



TC.

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ TCF, LEF VE
CASPAŞE-9 EKSPRESYONUNDAKİ ROLÜ**

Tuğba DAĞDEVİREN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

SİVAS-2019

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

**PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN
ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ
TCF, LEF VE CASPASE-9 EKSPRESYONUNDAKİ
ROLÜ**

Tuğba DAĞDEVİREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. H. Eray BULUT**

SİVAS-2019

“Peri-İmplantasyon Döneminde Sıçan Endometriumunda Wnt- β Katenin Yolağının Tcf, Lef ve Caspase-9 Ekspresyonundaki Rölü” adlı Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Ana Bilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hüseyin Eray BULUT

Prof. Dr. Celal KALOĞLU

Prof. Dr. Birkan YAKAN

ONAY

Bu tez çalışması, 11.01.2019 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Zübeyde AKIN POLAT

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ



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

Bu çalışma (T-730), CÜBAP tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, her türlü bilimsel destek ve anlayışı benden esirgemeyen, tez çalışmamın fikir, laboratuvar çalışmaları ve yazım aşamalarında, engin bilgi ve deneyimi ile katkı sağlayan ve yol gösteren, bilimsel bir bakış açısı ile problem çözme yeteneğimin gelişmesinde ve çalışma disiplini kazanmamda en büyük pay sahibi olan değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. H. Eray BULUT**'a,

Çalışmalarında, ikinci danışmanım olarak her türlü desteğiyle yanımda olan ve çok değerli katkılar sunan sevgili hocam Sayın **Prof. Dr. Celal KALOĞLU**'na,

Eğitim sürecimde, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda uygun ve konforlu çalışma alt yapısı oluşturarak bizlerin başarısına katkı sağlayan değerli hocalarım Sayın **Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN** ve Sayın **Dr. Öğr. Üyesi Z. Deniz ŞAHİN İNAN**'a,

Çalışmamızın, Real Time PZR ile ilgili bölümünün gerçekleşmesindeki bilimsel katkı ve değerli yardımları nedeniyle Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Öğretim Üyesi Sayın **Doç. Dr. E. Mahir KORKMAZ**'a,

Projemizin paralelinde yürütülen, diğer tez çalışmaları kapsamında, ortak yürüttüğümüz laboratuvar süreçlerinde ve tezimin şekillenmesindeki katkıları nedeniyle değerli arkadaşlarım **Rasim HAMUTOĞLU** ve **Ozan ÖNDER**'e,

Varlıklarını her zaman yanımda hissettirerek, sevincime ve heyecanıma ortak olan, sevgili dostlarım **Berna ÖZDENOĞLU KUTLU** ve **Buket BOZKURT BAŞARIK**'a,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki değerli arkadaşlarıma,

Tez çalışması için gerekli örnekleri almama yardımcı olan **Meral ŞAHİN**'e, Real Time PZR çalışmalarında, örneklerin değerlendirilmesi sürecindeki önemli katkıları nedeniyle **Merve Nur AYDEMİR** ve eşi **H. Bilal AYDEMİR**'e,

Tez çalışmasına, T-730 numaralı proje ile maddi destek sağlayan **CÜBAP Komisyonu**'na,

Hayatıma sevinç ve güzellik katan sevgili babam **Yunus DAĞDEVİREN**, annem **Mediha DAĞDEVİREN** ve abilerim **Gökhan** ve **Serkan DAĞDEVİREN**'e

Yürekten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım...

Tuğba DAĞDEVİREN

SİVAS, 2019

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

ÖZET	viii
ABSTRACT	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Uterusun Morfolojik, Anatomik ve Histolojik Özellikleri	4
2.2. Menstrual Döngü	6
2.2.1. Proliferasyon evresi	6
2.2.2. Sekresyon evresi	6
2.2.3. İskemi Evresi	7
2.2.4. Menstruasyon Evresi	8
2.3. Sıçanlarda Östrus Siklusu	8
2.3.1. Proöstrus Evresi	8
2.3.2. Östrus Evresi	9
2.3.3. Metaöstrus Evresi	9
2.3.4. Diöstrus Evresi	9
2.4. İmplantasyon	9
2.4.1. Apozisyon (yakınlaşma)	10
2.4.2. Adezyon (bağlanma)	10
2.4.3. Penetrasyon ve İnvazyon	11
2.5. Plasentasyon	12
2.6. İmplantasyon ve Desidua	13
2.6.1. Desidualizasyon	13
2.7. Endometriumun İmplantasyona Cevabı	15
2.8. Wnt Proteinleri	15
2.8.1. Wnt Proteinlerinin Sentezlenmesi, Taşınımı ve Olgunlaşması	16
2.8.2. Wnt İnhibitörleri	17
2.8.3. Frizzled Proteinleri (Fzd Reseptörü)	18
2.8.4. β -Katenin ve Etkileşimleri	19
2.8.5. Wnt Sinyal Mekanizması	20
2.8.6. Kanonikal Sinyal Yolağı	22
2.8.7. Nonkanonikal Sinyal Yolağı	23

2.8.8. Planar Cell Polarity (PCP) yolağı	24
2.8.9. Wnt/Ca ⁺² Sinyal Yolu	25
2.8.10. Wnt Proteinin Salgılanması	25
2.8.11. Wnt Proteinlerinin Hücre İçi Taşınması	26
2.8.12. İmplantasyon Sırasında Wnt Sinyali ve Desidualizasyon	27
2.8.13. Pre-implantasyon Embriyo Gelişiminde Wnt Sinyali	27
2.9. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)	28
2.9.1. Kaspaz Ailesi ve Kaspaz-9	30
2.9.2. Apoptoz Mekanizmaları	33
2.9.3. İmplantasyon ve Apoptozis	34
2.10. Uterus ve Hücre Ölümü.....	35
2.10.1. Uterus Epitelinde Hücre Ölümü	35
2.10.2. Uterin Desiduada Hücre Ölümü	37
2.11. TCF Proteinini (T cell factor).....	37
2.11.1. TCF7L2 (TCF4) Proteinini.....	38
2.11.2.TCF7L2 Geni.....	39
2.12.LEF Proteinini (Lenfoid Artırıcı Faktör).....	40
2.13. Wnt Sinyalizasyonun Nükleer Aracıları Olarak LEF-1/TCF Proteinleri	41
2.14. LEF-1/TCF Proteinlerinin Negatif Düzenleyicileri.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	44
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları	44
3.2. Kullanılan Cihazlar:.....	45
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:	45
3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:	46
3.5. Doku Preparasyonu.....	46
3.6. Işık Mikroskopi:	47
3.7. İmmunofloresan Boyama Protokolü:.....	47
3.8. Semikantitatif Skorelama Yöntemi:	48
4. BULGULAR	55
4.1. Östrus Siklusu (1. Grup).....	55
4.1.1.Östrus Siklusu (Hematoksilen-Eozin)	55
4.1.2. Östrus siklusu evrelerinde Wnt sinyal yolağı moleküllerinin (Wnt 3, Wnt 7a, beta-katenin, kaspaz 9, LEF-1 ve TCF) ekspresyonu	58
4.2. Gebelik Dönemi (2. Grup).....	89
4.2.1. Gebeliğin 7. Günü.....	89
4.2.2. Gebeliğin 7. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları.....	91
4.2.3. Gebeliğin 8. Günü.....	100

4.2.3. Gebeliğin 8. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları.....	102
4.2.4. Gebeliğin 9. Günü.....	111
4.2.4. Gebeliğin 9. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları.....	113
5. TARTIŞMA	126
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	146
6.1. Sonuçlar.....	146
6.2. Öneriler.....	148
7. KAYNAKLAR	149
8. EKLER	181
ÖZGEÇMİŞ	182



ÖZET

PERİ-İMLANTASYON DÖNEMİNDE SIÇAN ENDOMETRİUMUNDA WNT- β KATENİN YOLAĞININ TCF, LEF VE CASPASE-9 EKSPRESYONUNDAKİ ROLÜ

Tuğba DAĞDEVİREN

Yüksek Lisans Tezi

Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. Eray BULUT

2019, 194 sayfa

İmplantasyonda birçok sinyal molekülünün, blastosist ile reseptiv endometrium arasındaki haberleşmede rol aldığı bilinmektedir. Bu çalışmada, Wnt sinyal yolağı proteinlerinin östrus ve gebelik endometriumundaki ekspresyonları, immünfloresan ve real time PZR yöntemleriyle gösterilerek endometriumda oluşan değişikliklerdeki rolleri ve çeşitli sinyallerle nasıl düzenlendiği belirlenmiştir. Diöstrus evresinde uterus epitelinde Wnt-3 ve beta-katenin, endometrial bazal stromada Wnt-3, Wnt-7a, kaspaz-9 ve TCF, kan damarlarında ise Wnt-7a, kaspaz-9 ve TCF molekülleri kuvvetli ekspresyon göstermiştir. LEF-1, en düşük ekspresyona sahiptir. Metaöstrus evresinde Wnt-7a, uterus epitel hücreleri ve diğer alanlarda da çok kuvvetli lokalize olmuştur. Östrusta, LEF-1 ve TCF, perimetrial-miyometrial bağ dokuda lokalizasyon göstermiştir. Uterus epitelinde, beta-katenin ve kaspaz-9, bez epitelinde beta-katenin, subluminal stromada, Wnt-3 endometrial bazal stromada, Wnt-3 Wnt-7a ve kaspaz-9, kan damarlarında ise Wnt-3, Wnt-7a ve kaspaz-9 çok kuvvetli eksprese olmuştur. Gebeliğin 7. gününde LEF-1 yalnız mezometrial desiduada, TCF ise yalnız anti-mezometrial desiduada lokalizasyon göstermiştir. Gebeliğin 8. gününde, primer desidualizasyon zonunda Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin ve kaspaz-9 ekspresyonu maksimumdur. Gebeliğin 9. gününde, tüm moleküllerin lokalizasyonları, hem anti-mezometrial desiduada hem de mezometrial desiduada belirgin düzeyde artış göstermiştir. Real time PZR sonuçlarına göre Wnt-3 en iyi ekspresyonu gebeliğin 9. gününde gösterirken, en düşük östrustta görülmüştür. Wnt-7a, gebeliğin 7. 8. ve 9. günlerinde az çalışmıştır. Beta-katenin tüm bu moleküller arasında en yüksek ifadeye

sahip olup siklusta ve gebelikte en iyi çalışan proteindir. Kaspaz-9 ise, en iyi östrus ve metaöstrus dönemlerinde eksprese olmuştur. Sonuç olarak, peri-implantasyon süreci boyunca Wnt moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, Tcf, Lef-1) sıçan endometriumunda hücre sinyalizasyonu, transkripsiyon ve hücre ölümünün belirlenmesinde önemli bir rolü olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Rat, Wnt Sinyal Yolağı Proteinleri, İmplantasyon, strus ve Gebelik Endometriumu, İmmnflorasan, Real Time PZR



ABSTRACT

THE ROLE OF WNT- β CATENIN PATHWAY ON TCF, LEF AND CASPASE-9 EXPRESSIONS IN RAT ENDOMETRIYUM DURING THE PERI-IMPLANTATION PERIOD

Tuğba DAĞDEVİREN

Master of Science Thesis

Department of Histology-Embryology

Supervisor: Professor H. Eray BULUT

2019, 194 page

It is well known that plenty of signal molecules play important roles between the receptive endometrium and the blastocyst during implantation. In the present study, expressions of Wnt signal pathway proteins were demonstrated in the oestrus cycle and in the pregnancy endometrium by immunofluorescence and real time PCR techniques therefore their possible roles and interactions with several other signals on endometrial alterations have been determined. It has been shown in the dioestrus cycle that Wnt-3 and β -catenin in the uterine epithelium, Wnt-3, Wnt-7a, caspase-9 and TCF in the basal stroma and Wnt-7a, caspase-9 and TCF in the blood vessels were all expressed strongly whereas LEF-1 had the lowest immunolocalization in those areas. Wnt-7a was expressed very strongly in uterine epithelial cells and in other areas during the metoestrus cycle. LEF-1 and TCF were localized only in the perimetrial-myometrial connective tissue during the oestrus period. The strongly immunolocalized molecules and their localization areas during the oestrus period were as follows; β -catenin and caspase-9 in the uterine surface epithelium, β -catenin in the glandular epithelium, Wnt-3 in the subluminal stroma, Wnt-3, Wnt-7a and caspase-9 in the endometrial basal stroma, Wnt-3, Wnt-7a and caspase-9 in the blood vessels. While LEF-1 was expressed only in the mesometrial decidua, TCF was expressed only in the anti-mesometrial decidua during the seventh day of pregnancy. Highest Wnt-3, Wnt-7a, β -catenin and caspase-9 expressions were determined in the primary decidualization zone on day 8 of pregnancy. An increased immunolocalizations of all related molecules were determined both in the anti-mesometrial decidua and in the mesometrial decidua on day 9 of pregnancy. According to real time PCR findings, while Wnt-3 demonstrated its' highest expression on day 9 of pregnancy, it was found to be lowest in the oestrus. Wnt-7a had weak expressions on

days 7, 8, and 9 of pregnancy. On the other hand β -catenin had the highest expression levels among all studied molecules thus it was the only molecule that worked both during the oestrus cycle and pregnancy. Caspase-9 was highly expressed during the oestrus and metoestrus periods. In conclusion, it could be postulated that Wnt molecules might play crucial roles in cell signalling, transcription and cell death in the rat endometrium throughout the peri-implantation process.

Key Words: Rat, Wnt Signal Pathway Proteins, Implantation, Oestrus and Pregnancy Endometrium, Immunofluorescence, Real Time PCR



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Uterusun anatomik yapısı	4
Şekil 2.2. İmplantasyonun apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarından oluşan ardışık üç evresi	12
Şekil 2.3. Wnt protein ailesinin salgılanması ve hedef hücrelerde ve hücre içi boşluklardaki etkileşimi	18
Şekil 2.4. Wnt/ β -katenin sinyal mekanizması	22
Şekil 2. 5. Kanonikal yolak	23
Şekil 2.6. Non-kanonikal veya β -kateninden bağımsız yolağın birincisi Planar cell polarity (PCP) yolağı	24
Şekil 2.7. Wnt sinyal yolları	25
Şekil 4.1. Östrus siklusu evreleri	57
Şekil 4.2. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt-3' ün immünlokalizasyonları.....	59
Şekil 4.3. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	60
Şekil 4.4. Östrus siklusu proöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları.....	61
Şekil 4.5. Östrus siklusu proöstrus evresindekaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	62
Şekil 4.6. Östrus siklusu proöstrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonları.....	63
Şekil 4.7. Östrus siklusu proöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	64
Şekil 4.8. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt-3'ün immünlokalizasyonlar.....	67
Şekil 4.9. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	68
Şekil 4.10. Östrus siklusu östrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları.....	69
Şekil 4.11. Östrus siklusu östrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	70
Şekil 4.12 Östrus siklusu östrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonu.....	71
Şekil 4.13 Östrus siklusu östrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	72
Şekil 4.14. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları.....	75
Şekil 4.15. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	76
Şekil 4.16. Östrus siklusu metaöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları...	77
Şekil 4.17. Östrus siklusu metaöstrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	78
Şekil 4.18. Östrus siklusu metaöstrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonları.....	79
Şekil 4.19. Östrus siklusu metaöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	80
Şekil 4.20. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları.....	83
Şekil 4.21. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	84
Şekil 4.22. Östrus siklusu diöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları.....	85

Şekil 4.23. Östrus siklusu diöstrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	86
Şekil 4.24. Östrus siklusu diöstrus evresinde LEF'in immünlokalizasyonları.....	87
Şekil 4.25. Östrus siklusu diöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	88
Şekil 4.26. Gebeliğin 7. gününde ışık mikroskop bulguları.....	90
Şekil 4.27. Gebeliğin 7. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları.....	94
Şekil 4.28. Gebeliğin 7. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	95
Şekil 4.29. Gebeliğin 7. gününde Beta-kateninin immünlokalizasyonları.....	96
Şekil 4.30. Gebeliğin 7. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	97
Şekil 4.31. Gebeliğin 7. gününde LEF-1'in immünlokalizasyonları.....	98
Şekil 4.32. Gebeliğin 7. gününde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	99
Şekil 4.33. Gebeliğin 8. gününde ışık mikroskop bulguları.....	101
Şekil 4.34. Gebeliğin 8. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonu.....	105
Şekil 4.35. Gebeliğin 8. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonu.....	106
Şekil 4.36. Gebeliğin 8. gününde beta-kateninin immünlokalizasyonu.....	107
Şekil 4.37. Gebeliğin 8. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonu.....	108
Şekil 4.38. Gebeliğin 8. gününde LEF-1'in immünlokalizasyonu.....	109
Şekil 4.39. Gebeliğin 8. gününde TCF'nin immünlokalizasyonu.....	110
Şekil 4.40. Gebeliğin 9. gününde ışık mikroskop bulguları.....	112
Şekil 4.41. Gebeliğin 9. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları.....	116
Şekil 4.42. Gebeliğin 9. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları.....	117
Şekil 4.43. Gebeliğin 9. gününde beta-kateninin immünlokalizasyonları.....	118
Şekil 4.44. Gebeliğin 9. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları.....	119
Şekil 4.45. Gebeliğin 9. gününde LEF'in immünlokalizasyonları.....	120
Şekil 4.46. Gebeliğin 9. gününde TCF'nin immünlokalizasyonları.....	121
Şekil 4.47. Östrus siklusundaki GAPDH, LEF (sarı),TCF (pembe), beta-katenin (yeşil), Wnt-7a (bordo) ve kaspaz-9 (mavi) amplifikasyon eğrileri.....	123
Şekil 4.48. Gebelik günlerindeki GAPDH, LEF (sarı),TCF (pembe),beta-katenin (yeşil), Wnt-7a (bordo) ve kaspaz-9 (mavi) amplifikasyon eğrileri.....	123
Şekil 4.49. Östrus siklusundaki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri.....	124
Şekil 4.50. Gebelik günlerindeki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri.....	124

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 3.1. Real-Time PZR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları.....	51
Tablo 4.1. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	58
Tablo 4.2. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	66
Tablo 4.3. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	74
Tablo 4.4. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	82
Tablo 4.5. Gebeliğin 7. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	93
Tablo 4.6. Gebeliğin 8. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	104
Tablo 4.7. Gebeliğin 9. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri.....	115
Tablo 4.8. Östrus siklusu ve gebelik dönemi eç değerleri (18-24→ kırmızı, 24-30→ turuncu, 30-34→ yeşil, 34-... → mavi).....	125

KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Adenomatous polyposis coli
LH	Lutein hormonu
LIF	Lökosit inhibe edici faktör
CSF	Koloni stimulan faktör
IL	İnterlökin
FZD	Frizzled
WIF	Wnt inhibitör faktör
LRP	Low-density lipoprotein-reseptor-related-protein
DSH	Dishevelled
DKK	Dickkopf
GSK3-β	Glikojen sentaz kinaz-3
PP2A	Protein fosfat-2
CK-1α	Casein kinaz 1
HDAC	Histon deasetilaz
RYK	Receptor-like tyrosine kinase
DAAM1	Disheveled-associated activator of morphogenesis 1
LEF	Lymphoid enhancer-binding factor
TCF	T-cell factor
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
PKC	Protein kinaz C
CamKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate
PCP	Planer cell polarity
GFP	Green fluorescent protein
UE	Uterus epiteli
IAP	Apoptoz İnhibe Edici Protein Ailesi
PARP	ADP-ribose polymerase
ADP	Adenozin difosfat
TNF	Tümör nekroz edici faktör
DR5	Death receptor 5
IGF	Insulin-like growth factor
IGF-BP	Insulin-like Growth Factor Binding Protein
EVT	Ekstravillöz trofoblast
MMP	Matrix metalloproteinases

HMG	High-Mobility Group
CtBP	C-terminal-binding protein
TCR	Transkripsiyon faktör
CREB	cAMP-response element-binding protein
KO	Knockout fare
Wg	Wingless
Wls	Wntless



1. GİRİŞ

Memelilerde implantasyon birçok sinyal moleküllerinin, blastosist ile reseptiv endometrium arasındaki haberleşmede rol aldığı biyolojik olaylardan birisidir (Kaloğlu ve ark., 2003). Başarılı bir implantasyon, implante blastosist ve alıcı rahim arasında kesin olarak düzenlenmiş karşılıklı bir sinyalizasyona bağlıdır. Organizmalarda Wnt kendi özel reseptörlerine bağlanarak (Frizled Reseptörleri-Fz) en az üç farklı yolağı aktive edebilir; Wnt/ β -katenin sinyal yolağı (Kanonikal), hücre polaritesinin sağlanmasında rol oynayan sinyal yolağı (non-kanonikal) ve Wnt/kalsiyum (Ca^{+2}) sinyal yolağı.

Wnt ailesi fonksiyonel analizler kullanılarak en az 2 alt sınıfa bölünmüştür. *Xenopus*'larda, Wnt-1, Wnt-3a ve Wnt-8 embriyolarda axis çoğalmasını indüklerken, Wnt4, Wnt5a ve Wnt11 bunu yapamaz. Axis çoğalmasını indükleyebilen genlerin kanonikal olarak davrandığı düşünülmektedir, diğerleri ise non-kanonikal olanlardır (Du ve ark., 1995).

Wnt sinyal yolları, ergin dönemde kendini yenileyen hücrelerin adezyonunda, hedef hücre genlerinin transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin ve proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde önemli ölçüde rol oynamaktadır (Novakofski, 2004). Bu fonksiyonlarını birçok sinyal molekülleri ile etkileşerek gerçekleştirirler. Bu moleküller, plazma membranındaki reseptörlerine bağlanarak fonksiyon gören Wnt'lere veya reseptörlerine bağlanarak Wnt sinyal yollarını kontrol ederler (Tanır ve Demirezen, 2009).

Wnt sinyal yolu ve bu yolda görev yapan moleküllerdeki değişiklikler nedeni ile meydana gelen hastalıklarla ilgili çalışmalar çok geniş kapsamlı olarak literatürde yer almaktadır. Bu anormal ifade ile çeşitli hastalıklara ve kansere neden olan genlerin transkripsiyonu sağlanmış olur (Polakis, 2000; Moon ve ark., 2004; Nusse, 2005).

β -katenin, Wnt sinyal yolunda anahtar rol oynayan sitozolik bir proteindir (Willert ve Nusse, 1998). Fosforillenmeyen β -katenin, proteozomlarda parçalanamaz ve sitozolde birikir. Biriken β -kateninin bir kısmı, çekirdeğe girerek, burada bulunan transkripsiyon faktörlerini (TCF/LEF-1) aktive eder ve Wnt sinyal yolunun hedef genlerinin transkripsiyonunu başlatır. Bu aktivasyonla, hem sinyal yolunda görev yapan proteinlerin transkripsiyonu gerçekleşir hem de proliferasyonda, hücre siklusunda

farklılaşmada önemli rol oynayan birçok genin transkripsiyonunun kontrolü sağlanmış olur (Willert ve Nusse, 1998; Miller, 2002; Mikels ve Nusse, 2006).

Wnt sinyal yolağı, kaspaz-9 aktivitesini inhibe ederek apoptozu baskılayabilmektedir. Adenomatöz polipozis coli (APC) geni de apoptozu regüle etmek için bir başka mekanizma sunmaktadır. APC'nin β -katenin seviyesini düşürmesi TCF/LEF transkripsiyon faktörlerinin down-regülasyonuna yol açar (Munemitsu ve ark., 1995). TCF/LEF aktivitesi olmadan APC, kaspaz-3, kaspaz-7 ve kaspaz-9 aktivasyonuna neden olur ve bu proteinler aracılığıyla sonuç olarak apoptoz gerçekleşir (Chen ve ark., 2003). Wnt işlevleri birçok farklı dokuda çalışılmış olsa da, bağışıklık sisteminde Wnt sinyali hakkında çok az şey bilinmektedir. LEF-1'in gelişen B ve T hücrelerinde eksprese olması, Wnt sinyalizasyonunun lenfoid hücrelerin çoğalmasında ve/veya farklılaşmasını düzenleme olasılığını artırır (Okamura ve ark., 1998).

TCF/LEF, DNA bağlayan transkripsiyon faktör ailesidir ve β -katenin aracılı gen regülasyonunun önemli bir bileşenidir (Panhuysen ve ark., 2004). Wnt sinyalleşmesinin β -katenin ile transkripsiyon faktörlerinin LEF-1/TCF ailesinin üyeleri arasındaki etkileşimler yoluyla etkili olduğu düşünülmektedir. LEF-1/TCF transkripsiyon faktörleri, β -katenin ile etkileşime girerek Wnt sinyalleri ile nükleer bir cevaba aracılık eder. Wnt sinyali ve β -katenin stabilitesini arttıran diğer hücrel olaylar, β -katenin ile birlikte LEF-1/TCF proteinleri ile transkripsiyonel aktivasyona neden olur. Wnt sinyalizasyonu olmadığında, LEF-1/TCF proteinleri transkripsiyonu baskılar. LEF-1/TCF transkripsiyon faktörleri aynı zamanda diğer kofaktörlerle etkileşime girebilir ve çoklu sinyal ileten yolların entegrasyonuna izin verebilen çoklu protein arttırıcı komplekslerin montajında rol oynar. Stabilize β -katenin çekirdeğe translokasyon yapar, LEF-1/TCF faktörlerini bağlar ve Lnt-1 / TCF ve çekirdek baskılayıcı proteinler arasındaki etkileşimlerin bozulmasını içeren bir süreç olan Wnt hedef genleri aktivasyonunu sağlar (Grosschedl ve Eastmen, 1991).

Hücre ölüm mekanizmasının düzenlenmesi embriyolojik gelişim ve doku homeostazisi için önemli bir aşamadır. Son yıllarda yapılan araştırmalarda hücre ölümünü kontrol eden birçok yolak, hücre ve dokuda açıklanmıştır (Şimşek ve Vatanserver, 2014).

Apoptozun düzenleyici mekanizmasında kullanılan başlıca yol kaspazların aktivasyonudur (Kosova ve Arı, 2011). Kaspazlar sağlıklı hücrelerde inaktif enzim öncülleri (zimojen) olarak bulunmaktadır ve proteolitik aktiviteleri çok azdır ya da hiç

yoktur (pro-kaspaz) (Nicholson, 1999). Buna karşın apoptozun tetiklendiği yolların tamamında kaspaz aktivasyonu gözlemlenmektedir. Kaspazlar, apoptozun görev aldıkları aşamalara göre isimlendirilmektedir: Apoptotik sürecin tetiklenmesinde görev alan kaspazlar başlatıcı (kaspaz-8, -9), yürütülmesinde görev alan kaspazlar ise efektör (kaspaz-3, 6, 7) olarak adlandırılır (Earnshaw ve ark., 1999).

Vücutta fizyolojik bir durum olan apoptoz, anormal olmayan hücrelerin yok edilmesinden de sorumludur (Altunkaynak ve Özbek, 2008). Wnt gen ekspresyon ürünlerinden bazıları apoptoz sürecinde modülatör fonksiyonları olan faktörlerin aktivitesinde etkilidirler. Wnt'ler ayrıca, kaspazların aktivitesini etkileyen APC üzerinden de apoptozu etkilerler (Cesur, 2010).

Wnt-Frizzled sinyal yolağı nöron, endotel, vasküler düz kas ve kardiyomyosit gibi çeşitli hücre popülasyonlarında hem gelişim hem de hasar süreçlerinde apoptozu kontrol etmektedir (Li ve ark., 2006). Hücrelerin büyümesi sürecinde, Wnt sinyal iletimi var olan çevresel uyaranlara bağlı olarak apoptozu kolaylaştırır veya engeller (Ellies ve ark., 2000).

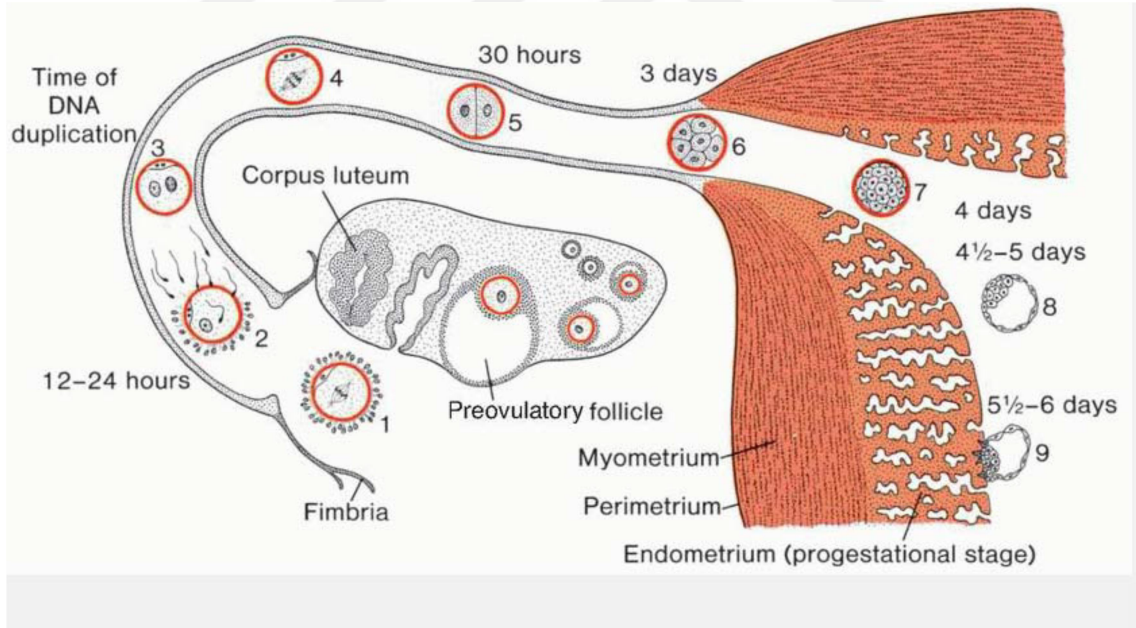
Lenfosit farklılaşması, kök hücrelerin son derece özel hücrelere dönüşmesini sağlayan karmaşık bir süreçtir. Hücre soylarını ve aşamalı genlerin ekspresyonunu düzenleyen harici sinyaller, hücre dışı büyüme faktörleri ve hücre-hücre temasını içerir. Hücreler içinde bu ipuçları, genlerin ekspresyonunu düzenleyerek bir farklılaşma programının yürütülmesinde özellikle önemli bir rol oynayan transkripsiyon faktörleri tarafından bütünleştirilir (Reya ve Grosschedl, 1998). LEF-1, TCF-1, TCF-3 ve TCF-4'ün diğer üç üyesini de içeren LEF-1/TCF HMG kopyalama faktörü ailesinin bir üyesidir. Buna ek olarak, LEF-1/TCF proteinlerinin, Wnt sinyal yolunda önemli bir efektör olan β -katenin ile etkileşime girdiği gösterilmiştir (Van de Wetering ve ark., 1991).

Bu çalışmada normal östrus dönemi ve gebelik dönemi endometriumunda Wnt sinyal yolağının Wnt-3, Wnt-7a, β -katenin, kaspaz-9 ve LEF-1/TCF proteinlerinin etkinliklerinin çeşitli sinyallerle nasıl düzenlendiği immunfloresan ve Real Time PZR yöntemleriyle saptanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Uterusun Morfolojik, Anatomik ve Histolojik Özellikleri

Uterus, armut şeklinde bir organ olup, gövde (korpus), iç ağız ve iç ağızdan aşağıya uzanan silindirik bir yapı olan serviksten oluşur. Uterus gövdesinin kubbe şeklindeki kısmına ise fundus adı verilir (Şekil 2.1.). Uterus duvarı nispeten kalındır ve üç tabakadan oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2003). Perimetrium; en dışarıda bulunan, uterusun bazı bölümlerinde seroza (bağ dokusu ve mezotelyum) veya adventisya özelliği taşıyan tabakasıdır (Ovalle, 2009; Moore ve Persaud, 2009). Devam eden diğer katmanlar, miyometriyum ile endometrium tabakası olan, uterus mukozasıdır. Miyometriyum, bağ dokusu ile ayrılmış düz kas demetlerinin oluşturduğu uterusun en kalın tabakasıdır. Bu tabakada düz kas demetleri sınırları iyi belirlenemeyen 3 ya da 4 tabaka olarak oluşmuştur (Junqueira ve Carneiro, 2003). Burada yer alan kas demetleri içte ve dışta longitudinal, büyük kan damarlarının bolca bulunduğu orta tabakada ise oblik ve sirküler şeklinde dağılım gösterir (Moore ve Persaud, 2009; Ovalle ve Nahirney, 2009).



Şekil 2.1. Uterusun anatomik yapısı (Sadler,2008).

Endometrium, uterusun mukozal iç yüzeyi olarak adlandırılır. Endometrium tek katlı prizmatik epitel ve endometriyal stroma olarak da bilinen zengin lamina propria ağından oluşmaktadır. Tek katlı silyalı hücreler bol miktarda bulunur ve silyasız salgı yapan

prizmatik hücreler de endometrium lamina propriasında miyometrium tabakasına kadar uzanır (Moore ve Persaud, 2007; Ovalle ve Nahirney, 2009).

Epitel tabakası, altındaki lamina propria'ya doğru çöküntüler oluşturur, öylece çok sayıda uterus bezini meydana getirir. Bu bezler tübüler özelliktedir ve lamina propria boyunca devam eder (Şeftalioğlu, 1998; Erdoğan ve ark., 2007). Uterus bezleri; dallı ya da çatallı özellik gösteren basit tübüler şekildedir. Tek katlı prizmatik epitel hücrelerinin apikal yüzlerinde kısa ancak düzenli yerleşim gösteren mikrovilluslar yer almaktadır ve farklı büyüklük ve yoğunlukta salgı granülleri içeren apikal sitoplazmaları vardır. Endoplazmik retikulumları iyi gelişmiştir ve çekirdeğin hemen altında, hücrenin bazal kısmındadır. Ribozom bakımından oldukça zengindir (Erkoçak, 1982).

Endometrium tabakası kök hücreler, fibroblastlar, T ve B lenfositler, mast hücreleri, desidual hücreler ve yıldız şekilli hücreleri bol miktarda içerir. Bunun yanında temel madde içeren tip III kollajen lif bakımından da oldukça zengindir (Moore ve Persaud, 2007; Ovalle ve Nahirney, 2009). Endometrium işlevsel ve yapısal özelliğine göre iki kısma ayrılmıştır: 2/3'lük üst kısmından oluşan ve menstruasyon sırasında dökülen kalın yüzeysel katmanına fonsiyonalis (stratum functionale endometriale), kalan 1/3'lük alt kısmını oluşturan daha yoğun katman ise bazalis (stratum bazale endometriale) olarak adlandırılır. Menstruasyonda dökülen fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlayan tabaka, bazalis tabakasıdır. Lamina propria ise sıkı fibröz bağ dokusu özelliktedir (Şeftalioğlu, 1998; Erdoğan ve ark., 2007). Diğer uterus tabakaları içerisinde en özel kan damar sistemi endometriuma aittir. Uterusta yer alan arterler miyometriumda anastomozlaşan arkuat arterlere bölünür. Arkuat arterler endometrium tabakasına doğru ışınal şekilde ilerleyerek endometriumun bazalisindeki düz arterleri oluşturur. Endometriumun fonsiyonalisinde ışınal arterlerin dalları spiral arterlere dönüşerek daha üst kısımlarda ince ve çok sayıda kapilleri oluşturur (Ross ve ark., 2003). Endometrium pubertadan menapoza kadar farklı periyotlarda belirli değişikliklere maruz kalır. İnsanlarda bu tür değişiklikler, ovaryal siklus denilen dönemle gelişir ve bu süreç 0-28 günlük periyodu içerir. Memelilerde ve insanlarda bu seksüel sürece menstrual döngü adı verilir. Menstrual döngü boyunca endometrium epiteli ve pars fonsiyonalis, insanlarda döngünün 0-4 günü arasında nekroza uğrararak kanama ile birlikte atılır (Moore ve Persaud, 2007; Ovalle ve Nahirney, 2009).

2.2. Menstrual Döngü

Menstruasyon denilen olay, hipotalamus, hipofiz ve ovaryum tarafından üretilen hormonların etkileşimlerine cevap olarak doğmuş, hücre içindeki farklı sinyal molekülleri ile ortaya çıkan bir olaydır. Bu etkileşimlerin sonucu olarak bir tek folikül seçilerek olgunlaşması ve aylık periyotlar içerisinde gerçekleşen döngüsel bir süreçtir. Steroid hormonlarının salgısıyla endometriumda bir seri değişiklik gerçekleştirerek implantasyona hazırlık yapılmaktadır (Clancy, 2009). Menstrual siklus ortalama 28 günde bir gerçekleşmektedir. Bu döngü 4 evre de tamamlanır (Kierszenbaum, 2006).

- Proliferasyon Fazı (Foliküler evre)
- Sekresyon Fazı (Luteal evre)
- İskemi fazı (premenstrual faz)
- Menstruasyon Fazı (Kanama evresi).

2.2.1. Proliferasyon evresi

Proliferasyon evresi, üreme döngüsünün 5.-14. günleri arasını kapsar. 28 günlük döngünün 14. gününe (ovulasyon) kadar devam eden bu süreç, menstruasyonun bitmesiyle başlar. Ovulasyonun hemen ardından 1-2 gün daha devam eder (Şeftalioğlu, 1998; Erdoğan ve ark., 2007). Proliferasyon evresinin başlamasıyla menstruasyon sona erer ve endometrium fonksiyonalsi tamamen atılır. Endometrium bazaliste ise uterus spiral bezleri ve arterlerin bazal kısımları yer alır (Şeftalioğlu, 1998; Karaöz, 2002). Bazalde yer alan bez epiteli hücreleri bir seri mitoz bölünme geçirerek çoğalırlar. Bu çoğalma ile yüzeye doğru uzanarak yeni yüzey epitel hücrelerini ve endometriumun fonksiyonalsi bezlerini oluşturur. Burada yer alan bez yapılarının lümenlerinde genişleme meydana gelir bu genişlemeye bağlı olarak glikojen depolanmaya başlar. Genişleyerek kanla dolmaya başlayan kapillerlerden endometriuma doğru eritrositlerin geçişi söz konusudur. Önce bezlerin lümenine, ardından da vaginaya akan bir kısım kan, intermenstrual kanama olarak tanımlanır. Tamamlanan bu olay sonucunda endometrium fonksiyonalsinin kalınlığı 3 mm kadar olmaktadır (Şeftalioğlu, 1998; Karaöz, 2002; Erdoğan ve ark.,2007).

2.2.2. Sekresyon evresi

Bu evre ovulasyon ve menstruasyon fazının başlaması arasında kalan süre olarak tanımlanır. Ovulasyon bittikten sonra, korpus luteum progesteron salgısını ve yıkımını gerçekleştirir. Burada ilk değişiklik, bez epiteli hücrelerinde görülür; hücrelerin

nükleuslarının altında vakuollerini oluşmaya başlar. Sekresyon fazı boyunca vakuolizasyon devam eder ve bu vakuolizasyon fizyolojik bir değişliktir. Bez epiteli hücrelerinin apikal sitoplazmaları glikojen biriktirir. Spiral arterler endometriyal bezlerle beraber uzayarak endometriumun yüzey kısmına ulaşır. Endometrium stromasında ödem ortaya çıkar ve kalınlığı 7-8 mm olur (Gellersen ve Brosens, 2014). Progesteronun etkisiyle fibroblastlar implantasyona hazırlık için desidua hücrelerine dönüşürler. Endometriyal stromal hücrelerin desidua hücrelerine dönüşmeleri, GER ve Golgi sistemlerinde dilatasyon, sitoplazmalarında glikojen birikimi ve lipid damlacıklarının fazla olmasıyla bağlantılıdır. Sekresyon fazının başında ve ortasında sitoplazmik uzantılar ödemli bağ dokuya uzanır ve biriktirdikleri glikojen ve salgı ürünlerini ekstraselüler boşluğa bırakırlar. Desidua hücreleri ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesini sağlayan fagositik aktivite özelliği gösterir (Gellersen ve Brosens, 2014). Sekresyon evresinde bir dizi olaylar zinciri gerçekleşir; hiperemi, ödem, yedek besin depolama ve desidualizasyon. Endometriumun desiduya dönüşmesi eğer döllenme gerçekleşmiş ise oldukça önemlidir. Çünkü blastosistin gömülerek gelişimini sürdürmesi için en uygun ortam desidua'dır. Sekresyon evresi sonunda gerçekleşen bütün yapısal değişlikler endometriumda 3 farklı bölge oluşmasını sağlar:

1. Yüzeysel kompakt katman: Spiral bezlerin boyun kısımlarını içerir. En az ödeme sahip bölgedir.
2. Kalın spongiyoz katman: Spiral bezlerin kıvrıntılı kısımlarını içeren bölgedir. En çok ödem bu bölgede gözlenir.
3. Derin bazal katman: Spiral bezlerin son kısımlarıyla, spiral arterlerin alt parçalarını içeren bölgedir ve menstruasyonda, doğum sırasında en çok doku kaybına uğrayan katmandır (Şeftalioğlu, 1998; Karaöz, 2002).

2.2.3. İskemi Evresi

Üreme siklusunun 27-28. günlerini kapsar. Döllenme gerçekleşmemiş ise korpus luteum, 10 gün varlığını korur ve bu süreçte progesteron ve östrojen hormonları salgılanmaya devam eder. 10-12. günden sonra korpus luteum geriler, endometriumu stimüle eden progesteron ve östrojen hormonları kanda giderek düşmeye başlar. Fonksiyonel tabaka damarları bir seri değişliğe uğrar. Spiral arterler, uzun süren periyodik kontraksiyon yaparlar. Bu esnada endometrium fonksiyonalse giden kan, periyodik kesintilere uğrayarak endometriumun beyaz ve kansız bir görünüm almasını sağlar ve bu olaya iskemi adı verilir. Damarlarda meydana gelen bu değişlikten dolayı

bezler de salgı görevini yapamaz, endometrium susuz kalarak büzülür. Fakat endometrium bazaliste kan dolaşımı normal devam eder (Erkoçak, 1982; Şeftalioğlu, 1998; Kierszenbaum, 2006).

2.2.4. Menstruasyon Evresi

Siklusun 1. gününden başlayıp, 5. gününe kadar devam eder. İskemi evresinden sonra endometrium nekroza uğrar. İskemik evrede zarar gören arterler, kan yeniden damara akınca yırtılır ve kanama günlerce sürer ve daha sonra yavaşlar (Erkoçak, 1982; Şeftalioğlu, 2003; Erdoğan ve ark.,2007). Fertilizasyon başlamazsa, ovulasyondan sonra 14. günde korpus luteum fonksiyonunu yitirir. Östrojen ve progesteron salınımı düşer ve menstruasyon başlar. Hormon düzeylerinin farklı olmasıyla fonksiyonel tabakanın kanlanması değişiklik göstermektedir. Spiral arter duvarları kasılıp gevşemeye başlar. 2. gün sonunda ise spiral arterlerin kasılmasına bağlı olarak kan akımı engellenmiş olur. Endometriumun fonksiyonals tabakasında, oksijenlenmenin ortadan kalkmasıyla meydana gelen iskemi bu tabakanın nekrozuna sebep olur. Spiral arter duvarında yırtılma meydana gelir ve bunun sonucunda endometrium içerisine kanama olur. Nekroza uğramış endometrium fonksiyonals tabakasından epitel ve stromal hücreler ayrılarak uterus sıvısı kan ile beraber atılır. Endometriumun fonksiyonals tabakası tamamıyla dökülür ve geride sadece endometrium bazalis kalır. Bazaldeki hücreler, mukozayı yeniden oluşturmak için bir araya gelir ve çoğalarak endometriumu yeni bir döngüye hazır hale getirir (Gartner ve Hiatt, 2007).

2.3. Sıçanlarda Östrus Siklusu

Sıçanlarda (rat) östrus siklusu birbirini takip eden 4-5 günlük bir süreçten oluşmaktadır. Bu döngü genel olarak dört evreden oluşur;

1. Proöstrus evresi; 12 saat,
2. Östrus evresi; 12-14 saat,
3. Metaöstrus evresi; 21 saat,
4. Diöstrus evresi; 57 saat.

2.3.1. Proöstrus Evresi

Östrusun bu evresinde LH ve östrodiol en yüksek seviyeye ulaşır. Evrenin başlarında östradiol en düşük seviyedeysen evrenin sonlarına doğru artış gösterir. Tek katlı prizmatik epitel hücrelerin boyutları giderek artar ve tek katlı yüksek prizmatik hücrelere dönüşür (Mendoza-Rodriguez ve ark., 2002). Proöstrus ile östrus arasında

gerçekleşen ovulasyonu, LH kendiliğinden stimüle eder (Smith ve ark., 1975). Çekirdekli epitelyal hücreler fazladır, bu hücreler bazen birlikte ya da ayrı ayrı bulunabilir. Bazı bölgelerde ise kornifiye hücreler görülebilmektedir.

2.3.2. Östrus Evresi

Kornifiye skuamoz epitelyal hücrelerle karakterizedir. Burada hücreler çoğunlukla kümeler halinde bulunur (Parkening ve ark.,1982). Proöstrus ve östrus arasında LH'in pik yapmasıyla ovulasyon olayı gerçekleşir. Uterusta, yüzey epitelinde proliferasyon yoktur. Fakat hücrenin boyutlarında uzama olduğu için epitelde kalınlaşma söz konusudur. Bazı epitel alanlarında yalancı çok katlı epitel varmış gibi görünür. En önemli farklardan biri, bu evrede epitelde apoptotik hücrelerin görülmesidir (Mendoza-Rodriguez ve ark., 2002). Uterus boşluğunda genişlemelerle beraber sıvı birikimi söz konusudur. Epitelde meydana gelen bu değişikliklerden dolayı uterus, blastosist implantasyonuna hazırdır (Orchard ve Murphy, 2002).

2.3.3. Metaöstrus Evresi

Yaklaşık olarak 21 saat süren metaöstrus evresinde artık dişi sıçan erkeği kabul etmez (Lohmiller ve Swing, 2006). Uterusta kan damarları oldukça küçük ve azalmıştır. Östrodiol serum düzeyleri düşmüştür (Mendoza-Rodriguez ve ark., 2002). Metaöstrus evresinde lökositler baskındır (Parkening ve ark., 1982).

2.3.4. Diöstrus Evresi

Endometriyal rejenarasyon yeniden başlamıştır. Erken dönem diöstrusta östradiol salınımı düşüktür ancak geç diöstrusta östradiol salınımı kademeli olarak artar (Levine ve ark., 1985).

2.4. İmplantasyon

İmplantasyon genetik açıdan farklı embriyonik ve maternal dokular arasında meydana gelen bir gelişimsel süreçtir. İmplantasyondan önce blastosist ve endometrium arasında birtakım sinyalleşme meydana gelir (Kayışlı ve Demir, 2000; D'Souza ve ark., 2007). Bu etkileşimi sağlayan büyüme faktörleri, adezyon molekülleri, hormonlar, sitokinler, ekstraselüler matriks proteinleri, iyon kanalları ve prostaglandinler gibi faktörleri içeren bir sistemdir. Bu sistemde meydana gelen herhangi bir eksiklik ya da aksaklık başarılı bir implantasyonu engellemektedir (Paria ve ark., 2002; Mourik ve ark., 2009). Başarılı bir implantasyon için blastosist ve endometrium arasında eşleşen bir uyum olmalıdır.

Endometriumda menstrual siklus boyunca birtakım değişiklikler meydana gelir ve endometrium implantasyon penceresi olarak bilinen kısa bir dönem boyunca reseptiftir. İnsanlarda menstrual siklusun orta-sekretuar fazında ovulasyon gerçekleştikten 6-8 gün sonra, blastosist implantasyona hazır hale gelir ve bu 4 gün sürer (Salamonsen ve ark., 2016). Gebeliğin 4. gününde blastosist evresindeki embriyo, uterus boşluğu içerisine yerleşmiştir. Östrojen ve progesteron salgılanmasıyla implantasyon bölgesinde endometriyal damar geçirgenliği artış gösterir ve endometrium implantasyona hazırlanır. Blastosist, zona pellusidadan ayrılarak trofoektodermin epitelial uzantıları uterus lümeni epiteli ile karşılaşır (apozisyon). Zona pellusidanın ayrılması (hatching) başarısızlıkla sonuçlanırsa embriyonun implante olması mümkün değildir (Moore ve Persaud, 2002; Gürsoy ve ark., 2009). Şekil 2’de ifade edildiği gibi implantasyon üç aşamada sınıflandırılabilir: Apozisyon, adezyon ve invazyon (Davidson ve Coward, 2016).

2.4.1. Apozisyon (yakınlaşma)

Fertilizasyondan 1-2 gün sonra embriyo ile uterus arasında bir iletişim söz konusudur. Bu iletişim, implantasyona kadar devam eder ve başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesiyle devamında yavrunun intrauterin yaşamı boyunca da süreklilik gösterir (Aplin ve ark., 2008).

2.4.2. Adezyon (bağlanma)

Yüzey epiteli ve trofoektodermin temas etmesiyle beta integrinlerin rol aldığı süreçtir (Damsky ve ark., 1994; Wang ve Armant, 2002; Gökçimen ve Temel, 2004). İmplantasyon devam ederken, hücre yüzey moleküllerinin apikolateral kısımlarında değişiklikler meydana gelmektedir. Beta-integrin varlığı, implantasyondan önce bazal durumdadır fakat sekretuar faza geçince hem bazal hem de lateral olarak değişiklikler izlenir. Bu değişiklik implantasyon sırasında luminal epitel hücrelerinin hücreler arası etkileşimdeki farklılığını gösterir (Gökçimen ve Temel, 2004). Bu aşamada blastosist, uterus lümenine 2-3 gün asılı kalır ve enzimatik olarak gevşeyen zona pellusidadan ayrılır; bu olay zona hatching olarak isimlendirilir. Gelişim devam ederken 6. ve 7. günlerde epitel yüzey bölgesine yerleşmiş blastosistin buraya tutunması endometriumun sekresyon fazında gerçekleşir. Temas ettiği bölgede trofoblast hücreleri, dış kısımda sinsityotrofoblast, içte sitotrofoblast tabakalarını oluşturmak üzere farklılaşarak endometrium epiteline penetre olurlar. İç kısımda yer alan hücre kitlesi trofoblast

boşluğunun iç duvarı boyunca tutunma bölgesine doğru göç ederek blastosistin embriyonel kutuptan endometriuma gitmesine yardımcı olur (Gelety ve Buyalos, 1995; Paria ve ark., 2000). Adezyon gerçekleşirken, bazı bağlanma sinyal sistemlerine ihtiyaç vardır. Bu sinyal sistemlerinde önemli adhezyon moleküllerinden selektinler, integrinler, galectinler, heparan sülfat, proteoglikanlar (HSPGs), musin-1, kadherinler (E ve P) ve trophinin-tastin-bystin kompleksidir (Carson ve ark., 2000; Red-Horse ve ark., 2004). Adezyon başlarken selektinler, transmembran proteinlerle kalsiyuma bağlı lektin domainlerine aracılık eder; bu durum moleküllerin tutunmadan önce lökositlerin bir küme oluşturarak yuvarlanmasını tetikler. Yuvarlanan lökosit kümelerinin membrana yapışması için beta-2 integrinler immunglobulin süper ailesi endotelial reseptörler ile etkileşime girerler. Bu yapışma adezyon için bir başlangıç oluşturur, bunun devamında extravazasyon gerçekleşir (Aplin ve ark., 2008). Sinyal yollarının adhezyonun belli aşamalarında trofoektodermin trofoblastı oluşturması için epitelyal-mezenşimal değişiklikleri kontrol eder. Koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1), lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler implantasyon aşamasında endometrium tarafından üretilir. İntegrinler, kadherinler ve selektinler, adezyonun ileri aşamalarında diğer adezyon molekülleri ile bütünleşirler. Erken embriyonik dönemde adezyon molekülleri üzerinden hücre adezyonuna laminin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks elemanları da katılır ve bu ekstraselüler moleküllerin ekspresyonu endometriyal stromada gerçekleşir (Aplin ve ark., 2008). Trofoblastik göç gerçekleşirken, hücre-hücre etkileşiminde önemli rolü olan bir başka molekül efrinlerdir. Efrinler birer peptit olup, tirozin kinaz hücre membran reseptörlerine bağlanırlar. Endometriyal hücrelerde ve blastosistte aktif olarak efrin ekspresyonu saptanabilmektedir (Fujiwara ve ark., 2002).

2.4.3. Penetrasyon ve İnvazyon

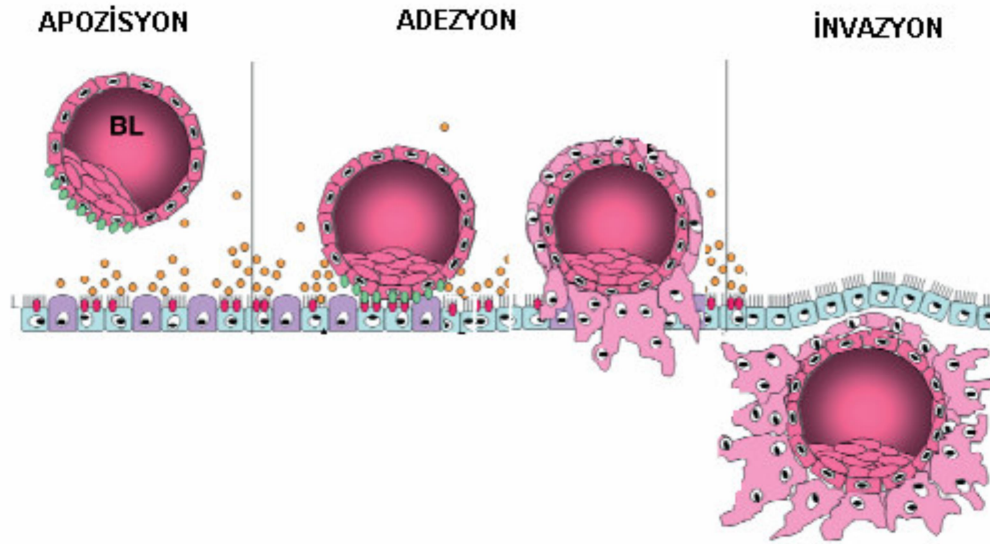
İmplantasyon sürecindeki üçüncü evredir. Blastosistin tutunmasıyla trofoblastların luminal epitele penetre olması akabinde farklılaşan trofoblastların subepitelyal endometriyal stromaya invaziv olmasıyla tamamlanır. Blastosistin implante olmasıyla endometriyal luminal epitel ve trofoblastlar arasında bu penetrasyon ve invazyon olayı memelilerde 2 farklı tip olarak görülür:

a- Noninvasive implantasyon; implantasyon süreci bağlanma evresinde duraksar; farklı 2 tipi vardır:

-Sentrık noninvasıve implantasyon; bağlanma evresinden sonra uterus boşluğu içerisinde gelişip büyüyen embriyo ile karakterizedir. Örneğın; at ve domuz.

