**). Embryonic ectoderm (*arrow head*), extraembryonic ectoderm (*arrow*), maternal blood (*asterisk*). (Objective magnifications; **a–b** 5×, **d** 20×, **c–e**, **f** 40×)

the placenta, the junctional zone, and the decidua basalis—the maternal part of placenta. On day 11 of pregnancy, c-Abl expression was observed in the cytoplasm and surface/plasma membrane of trophoblastic cells and endothelial cells of fetal vessels of the labyrinth zone, but was not seen in the junctional zone or the decidua basalis (Fig. 4a, b). We detected increased c-Abl immunoreactivity in the fetal part of the placenta on day 13 (Fig. 4c, d), but not in the maternal part (Fig. 4c). On day 15, c-Abl immunoreactivity in giant trophoblast cells and endothelial cells of fetal vessels was increased compared to day 13 (Fig. 4e, f). No immunoreactivity for c-Abl tyrosine kinase was seen in the maternal part of the placenta at this time (Fig. 4e). In the days of pregnancy evaluated, only the glycogenic cells of the junctional zone showed weak c-Abl immunoreactivity. Interestingly, trophoblast cells exhibited increased cytoplasmic and membrane staining throughout pregnancy. There were interesting heterogeneous staining intensities on various parts of giant trophoblast cell membrane (Fig. 4f) that warrant further study. It may be that

trophoblast giant cells present this dramatic staining because of their migration during placental modeling.

Discussion

Here we have further characterized the expression of total c-Abl protein tyrosine kinase during mouse pre-receptive, receptive and non-receptive endometrium. We also showed that c-Abl tyrosine kinase localizes in fetal part of mouse placenta but not in maternal part. These findings provide evidence that c-Abl as a protein tyrosine kinase is involved in uterine modeling and placental development.

Previous literature assessed c-Abl expression in somatic and germ cell lineages and demonstrated its role in the preimplantation period of embryonic development in mice (Ahmad and Naz 1994). c-Abl knock-out mice showed neonatal lethality and lymphopenia (Tybulewicz et al. 1991). Interestingly, Iwaoki et al. (1993) showed that high levels of c-Abl mRNA expression in the ovary correlated

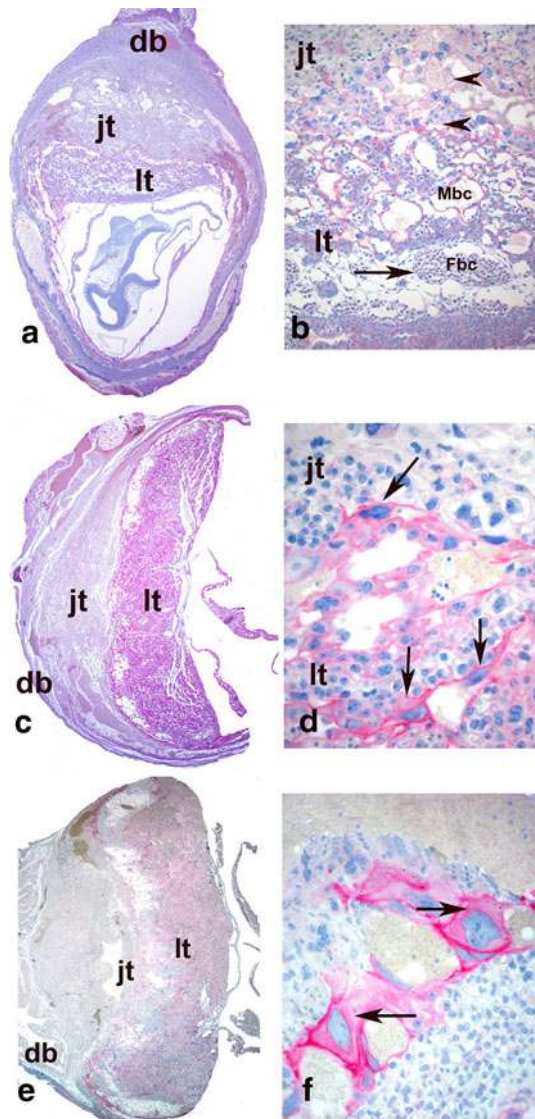


Fig. 4 c-Abl expression on mouse placenta. c-Abl immunoreactivity in 11. day of gestation in mouse decidua basalis (db) and placental layers; labyrinth layer (lt) and junctional layer (jt) (a), in placental cells (b). Trophoblastic giant cells showed membranous and cytoplasmic c-Abl expression. Glycogenic cells (arrow heads) showed membranous c-Abl staining. Spongiotrophoblast cells did not display any immunoreactivity. Endothelial cells of labyrinth layer vessels display very strong c-Abl immunoreactivity. Fetal blood cells (Fbc) exhibited weak cytoplasmic c-Abl staining in the vessel, but Maternal blood cells (Mbc) did not (b). c-Abl immunoreactivity on the 13th day of gestation in mouse placenta (c). Trophoblastic giant cells (arrow) showed very intense membranous and cytoplasmic staining in the labyrinth layer (lt) of placenta (d). Spongiotrophoblast cells showed almost no c-Abl expression in their cytoplasm. c-Abl immunoreactivity in 15. day of gestation in mouse placental layers (e) and different placental cells (f). Trophoblastic giant cells (arrows) showed very strong c-Abl staining, interestingly some membranous part of cells exhibit more strong immunoreactivity than others. lt: labyrinth layer, jt: junctional layer, db: decidua basalis. (Objective magnifications; a, c, e 2,5×; b, d, f 40×)

with different sizes of oocytes. In our study here, we evaluated the distribution of the total c-Abl protein in the uterus and early embryo through the window of endometrial receptivity to non-receptive endometrium. We found a strong cytoplasmic and membranous staining during mouse embryonic development. On days 1 and 2 of pregnancy c-Abl showed a gradually increasing immunostaining until day 5 (receptive stage) (correlating with decreasing estrogen after ovulation), the day implantation occurs (Paria et al. 1998; Carson et al. 2000). In our study c-Abl increased in expression in uterine LE cells and endometrial GE cells from days 1 through 5 of pregnancy suggesting that during the pre-receptive period, this increase is likely to be involved in uterine remodeling necessary for this impending implantation and decidualization.

Moore and Kinsey (1994) suggested that c-Abl protein tyrosine kinase was associated with cytoskeletal components closely (Moore and Kinsey 1994). There are some studies showing that c-Abl has F- and G-actin-binding domain in its amino terminal region (Hantschel and Superti-Furga 2004; Hernandez et al. 2004), and binds to apical actin filaments in neuroepithelial cells (Van Etten 1999), suggesting a role in regulation of apical cytoskeleton (Woodring et al. 2003), cell adhesion and G-actin polymerization (Lanier and Gertler 2000; Moresco and Koleske 2003). We hypothesize that it is through the use of these cytoskeletal binding motifs that c-Abl may regulate the structural and functional differentiation of the uterine lumen, stroma, and trophoblasts. Particularly, it may take role in migration and movement of giant trophoblastic cells during placental development.

Previous studies showed that proline rich region of ESX1 mediates interactions in vitro with the c-Abl SH3 domain and ESX1 has an essential function during placental development (Yan et al. 2000). As is known, the labyrinth layer, fetal part of placenta, has a vessel network formed by fetal capillary and maternal lacunas, and supplies an extensive contact surface by this vessel network (Ohlsson et al. 1999). Primary hemotrophic change between mother and fetus occurs within this labyrinth layer, and it is not possible embryo can survive without it (Coan et al. 2004). In our study, we showed an intense c-Abl staining in the labyrinth layer; it may be that c-Abl is involved in the proper development of labyrinth layer and thus the survival of the fetus. We indicated that c-Abl expressed in labyrinth layer of placenta, but not in the junctional layer or decidua basalis at days 11, 13 and 15 of gestation. Remarkably, c-Abl expression *increased* in the giant trophoblast cells and endothelial cells of fetal vessels in the labyrinth layer from the 11th to the 15th day of development. Thus we suggested that c-Abl could support

development and continuity of placental development by playing an important role in proliferation and migration of trophoblastic cells necessary for fetal survival. Both cytoplasmic and membrane localization of c-Abl, especially regarding its function in actin polymerization would be explained by having c-Abl act in an effective role in dynamic intracellular organization, coordinating morphological changes and the movement(s) of trophoblast cells.

Other previous studies have shown that c-Abl acts as an angiogenic factor (O'Neill et al. 1997) and has a key role in differentially mediating bFGF- and VEGF-induced angiogenesis in microvascular endothelial cells (Yan et al. 2008) and tumor micro-vessels (O'Neill et al. 1997). Our findings are also consistent with c-Abl may have an angiogenic function during placental development. It can be hypothesized that c-Abl may have a functional role in angiogenesis and development of both the placenta and fetal hematopoietic system. As mentioned, c-Abl knockout mice have been shown to die early upon parturition (Tybulewicz et al. 1991). Our detailed analysis of the expression of the protein suggests that it may have a more subtle role in early reproductive events than appreciated. Defects in synthesis or regulation of the activity of c-Abl might cause abnormalities in the blastocyst or in aberrant uterine remodeling with resulting altered embryonal and/or placental development. Indeed, the defects found in the knockout mice may in part result from developmental events gone awry in the early embryo or placenta, or uterus. Careful study of the consequences of disrupted c-Abl function early in development, either in maternal tissues, the embryo, or both, will allow these questions to be answered.

Acknowledgments This study was supported by the Research Fund of Akdeniz University—Antalya/Turkey (Project no #2004.02.0122.006).

References

- Abelson HT, Rabstein LS (1970) Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res* 30:2213–2222
- Ahmad K, Naz RK (1994) Protein phosphorylation pattern and role of products of c-erbB-1 and c-abl proto-oncogenes in murine preimplantation embryonic development. *Am J Reprod Immunol* 32:226–237
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K (2000) Embryo implantation. *Dev Biol* 223: 217–237
- Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2004) Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod* 70:1806–1813
- Daniel R, Chung SW, Eisenstein TK, Sultzner BM, Wong PM (2001) Specific association of Type I c-Abl with Ran GTPase in lipopolysaccharide-mediated differentiation. *Oncogene* 20: 2618–2625
- Hantschel O, Superti-Furga G (2004) Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:33–44
- Hernandez SE, Krishnaswami M, Miller AL, Koleske AJ (2004) How do Abl family kinases regulate cell shape and movement? *Trends Cell Biol* 14:36–44
- Iwaoki Y, Matsuda H, Mutter GL, Watrin F, Wolgemuth DJ (1993) Differential expression of the proto-oncogenes c-abl and c-mos in developing mouse germ cells. *Exp Cell Res* 206:212–219
- Laneuville P (1995) Abl tyrosine protein kinase. *Semin Immunol* 7:255–266
- Lanier LM, Gertler FB (2000) From Abl to actin: Abl tyrosine kinase and associated proteins in growth cone motility. *Curr Opin Neurobiol* 10:80–87
- Li B, Boast S, de los Santos K, Schieren I, Quiroz M, Teitelbaum SL, Tondravi MM, Goff SP (2000) Mice deficient in Abl are osteoprotic and have defects in osteoblast maturation. *Nat Genet* 24:304–308
- Moore KL, Kinsey WH (1994) Identification of an abl-related protein tyrosine kinase in the cortex of the sea urchin egg: possible role at fertilization. *Dev Biol* 164:444–455
- Moresco EM, Koleske AJ (2003) Regulation of neuronal morphogenesis and synaptic function by Abl family kinases. *Curr Opin Neurobiol* 13:535–544
- O'Neill AJ, Cotter TG, Russell JM, Gaffney EF (1997) Abl expression in human fetal and adult tissues, tumours, and tumour microvessels. *J Pathol* 183:325–329
- Ohlsson R, Falck P, Hellstrom M, Lindahl P, Bostrom H, Franklin G, Ahrlund-Richter L, Pollard J, Soriano P, Betsholtz C (1999) PDGFB regulates the development of the labyrinthine layer of the mouse fetal placenta. *Dev Biol* 212:124–136
- Paria BC, Das N, Das SK, Zhao X, Dileepan KN, Dey SK (1998) Histidine decarboxylase gene in the mouse uterus is regulated by progesterone and correlates with uterine differentiation for blastocyst implantation. *Endocrinology* 139:3958–3966
- Plattner R, Kadlec L, DeMali KA, Kazlauskas A, Pendergast AM (1999) c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13:2400–2411
- Shaul Y (2000) c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 7:10–16
- Shaul Y, Ben-Yehoyada M (2005) Role of c-Abl in the DNA damage stress response. *Cell Res* 15:33–35
- Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, McElroy AK, Wang JY, Hope TJ (1998) Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7457–7462
- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 65:1153–1163
- Van Etten RA (1999) Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9:179–186
- Woodring PJ, Hunter T, Wang JY (2003) Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci* 116:2613–2626
- Yan YT, Stein SM, Ding J, Shen MM, Abate-Shen C (2000) A novel PF/PN motif inhibits nuclear localization and DNA binding activity of the ESX1 homeoprotein. *Mol Cell Biol* 20:661–671
- Yan W, Bentley B, Shao R (2008) Distinct angiogenic mediators are required for basic fibroblast growth factor- and vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis: the role of cytoplasmic tyrosine kinase c-Abl in tumor angiogenesis. *Mol Biol Cell* 19:2278–2288

Reproductive Sciences

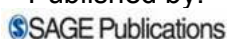
<http://rsx.sagepub.com>

A Putative Mitotic Checkpoint Dependent on mTOR Function Controls Cell Proliferation and Survival in Ovarian Granulosa Cells

Aylin Yaba, Veronica Bianchi, Andrea Borini and Joshua Johnson
Reproductive Sciences 2008; 15; 128
DOI: 10.1177/1933719107312037

The online version of this article can be found at:
<http://rsx.sagepub.com/cgi/content/abstract/15/2/128>

Published by:



<http://www.sagepublications.com>

On behalf of:



[Society for Gynecologic Investigation](#)

Additional services and information for Reproductive Sciences can be found at:

Email Alerts: <http://rsx.sagepub.com/cgi/alerts>

Subscriptions: <http://rsx.sagepub.com/subscriptions>

Reprints: <http://www.sagepub.com/journalsReprints.nav>

Permissions: <http://www.sagepub.com/journalsPermissions.nav>

Citations (this article cites 33 articles hosted on the
SAGE Journals Online and HighWire Press platforms):
<http://rsx.sagepub.com/cgi/content/refs/15/2/128>

A Putative Mitotic Checkpoint Dependent on mTOR Function Controls Cell Proliferation and Survival in Ovarian Granulosa Cells

Aylin Yaba, MSc, Veronica Bianchi, PhD, Andrea Borini, MD, and Joshua Johnson, PhD

The conserved target of rapamycin (TOR) proteins are involved in sensing nutrient levels and/or stress and the resultant control of cell growth, size, and survival. The authors assess mammalian TOR (mTOR) kinase expression in the mouse ovary and also the expression of its cofactors, Raptor, Rictor, and LST8. In granulosa cells, mTOR demonstrates high cytoplasmic/perinuclear expression. The kinase-active serine 2448-phosphorylated form of mTOR (P-mTOR) is present at very high levels during the M-phase. P-mTOR was enriched on or near the mitotic spindle and also near the contractile ring during cytokinesis. Rapamycin inhibition of mTOR resulted in both reduced granulosa cell proliferation and reduced follicle growth in vitro, each in a dose-dependent fashion. Follicles cultured in rapamycin did not undergo atresia. mTOR inhibition results in a reduction in granulosa cell proliferation, supporting a model in which stress and nutritional cues may directly influence ovarian follicle growth.