-Eksentrik noninvasıve implantasyon; genellikle mezometriyumun antimezometriyal kutup alanında yerleşim gösteren uterus boşluğunun bir kenarına doğru yaklaşmış eksentrik yerleşimli embriyo implantasyonudur. Sıçan ve fareler en iyi örnektir.

b) İnvasive implantasyon (intertisyel); birçok memeli türünde görülen bu implantasyon sürecince embriyonun endometriyal stromaya invazyon ile devam eder (Şekil 2.2) (insanlar ve primatlar) (Carter, 2007).



Şekil 2.2. İmplantasyonun apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarından oluşan ardışık üç evresi (Fitzgerald ve ark., 2007).

2.5. Plasentasyon

Plasentasyon, endometriyal stromanın trofoblastik invazyonu ile başlar. Kontrol edilemeyen invazyon durumunda uterus ve uterus duvarında yüksek oranda yayılım söz konusudur. Trofoblast invazyonu endometriyumdan salınan sitokinlerin ve proteaz inhibitörlerinin salgılanmasıyla kontrol altına alınabilir. Bir diğer sınırlayıcı faktör endometriyal stromal hücrelerin farklılaşarak oluşturduğu desidual hücre tabakasının varlığıdır. Trofoblastik aktivite gerçekleşirken kontrol altına alınması gerekir bu kontrolü sağlayan en önemli faktörler; sitokinler, enzimler, büyüme faktörleri, inhibitör faktörler ve plazminojen faktörler arasındaki dengedir (Carter, 2007; Aplin ve ark., 2008).

2.6. İmplantasyon ve Desidua

İmplantasyon sırasında, koryon-uterus ilişkisi kuvvetli ise uterus mukozasında yer alan bağ doku hücreleri değişikliğe uğrayarak daha büyük ve yuvarlak şekilde desidua hücrelerine dönüşürler. Bu hücreleri içeren uterus mukozası ise desidua olarak tanımlanır. Desidua kelime olarak doğumda atılan ya da dökülen embriyo kısmıdır. Bu tip plasentalara ise desidualı (desiduata) plasenta ismi verilir. Doğum esnasında plasenta yavru ile birlikte atılır ve bu yüzden kanama meydana gelir. Koryon uterus ilişkisinde ise her iki dokunun teması mevcutsa desidua şekillenmez ve plasenta da desiduasız (adeciduata, indeciduata) plasenta adını alır. Bu tip plasentalarda doğum esnasında uterus mukozasında herhangi bir zedelenme ya da atılma meydana gelmez ve dolayısıyla kanama da söz konusu değildir. Desidualı plasentaya sahip insanlarda gebeliğin 23. gününden itibaren uterusun bağ dokusunda yer alan fibroblastlar büyüyerek epiteloid karakter kazanır. Bu desidua hücrelerinin sitoplazmalarında bol miktarda glikojen ve lipid vardır (Hassa ve Aştı, 1997).

2.6.1. Desidualizasyon

Desidualizasyon, endometriyal stromal hücrelerin büyümesi ve ardından epiteloid bir karakter kazanması demektir (Alden,1947). Ökromatik çekirdeğin oldukça belirgin bir çekirdekçiği vardır. Olgun bir desidua hücresi çevresinde arjirofilik fibriler bir materyalden oluşmuş bir periferik laminaya sahiptir. Bunun aksine tam gelişmiş desidua hücresi çevresindeki fibriler lamina içine sitoplazmik çıkıntılar gönderir ve bu çıkıntılarının ucunda 0,5µ çapında yoğun granüler cisimcik taşır. Bu uzantıların histokimyasal olarak glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve izositrat dehidrogenaz aktivitesi gösterdiği bilinmektedir. Desidualizasyon esnasında, uterus bezlerinde yer alan hücrelerin lümenleri genişler ve uterus sütü olarak adlandırılan bir salgı üretip lümenlerine verirler (Demir, 1995). Kemirgenlerde implantasyon gerçekleşeceği zaman endometriumda birtakım değişiklikler meydana gelir. Kemirgenlerde endometriyal fibroblastlar vücudun diğer bölgesindeki fibroblastlardan biraz daha farklıdır. Kemirgenlerde desidualizasyon olayı oldukça önemli ve ilginç özelliklere sahiptir. Endometriyal stromal hücreleri ovaryum steroidleri tarafından uyarılır. Normal şartlarda desidualizasyon, embriyonun implante olduğu bölgelerin çevresinde gerçekleşir. Embriyo ve endometriumun ayrılma alanlarında desidualizasyon gerçekleşmez (Abrahamsohn, 1983). Desidualizasyon, implante blastosistin mukozal kripler tarafından etrafının çevrilmesiyle başlar. Bu bölgelerde genellikle anti-

mezometrial ve subepitelyal bölgelerdir. Başlangıçta ilk desidua hücreleri trofoblastlar bazal laminaya ulaştığında ve epitelin yerini almasıyla şekillenir. Ardından desidualizasyon miyometriyuma doğru antimezometrial olarak yayılım gösterir. Birkaç gün sonra ise mezometrial endometriumda göze çarpan değişiklikler gerçekleşir. Desidual hücreler uterusu yer alan fibroblastların farklılaşmasıyla oluşurlar. Hücrelerin çekirdekleri iyi sınırlanmış granüler ve fibriler oluşumlar şekillenir. Daha sonra hücre ve çekirdeği yuvarlaklaşır; büyüyerek stromada hücre dışı boşlukta azalma meydana gelir (Lundkvist, 1978).

Gebeliğin 10. gününde ratlarda uterusu farklı ana bölgeler tanımlanmıştır. Bu farklı bölgeler, antimezometrial desidua, desidual kripler, mezometriyal desidua (bu bölüm iki alt bölge içerir), glikojenden zengin hücreler bölgesi ve stromal hücrelerin farklılaşmamış bölgesidir. Anti-mezometrial endometriumda ilk olarak desidualizasyona uğrayan bölge, embriyonun çevresini saran, açıkça görülen dar bir bölgesidir. Bu bölgeye primer desidua ya da primer desidual bölge ismi verilir. Tamamen değişmiş desidua hücreleri tarafından çevrili olarak şekillenmiştir. Burada bulunan desidua hücreleri ise daha olgunlaşmış halde bulunan hücrelerdir. Ve en önemli özelliği ise antimezometrial desiduada baskın olan hücrelerdir. Morfolojik olarak bakıldığında fibroblastlar ile olgunlaşmamış halde bulunan desidua hücreleri arasında bir geçiş formundaki hücrelerdir. Bu hücrelere predesidual hücreler ismi verilmektedir. Predesidual hücreler, miyometriyuma bitişik halde bulunurlar ve fibroblastların bir tabakası halinde çevrenmişlerdir (Welsh ve Enders, 1985). Stromaya ait bu bölge ratlarda desidualize olmaz, brinoid kapsül ya da kapsül olarak adlandırılan, birbirine yakın demetler halinde bulunan fibroblastların bir tabakası tarafından predesidual hücrelerden ayrı konumlanmışlardır. Bu durum sadece ratlara özgüdür; farelerde görülmez (Parr ve Parr, 1986; Tung ve ark., 1986). Farklılaşmasını bitirmiş endometriyal desidua hücreleri, farklı özellikte olabilir. Bunlar çok yüzlü, birbirlerine yakın ve yuvarlaklırlar. Bu hücrelerin çok belirgin granüler ve fibriler bölgelere sahip önkromatik ve çıkıntılı bir çekirdekleri mevcuttur. Ratlarda desidua hücreleri genellikle iki çekirdekli olabilir. Farelerde ise 3 ya da 4 çekirdekli desidua hücreleri vardır. Ancak bu durum çok yaygın değildir. Sitoplazma içeriği birçoğu granül içeren endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve mitokondri yer almaktadır. Rat ve hamsterlerde, desidua hücreleri yoğun olarak glikojen ve lipid damlacıkları içerir. Farelerin ise antimezometriyal desidua hücrelerinde yalnızca yağ damlacıkları görülebilir

(Abrahamsohn ve Zorn, 1993). Ratlarda mezometrial desidua hücreleri üzerinde O'Shea ve ark. (1983) ile Welsh ve Enders (1985) tarafından yapılan çalışmalarda, az yoğun, paketlenmiş antimezometrial hücreler ve bunlara eşlik eden çok uzun hücresel yapılar gözlenmiş; sonuç olarak ise hücrelerin diken, uzantılara sahip olduğu tespit edilmiştir. Organelleri ise antimezometrial hücrelerinkine göre daha az gelişmiş şekilde bulunur. Endometriumun tam ortasında mezometrial ve antimezometrial desidua arasında bir bölge, glikojen bakımından oldukça zengindir. Burası birbirine yakın halde bulunan sıkı paketlenmiş gap junction ve adherenslere sahiptir. Kan damarları bol miktarda bulunur ayrıca geniş lümenleri ve çekirdekleri çıkıntı yapmış şekilde de endotel hücreleri vardır. Buradaki damarların varlığı desidua hücrelerini, bir ipe tek sıra dizilmiş halde veya iki katlı dizilmiş şekilde hücreler olarak düzenlenmelerini sağlamaktadır (Welsh ve Enders, 1985).

2.7. Endometriumun İmplantasyona Cevabı

Blastosist implante olduktan sonra hormonların etkileşimi ile endometriumun genelinde implante olan blastosiste bir yanıt oluşur. İmplantasyon tamamlandıktan sonra, yüzey epiteli hücrelerinde hipertrofi gerçekleşir ve sitoplazmada glikojen birikimi söz konusudur. Kapiller pleksuslarda dilatasyon gerçekleşir; bu durum yüzeysel damarları venüllere benzeyen bir damara dönüştürür. Çevrede silindirik şekil almış endotelial hücreler izlenir. Eğer erken villus aşaması gerçekleşmişse venül yapıları olması gerektiğinden daha fazla dilate olur; böylece bez yapılarına kan sızıntısı meydana gelir. T-lenfositlerin yoğunluğu, gebeliğin 1. trimesterinde yoğun bir artış gösterir (Sadler, 2008). İmplantasyon başladıktan sonra ise stromal fibroblastlar desidua hücrelere dönüşürler. Bu dönüşüm insanlarda oldukça hızlıdır. İnsan blastosisti maternal damarları aşındırmadan önce uzağa penetre olur. Trofoblastik plak evresinde, trofoblast sadece epitelin yüzeyine yayılım göstermez; bazal laminaya da dağılım gösterir. Trofoblastın etrafında artık tamamen sinsityal trofoblast ve lakünaları oluşturulur. Lakünalara maternal kan dolduğunda, endometrium genişler ve uterin lümenine doğru dağılır (Kliman, 2000; Moore ve Persaud, 2007).

2.8. Wnt Proteinleri

Wnt, isim olarak *Drosophila melanogaster* wingless (Wg) geni ve farede 15. Kromozomda, Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) geni olarak bilinen int-1 geninden türetilmiştir (Barker, 2008). Wnt ailesine ait sinyal proteinleri embriyogenez

ve yetişkin doku hemostazisini içeren birçok gelişimsel olaya aracılık etmektedir (Berk, 2006). Wnt protein grubu ailesi, bol miktarda salgılanan sistein ve zengin glikoproteinden oluşmuştur. Bu grubun üyeleri reseptör aracılıklı sinyal iletimlerinin aktivasyonunda ligand olarak görev yaparlar. Wnt genlerinin başlattığı sinyal yollarının omurgalı ve omurgasız birçok canlıda embriyolojik gelişim esnasında hücre göçü ve hücre proliferasyonu ve aynı zamanda hücrenin akıbetinin belirlenmesi ve hücrelerin farklılaşması gibi olaylarda önemli görevleri vardır (Huelsen ve Behrens, 2002; Olson ve Schneider, 2003). Wnt genlerinin ürünü olan Wnt proteinleri 36-40 kD molekül ağırlığında ve yaklaşık 350 amino asit uzunluğundadır (Miller, 2001). Wnt ailesinin günümüze kadar 19 adet farklı tipi belirlenmiştir. Bunlardan biri Wnt-1 olup, mesensefalon ve beyincik gelişiminden sorumludur (Komiya ve Habas, 2008). Wnt-2, Wnt3-a, Wnt-5a ve Wnt-5b embriyogenez boyunca farklılaşma ve hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinden sorumludur ve ayrıca onkonogeneze de rol alır (Nusse, 2005). İnsanda embriyonik hayatta ve karsinogeneze Wnt-2b'nin rol aldığı gösterilmiştir. Fötal dönemde erkek genital sistemin gelişiminde rol oynayan ise Wnt-4'tür. Bunlardan Wnt-6. kolorektal karsinogeneze rol alır (Wodarz ve Nusse, 1998; Walsh ve Andrews, 2003; Carmon ve Loose, 2008). Wnt-7a ise uterus düz kasının gelişiminde ve erişkin dönemde uterus fonksiyonlarında oldukça önemli bir role sahiptir (Carmon ve Loose, 2008). Wnt-7a, erkek üreme sisteminde seks steroid hormonlarının değişiminde de etkilidir. Wnt-9, gastrik kanser alanlarında eksprese olmaktadır (Komiya ve Habas, 2008).

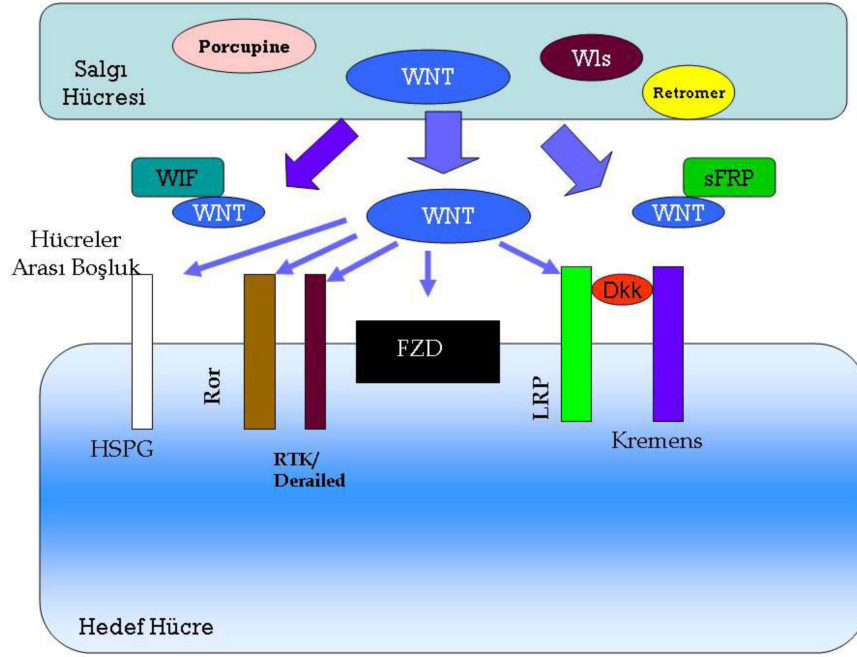
2.8.1. Wnt Proteinlerinin Sentezlenmesi, Taşınımı ve Olgunlaşması

Wnt ailesi proteinlerinin sentezlendikleri hücrelerde taşınabilmesi için çeşitli değişikliklere uğraması gerekmektedir. Bu proteinlerin olgunlaşp taşınması için ise glikoz ve lipit parçacıkları bazı protein yapılarına katılmak zorundadır (Hausmann ve ark., 2007). Endoplazmik retikulumda (ER) bulunan Porcupine proteini inhibe edildiğinde, Wnt proteinleri hücre dışarısına çıkamaz ve fonksiyonlarını kaybeder. Bu durum Wnt proteininin olgunlaşp taşınmasında önemli bir faktördür. Porcupine, açıltransferaz ailesine ait bir proteindir ve bu protein Wnt proteinlerinin üzerindeki Cys77 aminoasidine lipit parçacıklarını bağlar.(palmitate grubu) (Mikels ve Nusse, 2006). Wnt'lerin transkripsiyonel, RNA splicing, translasyonel, post-transkripsiyonel ve post-translasyonel seviyeleri, Wnt gen ekspresyonlarının düzenlenmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Herhangi bir patolojik durum söz konusu olmadığı zaman

bu regülasyon, Wnt'lerin hedef hücrelerde ve dokularda, doğru fonksiyon görmesini gerçekleştirmek içindir (Tian ve ark., 2005). Wnt proteinlerinin glikolizasyonu, Wnt proteinleri sentezlendikten sonra endoplazmik retikuluma ulaşır ulaşmaz, oligosakkarid transferaz (OST) bileşimi, peptit bağlarının uygun yerlerinde N-linked oligosakkarid zincirlerini ilave eder. Glikoz moleküllerinin, Wnt'lerin sentezlenmesi ve fonksiyonları ile ilgili olan ilişkisi tam olarak anlaşılammıştır. Coudreuse ve Korwagen'e (2007) göre morfojen yapıdaki diğer proteinlerde olduğu gibi (Hedgehog), glikolizasyon işlemi, Wnt proteinlerini hücre dışına çıkarmak için programlanmış ve hücreler arası boşlukta Wnt proteinlerinin ilerleyebilmesine yardımcı olması olasıdır.

2.8.2. Wnt İnhibitörleri

Hücre dışına salgılanan Wnt proteinleri hedefteki hücreye ulaşmadan önce, hücreler arası boşlukta çeşitli proteinlerle bağlanarak ya da hedef hücrenin yüzey reseptörü ortadan kaldırılarak, hedef hücrede etkinliğinin oluşmasının engellenmesini sağlayan Wnt proteinlerine ait bazı antagonist proteinlerin bulunduğu belirtilmiştir (Şekil 2.3). Bunlardan FZD proteini gibi özellik gösteren SFRP proteini, Wnt proteinlerinin bağlanabileceği Cys aminoasidinden oldukça zengin bir bölgeye sahiptir. Fakat bu proteinlerde FZD proteininde olduğu gibi, sinyal iletim sistemini etkileyecek bir hücre içi kısmı olmadığından, Wnt sinyal iletimi durdurulmuş olur. Başka bir antagonist faktör ise Wnt-inhibitör-faktör (WIF) proteindir. Bu protein Wnt proteinleri üzerindeki WIF bölgesi üzerinden Wnt proteinlerini bağlar ve etkisiz hale getirir (Logan ve Nusse, 2004). WIF ve SFRP proteinlerinin Wnt proteinlerine bağlanarak proteinlerin stabilizasyonunu ve hücre içinde taşınımını sağladığı da düşünülmektedir (Uren ve ark., 2000). Kanonikal Wnt sinyal yolağında hücre yüzeyinde Fzd reseptörü ile birlikte bulunan ve Wnt sinyal iletim sisteminin uyarımını sağlayan LRP reseptör proteinini inhibe eden Dickkopf (Dkk) proteini de doğrudan olmasa da kanonikal yolu bloke eder (Mao ve ark., 2002).



Şekil 2.3. Wnt protein ailesinin salgılanması ve hedef hücrelerde ve hücre içi boşluklardaki etkileşimi (Logan ve Nusse, 2004).

2.8.3. Frizzled Proteinleri (Fzd Reseptörü)

Fzd reseptörü G-proteini ile birleşik reseptör protein ailesine aittir ve Wnt sinyal iletiminde en önemli görevi olan reseptördür. Frizzled proteinlerinin boyutları 500-700 amino asit arasında değişiklik göstermektedir ve proteinin sisteince zengin birimi (Cystein Rich Domain) ve 40-100 amino asitlik hidrofobik bağlanma bölgesi bulunduran amino ucunun ise hücre dışarısında olduğu tahmin edilmektedir. Bu proteinlerin hücre membranını, tam yedi kez geçen ve α -heliks yapıda olan hidrofobik bir birim içermektedir. Hücre içi karboksil grubu içeren ucu ise değişken uzunluk göstermektedir (Wang ve ark., 1996). Wnt proteinleri doğrudan Fzd reseptörünün dış kısmında bol miktarda bulunan Cys aminoasidinin olduğu yere bağlanır. Kanonikal sinyal iletim sistemine ait bir Wnt proteini tarafından uyarılan Fzd reseptörü sitoplazmada bulunan Dvl proteinlerinin aktivasyonunu gerçekleştirir. Fzd reseptörlerinden bazılarının aktivasyonu sonucu sitoplazma içinde bulunan Dvl proteininin yanında GTPazlar ve heterodimerik G proteinleri de aktive olmaktadır (Logan ve Nusse., 2004). On tane Frizzled reseptörü vardır. Fzd-1 reseptörü, yetişkin akciğer, pankreas ve ovaryum gibi dokularda ve fetal akciğer ve böbrekte eksprese edilir. Fzd-2'ler fetal böbrek ve akciğerde, erişkinlerde ise yüksek oranda ovaryumda eksprese edilir ve burada düzenleyici görevi vardır. Fzd-4, Wnt için önemli bir pozitif

düzenleyicidir. Fzd-5'in ise, Wnt-5a için bir reseptör olduğu düşünülmektedir. Fzd-6, kanonikal Wnt/ β -katenin sinyal yolağında negatif düzenleyicidir (Hendrickx ve Leyns., 2008). Hücre proliferasyonundan ve apoptozis inhibisyonundan da sorumludur. Fzd-7'ler APC (adenomatosis poliposis coli) fonksiyonunu downregüle ederek β -katenin bağımlı sinyalleri artırır. Fzd-8, birçok kanser türünde belirlenmiştir. Fzd-9'un beyin, testis, göz, iskelet, kas ve böbreklerde eksprese edildiği, yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Noort ve ark., 2002; Hendrickx ve Leyns, 2008; Amerongen ve Nusse, 2009).

2.8.4. β -Katenin ve Etkileşimleri

İnsanlarda, beta-katenin (β -Katenin) CTNNB1 geni tarafından kodlanan özel bir proteindir (Kraus ve ark.,1994) *Drosophila*'da homolog proteini *armadillo* olarak isimlendirilir. β -katenin ile yapılan dizi analizinde bu proteinlerin *armadillo* ailesine ait oldukları saptanmıştır. Farklı özellikleri yerine getirmek için özelleşmiş olan bu proteinler , protein-protein bağlanmalarını gerçekleştiren 'armadillo tekrar birimi' (armadillo repeat unit) adı verilen birçok kopyaya sahiptir (Yochum ve ark., 2008). 781 adet aminoasitten oluşmuş 92 kD'luk bir proteindir. Temel olarak yapısına bakıldığında 100 aminoasitlik karboksi-terminal uç, 16 aminoasitlik amino uç, 42 aminoasitten oluşan tekrar bölgeleri içermektedir. Proteinin amino ucu β -Katenin stabilitesinin sağlanmasında yardımcı olurken, karboksil ucu transkripsiyon aktivitesinde önemli bir role sahiptir (Willert ve Nusse, 1998, Hagen ve ark., 2004).

Armadilla tekrar gruplarının helikal şekilde bükülmesi β -katenin proteininin kaderin molekülü, axin, adenomatöz polipozis koli (APC) ve son olarak TCF/LEF ailesine bağlanmasını düzenler (Willert ve ark., 1999; Luu ve ark., 2004).

β -kateninin serin/treonin içeren amino-terminal ucu fosforilasyon işlevinin gerçekleştiği bölgedir. DNA ile aktivasyona giren kısım ise karboksi-terminal uç bölgesidir (Hagen ve ark., 2004). Epitelyal hücre sitoplazması ve plazma hücre membranlarında beta-katenin proteini bol miktarda bulunmaktadır, katenin ailesinin bir üyesidir ve bu molekül ailesi β -katenin α -katenin, γ -katenin olarak sınıflandırılır. Örneğin; α -katenin diğer iki katenin grubunun kaderinle birleşimidir (Kemler, 2003). Kateninler kaderinle yapılan kompleks hücre adezyonunda önemlidir (Daugherty ve Gottardi, 2007). β -katenin- kaderin kompleksinin doku farklılaşmasında özellikle embriyonun preimplantasyon döneminde oldukça önemli görevi olduğu

düşünülmektedir (Erdem ve Alper, 1997). Morula safhasında olan bir embriyo blastomerler arasında bağlantının kurulması ve hücrel bir bütünlük oluşturması açısından kaderin- katenin bağlantıları önemlidir. Bu olayda özellikle kaderin grubundan E-kaderinler görev alır (Sert, 2007). β -katenin embriyonik gelişimde, hücre-hücre adezyonunda ve malign tümör transformasyonunda etkili rollere sahiptir. Hücre tomurcuklanmasını etkileyerek vücut ekseninin embriyolojik oluşumunda doğrudan rol oynar. Son olarak zonula adherens bağlantı komplekslerinde ve yara iyileşmelerinde de etkin role sahiptir (Ougolkov ve ark., 2004).

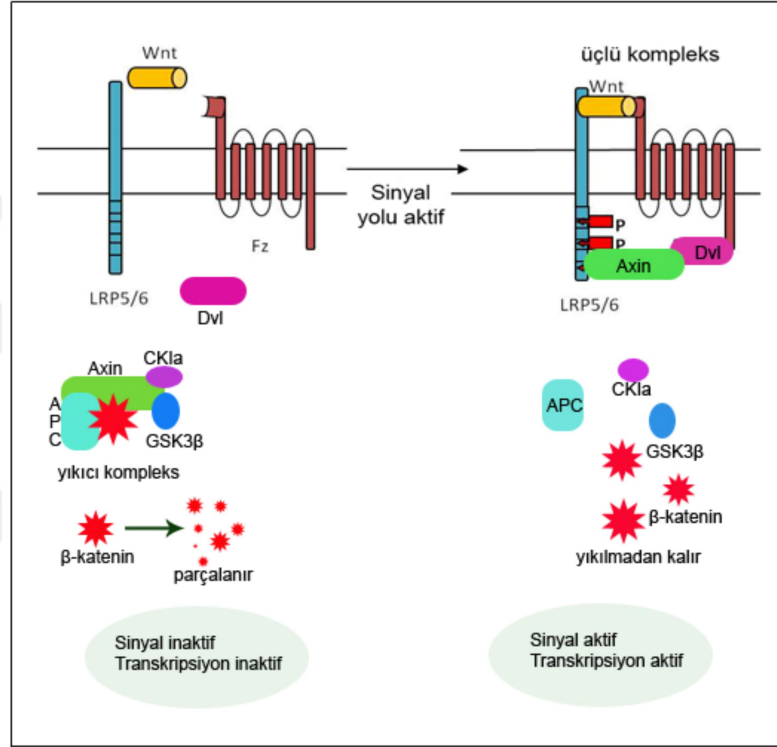
2.8.5. Wnt Sinyal Mekanizması

β -katenin Wnt sinyal yolağında ve hücre-hücre adezyonunda etkili role sahiptir (Schohl ve Fagotto, 2002). Wnt proteinlerinin Fzd ailesine ait reseptörlere bağlanması ve Wnt sinyal yolağının aktifleşmesiyle β -katenin proteininin etkileri ortaya çıkar (Hagen ve ark., 2004). Wnt/ β -katenin sinyal yolağı bu adı Wnt proteininden alır (Nusse ve Varmus, 1992). Bu protein ergin dönemde hemopoietik hücreler, epitel dokusuna ait hücrelerin en alt tabakasında yer alan bazal hücreler, beyin, karaciğer ve akciğer gibi dokularda ve organlarda bulunan erişkin kök hücrelerden köken almaktadır (Nusse ve Varmus, 1992; Donma ve Donma, 2010)

Bu sinyal yolağında görev alan moleküllerin etkileri ve sonuçları sinyal yolağının bulunmasından bugüne kadar tanımlanmıştır. Ligand molekül Wnt proteininin kendisidir. Bu ligandın bağlanacağı reseptörler ise farklı olabilir bunlar; frizzled (Fz) reseptörü ve low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP 5/6) yardımcı reseptörlerdir. Bu yolda sinyal iletiminin hücre içerisinde gerçekleşmesine yardımcı olan moleküller; β -katenin, Disheveled (Dsh) Axin, protein fosfataz 2A, glikojen sentaz kinaz 3- β (GSK3- β) ve adenomatöz polipozis koli (APC) proteinidir. Burada ilgili bölgelerde hücrel cevap için uyarı veren transkripsiyon faktörleri ise T-cell faktör (TCF) ve lymphoid enhancer-binding faktör (LEF) dür (Dönmez, ve ark., 2011; Can, 2014). Bu transkripsiyon faktörleri birçok genin ifadesi için oldukça önemlidir. Transkripsiyon faktörleri içerisinde bazıları kanser oluşumunu tetikleyicidir. Bunlardan c-Myc ve Cyclin d1 gibi genler bunlara ek olarak Octamer-binding transcription faktör-4 (Oct-4), Nanog ve Snail gibi embriyonik kök hücrelerde eksprese edilen genler de yer almaktadır (Clevers, 2006). Wnt sinyal yolağında sinyal aktivasyonu ve hedef genler arasında hangi genin ifade edileceğini hücre tipi belirlemektedir. Bu sayede tek bir sinyalden oluşacak cevapla hücrel cevapların çeşitliliği artacaktır (Nusse, 2005).

Bu sinyal yolağının çalışma prensibindeki asıl unsur sitoplazmik düzeydeki β -kateninin ortamdaki varlığı ve miktarıdır. Wnt ligandı hücre reseptörüne bağlanmadığı takdirde yani, sinyal iletimi aktif değilken her bir hedef genin ifadesinin baskılanması durdurulur. Bunu gerçekleştiren faktör ise hücre içerisinde β -katenin düzeyinin minimum seviyede olmasıdır. β -katenin miktarı hücre içerisinde oldukça sıkı kontrol edilmektedir. Normal şartlarda β -katenin hücre içinde protein senteziyle orantılı bir şekilde sentezlenir. Bazıları kaderinlerle beraber hücre adezyonunda görev alırken, geriye kalan diğer proteinler yıkılarak sitoplazmik β -katenin seviyelerinin düşük olmasını sağlar. Bu durum β -katenin yıkım kompleksi tarafından gerçekleştirilir. β -katenin yıkım kompleksi bazı yapısal proteinlerden olan Axin, tümör bağlayıcı bir protein olan APC, CK-1 α ve GSK3- β ' den oluşmuştur (Nusse, 2012). β -katenin proteozomlar tarafından yıkıma uğrar, bunu gerçekleştiren ise CK-1 α ve GSK3- β tarafından farklı bölgelerinden fosforillenmesidir. Çekirdekte yer alan Wnt hedef genleri ile bağlantılı olan transkripsiyon faktörlerinden LEF-1 ve TCF nin aktiviteleri, baskılayıcı bir protein olan Groucho ve Histon deasetilaz (HDAC) tarafından engellenmektedir. Burada asıl olay HDAC histonları deasetilleyerek kromatinin yeniden oluşmasını engeller ve hedef genlerin baskılanması sürecine katkı sağlar (şekil 2.4) (Gordon ve Nusse, 2006). Diğer bir durum ise sinyal iletiminin aktif olmasıdır; yani Wnt ligandı reseptörlerine bağlandığında hücre içerisinde sitoplazmik β -katenin seviyesi artar ve böylece hedef genler üzerine kurulan baskı ortadan kalkarak ilgili hedef genin ifadesi oluşur. Wnt asıl reseptörü olan yedi geçişli transmembran bir protein olan Fzd reseptörüne bağlanır. Fakat sinyal iletiminin gerçekleşebilmesi için Wnt'nin Fzd reseptöründen başka, eş zamanlı olarak LRP5/6 yardımcı reseptörlerine de bağlanması gerekir. Ligand reseptör etkileşmesinden sonra LRP5/6 reseptörleri membrana bağlı olarak CK-1 α tarafından bazı bölgelerinden fosforillenir. Fosforile olan bölgeler β -katenin yıkım kompleksi üyelerinden Axinin bağlanacağı bir alan oluşturur. Henüz bilinmeyen bir mekanizma ile eş zamanlı olarak Fzd reseptörüne bağlı olan Dsh proteini hiper- fosforile hale gelir ve β -katenin yıkım kompleksi moleküler olarak değişiklik gösterir. Buna bağlı olarak β -katenin yıkım kompleksinin her bir üyesinde aktivite değişikliği meydana gelir bu durumda yıkım kompleksi inaktif hale geçer. β -katenin yıkım kompleksinin inaktif hale gelmesiyle β -kateninin yıkımı da inhibe olur ve sitoplazmada fazla miktarda β -katenin birikimi gerçekleşir (Dönmez ve ark., 2011; Lien ve Fuchs 2014). Sitoplazma içerisinde β -katenin miktarının artmasıyla diğer moleküller nükleusa geçer. Burada ise TCF ve LEF kompleksine bağlanırlar.

Transkripsiyon faktörü olan TCF/LEF kompleksinin aktivitesini baskılayan Groucho ve HDAC1' ortamdan uzaklaştırarak bu iki molekül yerine p300 bağlanır. Baskılayıcı moleküllerin ortamdan uzaklaşmasıyla aynı zamanda histon proteinlerini asetilleyerek kromatinin tekrar şekillendirilmesini kolaylaştıran p300'ün etkisiyle Wnt sinyal yolağındaki hedef genlerin transkripsiyonu başlar ve böylece her hedef genin hücresel cevabı oluşur (Şekil 2.4) (Nusse, 2005; Gordon ve Nusse, 2006; Dönmez ve ark., 2011; Berridge, 2012; Nusse, 2012; Can, 2014; Lien ve Fuchs, 2014).



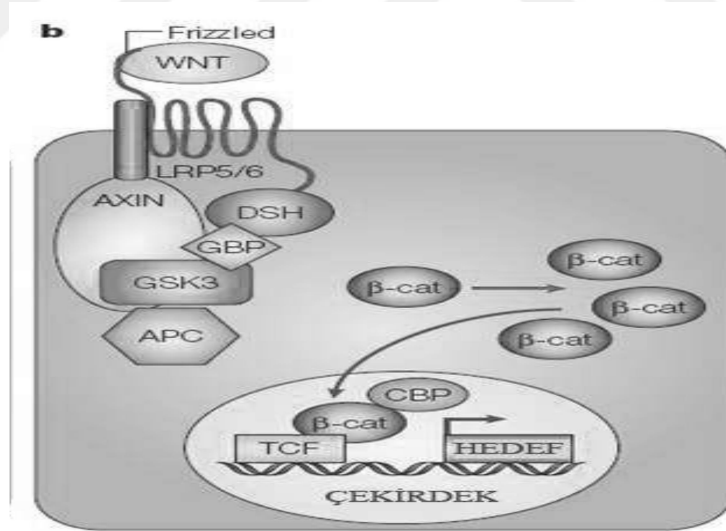
Şekil 2.4. Wnt/β-katenin sinyal mekanizması (Dönmez ve ark.,2011).

Wnt proteinleri memelilerde iki farklı hücre içi haberleşme sistemini tercih ederler; β-katenin proteinin esas olarak rol aldığı kanonikal yolak, diğeri ise; β-kateninden bağımsız olarak çalışan nonkanonikal sinyal iletim sistemidir. Nonkanonikal sinyal yolağı, Wnt/Ca⁺², Wnt/JNK sistemleri olarak da bilinir (Miller ve ark., 1999).

2.8.6. Kanonikal Sinyal Yolağı

Wnt'lerin protein ligandlarının Fzd/LRP reseptör kompleksine bağlanması sonucunda aktifleşen Wnt/β-katenin-TCF/LEF transkripsiyon faktörlerinin rol aldığı intraselüler sinyal yoludur. Kaderinlerin intraselüler domainine bağlı olarak bulunan β-katenin aynı zamanda sitozolik protein kompleksine de bağlıdır. Dsh ile LRP5/6 reseptörlerinin intraselüler domaini Fzd reseptörlerinin intraselüler domaini ve aksin (tumor suppressor

protein) proteini ile fiziksel bir etkileşim kurmaktadır. Kanonikal sinyal yolağının önemli bileşenlerinden bazıları da APC (Adenomatous polyposis coli, tumor suppressor protein), GSK-3 α/β (glycogen syntase kinase), Aksin, CKI (CK1 γ (caseine kinase 1 family member) 'dir ve bu moleküller sitoplazmik kompleks halde bulunurlar. Wnt proteinlerinin ya da ligandlarının Fzd/LRP5/6 reseptör kompleksine bağlanmaması durumunda ya da ortamda Wnt yokluğunda kanonikal yol aktif hale geçemez ve bunun aksine GSK-3 β , APC, CKI, β -katenin, aksin kompleksinde β -katenin'in fosforilasyonu gerçekleşir ve ubiquitinyasyon ile proteozomal degradasyon söz konusudur. Eğer ortamda Wnt varsa ve kendine özgü reseptörlerine bağlanmışsa Dsh fosforilize olur Fzd reseptörünün intraselüler domainine bağlanır. Aksin kompleksinin fosforilasyonu ile LRP5/6 reseptörünün intraselüler domainine bağlanır (Monga, 2005). Bu sayede β -katenin için sitozolik aktivite başlar ve hücre içi nükleer taşınma gerçekleşir. Sitozolik olarak serbest kalan β -katenin aynı zamanda kadeninlerin de intraselüler domainine α -katenin ile birlikte bağlanmaktadır (Şekil 2.5) (Miller, 2001; Huang ve Klein, 2004; Johnson ve ark., 2004; Monga, 2005; Tian ve ark., 2005; Bovolenta ve ark. 2006; Clevers, 2006; Willert ve Jones; 2006).



Şekil 2. 5. Kanonikal yolak (Berk, 2006).

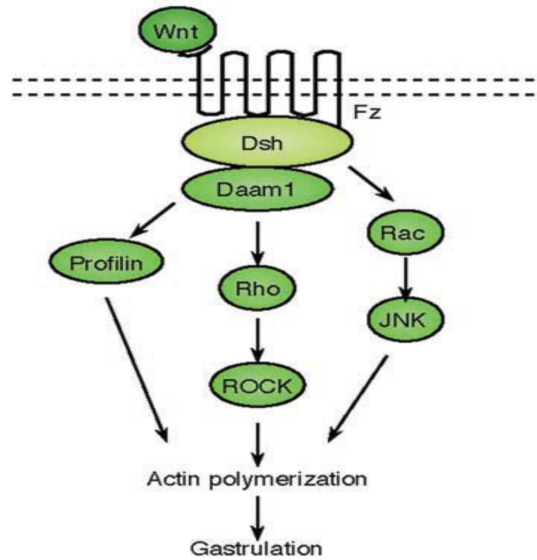
2.8.7. Nonkanonikal Sinyal Yolağı

Wnt proteinlerinin koreseptörler aracılığıyla aktifleşen ve β -kateninden bağımsız olarak devam eden intraselüler yolağıdır. Bu sinyal yolağında Wnt proteinlerinin Fzd reseptör ailesi üzerinden gerçekleştirdiği Wnt/PCP (planar cell polarity) ve Wnt/Ca²⁺ ile ROR2 [receptor tyrosine kinase (RTK)'ların Ror ailesinden]-JNK (cJun N-terminal kinases)

sinyal yolu ve RYK (receptor-like tyrosine kinase)-Src sinyal yolu gibi koreseptörler görev alır (Miller, 2001; Johnson ve ark.,2004; Huang ve Klein, 2004; Monga, 2005; Tian ve ark., 2005; Bovolenta ve ark., 2006; Clevers, 2006; Willert ve Jones, 2006). Bu sinyal yolağı Planar cell polarity (PCP) yolağı veya Wnt/Ca yolağıdır (Şekil 2.6) ve (Şekil 2.7).

2.8.8. Planar Cell Polarity (PCP) yolağı

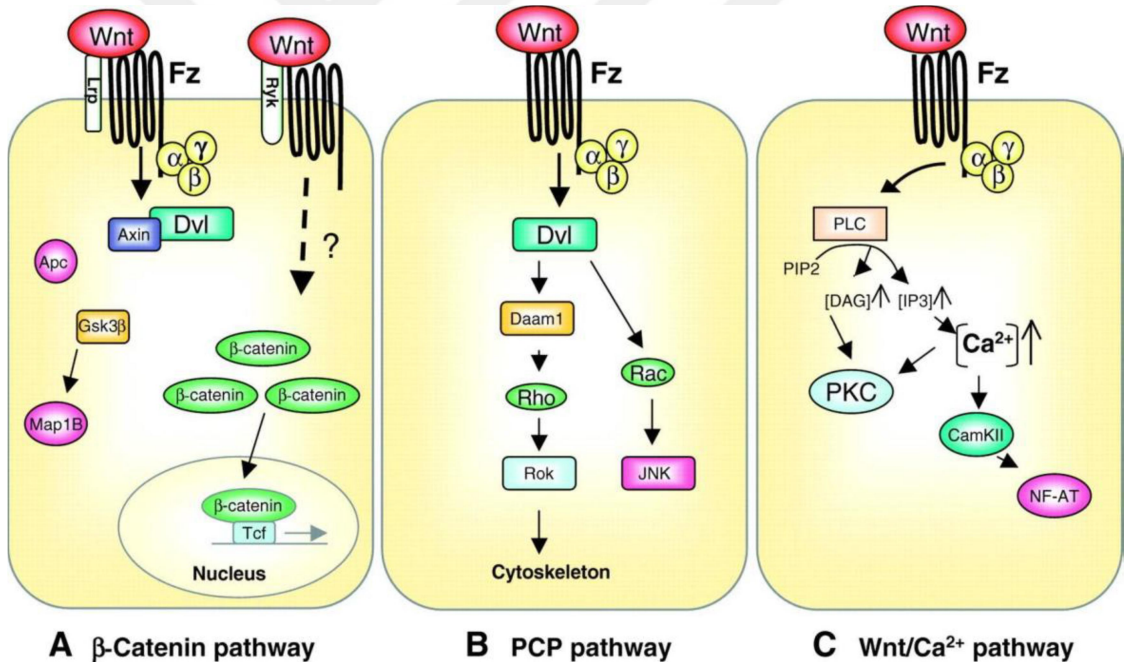
Dsh, Fzd, Daam1, Rho, Rac, Prickle ve Strabismus'u içeren birçok bileşeni vardır (Komiya ve Habas, 2008). Yapılan çalışmalarda Protein Kinaz A (PKA) gibi faktörlerin non-kanonik sinyal yolağının negatif düzenleyicileri olduğu gösterilmiştir. Burada PKA, RhoA ile etkileşime girebilir ve sonucunda Rho aktivitesini inhibe edebilir. Planar cell polarity sinyal yolağının Wnt sinyalinin LRP5/6 koreseptöründen bağımsız Fzd reseptörünün bir aracı olduğu düşünülmektedir (Ikeda ve ark.,1998; Mao ve ark., 2001; Moon ve ark., 2004; Kohn ve Moon, 2005; Bilic ve ark.,2007). Dsh aktivasyonu, Wnt sinyali ile, LRP5/6'dan bağımsız olan Fzd aracılığıyla uyarılır. Daam1 Dsh' ye bağlanır ve Rho kinaz (ROCK) aktivasyonuna dönüşür ve böylece Rho aktivasyonuna aracılık etmiş olur. Axin polimerizasyonu için axin bağlayıcı bir proteine aracılık eden yine Daam1'dir. Dsh JNK için Rac aktivasyonuna katılır (Şekil 2.7., B). Rock, Jnk bir araya gelerek hücre iskeletinin düzenlenmesi ve gastrulasyon gibi önemli olaylarda rol alır (Bilic ve ark., 2007; Komiya ve Habas, 2008).



Şekil 2.6. Non-kanonik veya β -kateninden bağımsız yolağın birincisi Planar cell polarity (PCP) yolağı (Berk, 2006).

2.8.9. Wnt/Ca²⁺ Sinyal Yolu

Wnt proteinlerinden bazıları Fzd reseptörlerine bağlandıktan sonra Fzd 'nin intraselüler domaini Dsh ile bağlanır ve heterotrimerik G proteini (Gαβγ) phospholipase C stimülasyonu meydana gelir. Bu sayede intraselüler Ca²⁺ salınımı artmaya başlar. Kalsiyum salınımı arttıkça siklik guanozin monofosfat (cGMP) salınımı düşer. Buradan çıkan sonuçlarla intraselüler Wnt/Ca²⁺ sinyal yolunun aktifleşmesinde PKC (protein kinase C) ve CamKII (Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II) gibi kalsiyuma duyarlı enzimlerin aktivitesinin sağlanması ile mümkün olduğu kanıtlanmıştır. Transkripsiyon faktörü olan NFAT (nuclear factor of activated T-cells) aktivasyonu ile hedef genlerde transkripsiyon gerçekleşir (Şekil 2.7., C). Wnt Ca²⁺ sinyal yolağı hücre hareketi ve sonuç olarak hücre akibetinin ne olacağı konusunda etkili mekanizmalara sahiptir (Miller, 2001; Huang ve Klein, 2004; Johnson ve ark.,2004; Monga, 2005; Tian ve ark., 2005; Bovolenta ve ark., 2006; Clevers 2006; Willert ve Jones, 2006).



Şekil 2.7. Wnt sinyal yolları (Bovolenta ve ark, 2006).

2.8.10. Wnt Proteinin Salgılanması

Hücreler arası haberleşme; moleküllerin salınması, bağlanması ve taşınmasını içeren bir olaylar bütünüdür. Wnt tarafından üretilmiş hücrelerde wnt proteinleri porsupinin transferi ile endoplazmik retikulumda istenilen hale gelirler. Sekresyon veziküllerinde yer alan Wnt proteininin salgılanması ve taşınması plazma zarında bulunan çoklu geçiş

özelliğine sahip transmembran proteinleri olan Wnt ler tarafından kontrol edilir (Ching ve Nusse, 2006).

Wnt üretimli hücrelerin retromer yapıları hücre içerisinde hareket edip, diğer hücelere taşınabilen lipoprotein yapıda wnt formlarını şekillendirirler. Wnt proteinleri çok iyi korunmuş sistein parçalarından oluşmuştur. Wnt proteinlerinin N- terminal uçları sinyal peptitlerini ve salgılarını taşımasına rağmen tamamen parçalanmaları söz konusu değildir. Bu durum bölgesel bir modifikasyondur ve Wntlerin fonksiyonunu tamamlamaları için gereklidir. Bu karmaşa Wnt sekresyon hücrelerinde bir drosophila geninde bulunmuş ve porsupin adı verilmiş olup endoplazmik retikulumda yer alan substratların bir türü olan asil transferaz enzimlerine benzerlik göstermiş olan asilattır (Mikels ve Nusse, 2006). Yapılan çalışmalar bu sonuçların porsupin ve homoloğu olan mom-1 in Wnt palmitilasyonundan sorumlu olan enzimi kodladığını düşünülmektedir (Mikels ve Nusse, 2006). Wnt salınımı için, *Drosophila* dışında bir gen daha bulunmuş ve buna da Wntless (wls) denmiştir. Bu genin de wntlerin salınımı için gerekli olduğu öngörülmüştür. Wntless (wls) gen kodu yedi geçişli zar proteininden oluşmaktadır. Wls ortamda bulunmadığında Wnt'ler bunları üreten hücelere tutunurlar. Wntlesslerin ilk etkileşimi Wnt proteinleriyle bu yüzden etkileşimde olduğu hücrenin golgi cisimciği içersinden yer alır. Başka bir hipoteze göre retromer yapısı geri dönüşümlü Wnt reseptörünü içermesi ve bununda temel salgılama yolları, Wnt salgılamasındaki ayrılmış kısmın bir parçası olduğunu göstermektedir (Clevers, 2006). Özetle komplekslerin, golgi cisimciğindeki döngüsünde proteinlerin geri hareketlerinde etkin bir role sahip olduğu gösterilmiştir (Oruç ve Berk, 2006)

2.8.11. Wnt Proteinlerinin Hücre İçi Taşınması

Wnt proteini tıpkı bir morfojen gibi davranır. Kontrasyona bağlı olarak hücre içi uzun mesafelerde aktivite gösterebilir. Yapılan çalışmalarda bu sinyalleşmenin nasıl üretildiğine dair bir fikir yoktur. Palmitol parçalarının lipit partiküllerini ya da zar yapısının hareket sınırlarını kısıtlayabileceği akla gelmektedir. Bu sebepten Wnt'ler intraselüler taşıyıcı veziküllere bağlanabilirler ya da lipoprotein partikülleriyle hareket edebilirler. Bir başka olasılık ise Wnt proteinlerinin uzun ve ince olan filopodial partiküller olan sitonimlerle beraber taşınabilecek olmalarıdır. Drosophilalar üzerinde yapılan çalışmalar ekstraselüler heparan sülfat proteoglikanın Wnt proteinlerinin taşınmasına yönelik bir rolü olduğunu göstermektedir (Oruç ve Berk, 2006).

2.8.12. İmplantasyon Sırasında Wnt Sinyali ve Desidualizasyon

Embriyonik gelişim sürecinde başarılı bir implantasyon için alıcı uterus ve blastosist arasında çapraz bir yaklaşma söz konusudur (Chen ve ark., 2009). Embriyo implantasyonunda ve uterin desidualizasyonunda yer alan birçok sinyalizasyon molekülü ve bu moleküllerin çalıştığı sinyal yolları araştırılmasına rağmen, embriyo-uterus diyalogundaki şifreler hala çözülememiştir. Fare modelleri üzerinde yapılan genomik dizi çalışmaları memelilerde Wnt sinyal yolağının implantasyonda önemli bir rolü olduğunu göstermiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar çoklu implantasyon ve desidualizasyon olaylarında; preimplantasyon, embriyo gelişimi, blastosist aktivasyonunda wnt sinyalinin kritik bir etken olduğunu göstermektedir (Zhang ve Yan, 2016).

2.8.13. Pre-implantasyon Embriyo Gelişiminde Wnt Sinyali

Memelilerde implantasyon öncesi embriyo gelişimi, döllenme aracılığıyla oosit büyümesinin tamamlanmasından morula oluşturmak için döllenmiş zigotların ardışık olarak bölünmesine kadar bir dizi kritik olayı kapsar (Lloyd ve Fleming, 2003; Mohamed ve ark., 2004). Çeşitli Wnt ligandları, FZD reseptörleri ve ilişkin düzenleyiciler implantasyon öncesi rat embriyosunda saptanabilmektedir, bu ise erken gebelik döneminde Wnt sinyalizasyonunun etkili olduğunu gösterir (Haegel ve ark., 1995; Huelsken ve ark., 2000; Wang ve ark., 2004; Kemp ve ark., 2005; Xie ve ark., 2008). Toplam ve defosforile (aktif) β -katenin, blastositlere döllenmiş hücreleri embriyoları içeren tüm aşamalarda ekprese edilmiş olmasına rağmen, birkaç çalışma blastosist oluşumu için β - katenin bağımlı yolun gereksiz olduğuna dair artan kanıtlar sunmuştur (De Vries ve ark., 2004). Genomik knock-out çalışmaları heterozigot çaprazlamalardan zigotik β - kateninleri olmayan fare embriyolarının normal bir şekilde blastosistleri oluşturabildiğini ve heterozigot bir anneye implante edilebildiğini göstermiştir, fakat anterior - posterior aks oluşumunda mevcut bir defekt ve mezoderm ve baş yapılarının yokluğu ile beraber erken implantasyonun ölümcüllüğünü sergilemiştir (Huelsken ve ark., 2000; De Vries ve ark., 2004; Landeira ve ark., 2015). Bu zigotik β -katenin-delesyon embriyolarının blastosist oluşumunun, maternal olarak türemiş β -katenin tarafından kısmen kurtarılabilceği varsayılmıştır (Gao ve Chen 2010). Bununla birlikte, oositlerde vahşi - tip β - kateninin şartlı eliminasyonu ile fare embriyoları normal blastosist oluşumu sergilemiştir bu da hem annenin hem de zigotik β -kateninin, implantasyon öncesi embriyo gelişiminde sorumlu olmadığını açığa

çıkarmıştır (Gao ve Chen 2010). Son zamanlarda, fare-hücre embriyolarında nükleer β -katenin sinyalizasyonunu bastırmak için adenoviral vektör (ADV) aracılı Dkk1 veya Tcf- β -katenin komplekslerinin küçük molekülü inhibitörleri (PKF115-584) kullanılarak doğrudan kanıt sunulmuştur (Huelsen ve ark., 2000). Bu iki hücreli embriyoların blastosistlere dönüştüğü yorumu, nükleer β -katenin sinyalizasyonunun, implantasyon öncesi embriyo gelişimi için önemli olmadığını göstermiştir. Pre-implantasyon dönem boyunca kanonik Wnt sinyalizasyonu entegre değilken, sonuç sayısındaki artış implantasyon öncesi embriyo gelişiminde kanonik olmayan Wnt sinyalizasyonunun potansiyel rolüne ilgi çekici bir bakış açısı sunmaktadır. Eski bir çalışma fare peri-implantasyon embriyolarında Wnt familyası bileşenlerinin benzersiz ekspresyon profillerini göstermiştir bu da alternatif Wnt sinyal yollarının, implantasyon öncesi dönemde rol oynayabileceğini işaret eder (Mohamed ve ark., 2004). Wnt/PCP ve Wnt-cGMP / Ca²⁺ yollarında etki ettiği bilinen çoklu moleküller için transkriptler ve/veya proteinler, implantasyon öncesi gelişim boyunca sunulmuştur. Wnt/PCP sinyalizasyonu regülasyonunun normal implantasyon öncesi gelişime dahil olduğu ortaya konmuştur çünkü gelişen blastosist kümelerinin ayırt edilmesine ve tek bir hücre içi kütesinin oluşturulmasına olanak sağlamaktadır (Na ve ark., 2007). Wnt sinyalizasyonunun kanonik ve kanonik olmayan yollara yayılmasında merkezi bir arabulucu olarak, implantasyon öncesi embriyoda üç murin *Dsh* genlerinin hepsi (*Dsh1*, *Dsh2* ve *Dsh3*), genellikle belirgin mekan-zamansal lokalizasyonlarla ifade edilmiştir (Wansleben ve Merjilink 2011; Van der Horst ve ark., 2012; Cooke ve ark., 2013). Dsh-GFP füzyon proteinlerinin aşırı ekspresyonu, blastosist oluşturmada bir uyumsuzluğa yol açarak dört hücre aşamalı fare embriyolarının morfolojisinde ve adhezyon özelliklerinde belirgin bir bozulmaya yol açmaktadır (Van der Horst ve ark., 2012). Dsh proteinlerinin aynı zamanda kanonik olmayan Wnt yoluyla hücre polaritesi ve hücre yapışması açısından önemli düzenleyiciler olduğu düşünüldüğünde, yukarıda bahsi geçen çalışmalar implantasyon öncesi non-kanonik Wnt sinyalizasyonunun embriyo gelişimi esnasında kritik öneme sahip olabileceği fikrini güçlendirmiştir.

2.9. Programlanmış Hücre Ölümü (Apoptoz)

Apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. Apo: ayri, Ptois: düşme demektir. Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Avusturyalı bir patolog olan J.F.K. Kerr tarafından tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz ile ilgili yapılan çalışmalarda genellikle *Caenorhabditis elegans* nematodu kullanılmıştır. Basit

yapıda, çok hücreli olan bu nematod ile çalışan, Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı bilim adamları “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır. Bu nematodlarda 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 apoptozu kontrol etmektedir. Mutasyon sonucu inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun gerçekleşmediği ve normal şartlarda ölmesi gereken hücrelerin ölmeyip yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu yüzden ced-3 ve ced-4’ün ölüm genleri olup apoptozu indükledikleri fakat ced-9’un ise ölüme karşı koyan gen olup apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Günümüzde bu genlerin insan genomu için karşılıklı uyarlanması şu şekildedir; ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için ise Bcl-2 olarak tanımlanmıştır (Hengartner ve ark.,1992; Andrew ve ark.,2001).