KEY WORDS: TOR, mTOR, mouse, ovary, granulosa cells, follicle, growth, cytoskeleton, proliferation, size control.

Coordinated Granulosa Cell Proliferation Is Responsible for the Growth of Mammalian Ovarian Follicles

Follicles within the mammalian ovary grow in response to a multitude of cues, including autocrine, endocrine, paracrine, and juxtacrine signals.^{1,2} Within this complex context, the granulosa cells that surround single oocytes are the key to follicle growth and increasing mass. Beginning as a single layer of just a few pregranulosa cells around a primordial oocyte, growth-activated granulosa

cells proliferate in a stereotyped manner that results in the multilaminar ovulatory follicle. Ovulatory follicles contain tens of thousands of granulosa cells and surrounding theca cells, which have proliferated and differentiated to support the mature oocyte. While many signals that affect granulosa cell behavior in vivo and in vitro have been exhaustively characterized, exactly how granulosa cells integrate said signals to control the growth of follicles is unclear. One pathway that serves to integrate such signals operates using the conserved mTOR kinase to regulate cell responses to environmental cues.

mTOR Signaling and Cell Behavior

The target of rapamycin (TOR) gene product is a serine/threonine kinase that has been implicated in the control of a variety of cell behaviors. In general, during periods of compromised nutrition or stress, mammalian TOR (mTOR) activity is decreased, leading to pleiotropic downstream effects that can reduce cell size³ and induce the onset of autophagy.⁴ Reduced mTOR activity can also result in decreased proliferation,⁵ and for this reason, mTOR is considered an important target for anticancer therapy.

From the Department of Obstetrics, Gynecology, & Reproductive Sciences, Yale School of Medicine, New Haven, Connecticut (AY,VB,JJ), and Tecnobios Procreazione, Bologna, Italy (VB,AB).

We would like to thank Dr John S. Davis for commentary on the article prior to submission. Dr Vikki M. Abrahams provided invaluable assistance with cell viability assessment. Jimmy Hom and Brett Carisio are also thanked for enthusiastic, helpful technical assistance.

Address correspondence to: Joshua Johnson, Department of Obstetrics, Gynecology, & Reproductive Sciences, Yale School of Medicine, 300 George Street, Room 770D, New Haven, CT 06510; e-mail: josh.johnson@yale.edu.

Reproductive Sciences Vol. 15 No. 2 February 2008 128-138

DOI: 10.1177/1933719107312037

© 2008 by the Society for Gynecologic Investigation

mTOR functions as part of at least 2 multiprotein complexes, each of which has defined roles in the control of cell growth and fate. The first, the mammalian TOR complex 1 (mTORC1), consists of mTOR and a growing list of cofactor proteins. Among these cofactors, the protein Raptor^{6,7} has been shown to be required for the downstream effects of mTORC1. The other mTOR complex, mTORC2, includes the cofactor Rictor essentially in place of Raptor.^{8,9} mTORC2 has been shown to regulate the organization of the actin cytoskeleton, acting through Rho GTPases.^{8,10}

mTOR Activity

Phosphorylation of serine residue 2448 in mTOR has been shown to correlate with the activation status of mTOR.¹¹⁻¹⁴ The active molecule is referred to here as P-mTOR. mTOR Ser-2448 phosphorylation is acutely sensitive to rapamycin treatment.^{11,15} Phosphorylation of mTOR at this site has been shown to be dependent on upstream activity of the PI-3 kinase pathway^{11,16,17} and, more recently, as resulting from feedback from a downstream mTOR substrate, P70S6 kinase (p70S6K).¹¹ As such, this modified form of mTOR has been used as an indication of its activity and thus is reflective of nutrient availability and stress.

mTOR Expression in the Ovary and Within Other Mammalian Cells

Questions about mTOR function within the ovary have begun to be addressed in the contexts of granulosa cell¹⁸ and luteal cell¹⁹ function. Some information is available regarding the subcellular localization of mTOR in other mammalian cells and tissues. In one example, Zhang et al²⁰ demonstrated a predominantly nuclear localization of mTOR in a variety of transformed cell lines and primary cells. In contrast, Drenan et al²¹ showed that endogenous and recombinant mTOR primarily localize to the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus, even in some of the same cell types. Another group showed that the active form of mTOR (phospho-serine 2448) is predominantly nuclear in untreated Swiss 3T3 cells but rapidly becomes associated with an actin cytoskeletal arc upon the activation of cell migration.²² Here, we have determined the location(s) of (1) total and (2) active mTOR expression within the mouse ovary. Furthermore, we show that inhibition of mTOR in primary cultures of

granulosa cells results in cell death that correlates with the G2/M stages of the cell cycle. Ovarian follicles cultured in the presence of rapamycin were reduced in size compared with vehicle-treated controls but remained viable; the effects of rapamycin were not seen to be consistent with the induction of follicular atresia. We hypothesize that mTOR acts as a novel mitotic survival checkpoint that acts to regulate follicle growth in vivo.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The studies included in this work were performed in accordance with the Yale University Institutional Animal Care and Use Committee Policies for Animal Use under an approved animal protocol. Handling and euthanasia of mice were performed per the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. C57BL/6 mice between 25 days and 11 weeks of age were used for these studies. Ovaries were collected from 25-day-old and 12-week-old C57BL/6 mice to evaluate in situ expression of mTOR and P-mTOR. Animals were housed in a temperature-controlled room (21°C) under a 14:10 hour dark:light cycle with food and water available ad libitum. Mice were killed using cervical dislocation after ketamine anesthesia. After their removal, the ovaries were immediately fixed with fresh 4% paraformaldehyde for 6 hours for immunostaining. The experimental protocol for animal use was approved by the Yale University Animal Resources Center.

Immunostaining

Detection of mTOR, P-mTOR, and P-HH3 in paraffin sections. Paraffin-embedded samples were cut into 5- μ m sections. After deparaffinization in xylene and rehydration in a graded series of ethanols, antigen retrieval was performed by microwaving in 10 mM sodium citrate, pH 6.0 for 8 minutes. For colorimetric detection of mTOR and P-mTOR, sections were immersed in 3% hydrogen peroxide in methanol for 10 minutes to block endogenous peroxidase activity. Slides were then incubated in a humidified chamber with TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and 5% normal goat serum; Sigma, St Louis, MO) for 1 hour at room temperature. After removing excess blocking solution, the sections were incubated with rabbit antimouse mTOR (1:50 dilution;

Cell Signaling Technology, Danvers, MA) or P-mTOR (1:50 dilution; Cell Signaling) overnight in a humidified chamber at 4°C. The sections were washed 3 times for 5 minutes each with TBS-T, then incubated in biotinylated antirabbit second antibody. Incubation in streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) conjugates (ABC Elite HRP staining kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) followed for 30 minutes. After washing, sections were incubated in DAB (Sigma) and optionally counterstained with hematoxylin. For dual immunostaining, Alexa 546-conjugated goat antirabbit second antibody (1:300 dilution; Molecular Probes, Carlsbad, CA) was substituted for 1 hour at room temperature. The sections were washed 3 times for 5 minutes each with TBS-T, then reblocked with 5% normal goat serum in TBS-T solution for 15 minutes at room temperature. Sections were optionally incubated with rabbit antimouse Phospho-Histone H3 (Alexa 488 conjugate; Cell Signaling; 1:200 dilution in TBS-T) or antimouse α -tubulin (Alexa 488 conjugate) for 1 hour at room temperature. After final washes, sections were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories; H-1400) containing a 1:200 dilution of DAPI.