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan bu durum, çok hücreli canlılarda istenmeyen bazı hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla genelleşmiş belirli bir kontrol ve program dahilinde gerçekleşen fizyolojik bir ölüm sürecidir (Wyllie ve ark.,1980). Apoptoz hücre ölüm mekanizması olarak bilinir. Bilinen en ilginç özelliği apoptotik süreçte çevresel dokular herhangi bir yıkıma uğramazlar. Bu durum apoptotik hücre ölümünü nekroz hücre ölümünden ayıran en önemli farktır. Apoptoz apoptotik hücre ölümü sırasında meydana çıkan hücresel bileşenlerin membran ile çevrili apoptotik cisimcikler olarak bilinen veziküller halinde komşu hücreler (fagositler) tarafından yutulur (fagositoz) herhangi bir enflamasyona neden olmadan yok edilmesiyle karakterizedir (Searle ve ark.,1982; Savill ve Fadok, 2000). Apoptoz durumunda hücrede herhangi bir yangı olmaksızın hücreler kendi kendilerini yok ederek homeostazi korurlar (Tomatır, 2003). Apoptoz mekanizmasında hücrelere dışarıdan bakıldığında hücrenin büzülerek tomurcuklandığı (blebbing) ve bu tomurcukların her birinin ayrı apoptotik parçacıklar halinde çevreye yayılım gösterdiği izlenmiştir. Hücre içerisinde birçok farklı değişiklik meydana gelmektedir. Örneğin nükleusun yoğunlaşarak DNA miktarının her biri 200 baz çiftinden oluşan nükleik asit kalıntılarına ayrılmasıdır ve bu olay fragmentasyon olarak bilinir (Wyllie 1980; Wyllie ve ark.,1980). Diğer birçok organelde de buna benzer özellikler meydana gelmektedir. Mitokondride dış zar daha esnekleşerek geçirgen bir hal alır, bu durum apoptoz süresince gerçekleşebileceği gibi tek başına da apoptozu tetikleyebilir (Green ve Reed, 1998). Gerçekleşen bu hücresel değişimler içerisinde hücre iskelet elemanlarına ait protein sentezi inhibisyonu da yer almaktadır (Taylor ve ark., 2008). Apoptoz olayı hücre içerisinde sitoplazmik azalma

ve çevredeki hücrelerde olan yakın ilişkinin ortadan kalkmasıyla başlar. Hücrenel büzüşmeden sorumlu olan sodyum (Na) , klor (Cl), potasyum (K) taşıyıcı sisteminin durmasıyla hücrenin içinde ve dışında sıvı hareketinin tükenmesidir. Apoptoza uğrayacak hücreler hacimce küçülür, çevredeki diğer birçok hücre ile ilişkisini keserek mikrovillusları kaybolur (Tomatır, 2003). Programlanmış hücre ölüm süreci olarak bilinen apoptozda birçok proteinin proteolitik kesimi organellerin değişimlerini organize etmekte ve bununla beraber apoptotik sinyalin hücrenel yayılımını gerçekleştirmektedir. Bu proteolitik kaskad, kaspazlar olarak bilinen sistein-aspartat proteazları tarafından başlatılır ve bu proteazlar tarafından yürütülmektedir (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Kaspaz ailesi sağlıklı hücrelerde inaktif enzim öncülleri olarak bilinen zimojen halde bulunurlar. Bu sebepten proteolitik aktiviteleri oldukça azdır yada hiç yoktur (pro-kaspaz) (Nicholson,1999). Prokaspazların aksine apoptozun tetiklendiği tüm olaylarda kaspazların aktivasyonu görülmektedir. Kaspaz ailesi apoptozda görev aldıkları aşamaya göre isimlendirilirler. Apoptotik süreci başlatan kaspazlar kaspaz-8 ve kaspaz-9 iken, apoptozun yürütülmesinde görev alan efektör olarak adlandırılan kaspazlar 3, 6 ve 7'dir (Earnshaw ve ark., 1999).

2.9.1. Kaspaz Ailesi ve Kaspaz-9

Sistein proteazları olan kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptit bağına kırma özelliğindedirler. Hücre içerisinde inaktif durumdadırlar, fakat proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirme özelliğine sahiptirler. 100 farklı tipte hedef proteini keserek apoptozu gerçekleştirirler. 3 farklı tipte kaspaz mekanizması vardır.

I- Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2, 8, 9, 10)

II-Efektör kaspazlar (Kaspaz 3, 6, 7)

III-İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14).

DNA tamir ve replikasyonu için ihtiyaç duyulan enzimleri inaktivite ederler. Hücreye ait hücre iskelet proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmayla bölünmesine neden olurlar (Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin 2001; Spierings ve ark., 2004).

Apoptoz aktive olduktan 1 saat sonra ya da daha uzun bir süre sonra DNA' da tek bir iplikte bir çentikle başlayan oldukça karakteristik ve dönüşümü olmayan bir parçalanma söz konusudur (Danial ve Korsmeyer, 2004). Sistein proteaz ailesine ait olan kaspazların merkezinde en işlevsel grup sisteindir ve sitoplazma içerisinde inaktif prokürsörler olarak bulunurlar. Bir başka deyişle ICE proteazlardır ve bu proteazlar

proteaz aktivasyon dizisi başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımını gerçekleştirirler. Aynı esnada nukleazlar da aktivasyon göstererek DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gösterirler (King ve Cidlowski, 1998). Sitokrom c, sitoplazma içerisine salınarak apoptozun başlaması ve sonlandırılmasından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olmaktadır. Sitozolda tanımlanan 14 kaspaz vardır (Wang J. ve ark.,2001). İlk kez bir proteaz olarak tanımlanmış ve inflamasyonu uyaran ICE, prokaspaz-1 olarak adlandırılmıştır. Kaspazlar olaylar dizisinde prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2, 8, 9, 10) ya da "uygulayıcıları" (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılabilirler (Budihardjo ve Oliver, 1999; Büyükgebiz, 2001). Apoptozda ölüm sinyalini veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanır ve hangi hücrenin öleceğine dair yön verirler fakat hücrenin tamamen ölümünden sorumlu değildirler. Başlatıcı kaspazlar hücre ölümünü gerçekleştirecek moleküllerin aktivasyonunu sağlarlar. Hücre ölümünden sorumlu kaspazlar efektör kaspazlardır ve başlatıcı kaspazların hücre içerisinde akışından sorumludurlar (Büyükgebiz, 2001). Apoptoz mekanizmasının merkezi bileşeni asıl olarak kaspazlardır (Hampton ve Orrenius, 1998). Kaspazların aktivasyonu her hücreye özgüdür. Kaspaz inhibitörleri (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (Büyükgebiz, 2001). Bunun yanında IAP (inhibitors of apoptosis) ailesinin kaspazlardan farklı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modellemesi ve hücre siklusunu kontrol ederek apoptozisi inhibe ettiği bilinmektedir. Malign hücrelerde çok miktarda gözlenirler (Israels ve Israels, 1999). Kaspaz grubu ailesi proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgeden keserler bu yüzden c-asp-ases adını almışlardır. Yalnızca aspartik asit bölgesinin kesilmesiyle hücrede lizis şekillenemez ve apoptotik cisimcikler oluşur (Hampton ve Orrenius, 1998; Israels ve Israels, 1999). Kaspazlar normal olan hücrelerde inaktif proenzimler olarak sentezlenirler. Bunlarda otoproteolitik parçalanma ya da özelleşmiş aspartik asit rezidüllerinde diğer kaspazlar aracılığıyla hızlı bir şekilde aktive olabilir. Kaspaz ailesinin bilinen 14 üyesinden sadece yedi tanesi apoptoziste etkilidir. Apoptoz boyunca upstream sinyal ileticisi (başlatıcı kaspaz) olan uzun pro-domainli kaspazlar ve karşısında kısa pro-domain içeren downstream kaspazları (efektör) proteolitik olarak etkili olan kaspazlar görev alırlar (Thornberry ve Lazebnik, 1998). Kaspaz-8 ve Kaspaz-10'un prodomainlerinde adaptör proteinlerle etkileşime girerek öldürücü efektör domain (DED) olan bir reseptör vardır. Toplayıcı domain olan (CARD) kaspaz-2 ve kaspaz-9 da bulunur ve bir adaptor molekülün bağlanmasında , efektör kaspazların da

aktivasyonunda oldukça önemlidir (Earnshaw ve ark.,1999). En iyi tanımlanmış kaspaz substratı DNA'nın onarımında yer alan ve çekirdek proteini olan poly-(ADP-ribose) polimeraz (PARP)'dır. Kaspaz parçalanması için hedefteki başlangıç proteinlerinden biri PARP'tır (Duriez ve Shah, 1997). Laminlerin kaspaz parçalanmaları, çekirdek büzüşmeleri sitozolik olarak yeniden birleşmesine neden olan fodrin ve aktine benzer hücre iskelet proteinlerinin parçalanmasından sorumludurlar (Mashima ve ark., 1995; Orth ve ark.,1996). Daha gelişmiş olarak, DNA-protein kinaz (DNAPK) hücre siklusu düzenleyicileri [retinoblastoma protein(pRb)], transkripsiyon faktörleri (NF- κ B) ve hücre sinyal proteinleri [Raf, protein kinase B (PKB)] açıklanmıştır (Song ve ark.,1996; Barkett ve ark.,1997; Tan ve ark.,1997; Widmann ve ark.,1998). Proteinlerin kaspazlar tarafından parçalanması apoptotik ölüm için oldukça önemli olmasına rağmen, anahtar durumdaki substratların tamamı bilinmemektedir. Bazı kaspazlar pro-inflamatuar sitokinler ve inflammatuar cevaplara aracılık etmek için önemlidirler (Thornberry ve ark.,1992).

2.9.1.1. Kaspaz-9

Başlatıcı kaspaz ailesinden olan kaspaz-9, gelişmekte olan desidualda, 4. ve 5. günlerden başlayarak desidualizasyon boyunca artış gösterir (Schlafke ve Enders, 1975). Kerr ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada apoptoz kavramının ilerlemesini takiben insan endometriumunda apoptozisin varlığını bildirmişlerdir (Kerr ve ark., 1972). Apoptoz menstruasyon döngüsü boyunca hücrel homeostaziyi sürdürmeye çalışır bu sayede geç dönem sekretuar ve menstrual fazda uterus endometriumunda fonksiyonel tabakadan yaşlanan hücreler atılmaktadır (Hopwood ve Levison, 1976; Kokawa ve ark., 1996; Shikone ve ark.,1996). Bu aşamadan sonra döngünün proliferatif fazı devam eder. Geç salgı ve menstruasyon döneminde endometrium glandular epitelinde apoptozis meydana gelirken proliferatif fazda ya da sekretuar fazın henüz başlangıcında çok az miktarda apoptoz gerçekleşir (Kokawa ve ark., 1996; Tao ve ark., 1997; Vaskivuo ve ark., 2000). Proliferatif fazda endometriyal hücrelerin proliferasyonu genel olarak östrojenlerin etkisiyle ilişkilidir. Progesteronun hücreleri farklılaştırma yoluna yönlendirdiği ve bunun sonucu olarak büyümeyi durdurduğu bilinmektedir. Normal bir endometriumda apoptozun periyodik doğası düşünüldüğünde östrojen ve progesteronun bu dokuda apoptoza neden olan sinyalleri düzenleyebileceği düşünülmektedir (Vaskivuo ve ark.,2000). Apoptozda mitokondrinin rolü oldukça dikkat çekicidir, birçok pro-apoptik sinyal içerirler. Bunlar içerisinde en önemlileri AIF(apoptozis indükleyici

faktör), Smac, diablo ve sitokrom c 'dir. Spesifik mitokondriyal membran gözeneklerinin oluşması, Bcl-2 protein familyası üyelerinin desteklemesiyle apoptozis gerçekleşir. Bu gözeneklere 'geçirgenlik geçiş gözenekleri' (PT) denir. PT gözenekleri oluştuğunda, proapoptik moleküller - AIF, Smac, diablo ve Sitokrom c mitokondriden çıkar. Sitokrom C'nin sitozele salınması apoptozisin uyarılması oldukça önemli bir olaydır. Sitokrom C, Apaf (CED-4'ün homoloğu) isimli bir proteinle etkileşir. Kaspaz-9 ve hemen ardından kaspaz-3'ü aktive eder (Dash, 2008).

2.9.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz gerçekleşirken mevcut olan iki yolu kullanır. Bunlar;

I- İnstrinsik (Mitokondriyal) yol,

II- Ekstrinsik yol,

a- Direkt mekanizma,

b- Dolaylı mekanizma.

Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller, DNA hasarı, hücre içi Ca^{++} düzeyi artışı, pH azalışı, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi gibi faktörlerdir. Hücre dışı yer alan sinyaller ise büyüme ve üreme faktörlerinin eksikliği, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS-FAS ligandı aracılığıyla apoptoz) sitotoksik T Lenfositler ve iskemi, toksin, kemoterapi gibi dış uyarıcılardır. Yukarıda bahsedilen her iki mekanizmada da kaspazlar görev almaktadır. Hücre içerisindeki faktörler instrinsik mekanizmayı devreye sokarken, hücre dışı faktörler ise ekstrinsik mekanizmayı devreye sokar ve apoptoz indüklenir (Smaili ve ark., 2000; Danial ve Korsmeyer, 2004; Kroemer ve ark., 2007).

2.9.2.1. İnstrinsik Yol

Hücre içerisindeki sinyallerin alınmasıyla apoptotik uyarı başlatılarak Proapoptik proteinlerden biri olan Bid; diğer proapoptik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder. Bax ve Bak proteinlerinin aktivasyonunu gerçekleştirir. Bax ve Bak proteinleri mitokondri membranında por oluşumu için uygun ortam hazırlar ve zar potansiyelini değişikliğe uğratar (Spierings ve ark., 2004). Mitokondri membran porlarından Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endonükleaz-G, AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Oksidatif fosforilasyon için sitokrom C elektron taşıyıcı yapar. SMAC, inhibitör apoptotik faktörü (IAF) 'ı engelleyerek apoptozu hızlandırır. İnhibitör apoptotik faktörün ortamda bulunması kaspazlardan 3 ve 8'in aktivasyonunu engeller. Apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün çekirdeğe translokasyonu gerçekleşir ve

parçalanır. Endonükleaz-G (ENDO-G) ise DNA 'yı parçalar. Mitokondri çeperlerinde oluşan porlardan salınan sitokrom c Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin de ortama katılmasıyla sitozolde Apoptozom adı verilen bir kompleks oluşturur (Strasser ve ark.,2000; Adams ve Cory, 2001; Adrain ve Martin, 2001). Apoptozomun en önemli işlevi Kaspaz-9 'u keserek aktifleştirmesidir. Kaspaz-9' da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline dönüştürür. Aktif hale gelen kaspaz-3 ise inaktif Kaspaz aktive edici DNaz (CAD)' ı inaktif hale getirerek serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın da nukleozomal alt birimler şeklinde fragmente olmasını sağlar (Palmer ve ark., 2000; Smaili ve ark.,2000; Adams ve Cory, 2001).

2.9.2.2. Ekstrinsik Yol

Hücre yüzeyinde bulunan Fas, TNFR, DR5 ölüm reseptörlerinin ölüm sinyalleri olan FasL, TNF-alfa, TRAIL ile bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik özellik kazanan bu reseptörler adaptör molekülleri ve prokaspazlarla birleşerek Death inducing signaling complex (DISC) halinde bir yapı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumda yer alan prokaspaz-8'in hem uzun kolu hemde kısa kolu kesilerek öncülü olan aktif haldeki kaspaz-8 oluşumu sağlanır. Aktif halde bulunan kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olarak farklı 2 yolla kaspaz-3 'ün aktivasyonunu gerçekleştirir. Ya direkt olarak kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da dolaylı yoldan Bid'i keserek instrinsik yolda kaspaz-9' u aktive ettikten sonra kaspaz-3 'ü aktive eder. Dolaylı yoldan ya da direkt gerçekleşen bu mekanizmada aktif olan kaspaz-3 CAD aktivasyonu göstererek DNA fragmentasyonuna neden olur (Adams ve Cory,200; Curtin ve Cotter, 2003; Spierings ve ark.,2004).

2.9.3. İmplantasyon ve Apoptozis

Omurgalı yaşam döngüsünde dokuların şekillenmesi, gastrulasyon, nörulasyon dönemlerinde, tümör gelişiminde, ayak perdelerinin şekillenmesinde ve preimplantasyon döneminde embriyoda ilk boşlukların oluşmasında apoptozisin çok önemli bir yeri olduğu saptanmıştır (Parr ve Parr, 1989; Kamijo ve ark., 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalarda büyüme hormonlarıyla beraber bazı sitokinlerin , hücre için ölme veya yaşama sinyali göndererek apoptozu kontrol ettiği saptanmıştır.Örneğin; IGF-1, IGF-2 ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein olan IGFBP'nin menstrual siklus boyunca endometriumun gelişimi ve implantasyon aşaması boyunca

önemli etkileri vardır (Giudice ve ark., 1998; Duc-Goiranr ve ark.,1999). Lökemia İnhibitör faktör (LIF) fare endometriumunda implantasyon sırasında üretilmektedir. Bu türler için LIF'in salgılanması oldukça önemlidir. Endometriyal LIF'in laminin reseptörleri integrinleri eksprese eden sitototroblastın aktivitesini engelleyerek trofoblast invazyonunu kontrol edebileceği düşünülmektedir (Bischof ve Campana, 1995; Duc-Goiranr ve ark.,1999; Sunder ve Lenton, 2000). Blastosist dönemindeki embriyo, gelişim sırasında birçok dejeneratif değişiklik gösterir. Başlangıçta iç hücre kitlesi görülür ve bu hücrelerin de yaklaşık % 10'u komşu hücreler ya da trofoblastlar tarafından fagosite edilerek emilir. Embriyonik hayatta apoptozisin görüldüğü bir başka alan ise uterus epitelidir. Uterus hücreleri menstrual siklus , blastosist implantasyonu ve desidualizasyon sırasında apoptozis oldukça etkili role sahiptir. Menstrual siklus esnasında salınan progesteron ve östrojen, luminal epitel ve glandular epitel hücrelerinde proliferasyon göstererek apoptosize ve farklılaşmaya neden olur.

İmplantasyon penceresi döneminde apoptozis, uterus glandular hücrelerinde görülmekte ve böylece endometriyal desidualizasyon oluşumuna katılmaktadır. Desidualizasyon dönemindeki apoptozisin bax genindeki artış ve bcl-2 genindeki azalma ile gerçekleştiği her iki genin salınımı ile de kontrol edildiği bilinmektedir. Bax geninin apoptozis oluşumundan çok daha evvel salındığı ve bu sayede bcl-2 için hücrelerin hayatta kalmasını sağlayan sinyallerin oluşumunu inhibe ederek endometriyal hücrelerde apoptozisi gerçekleştirdiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Parr ve Parr, 1989; Galan ve ark., 2000). İmplantasyon ve apoptozisi düzenleyen bazı faktörlerin ortak olması, aynı faktörlerin her iki olayda da etkili olduklarını ve sağlam bir embriyo oluşumu için kontrolü sağladıklarını göstermektedir (Parr ve Parr, 1989; Kamijo ve ark., 1998).

2.10. Uterus ve Hücre Ölümü

2.10.1. Uterus Epitelinde Hücre Ölümü

Duvar trofoblastlarına bakan lümen epitel hücrelerinin, adezyon fazı sırasında bazal laminalarından ayrıldıkları, sıçanlarda ve farelerde yapılan çalışmalarla uzun zaman önce bildirilmiştir (Lawn, 1969; Potts, 1969; Enders ve Schlafke, 1967). Bu süreç trofoblastların bazal membran ile doğrudan temas haline geçmesiyle sonuçlanır. Epitelyal astarın ortadan kalkmasıyla implantasyon alanı altında yer alan anti-mezometrial alan olarak devam eder. Bu süreçle ilgili elektron mikroskopuyla yapılan

çalışmalarda, implantasyon bölgelerinin lateral kenarları boyunca dejenerasyon hücrelerinin yuvarlandığı ve bunların sitoplazmik yapılarının ve organellerinin orta düzeyde değişiklik gösterdiği savunulmaktadır (Enders ve Schlafke,1967). Kalan uterus lümeninde hücrenel enkaz görülebilir, ancak çoğu dejenere olmuş hücreler hemen trofoblastlar tarafından tutularak uzaklaştırılır. Işık ve elektron mikroskopuyla yapılan çalışmalara dayanan ek gözlemlerde, fare uterusunun anti-mezometriyal alanında üç fazlı bir diziyi ortaya çıkarmıştır. İlk olarak, az sayıda epitelyal hücreler, nükleer bozulma belirtileri göstermeye başlarken (kromatoplazma), yoğun asit fosfataz açısından zengin lizozomal vakuoller içeren canlı epitel hücreleri ise bu izole dejenere olmuş hücrelerin yanında görünür. Dejenerasyon daha sonra otofajik vakuoller (autophagosomes) olarak tanımlanan sitoplazmik cisimler içeren çoğu epitelyal hücrelerle kaplı tüm anti-mezometriyal alanlara uzanır. Endoplazmik retikulum ve golgi veziküllerinin şişmesi, nükleer sınırlar boyunca kromatin birikmesi ve nükleer parçalanma bu hücrelerin ileri evre dejenerasyona uğramasıyla gözlenir (El-Shershaby ve Hinchliffe, 1975). Sıçan implantasyonu alanlarının daha sonralarda yapılan çalışmalarında, hücrenel büzölme ve kromatin değişiklikleri söz konusudur (Parr ve ark.,1987). Sıçan implantasyon bölgelerine bitişik olan desidual hücreler, çapraz bağlama reaksiyonlarını katalize eden ve aktivasyonu apoptosis ile ilişkili olan bir enzim olan doku transglütaminazı için de kuvvetli bir şekilde pozitiflik gösterir (Piacentini ve Autuori, 1994). Trofoblast fagositoz denilen olay, epitelyal hücrelerin önemli ölçüde bozulmaya uğramasından sonra başlar, bu da epitelin parçalanmasının esas olarak bir i otolitik mekanizmanın sonucu olduğunu gösterir (Finn ve Bredl, 1973). Gebelik ilerledikçe epitel dejenerasyonu implantasyon odasının mezometriyal tarafına uzanır. Anti-mezometriyal bölgedeki dejeneratif epitelyal hücrelerin aksine, ikinci hücre kümesi, rezidüel uterus lümeni geniş yapışık hücrelerin serilmesi ile karakterize edilir (Welsh ve Enders, 1991). Mesometriyal zonda hücre ölümü gerçekleşeceği zaman trofoblastlar, implantasyon alanının o bölgesine ulaşacak kadar genişlemeden çok daha önce başlamıştır. Epitelyal hücre ölümünün son aşaması, kalan uterus lümenini çevreleyen astar kısmında meydana gelir. Burada meydana gelen hücre ölümü dalgası, çok sayıda subepitelyal stromanın istilası ile çakışır ve bazal membran ile temas halindedir (Welsh, 1993).

2.10.2. Uterin Desiduada Hücre Ölümü

Plasental ünitenin genişlemesine uyum sağlamak için, desidual inisiyasyon süreci, primer ve sekonder desidual bölgeleri üreten stromal transformasyon evresini takip eder. Farelerde, piknotik çekirdekli küçük desidual hücreler ilk önce trofoblastlara yakın iç desidual tabakada görülür (Katz ve Abrahamson,1981). Daha sonra, ölüm hücreleri (nükleer kromatin agregasyonu ve mitokondriyal distansiyon) arttıkça, perifere doğru ilerler (Katz ve Abrahamson, 1987). Sıçanlarda, hücre dejenerasyonu, embriyonun hemen bitişiğinde de görülür ve daha sonra anti-mezometriyal bölge boyunca yayılır (Bulmer ve Dickson, 1961, Welsh ve Enders, 1985). Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde gerileyen desidual hücrelerin, otolitik aktiviteye katıldığı ve eliminasyonlarının trofoblastik fagositoz ile kolaylaştırıldığı gösterilmiştir (Katz ve Abrahamson, 1987).

2.11. TCF Proteini (T cell factor)

Ekstravillous trofoblastlar (EVT'ler) insan plasenta oluşumunda önemli bir rol oynar ve bu nedenle başarılı gebelik sonucunda kritik bir etkidir. Katenin bozunma inhibisyonu sitozolik birikimi, nükleer alımını ve lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü 1'e (LEF1)/T-hücre faktörü (TCF) familyası transkripsiyon faktörlerine bağlanmayı uyarır (Willert ve Jones, 2006; Hoppler ve Kavanagh, 2007). Uyarılmamış hücrelerde, LEF / TCF, Groucho (Grg)/transdusine benzer ayrı (TLE) familyanın (TLE) proteinleri gibi farklı ortak represörler ile birlikte transkripsiyon inhibitörleri olarak görev yapar (Buscariet ve Stifani, 2007). Bununla birlikte, Wnt aktivasyonu üzerine, bu represörler, LEF/TCF için aktivasyon alanı sağlayarak, beta-katenin ile değiştirilir. Komplekslere farklı koaktivatörlerin (Pygopus [Pygo]; B-hücreli lenfoma 9) eklenmesi üzerine, aktif LEF/TCF hücre proliferasyonu ve invazyonunda rol alan hedef genlerin ekspresyonunu indükler, örneğin siklin D1, c-jun, Avian myelocytomatosis virüsü onkojen hücresel homolog ve MMP'ler (Willert ve Jones, 2006). EVT'lerin oluşumu, aynı zamanda, trofoblast motilitesinde ve/veya farklılaşmasında faktörün eşsiz rolünü ortaya koyan, TCF-4'ün çok sentezlenmesi ile de ilişkilendirilmiştir (Pollheimer, ve ark., 2006). Bununla birlikte, rekombinant Wnt ile *in vitro* stimülasyon, trofoblastlarda ve diğer hücrelerde kanonik olmayan sinyal yollarını da aktive edebilir (Yun ve ark., 2005; Sonderegger ve ark., 2010). Bu sebeple, kanonik Wnt sinyalizasyonunu ve EVT'lerdeki kritik düzenleyicileri daha iyi tanımlamak için, küçük interferans RNA'sı (siRNA) aracılı gen susturulmasını kullanılarak TCF-4'ün spesifik rolü analiz edilebilir Buradan

çıkan sonuçlar, TCF-4'ün trofoblast motilitesini ve integrin 1 (ITGA1) ve ITGA5 gibi promigratör genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bilgisini verebilir. TCF-4 ile yapılan immünofloresan çalışmalar, ilk trimesterdeki plasental dokulardaki çekirdek baskılayıcıları ve aktivatörleri ve erken plasental dokuların immünofloresan çalışmaları, EVT oluşumu üzerine kanonik Wnt yolağının transkripsiyonel bileşenlerinin induksiyonu olduğunu ortaya çıkarmıştır. TCF3 ve TCF-4 ler nonproliferatif fazlarda negatif EVT'lerde oldukça fazla miktardadır. Bununla beraber EVT oluşumu, diğer hücrelerde Wnt / TCF'nin bir hedef geni olarak tarif edilen transkripsiyon faktörü Snail1 ekspresyonu ile de ilişkilendirilmiştir (Yook ve ark., 2006; Ten Berge ve ark., 2008). Diğer gelişmekte olan dokulara benzer şekilde, kanonik ve aynı zamanda kanonik olmayan Wnt sinyal yolları, uterus traktüsünün evrimi, blastosist aktivasyonu, implantasyon, desidualizasyon ve plasental gelişim de dahil olmak üzere farelerin reproduktif süreçlerine kritik olarak dahil edilir (Sonderegger ve ark., 2010; Knöfler ve Pollheimer, 2013).

2.11.1. TCF7L2 (TCF4) Proteini

TCF7L2 olarak tanımlanan TCF4, (İnsan T-hücre transkripsiyon faktörü-4) gen bir transkripsiyon faktörü olan TCF-4'ü kodlamak üzere programlanmıştır. TCF grubuna ait proteinler, bir DNA-bağlanma bölgesi olan yüksek mobiliteli grup (high mobility group-box- HMG-box) içeren transkripsiyon faktörleri ailesindedir (Florez , 2007; Weedon, 2007; Tong ve ark., 2009) ve en önemli özelliği beta-kateninin Armadillo tekrarlarına bağlanmalarıdır (Willert ve Jones, 2006). TCF ve LEF-1 proteinleri ilk olarak T-hücre genlerini aktive eden transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmışlardır (Behrens ve ark.,1996). Memelilerde 4 farklı T hücre transkripsiyon faktörü vardır (Jin, 2008). Bunlar;

1. TCF7 [TCF-1],
2. Lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü [LEF-1],
3. TCF7L1 [TCF-3]
4. TCF7L2 [TCF-4]

Bu TCF proteinleri HMG bölgeleri ile doğrudan DNA'ya bağlanırlar, fakat gen ifadesini aktive etme özelliğine sahip değildirler, daha çok DNA sarmalını bükülmeye yönlendiren yapısal transkripsiyon faktörleri olarak görev alırlar (Kikuchi ve ark., 2006).

TCF7L2 mRNA'sı, proteinin farklı sayıdaki izoformlarını oluşturan ve alternatif kesim sonucu oluşan ekspresyon durumuna göre protein aktivitesini değiştiren ve farklı efektörlerin bağlanabildiği bazı özel bölgeler içerir (Gostner ve ark 2011). TCF4 proteini, β -katenin bağlanma bölgesi (CTNNB1), DNA-bağlanma bölgesi (HMG kutusu) ve birçok izoformda değişken olan bir C-terminal bölgesi olmak üzere 3 temel bölgeye sahiptir. Sadece uzun okuma çerçeveli form COOH-terminal bağlanma proteini (CtPB)'ne bağlanabilir, bu yüzden C-terminal önemli bir düzenleyici fonksiyona sahiptir. CtBP varlığı TCF7L2'nin repressör fonksiyonu için çok önemlidir (Shiina ve ark., 2003; Shulewitz ve ark., 2006).

Wnt ligand eksikliğinde TCF4, Groucho/TLE, karboksi uca bağlanan protein (CtBP) ve HMG-kutusu transkripsiyon faktörü-1 (HBP1) gibi bazı korepresörler ile doğrudan bağlantı kurarak hedef genlerin transkripsiyonunu baskılayan bir represör gibi davranır. Son olarak Wnt sinyalizasyonu aktive olduğunda, β -katenin TCF/LEF'e Armodilla uçtan bağlanır, baskılayıcıların yerine geçer ve TCF7L2'yi bir transkripsiyonel aktivatör haline getirir (Widelitz, 2005; Kikuchi ve ark.,2006). Öncül promotörlerinde TCF/LEF bağlanma bölgelerini taşıyan ve transkripsiyonu β -katenin-TCF/LEF tarafından aktive edilen 75 farklı gen yer almaktadır. Bu genler c-myc, Siklin D1, siamois, MMP7, twin, fral, gastrin, c-jun, PPAR γ , CD44 ve ürokinaz-tip plasminojen aktivator reseptör gibi genlerdir (Polakis, 2000, Kolligs ve ark., 2002; Widelitz, 2005).

2.11.2.TCF7L2 Geni

TCF7L2 (TCF4) geni 10. kromozomun q25.3 bölgesinde yerleşmiştir ve 215.9 kb büyüklüğünde geniş bir alana yayılmıştır (Damcott ve ark., 2006).

İnsan TCF7L2 geni 14 ekzon ve 13 intron bölgesine sahiptir (Duval ve ark.,2000). İnsan T hücre transkripsiyon faktörü 4 (hTCF4-human TCF4) geninin genomik yapısını açığa çıkarmak için kolorektal kanser hücrelerinde yaptıkları çalışmada TCF7L2 geninin 5'i alternatif olmak üzere toplamda 17 ekzonunun bulunduğunu belirlemişlerdir. TCF faktörleri TCF ailesi üyelerinin aktivitesinin transkripsiyonel baskılanmasına aracılık ederek gerekli bir korepresör protein olan CtBP ile fonksiyonel olarak COOH- terminal bağlanma bölgeleri yoluyla etkileşime girerler. Duval ve ark (2000), çalışma sonuçlarına göre TCF7L2 geninin 17 ekzonundan 5'i olan ekzon 4, 13, 14, 15 ve 16'nın alternatif ekzonlar olabileceğini ve ekzon 9, 16 ve 17'de kullanılan 3 alternatif kesim alıcı bölgesinin TCF4 mRNA transkriptlerini oldukça karmaşık hale getiren teorik

olarak 256 farklı kesim ürününün oluşmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. TCF7L2 tarafından kodlanan TCF4 proteini, CTNNB1 (β -katenin) için bir nükleer reseptör gibi davranır. Wnt sinyal yolağında anahtar bir rol oynar (Florez, 2007; Weedon, 2007). Wnt sinyal mekanizması hücre çoğalması, motilite ve normal embriyogenez (hücre farklılaşması) için oldukça önemlidir. Miyogenez ve adipogenezisi düzenlediği bildirilmiştir (Ross ve ark., 2000; Etheridge ve ark., 2004).Çekirdekte TCF7L2'nin beta -katenine bağlanması, siklin D1 gibi β -hücre çoğalmasında görev almış hedef genlerin transkripsiyonunu indüklemesiyle önemlidir. Siklin D1, β -hücre proliferasyonunun en kilit belirleyicilerindedir (Lyssenko, 2008).

2.12.LEF Proteini (Lenfoid Artırıcı Faktör)

Yüksek Mobilite Grubunun (HMG) kutu transkripsiyon faktörleri olan Lenfoid Artırıcı Faktör (LEF)/TCF familyası, Wnt proteinleri, salgılanan hücrelerde hücre akibetini, polariteyi ve büyüme değişimlerini salgılayan ligandlar tarafından yönlendirilen gelişimsel bir sinyalizasyon yolağında işlev görmektedir (Cavollo ve ark.,1998). Hücre yüzeyindeki trans-membran reseptörleri ile Wnt ligandının tanınması, normal olarak kararsız armadillo tekrar protein beta-kateninini stabilize eden ve onu çekirdeğe yeniden yönlendiren bir sinyalizasyon kaskadı başlatır (Roose ve ark.,1998). Çekirdekte, dört memeli LEF/TCF proteininin herhangi biri Wnt-tetikli nükleer beta-katenin proteinine sıkı sıkıya bağlanabilir ve tek HMG DNA bağlanma alanları aracılığıyla, Wnt hedef genlere beta-katenindeki güçlü transkripsiyon aktivasyon alanını etkileyebilir. Wnt sinyalizasyonu olmadığında, bazı LEF/TCF faktörlerinin, ortak represörlerin dahil edilmesi aracılığıyla aktif gen susturulmasıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (Brown ve Moon, 1998; Cavollo ve ark.,1998; Roose ve ark.,1998; Brannon ve ark.,1999). Mevcut çalışmaların çoğunda, Wnt sinyalizasyonunda spesifik LEF/TCF proteinlerinin işlevine odaklanılmıştır, fakat çok azında, alternatif izoformların tam olarak tamamlanma biçimlerinin ve ifade biçimlerinin sinyalizasyonu nasıl etkilediğini anlamaya yönlendirme yapılmaktadır. Embriyogenez sırasında Wnt sinyalizasyonu, doku farklılaşmasının sayısız bölgesinde meydana gelir ve bu, LEF/TCF proteinlerinin ekspresyon modelinde yansıtılır. Bilinen dört memeli LEF/TCF proteininin (LEF-1, TCF-1, TCF-3 ve TCF-4) her biri için embriyonik ekspresyon paternleri, farklı fakat geniş, örtüşen dağılımlar göstermektedir (Oosterwegel ve ark.,1993; van Genderen ve ark.,1994; Kratochwil ve ark.,1996; Korinek ve ark.,1998). LEF/TCF faktörlerinin her biri farelerde genetik olarak inaktive edilmiştir ve bu nakavtlardan kaynaklanan

fenotipler her bir faktör için benzersizdir (van Genderen ve ark., 1994; Verbeek ve ark.,1995; Korinek ve ark.,1998; Galceran ve ark.,1999). Sadece embriyonik LEF/TCF'yi eksprese eden dokuların bir alt kümesi, nakavt farelerde eksik veya hasarlıdır, bu da LEF/TCF proteinleri arasındaki ekspresyon ve fonksiyonel fazlalığın mutlak seviyesini göstermektedir. Doğum sonrasındaki saatlerde, geniş LEF/TCF ekspresyonu yok olur ve fare dokularının northern blot analizi ile sadece çok sınırlı LEF /TCF mRNA paternleri tespit edilebilir (Oosterwegel ve ark.,1993). Örneğin, hem LEF-1 hem de TCF-1 mRNA, timusta kolaylıkla tespit edilir, ancak başka herhangi bir dokuda çok az mRNA saptanabilir (Travis ve ark.,1991; Van de Wetering ve ark.,1991; Waterman ve ark.,1991). LEF/ TCF Wnt yolağının, beta-katenin de-regülasyonuna yol açan genetik mutasyonlara bağlı ektopik ve konstitütif aktivasyonudur. Böylelikle, beta-katenin çekirdekte bol ve yapısal olarak aktif bir ko-aktivatör haline gelir ve eğer bir LEF/TCF faktörü varsa, gen hedeflerinin ve hücre transformasyonunun uygunsuz aktivasyonu mümkündür (Roose ve ark.,1999).

2.13. Wnt Sinyalizasyonun Nükleer Araçları Olarak LEF-1/TCF Proteinleri

LEF ve TCF köken olarak 5'CTTTGWW 3' (W'nin A veya T'yi gösterdiği yerde) nükleotid sekansını tespit eden lenfoid spesifik DNA-bağlayıcı proteinler olarak tanımlanmıştır (Travis ve ark.,1991; van de Wetering ve ark.,1991; Waterman ve ark.,1991). Bu proteinler ve diğer iki murin homologu TCF-3 ve -4 DNA sarmalında keskin bir bükülmeyi indükleyen yüksek hareketlilik grubu (HMG) alanı olarak adlandırılan, hemen hemen aynı DNA bağlanma bölgesini paylaşırlar (Giese ve ark.,1992; Love ve ark., 1995). Ne LEF-1 ne de TCF-1 tipik transkripsiyonel aktivatörler gibi davranmaz, çünkü multimerize LEF-1 / TCF bağlanma bölgeleri içeren sentetik bir güçlendiriciden transkripsiyonu stimüle edemezler (van de Wetering ve ark.,1996; Hsu ve ark., 1998). T hücre reseptörü (TCR) α arttırıcı bağlamında, LEF-1'in transaktivasyon yeteneği, LEF-1 / TCF bağlanma bölgesini çevreleyen protein bağlama bölgelerine ait spesifik düzenlemeye ve doluluğa bağlıdır (Giese ve ark.,1995). Beta-katenin, LEF-1 / TCF'nin amino hedefleri ile etkileştiğinde, yine de, bu proteinler transkripsiyonu diğer DNA bağlayıcı proteinlerin spesifik bir bağlamından bağımsız olarak aktive edebilirler (Behrens ve ark.,1996; Huber ve ark.,1996; Molenaar ve ark.,1996; van de Wetering ve ark.,1997; Hsu ve ark.,1998). Çeşitli çalışmalar, Wnt sinyallerinin aşağı akım efektörleri olarak LEF-1/TCF proteinlerine ait rolü desteklemektedir. İlk olarak, DNA'yı bağlayan fakat β -katenini bağlamayan dominant

negatif LEF-1 / TCF formları, β -katenin veya Wnt aracılı sinyalizasyona engel olabilir (Molenaar ve ark.,1996; Brannon ve ark.,1997; van de Wetering ve ark.,1997; Dorsky ve ark.,1998; Kengaku ve ark.,1998). İkinci olarak, *Drosophila*'da dTCF / Pangolin fonksiyon kaybı mutantlarının genetik analizi, Wg yoluyla sinyalizasyonun aşağı yönlü etkilerinin dTCF'ye dayandığını göstermektedir (Brunner ve ark.,1997; Van de Wetering ve ark.,1997). Omurgalılarda, Wnt sinyalizasyonunda LEF-1/TCF proteinleri için bir role ait genetik kanıtın, gelişmekte olan fare embriyosunda farklı fakat üst üste olan şekillerde ifade edilen bu transkripsiyon faktörlerinin fazlalığı nedeniyle muhtemelen elde edilmesi daha zor olmuştur (Oosterwegel ve ark.,1993; Korinek ve ark.,1998). Farelerde bireysel Lef1/Tcf genlerinin mutasyonu, bilinen Wnt mutasyonlarının neden olduğu fenotiplerden herhangi birine benzeyen fenotipler üretmemektedir; bunlar arasında mezoderm farklılaşması, böbrek gelişimi ile ekstremiteler ve plasenta oluşumundaki eksiklikler yer almaktadır (Thomas ve ark.,1991; Stark ve ark.,1994; Parr ve McMahon, 1995; Takada ve ark., 1994; Monkley ve ark.,1996). Lef1 geninin hedeflenen mutasyonu, saç folikülleri, meme bezleri ve dişler dahil olmak üzere çoklu organların gelişmesine engel olurken (Van Genderen ve ark.,1994), Tcf1 mutasyonu T hücresi farklılaşmasını bozmaktadır (Verbeek ve ark.,1995).

2.14. LEF-1/TCF Proteinlerinin Negatif Düzenleyicileri

Wnt/Wg sinyali ve β -katenin stabilizasyonu yoksa LEF-1/TCF proteinleri transkripsiyonu aktif şekilde baskılayabilir. Bu, Wnt/Wg sinyali olmadığında, mutasyonlu LEF-1/TCF bağlanma bölgelerini taşıyan Ubx ve Siamois transkripsiyonel kontrol elemanlarının ortaya koyan *Drosophila* ve *Xenopus*'daki deneylerden çıkarılmıştır (Brannon ve ark.,1997; Riese ve ark.,1997; Bienz, 1998). Çeşitli çalışmalar, LEF-1/TCF proteinleri ile Hairy, Engrailed ve Dorsal gibi çeşitli DNA bağlayıcı proteinler ile etkileşime giren transkripsiyonel ortak bir baskılayıcı olan Groucho arasında genetik ve biyokimyasal etkileşimleri ortaya koymuştur (Cavallo ve ark.,1998; Fisher ve Caudy, 1998; Levanon ve ark.,1998; Roose ve ark.,1998). Ayrıca Groucho, AML-1 (akut miyeloid lösemi faktörü 1) dahil olmak üzere, TCR α arttırıcıda LEF-1 ile işbirliği yapan bir protein olan Runt domaini aile proteinleri ile etkileşime girer (Hsu ve ark.,1998; Levanon ve ark.,1998). Groucho, TCF beta-katenin bağlanma bölgesinden ayrı olan bir insan TCF-1 bölgesini bağlar. Groucho'nun transkripsiyonu baskıladığı mekanizma, histon H3 ile etkileşim yoluyla baskılanan kromatin alımını da kapsayabilir (Palaparti ve ark.,1997).

CREB c-Fos ve NF- κ B'nin (Shikama ve ark.,1997) de dahil olduğu çoklu faktörler tarafından alınan iyi incelenmiş bir transkripsiyonel ko-aktivatör CREB / p300, LEF-1 / TCF proteinlerinin ortak bir baskısı için başka bir adaydır. CREB c-Fos ve NF- κ B gibi çoklu faktörler tarafından iyi incelenmiş bir transkripsiyonel ko-aktivatör olan CREB/p300, LEF-1/TCF proteinlerinin ortak baskılayıcısı için başka bir adaydır. CBP, dTCF'nin DNA-bağlanma bölgesine bağlanır ve in vitro olarak dTCF'nin β -katenin bağlanma bölgesinde bir lizin tortusunu asetilleyebilir (Waltzer ve Bienz., 1998). Armadillo'nun dTCF'ye bağlanması asetilasyonu bloke etse bile, bu protein modifikasyonu sadece dTCF ve Armadillo arasındaki etkileşimi hafif olarak azaltmaktadır (Munshi ve ark.,1998).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen vücut ağırlığı yaklaşık 200-220 gram arasında değişen 8 haftalık Wistar albino cinsi 10 adet erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan 02.02.2017 tarih ve 65202830/10 sayılı onay belgesi (EK-1) alınmıştır.

Deney Grupları

Grup-1: Çalışmada kullanılan hayvanlar oda ısısında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyotlar sağlanarak gebelik oluşturulmayan normal östrus siklusunun sağlandığı gruptur. Normal östrus siklusuna girdiği kabul edilen hayvanlara 5. günden sonraki 1., 2., 3. ve 4. günlerde (diöstrus, proöstrus, östrus, metaöstrus) ve hergün için 1 hayvan olmak üzere 3mg/kg Xylazine HCL+ 90mg/kg Ketamine HCL intraperitoneal yolla verilerek anestezi altında uygun yöntemlerle uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

Grup-2: Çalışmada kullanılan hayvanlar oda ısısında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık periyotlar sağlanarak normal östrus siklusunun sağlandığı ve gebelik oluşturulacak olan hayvan grubudur. Östrus siklusları vajinal smear ile belirlendi. Östrus evresinde olan dişi sıçanlar gebelik oluşması için erkek sıçanların kafeslerine alındı. Ertesi gün vajinal plak oluşumuna bakılarak vajinal plak görülen sıçanlar gebe kabul edilip ayrı kafeslere alındı. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 1. günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlara, gebeliğin 7., 8. ve 9. günlerinde hergün için 2 hayvan olmak üzere 3mg/kg Xylazine HCL+ 90mg/kg Ketamine HCL intraperitoneal yolla verilerek anestezi altında uygun yöntemlerle uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

Ölüm sonrası alınan uterus dokularına KASPAZ-9, LEF ve TCF proteinlerini göstermek amacıyla immünofloresan incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı.

Mikroskopik değerlendirme için alınan kesitler, Olympus BX51 (Japan) marka mikroskopta değerlendirilip, uygun alanlardan fotoğraflar çekildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar:

- ❖ Doku takip cihazı (Leica, Germany)
- ❖ Gömme fırını (MKN Taab, UK)
- ❖ Ben mari (Leica, Germany)
- ❖ Mikrotom (Leica, Germany)
- ❖ pH Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- ❖ Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- ❖ Floresan Mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- ❖ Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- ❖ Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)
- ❖ Mikropipetler- 10ul, 20ul, 200ul ve 1000ul- (Gilson, USA)
- ❖ Santrifüj
- ❖ Thermal cycler
- ❖ Nanodrop
- ❖ Elektroforez (Thermo Fischer, Germany)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Sarf Malzemeler:

- ❖ Antikorlar
 - Primer antikorlar;
 - CASPASE-9 (96.1.23): sc-.56076.,
 - TCF7L2 ab76151 Abcam.,
 - LEF-1 Boster.,
 - Wnt7a (E-9): sc-365665 S. Cruz Bio.,
 - Wnt3 (D-9): sc-74537 S. Cruz Bio.,
 - β -katenin (E-5): sc-7963 S. Cruz Bio
 - Sekonder antikorlar;
 - Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flour 647): ab150115 Abcam
 - Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flour 568): ab175473 Abcam
 - Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Flour 488): ab150077 Abcam
- ❖ SuperBlock (Sky Tech Lab, USA)
- ❖ DAPI (Sigma, USA)
- ❖ Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- ❖ Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)

- ❖ Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- ❖ EDTA (Sigma, USA)
- ❖ Formaldehit (Merck, Germany)
- ❖ Sodyum dihidrojen fosfat (Merck, Germany)
- ❖ Di sodyum hidrojen fosfat (Merck, Germany)
- ❖ Paraformaldehit (Merck, Germany)
- ❖ Triton X-100 (Biotech, Canada)
- ❖ Hidrojen peroksit (Sigma, USA)
- ❖ BSA(Bovine Serum Albumine) (CapriCorn Scientific, USA)
- ❖ Tris EDTA Buffer (Ambion, USA)
- ❖ Entellan (Merck, Germany)
- ❖ Sodyum sitrat (Merck, Germany)
- ❖ Etil alkol
- ❖ RNAlater (Qiagen, Germany)
- ❖ Antibody Diluent Reagent (Invitrogen, USA)

3.4. Kullanılan Çözeltiler ve Tamponlar:

i. % 10'lük Tamponlanmış Nötral Formalin (pH: 7.0)

- ❖ Formaldehit 100cc
- ❖ Distile Su 900cc
- ❖ NaH_2PO_4 4g
- ❖ Na_2HPO_4 6.5g

ii. %4'lük Paraformaldehit (pH 7.4)

- ❖ Distile Su 850ml
- ❖ Paraformaldehit 40gr
- ❖ 10N NaOH 0.1ml
- ❖ 10X PBS Stock 100ml

iii. Yıkama Çözeltisi

- ❖ 1000 ml PBS içinde 1ml Triton X-100 çözünerek hazırlandı.

3.5. Doku Preparasyonu

Ötenazi sonrasında alınan uterus dokuları %10'lük tamponlanmış nötral formalinde en az 48 saat ve %4'lük paraformaldehitte +4 derecede 24 saat süre ile fikse edildi. Doku

takip cihazı ile artan dereceli etanol ile dehidrasyon yapıldıktan sonra ksilolle şeffaflandırılıp parafin içinde bloklandı.

3.6. Işık Mikroskopi:

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica marka mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitlere genel morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilin-eozin boyama uygulaması yapıldı ve Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskopi ile uygun görüntüler alındı.

3.7. İmmunofloresan Boyama Protokolü:

Parafine gömülen doku örneklerinden alınan 3-4 µm'lik seri kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra aşağıda belirtilen işlem basamakları uygulandı.

- Ksilolde deparafinizasyon
- %100'lük alkol..... 2' dk
- %100'lük alkol..... 2' dk
- %95'lik alkol..... 2' dk
- %80'lik alkol..... 2' dk
- %70'lik alkol..... 2' dk
- Distile su 5 dk yıkandı.
- Mikrodalga fırında 2 defa 5'er dakika sırasıyla maksimum güçte ve 550W'da 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH=6) içerisinde epitoplara açığa çıkarılması gerçekleştirildi.
- Pappen (Daido Sangyo Co., Ltd. Tokyo, Japan) ile örneklerin etrafı çizildi.
- Kesitler yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 2 kez 3'dk yıkandı.
- Kesitlerin immünoglobulinin nonspesifik taşınmasını engellemek için SuperBlock (Sky Tech Lab, USA) çözeltisinde oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. (Serum Bloklama)
- Kesitler primer antikorlarla +4 derecede nemli karanlık ortamda gece boyu inkübe edildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları seyreltme oranları; KASPAZ-9 (1:100), LEF-1 (1:100), TCF7L2 (1:100), Wnt-7a (1:100), Wnt-3 (1:100), β-katenin (1:100). Bütün primer antikorlar pH=7.4 olan antibody diluent reagent (Invitrogen, USA) çözeltisi ile sulandırıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 4 kez 3'er dakika yıkandı.

- Sekonder antikor (Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flour 647): ab150115 abcam, Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flour 568): ab175473 abcam ve Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Flour 488): ab150077 abcam) oda ısısında 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 4 kez 3'er dakika yıkandı.
- 0.5 ug/ml DAPI (Sigma, USA) ile oda ısısında 10 dk çekirdek boyaması yapıldı.
- Yıkama çözeltisinde (PBS-Triton X-100) 5 dakika yıkandı.
- Kapatma medyumuyla kapatma yapıldı.

3.8. Semikantitatif Skorlama Yöntemi:

Peri-implantasyon periyotlarında uterus dokularında görüntülenen KASPAZ-9, LEF-1 ve TCF7L2 ekspresyonlarının şiddeti semikantitatif skorlama yöntemi ile belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi. Bütün kesitler birbirinden bağımsız iki gözlemci tarafından incelenerek, uterus dokusunda KASPAZ-9, LEF-1 ve TCF7L2 antikorlarının ekspresyon derecelerine göre; ekspresyon yoksa negatif (-), hafif derecede ekspresyon varsa (+), orta derecede boyanma olmuş ise (++), yoğun derecede ekspresyon olmuş ise (+++) boyanma olarak uterus dokuları değerlendirildi.

3.9. Real Time-PZR Uygulamaları

Oluşturulan kontrol ve deney grubundan alınan uterus dokuları ötenazi sonrası çift taraflı kesilerek açıldı ve endometrium dokusu zarar görmeden kazındı. Kazınan örnekler RNAlater içerisine konulduktan sonra -20°C'de bekletildi KASPASE-9, LEF-1 ve TCF7L2, Wnt3, Wnt7a ve β -katenin proteinlerinin ekspresyonlarının belirlenmesi için RNA izolasyon kiti (RNeasy Mini Kit, İnvitrogen) kullanılarak total RNA eldesi gerçekleştirildi. Bu proteinlerden elde edilen RNA'lardan cDNA kiti (Superscript II RT, Thermo Fisher Scientific) kullanılarak cDNA'lar elde edildi ve bu proteinlerin ekspresyonu relatif kantitasyon kullanılarak Real-Time-PCR yöntemiyle belirlendi. PCR amplifikasyonu Biorad CFX Connect cihazıyla uyumlu Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada housekeeping gen (GAPDH) iç kontrol olarak kullanıldı. Elde edilen ct değerleri (cycle treshold, RFU (relative frequency of unit)/cycle)), referans GAPDH geni baz alınarak karşılaştırıldı.

3.9.1. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu için İnvitrogen RNeasy Mini Kit kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak olan malzemeler otoklavlanmış ve daha sonra UV Crosslinker'da

sterilize edilmiştir. Sterilize edilen malzemeler ayrıca DEPC (Dietilpirokarbonat) içeren suyla yıkanmış ve olası RNaz kontaminasyonu engellenmiştir. Buz içerisine konulmak şartıyla alınmış olan dokuların bulunduğu ependorf tüpler -20°C 'den alınarak çalışma ortamına konulmuştur.

- 7ml Lizis buffer ve 70 μl β -merkaptoetanol homojenizasyon tamponu hazırlandı.
- Hazırlanan tampondan 600 μl dokuların olduğu ependorf tüplere aktarıldı.
- Daha sonra örnekler homojenizasyon makinesinde??? edildi.
- Örnekler 26,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant temiz bir RNaz içermeyen tüpe aktarıldı.
- ~700 μl %70'lik etanol eklendi.
- Kolon tüplere ~700 μl örnek aktarıldı.
- Oda sıcaklığında 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı ve aynı toplama tüpleri kolon tüplere yeniden yerleştirildi.
- Bütün lizat hacmi işleme tabi tutulana kadar tekrarlandı.
- Kolon tüplere 700 μl Wash Buffer I eklendi.
- Oda sıcaklığında 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı ve kolon tüplere yeni bir toplama tüpü yerleştirildi.
- Kolon tüplere 500 μl Wash Buffer II eklendi.
- 12,000 x g'de 15 sn santrifüj edildi.
- Bütün yıkama hacmi işleme tabi tutulana kadar tekrarlandı.
- Kolon tüplerin merkezine 30-100 μl RNaz içermeyen su eklendi.
- Oda sıcaklığında ~12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi.