Cell Labeling and Cytospin Slide Preparation

For granulosa cell labeling and subsequent cytospin slide preparation, the manufacturer's protocol for P-HH3 staining of cells in suspension was followed with the following modification for concurrent labeling of P-mTOR. Prior to the addition of the fluor-conjugated anti-P-HH3, cells were treated with anti-P-mTOR (1:50 dilution) overnight at 4°C, washed 3 times for 5 minutes, and then stained with antirabbit second antibody (Alexa 546 conjugate). Reblocking was performed prior to the addition of anti-P-HH3. After 3 final washes, cytospin slides were prepared, and cell nuclei were stained with DAPI. Both sections and granulosa cell cytospin preparations were imaged using a Zeiss LSM Pascal Confocal Microscope.

In Vitro Culture, Treatment, and Viability Assessment of Granulosa Cells and Follicles

Granulosa cells. Ovaries were removed, rinsed in DMEM media, and incubated in 3% sucrose/0.01 M EDTA.

Afterward, cells were moved to DMEM/F12 with 5% serum and punctured, and granulosa cells were filtered through a 40- μ m filter. Cells were pelleted and resuspended in DMEM/F12 containing 5% serum, 1 $\times$ penicillin/streptomycin, and 13 μ g/mL laminin (Invitrogen, Carlsbad, CA). Fifty thousand cells per well were then plated in 96-well plates. The following day (day 0), the media were removed and replaced with fresh media lacking only laminin but containing either vehicle (EtOH) or vehicle containing rapamycin in the following 100-fold dilutions: 10, 0.1, 0.001, and 0.00001 nM. Cell viability was assessed via the CellTiter assay^{23,24} 1, 3, and 5 days after the addition of vehicle or rapamycin. For direct cell counts, 75 000 cells were plated and treated identically with rapamycin or vehicle. At 1, 3, and 5 days after treatment, cells (in triplicate) were trypsinized and resuspended in 100 μ L of phosphate-buffered saline containing 0.01% Trypan Blue (EMD Chemicals, Darmstadt, Germany); the number of viable cells was determined using a hemocytometer by counting those cells that excluded Trypan Blue. A 2-way ANOVA of data from viability and cell number experiments was performed using GraphPad Prism statistical analysis software (GraphPad Software, San Diego, CA).

Ovarian follicles. Follicles were cultured after the work of Cortvrindt et al.²⁵ Briefly, preantral follicles were mechanically isolated from the ovaries of 25-day-old mice in Leibovitz L-15 media containing 1 $\times$ penicillin/streptomycin. Individual follicles were then placed in individual drops of follicle culture media containing 0.5 μ g/mL recombinant follicle-stimulating hormone (National Hormone and Peptide Program, HUMC, <http://www.humc.edu/hormones>) under mineral oil. Photographs were taken of follicles every 24 hours, and diameter measurements were calculated using Axiovision software (Zeiss, Thornwood, NY). Follicle viability was assessed via a luminescent viability assay (Celltiter-glo; Promega, Madison, WI) by placing individual follicles either postculture or immediately after isolation (controls) into fresh media droplets containing assay substrate for 2 hours at room temperature.

For reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), RNA was extracted from either whole ovaries or isolated granulosa cells as follows. Either 1 whole ovary or granulosa cells isolated from 2 ovaries were homogenized in 1 mL of Tri Reagent (Invitrogen), followed by RNA extraction. Reverse transcription was performed on 1 μ g of total RNA using Superscript II

reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed using 1 μ L of each RT sample within a reaction mix containing 1 $\times$ Buffer D (Epicentre Biotechnologies, Madison, WI), 10 pmol of each primer, and Taq polymerase (Epicentre Failsafe Taq polymerase). Thirty-five PCR cycles were performed for all target genes, with the exception of the loading control β -actin, for which 25 cycles were performed. Primers used for the amplification of mTORC complex genes were as follows (oligonucleotide sequences listed 5' to 3' orientation; accession number and product size follow gene name in parentheses). All primers were designed such that a genomic exon was spanned, and mock reversed transcribed control samples were run versus every experimental sample. mTOR (AF152838, 150 bp): sense, TTG GAG TGG CTG GGT GCT GA, antisense, AAG GGC TGA ACT TGC TGG AA; LST8 (AK088951, 138 bp): sense, GAC TAA GGC AGA GTG CAG AG, antisense, AAA AGC GCA CCG TGT GGT CA; raptor (AB082952, 148 bp): sense, GCC ATC ACA GAT ACC ATC GC, antisense, CTG CTT ACT GGG GTG CAG TT; Rictor (AK087858, 110 bp): sense, GAG AAC GTC CCG CTC GAT CT, antisense, TGG CCC AGC TTT CTC ATA TT; and β -actin (NM007393, 399 bp): sense, GAT GAC GAT ATC GCT GCG CTG, antisense, GTA CGA CCA GAG GCA TAC AGG.

RESULTS

mTOR Is Broadly Expressed in the Mouse Ovary

As revealed by immunohistochemical detection methods, mTOR expression was found to be essentially ubiquitous in the mouse ovary (Figure 1), with higher expression in the cytoplasm than the nuclei of cells (Figure 1A, B; nuclear counterstaining is omitted to reveal greater expression in cytoplasm than nuclei; the asterisk indicates a positively stained oocyte). Cytoplasmic mTOR was detected in granulosa cells, theca, the ovarian stroma, ovarian surface epithelium, and oocytes at all stages of follicular development (examples in Figure 1B [asterisk] and C [red box and inset]).

The Kinase-Active Form of mTOR (Phospho-Serine 2448) Is Highly Enriched in Mitotic Granulosa Cells

We went on to assess the expression of the active, serine 2448-phosphorylated form of mTOR¹⁵ (referred to here

as P-mTOR) in ovary tissue sections. Given the broad and mainly cytoplasmic nature of total mTOR expression within granulosa cells, we expected a similar distribution of the active form, under conditions in which nutritional and stress status were normal *in vivo*. However, P-mTOR was found to be massively enriched in a small subset of cells within healthy follicles (colorimetric detection of P-mTOR is shown in Figure 1D-G, with counterstaining omitted in Figure 1D to highlight the specificity within the granulosa cells relative to other ovarian cell types and enrichment in scattered cells). This enrichment of Ser 2448-phosphorylated mTOR was found to correlate strongly with the mitotic status of granulosa cells (Figure 1F-J). P-mTOR displayed dynamic expression during the M phase, showing an association near (Figure 1F and G, red arrowheads) and between (Figure 1F, I, and J, yellow arrowheads) separating chromosomes. Concentrated P-mTOR expression was also consistently detected in the region of the actin contractile ring of dividing granulosa cells (Figure 1G, white arrowhead). Adjacent oviduct and uterine tissues were also examined, and no increase in the amount of P-mTOR was detected during mitosis in any cell type other than granulosa cells (data not shown).

The specificity of enriched expression during mitosis was confirmed by dual staining of mTOR and P-mTOR with the mitosis-specific phosphorylated form of Histone H3 (P-HH3).²⁶ Costaining with anti-P-HH3 (green channel) revealed that in the case of P-mTOR, most granulosa cells with high expression of P-mTOR were also positive for P-HH3 (Figure 1H, I). High P-mTOR expression was seen in all stages of mitosis, with the phosphoprotein showing tight localization to the region of the mitotic spindle in P-HH3-positive cells (Figure 1H, merged inset; and Figure 1I, yellow arrowhead). Costaining with α -tubulin confirmed the enrichment of P-mTOR in the region of the mitotic spindle (Figure 1J). While the association of P-mTOR with actin-containing cytoskeletal structures has been reported,²² its expression in the region of the tubulin-based mitotic spindle is a novel observation that may have unique consequences for granulosa cells and their proliferation.

Analysis of paraffin-embedded tissue sections allowed for high-quality, reproducible detection of mTOR and P-mTOR and their relative expression levels in the different cell types of the ovary. However, to further assess the subcellular localization of P-mTOR during interphase cell cycle stages, we went on to use cytospin preparations of freshly isolated mouse granulosa cells for the same dual

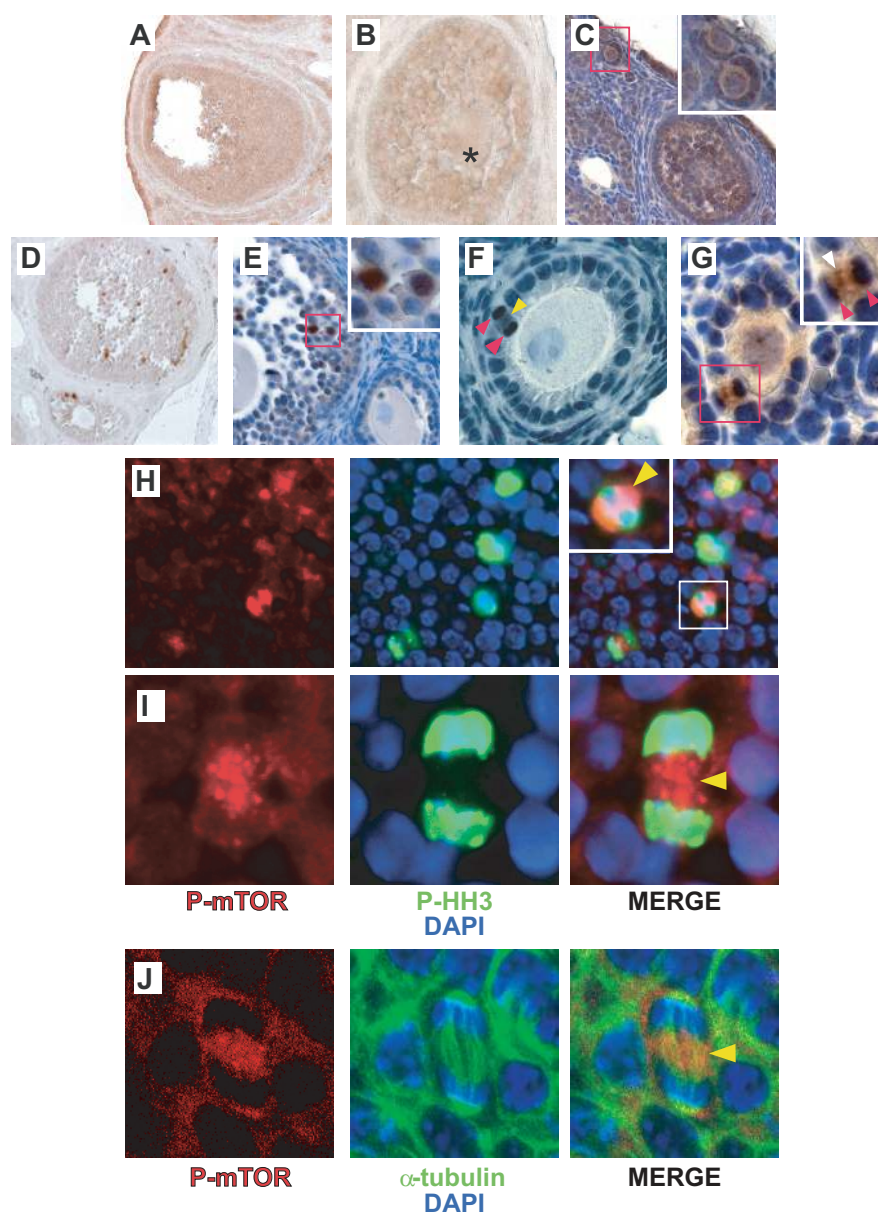


Figure 1. Expression of total and active (P-mTOR) mammalian target of rapamycin (mTOR) in the mouse ovary. Expression of mTOR in growing follicles in the ovaries of 12-week-old animals via colorimetric immunohistochemical detection. (A, B) Hematoxylin counterstaining has been omitted so that the positive signal (brown) may clearly be seen to be predominantly cytoplasmic. mTOR is expressed essentially ubiquitously, with the highest levels seen in the ovarian surface epithelium and granulosa cells. Most granulosa cells express mTOR in their cytoplasm. (C) Representative small (primordial and primary) follicles, in which both granulosa cells and immature oocytes express mTOR. In contrast, P-mTOR was found to be massively enriched in a small subset of cells within healthy follicles (colorimetric detection of P-mTOR is shown in panels D and G, with counterstaining omitted in panel D to highlight the specificity to granulosa cells and nuclear enrichment in scattered cells). P-mTOR showed an enriched expression that correlated strongly with the mitotic status of granulosa cells. Cells with mitotic figures showed high P-mTOR expression adjacent to condensed chromatin (F and G, red arrowheads). P-mTOR could also be seen decorating the contractile ring (G) in cells undergoing cytokinesis (G, inset, white arrowhead). Immunofluorescent costaining with anti-phospho-Histone H3 antibody revealed that most mitotic cells positive for P-HH3 were also positive for P-mTOR (H, I). In the case of cells at the metaphase and anaphase stages of mitosis, P-mTOR could be seen in the region of the mitotic spindle (yellow arrowhead, H and inset; also I). We went on to confirm the specificity of enriched expression during the mitosis of P-mTOR by performing dual staining for P-mTOR and α -tubulin (see Figure 1J, yellow arrowhead).

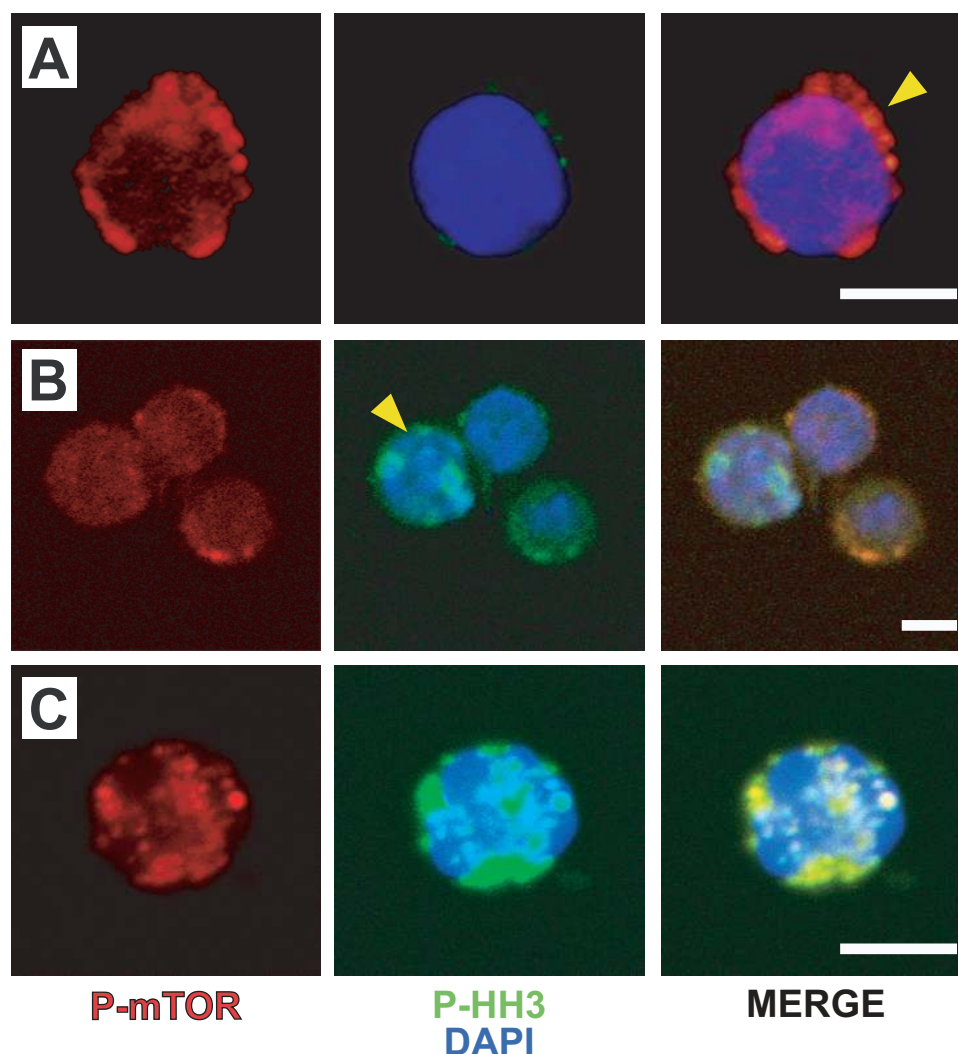


Figure 2. P-mTOR is expressed in freshly isolated mouse granulosa cells and enriched in those cells that are entering mitosis. Cytospin preparations of granulosa cells were prepared and dual stained for P-mTOR and P-HH3. These cytospin preparations allowed for a more detailed view of the subcellular localization of P-mTOR. P-mTOR was clearly detected as being perinuclear (A and B, yellow arrowheads) in nondividing cells (A and B) and at greatly increased levels reminiscent of that seen in paraffin sections (above) in G2/M-phase granulosa cells (C). All cells that expressed high levels of P-mTOR also expressed P-HH3. Scale bars = 5 μ m.