Total RNA izolasyonu sonrasında μl 'sinde kaç nanogram RNA olduğunu saptamak için nanodrop cihazında ölçüm gerçekleştirilmiş ve konsantrasyon tayinleri yapılmıştır. İzole RNA'lar -80°C 'de muhafaza edilmek üzere saklanmıştır. RNA'dan cDNA sentezi için İnvitrogen firmasının Superscript II RT ile ReverseTranskriptaz PZR kiti kullanılarak RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. cDNA Eldesi

Çoğunlukla gen ifadesi çalışmaları için gerçekleştirilen RT-PZR, genellikle RNA virüslerinden elde edilen Reverse Transkriptaz enzimi kullanılarak ortamda var olan RNA moleküllerini komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürmeyi amaçlamaktadır.

Ayrıca real-time PZR ile kombine bir şekilde floresan işaretli boyalar kullanılarak kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapılması ile gen ifade düzeyi çalışmalarında da sıklıkla kullanılmaktadır. Uygulama basamakları aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

Protokol:

Bileşen		Hacim (µL)
Gene Özgü Primer (GSP) (2 pmol)	→	1 µL
1 ng-5 µg total RNA	→	5 µL
dNTP karışımı (her birinden 10mM)	→	1 µL

Son hacim ddH₂O ile 12µL'ye tamamlanmıştır.

- a) Karışım 65°C'de 5 dk inkübe edilip hemen buz üstüne alınmıştır.
- b) 4 µL 5x First Strand Buffer ve 2 µL 0,1M DTT eklenmiştir ve karışım dikkatli bir şekilde karıştırılarak 42°C'de 2 dk inkübe edilmiştir.
- c) 1 µL (200 ünite) Superscript II RT eklenip karıştırılmış ve son hacim 20 µL'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.
- d) 42°C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- e) Reaksiyonu durdurmak ve enzimi inaktive edebilmek için 70°C'de 15 dk reaksiyon karışımı bekletilmiştir.
- f) RT-PZR'nin başarılı olup olmadığını ölçmek için genin ekzon dizilerinden tasarlanan primerler ile standart PZR yapılmıştır.

3.9.3. Primerler

Gerçek zamanlı kantitatif PZR nükleik asitlerin miktarlarının belirlenmesinde günümüzde kullanılan bir metottur. "Real-time PZR"da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle anlaşılır ve amplifikasyonun devir sayısı belirli miktardaki DNA moleküllerinin elde edilmesi açısından da gereklidir. Bu çalışmada floresan boya olarak SYBRGreen kullanıldı. Real-Time PZR tekniğinin sorunsuz çalışabilmesi için uygun primer seçimi oldukça önemlidir. Primerlerin cDNA'ya özgül olarak bağlanması ve primer-dimer ya da özgül olmayan amplikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Bu çalışmada kendi hazırladığımız primerler kullanılmıştır. Gen ekspresyonları incelenen genlere ait özgül primerlerin dizisi, T_m değeri, erişim numaraları ve dizi yerleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Real-Time PZR yönteminde kullanılan primerler ve erişim numaraları

Gen	Primer dizisi (5'→3')	Uzunluk (bp)	T _m Değeri	T _A Değeri	Erişim No	Dizi Yeri
Wnt3 Forward	AGTCTCGTGGCTGGGTGGA	19	61.6	56.7	XM_006246487	922-940
Wnt3 Reverse	TTGGGCTCGCAGAAGTTAGG	20	60.5			1011-1030
Wnt7a Forward	GGGACTATGACCCGAAAGC	20	62.5	58	NM_001100473	251-270
Wnt7a Reverse	GGATCTTGTTACAGATGATGCTC	23	60.9			358-380
β katenin Forward	AGCTTCCAGACACGCCATCAT	21	61.2	58	XM_008766691	1350-1370
β katenin Reverse	CGGTACAACGGGCTGTTTCTAC	22	64.2			1426-1447
Cas-9- Forward	AGCCAGATGCTGTCCATAC	20	60.5	57.6	AY027667	1077-1096
Cas-9- Reverse	CAAGGTCTCGATGTACCAGGAA	22	62.1		AY027667	1219-1240
LEF1- Forward	AATGAGGGCGAATGTCGTAG	20	58.4	58	XM_006233309	1682-1701
Lef-1- Reverse	GCTGTCTTTCTTTCCGCGCTA	21	61.2		XM_006233309	1798-1818
Tcf7l2/tcf4 -Forward	ACCTTCATCACGTACAGCA	20	58.4	50	NM_001191052	1075-1094
Tcf7l2/tcf4 -Referse	GGATGGGGGATTTGCCTAC	20	60.5			1220-1239
GAPDH Forward	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	20	62.5	58	NM_017008.4	1-20
GAPDH Reverse	GCCAAATCCGTTACACCCG	19	59.5			87-105

3.9.4. Standart PZR Uygulamaları

Real-Time PZR'de uygun T_A değerlerinin saptanması standart PZR ile belirlenmiştir. Her bir gen bölgesine ait PZR reaksiyonu sırasında primer bağlanma (annealing) sıcaklığı (T_A), her bir primerin T_M değerlerinden hareket edilerek hesaplanmıştır. Bu aşamada öncelikli olarak her bir primer çifti için tahmin edilen T_M değerlerinden ortalama 3-4°C altına inilmiş ve bu sıcaklığa $\pm 4^\circ\text{C}$ 'lik bir gradiyent uygulanmıştır. Buna göre tüm primerler 50-58°C aralığında gradiyente tabî tutulmuştur.

Tüm standart PZR reaksiyonları 50 μL son hacimde hazırlanmıştır. 50 μL 'lik reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Hannover, MD), 5 μL 10^\times reaksiyon tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, %0,8 Nonidet P-40), primer çiftlerinden her birinden 10 pmol (Macrogen), 0,25 mM her bir dNTP (MBI Fermentas), 3 mM MgCl_2 , 1,2 M betain, %0,1'lik TritonX-100 ve 100-500 ng kalıp DNA eklenmiştir. Standart PZR uygulamaları aşağıdaki koşullar altından gerçekleştirilmiştir:

Başlangıç denatürasyonu:	94°C'de 3 dk
-35 döngü	
Denatürasyon:	94°C'de 45 sn
Bağlanma:	50-58°C'de 30 sn
Uzama:	72°C'de 45 sn
Son uzama:	72°C'de 10 dk
Son sıcaklık:	12°C

Her bir primerin uygun T_A değeri Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

3.9.5. Real-Time PZR

Real-time PZR, oluşan ürüne bağlanan ürüne ışınım veren raportöre gereksinim duyar. Raportör oluşan ürün miktarını yansıtan floresan sinyal oluşturur. PZR döngüleri sonucunda oluşan kısa sekanslara Amplikon adı verilir. Başlangıç Real-Time PZR döngülerinde sinyal zayıftır. Sinyalin güçlenmesi amplikonların artışı ile olur. Sinyalin eşik seviyeye ulaşması için gereken döngü sayısına CT (threshold cycle= eşik değer döngü) adı verilir. Amplifikasyon cevap eğrileri Ct değeri aşıldıktan sonra logaritmik olarak artar (Kubista vd. 2006). Bizim çalışmamızda kullandığımız raportör ise GAPDH'tir.

Kontrol ve deney gurplarından elde edilen total RNA'lardan sentezlenen cDNA örneklerinin kantitatif analizi için SYBER Green I boyasının floresan ışığa özelliği kullanılarak real-time PCR gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Biorad CFX Connect

cihazıyla uyumlu Sso Advanced Universal SYBR Green Supermix kullanılmıştır. Standart PZR'da olumlu sonuç alınmış primerler ve rapörtör gen olarak da GAPDH geni primerleri kullanılmıştır.

İçerik; antibody-mediated hot-start Sso7d-fusion polimeraz, referans boyalar, dNTPs, MgCl₂, SYBR Green I boyası, enhancer, stabilizatör. Tüm bileşenler eritilerek oda sıcaklığına getirilir,

Karıştırılıp santifüjlenir. Işıktan korunarak buzda saklanır. Önerilen şekilde PZR hazırlanır.

Bileşen	20 µl için	10 µl için	Final Konsantrasyon
Süpermix(2x)	10 µl	5 µl	1x
OligoF	1 µl	0,5 µl	250-500 nM
OligoR	1 µl	0,5 µl	260-500 nM
Template	1,5-2 µl	1 µl	cDNA: 100ng-100 fg
Nükleaz içermeyen su	-	-	
Total hacim	20 µl	10 µl	

• Master mixin karıştırılıp homojenize olduğundan emin olunur. Her tüpe oligolardan eşit miktarda dağıtılır.

• DNA ve gerekirse su eklenir ve tüpler filmle kapatılır. 30 sn vorteksleyip santrifüjlenir.

• Program kurulur, PCR tüpü yüklenir ve program başlatılır.

Polimeraz aktivasyonu ve DNA denatürasyonu: cDNA için 95-98 °C'de 30 sn

Amplifikasyon için denatürasyon: 95-98 °C'de 5-15 sn

45-50 döngü

Bağlanma : T_A'da 15-30 sn

Real-time PZR'da genel olarak anlamlı floresan işaret kaçınıcı döngüden itibaren sayaçlar tarafından algılanabiliyorsa o değer üzerinden kalitatif olarak hedef nükleotid dizisinin miktarı hakkında yorum yapma imkanı oluşur. Reaksiyon sonrası elde edilen ct (cycle treshold, RFU (relative frequency of unit/cycle) değerlerinin yorumlanması şu

şekildedir; Ct değeri 18-24 arasında ise reaksiyon oldukça başarılıdır, örnek içerisinde hedef nükleotid dizisi oldukça fazla; ct değeri 24-30 arasında ise reaksiyon başarılıdır, hedef nükleotid dizisi orta seviyede mevcut, ct değeri 30-34 arasında ise reaksiyon az da olsa başarılıdır, örnek içerisinde hedef nükleotid dizisi az; ct değeri 34 ve yukarısında ise reaksiyon başarılı sayılmaz, ortamda herhangi bir kontaminasyon ya da çok az miktarda hedef nükleotid dizisi vardır (Schmittgen ve Livak, 2008). Ct değerleri üzerinden $2^{\Delta\Delta ct}$ değeri hesaplanmıştır. Buradaki amaç, genlerin ifade düzeylerinin nispi artış ya da azalışının belirlenmesidir.



4. BULGULAR

Bu çalışmada, gebeliğin 7, 8 ve 9. günlerinde sıçan endometriyumunda, Wnt sinyal yolağının hücre ölümü, hücre transkripsiyonu ve hücre taşınımının tespit edilmesi amacıyla iki deney grubu oluşturulmuştur. Birinci grup östrus siklus takip edilen sıçanlardan (5 adet hayvan), ikinci grup ise gebelik oluşturulan sıçanlardan (7 adet hayvan) teşkil edilmiştir.

4.1. Östrus Siklusu (1. Grup)

Gebelik oluşturulmayan hayvanlardan oluşan bu grupta östrus siklusu, histolojik bulgular esas alınarak, 4 temel evrede (diöstrus, proöstrus, östrus ve metaöstrus) incelenmiştir. Rutin protokoller takip edilerek hazırlanan preparatlar, birinci aşamada hematoksilin-eozin ile boyanmış ve ardından ışık mikroskobu altında incelenmiştir. İkinci aşamada ise preparatlara Wnt 3, Wnt 7a, beta-katenin, kaspaz 9, LEF-1 ve TCF antikollarını içeren immünfloresan boyalar uygulanmış ve Wnt sinyal moleküllerinin perimetrial-miyometrial bağ dokusu, miyometrium, uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma, endometrial bazal stroma ve kan damarlarındaki immünlokalizasyon düzeyleri immünfloresan mikroskop altında incelenmiştir.

4.1.1.Östrus Siklusu (Hematoksilen-Eozin)

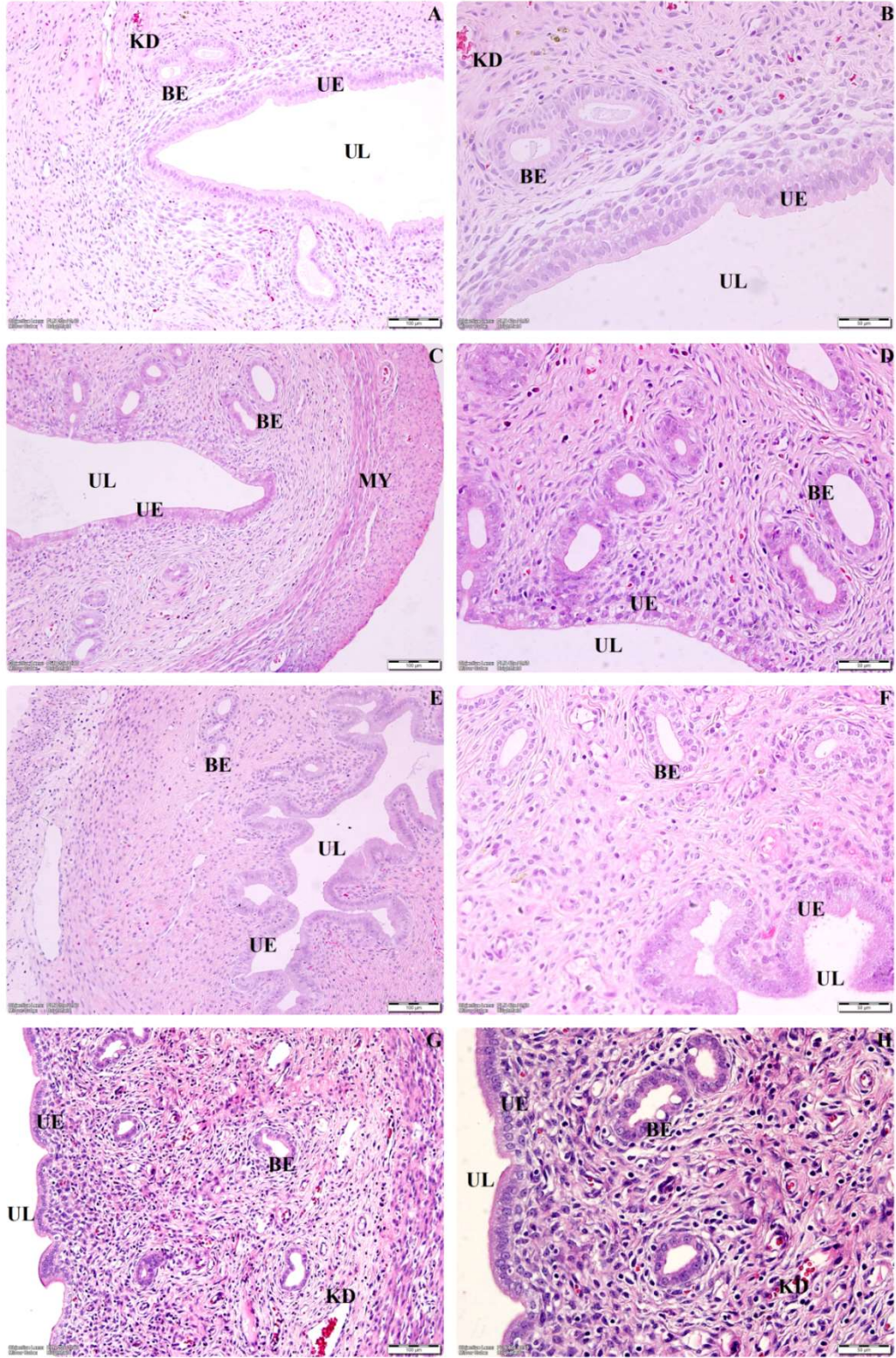
Proöstrus evresi; lümen içerisinin sıvıyla dolu olduğu gözlenmiştir. Tek katlı prizmatik hücrelerden oluşan epitel hücrelerinde, mitotik aktivitenin devam ettiği tespit edilmiştir. İlerleyen süreçte, prizmatik hücrelerin boyutlarının kademeli olarak artış gösterdiği ve tek katlı yüksek prizmatik hücrelere dönüştüğü izlenmiştir. Proöstrus evresinde dejenerasyona rastlanılmazken, mukozada seyrek halde birkaç lökosit kayd edilmiştir. Endometriyal bezler hipertrofik olup, vaskülarizasyon ve ödem artışı oldukça belirgin düzeye erişmiştir. Ayrıca fazla miktarda çekirdekli epitelyal hücre sayılmıştır (Şekil 4.1 G, H).

Östrus evresi; ışık mikroskobu incelemelerinde, uterus lümen şişkinliğinin maksimum seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. Bunun yanında, kümeler halinde yerleşim gösteren uterus epitel hücrelerinde büyüklük açısından belirgin bir farklılık saptanmıştır. Östrus evresindeki uterus preparatlarında lökositlere rastlanılmamıştır. (Şekil 4.1.E-F).

Metaöstrus evresi; luminal epitel ve bezler vakuolar dejenerasyonlar devam ederken, mitotik aktivitenin tekrar başladığı görülmüştür. Ayrıca metöstrusta baskın lökositler izlenmiştir. Kan damarları ve bez epitelinde azalma görülmüştür (Şekil 4.1. C, D).

Diöstrus evresi; uterus, kübik-prizmatik şekilli epitel hücrelerine sahiptir. Bu evrede uterusun lümeninin genişlediği gözlenmiştir. Diöstrustaki uterus, epitel hücreleri, atrofik ve çökmüş (kollabe) özelliklere sahiptir. Endometriyal bezlerde seyrek dejeneratif hücreler gözlenirken, stroma bölgesinde stromal ödem saptanmıştır. Endometriyal rejenerasyonun yeniden başladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.1 A, B).





Şekil 4.1. Östrus siklusu evreleri: G-H proöstrus, E-F östrus, C-D metaöstrus, A-B diöstrus UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, L: lökosit, KD: kan damarı.

4.1.2. Östrus siklusu evrelerinde Wnt sinyal yolağı moleküllerinin (Wnt 3, Wnt 7a, beta-katenin, kaspaz 9, LEF-1 ve TCF) ekspresyonu

4.1.2.1. Proöstrus

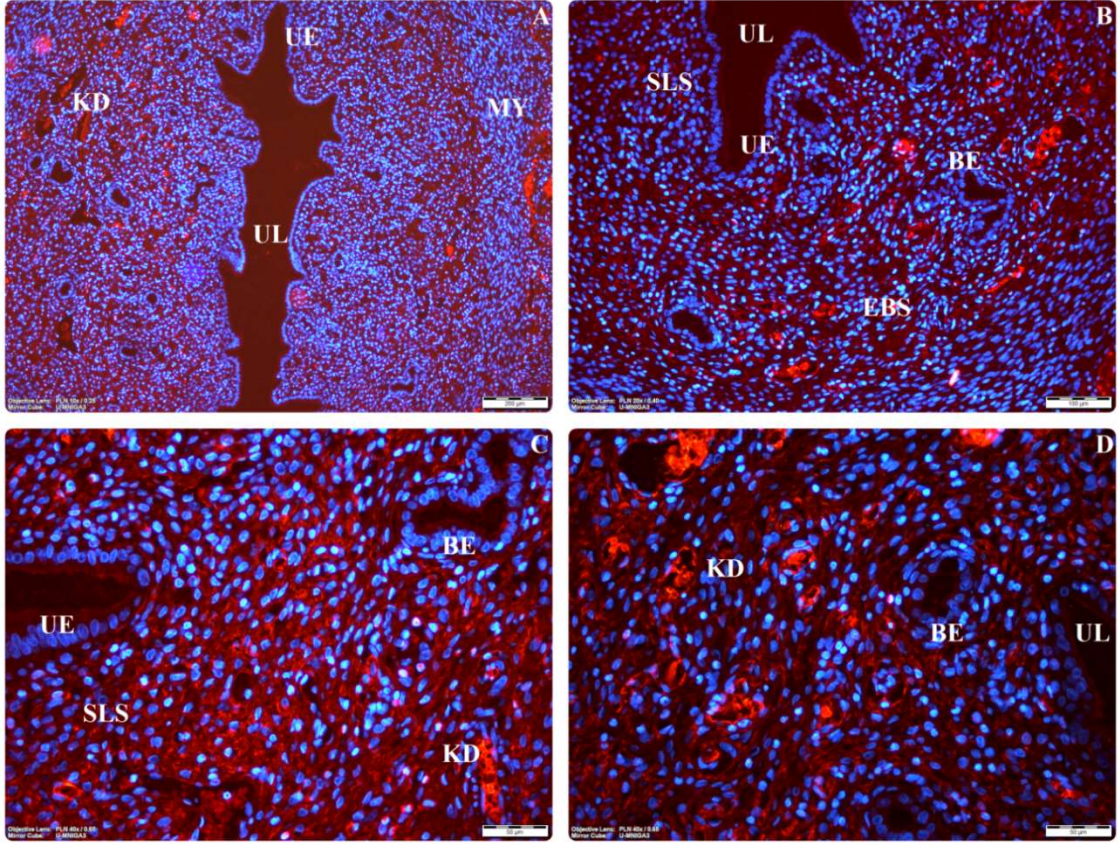
Tablo 4.1’de östrus siklusunun 1. evresini oluşturan proöstrus evresinde, Wnt sinyal yolağı moleküllerinin lokalizasyon kuvvetleri gösterilmiştir.

Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9 ve LEF-1 molekülleri perimetrial-miyometrial bağ doku ve miyometriumda her hangi bir etkileşim göstermemiştir. Endometriumda en fazla (3 alanda) çok kuvvetli immünlokalizasyon (++++) gösteren molekül ise beta-katenindir. Beta-katenin uterus epiteli, bez epiteli ve endometrial bazal stromada çok kuvvetli eksprese olmuştur. Endometrial bazal stroma, en fazla molekülün (Wnt-3, beta-katenin, ve kaspaz-9) lokalize olduğu doku niteliğindedir. Üç molekül de endometrial bazal stromada çok kuvvetli etkileşim meydana getirmiştir. TCF molekülü, tüm sinyal molekülleri arasında, 6 alanda da eksprese olan tek moleküldür. Molekülün lokalizasyon kuvveti zayıftan (+) kuvvetliye (+++) kadar değişim göstermiştir (Tablo 4.1; Şekil 4.2-7).

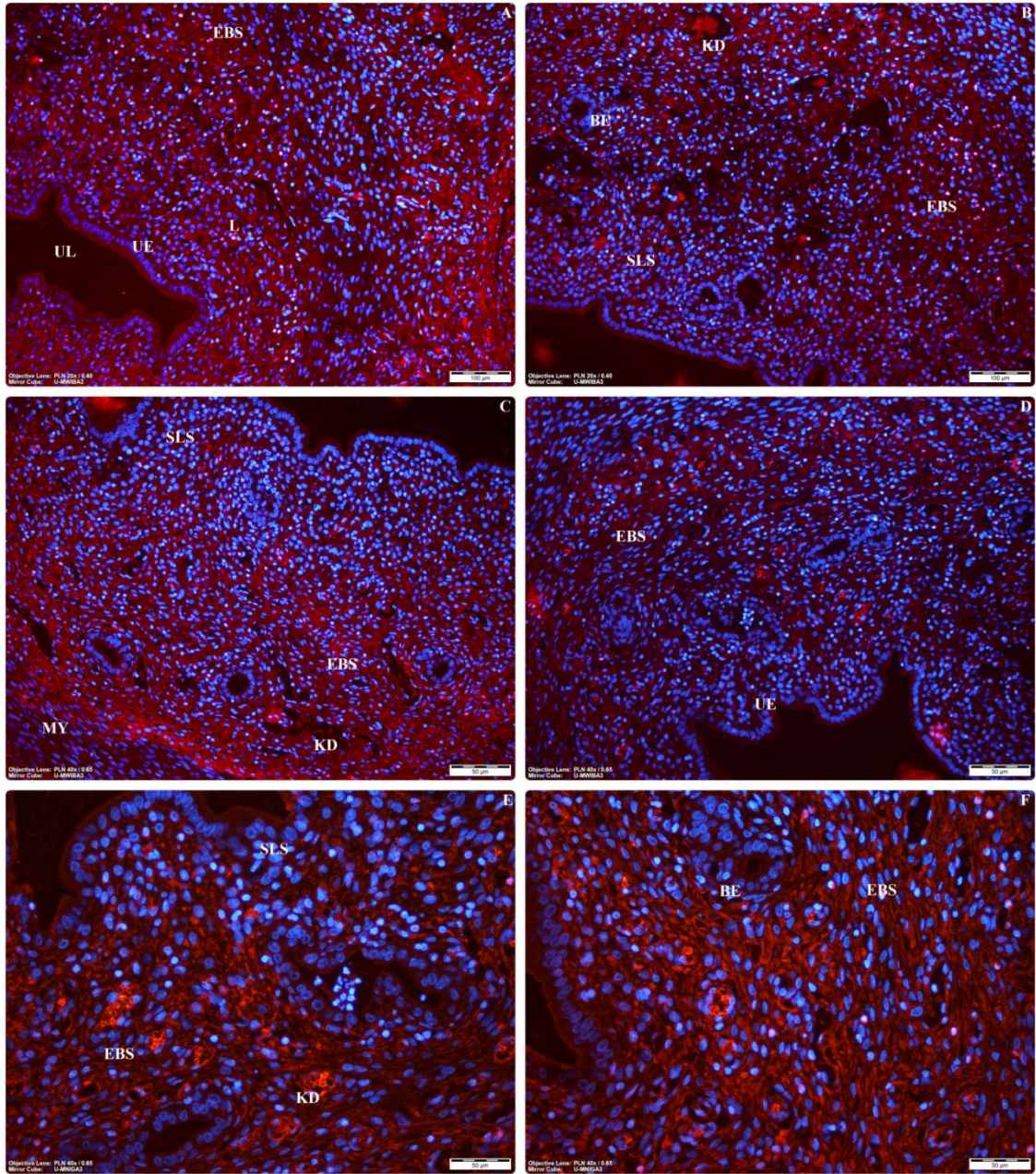
Tablo 4.1. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri

PROÖSTRUS	PMB	MY	ENDOMETRİUM				
			UE	BE	STROMA		KD
					SLS	EBS	
Wnt-3	-	-	+	+	++++	++++	+++
Wnt-7a	-	-	++	+	+++	+++	+++
Beta-katenin	-	-	++++	++++	+++	++++	+++
Kaspaz-9	-	-	++	++	+++	++++	+++
LEF-1	-	-	++	++	+	+	++
TCF	+++	+	+	+	+	++	++

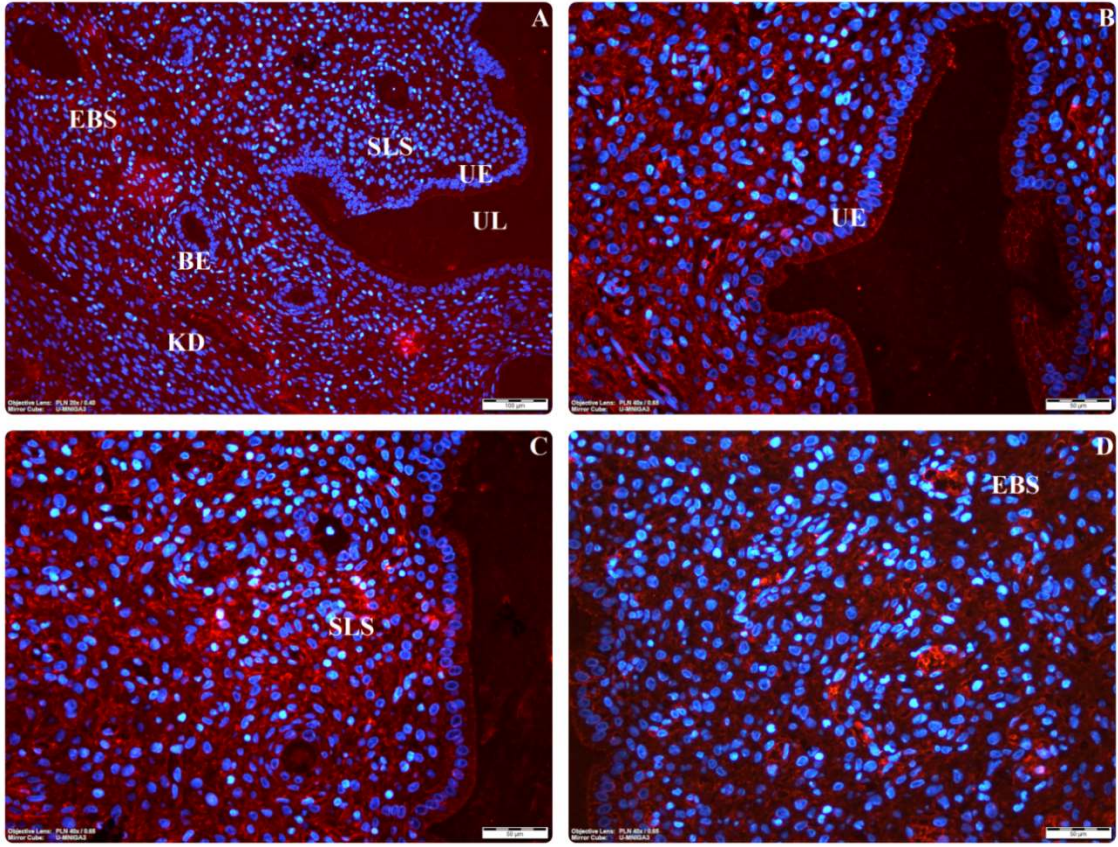
PMB: perimetrial-miyometrial bağ doku; MY: miyometrium; UE: uterus epiteli; BE: bez epiteli; SLS: subluminal stroma; EBS: endometrial bazal stroma; KD: kan damarı; (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



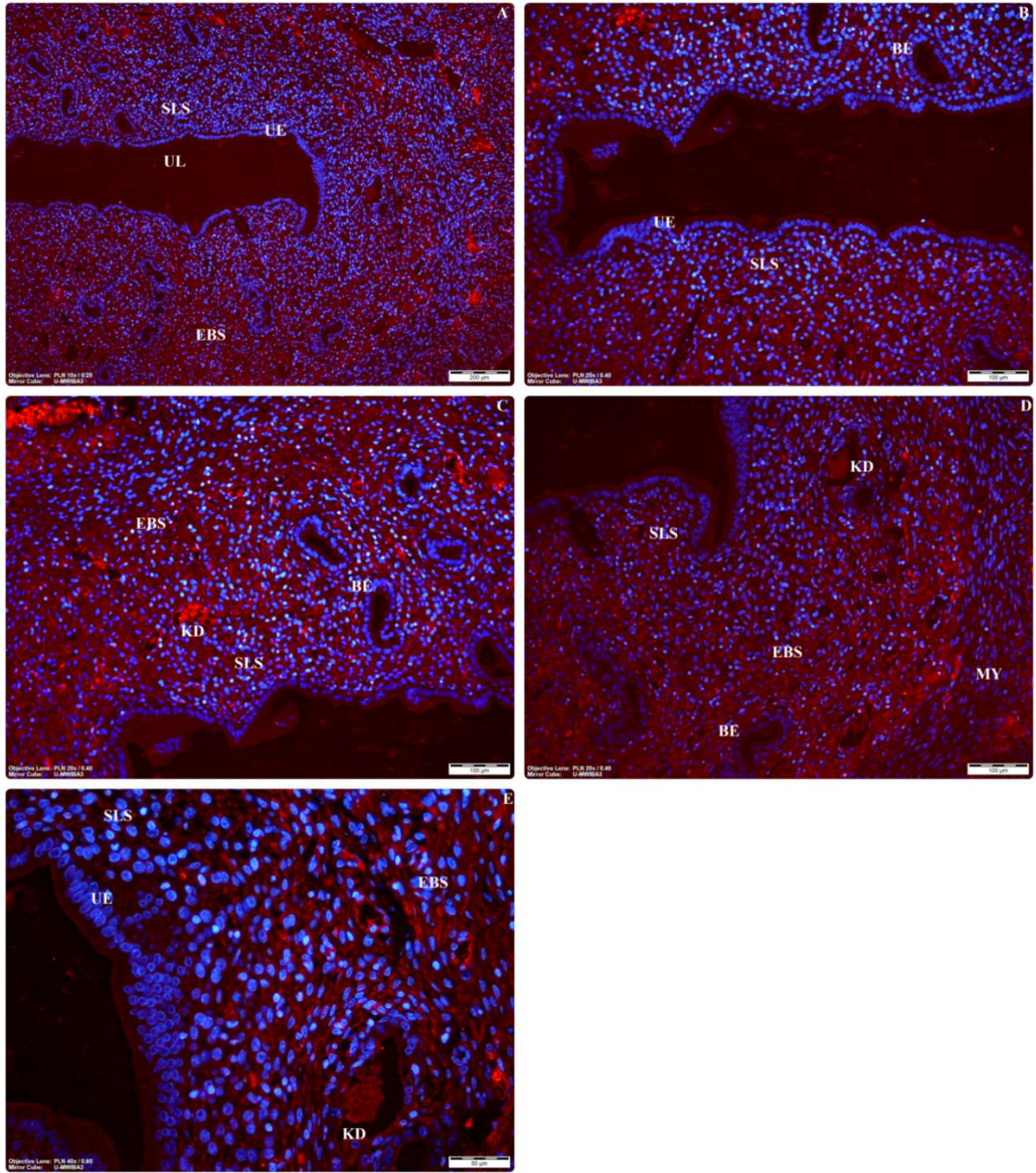
Şekil 4.2. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt-3'ün immünlökalisasyonları. (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı, MY: miyometrium.



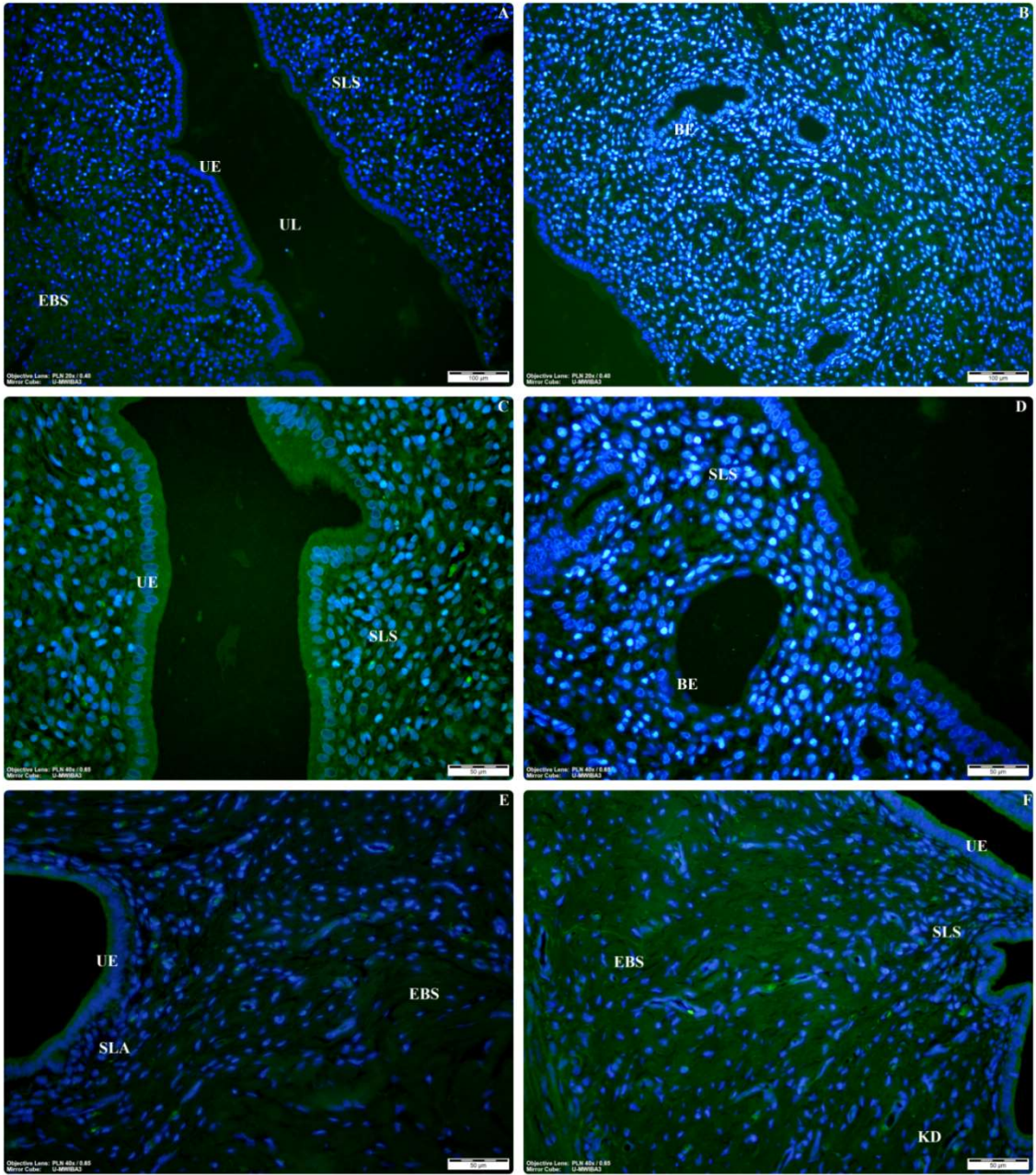
Şekil 4.3. Östrus siklusu proöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-F) uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı..



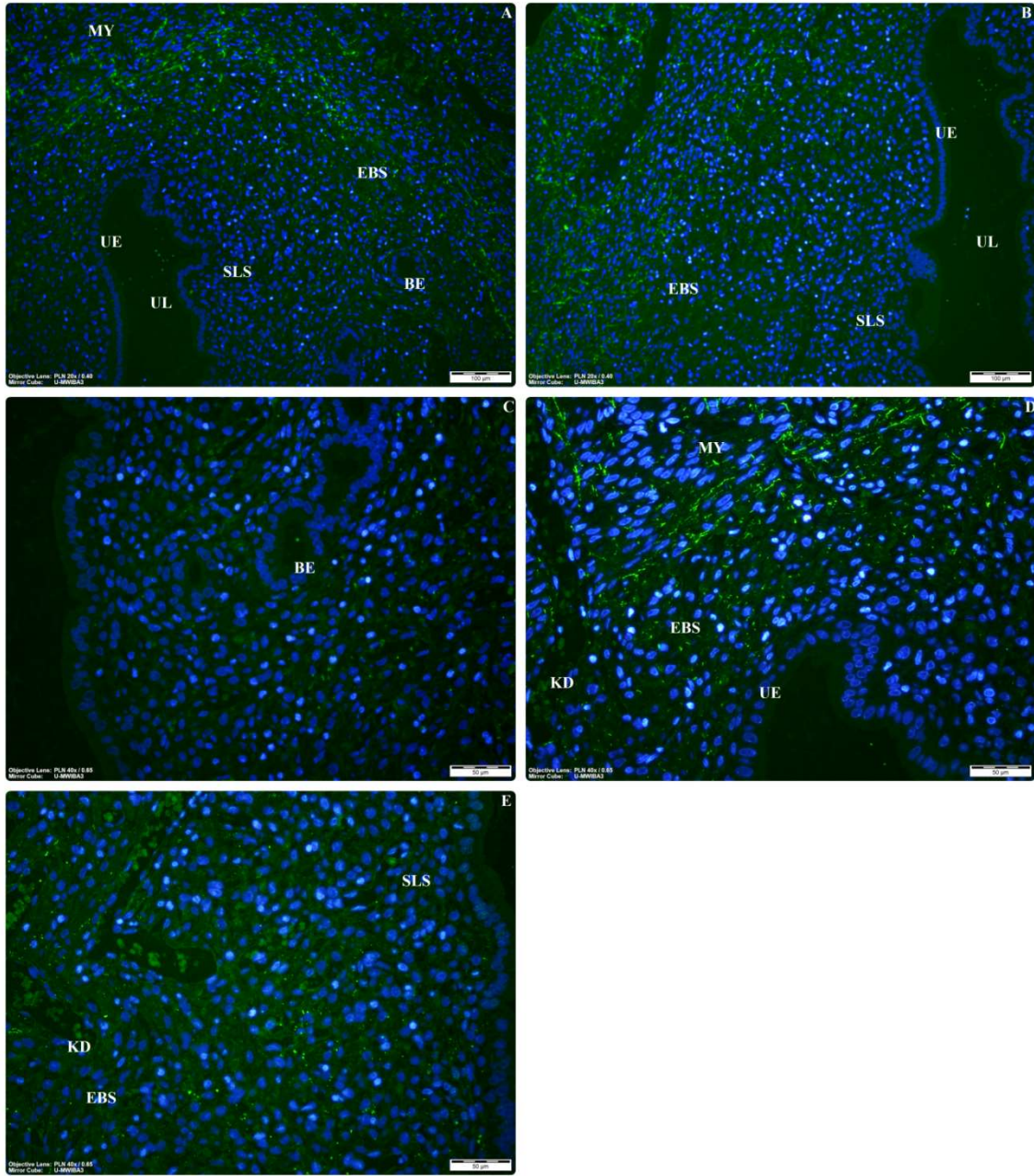
Şekil 4.4. Östrus siklusu proöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.5. Östrus siklusu proöstrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları (A-E)
 UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.6. Östrus siklusu proöstrus evresinde LEF'in immünlokalizasyonları (A-F) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.7. Östrus siklusu proöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları (A-E)
 UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı, MY: miyometrium.

4.1.2.2. Östrus

Östrus siklusunun meta ve diöstrus evrelerinde olduğu gibi, siklusun 3. evresini oluşturan östrus evresinde de, Wnt sinyal yolağı moleküllerinin perimetrial-miyometrial bağ dokusu, miyometrium, uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma, endometrial bazal stroma ve kan damarlarındaki lokalizasyon durumları deneysel olarak test

edilmiştir. Her bir molekülün belirtilen doku, organ ve yapılardaki tutunma dereceleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Wnt-3; östrus siklusunun östrus evresinde molekül, perimetrial-miyometrial bağ dokusunda ve miyometriumda herhangi bir etkileşim göstermemiştir (Tablo 4.2). Bununla birlikte subluminal stroma, endometriyal bazal stroma ve kan damarlarında Wnt-3’ün maksimum düzeyde tutunduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4.8; A-D).

Wnt-7a; molekülünün, östrus evresindeki immünlokalizasyon düzeyleri Wnt-3 ile benzerlik göstermektedir; perimetrial-miyometrial bağ dokusunda ve miyometriumda lokalize olmazken, endometriyal bazal stroma ve kan damarlarındaki tutunumu çok kuvvetlidir (Şekil 4.9; A-D). Wnt-7a, uterus epiteli ile bez epiteli hücreleri ve hücre sınırlarında ise çok zayıf ekspresyon göstermiştir.

Beta-katenin; Wnt sinyal yolağı moleküllerinden beta-katenin, östrus evresinde en fazla immünlokalizasyon gösteren molekül niteliğindedir (Tablo 4.2). Molekülün ekspresyon derecesi, endometriumun hemen hemen bütün alanlarında, özellikle uterus epiteli ve bez epitelinde, hücre sınırları da dahil olmak üzere çok kuvvetli iken, subluminal stroma ve kan damarlarında kuvvetlidir. Beta-katenin de Wnt-3 ve Wnt-7a molekülleri gibi, hem perimetrial-miyometrial bağ dokusunda ve hem de miyometriumda immünlokalizasyon göstermemiştir (Şekil 4.10; A-D). İncelenen preparatların belirli alanlarında lökosit hücreleri tespit edilmiştir. Ayrıca, endotel kapiller boyunca beta-kateninin orta kuvvetli eksprese olduğu gözlenmiştir.

Kaspaz-9; Tablo 4.3’de Wnt-3, Wnt-7a ve beta-katenin molekülleri gibi kaspaz-9’unda perimetrial-miyometrial bağ dokusunda ve miyometriumda lokalize olmadığı görülmektedir. Bununla birlikte molekül üç farklı noktada (uterus epiteli, endometrial bazal stroma ve kan damarı) çok kuvvetli immünlokalizasyona sahiptir (Şekil 4.11; A-D). Uterus epitel hücre sınırlarının belirgin olduğu kayıt edilmiştir.

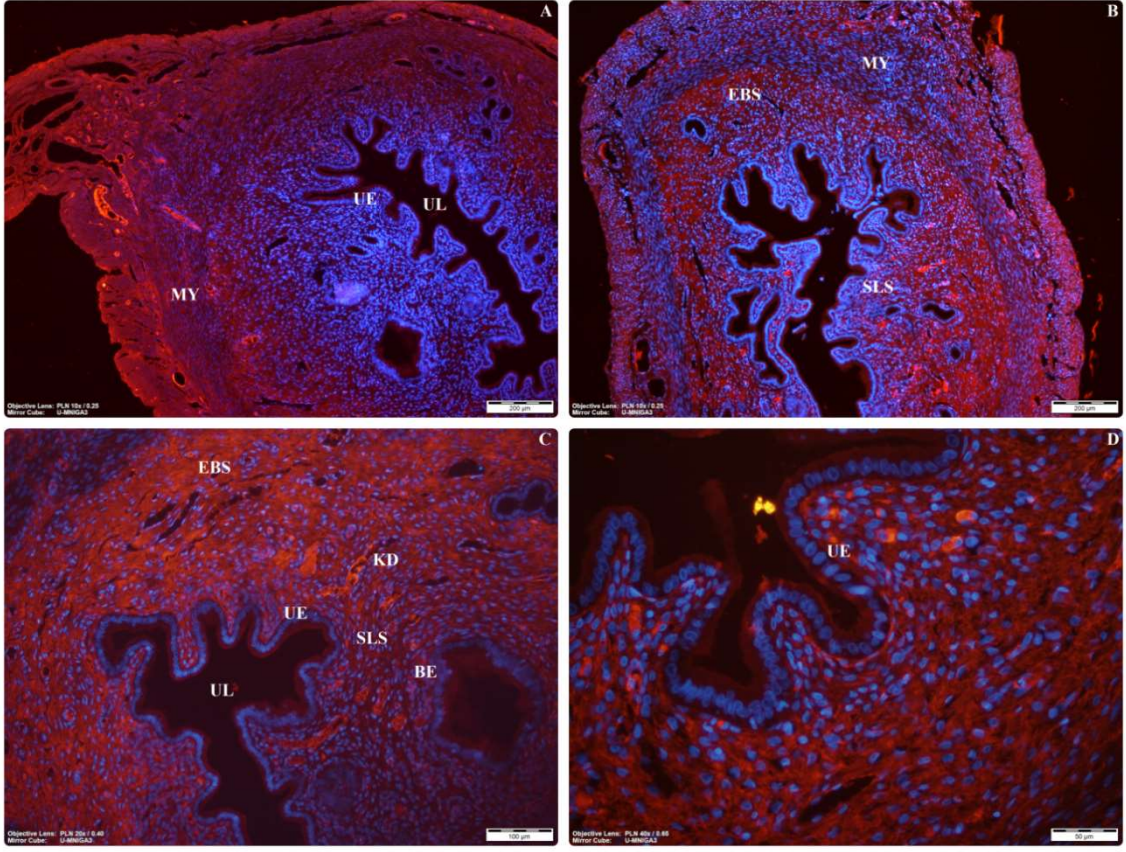
LEF-1; Wnt sinyal yolağı moleküllerinin lokalizasyon derecelerinin deneysel olarak test edildiği yapıların (perimetrial-miyometrial bağ dokusu, miyometrium, uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma, endometrial bazal stroma ve kan damarları) tamamında lokalizasyon gösteren tek sinyal molekülü olmuştur (Şekil 4.12; A-F). Molekülün bu alanlardaki ekspresyon dereceleri zayıftan (+) kuvvetliye (+++) kadar değişiklik göstermiştir. Ayrıca LEF-1, altı Wnt sinyal yolağı molekülü arasında kuvvetli lokalizasyon göstermeyen iki molekülden biridir (Tablo 4.2).

TCF; Wnt sinyal yolağı molekülleri arasında kuvvetli lokalizasyon göstermeyen iki molekülden birisi de TCF'dir. Uterus epitelinde eksprese olmayan TCF, perimetrial-miyometrial bağ doku ve endometrial bazal stroma alanında kuvvetli immünlokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.13;.A-D). Subluminal stroma alanlarında, hücrelerin yalnız sitoplazmalarında zayıf ekspresyon (+) tespit edilmiştir.

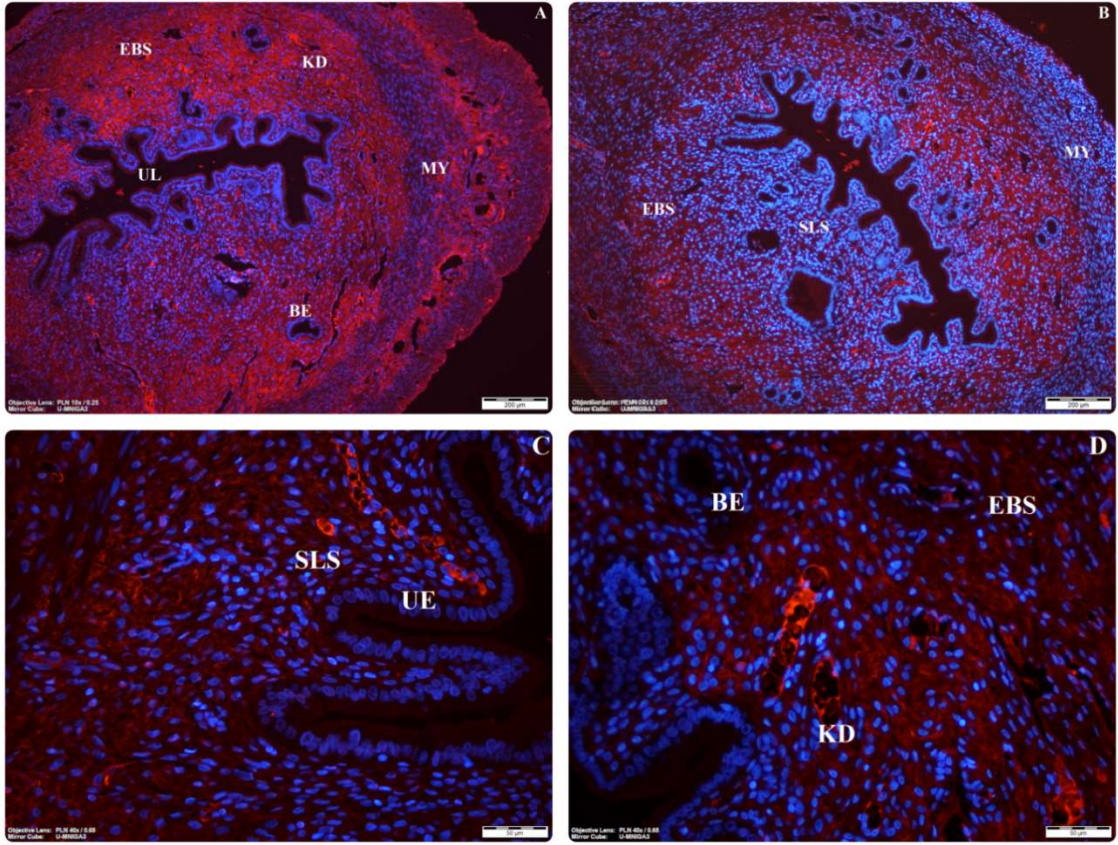
Tablo 4.2. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri

ÖSTRUS	PMB	MY	ENDOMETRİUM				
			UE	BE	STROMA		KD
					SLS	EBS	
Wnt-3	-	-	++	+	++++	++++	++++
Wnt-7a	-	-	+	+	++	++++	++++
Beta-katenin	-	-	++++	++++	+++	++	+++
Kaspaz-9	-	-	++++	++	+++	++++	++++
LEF-1	++	++	++	++	+	++	+++
TCF	+++	+	-	++	+	+++	++

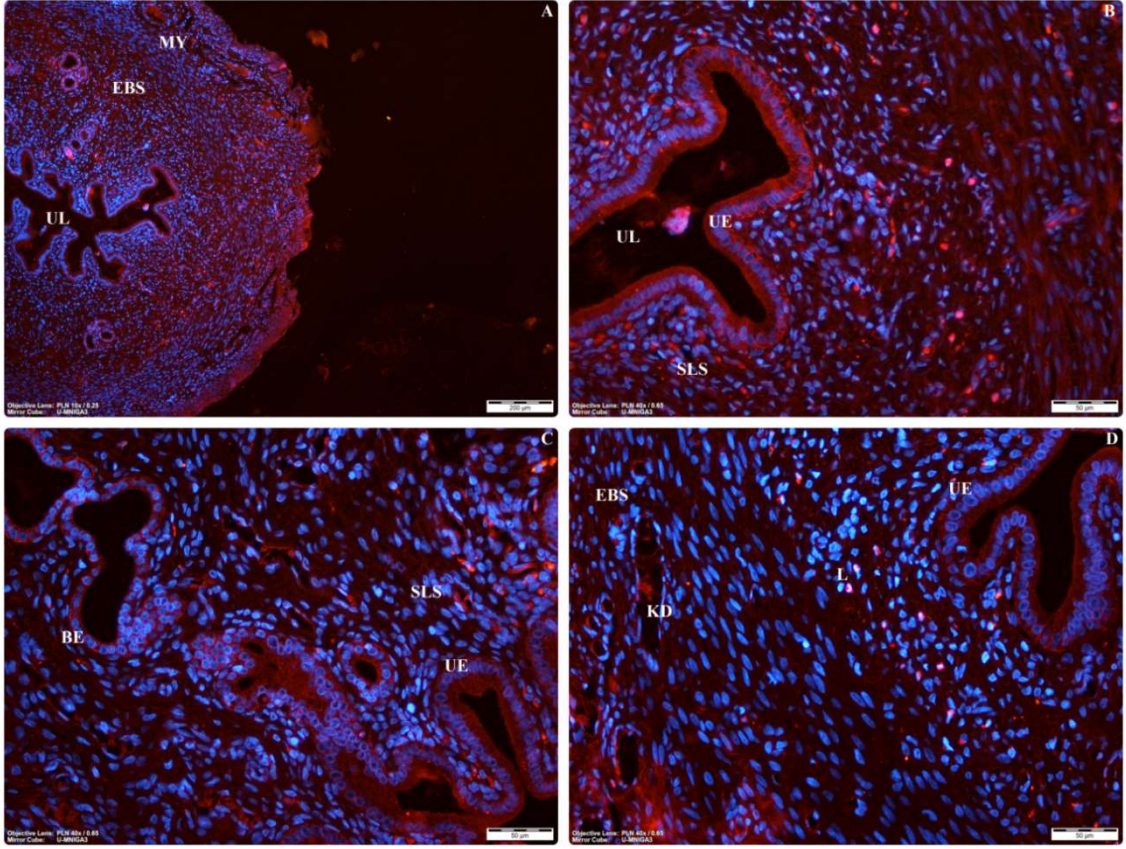
PMB: perimetrial-miyometrial bağ doku; MY: miyometrium; UE: uterus epiteli; BE: bez epiteli; SLS: subluminal stroma; EBS: endometrial bazal stroma; KD: kan damarı; (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



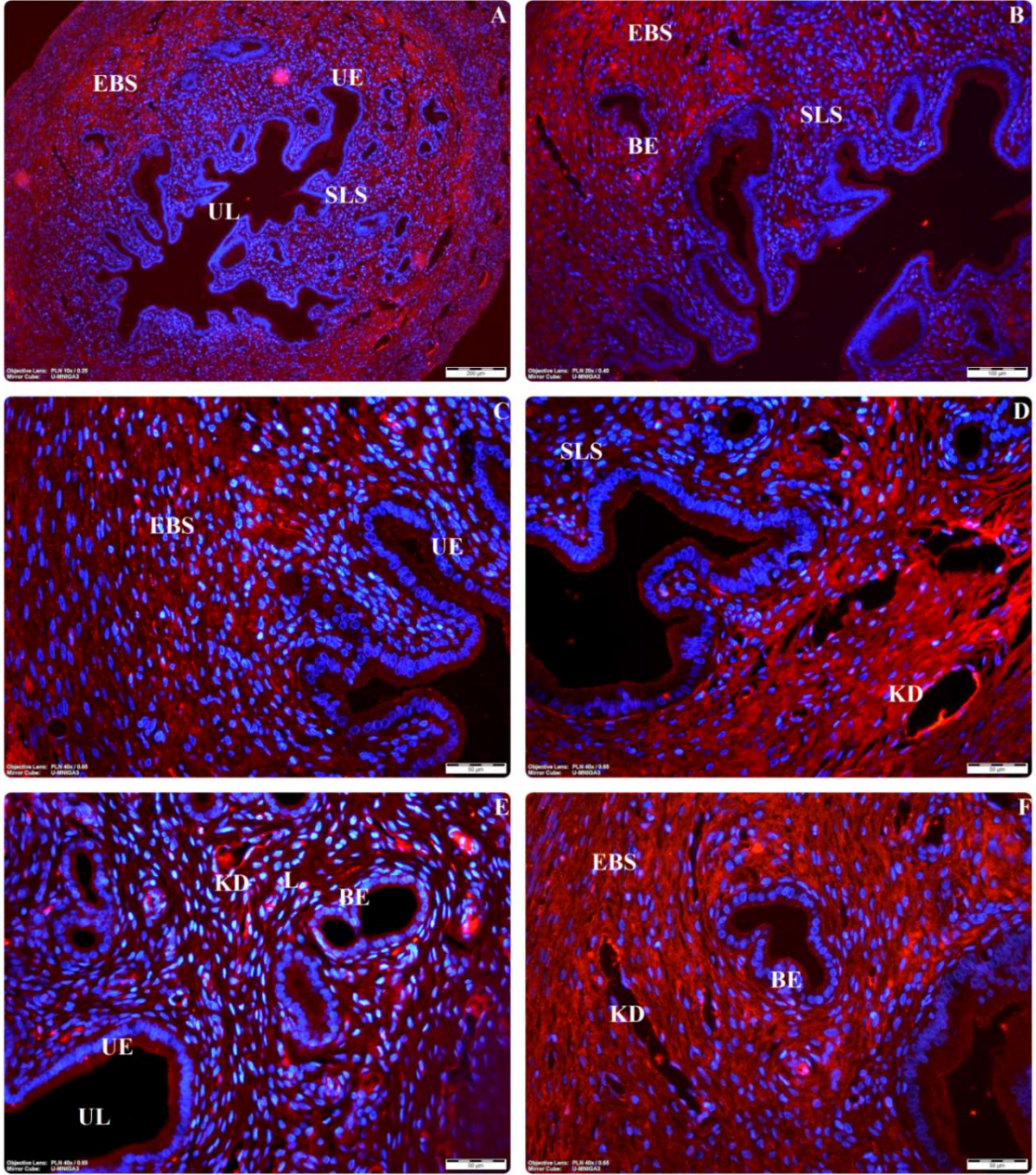
Şekil 4.8. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium.