immunostaining (Figure 2). Immunostaining of cytospin preparations revealed that P-mTOR is primarily cytoplasmic/perinuclear in nondividing cells (Figure 2A). This expression was evocative of that seen in the region of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum as reported by Drenan et al.²¹ Here again, remarkable colocalization of P-HH3 and P-mTOR was found (Figure 2B, C) in cells with intact nuclei.

The localization of mTOR and its active form to cytoskeletal elements led us to question which of the 2 mTOR complexes are present and potentially controlling the function of granulosa cells. As mentioned, mTORC1

and mTORC2 have defined roles in cell behavior, with mTORC2 having previously been indirectly implicated in the control of the actin cytoskeleton. As the proteins Raptor (a required component of mTORC1) and Rictor (mTORC2) are mutually exclusive in the 2 mTORCs, we determined which of the 2 are expressed in granulosa cells by RT-PCR. As shown, both Raptor and Rictor are expressed in whole ovary and in isolated granulosa cells (Figure 3) at the level of mRNA. Whether the 2 proteins are expressed and actually participate in mTORC function at the cytoskeletal sites revealed in these studies remains to be investigated.

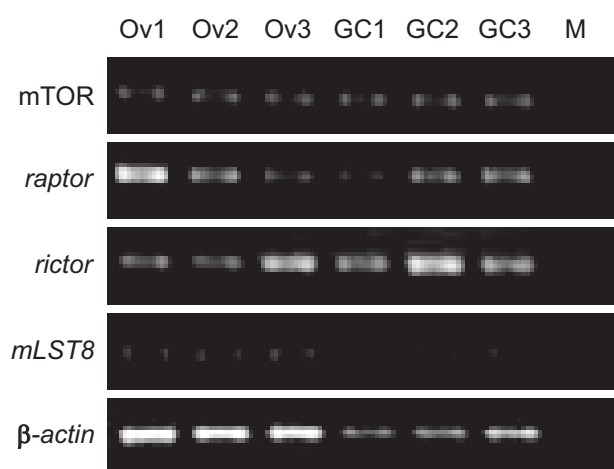


Figure 3. Granulosa cells express the key components of both mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) and mTORC2. Reverse transcription polymerase chain reaction analysis of mTORC genes showed that the key components of both mTORC1 and mTORC2 are expressed in granulosa cells. Transcripts of 2 genes common to both complexes, mTOR and mLST8, are expressed in whole ovary samples (3 unique repeats, Ov1–3) and in isolated granulosa cells (GC1–3). Both Raptor, an essential component of mTORC1, and Rictor, essential for mTORC2, are expressed in whole ovary and in isolated granulosa cells. All mock reverse-transcribed samples resulted in no bands.

Rapamycin Treatment Results in a Reduction in Granulosa Cell Proliferation and Aberrant Mitoses

The association with the mitotic apparatus mTOR might have a role during granulosa cell mitosis. Inhibition of mTOR might therefore affect and potentially prevent normal mitosis. To this end, cell proliferation was assessed within primary mouse granulosa cells cultured in vitro. Fifty thousand granulosa cells were plated in triplicate and treated with either 1 concentration in a dilution series of rapamycin or ethanol vehicle. As a control, the global induction of apoptotic cell death in these cultures was assessed via fluorescent-labeled annexin V and propidium iodide (PI) exclusion. Apoptotic cells were very rare (less than 0.1% annexin V–positive/PI–negative cells, $n = 3$ samples per treatment) under all treatment conditions. This is in keeping with published reports of mTOR inhibition potentiating but not causing classical apoptosis.^{27,28} However, a dose–response relationship was found between rapamycin treatment and granulosa cell number as measured by the CellTiter assay and by the direct counting of cells over the time course (Figure 4A, B). A

plateau effect was seen at greater than 0.1 nM, with similar significant negative effects upon measured granulosa cell viability and number 3 and 5 days posttreatment at and above that concentration. Treatment with lower concentrations, 0.001 and 0.00001 nM rapamycin, also decreased cell viability and number.

Concurrent microscopic analysis of the cultures used for the above assays of cell viability and number (Figure 4A, B) showed that the number of cells undergoing normal hallmarks of mitosis completion correlated with the cell viability data (Table 1). Here, we scored the number of cells per well in 5 microscopic fields with an appearance of the late stages of mitosis, from approximately mitotic anaphase through nearly complete cellular division. The percentage of cells seen to be completing mitosis was dependent on the concentration of rapamycin; treatment at all concentrations of rapamycin reduced the number of mitotic cells relative to the total number of cells, with essentially zero mitotic cells seen in 0.1-nM-treated wells after day 1 of culture.

Rapamycin induces granulosa cell death during mitosis in a concentration-dependent manner. Primary granulosa cell viability was measured via colorimetric assay at days 1, 3, and 5 posttreatment with 10, 1, 0.01, 0.001, and 0.00001 nM rapamycin (Figure 4A). Ethanol vehicle-treated samples were set to 100% viability. Data shown are mean optical density values $\pm$ SEM. Significant ($P < .001$, 2-way ANOVA analysis) viability reduction was seen in cells treated with greater than 0.1 nM rapamycin on days 3 and 5 posttreatment. At 5 days posttreatment, cells treated with 0.00001 nM rapamycin showed a significant decrease in viability versus vehicle as well ($P < .001$). Viable cell number after each treatment correlated with the loss of cells seen in the viability assays at each time point posttreatment (Figure 4B). As seen in the cell viability measurements, significant ($P < .001$) differences in cell number were seen in treatments greater than 0.001 nM rapamycin versus vehicle on days 3 and 5. Fluorescent immunocytochemical labeling of P-mTOR and P-HH3 of 0.1 nM rapamycin-treated primary mouse granulosa cells resulted in aberrant staining on day 3 posttreatment. Co-localization between P-mTOR and P-HH3 was seen in vehicle-treated cells, as expected, with condensed chromatin evident in mitotic cells (white arrowhead). However, few cells were positive for P-mTOR in cells treated with 0.1 nM rapamycin. A few treated cells were positive for both P-mTOR and P-HH3 (yellow arrowhead); however, none of these cells demonstrated normal chromatin morphology.

Table 1. Percentage of Dividing Cells in Vehicle-Treated Versus Rapamycin-Treated Primary Granulosa Cells

Days Posttreatment	Average % Dividing ^a Cells $\pm$ SEM			
	Rapamycin Concentration, nM			
	Vehicle	0.00001	0.001	10
1	7.7	4.8	3.8	3.4
3	9.1	6.0	2.2	0.9
5	6.0	4.4	1.4	0.3

^aCells were scored as dividing if they were elongated and raised from mitotic anaphase through nearly complete cellular division. Approximately 200 cells were counted for each of 3 microscopic fields.