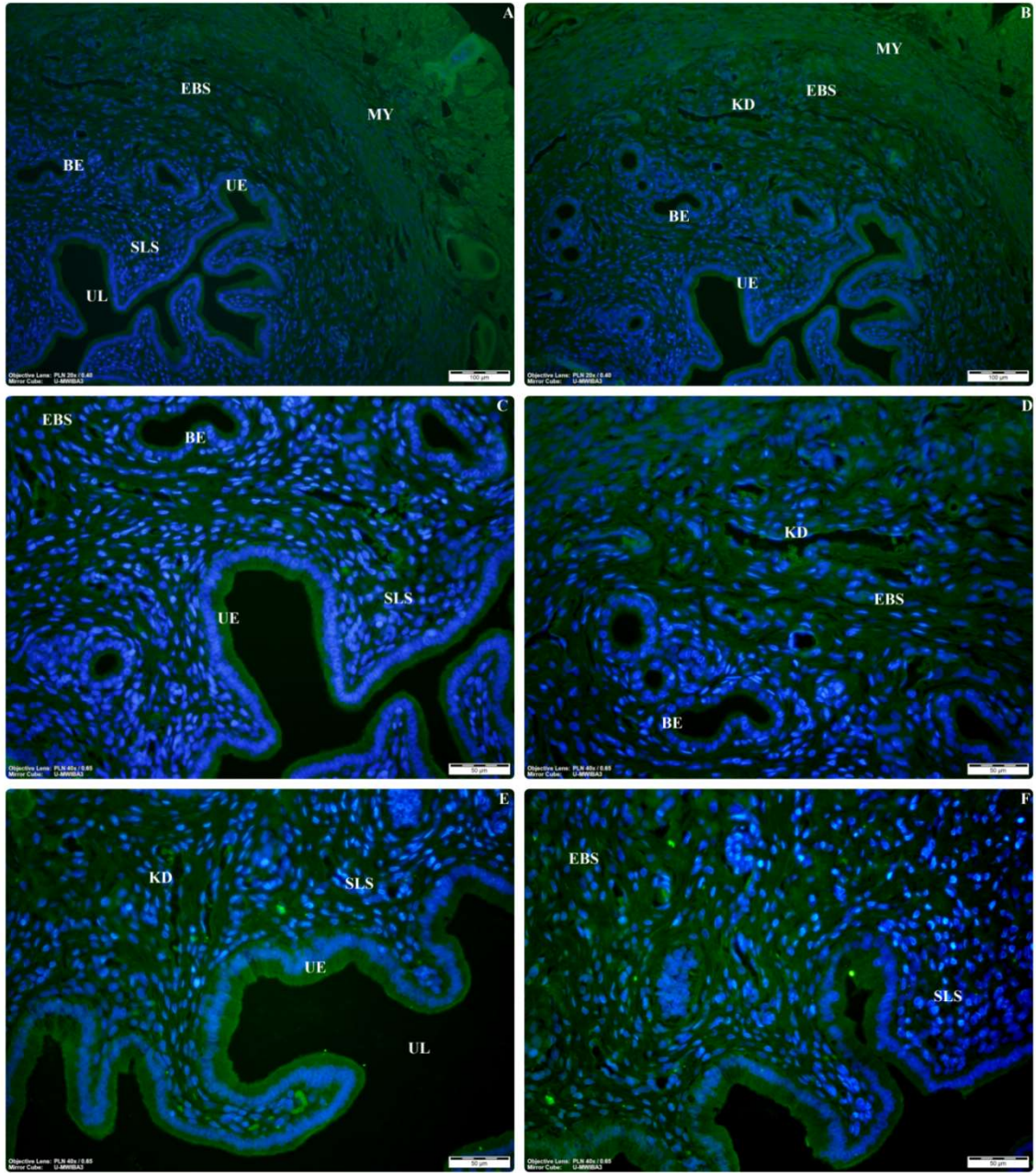
Şekil 4.9. Östrus siklusu östrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium.



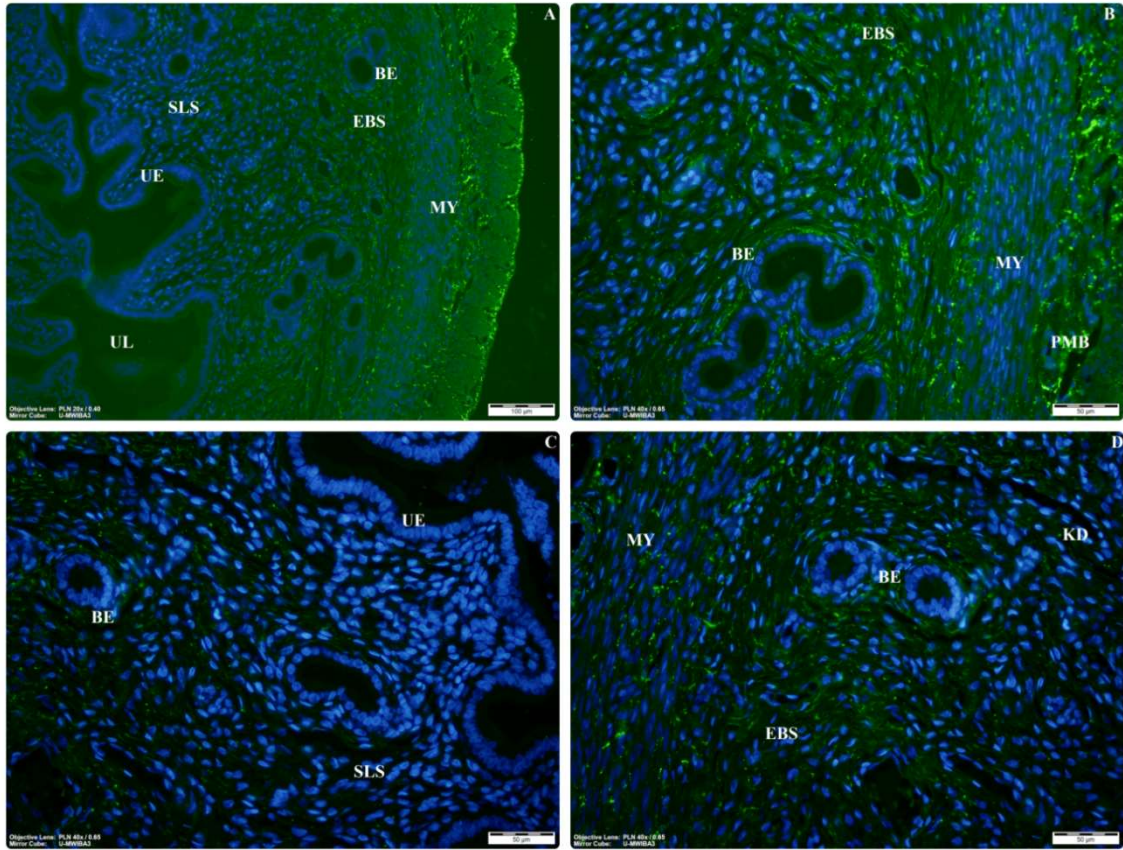
Şekil 4.10. Östrus siklusu östrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-D)
UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium.



Şekil 4.11. Östrus siklusu östrus evresinde kaspaz-9'un immünlökalisasyonları (A-F)
 UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.12. Östrus siklusu östrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonları (A-F) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium.



Şekil 4.13. Östrus siklusu östrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium PMB: perimetrial miyometrial bağ doku.

4.1.2.3. Metaöstrus

Hazırlanan preparatlardan elde edilen mikroskopik fotoğraflar (Şekil 4.14-19) analiz edilerek, östrus siklusu metaöstrus evresi süresince, sırasıyla Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF moleküllerinin perimetrial-miyometrial bağ dokusu, miyometrium, uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma, endometrial bazal stroma ve kan damarlarındaki ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. Elde edilen veriler mukayese edilerek Tablo 4.3'de sunulmuştur.

Wnt-3; östrus siklusunun metaöstrus evresinde Wnt-3 molekülü, hem uterus epitelinde hem de bez epitelinde orta kuvvetli ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.14; A, C). Subluminal stroma alanlarında kuvvetli immünlokalizasyon izlenirken, endometriyal bazal stroma alanında çok kuvvetli ekspresyon meydana gelmiştir (Şekil 4.14; B, D). Stromal kan damarlarında ve endotelde belirlenen immünlokalizasyon derecesi ise

kuvvetli düzeydedir. İncelenen preparatlarda, belirli alanlarda, seyrek halde lökosit hücreleri görülmüştür (Şekil 4.14; B).

Wnt-7a; Şekil 4.15 (A, B)'da görüldüğü gibi, uterus epiteli hücrelerinde ve hücre sınırlarında çok kuvvetli immünlokalizasyon oluşurken, bez epiteli ve bez epiteli stromasında kuvvetli gerçekleşmiştir. Stroma alanlarında ise, subluminal stromadan başlayarak endometriyal bazal stroma alanlarına kadar, molekülün ekspresyonu çok kuvvetli düzeydedir (Şekil 4.15; C, D). Benzer şekilde, kan damarları ve kapiller endotelinde de çok kuvvetli ekspresyon tespit edilmiştir. Lökosit hücrelerinin belirli alanlarda değişiklik gösterdiği izlenmiştir (Şekil 4.15; B-D).

Beta-katenin; östrus siklusunun bütün evrelerinde görüldüğü gibi uterus epitelinde, epitel hücre sınırlarında ve bez epiteli ile bez epiteli hücre sınırları stroması da dahil olmak üzere çok kuvvetli ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.16; A, C, D). Molekülün subluminal stromadaki immünlokalizasyon düzeyi, bu alanlara göre daha düşük seviyededir (orta kuvvetli). Şekil 4.16'da (B, D) görüldüğü gibi, endometriyal bazal stromada ve kan damarlarında beta-katenin, kuvvetli düzeyde eksprese olmuştur.

Kaspaz-9; uterus epiteli ve bez epiteli çevresinde orta kuvvetli iken, subluminal stroma boyunca, endometriyal stroma bölgesi de dahil olmak üzere, tamamen kuvvetli immünlokalizasyon göstermiştir (Şekil 4.17; C, D). Kan damarlarında, uterus epitelinde ve bez epitelinde ise orta kuvvetli ekspresyon meydana geldiği Şekil 4.17 (B, D)'de ifade edilmiştir. İncelenen preparatlarda, bez epiteli ve uterus epitelinde, siklusun diğer evrelerine göre, belirgin şekilde dejenerasyonlar tespit edilmiştir.

LEF-1; östrus siklusunun hemen hemen bütün evrelerine göre uterus epiteli, en az immunreaktivite gösterirken, bez epiteli alanlarında kuvvetli lokalizasyon izlenmiştir (Şekil 4.18; A,B).Perimetrial miyometrial bağ doku alanı diğer siklus dönemlerinde eksprese olmazken orta kuvvetli reaksiyon görülmüştür(Şekil 4.18; A). Endometrial bazal stroma alanlarında subluminal stromal bölgelere göre çok az olan ekspresyon daha fazla görülmüştür (Şekil 4.18; B) Östrus siklusu boyunca Lef-1 proteininin en çok eksprese olduğu bez epiteli alanlarında metaöstrus evresinde izlenmiştir (Şekil 4.18; C,D).

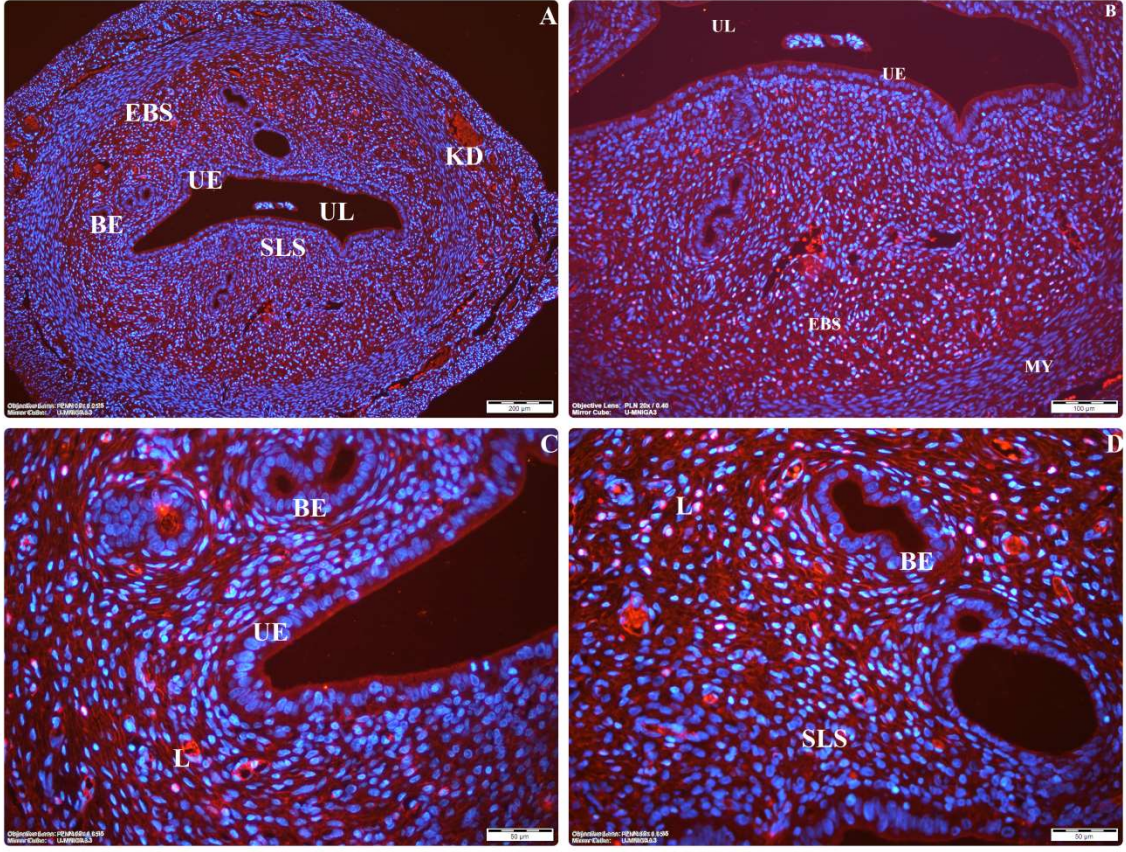
TCF; Şekil 4.19 (E)'de görüldüğü gibi molekül, uterus epitelinde lokalize olmamıştır. Bez epiteli ve subluminal stroma boyunca zayıf ekspresyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.19; C, D). Endometriyal bazal stromada subluminal stromaya göre daha belirgin (orta

derecede) immünlökalisierung meydana gelmiştir. Belirli alanlarda kan damarlarında orta kuvvetli ekspresyon izlenirken, diğer molekülerden farklı olarak, perimetriyal-miyometriyal bağ doku alanlarında orta kuvvetli lokalizasyon tespit gözlenmiştir (Şekil 4.19; B, D). TCF'nin miyometriyum-endometriyum sınırı boyunca gösterdiği immünlökalisierung düzeyi ise orta kuvvetlidir (Şekil 4.19; A).

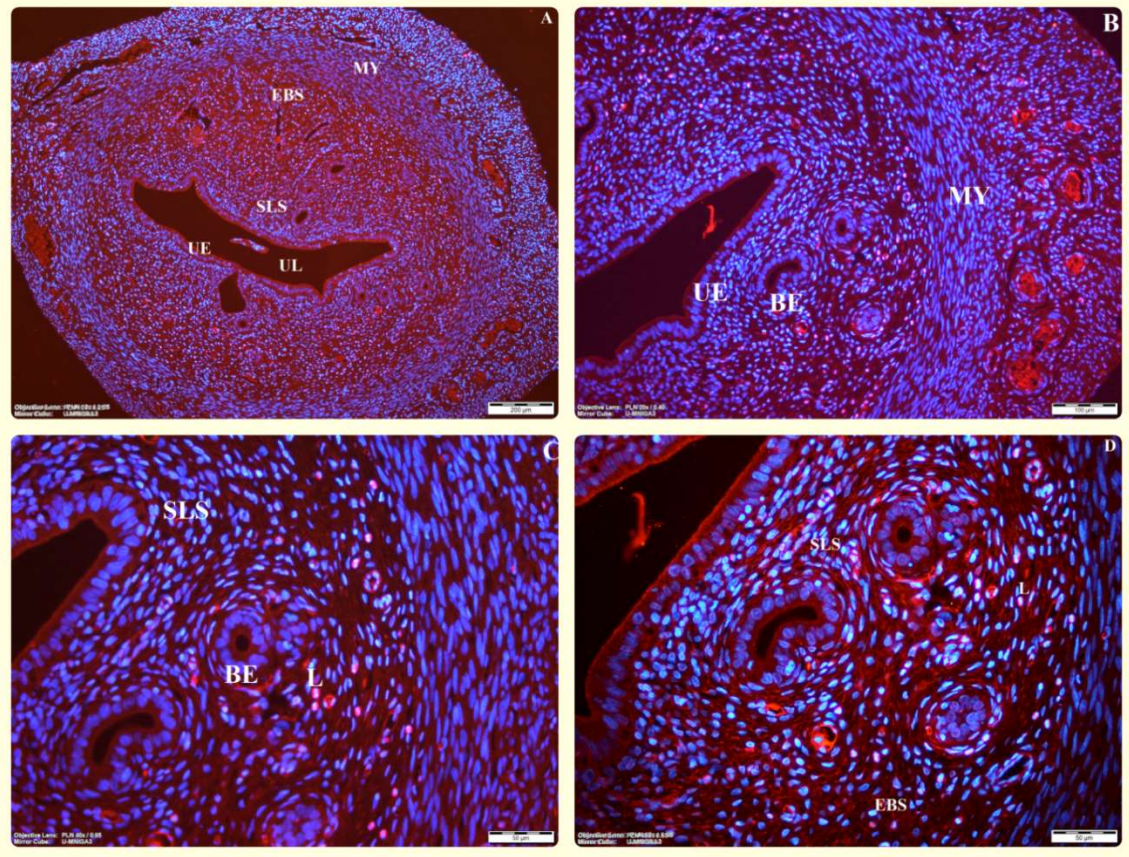
Tablo 4.3. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlökalisierung düzeyleri

METAÖSTRUS	PMB	MY	ENDOMETRİUM				
			UE	BE	STROMA		KD
					SLS	EBS	
Wnt-3	-	+	++	++	+++	++++	+++
Wnt-7a	-	+	++++	+++	++++	++++	++++
Beta-katenin	-	+	++++	++++	++	+++	+++
Kaspaz-9	-	+	++	++	+++	+++	++
LEF-1	++	+	+	+++	+	++	++
TCF	++	++	-	+	+	++	+++

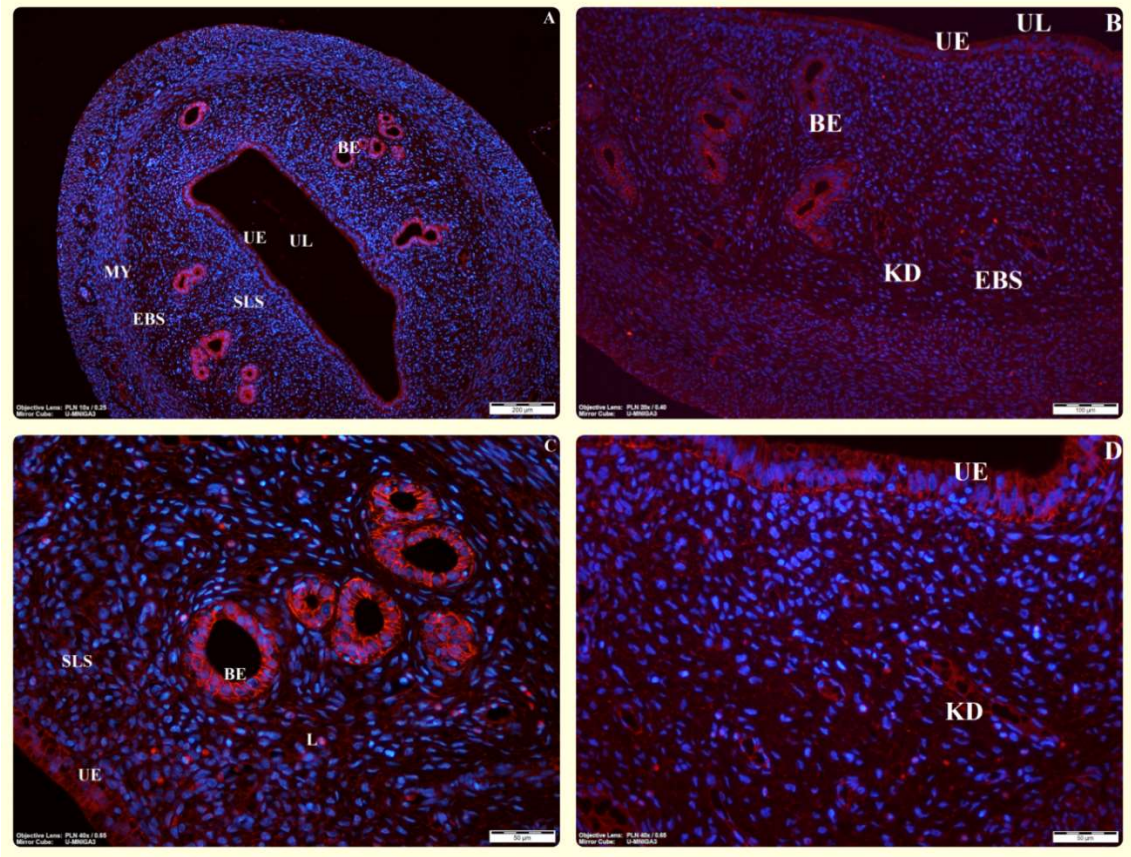
PMB: perimetriyal-miyometriyal bağ doku; MY: miyometriyum; UE: uterus epiteli; BE: bez epiteli; SLS: subluminal stroma; EBS: endometrial bazal stroma; KD: kan damarı; (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



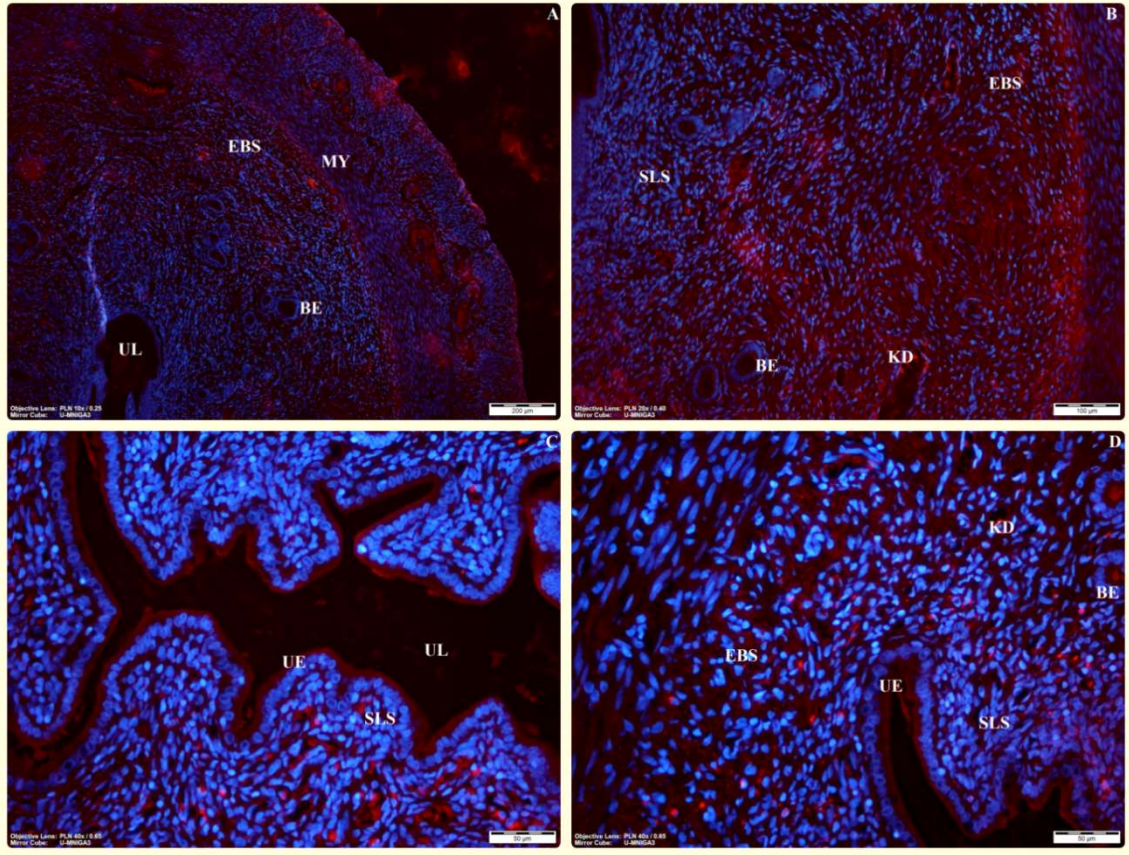
Şekil 4.14. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları (A-D)
UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: sublüminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı, L: lökosit.



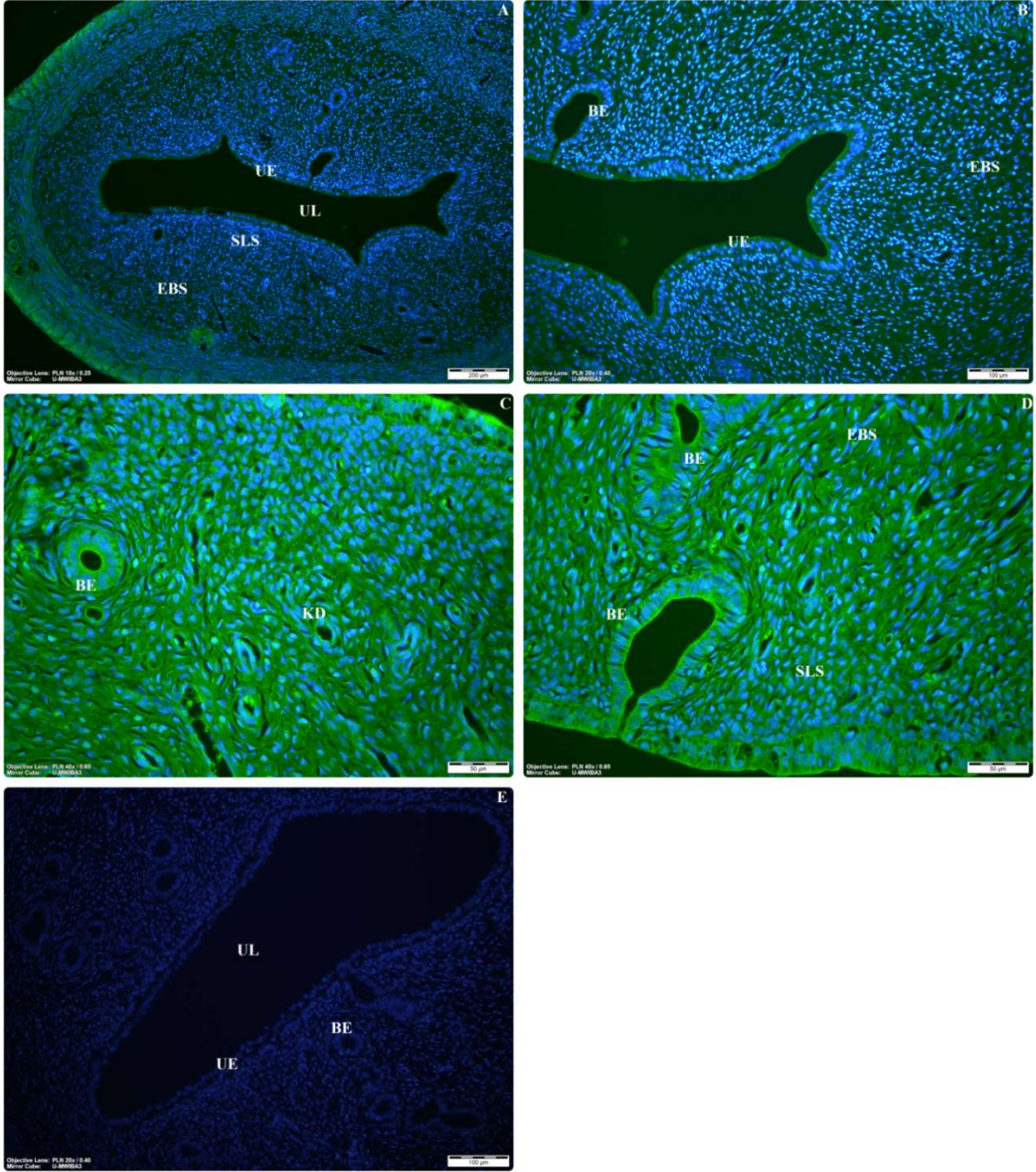
Şekil 4.15. Östrus siklusu metaöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



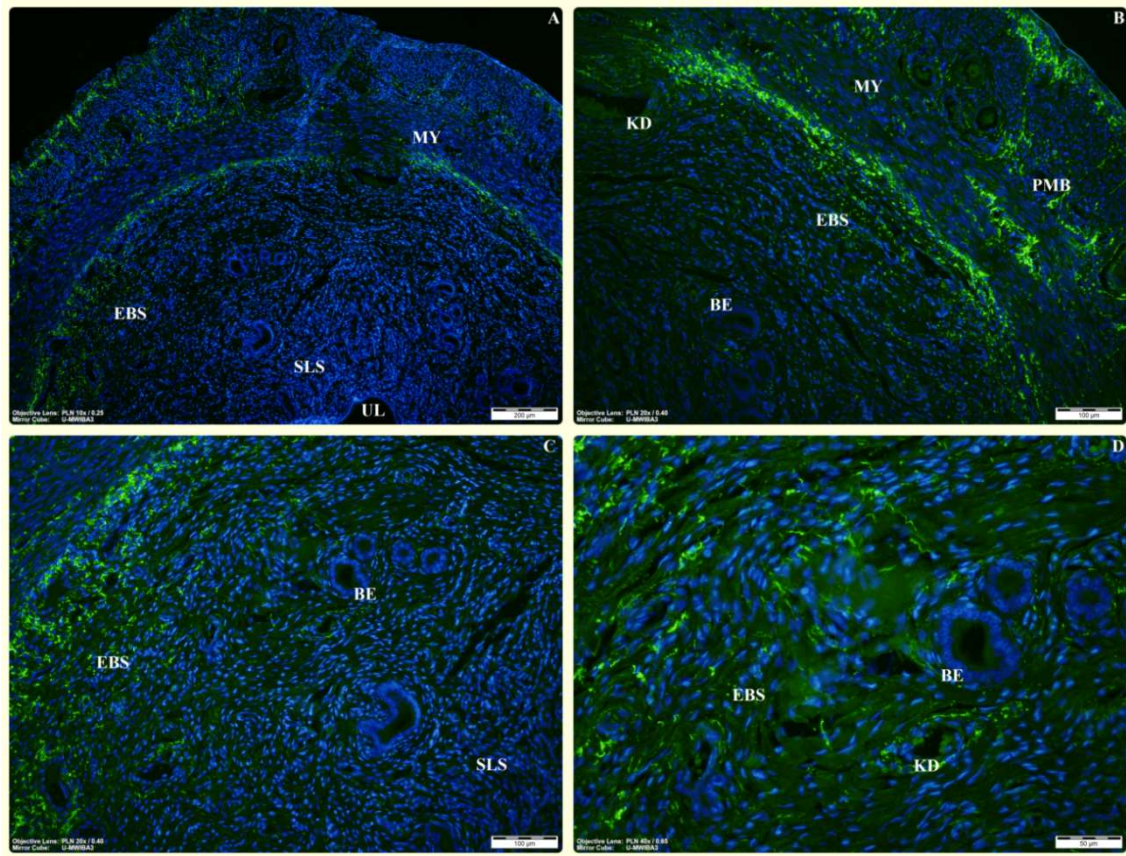
Şekil 4.16. Östrus siklusu metaöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.17. Östrus siklusu metaöstrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.18. Östrus siklusu metaöstrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonu (A-D), Negatif kontrol kesit (E); (UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı).



Şekil 4.19. Östrus siklusu metaöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları. (A-D) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı MY: miyometrium, PMB: perimetrial miyometrial bağ doku.

4.1.2.4. Diöstrus

Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt sinyal yolağı moleküllerinin perimetrial-miyometrial bağ dokusu, miyometrium, uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma, endometriyal bazal stroma ve kan damarlarındaki immünlokalizasyon düzeyleri Tablo 4.4'de sunulmuştur.

Wnt-3; östrus siklusu evrelerinden diöstrusta, sinyal yolağı moleküllerinden olan Wnt-3'ün, immünlokalizasyon düzeyleri Şekil 4.20'de görülmektedir. Molekülün uterus epitelindeki ekspresyon düzeyinin kuvvetli olduğu anlaşılmaktadır. Wnt-3'ün lokalizasyonu bez epiteli ve subluminal stromada ise orta kuvvetlidir (Şekil 4.20; B,D). Endometriyal bazal stromada kuvvetli immünlokalizasyon gösteren molekülün, kan damarlarındaki ekspresyonunun orta düzeyde olduğu saptanmıştır (Şekil 4.20; C,E).

Wnt-7a; molekülünün uterus epiteli ve bez epitelindeki lokalizasyonları zayıf düzeyde gerçekleşmiştir (Şekil 4.21; B-D). Subluminal stromada orta kuvvetli ekspresyon görülürken, endometriyal bazal stroma ve kan damarlarında ise kuvvetli immünlökizasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.21; A,D).

Beta-katenin; uterus epiteli ve hücre sınırlarında molekülün kuvvetli ekspresyon gösterdiği saptanmıştır. Şekil 4.22 incelendiğinde, beta-kateninin, hem bez epiteli ve bez epiteli stromasında hem de subluminal stroma alanlarında orta kuvvette lokalizasyon gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.22; B,C). Bununla birlikte, endometrial bazal stroma ve kan damarları da dahil olmak üzere, çevre alanlarda molekülün ekspresyon derecesi orta kuvvetlidir (Şekil 4.22; A,C). Östrus siklusunun diğer evreleriyle mukayese edildiğinde beta-kateninin, uterus epitelindeki immünlökizasyonunun, diöstrus evresinde daha düşük düzeyde olduğu anlaşılmaktadır (Şekil 4.22; D).

Kaspaz-9; diöstrus evresi boyunca sırasıyla uterus epiteli, bez epiteli ve subluminal stromada orta kuvvetli bir ekspresyonla kendini göstermiştir. (Şekil 4.23; B,D). Molekülün lokalizasyon derecesi, endometrial bazal stromada kuvvetliken, kan damarlarında çok kuvvetli düzeye erişmiştir (Şekil 4.23; A,B,E). Mikroskopik gözlemler, sonucunda miyometriyumdaki ekspresyon düzeyinin zayıf olduğu belirlenmiştir.

LEF-1; molekülün ekspresyon dereceleri Şekil 4.24 (A-F)'da sunulmuştur. Uterus epiteli, bez epiteli, subluminal stroma ve endometriyal bazal stromada zayıf ekspresyon izlenmiştir (Şekil 4.24; A-D). Kan damarlarında ve kan damarı stromasında ise aynı şekilde ekspresyon oldukça zayıftır (Şekil 4.24; E). Perimetriyal-miyometriyal bağ doku bölgesinde molekülün lokalizasyonu zayıf düzeydedir.

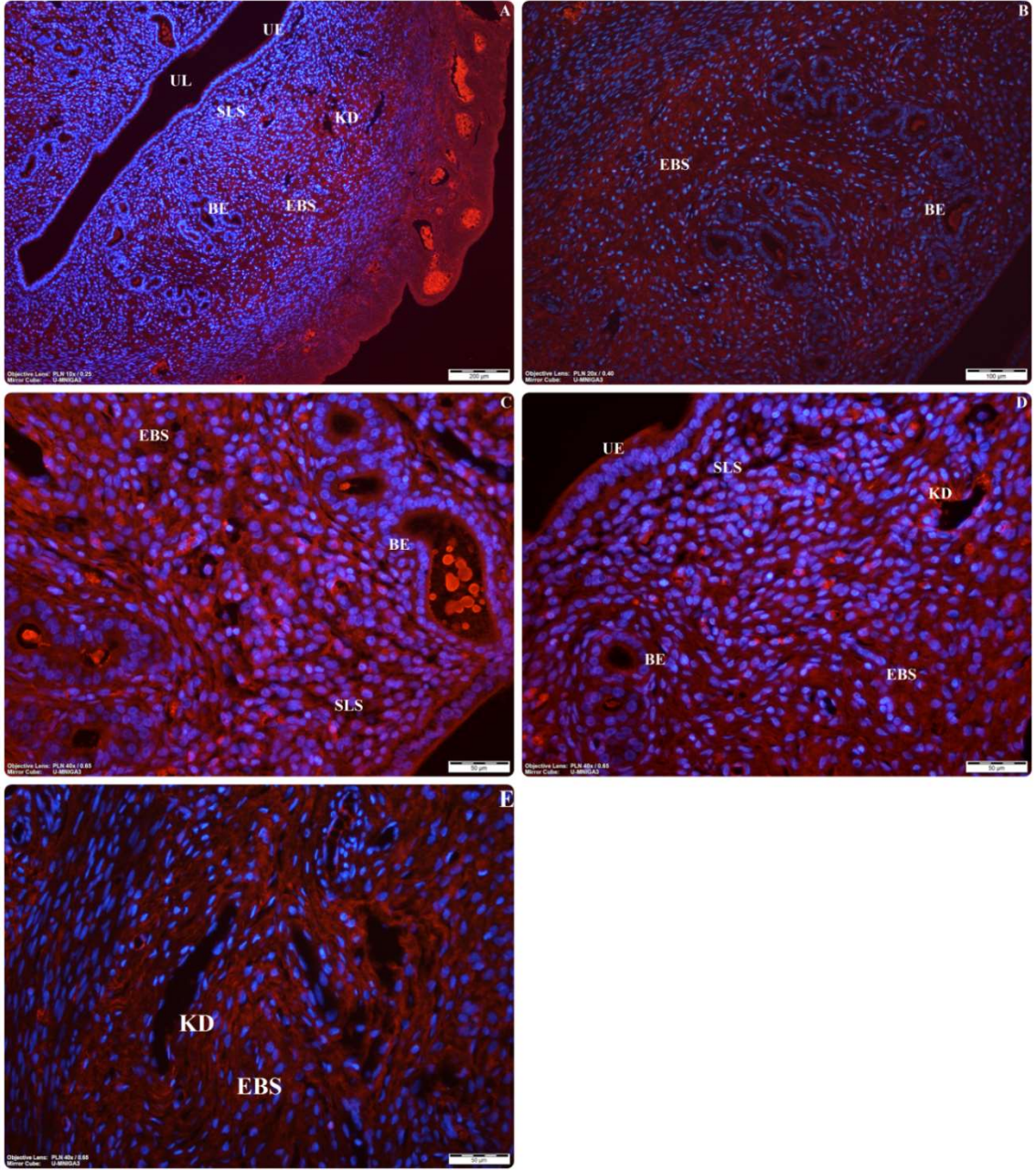
TCF; molekülü, uterus epiteli ve bez epiteli sitoplazmasında eksprese olmamıştır (Şekil 4.25; B,E). Bununla birlikte bez epiteli stromasında çok düşük düzeyde lokalizasyon saptanmıştır. Subluminal stromada zayıf ekspresyon izlenmekle birlikte, endometriyal stromaya doğru ilerledikçe immünlökizasyon kuvvetli düzeye erişmiştir. Kan damarlarında TCF'nin, kuvvetli ekspresyon gösterdiği belirlenmiştir. Uterusun perimetriyal-miyometriyal bağ doku alanında sinyal yolağı moleküllerinden yalnız TCF'nin ekspresyon gösterdiği ve lokalizasyon şiddetinin orta kuvvetli olduğu tespit

edilmiştir (Şekil 4.25; A,C). Benzer şekilde, molekülün miyometriyum bölgesinde de immünlokalizasyonu, orta kuvvetli düzeyde gerçekleşmiştir (Şekil 4.25).

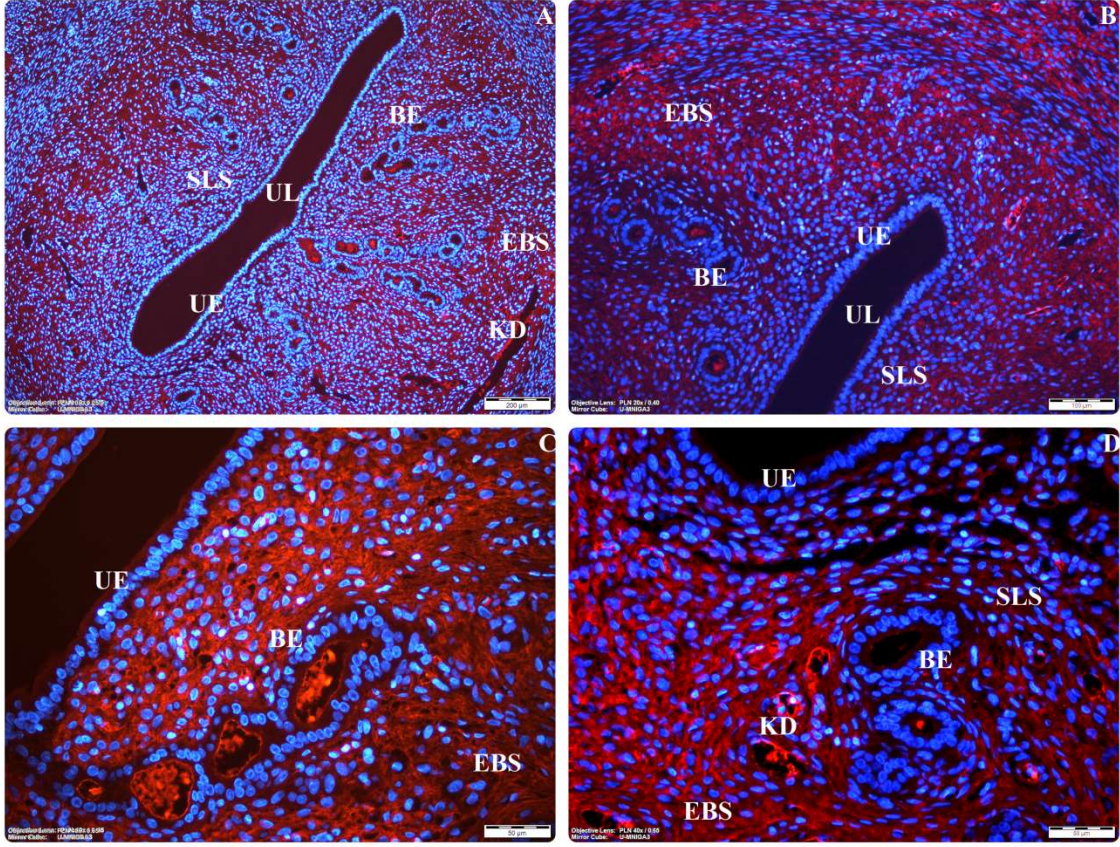
Tablo 4.4. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri

DİÖSTRUS	PMB	MY	ENDOMETRİUM				
			UE	BE	STROMA		KD
					SLS	EBS	
Wnt-3	-	+	+++	++	++	+++	++
Wnt-7a	-	-	+	+	++	+++	+++
Beta-katenin	-	+	+++	++	++	++	++
Kaspaz-9	-	+	++	++	++	+++	+++
LEF-1	+	-	+	+	+	+	+
TCF	++	++	-	-	+	+++	+++

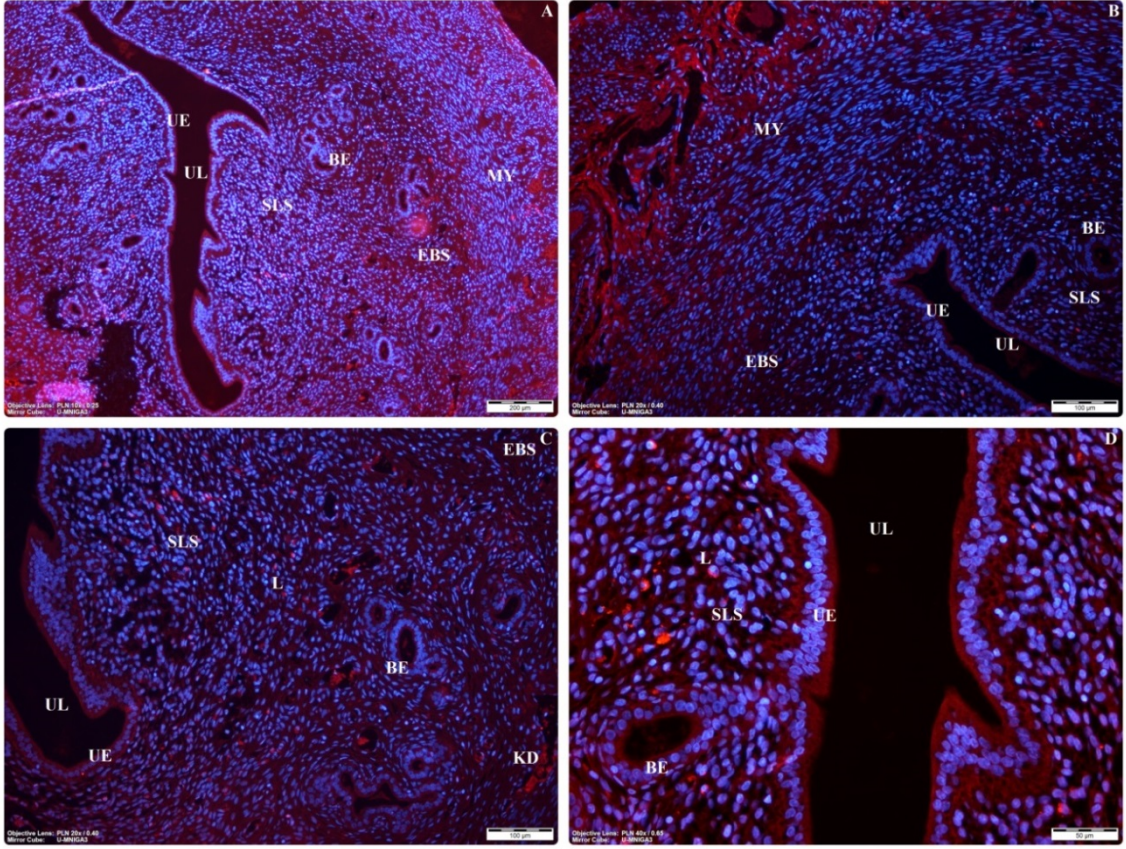
PMB: perimetrial-miyometrial bağ doku; MY: miyometriyum; UE: uterus epiteli; BE: bez epiteli; SLS: subluminal stroma; EBS: endometrial bazal stroma; KD: kan damarı; (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



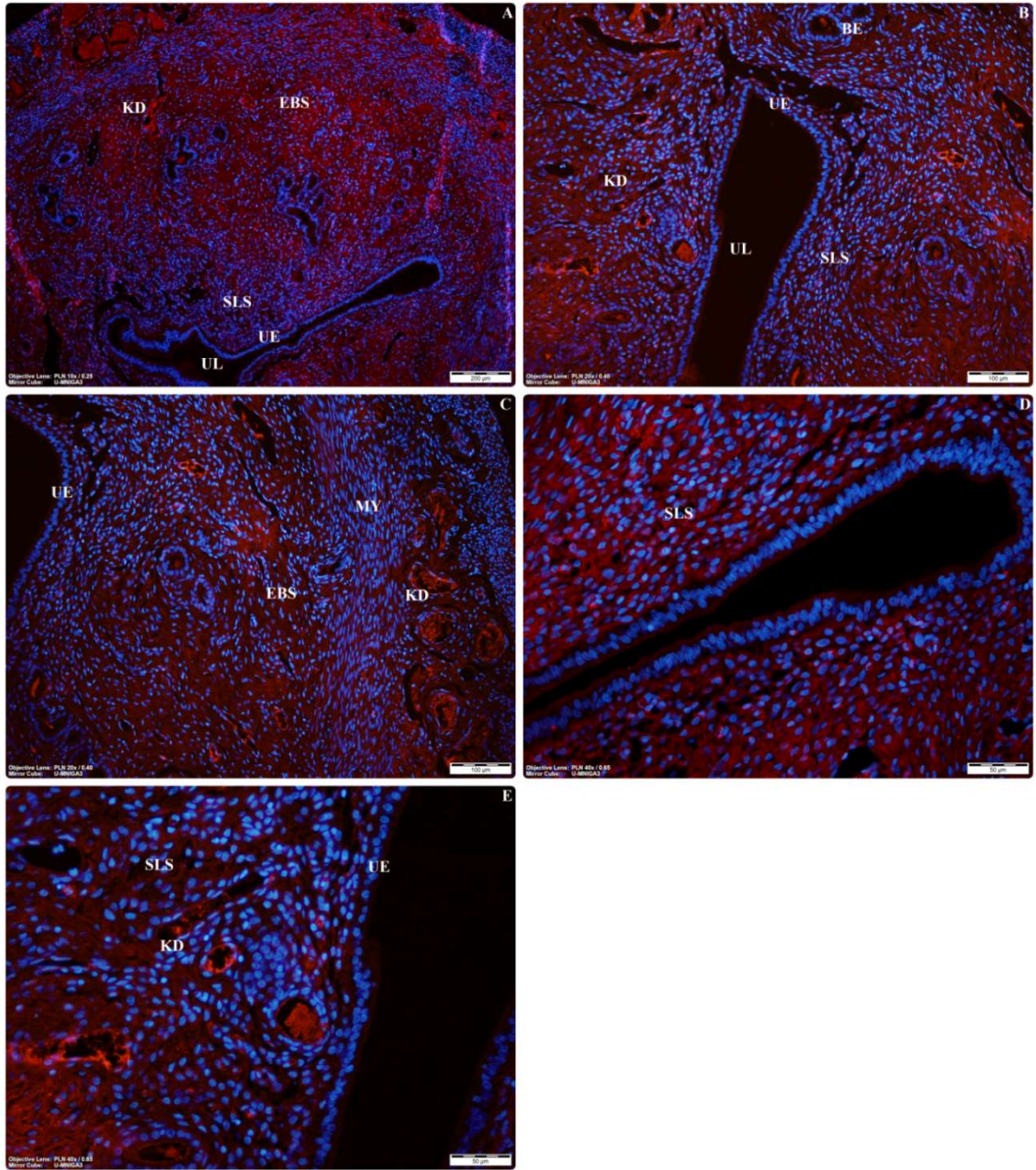
Şekil 4.20. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt-3' ün immünlokalizasyonları.(A-E)
UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



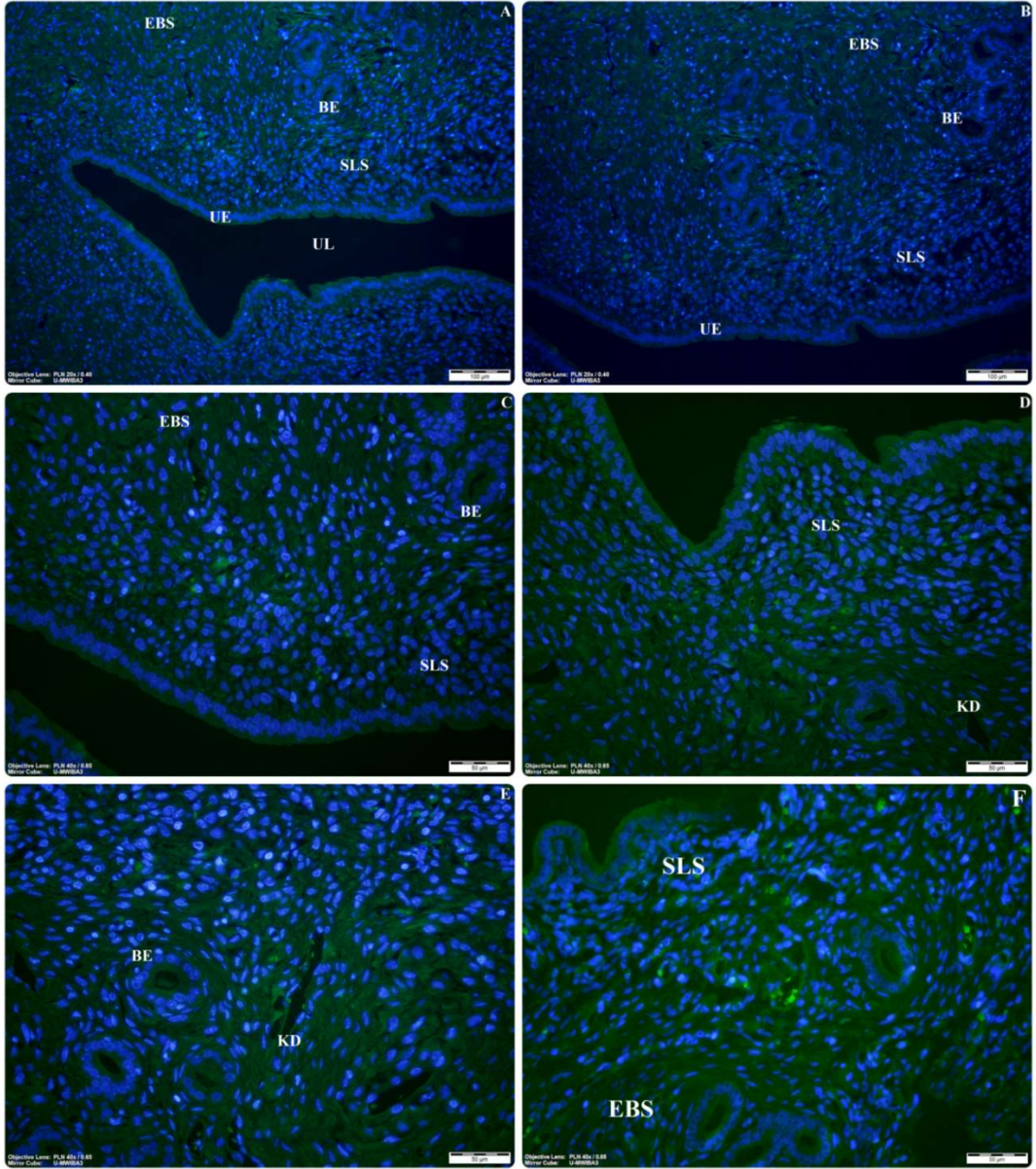
Şekil 4.21. Östrus siklusu diöstrus evresinde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-D)
UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



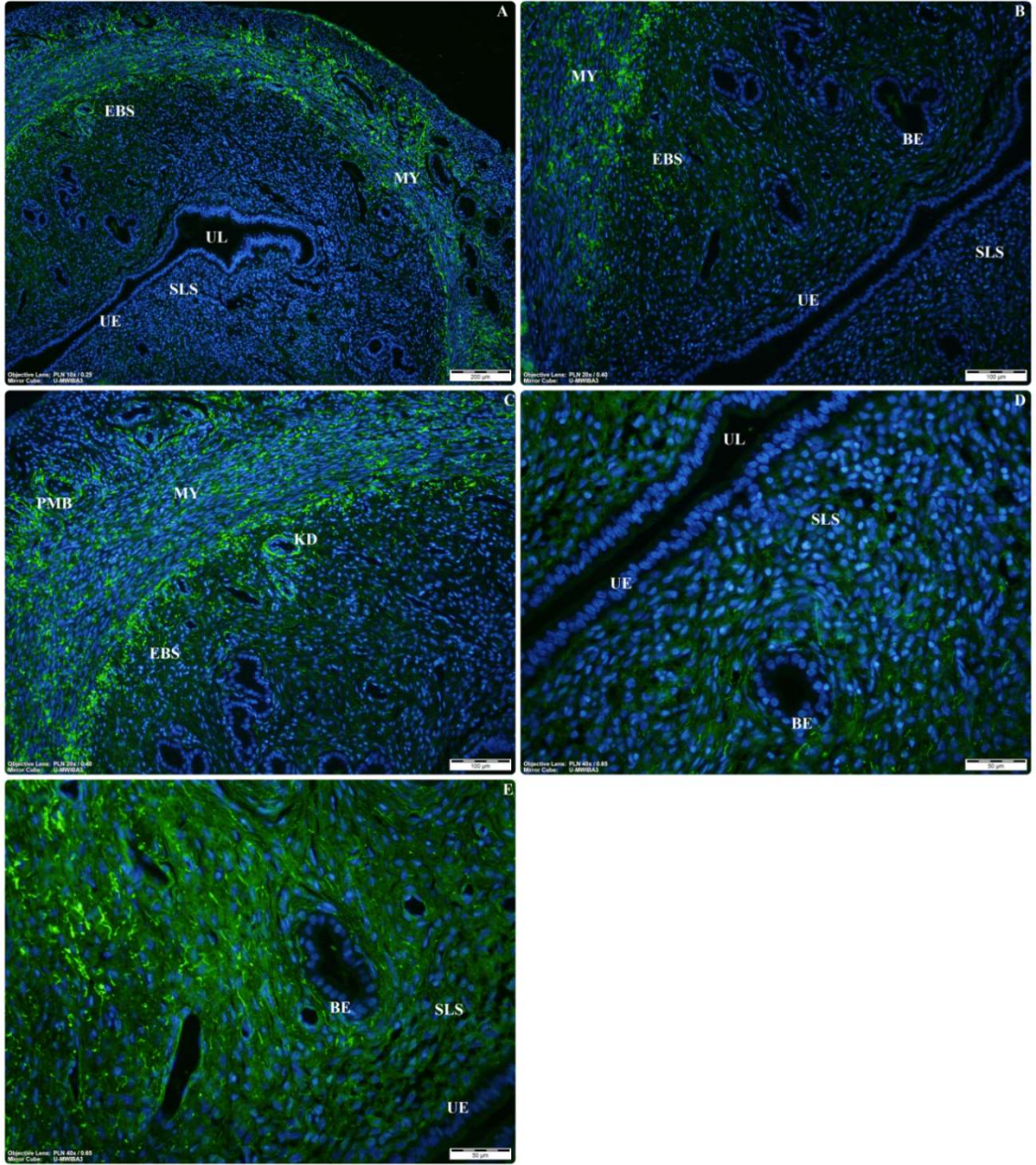
Şekil 4.22. Östrus siklusu diöstrus evresinde beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-E) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.



Şekil 4.23. Östrus siklusu diöstrus evresinde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları (A-E)
UL: Uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: Bez epiteli, SLS: Subluminal stroma, EBS: Endometriyal bazal stroma, KD: Kan damarı.



Şekil 4.24. Östrus siklusu diöstrus evresinde LEF-1'in immünlokalizasyonları (A-F)
UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı.

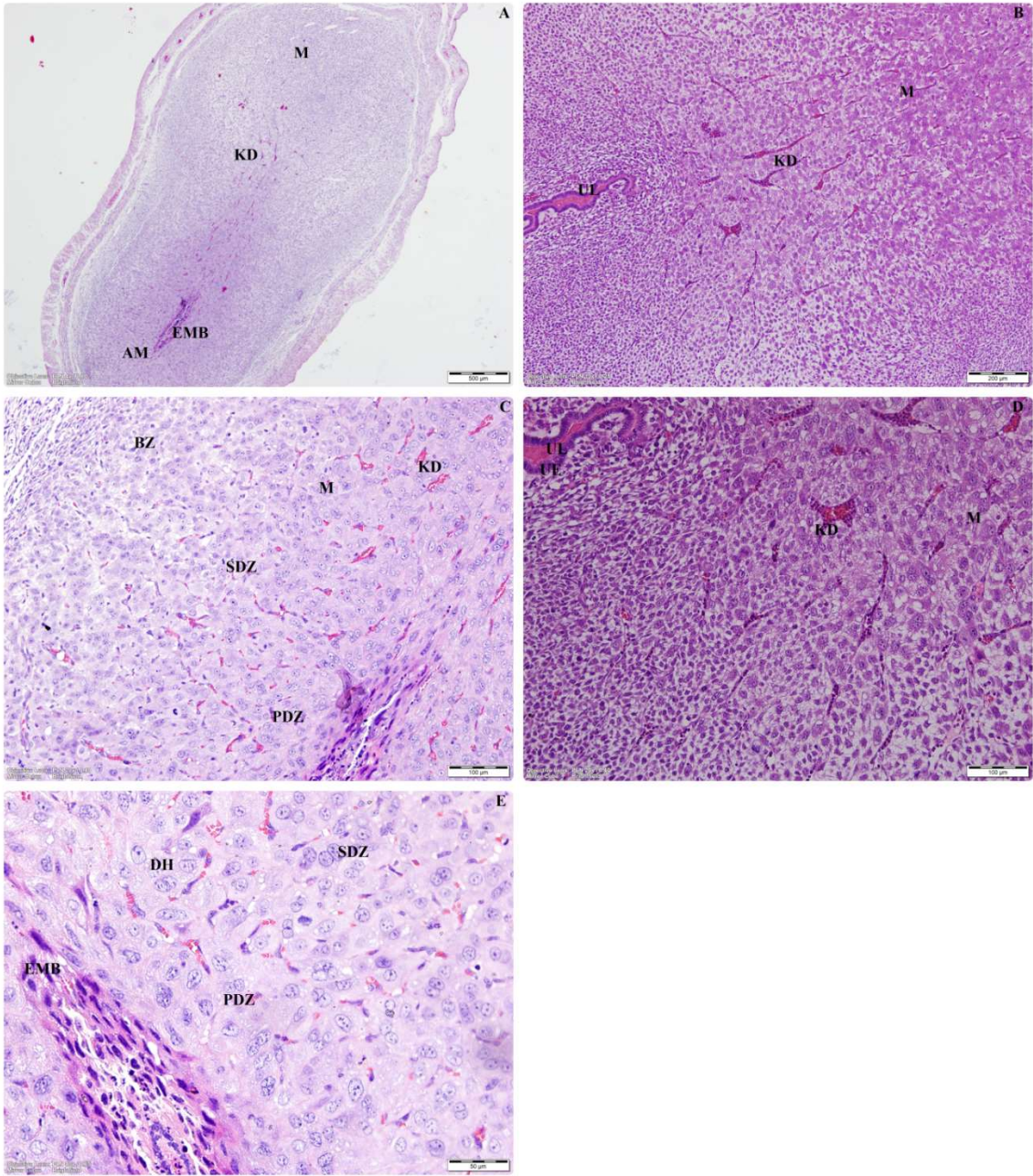


Şekil 4.25. Östrus siklusu diöstrus evresinde TCF'nin immünlokalizasyonları (A-E) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, BE: bez epiteli, SLS: subluminal stroma, EBS: endometriyal bazal stroma, KD: kan damarı, MY: miyometriyum, PMB: perimetrial-miyometriyal bağ doku.

4.2. Gebelik Dönemi (2. Grup)

4.2.1. Gebeliğin 7. Günü

Işık mikroskopik inceleme: Bu dönemde embriyo, poligonal şekilli diğer hücelere oranla daha büyük hücelerden oluşan primer desidua adı verilen bir tabaka ile çepeçevre sarılmıştır. Embriyonun, blastosist apozisyon sonrasında antimezometrial alanda lokalize olduğu izlenmiştir. Gebeliğin 7. gününde embriyonun yerleştiği bu bölgede, implantasyon zonu ya da desidual kapsül adı verilen, bir kript bölgenin olduğu gözlenmiştir. Embriyoyu kuşatan alanda iri çekirdekli, trofoblast hücrelerinin yassı çekirdekli, iğ şeklindeki primer desidual hücrelerinin arasına katıldığı ve buradaki kan damarları ile ilişki kurduğu tespit edilmiştir. İmplantasyon bölgesinde uterus epiteli, antimezometrial alandan mezometrial alan ve uterus lümeni boyunca koyu boyanmıştır ve yassı-kübik hücreden alçak prizmatik hücreye doğru değişiklik gösteren bir morfolojiye sahiptir. Antimezometrial alan ve mezometrial alanı kapsayan subepitelyal alanda, 3-4 hücre kümesinden oluşan, sıkıca bağlanarak bir araya gelen desidual hücreler, primer desidualizasyon zonunu oluştururken, antimezometrial alanda bu zonun dışında, poligonal şekilli hücelerden oluşmuş sekonder desidualizasyon zonu belirginleşmiştir. Uterus lümeninin bulunduğu mezometrial alanda ise kan damarları tespit edilmiştir.



Şekil 4.26. Gebeliğin 7. gününde ışık mikroskop bulguları (H-E) (A-E) UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, EMB: embriyo, PDZ: primer desidualizasyon zonu, SDZ: sekonder desidualizasyon zonu, AM: antimezometrial alan, M: Mezometrial alan, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.

4.2.2. Gebeliğin 7. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları

Tablo 4.5. Gebeliğin 7. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri verilmiştir.

Wnt-3; Gebeliğin 7. gününde antimezometrial alanda, embriyoda ve embriyo çevresinde yer alan primer desidualizasyon zonu ve sekonder desidualizasyon zonunda orta kuvvetli ekspresyon tespit edilmiştir (Şekil 4.27; A-C). Antimezometrial alanda lokalizasyon göstermiş kan damarlarında orta kuvvetli ekspresyon izlenirken, antimezometrial alanın bazal zonuna gidildikçe çok kuvvetli immünlokalizasyon görülmüştür. Uterus lümeninin yer aldığı mezometrial alanda stromal hücrelerin henüz farklılaşmadığı, uterus lümeni etrafında Wnt-3 ekspresyonu izlenmezken, uterus epitelinde kuvvetli immünlokalizasyon tespit edilmiştir. Mezometrial alanın bazal zonunda orta kuvvetli immünlokalizasyon izlenmiş, uterus lümeni etrafında yer alan kan damarlarında orta kuvvetli immünfloresan reaksiyon görülmüştür (Şekil 4.27; B-D).

Wnt-7a; antimezometrial alanda, genel olarak embriyoda ekspresyon orta kuvvetli iken, embriyo çevresinde ise dev trofoblastlar görülmüştür (Şekil 4.28; B,D). Desidual hücrelerin yer aldığı primer desidualizasyon zonda kuvvetli immünlokalizasyonun sekonder desidualizasyon zonuna doğru gidildikçe orta derecede immünlokalize olduğu tespit edilmiştir. Primer ve sekonder desidual zonlardan uzaklaştıkça bazal zonda kuvvetli immünlokalizasyon görülmüştür (Şekil 4.28; A,B). Desidual hücrelerin etrafında yer alan kan damarlarında kuvvetli ekspresyon izlenmiştir. Wnt-7a'nın mezometrial alanın bazal zonunda çok kuvvetli eksprese olduğu tespit edilmiştir. Uterus epiteli ve bu bölgede yer alan kan damarlarında ekspresyonun kuvvetli olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.28; E).

Beta-katenin; gebeliğin 7. gününde beta-katenin ekspresyonu en çok antimezometrial alanın sekonder desidualizasyon zonunda görülürken, embriyo çevresine inildikçe primer desidualizasyon alanda ekspresyonun kuvvetli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.29; B,C) Embriyo bölgesinde ise orta kuvvetli immünfloresan reaksiyon söz konusudur. Kan damarları ve kan damarı stromasında da orta kuvvetli immünlokalizasyon gerçekleşirken, bazal zona gidildikçe ekspresyon seviyesinde her hangi bir değişiklik olmamıştır (Şekil 4.29; C,E). Mezometrial alanda, uterus epiteli çevresinde ve hücre

sınırlarında kuvvetli ekspresyon görülürken, kan damarları ve bazal zonda orta kuvvetli immünreaksiyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.29; G,H).

Kaspaz-9; Antimezometrial alanda en zayıf ekspresyon embriyoda görülmüştür (Şekil 4.30; A,B). Primer desidualizasyon zon kuvvetli immünreaksiyon gösterirken, sekonder desidualizasyon zonda orta kuvvetli immünreaksiyon izlenmiştir. Desidual zonun dışındaki stromal hücrelerde ekspresyon tespit edilmemiştir. Bazal zon orta kuvvetli ekspresyon gösterirken, kan damarları, kapiller endotelinde kuvvetli immünreaksiyon tespit edilmiştir. Kaspaz-9, uterus epiteli ve mezometrial alandaki stromal hücrelerde orta kuvvetli lokalizasyona sahiptir (Şekil 4.30; F) Kan damarları antimezometrial alana göre daha az ekspresyona sahiptir. Mezometrial alanın bazal zonunda ise orta kuvvetli immünreaksiyon meydana gelmiştir (Şekil 4.30; I).

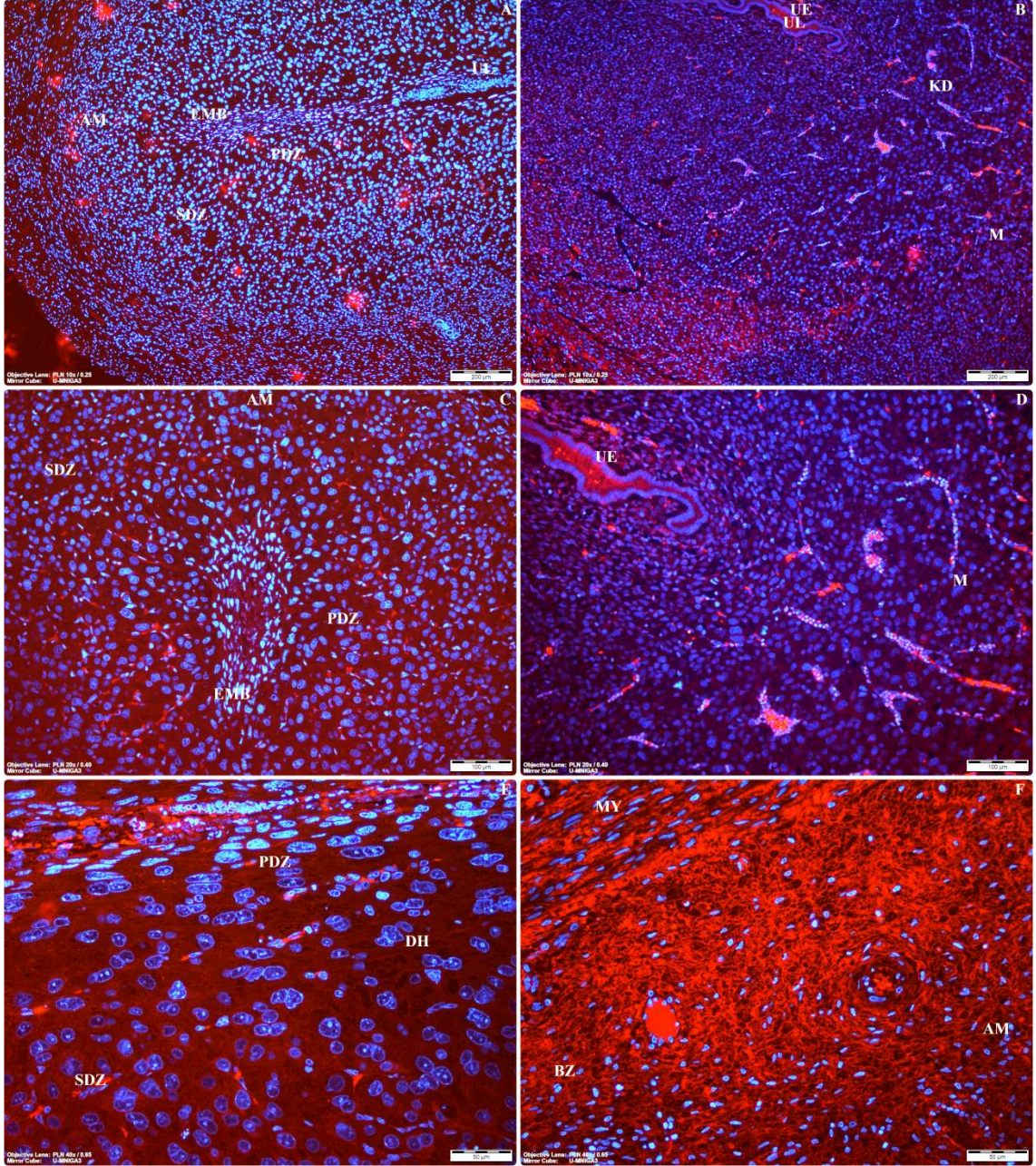
LEF-1; gebeliğin 7. gününde antimezometrial alanda, embriyo da dahil olmak üzere primer desidualizasyon ve sekonder desidualizasyon zon, kan damarları ve bazal zonda ekspresyon negatif iken, sadece mezometrial alanda uterus epiteli çevresinde, stromal hücrelerde zayıf ekspresyon tespit edilmiştir (Şekil 4.31; A-D). Diğer bölgelerden farklı olarak mezometrial bazal zonda ekspresyon orta derecede gerçekleşmiştir (Şekil 4.31; E,F).

TCF; molekülü 7. günde, en belirgin olarak primer desidualizasyon zonu ve burada yer alan kan damarlarında kuvvetli ekspresyon gösterirken, embriyo ve sekonder desidualizasyon zonda orta kuvvetli immünreaksiyon meydana gelmiştir. Antimezometrial alanın bazal zonunda ekspresyon zayıftır. Mezometrial alanda ise TCF lokalize olmamıştır (Şekil 4.32; A-F).

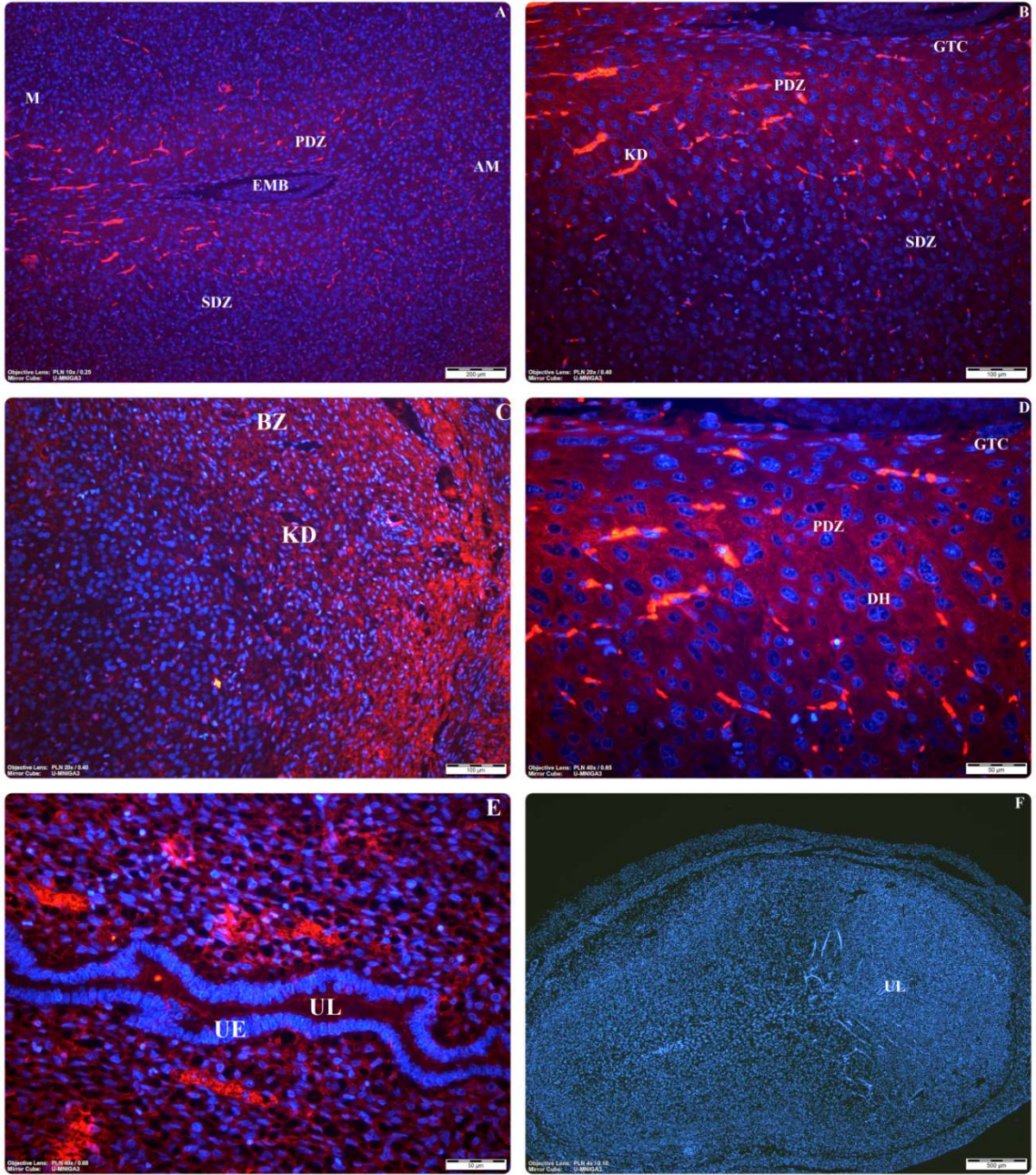
Tablo 4.5. Gebeliğin 7. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri

7. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL DESİDUA					MEZOMETRİAL DESİDUA		
	EMB	PDZ	SDZ	BZ	KD	UE	BZ	KD
Wnt-3	++	++	++	++++	++	+++	+++	++
Wnt-7a	++	+++	++	+++	+++	+++	++++	+++
Beta-katenin	++	+++	++++	++	++	+++	++	++
Kaspaz-9	+	+++	++	+++	++++	++	++	+++
LEF-1	-	-	-	-	-	+	+	+
TCF	++	+++	++	+	+++	-	-	-

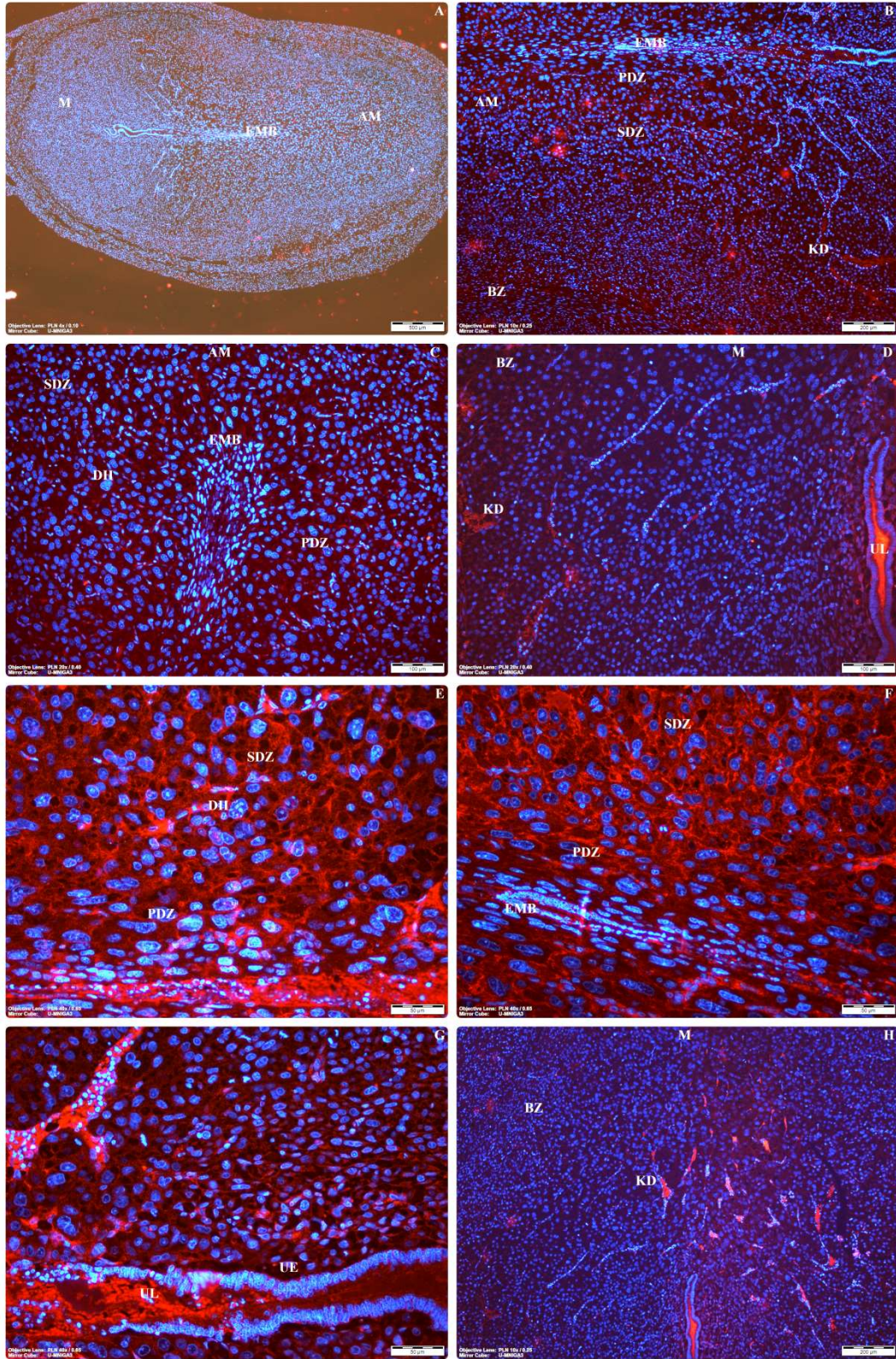
EMB: embriyo; PDZ: primer desidualizasyon zonu; SDZ: sekonder desidualizasyon zonu; BZ: bazal zon, KD: kan damarı (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



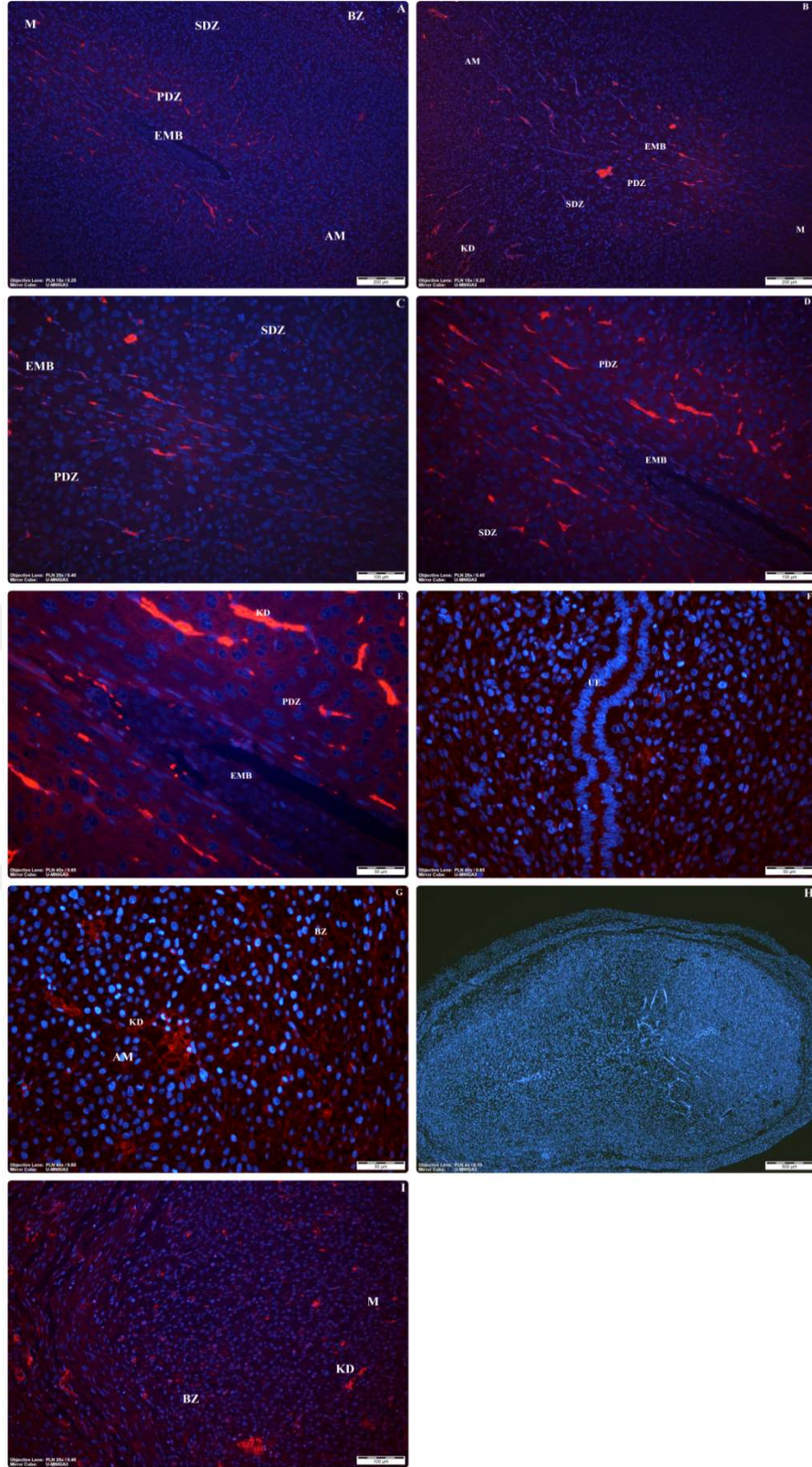
Şekil 4.27. Gebeliğin 7. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları (A-F) AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı; ok uçları: desidual hücreler.



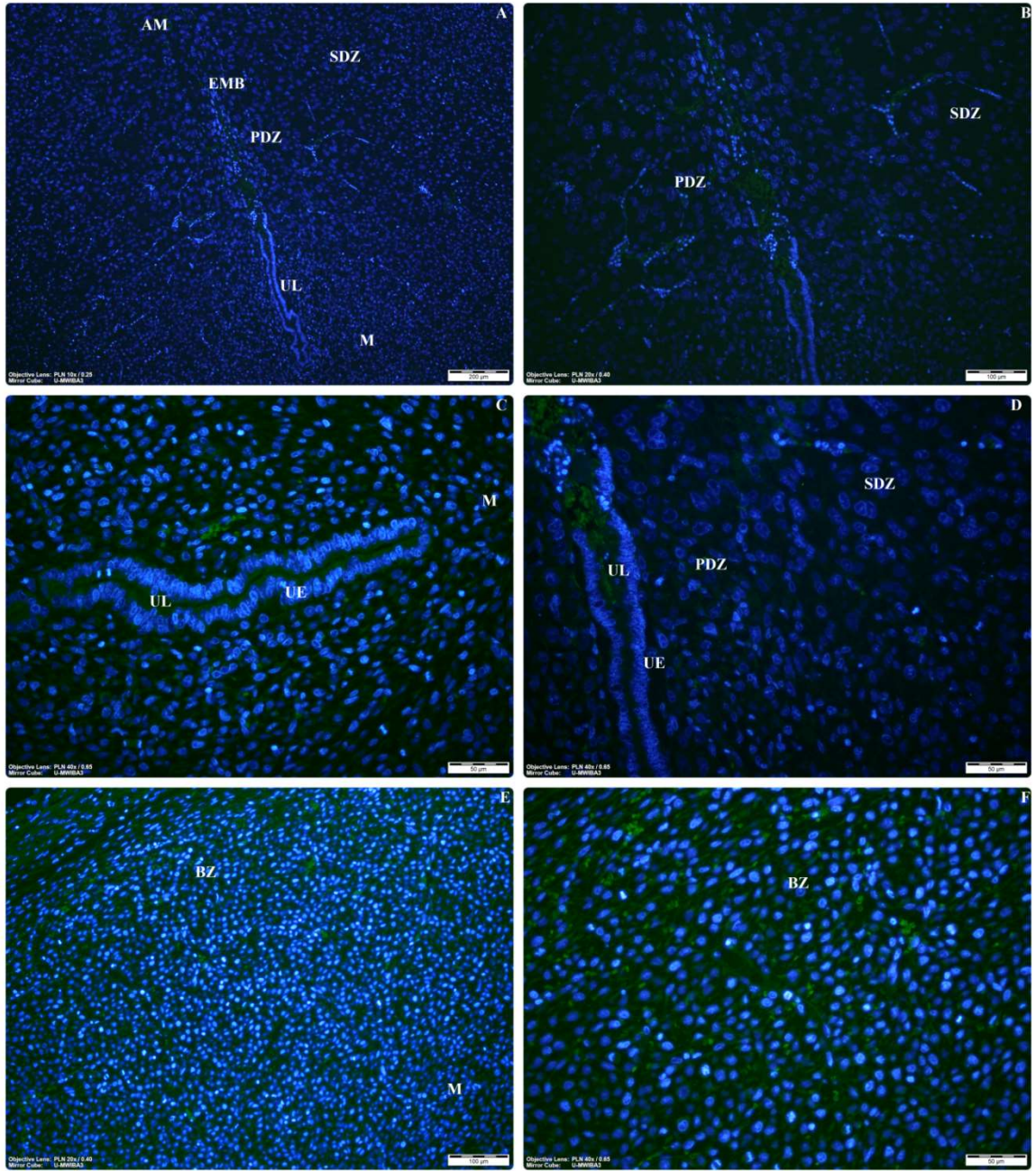
Şekil 4.28. Gebeliğin 7. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-F) negatif kontrol kesit: F, AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



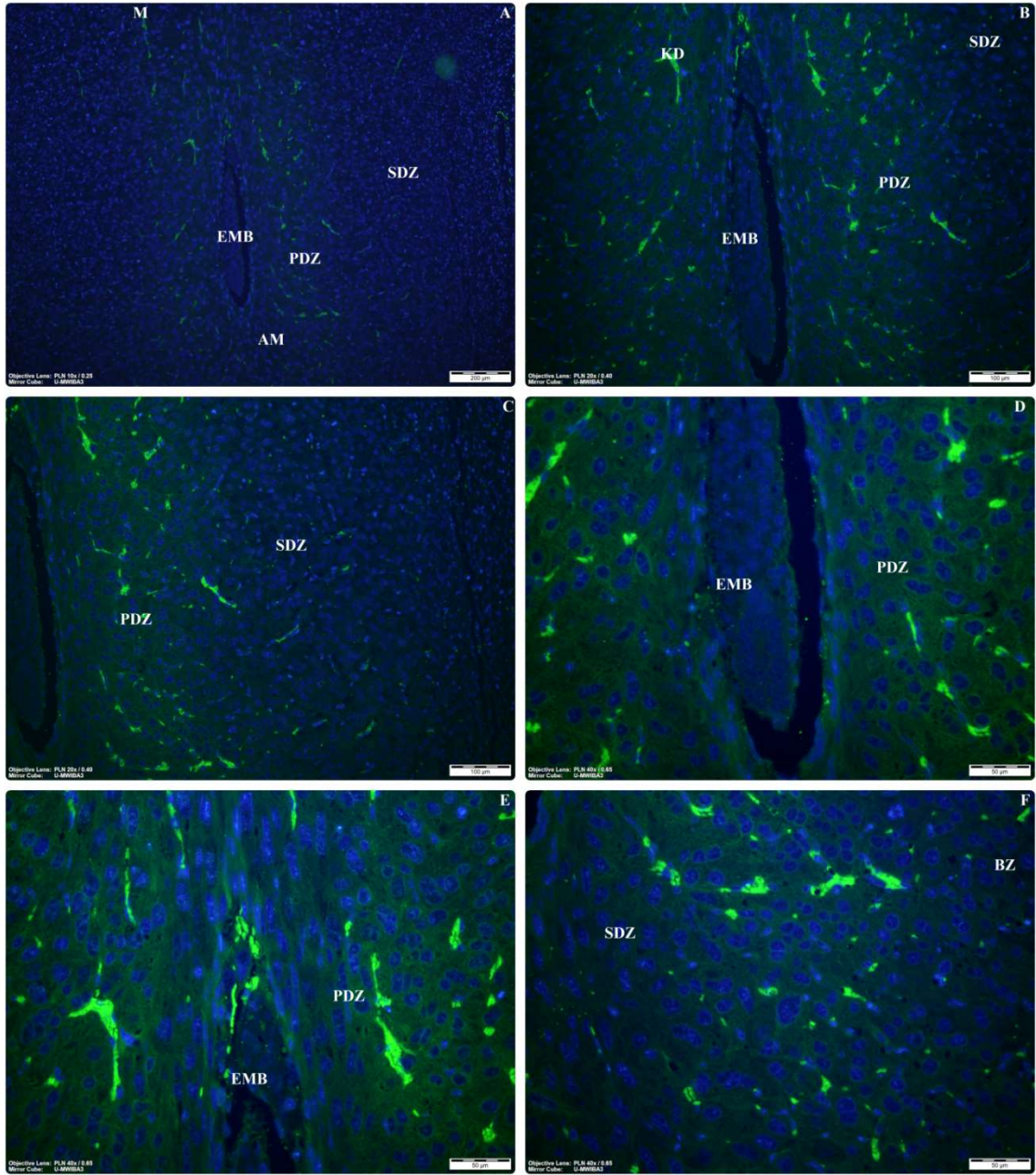
Şekil 4.29. Gebeliğin 7. gününde Beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-H) AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, GTC: dev trofoblast, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



Şekil 4.30. Gebeliğin 7. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları (A-I) negatif kontrol kesit: H, AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



Şekil 4.31. Gebeliğin 7. gününde LEF-1'in immünlokalizasyonları (A-F) AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



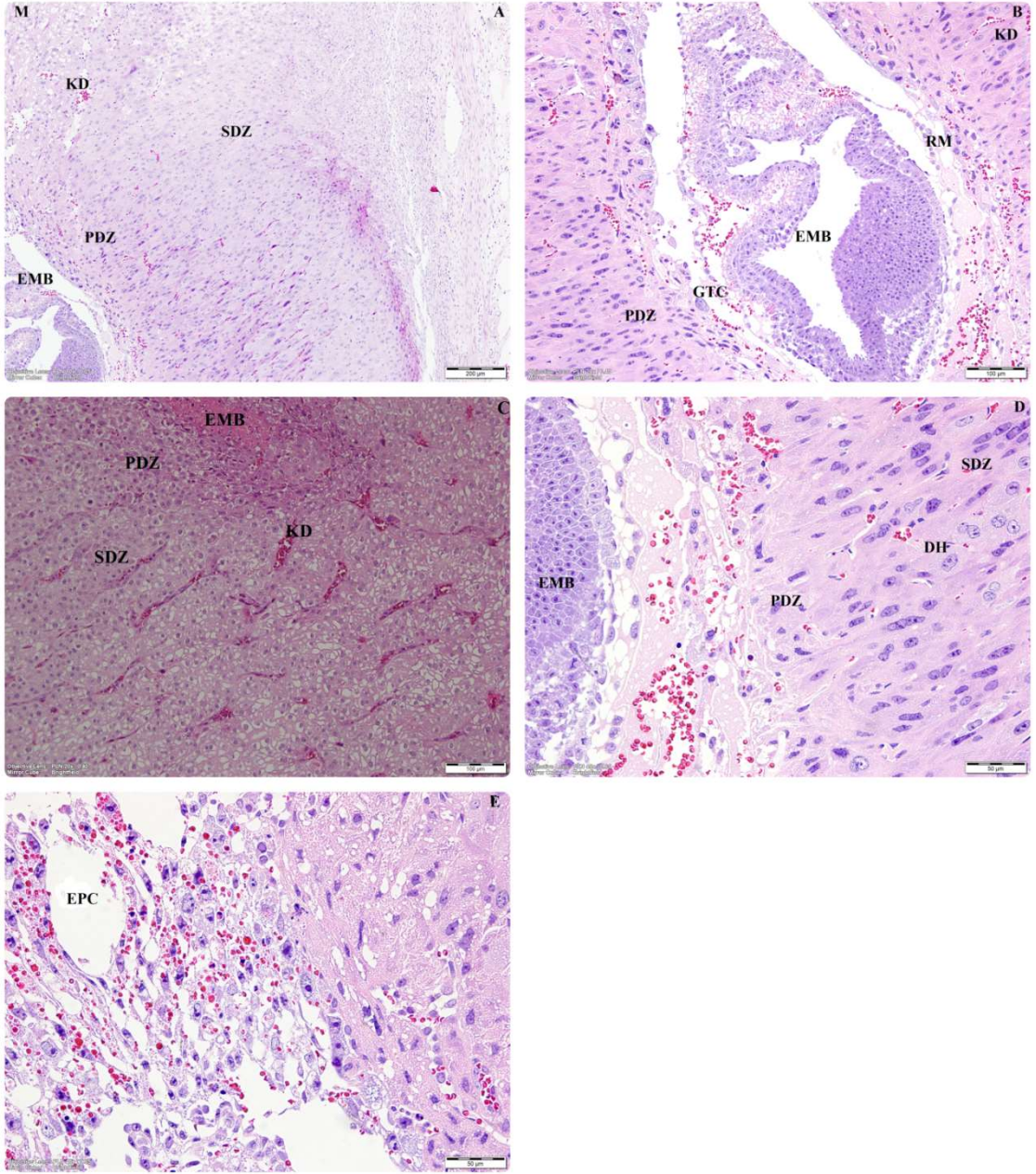
Şekil 4.32. Gebeliğin 7. gününde TCF'nin immünlokalizasyonları (A-F) AM: antimezometrial alan, M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, UL: uterus lümeni, UE: uterus epiteli, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.

4.2.3. Gebeliğin 8. Günü

Işık mikroskopik inceleme: Gebeliğin 8. gününde, implantasyon bölgesinden alınan farklı kesitlerde, antimezometrial desiduada büyük oranda bir genişleme olduğu tespit edilmiştir. Özellikle bu alanda olgun desidual hücreler gözlenmiştir. Yapılan incelemelerde blastosistin tamamen gömüldüğü ve embriyonun bulunduğu alandan periferde doğru dizilim gösteren, olgunlaşan desidual hücrelerden oluşan, implantasyon zonu izlenirken, bazale doğru gidildikçe sekonder desidual zon görülmüştür. Geride kalan daha dar bir bölgede henüz farklılaşmamış hücreler olan, stromal hücreler yer almaktadır. Bu hücreler ile bazal zon arasında kalan, lateral olarak mezometrial alanın mezometrial stromasına kadar sıkıca paketlenmiş ve daha çok yassı hücrelerden oluşmuş bir kapsül yapısı vardır. Embriyoya bakıldığında anti-mezometrial ve mezometrial alan boyunca bir düzlemde yer alarak, çevresindeki trofoblast hücreleri ve desidual hücreler ile ilişki halinde olduğu tespit edilmiştir.

Antimezometrial hücreler gebeliğin 7. günündeki hücelere oranla daha yüksek hacimde görünmektedir. Hücrelerin daha çok ökromatik nukleusa sahip olduğu gözlenmiştir. Mezometrial hücreler ise 7. gündeki hücrelerle aynı özellikte olmasına rağmen poligonal bir görünüme sahiptir. Özellikle 8. günde desidual hücrelerle beraber bu hücrelerin arasında çok sayıda lökosit içeren sinüzoidal kapillerler yer almaktadır. Mezometrial alanda ise bol miktarda kan damarı olduğu belirlenmiştir.

Embriyo bölgesinde uterus epitelinin dejenerasyonunun artmasıyla antimezometrial alanda, trofoblastların invazive olmasıyla bu hücrelerin yakınında maternal kan damarlarının yer aldığı ektoplasental kon şekillenmeye başlamış ve ektoplasental kon alanında vaskülarizasyonun arttığı gözlenmiştir. Embriyonun etrafında parietal endodermin dış kısmında Reichert membranı belirmeye başlamıştır. Bu membran dışında kalan 1-2 tabakalı trofoblast hücreleri, desidual hücrelerle beraber maternal kan damarları ile temas halindedir.



Şekil 4.33. Gebeliğin 8. gününde ışık mikroskop bulguları (H-E) (A-E), M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.

4.2.3. Gebeliğin 8. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları

Tablo 4.6. gebeliğin 8. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri kısaca özetlenmiştir.

Wnt-3; gebeliğin bu gününde Wnt-3'ün primer desidual zonda, 7. güne oranla çok kuvvetli ekspresyonu izlenirken, embriyo çevresinde 7. güne göre artmış kuvvetli bir immünreaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4.34; A,C). Sekonder desidual zon alanlarında orta kuvvetli lokalizasyon izlenirken antimezometrial alanda yer alan kan damarlarında orta kuvvetli ekspresyon belirlenmiştir (Şekil 4.34; B,D). Embriyo bölgesinde yer alan dev trofoblast hücrelerinde ekspresyon oldukça belirgindir. Embriyonun hemen dışında yer alan Reichert membranında, embriyoda görüldüğü gibi, orta kuvvetli immünlokalizasyon tespit edilmiştir (Şekil 4.34; D,E). Mezometrial alan bazal zonda ise zayıf ekspresyon görülmüştür. Maternal sinuzoid alanlarda orta kuvvetli immünlokalizasyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.34; F).

Wnt-7a; bu molekül embriyo bölgesinde kuvvetli immünlokalizasyon gösterirken, en kuvvetli immünreaksiyonun primer desidual zonda olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.35; A-C). Sekonder desidual bölgelerde ise orta kuvvetli ekspresyon meydana gelmiştir. Embriyo alanında bulunan dev trofoblast hücreleri, Reichert membranı ve maternal sinuzoidlerde ekspresyon çok kuvvetli ve orta kuvvetli düzeyde tespit edilmiştir (Şekil 4.35; B). Antimezometrial alanda bazal zon da dahil olmak üzere kan damarları, kapillerler endotelinde orta derecede immünreaksiyon görülmüştür. Desidual hücrelerin antimezometrial alanda belirgin şekilde hacimlerinin arttığı izlenmiştir (Şekil 4.35; E). Mezometrial alanda, endometrial bazal zon ve kan damarlarında kuvvetli derecede ekspresyon olduğu izlenmiştir (Şekil 4.35; F).

Beta-katenin; gebeliğin karşılaştırılan diğer iki gününe oranla ekspresyonun embriyo bölgesi ve embriyo alanlarında, primer ve sekonder desidual zonlar da dahil olmak üzere, maksimum seviyede izlendiği görülmüştür (Şekil 4.36; A-C). Antimezometrial alanda bazal zon ve kan damarlarında kuvvetli immünreaksiyon tespit edilmiştir. Antimezometrial alanda yer alan büyük desidual hücrelerin sınırları oldukça belirgindir (Şekil 4.36; E). Embriyo çevresinde iç kısımlara doğru trilaminar diskin oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.36; C). Mezometrial zonda kan damarları ve küçük kapiller oldukça fazladır. Ektoplasental kon alanlarında orta kuvvetli ekspresyon görülmüştür

(Şekil 4.36; B). Mezometrial alanda bazal zon orta kuvvetli izlenirken, kan damarlarında kuvvetli immünreaksiyon tespit edilmiştir. Mezometrial alan stromasında ok ucunda gösterilen alanda bez epiteli ve bez epiteli sınırları izlenmiştir. Bez epiteli hücre sınırlarında orta kuvvetli ekspresyon görülmüştür (Şekil 4.36; G).

Kaspaz-9; kaspaz-9 molekülünün gebeliğin 8. gününde en çok eksprese olduğu izlenmiştir. Embriyo ve çevresinde çok kuvvetli immünreaksiyon göstermiştir. Embriyo çevresinde birden fazla görünen dev trofoblastlarda ekspresyon oldukça kuvvetlidir (Şekil 4.37;A-C). Primer desidual zon embriyo ile aynı ekspresyonu gösterirken, sekonder desidual zona gidildikçe kuvvetli immünlokalizasyon izlenmiştir (Şekil 4.37; E,F). Embriyo çevresindeki kan damarları da kuvvetli lokalizasyon gösterirken, bazal zonda da kuvvetli immünreaksiyon görülmüştür (Şekil 4.37; E,F). Mezometrial bazal zonda ekspresyon orta kuvvetliken, kan damarları ve kapillerde kuvvetli immünfloresan ışımaya yapmıştır (Şekil 4.37; D). Kapsül yapısı da oldukça net izlenmiştir (Şekil 4.37;A).

LEF-1; molekülüne bakıldığında embriyo alanında kuvvetli immünfloresan lokalizasyon izlenirken, embriyo alanında trilaminar disk oldukça belirgindir (Şekil 4.38; A,B,C). Dev trofoblastlar ve Reichert membranında da orta kuvvetli immünreaksiyon görülmüştür. Primer desidual ve sekonder desidual zonda orta kuvvetli ekspresyon vardı (Şekil 4.38; A,B). Bazal zon kuvvetli immünreaksiyon gösterirken kan damarlarında orta kuvvetli immünlokalizasyon görülmüştür (Şekil 4.38; E). Mezometrial alanda endometrial bazal zonda kuvvetli immünreaksiyon izlenirken, kan damarlarında orta kuvvetli lokalizasyon görülmüştür (Şekil 4.38; F).