To directly assess the effects of rapamycin upon mTOR Ser-2448 phosphorylation^{11,15} in granulosa cells, we assessed the expression of the phosphoprotein in treated versus vehicle-treated cultures on day 3 of our time course. As shown in Figure 4C, vehicle treatment allowed for bright, compact staining associated with P-HH3-positive chromatin (white arrowhead) as shown above (Figure 1H) and as seen in untreated cells. In contrast, 0.1 nM rapamycin treatment resulted in not only a reduction in the number of cells that completed mitosis normally (Table 1) but also a reduction in the number of cells that were brightly positive for P-mTOR. Rapamycin-treated granulosa cells instead showed very weak staining for P-mTOR when positive at all (cells denoted by white outlines). Very few cells were positive for P-HH3. However, a few cells in each well (of a 96-well plate) did show aberrant immunopositive condensations of P-mTOR, above background, that co-localized with P-HH3 (yellow arrowhead).

Therefore, a direct correlation may be seen between active mTOR, mitotic status (as seen in P-HH3 costaining), and the completion of mitosis. We interpret these data as indicative of a requirement for active mTOR and its presumptive downstream targets such that granulosa cells may proliferate normally and avoid cell death during the G2/M stages of the cell cycle.

Rapamycin Treatment Results in Attenuated Follicle Growth In Vitro

Finally, the effects of mTOR inhibition on growing follicles were assessed. Intact mouse primary follicles ($n = 12$ follicles per treatment) containing 2 to 3 layers of granulosa cells were cultured in increasing concentrations of

rapamycin; representative photomicrographs are shown in Figure 5. Follicles treated with 1 nM and 100 nM were reduced in size compared with both vehicle-treated samples and samples treated with 0.00001 nM rapamycin (Figure 5A). Surprisingly, follicles cultured in 0.00001 nM rapamycin were consistently larger and demonstrated improved morphology when compared with even vehicle-treated follicles, as early as 24 hours postculture. At the end of the culture period, follicle viability was measured using an indirect luminescence-based assay, and viability for cultured follicles was compared with freshly isolated follicles of the same approximate size(s). Even follicles cultured in 100 nM rapamycin were shown to be viable and generated approximately the amount of luminescence as freshly isolated follicles of the same diameter (negative controls containing no follicles generated negligible background luminescence). Therefore, treatment did not result in general toxicity to the follicles nor to the induction of atresia, in which most granulosa cells would have been induced to die via apoptosis.

DISCUSSION

In summary, mTOR is ubiquitously expressed in the mouse ovary with predominantly cytoplasmic and perinuclear expression in granulosa cells. However, the active form of mTOR, phosphorylated on serine 2448, is strongly enriched within mitotic granulosa cells. P-mTOR is enriched in the region of the mitotic spindle and also near actin filament-containing structures, including the contractile ring of cytokinesis. Active mTOR's association with the mitotic spindle is either a situation that is unique to granulosa cells or has been unrecognized in other mammalian cell types. Intriguingly, inhibition of TOR protein in yeast has been shown to affect the microtubule stability and the morphology and function of the mitotic spindle.²⁹ As mentioned, mTOR has been shown to colocalize with actin condensations in vitro as cells migrate.²² Its association with actin elements within the mitotic contractile ring may then occur in a similar fashion.

The detected association with mitotic machinery caused us to investigate possible effects of mTOR inhibition on granulosa cell mitosis. In vitro culture of granulosa cells revealed negative effects of rapamycin on cell growth versus controls without an overt induction of apoptosis. The negative effects of rapamycin on granulosa cell proliferation are likely to be 2-fold. First, granulosa

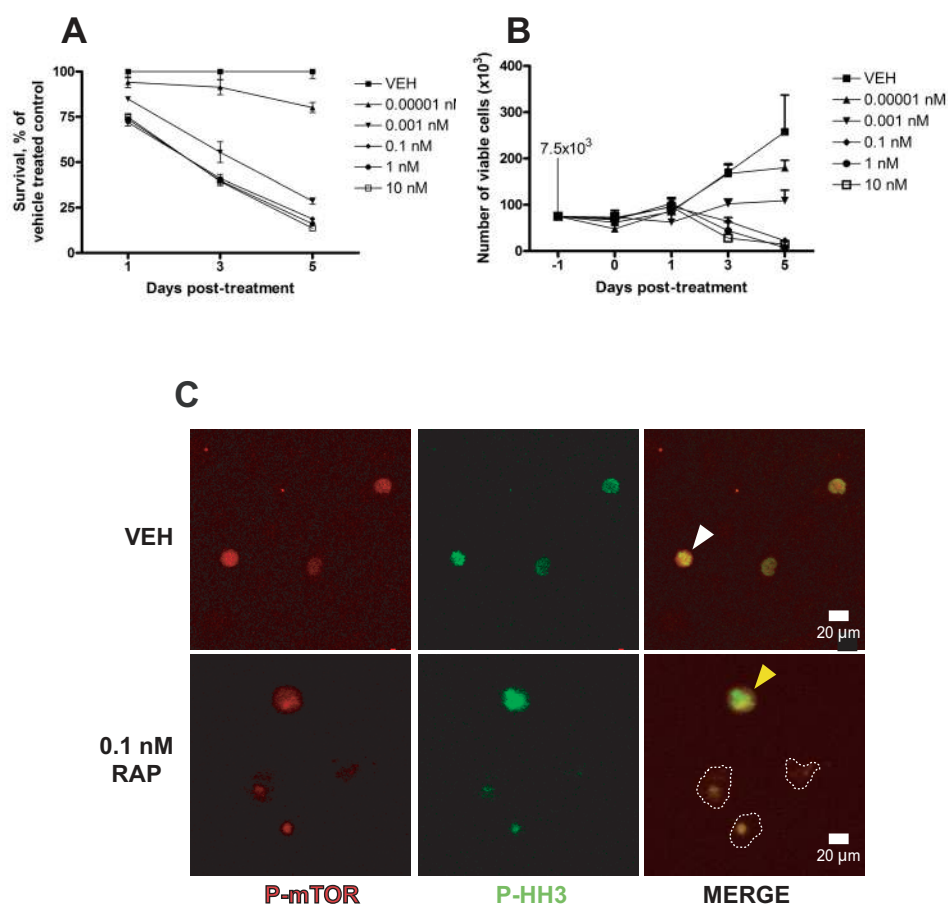


Figure 4.

cells that attempt to divide when mTOR is inhibited are less likely to survive mitosis than vehicle-treated controls; this was apparent after both the visualization of aberrant mitoses within treated cells (Figure 4C) and the reduction in the number of cells displaying normal mitotic hallmarks (Table 1). Second, mTOR inhibition may result in changes in cell cycle duration or completion in viable granulosa cells by acting at checkpoints outside of the G2/M phases. mTOR has been shown to be involved in cell cycle progression at G1,³⁰⁻³¹ but effects at G2/M or at the so-called spindle checkpoint have not been described to date. To our surprise, while low-level inhibition of mTOR (0.00001 nM rapamycin) resulted in a subtle decrease in cultured primary granulosa cell number (Figure 4A, B), it resulted in a consistent increase in the

size of cultured follicles (Figure 5A). Such an effect on intact follicles is likely to result from the presence of the oocyte and oocyte-supplied growth factors. Effects on follicle and oocyte quality under these conditions will require further investigation.