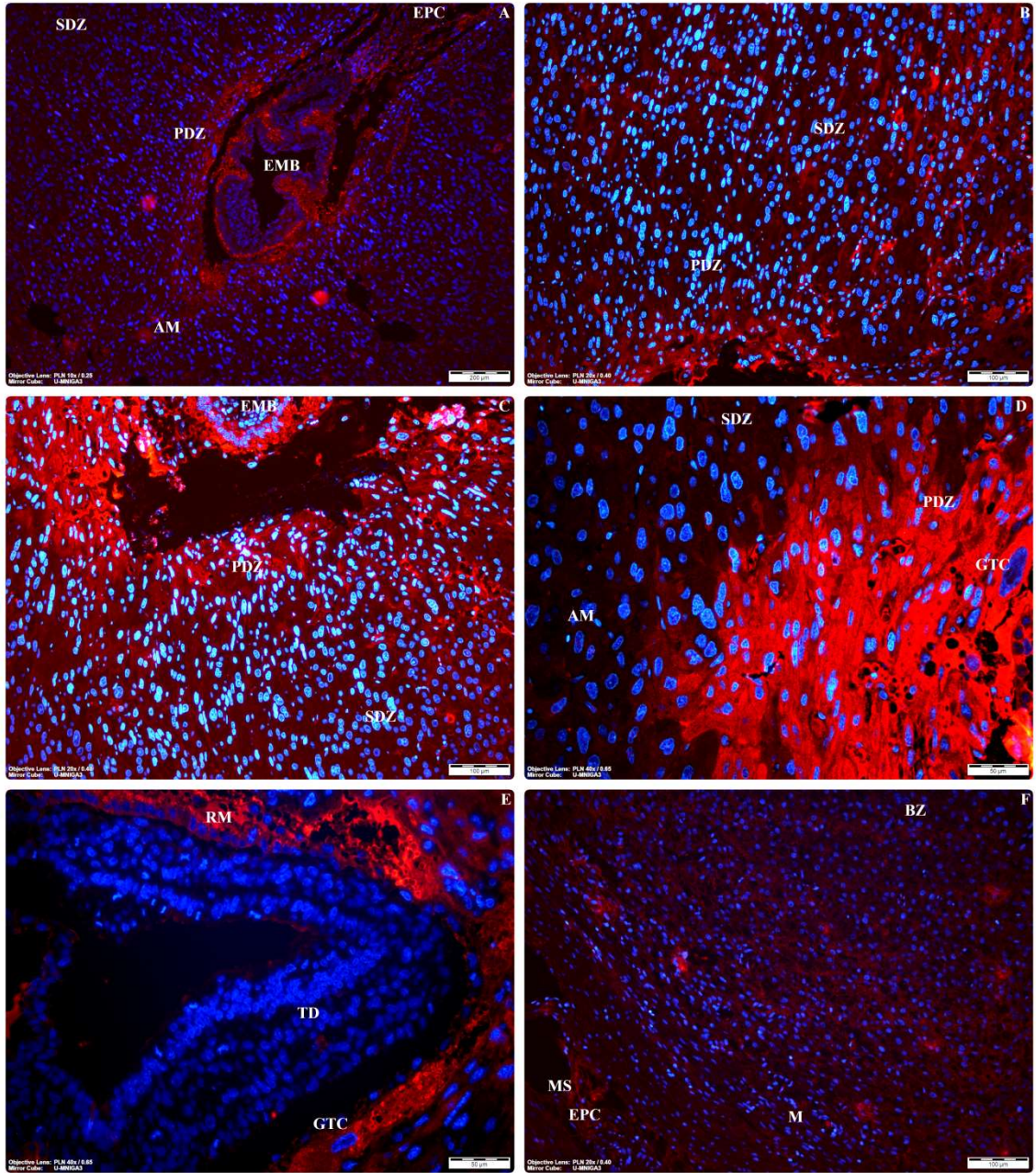
TCF; gebeliğin 8. gününde spesifik bir immünreaksiyon göstermiştir (Şekil 4.39; B,E). Embriyo bölgesinde orta kuvvetli immünlokalizasyon gösterirken, aslında sitoplazmadan çok çekirdeği boyadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.39; D,E). Primer ve sekonder desidualizasyon zonunda, stroma alanlarında orta kuvvetli ekspresyon göstermiştir. Fakat bu alanlarda daha çok desidual hücrelerin çekirdek kısımlarında lokalize olduğu izlenmiştir. Oklarla gösterilen hücrelerde çekirdeğin çok kuvvetli immünreaksiyon verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.39; D,E,F). Primer desidual zon çevresinde, bazı desidual hücrelerin sitoplazmalarında orta kuvvetli ekspresyon izlenirken, antimezometrial alanda endometrial bazal zon bölgesinde de orta kuvvetli immünreaksiyon görülmüştür. Mezometrial alanda büyük kan damarlarında orta kuvvetli ekspresyon izlenirken bazal zonda orta kuvvetli immünlokalizasyon

izlenmiştir. Trilaminar disk hücrelerinde de sitoplazmadan çok çekirdekte ekspresyon olmuştur (Şekil 4.39; E,G).

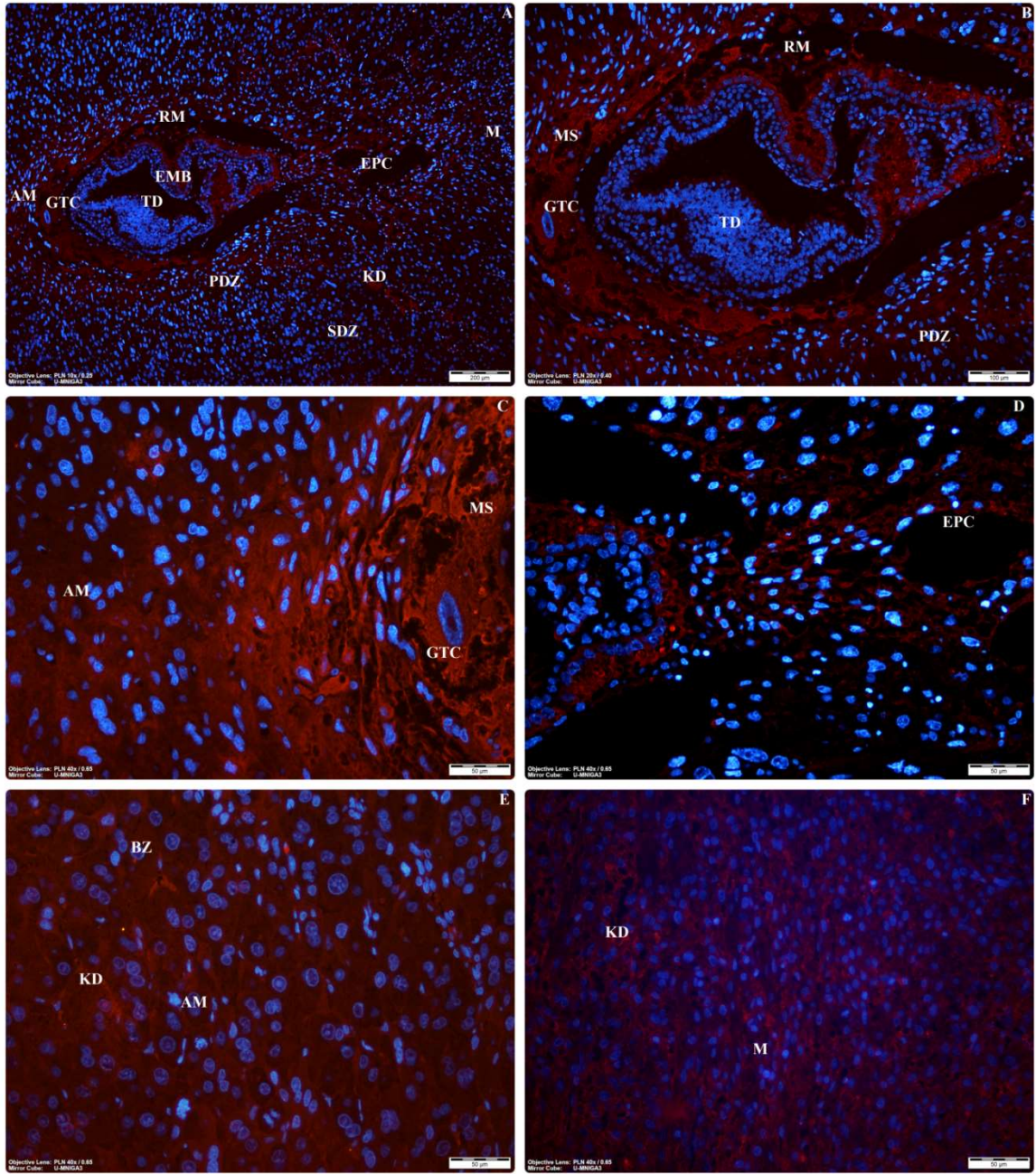
Tablo 4.6. Gebeliğin 8. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlökalisasyon düzeyleri

8. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL DESİDUA					MEZOMETRİAL DESİDUA	
	EMB	PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ	KD
Wnt-3	+++	++++	++	++	+++	+	++
Wnt-7a	+++	++++	++	++	++	+++	+++
Beta-katenin	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
Kaspaz-9	++++	++++	+++	+++	+++	++	++
LEF-1	+++	++	++	+++	++	+++	++
TCF	++	++	++	++	++	+++	++

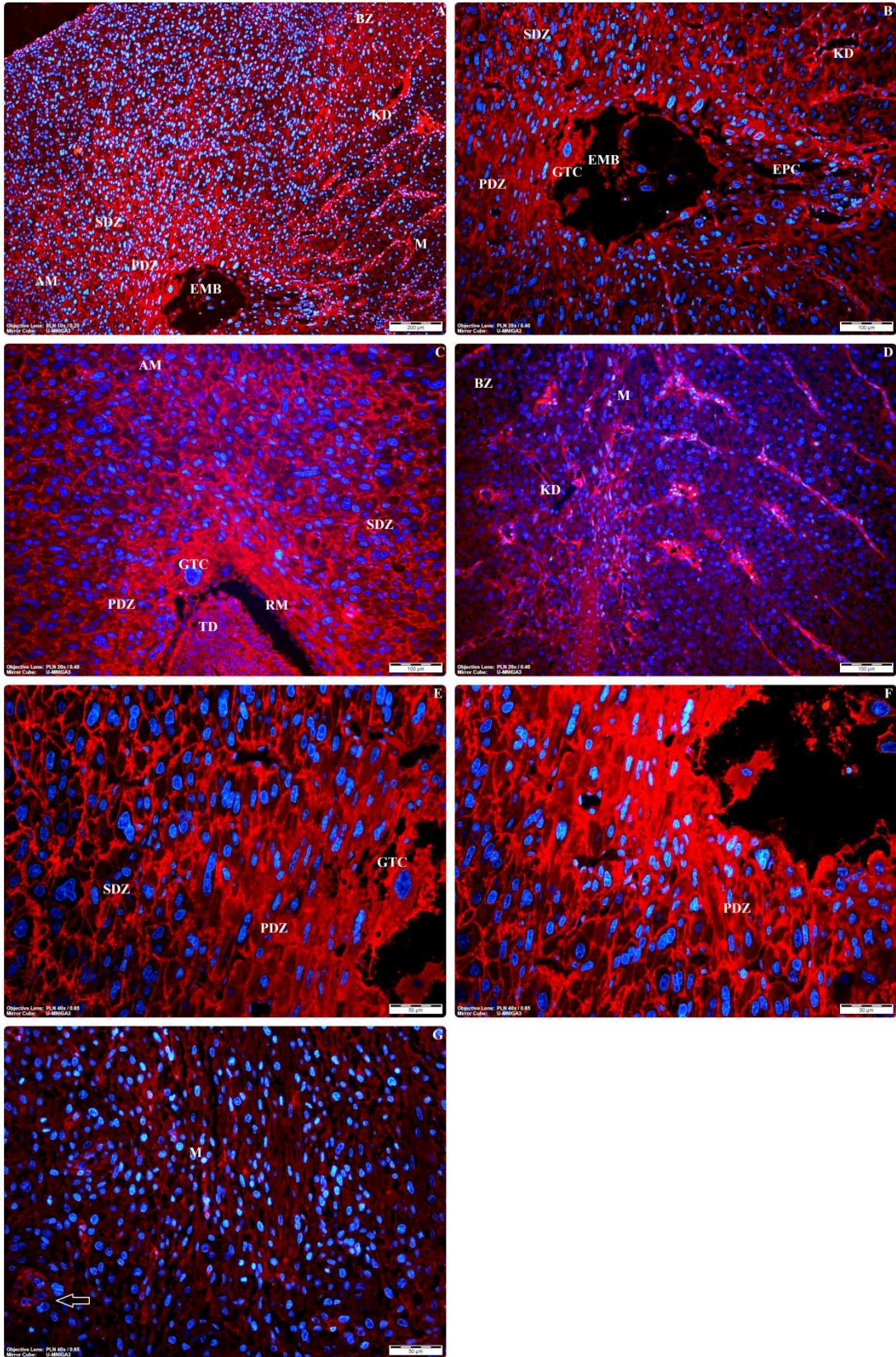
EMB: embriyo; PDZ: primer desidualizasyon zonu; SDZ: sekonder desidualizasyon zonu; BZ: bazal zon, KD: kan damarı (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



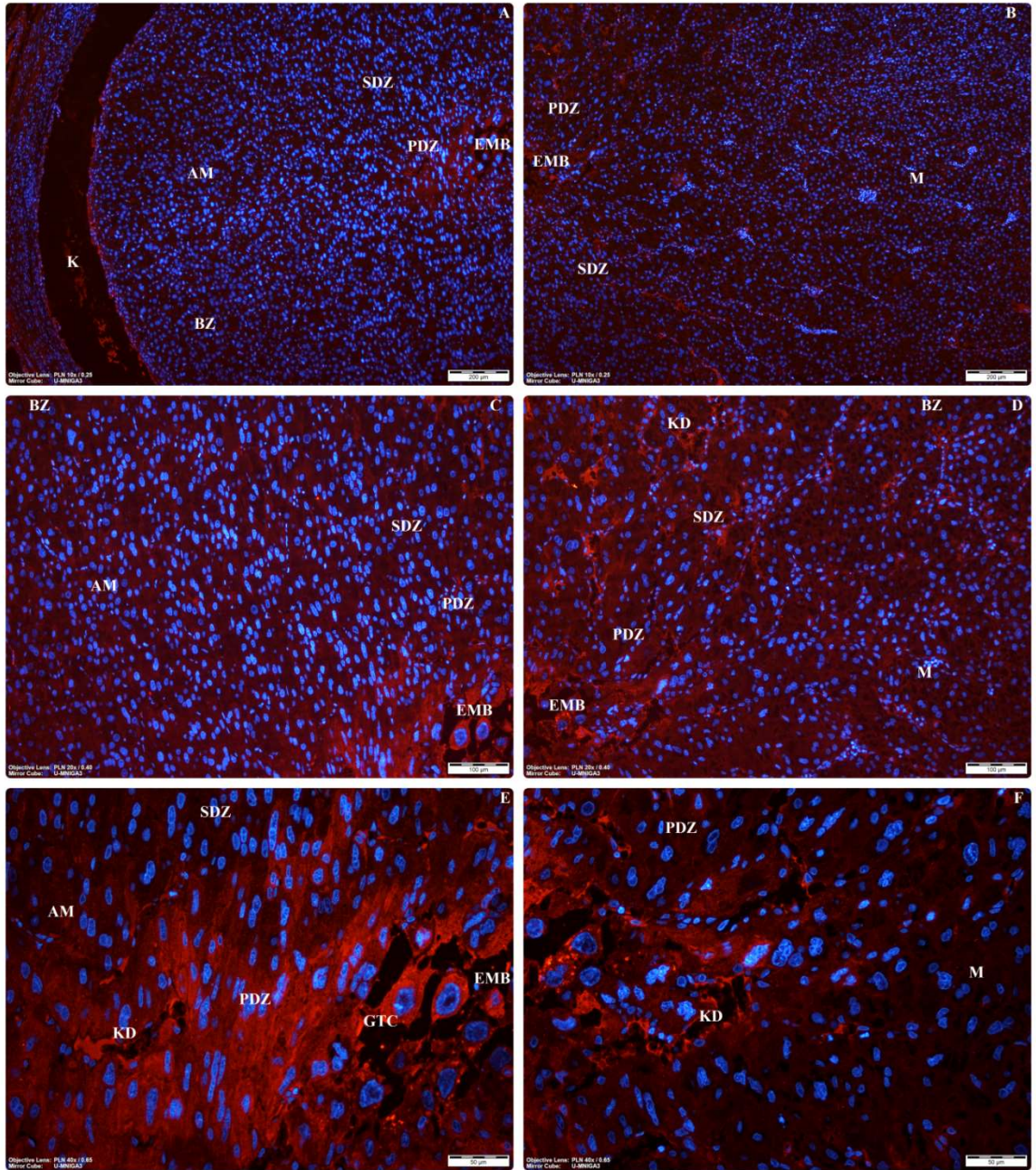
Şekil 4.34. Gebeliğin 8. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonu (A-F), M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı.



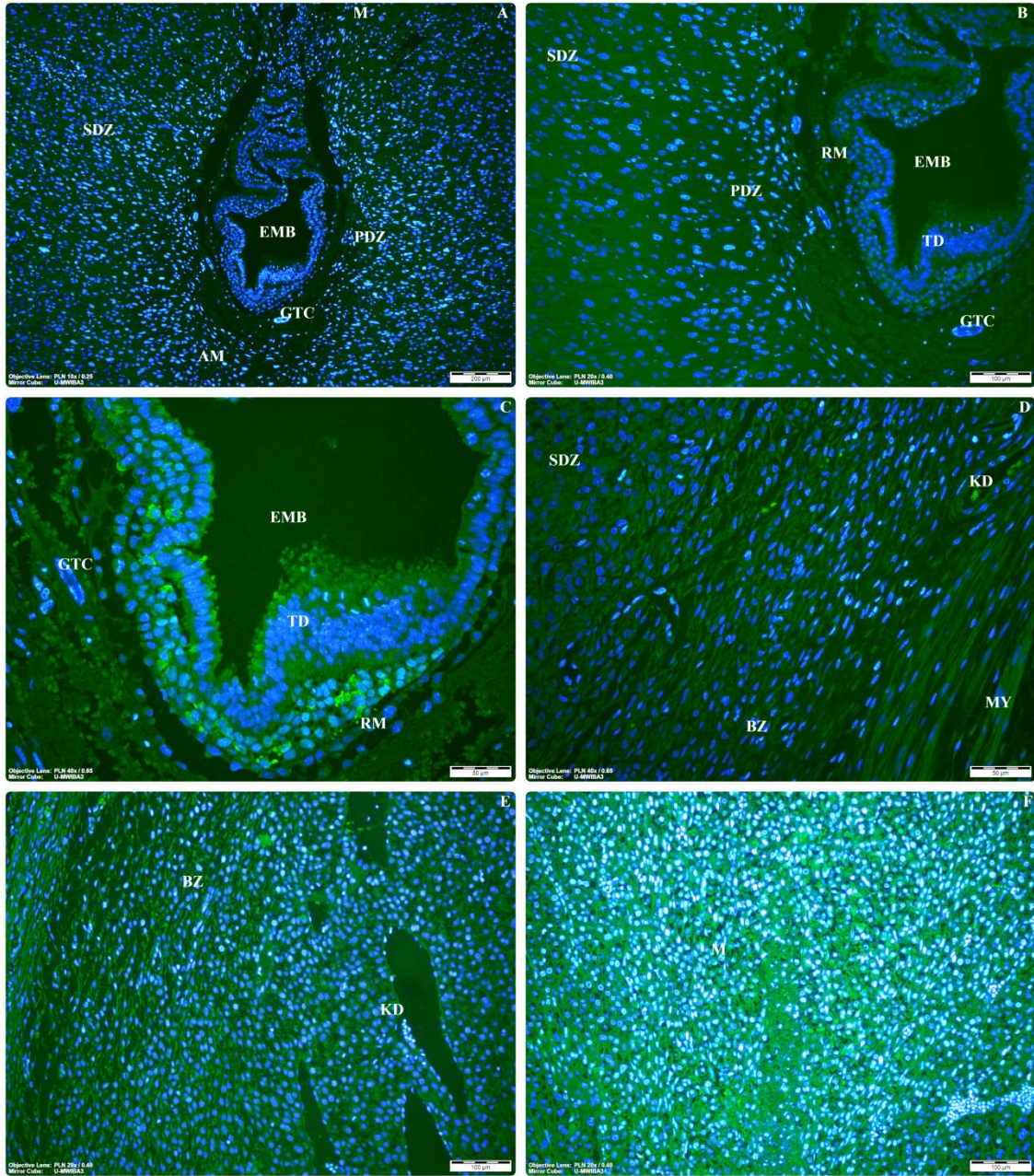
Şekil 4.35. Gebeliğin 8. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonu (A-F) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplantal kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı.



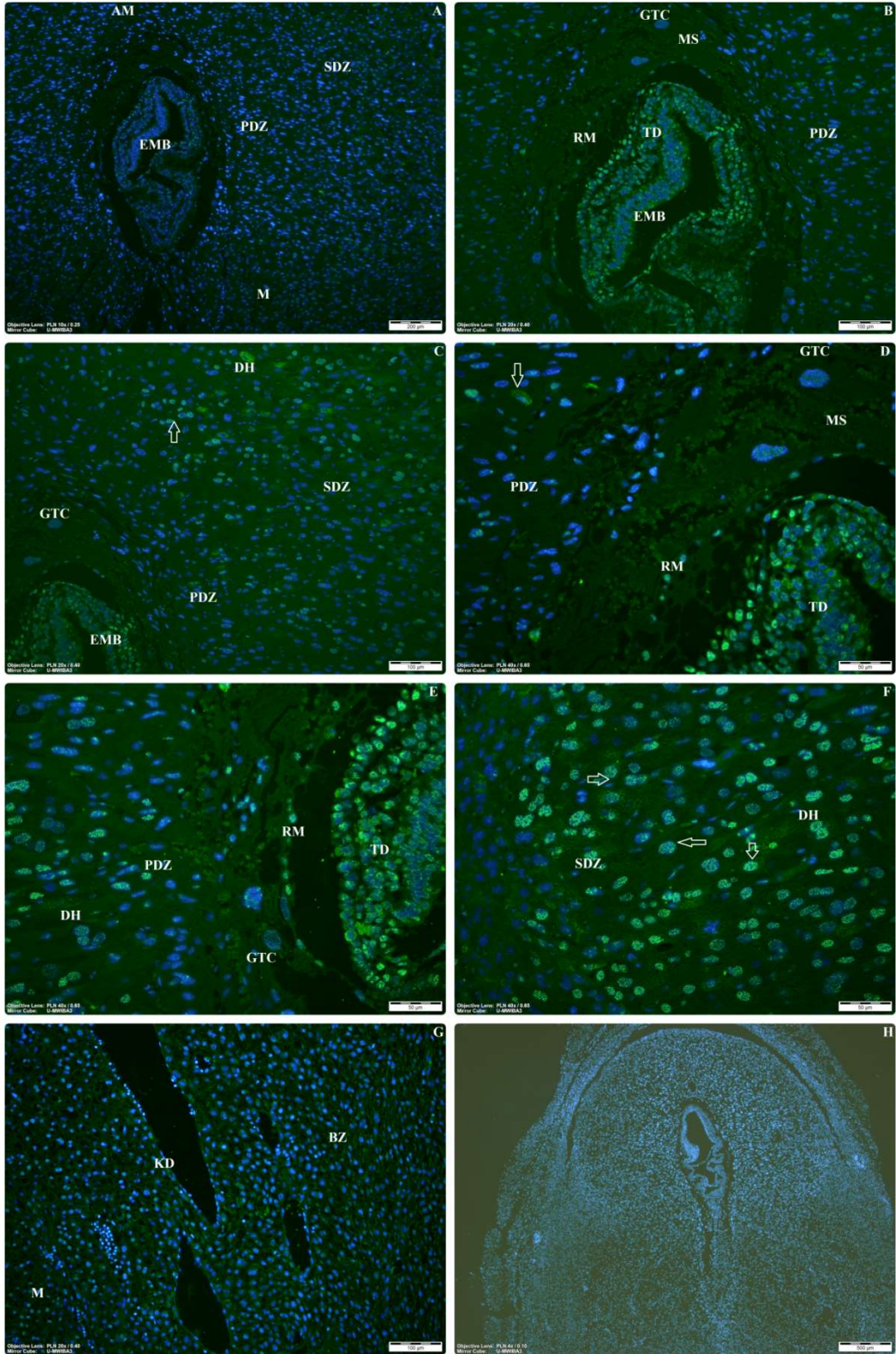
Şekil 4.36. Gebeliğin 8. gününde beta-kateninin immünlokalizasyonu (A-G) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı, Ok ucu: bez epiteli.



Şekil 4.37. Gebeliğin 8. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonu (A-F) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplazental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı, K: kapsül.



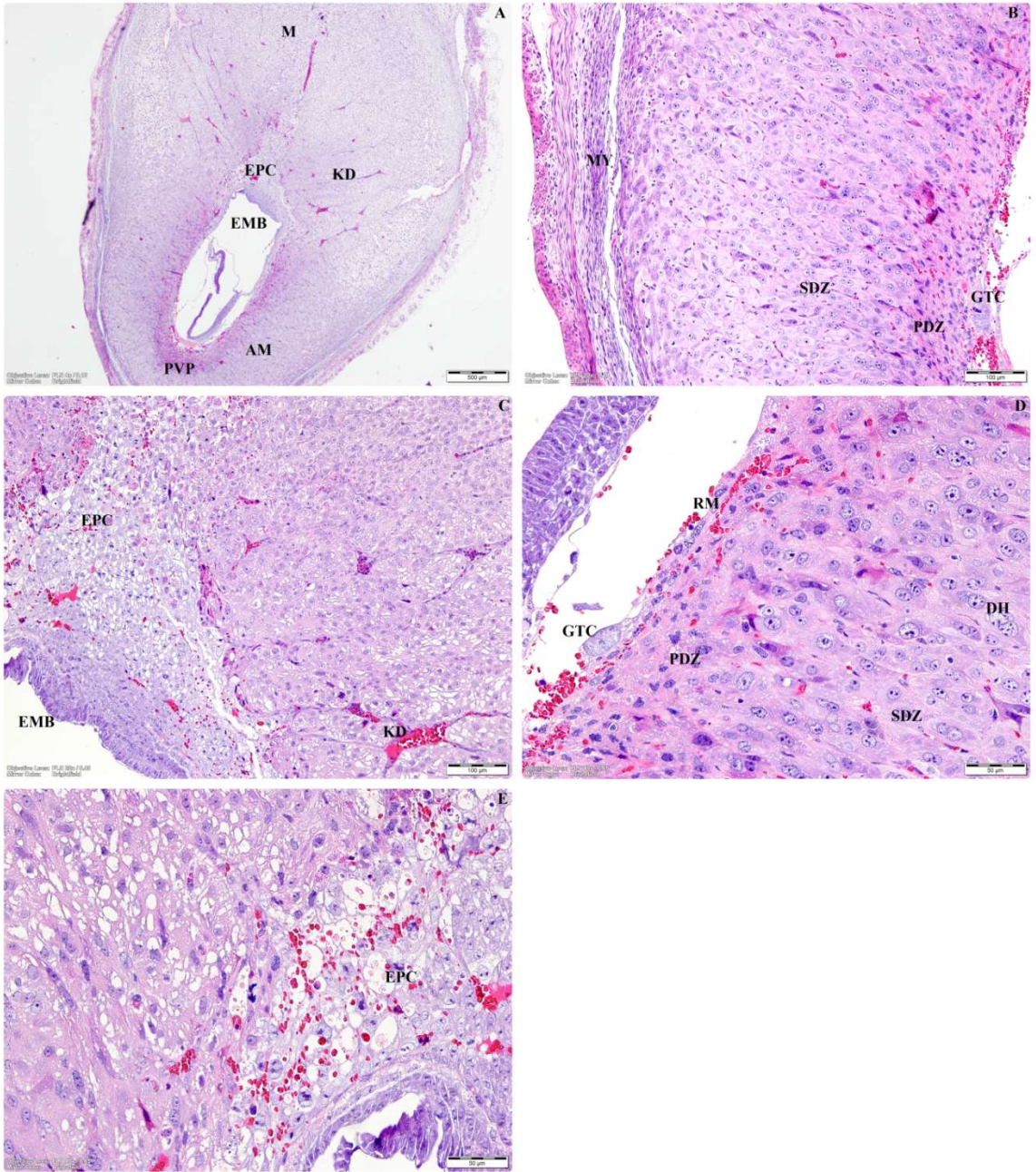
Şekil 4.38. Gebeliğin 8. gününde LEF-1'in immünlokalizasyonu (A-F) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı.



Şekil 4.39. Gebeliğin 8. gününde TCF'nin immünlokalizasyonu (A-G) negatif kontrol: H; M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplantal kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, MS: maternal sinuzoid, TD: trilaminar disk, KD: kan damarı, DH: desidual hücre, Ok ucu: desidual hücre.

4.2.4. Gebeliğin 9. Günü

Işık mikroskopik inceleme: Gebeliğin 9. gününde embriyo ve uterus hacminin arttığı görülmüştür. İmplantasyon alanında stromal hücrelerin antimezometrial alanda desidual hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir. Bu farklılaşma yalnız antimezometrial alandaki hücrelerde değil, mezometrial bölgedeki hücrelerde de görülmüştür (Şekil 4.40; A, B). Endometriumun mezometrial alanında, uterus epiteli ve uterus lümeninin büyük bir kısmı tamamen kapanmıştır. Bu kapanan alanlarda kan damarları ve bol miktarda desidual hücrelerin varlığı saptanmıştır (Şekil 4.40; A). Desidual kapsül diğer günlere oranla daha belirgindir. Embriyonik tabakalar oldukça belirgin izlenirken, Reichert membranı dışındaki trofoblastların antimezometrial alanda, kan damarları ile beraber vitellus kesesini oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 4.40; B, D). Ektoplasental kon ise mezometrial alanda şekillenmiştir (Şekil 4.40; E).



Şekil 4.40. Gebeliğin 9. gününde ışık mikroskop bulguları (H-E) (A-E) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplazental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı, PVP: Primitif vitellüs kesesi plasentası.

4.2.4. Gebeliğin 9. gününde Wnt sinyal moleküllerinin (Wnt-3, Wnt-7a, beta-katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF) immünlokalizasyonları

Wnt-3; bu dönemde Wnt-3 embriyo bölgesinde kuvvetli immünlokalizasyon gösterirken, primer desidual ve sekonder desidual zonların etrafında orta kuvvetli eksprese olmuştur (Şekil 4.41; A, C, E). Antimezometrial alanın kan damarları ve bazal zonda kuvvetli immünreaksiyon meydana gelmiştir (Şekil 4.41; A). Embriyo çevresinde, dev trofoblast hücreleri oldukça belirgindir (Şekil 4.41; C, E). Mezometrial alanda bazal zon ve kan damarlarındaki lokalizasyonun derecesi kuvvetlidir (+++) (Şekil 4.41; B, D, F).

Wnt-7a; gebeliğin 9. gününde Wnt-7a embriyo çevresinde daha kuvvetli ekspresyon gösterirken, primer ve sekonder desidual alanlarda orta kuvvetli immünlokalize olmuştur (Şekil 4.42; A, C). Antimezometrial bölgede kan damarlarında ekspresyon yok denecek kadar zayıftır. Bazal zona doğru gidildikçe kuvvetli bir immünreaksiyon gerçekleşmiştir. Yassı hücrelerden oluşmuş embriyo etrafındaki Reichert membranı ve dev trofoblast hücrelerinde immünlokalizasyon devam etmektedir (Şekil 4.42; A). Mezometrial alanda bazal zon orta kuvvetli ekspresyon gösterirken, kan damarları ve kapillerde kuvvetli immünreaksiyon meydana gelmiştir (Şekil 4.42; E, F).

Beta-katenin; sitozolik bir protein olan beta-katenin bu dönemde embriyo ve çevresinde çok kuvvetli (++++) immünreaksiyon göstermiştir (Şekil 4.43; A, C). Sitoplazmada oldukça belirgin bir lokalizasyon gösteren bu molekülün, antimezometrial alanda primer desidual bölgede ve sekonder desidual alanda çok kuvvetli ekspresyonu saptanmıştır (Şekil 4.43; B, C, F). Dev trofoblastlar, Reichert membranı ve maternal sinuzoid kapillerler oldukça belirgindir (Şekil 4.43; E). Embriyo çevresinde, hücre sınırlarında da çok kuvvetli immünreaksiyon gerçekleşmiştir. Bazal zonda ekspresyon, diğer alanlara göre daha az kuvvetlidir (Şekil 4.43; C). Mezometrial bölgede bazal zon ve kan damarlarında kapillerler de dahil çok kuvvetli immünreaksiyon görülmüştür (Şekil 4.43; D).

Kaspaz-9; gebeliğin 9. gününde kaspaz-9 ekspresyonu daha çok embriyo çevresinde ve antimezometrial alanın bazal zonunda tespit edilmiştir (Şekil 4.44; A, B, G). Embriyo etrafındaki desidual hücrelerde orta kuvvetli ekspresyon vardır. Embriyo sınırından primer desidual zona ve sekonder desidual zona geçtikçe ekspresyon orta kuvvetli olarak izlenmiştir (Şekil 4.44; C, D). Bazal zonda primer desidual alanlara göre kuvvetli

bir immünreaksiyon vardır. Antimezometrial bölgede kan damarlarında da kuvvetli lokalizasyon görülmüştür. Mezometrial alanda bazal zon ve kan damarlarında kaspaz-9 immünlokalizasyonu güçlü olarak izlenmiştir (Şekil 4.44; I).

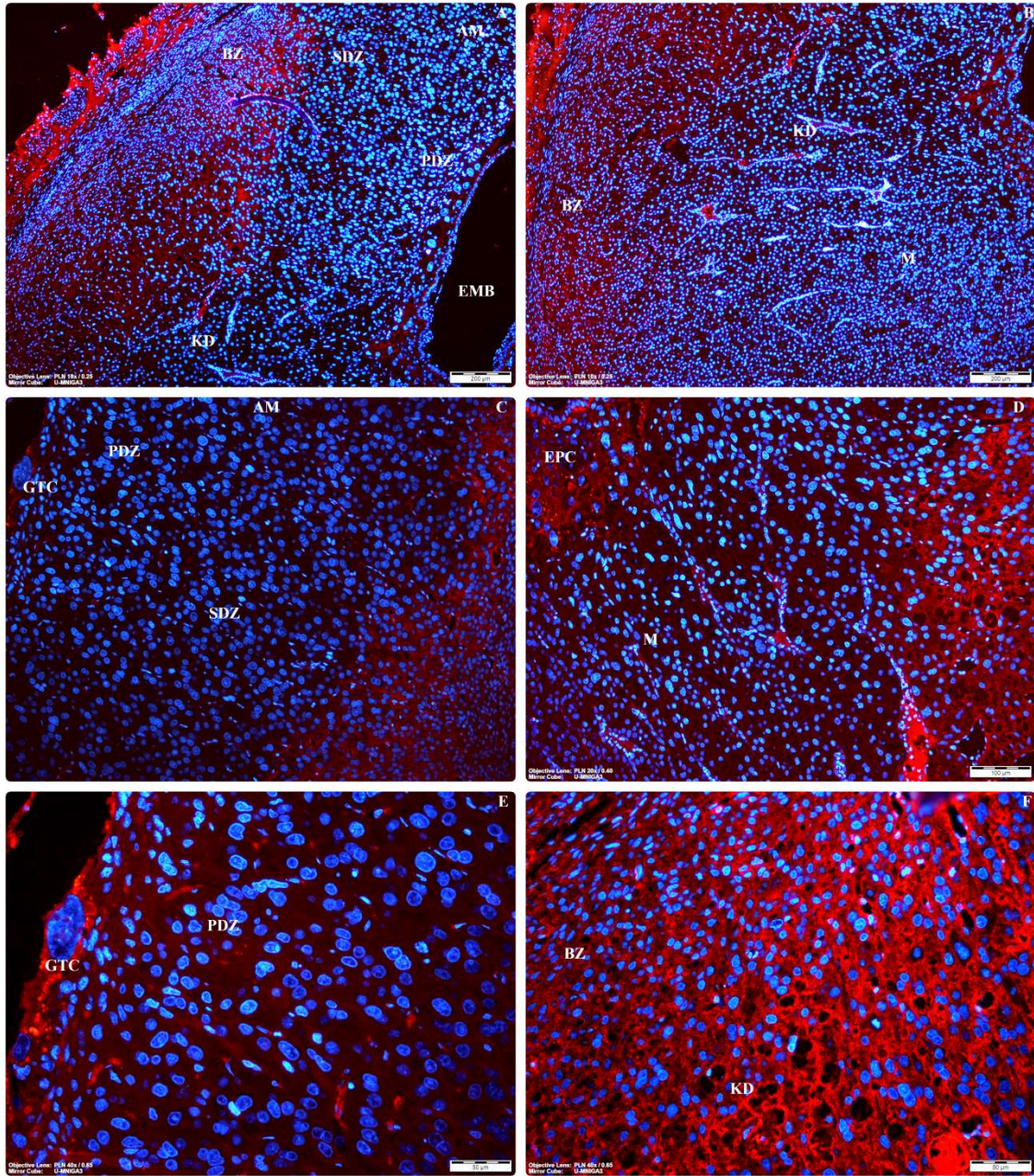
LEF-1; bu dönemde, embriyo ve embriyoyu oluşturan diğer hücreler bir bütün olarak değerlendirildiğinde, embriyo çevresinde orta kuvvetli immünreaksiyon gerçekleşmiştir (Şekil 4.45; A, B). Dev trofoblast hücreleri ışınal dizilim göstermiş olup, primer desidual zon ile beraber kuvvetli ekspresyon olmuştur (Şekil 4.45; D). Reichert membranı sınırları oldukça belirgindir. Trilaminar disk net bir şekilde görülmüştür. Sekonder desidual zonun, primer desidual zon gibi immünlokalizasyonu kuvvetlidir (Şekil 4.45; E). Antimezometrial alanda yer alan kan damarları, kan damarı stroması da dahil bazal zonla beraber kuvvetli lokalizasyon meydana gelmiştir (Şekil 4.45; F). Mezometrial alan bazal zonu ise, tıpkı diğer alanlar gibi stroma da dahil kuvvetli ekspresyon göstermiştir (Şekil 4.45; H, I).

TCF; molekülünün gebeliğin bu gününde, sitoplazma alanlarından çok çekirdek içerisinde lokalize olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.46; B). Embriyo çevresinde kuvvetli immünreaksiyon izlenirken, primer desidual zonda orta kuvvetli immünreaksiyon vardı. (Şekil 4.46; A, C). Sekonder desidual alanlarda ise ekspresyon kuvvetli düzeydedir (Şekil 4.46; D, F). Ok ile gösterilmiş desidual hücrelerin çekirdeklerine bakıldığında, kuvvetli bir lokalizasyon olduğu görülmektedir (Şekil 4.46; E, F). Kan damarları ve kapillerlerde orta derecede ekspresyon varken bazal zonda yeniden kuvvetli lokalizasyon izlenmiştir. Bazı desidual hücrelerin çok az bir kısmında, sitoplazmada lokalizasyon görülmüştür (Şekil 4.46; F). Trilaminar disk hücrelerinde, çekirdek içerisinde çok az ekspresyon görülürken, Reichert membranı sınırlarında da ekspresyon vardır. Mezometrial alanda bazal zon, kuvvetli pozitif bir reaksiyon gösterirken, kan damarları da orta derecede immünreaksiyon göstermiştir (Şekil 4.46; G).

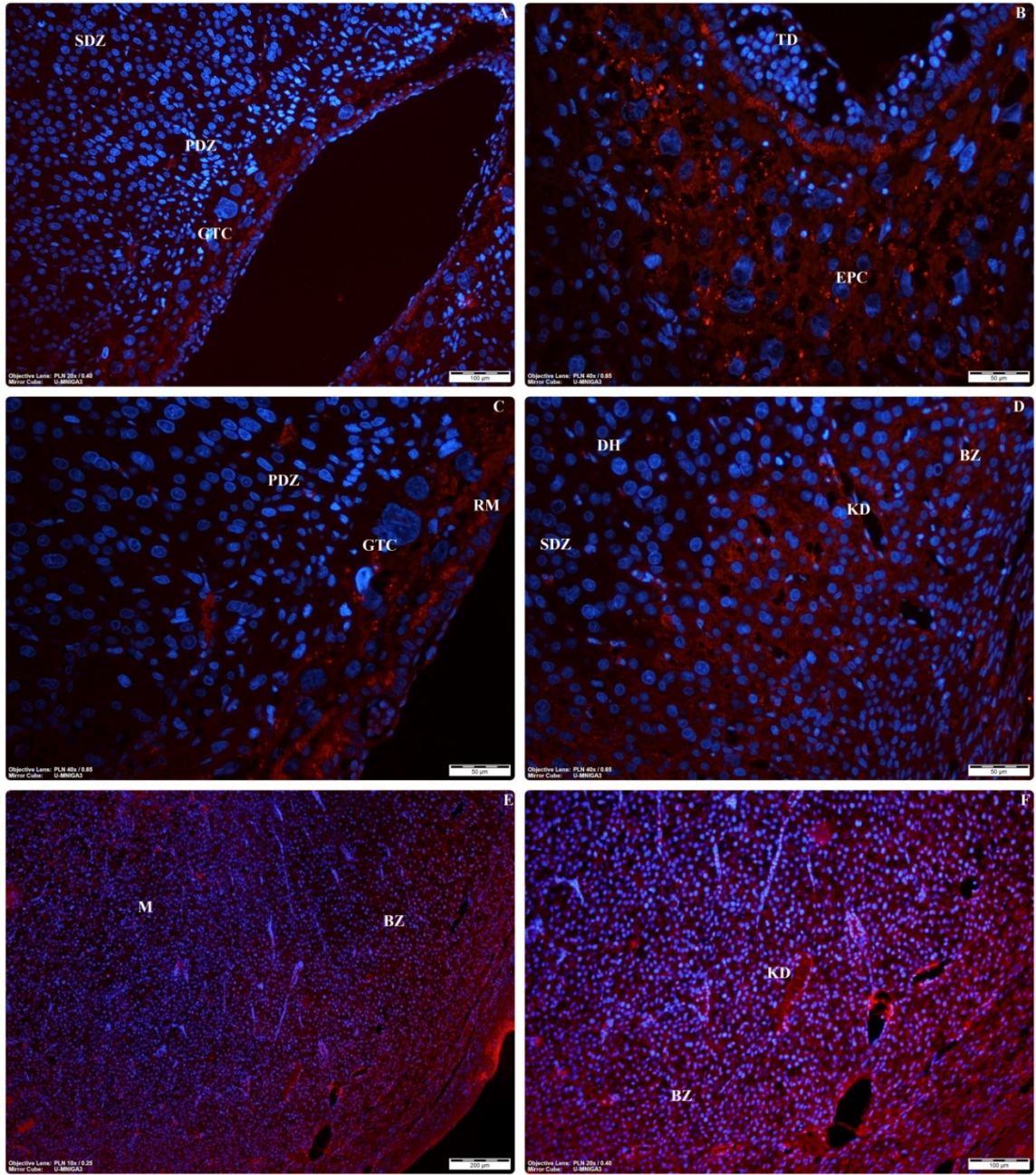
Tablo 4.7. Gebeliğin 9. gününde Wnt sinyal moleküllerinin immünlokalizasyon düzeyleri

9. GÜN	ANTI-MEZOMETRİAL DESİDUA					MEZOMETRİAL DESİDUA	
	EMB	PDZ	SDZ	BZ	KD	BZ	KD
Wnt-3	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
Wnt-7a	+++	++++	++	++	++	+++	+++
Beta-katenin	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++
Kaspaz-9	+++	++	++	+++	+++	+++	+++
LEF-1	++	+++	+++	+++	+++	+++	++
TCF	+++	++	+++	+++	++	+++	++

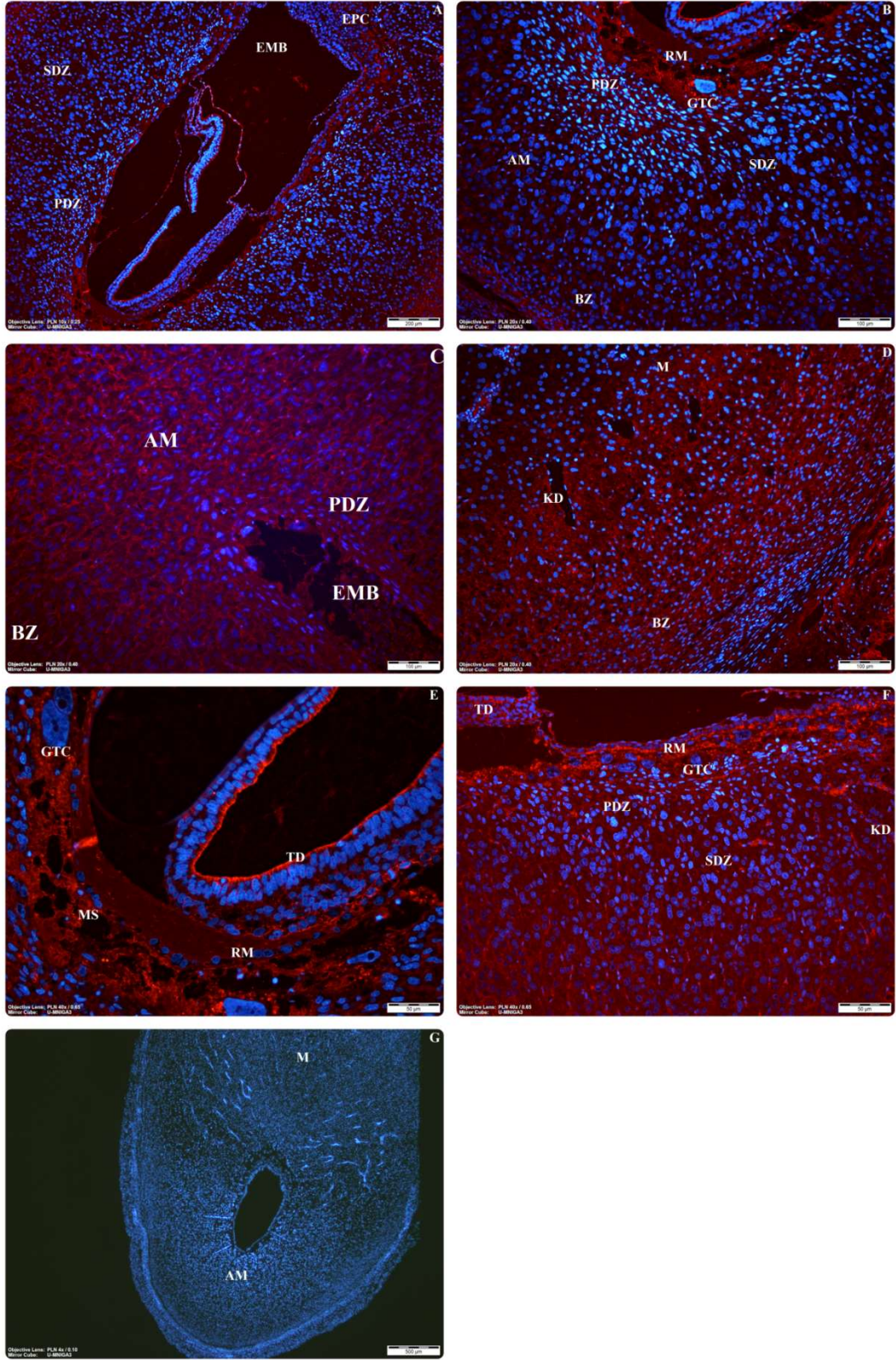
EMB: embriyo; PDZ: primer desidualizasyon zonu; SDZ: sekonder desidualizasyon zonu; BZ: bazal zon, KD: kan damarı (++++: çok kuvvetli ekspresyon; +++: kuvvetli ekspresyon; ++: orta kuvvetli ekspresyon; +: zayıf ekspresyon; -: ekspresyon yok).



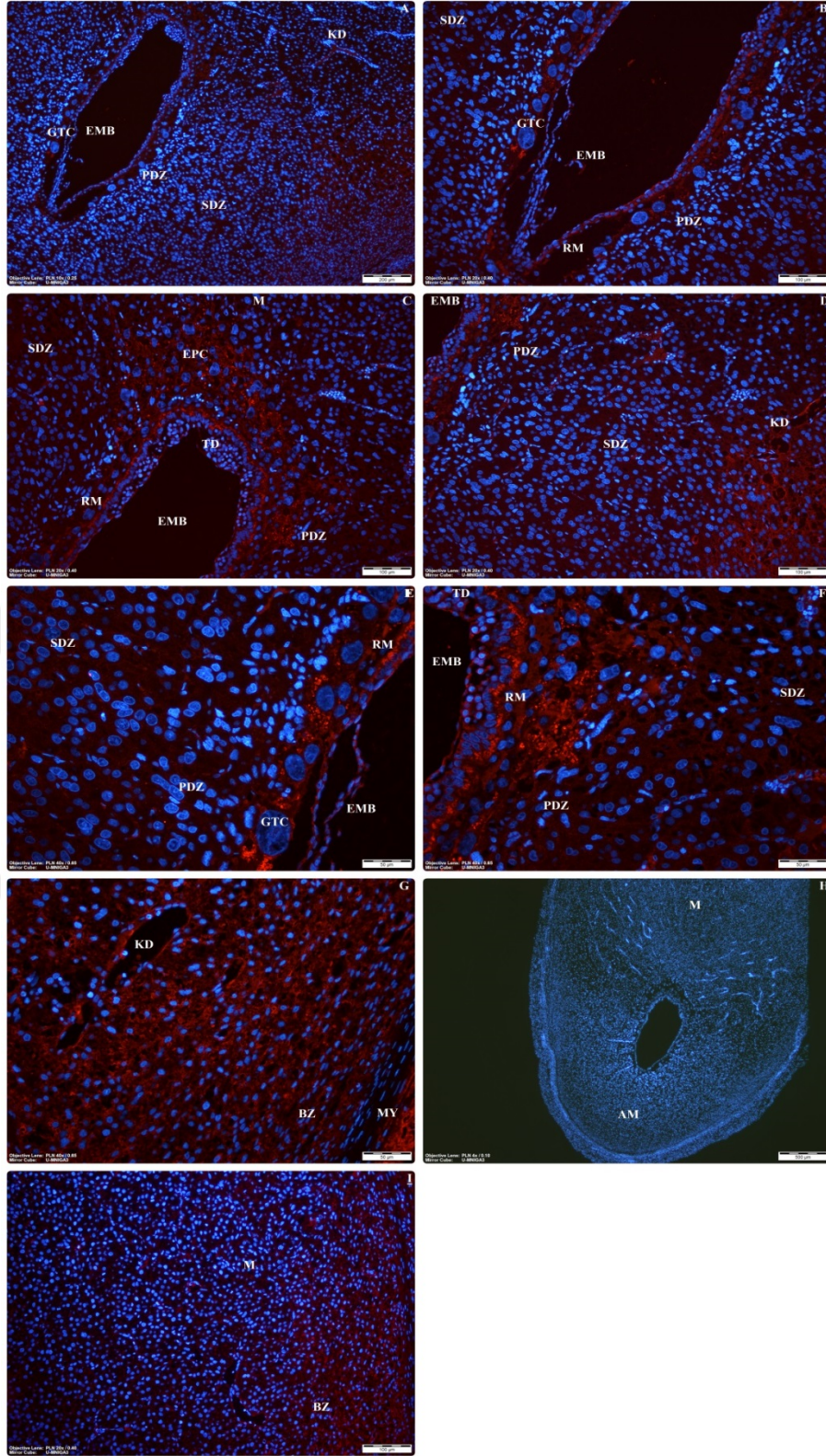
Şekil 4.41. Gebeliğin 9. gününde Wnt-3'ün immünlokalizasyonları (A-F) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



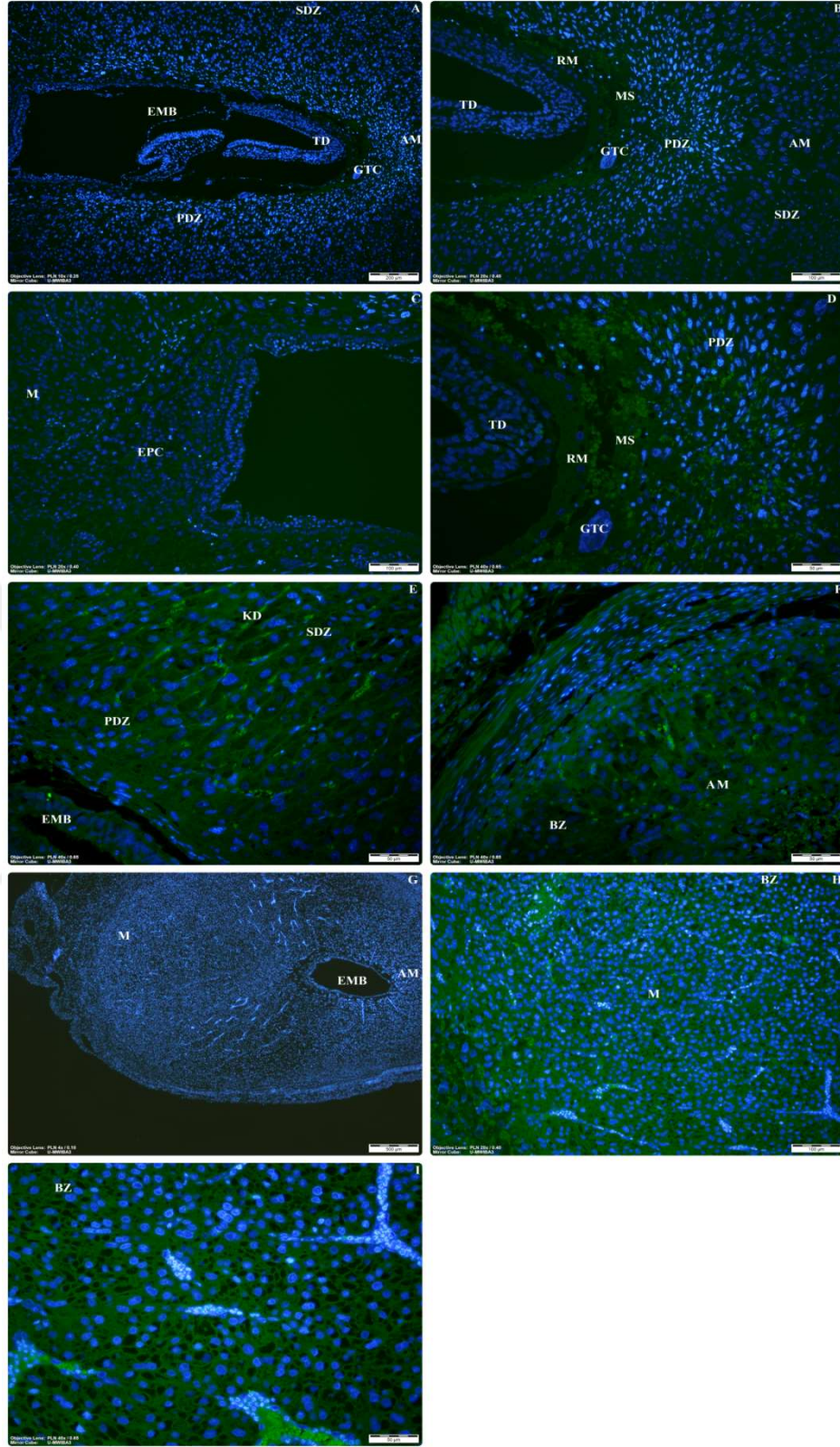
Şekil 4.42. Gebeliğin 9. gününde Wnt-7a'nın immünlokalizasyonları (A-F) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



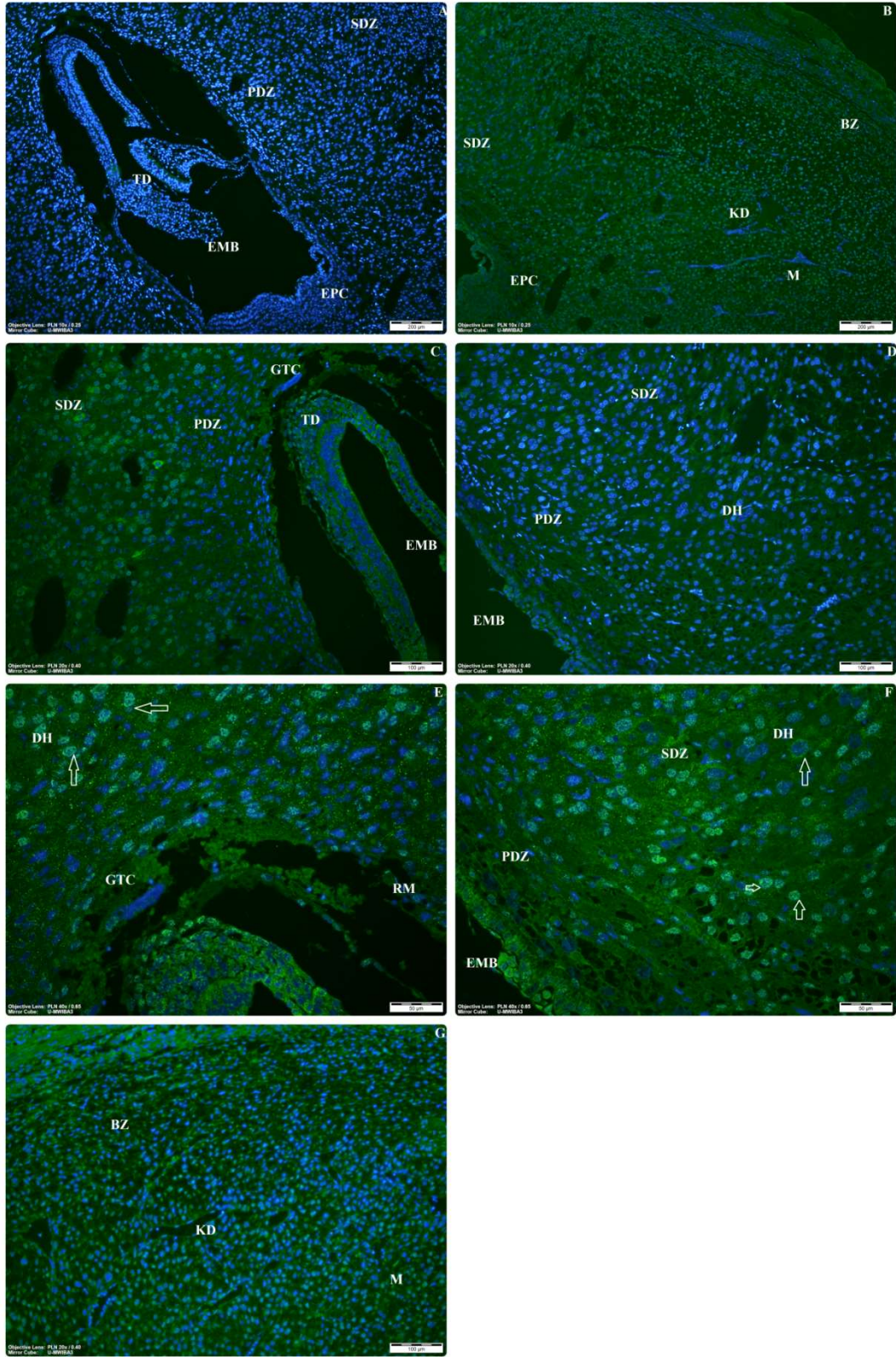
Şekil 4.43. Gebeliğin 9. gününde beta-kateninin immünlokalizasyonları (A-F) negatif kontrol; G; M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



Şekil 4.44. Gebeliğin 9. gününde kaspaz-9'un immünlokalizasyonları (A-I) negatif kontrol kesit: H; M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



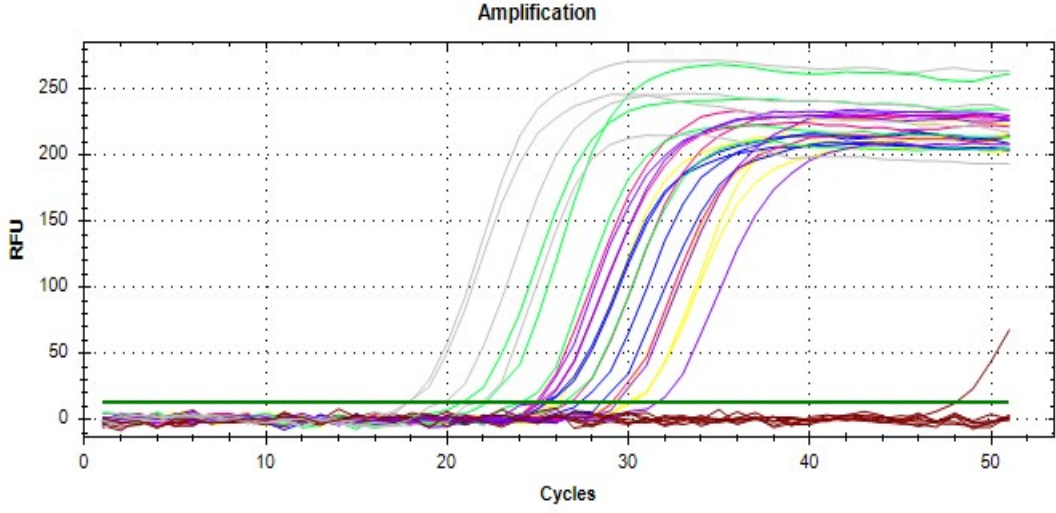
Şekil 4.45. Gebeliğin 9. gününde LEF'in immünlokalizasyonları (A-I) negatif kontrol kesit: G; M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ekto plasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı.