Understanding the upstream regulation of mTOR during the cell cycle is an important future direction. Just how is mTOR activated at such high levels during such a specific cell-cycle window? One known upstream activator of mTOR, PI3-kinase, has been shown to be required for cell cycle progression, specifically the M/G1 transition in CHO cells.³³ PI3-kinase's action would seem to be earlier than that seen for mTOR here, but exposure of those cells to the PI3K inhibitor LY294002 at early time points during mitosis did result in cleaved

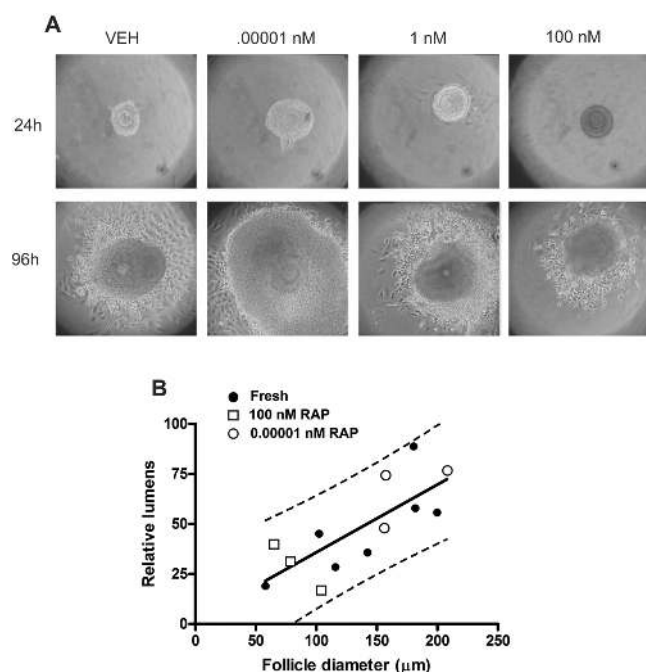


Figure 5. Follicle growth in vitro is attenuated by rapamycin treatment. (A) Representative images of follicles treated with either rapamycin or vehicle (VEH) during 4 days of in vitro culture. Follicles were photographed every 24 hours after placement in culture; images are shown at 24 and 96 hours. Postculture viability was assessed using a luminescence-based viability assay (B). Follicles cultured in rapamycin demonstrated similar viability as freshly isolated follicles of the same approximate diameter, demonstrating that treated follicles are still alive but have grown less than vehicle-treated controls (solid line, linear regression of relationship; dashed lines, 95% confidence interval).

caspase-3, indicating commitment to apoptosis. Whether mTOR acts downstream of PI3K in a cell cycle-dependent manner in granulosa cells is unclear. Equally exciting questions remain as to the downstream targets of mTOR activity in mitotic granulosa cells. As mentioned, direct effects of mTOR activity on the cytoskeleton through the mTORC2 are known in other cell types,^{8,10} and such effects may exist on the mitotic cytoskeleton. Exactly how death is initiated and executed during these stages is also unclear. The activation of caspase-3 after PI3K inhibition³³ is an intriguing downstream event that may result from mTOR inhibition during mitosis.

mTOR Control of Granulosa Cell Proliferation: Effects on Follicle Size

mTOR control of cell proliferation has been investigated, especially with regard to the clinical application of

rapamycin in attempts to slow tumor growth.³⁴ We now hypothesize that mTOR acts to control granulosa cell proliferation in a novel manner that is dependent on its binding to the cytoskeleton. The integration of nutrition and stress cues through mTOR may therefore directly control the growth and growth rate(s) of ovarian follicles in vivo in this manner. The preliminary demonstration that rapamycin slows the growth of follicles while preserving overall follicle viability (Figure 5) supports this hypothesis. More information is needed regarding mTOR function in these cells that are so critical for steroidogenesis, fertility, and ovarian cancer onset and progression.

REFERENCES

1. Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004; 82(E-suppl).
2. Pangas SA, Matzuk MM. Genetic models for transforming growth factor beta superfamily signaling in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol.* 2004;225:83-91.
3. Wulschleger S, Loewith R, Hall MN. Tor signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006;124:471-484.
4. Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic.* 2002;3:878-893.
5. Wiederrecht GJ, Sabers CJ, Brunn GJ, Martin MM, Dumont FJ, Abraham RT. Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of g1-phase progression in eukaryotic cells. *Prog Cell Cycle Res.* 1995;1:53-71.
6. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell.* 2002;110:163-175.
7. Kim DH, Sabatini DM. Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr Topics Microbiol Immunol.* 2004;279:259-270.
8. Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 2004;6:1122-1128.
9. Wulschleger S, Loewith R, Oppliger W, Hall MNN. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem.* 2005;280:30697-30704.
10. Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, et al. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and akt/pkb. *Mol Cell.* 2006;22:159-168.
11. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 1991;253:905-909.
12. Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, et al. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res.* 2003;63:2742-2746.

13. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, et al. Activation of the akt/mammalian target of rapamycin/4e-bp1 pathway by erbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2004;10:6779-6788.
14. Altomare DA, Wang HQ, Skele KL, et al. Akt and mTOR phosphorylation is frequently detected in ovarian cancer and can be targeted to disrupt ovarian tumor cell growth. *Oncogene.* 2004;23:5853-5857.
15. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at ser-2448 is mediated by p70s6 kinase. *J Biol Chem.* 2005;280:25485-25490.
16. Nav BT, Ouwers M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR. Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase b: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J.* 1999;344(pt 2):427-431.
17. Sekuli A, Hudson CC, Homme JL, et al. A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-akt signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen-stimulated and transformed cells. *Cancer Res.* 2000;60:3504-3513.
18. Alam H, Maizels ET, Park Y, et al. Follicle-stimulating hormone activation of hypoxia-inducible factor-1 by the phosphatidylinositol 3-kinase/akt/ras homolog enriched in brain (rheb)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway is necessary for induction of select protein markers of follicular differentiation. *J Biol Chem.* 2004;279:19431-19440.
19. Arvisais EWW, Romanelli A, Hou X, Davis JSS. Akt-independent phosphorylation of TSC2 and activation of mTOR and ribosomal protein s6 kinase signaling by prostaglandin f2 α . *J Biol Chem.* 2006;281:26904-26913.
20. Zhang X, Shu L, Hosoi H, Murti GK, Houghton PJ. Predominant nuclear localization of mammalian target of rapamycin in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem.* 2002;277:28127-28134.
21. Drenan RM, Liu X, Bertram PG, Zheng XF. Fkbp12-rapamycin associated protein or mammalian target of rapamycin (FRAP/mTOR) localization in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem.* 2004;279:772-778.
22. Berven LA, Willard FS, Crouch MF. Role of the p70s6k pathway in regulating the actin cytoskeleton and cell migration. *Exp Cell Res.* 2004;296:183-195.
23. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Funai EF, Mor G. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) confers human trophoblast cell resistance to Fas-mediated apoptosis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:33-41.
24. Neale D, Demasio K, Illuzi J, Chaiworapongsa T, Romero R, Mor G. Maternal serum of women with pre-eclampsia reduces trophoblast cell viability: evidence for an increased sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2003;13:39-44.
25. Cortvrindt R, Smits J, Van Steirteghem AC. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Hum Reprod.* 1997;12:759-768.
26. Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, Savic S, Baumhoer D, Glatz K. Two mitosis-specific antibodies, 508 mpm-2 and phosphohistone h3 (ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:83-89.
27. Dormond O, Madsen JC, Briscoe DM. The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2007;282:23679-23686.
28. Migita K, Eguchi K, Ichinose Y, et al. Effects of rapamycin on apoptosis of rheumatoid synovial cells. *Clin Exp Immunol.* 1997;108:199-203.
29. Choi JH, Adames NR, Chan TF, Zeng C, Cooper JA, Zheng SXF. Tor signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol.* 2000;10:861-864.
30. Hidayat S, Yoshino K, Tokunaga C, Hara K, Matsuo M, Yonezawa K. Inhibition of amino acid-mTOR signaling by a leucine derivative induces g1 arrest in Jurkat cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;301:417-423.
31. Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of g1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/P70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C281-C291.
32. Song J, Salek-Ardakani S, So T, Croft M. The kinases aurora b and mTOR regulate the g1s cell cycle progression of T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2006;8:64-73.
33. van Opstal A, Boonstra J. Inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase activity prevent cell cycle progression and induce apoptosis at the M/G1 transition in CHO cells. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:220-228.
34. Rubio-Viqueira B, Hidalgo M. Targeting mTOR for cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs.* 2006;7:501-512.