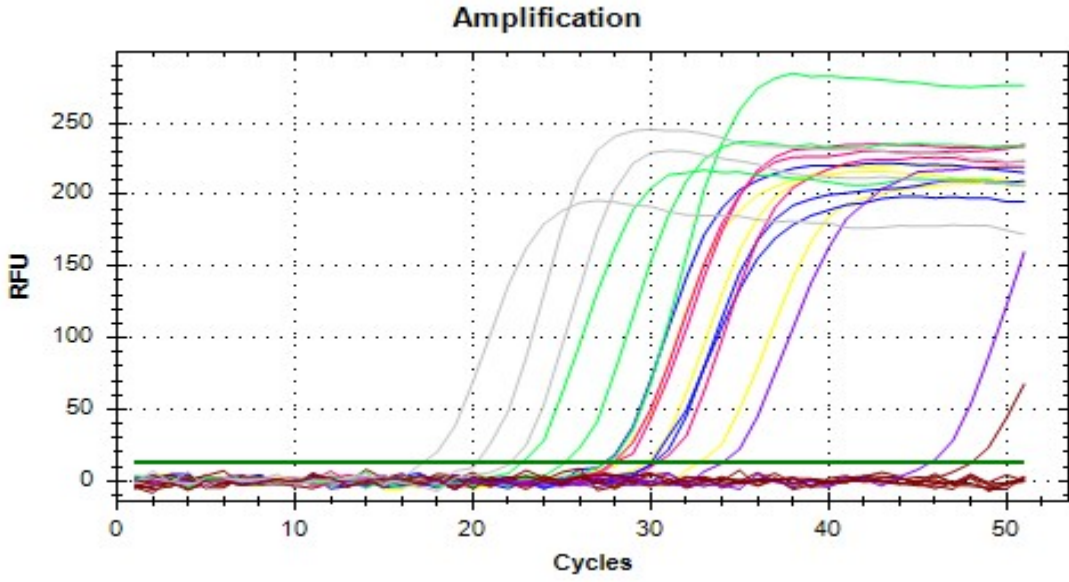
Şekil 4.46. Gebeliğin 9. gününde TCF'nin immünlokalizasyonları (A-G) M: mezometrial alan, BZ: bazal zon, EMB: embriyo, GTC: dev trofoblast, EPC: ektoplasental kon, RM: Reichert membranı, PDZ: primer desidualizasyon zon, SDZ: sekonder desidualizasyon zon, BZ: bazal zon, KD: kan damarı, DH: desidual hücre, Ok ucu: desidual hücre.

4.2.5. Real-time PZR

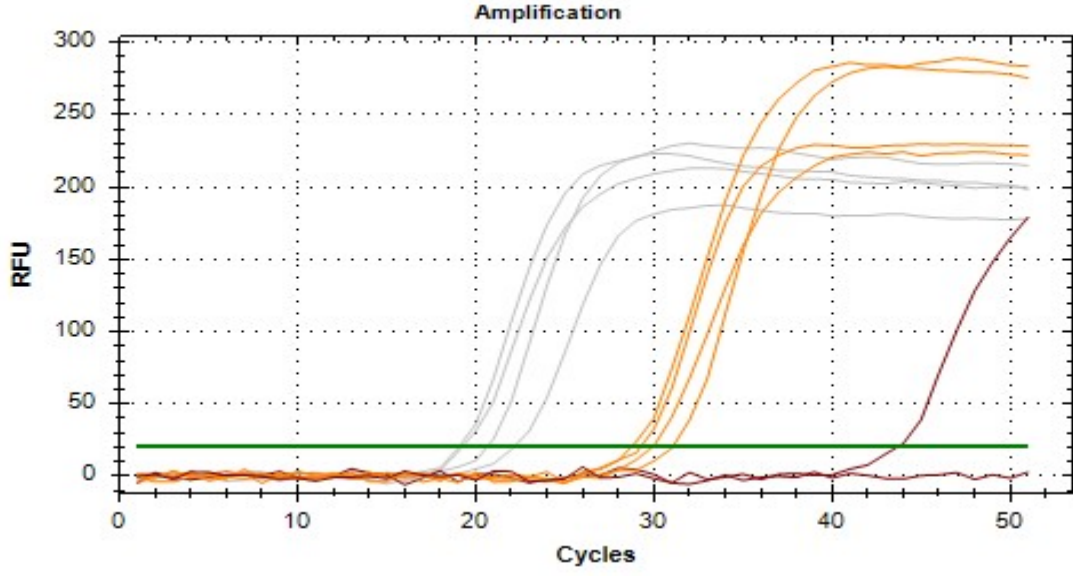
Östrus siklusu ve gebelik döneminde GAPDH, LEF (sarı),TCF (pembe), beta-katenin (yeşil), Wnt-7a (bordo) ve kaspaz-9 (mavi) amplifikasyon eğrileri Şekil 4.47. ve 4.48.'de, östrus siklusundaki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri Şekil 4.49, gebelikteki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri ise Şekil 4.50'de görülmektedir. Real time PZR çalışmalarından elde edilen veriler Tablo 4.8'de sunulmuştur. Tabloda verilen sayısal değerler ve gen ifadeleri birbirleriyle ters orantılıdır. En düşük sayısal değer en iyi gen ifadesini verirken, en yüksek sayısal değer ise en düşük gen ifadesi anlamına gelmektedir. Ratlarda, östrus siklusu dönemine ait genlerin amplifikasyon eğrileri ve cq değerleri incelendiğinde, Wnt-3 geninin, östrus döneminde en düşük, proöstrusta ise en yüksek seviyede eksprese olduğu görülmektedir. Gebelik döneminde, Wnt-3 geni için en iyi ekspresyon 9. günde elde edilmiştir. Wnt-7a, östrus ve metaöstrus dönemlerinde en yüksek derecede ifade olmuştur. Gebelik dönemi gen analizlerine göre, 7. günde hiç ekspresyon göstermeyen Wnt-7a, 8. ve 9. günlerde çok az gen ifadesi göstermiştir. Beta-katenin gen ifadesi, östrus döneminde en iyi metaöstrus ve östrus dönemde eksprese olurken, diöstrus ve proöstrusta orta derece ifade edilmiştir. Gebeliğin 7. 8. ve 9. günleri kıyaslandığında en iyi 9. günde çalışmıştır. 7. günde orta derecede olan gen ifadesi 8. gün ile eş zamanlıdır. LEF-1 geni östrus siklusunun, özellikle proöstrus döneminde en az çalışırken, östrus, metaöstrus ve diöstrusta orta seviyede gen ifadesi göstermiştir. Gebelik dönemi bulgularında ise 7. günde hiç gen ekspresyonu görülmezken, 8. ve 9. günlerde orta seviyede cDNA ifadesi göstermiştir. Kaspaz-9 geninin cDNA gen ifadesi, östrus siklusu dönemlerinin dördünde de orta derecede ifade edilmiştir. Gebeliğin 7. gününde orta seviyedeki gen ifadesi, en düşük 8. günde eksprese olurken, 9. günde tekrar orta derecede bir ekspresyon göstermiştir. TCF geninin ekspresyon düzeyi ise proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus dönemlerinde orta seviyede gerçekleşmiştir. Gebelik döneminde en çok 9. günde gen ifadesi izlenmesine rağmen, 7. ve 8. günlerde ekspresyon azalmıştır. Tüm moleküller arasında beta-katenin, hem gebelikte (9. gün) hem de östrus siklusunda (metaöstrus) en yüksek gen ifadesine sahip moleküldür (Tablo 4.8.). cq değerleri sırasıyla 22,77 ve 20,84 olarak tespit edilmiştir.



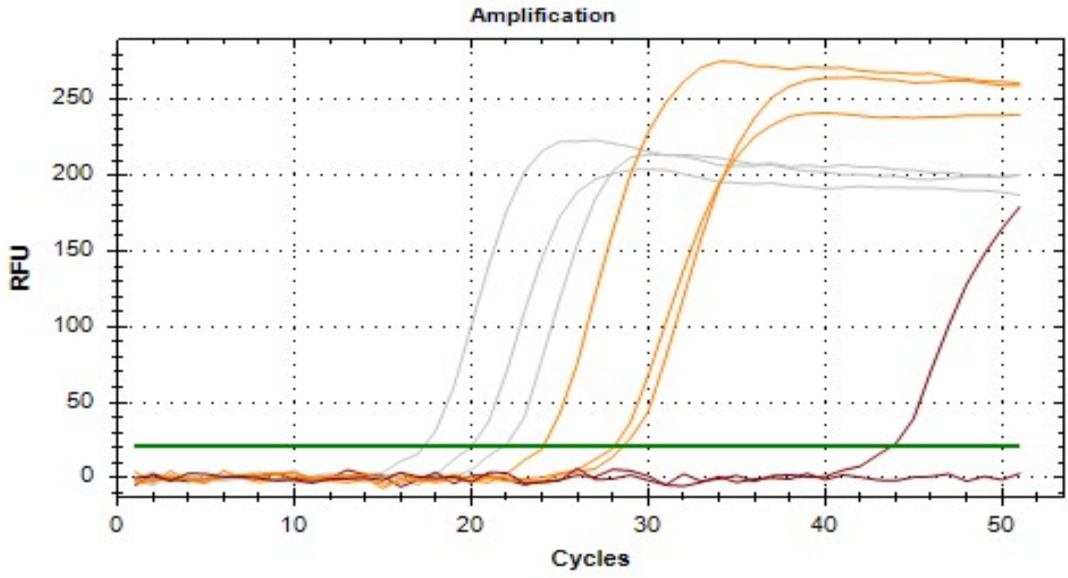
Şekil 4.47. Östrus siklusundaki GAPDH, LEF (sarı),TCF (pembe), beta-katenin (yeşil), Wnt-7a (bordo) ve kaspaz-9 (mavi) amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4.48. Gebelik günlerindeki GAPDH, LEF (sarı),TCF (pembe),beta-katenin (yeşil), Wnt-7a (bordo) ve kaspaz-9 (mavi) amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4.49. Östrus siklusundaki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri.



Şekil 4.50. Gebelik günlerindeki GAPDH (gri) ve Wnt-3 (turuncu) amplifikasyon eğrileri.

Tablo 4.8. Östrus siklusu ve gebelik dönemi cı değerleri (18-24→ kırmızı, 24-30→ turuncu, 30-34→ yeşil, 34-... → mavi)

	<u>GEBELİK</u>			<u>ÖSTRUS</u>			
	7. gün	8. gün	9. gün	Proöstrus	Östrus	Metaöstrus	Diöstrus
Wnt-3	28,54	28,07	24,07	28,75	31,06	29,27	29,97
Wnt-7a	45,75	32,81	34,08	29,37	25,36	25,04	31,59
Beta-katenin	27,50	25,16	22,77	24,10	22,14	20,84	26,44
Kaspaz-9	27,86	30,41	27,98	27,33	25,56	25,24	28,50
LEF-1	32,73	29,77	28,18	30,19	29,21	26,13	29,92
TCF	30,06	30,21	27,43	26,74	24,85	25,10	29,09

5. TARTIŞMA

Son yıllarda yapılan birçok araştırma implantasyon döneminde uterus endometriumunda meydana gelen morfolojik ve moleküler değişiklikleri anlamaya yöneliktir. Bununla birlikte bu sürecin nasıl tetiklendiği ya da hangi mekanizmaların buna neden olduğu, hala tam olarak anlaşılamamıştır. Organizmada meydana gelen değişikliklerin her biri farklı bir mekanizmayla işlemektedir. İmplantasyon, bu değişikliklerden sadece birisidir ve birçok bilinmeyen yönü vardır. İmplantasyon biyolojisi sürecinde etkili olduğu düşünülen sayısız sinyal molekülü belirlenmiştir. *In vitro* fertilizasyon çalışmaları ve PZR tekniklerinin beraber kullanılması ve bu çalışmalardaki gelişmeler, genetik ve moleküler çalışmaların yapılmasına neden olmasının yanısıra, blastosist ve endometrial dokularla elde edilen kültür çalışmaları ile beraber, implantasyon boyunca etkili sinyal moleküllerinin ortaya çıkarılmasını da sağlamış olacaktır. (Mohamed ve ark.,2004).

Uterus, üreme kanalları içerisinde, ovaryumda üretilen birçok steroid hormonun birincil hedefidir (Ahşap ve ark., 2007). Wnt ailesi üyelerinin, embriyonik gelişimin erken dönemlerinde ve yetişkin homeostazında önemli görevleri tespit edilmiştir. Bu görevler arasında en dikkat çekici olan ise Wnt üyelerinin steroid hormonalardan etkilenmesidir (Tulac ve ark.,2003; Hou ve ark.,2004). Östrojen hormonu, uterus epiteli hücrelerinde proliferasyonu indükleyerek, uterus epitel hücrelerinde sekretuar aktiviteyi, hücreler farklılaşmayı ve genel morfolojiyi korumaktadır (Ahşap ve ark., 2007). Genel düşünce, östrojen miktarının uterusu etkilemesinde nükleer reseptörlerin aktive olmasıyla ilişkili olmasıdır (Couse ve Korach, 1999). Buna ek olarak, östrojen hormonunun, uterusu genel olarak Wnt sinyalini bağımsız bir şekilde aktive ettiği bilinmektedir (Mericskay ve ark., 2004). Uterus içerisinde meydana gelen moleküler olaylara östrojenin yanıtı belirsizliğini sürdürmektedir. Yapılan çalışmalar Wnt sinyalizasyonunun, hızlı ya da gecikmeli fazları da birbirine bağladığını göstermektedir (Miller ve Sassoon, 1998, Miller ve ark., 1998). Wnt ligandları, Fzd reseptörleri, LRP reseptörleri, Wnt sinyal yoluna ait inhibitörler ve heperan sülfat proteoglikanların Wnt sinyal yolu ile ilgili moleküller olduğu belirlenmiştir (Cheng ve ark., 2008).

Komiya ve Habas (2008), Wnt ligandlarının (Wingless) kök hücre onarımı, embriyonik gelişim süreçleri, doku farklılaşması ve doku homeostazisinde çok önemli bir yere sahip olduğunu ileri sürmektedir. Wnt kanonikal sinyal yolağında, β -kateninin çekirdek mekanizması üzerinden, bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunda, üreme dokularının büyüme, farklılaşma ve gelişmesinde etkilidir. Wnt ligantlarının ve Wnt

sinyal reseptörlerinin insan ve fare endometriumundaki plasentasyonda eksprese olduğu bildirilmiştir (Nusse, 2005; Komiya ve Habas, 2008). İnsanda yapılan çalışmalarda, östrojenle doğru orantılı olarak, hücre proliferasyonu, trofoblastların farklılaşması ve desidualizasyon olaylarının, bu Wnt sinyal yolları ile kontrol edildiği bildirilmektedir (Mohamed ve ark., 2005). Sassoon (1999), knock-out farelerle yapılan çalışmalarda, embriyonal dönemde Wnt ligantlarının, üreme dokularında ve organların gelişiminde etkili olduğunu belirtmektedir. Maternal ya da embriyonik kökenli hormonların etkisiyle, endometrium içerisinde, siklus boyunca ya da gebelik devam ettiği sürece, Wnt genlerinden bazıları önemli değişiklikler göstermektedir. Bu genlerden bazıları, büyüme faktörleri ailesinden olduğu için endometriumda gebeliğin şekillenmesini, implantasyonu ve embriyonun büyümesini doğrudan etkilemektedir (Sassoon, 1999; Mohammed ve ark., 2005; Hayashi ve ark., 2007). Farelerde embriyonal dönemde ve östrus siklusu boyunca uterus bezlerinin gelişiminde, Wnt genlerinin de sorumlu olduğu Miller ve ark. (1998) tarafından tespit edilmiştir. Ayrıca, gebelik devam ederken, uterus ve blastosist aşamasındaki embriyoda da Wnt genlerinin varlığı bilinmektedir (Kemp ve ark., 2005; Hayashi ve ark., 2009). İnsanlarda ise Wnt genlerinin, seksüel siklus döngüsü içerisinde ve endometriozisli olgularda, mRNA şeklinde eksprese olduğu bildirilmektedir (Tulac ve ark., 2003; Tulac ve ark., 2006; Gaetje ve ark., 2007).

Mohammed ve ark. (2005) tarafından yapılan bir araştırmada, Wnt sinyal yolağının, fare endometriumunda implantasyonun gerçekleşmesi için şart olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, embriyonal dönemde, uterus mezenseşimal doku ve epitel dokunun bez gelişiminde Wnt'lerin oldukça etkili olduğu, fareler üzerinde yapılan bir başka çalışma ile (Mericskay ve ark., 2004) gösterilmiştir. 2009 yılında yapılan bir araştırmada (Hayashi ve ark.) ise, fare uterus dokusunda, Wnt genlerinin, gebeliğin oluşmaya başlaması ve sürdürülmesindeki rolü tespit edilmiştir. Tulac ve ark. (2003), insanlarda, Wnt genlerinden bazılarının, menstrual siklus aşamasının proliferatif ve sekretuar fazında eksprese olduğunu ve fazlara bağlı olarak değişim meydana geldiğini belirlemiştir. Menstrual siklusun proliferasyon ve sekresyon fazında Wnt ligantlarından özellikle Wnt-2, Wnt-3, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-7a ve Wnt-8b bu genlerin reseptörlerinin ise Fzd-6, LRP-6, inhibitörlerinin Dkk-1 ve efektörlerinin de Dvl-1, GSK-3beta ve beta-kateninin endometriumdaki ekspresyonları, normal dokuda daha önce yapılan çalışmalarda da incelenmiştir (Zeng ve ark., 2008). Bu gruptan Wnt-3'ün, proliferatif fazdaki endometriumda, sekretuar fazdakine oranla daha fazla eksprese olduğu

belirtilmekle birlikte, Wnt-7a'nın da luminal epitelde lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır (Zeng ve ark., 2008). Tulac ve ark. (2003), Wnt efektörlerinden beta-kateninin, aynı evrede, epitel ve stroma bölgesinde ekprese olduğunu bildirmiştir. Endometriumda, Wnt ailesi üyelerinin ekspresyonu, wnt reseptörleri, inhibitörleri ve efektörlerinin farklı düzenlenimleri, menstrual dönemde proliferasyon ve sekresyon fazlarında var olması, implantasyona hazırlık aşamasında endometriumda, stroma ve epitel bölgelerinde Wnt sinyal yolunun önemini desteklemektedir. Wnt grubu üyeleri, embriyonik dönemde de salgılanır. Bu durum, endometrial gelişimde ve farklılaşmada önemlidir. Bu nedenle embriyonik süreçten, erişkin döneme kadar, Wnt grubu üyeleri ve düzenleyicilerinin salgılarının, farklı periyotlarda önemli olduğu düşünülmektedir. Örneğin Wnt-7a eksikliği olan farelerde, uterus bezleri ve uterusun düz kasları gelişemeyerek, organize olamamaktadır (Miller ve Sassoon, 1998). Wnt gen ailesine ait genler, büyüme faktörü gen ailesi grubuna dahil olup, embriyonel hayatta ve yetişkin metabolizmasının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenir (Logan ve Nusse, 2004). Wnt sinyalizasyonunu aktive eden Wnt'ye ait proteinlerin hücre içerisindeki mekanizmaları beta katenin ya da Ca²⁺/JNK üzerinden aktive edilmektedir (Veeman ve ark., 2003; Logan ve Nusse, 2004).

Bu çalışmada, normal östrus dönemi ve gebelik dönemi (7. 8. ve 9. günler) sıçan endometriyumunda Wnt-3, Wnt-7a, β -katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF proteinlerinin etkinliklerinin çeşitli sinyallerle nasıl düzenlendiği, immunfloresan ve Real Time PCR yöntemleriyle incelenmiştir.

Östrus siklusunun proöstrus, östrus, metaöstrus ve diöstrus evrelerinde uterusda meydana gelen histolojik değişimler (epitel hücrelerinin histolojik şekli, endometrial bezlerde meydana gelen dejenerasyonlar, mitotik aktivite, hipertrofi, vaskülarizasyon, ödem vb.) Çınar (2012) yaptığı, pre ve postimplantasyon dönemlerinde fare endometriyumundaki Notch Ligand Jagged-1 ve Jagged-2'nin immunlokalizasyonu, başlıklı çalışmasından elde ettiği histo-morfolojik bulgularla benzerlik göstermektedir. Cesur, 2010 yılında Wnt antagonistlerinin pre ve post implantasyon dönemlerinde sıçan endometriyumundaki (Cesur, 2010), Arslan ise 2012 yılında, rhokinaz-a'nın pre ve postimplantasyon dönemlerinde fare endometriyumundaki immunlokalizasyon düzeylerini incelemiştir (Arslan, 2012). Her iki araştırmada da, östrus siklusu evrelerinde, uterusda gözlenen histo-morfolojik değişimler, sunulan çalışmadan elde edilen bulgularla örtüşmektedir.

Wnt-3; Wnt-3 molekülü Wnt sinyal yolağının biyomoleküllerinden biridir. İnsanlarda, östrus siklusunun farklı zamanlarında, Wnt-2, Wnt-3, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-7a ve Wnt-8b'nin; farelerde ise implantasyon aşamasında, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-7a, Wnt-7b, Wnt-11 ve Wnt-16'nın ekspresyon durumları birçok araştırmacı tarafından saptanmıştır (Tulac ve ark., 2003; Hayashi ve Spencer, 2006; Hayashi ve ark., 2007; Kiewisz ve ark., 2008; Hayashi ve ark., 2009). Zeng ve ark. (2008), Wnt-3'ün östrojene bağlı olarak ekspresyonunu inceledikleri çalışmada, proliferatif endometriumdaki etkileşimin sekretuar endometriumdaki daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada, östrus siklusunun dönemlerinde Wnt-3'ün ekspresyon düzeyleri uterus ve uterus çevresinde stromal alanlarda değişkenlik göstermiştir. İnsandaki proliferasyon fazının sıçanlarda denk geldiği düşünülen proöstrus ve östrus evrelerinde subluminal stroma ve endometrial bazal stroma bölgelerinde, yine insanda sekretuar faza denk gelen metaöstrus ve diöstrus dönemlerine göre daha kuvvetli ekspresyon izlenmiştir. Proliferatif faza denk geldiği düşünülen, proöstrus ve östrus dönemindeki kuvvetli ekspresyonun proliferatif fazda endometrium stromasında östrojenin etkisi altında gerçekleşen proliferasyondan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Wnt-3'ün aynı zamanda, gebeliğin belirli günlerinde de ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu kapsamda gebeliğin yedinci gününde, Wnt-3'ün desidual alanlar ve embriyo çevresinde lokalize olması ve özellikle antimezometrial desidual alanların bazal zonlarında kuvvetli immunreaksiyon göstermesi, bu molekülün, gebeliğin başlangıç günlerinde, Wnt sinyal yolunda, implantasyonda görev alabileceğini düşündürmektedir. Gebeliğin sekizinci gününde embriyo çevresinde kuvvetli görülen ekspresyon desidual alanlarda da varlığını korumuştur, ilerleyen gebelik günlerinde (9. gün) embriyo çevresi trofoblastlar, primer ve sekonder desidual alanlar orta kuvvetli reaksiyon vermesi molekülün çalıştığını göstermiştir. Real time PZR analizlerinden elde edilen istatistiksel veriler de, 7. 8. ve 9. günlerdeki immunfloresan bulguları destekler niteliktedir. Siklus dönemine ait veriler, östrus dönemi hariç diğer üç dönem için histolojik verilerle birbirini doğrular niteliktedir. Yapılan literatür incelemesinde, Wnt-3 molekülünün rat endometriyumunda, östrus siklusunu ve implantasyon dönemlerindeki etkileşimleri üzerine yapılmış bir çalışmaya rastlanılmadığı için, elde ettiğimiz bulgularımızı mukayese etmek mümkün olmamıştır.

Wnt-7a; Wnt sinyal yolağının, kanonikal iletim sisteminde kullanılan bir proteindir. İnsan endometriyumunun, implantasyon boyunca, ovaryum hormonlarına cevap veren ve

bu cevapla da implantasyona hazırlık aşamasında, menstrual siklus boyunca hareketli yapılanmalar gösteren, karmaşık bir doku olduğu bilinmektedir (Cunha,1976). Embriyodan salgılanan bazı faktörlerin, reseptör ve ligandları endometriumda yer alırken, maternal olarak salgılanan bazı faktörlerin reseptörleri ve ligandları blastosistte bulunmaktadır. Örneğin; EGF-R, LIF-R, IL-6 gibi. Ayrıca steroid hormonları, LIF gibi sitokinler, Heghod morfojenlerin fare uterusunda gibi sitokinler ve diğer etkenlerin, fare uterusunda blastosist kabul edilebilirliğinde önemli olabileceği düşünülmektedir. İmplantasyon gerçekleşirken, görev alan önemli yolaklardan biri de Wnt/ β -katenin sinyal yolağıdır. Wnt gen ailesine ait genlerin ve bunların inhibitörlerinin, endometriumda, gelişen blastosist ve ayrıca embriyoda eksprese oldukları gösterilmiştir (Mohammed ve ark., 2005). Normal bir menstrual siklusta, Wnt-7a proteininin, insan endometriumunda luminal epitelde salgılandığı, buna karşılık bez epiteli ve stromal alanlarda da salgısının olduğu, fakat luminal epitelde kıyaslandığında, salgılamasının daha az olduğu, araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Nusse, 2005; Komiya ve Habas, 2008; Mohamed ve ark., 2005). Yapılan bazı çalışmalar, Wnt-7a, Wnt-7b ve Wnt-11'in, yeni doğan farelerin endometrium epitelinde mevcut olduğunu göstermiştir. Bunlara ek olarak, farelerde Wnt-4 ve Wnt-5a ile ilgili çok sayıda çalışma yapıldığı ve bu moleküllerin uterus gelişimi için gerekli olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Wnt-7a'nın, uterusun glandular gelişimi sırasında da işlevsel olabileceği ifade edilmektedir (Vainio ve ark., 1999). Kara (2010)'nın, sebebi açıklanamayan infertil olgularda, Wnt-beta katenin yolağının yeri ve önemi, başlıklı çalışmasında, Wnt-7a proteininin, proliferasyon döneminde, luminal epitelde eksprese olduğu, bez epiteli ve stromal alanlarda negatif immunreaktivite gösterdiği, eş zamanlı olarak moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda ise, proliferasyon döneminde, luminal ve bez epitelinde de moleküllerin eksprese olduğu gösterilmiştir. Kara (2010)'nın çalışmasında moleküler incelemelerde Wnt-7a proteini bez epitelinde daha fazla olması ancak luminal epitelde moleküler ve immunreaktivite göstermesi implantasyona hazırlık açısından luminal epitelde implantasyonun gerçekleşeceği zaman, önemli olabileceğini düşündürmüştür. Yine aynı çalışmada, infertil olan gruplarda proliferasyon döneminde, Wnt-7a'nın immunreaksiyonu luminal epitel alanlarında pozitif izlenirken, yapılan moleküler çalışmalarda, mRNA düzeylerinde ekspresyon olmadığı ifade edilmiştir. Kara (2010)'nın çalışmasında, kontrol grubu proliferatif evrede, luminal epitelde Wnt-7a immunreaksiyonu ve moleküler mRNA ekspresyonu gözlenirken, sekretuar fazda yalnızca moleküler mRNA ekspresyonu tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise, Wnt-7a

proteininin, proliferatif dönemde başlayan ekspresyonunun, sekretuar faza kadar devam ettiği ancak, protein salgısının sekretuar fazda daha az olduğu saptanmıştır. Hayashi ve ark. (2007), Wnt genlerinin (Wnt-12, Wnt-2b, Wnt-4, Wnt-5a, Wnt-5b, Wnt-7a ve Wnt-11) sinyalleme yollarının, erken gebelikte endometriumda mevcut olduğunu saptamışlardır. Tulac ve ark. (2003) ise Wnt genlerinin, menstrual siklus döneminde sekretuar fazda insan endometriumunda eksprese olduğunu göstermiştir. Farelerde de, Wnt-4 ve Wnt-5a, östrus siklusu sırasında uterusun ağırlıklı olarak stromal alanlarında ifade edilirken, özellikle Wnt-7a'nın sadece luminal epitelde ifade edildiği belirlenmiştir (Miller, 1998). Miller ve ark. (1998), östrus siklusu boyunca östrojen ve progesteron hormonu etkisine maruz kalmış uterus, Wnt sinyal yolunda yer alan genlerin ekspresyon düzeylerinde belirli seviyelerde artış ve azalış olduğunu saptamıştır. Östrojen ve progesteronun etkisiyle, Wnt sinyal iletim sistemi, uterustaki hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemiştir (Rider ve ark., 2006). Progesteronun, uterus hücrelerinde GSK-3 β 'nin miktarında azalma olduğunu ve bu sinyal yolunun uyarılması için de progesteron hormonunun gerekli olduğunu göstermiştir. Wnt sinyal yolunda, östrojen miktarı ise, daha çok hücre çekirdeğindeki genlerin aktivasyonu için gerekli olduğunu vurgulamıştır. Hem siklus hem de gebelik boyunca östrojen için en uygun hedef organ uterusur. Farelerde östrojen, uterus epitelinin proliferasyonunu uyarıcı etki yaratır ve bu normal şekilde uterus morfogenezisinin devam etmesini sağlar. Hücrelerin farklılaşması ve salgı faaliyetlerinin de devam etmesi için oldukça gerekli bir faktördür. Ma ve ark. (2003) ve Paria ve ark. (2000)'nin genel düşüncesine göre, östrojen bu etkinliği, uterus dokusundaki reseptörleri ile etkileşerek oluşturmaktadır. Fakat bu düşüncenin aksine Hou ve ark. (2004), östrojen reseptörlerinden bağımsız bir şekilde, Wnt sinyal sistemini uyardığını, östrojenin hedef dokudaki etkisinin, farklı sinyal yolu üzerinden de çalışabildiğini göstermiştir.

Sunulan çalışmada ise östrus siklusunun bütün evrelerinde Wnt-7a, farklı seviyelerde ekspresyon göstermiştir. Özellikle siklusun bazı dönemlerinde stromal alanlarda, ekspresyon seviyelerinin arttığı saptanmıştır. Yapılan histolojik çalışmalara ek olarak, real time PZR sonuçlarına göre, Wnt-7a proteini, rat östrus siklusunun östrus ve metaöstrus dönemlerinde orta seviyede ekspresyon göstermiştir. İmmunfloresan çalışmalarda ise, özellikle stromal alanlarda ve bez epitel çevresinde farklı seviyelerde reaksiyon izlenmiştir. Ratlarda sekretuar faza denk geldiği düşünülen metaöstrus ve yüksek miktarda progesterona sahip olduğu ileri diöstrus döneminde değişkenlik

gösteren bez epitelinde, ekspresyonun son derece kuvvetli olabileceği, real time PZR sonuçlarıyla da desteklenmektedir. Çalışmamızda, gebeliğin belirli günlerinde, Wnt-7a'nın immunreaktivitesi yedinci günden başlayıp dokuzuncu güne kadar, farklı alanlarda pozitif lokalizasyon göstermiştir. Primer ve sekonder desidual zonlarda, bu bölgede yer alan kan damarlarında ve özellikle mezometrial bölgede, uterus epiteli de dahil, kan damarlarında ekspresyon göstermesi literatür bilgilerini doğrular niteliktedir. Gebeliğin ilerleyen günlerinde, örneğin sekizinci ve dokuzuncu günlerinde, endometriyumda embriyo çevresi mezometrial alanların immunreaktivitesinin, östrojenin etkisiyle, pozitif yönde olduğunu düşündürmüştür. Gebeliğin çalıştığımız bu üç günü ile ilgili elde ettiğimiz moleküler sonuçlar da özellikle yedinci gün real time sayısal verileri, immunfloresan bulgularımızla uyumlanmamıştır. Fakat 8. ve 9. günlerde ekspresyon seviyeleri orta düzeyde olup her iki çalışmada birbirini desteklemiştir. Bu durum ratlarda, kanonikal Wnt sinyal yolunun implantasyon için gerekli olduğu blastosist-uterus etkileşimlerinin koordine edilmesinde oldukça önemli bir görev aldığını düşündürmektedir. Özellikle implantasyon sırasında embriyonun Wnt-beta katenin aktivasyonu bu sinyalizasyonda Wnt-7a'yı tetiklediği düşünülebilir. Total beta-katenin implante olan embriyonun yer aldığı antimezometrial kutupta primer desidualizasyon zonlarının hemen dışında yer alan stromal alanlarda ve lümene yakın olan mezometrial bölgede daha etkili immunreaksiyon göstermiştir. Buradan Wnt/beta katenin sinyal yolunun, desidualizasyon sürecinin başlatılmasını düzenlemek adına, embriyo-uterus etkileşimlerinin oldukça kritik bir öneme sahip olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Beta-katenin; insanlarda, beta-katenin CTNNB1 geni tarafından kodlanan özel bir proteindir (Kraus ve ark.,1994). Beta-katenin epitel hücre sitoplazması ve hücre membranlarında bolca bulunmaktadır. Özellikle E-kaderin gibi farklı kaderinlerin sitoplazmik uzantıları için önemli bir bağlanma molekülüdür (Peifer ve ark., 1992). Korswagen ve ark. (2000)'nın yaptığı bir çalışmada, beta-kateninin sinyalizasyondan farklı olarak adherens bağlantı kavşağında da rol aldığını gözlemlemişlerdir. Yeni sentezlenen bir beta-katenin molekülü ilk olarak sinyal iletimi için mevcut olmayan yapışma bölgelerine bağlanır. Fazla ve serbest haldeki beta-katenin ise APC kompleksi tarafından yıkıma uğratılır. Cobas ve arkadaşları (2004) bir çalışmada farelerde beta-katenin kaybının hematopoietik sistemde bu proteinin homoloğu olan γ -katenin / plakoglobin ile telafi edebileceğini gözlemlemiştir. Başka bir çalışmada ise beta-

katenin içindeki aktive edici (onkojenik) nokta mutasyonların beta-kateninin N-terminal Ser/Thr yıkımını kaldırdığını ve bu sayede kalıtsal axin2 mutasyonu hastaların kolon kanserine daha yatkın olabileceklerini göstermektedir (Lammi ve ark., 2004). Beta-kateninin endometrial siklusun proliferatif ve sekretuar dönemleri boyunca bez epiteli ve stromal alanlarda ekspresyona edildiği gösterilmiştir (Smith ve ark., 2008). Bazı β -katenin geni knock-out çalışmalarında eksikliği olan mutant rat embriyoların blastosist evresine kadar gelişebildikleri gözlenmiştir (Haegel ve ark.,1995). Bu çalışmanın aksine beta-katenin preimplantasyon dönemde zigotik protein eksikliği ortadan kaldırıldığında TCF/ β -katenin inhibisyonunun Dkk1 ekspresyonundaki artışa bağlı olarak blastosist formasyonunu olumsuz yönde etkilemediği görülmüştür (De Vries ve ark.,2004). Lowry ve arkadaşları (2005) nın yaptığı bir çalışmada Beta-katenin yerleşik bir saç folikülü içinde Wnt'ye bağlı olarak korunduğunu bildirmiştir. Wnt sinyallerinin kıl kökü hücrelerinde kıl oluşumuna neden olduğunu ve kıl oluşumunda Wnt sinyalinin beta katenin ve LEF-1 tarafından aktarılabileceği düşünülmüştür (Lowry ve ark., 2005).

Çalışmamızda wnt sinyal yolağı molekülü olan beta kateninin ratlarda östrus siklusu boyunca endometriumda farklı bölgelerdeki lokalizasyonları takip edilmiştir. Siklusun dört döneminde de (proöstrus, östrus, metaöstrus, diöstrus) uterus epitelinde, bez epiteli ve stromal bölgelerde farklı seviyelerde ekspresyon göstermiştir. Beta- kateninin özellikle siklusun metaöstrus evresinde bez epitelinde çok kuvvetli immunreaksiyon göstermesi, ratlardaki metaöstrus dönemin insanlarda sekresyon faza denk gelebilecek olması ve sekresyon döneminde bez yapılarında meydana gelen değişikliklerden dolayı olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Real time PZR verilerine göre metaöstrus dönemi verileri en iyi protein ifadesini (20) vermiş olup her iki çalışma birbirini desteklemiştir. Gebelik dönemi verilerinde yedinci gün endometriumunda embriyo hattında izlenen kuvvetli immunreaktivite beta-kateninin hücre sitoplazması, hücreler arası membranlarda aktif olduğunu göstermiştir. İlerleyen gebelik günlerinde (8.ve 9.) yüksek ekspresyon seviyeleri antimezometrial alanda desidual hücrelerde primer, sekonder desidualizasyon zonlarında ve etraftaki kan damarları, kapillerlerde ayrıca mezometrial alan bez epiteli hücrelerinde izlenen ekspresyon seviyeleri β -kateninin endometriumda siklus döneminde implantasyona hazırlık aşamasında ve implantasyonda önemli bir faktör olduğunu desteklemektedir. Sunulan moleküler çalışmalarda da elde edilen istatistiksel sonuçların 7, 8 ve 9. günlerde iyi çalışmış olması histolojik çalışmalarla

uyuşması beta kateninin implantasyona hazırlık için önemli olduğunu düşündürmüştür. Ve sonuç olarak insan, fare ve rat endometriumunda östrus siklusu ve gebelik süresince Wnt sinyal iletiminin çeşitli faktörler göz önüne alınarak bu genlerin ekspresyonunun değiştiği söylenebilir.

Kaspaz-9; başlatıcı kaspaz ailesinden biri olan kaspaz-9 molekülü, apoptoz kavramının ilerlemesiyle beraber insan endometriumunda apoptozisin varlığını göstermiştir (Kerr ve ark.,1972). Kaspaz molekülü hücrenin parçalara ayrılması için sistein yüklü endoproteazlardır. Bu enzimler inaktif öncüller olarak hücrelerin sitoplazmalarında bol miktarda bulunurlar. Günümüzde ise tanımlanmış 14 memeli kaspazı vardır. Bu kaspazlardan kaspaz-11 ve kaspaz-12 hayvanlarda bulunurken insanlarda karşılığı hala bulunamamıştır. Kaspaz ailesi 3 gruba ayrılmıştır kaspaz-1,-4,-5,-11,-12,-13,-14' ü kapsayan enflamatuar grup kaspazlar, -2, -8, -9 ve -10'u içeren başlatıcı kaspazlar ve kaspaz-3,-6,-7'yi içeren efektör kaspazlar (Lee, 2000; Li ve ark., 2000). Kaspazların çalışma mekanizmalarıyla yapılan çalışmalarda kaspaz aktivasyonunun hücreye özgü olduğu ve kaspaz inhibitörlerinin efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği görülmüştür. Aynı çalışmada IAP ailesinin kaspazlardan ayrı bir şekilde transkripsiyon faktörlerinin modülasyonunda ve hücre siklusunun da kontrolünde yer aldığı bu kontrole bağlı olarak apoptozu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca bu inhibitörlerin malign hücrelerde çok daha fazla olduğu gözlenmiştir. Kaspazlarla beraber apoptosiste yer alan survivin 27q25 kromozumunda kodlanan 142 dizilik aminoasitten oluşan bir proteindir. Apoptoz mekanizmasında görev alan ana genlerden biridir.Bu proteinin normal proliferen olan hücrelerde çok az seviyede eksprese olduğu izlenirken,aşırı çoğalan hücrelerde ise daha fazla eksprese olduğu görülmüştür. Endometrial dokuda hiperplazi ve malignite gelişen olgularda çok yüksek seviyede eksprese olduğu gösterilmiştir (Israels ve Israels, 1999). Apoptoz, menstruasyon dönemi boyunca hücrel homeostaziyi sürdürmeye çalışır ve böylece geç dönem sekretuar fazda ve menstrual fazla uterus endometriumunda fonksiyonel tabakada yaşlanan hücrelerin atılmasını sağlamaktadır. (Hopwood ve Levison, 1976, Kokawa ve ark., 1996; Shikone ve ark., 1996). Bu aşamadan sonra döngünün proliferatif fazı devam ederken geç salgı ve menstruasyon döneminde endometriumdaki glandular epitel hücrelerinde apoptoz meydana gelir sekretuarın fazın çok başındayken ise çok az miktarda apoptoz gerçekleşir (Kokawa ve ark., 1996; Tao ve ark.,1997; Vaskivuo ve ark., 2000). Vaskivuo ve arkadaşları (2000)'nın yaptığı bir çalışmada proliferatif fazda

endometrial hücrelerin proliferasyonunun östrojenle ilişkili olduğunu, progesteronun ise hücreleri farklılaştırmaya yönlendirdiğini bunun sonucu olarak ise büyümei durdurduğunu bildirmiştir. İmplantasyon aşamasında apoptozun görüldüğü alanlardan biri ise uterus epitelidir. Uterus hücrelerinde luteal fazda blastosist implantasyonu ve desidualizasyonda apoptoz mekanizması oldukça etkilidir (Vaskivuo ve ark., 2000). Enders ve Schlafke (1967) fareler ve sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada uterus epitel hücrelerinin adezyon fazda bazal laminalarından ayrıldığını ve bu sürecin hemen ardından trofoblastların bazal membran ile doğrudan temas haline geçmesiyle epitelyal astarın ortadan kalkıp implantasyon alanı altında yer alan anti mezometrial bölgede hücresel değişikliklerin olduğunu savunmuşlardır. Sıçan implantasyonunda yapılan diğer çalışmalarda hücresel büzülme ve kromatin değişiklikleri söz konusu olmuştur (Parr ve ark.,1987). Sıçanlarda implantasyon alanlarına bitişik olan desidual hücreler çapraz bağlanmalar yaparak reaksiyonları katalizleyen ve aktivasyonu apoptoz ile ilişkili olan bir enzim, doku transglütaminazı için de kuvvetli bir şekilde pozitiflik gösterir (Piacentini ve Autuori,1994) Trofoblast fagositozu olarak tanımlanan bu olay epitelyal hücrelerin önemli derecede bozulmaya uğramasından sonra başlar ve bu durum epitelin parçalanmasının esas olarak iç otolitik mekanizmasının sonucudur (Finn ve Bredl, 1973). Gebelik devam ettikçe ilerleyen süreçlerde epitel dejenerasyonu antimezometrial alanın tam tersi olan implantasyon odasının mezometrial alanına ulaşır. Mezometrial alanda hücre ölümü gerçekleşeceği zaman trofoblastlar implantasyon alanının o bölgesine ulaşmadan daha önce genişlemiştir. Epitel bölgesinde hücre ölümünün son basamağında, geriye kalan uterus lümenini çevreleyen astar kısmında meydana gelir (Welsh, 1993). Kaspazların çalışma mekanizmaları incelendiğinde kaspaz aktivasyonunun yürütülebilmesi için yaklaşık olarak 21 izoformu olan Bcl gen ailesi tarafından düzenlenilmesi gerektiği düşünülmüştür (Ranger ve ark., 2001).Bcl proteinlerinden bazıları (Bcl2 ve Bcl-XI) apoptosisin inhibisyonuna dahil olurken,bazı Bcl proteinleri de (Bcl-Xs,Bax ve Bad) hücre ölümünü teşvik eder. Bu her iki grubun rekabeti apoptotik sürecin düzenlenmesine yol açar ve ölüm reseptörlerinin aşağı akışına etki eder. Bu süreç bazen bağımsız olarak gerçekleşebilir (Oltvai ve ark., 1993; Eskes ve ark.,1998; Mignotte ve Vayssiere, 1998). Bcl2 geni kaspaz-9'un aktivasyonu için kofaktör olarak görev yapan ve Apaf-1 bağlayan mitokondriden sitokrom c'nin salınmasını önler. Her iki olay ise kaspaz-9 aktivasyonunu inhibe eder (Hu ve ark., 1998). Akcali ve arkadaşları (1996) yaptıkları bir çalışmada Bax ve Bcl'nin psödopregnant sıçanlarda desidual hücrelerin apoptozunun düzenlenmesinde rol

oynadığını göstermişlerdir. Dai ve arkadaşları (2009) sıçanlarda, erken ve orta dönem gebelikte mezometrial alanda desidual hücrelerin regresyonunun sırasıyla Bax ve Bcl2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleriyle doğrudan ilişkili olabileceğini gösteren bir çalışma yapmışlardır. Bax ve Bcl2 proteinlerinin seviyeleri ise apoptosisin miktarını ve bölgesel dağılımını belirleyebileceğini göstermişlerdir. Bu denge progesteron hormonu tarafından düzenlenir çünkü bir antogonist proteinin uygulanması daha yüksek bir Bax ve Bcl2 oranına ve daha fazla apoptosiz olmuş desidual hücrelere neden olmuştur. Bu çalışmaların eksik olduğu düşünülerek uterus epitelinin yanı sıra desidual programlanmış hücre ölümünde yer alan apoptotik kaskadların üyelerini daha fazla aydınlatmak için, TNFalfa, TNFR1 ve TNF gibi reseptör ailesinin bir başka üyesi olan Fas reseptörünün çeşitli apoptotik proteinlerin ekspresyon aralığı da araştırılmıştır. Bütün çalışmalar birleştirilerek Bcl2 ve Bax proteinleri ile beraber Fas reseptörünün de bağlantılı olabileceği düşünülmüştür. Kaspaz ailesinde Bax ve Bcl2 geni ortadan kaldırıldığında ciddi apoptotik başarısızlıklara yol açan kaspaz-3 ve başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9'un aktif formları üzerine çalışılmıştır. Apoptotik sürecin sonunda ise hücreleri gösterebilmek için Tunel deneyi yapılmış ve trofoblastların koordineli replasmanı sırasında, implantasyon bölgesi alanında uterus epiteli ve desiduada programlanmış hücre ölümünün (apoptozun) sona ermek için başka bir yol daha izlediğine dair kanıtlar bulunmuştur (Hakem ve ark.,1998; Thornberry, 1998). Joswig ve ark. (2003) yılında kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-9 ve aktif kaspaz-3 formunun araştırılmasıyla ilgili her iki proteinin de gebe olmayan hayvanların endometriyumlarında ve gebeliğin erken dönemlerinde gebeliğin 3. gününe kadar eksprese olmadığını gözlemlemiştir, fakat başlatıcı kaspaz-9un, gelişmekte olan desiduada 4,5. günden başlayarak desidualizasyon işlemine paralel olarak arttığını, uterus epitelinde immunreaktivitenin görülmediğini eklemiştir ve implantasyon odasının antimezometrial kısmından mezometrial alanda dahil miyometriuma doğru desidualizasyon sürecini izlemiştir fakat verileri gösterilmemiştir (Joswig ve ark., 2003). Endometrium çalışmalarından farklı olarak apoptoz mekanizması birçok hastalık yada kanser olgularında da çalışılmıştır. Kroemer ve Reed (2000) apoptozisin kanser tedavisinde reseptör ve mitokondrial yol aracılığıyla, apoptozun kanser hücrelerini öldürmek için kanser tedavisinde kullanılabileceğini savunmuştur. Mitokondrial membran potansiyelinin bozulması, sitokrom c salınımı ve farklı kaspazların aktivasyonu farklı kemoterapotik ajanlar ile hücrelerin muamelesini takiben tanımlanmıştır (Kroemer ve Reed, 2000). Örneğin, kemoterapi ile indüklenmiş p53 cevabı Bax geninin

transkripsiyonundaki artışa neden olurken sitokrom c salınımına ve kaspazın da aktivitesine neden olur. Doxorubisin, sisplatin, methotrexate, sitarabin ve etoposid tedavisini takiben Fas sisteminin aktivasyonu ve FasL'nin induksiyonu farklı sistemlerde incelenmiştir. Bunlara ilaveten ise ölüm reseptör liganının interferon α ile KML'nin tedavisi KML projenitörlerinde Fas proteininin upregülasyonuna yol açacağını savunmuşlardır (Friesen ve ark., 1996; Fulda ve ark., 1997; Selleri ve ark., 1997). Apoptoz ve Wnt sinyal yolu proteinlerinden en iyi Wnt-1 ile ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark., 2001). Wnt-1 mitokondriye sitokrom c salınımını engelleyerek ve peş peşe kaspaz-9 aktivitesini de inhibe edebileceğini düşünmüşlerdir. (Li ve ark., 2006; Brocardo ve Henderson, 2008). Wnt-Frizzled sinyal yolağı nöron, endotel, vasküler düz kas ve kardiyomiyosit gibi çeşitli hücre popülasyonlarında hem gelişim hem de hasar (injury) süreçlerinde apoptozu kontrol etmektedir (Li ve ark., 2006). Hücrelerin büyümesi sürecinde, Wnt sinyal iletimi var olan çevresel uyaranlara da bağlı olarak apoptozu kolaylaştırır veya engeller (Ellies ve ark., 2000).

Bizim çalışmamızda immunfloresan olarak incelenen östrus siklusu gruplarında uterin epitel alanları, stromal bölgeler, bez epiteli hücrelerinde farklı seviyelerde siklusun her evresinde ekspresyon izlenmiştir. En çok siklusun östrus evresinde uterus epitelinde apoptoz görülmüştür. Bu durumun LH'nin en yüksek düzeyine östrusta ulaşmasından dolayı olabileceği tahmin edilmektedir. Uterus yüzey epitelinde proliferasyon yoktur fakat hücrenin boyutu maksimum uzunlukta olduğu için epitel kalınlaşmış şekilde izlenmiştir. Bu evrede apoptotik indeks artmış olduğundan epitelde apoptotik hücreler görülmüştür. Yüzey epitelindeki bu değişiklikler uterus artık blastosist implantasyonun gerçekleşmesini sağlayacağını düşündürmüştür. Real time PZR sonuçları östrus dönemde immunfloresan çalışmaların sonuçlarını desteklemiştir. Çalışmamızda aynı zamanda gebeliğin 7. 8. ve 9. günlerinde de kaspaz-9'un immunfloresan görüntüleri çekilmiş ve gebeliğin 7.gününden itibaren ilerleyen günlerde implantasyon alanlarında ekspresyon seviyelerinde artış gözlenmiştir. Anti-mezometrial ve mezometrial alanlar gebeliğin bu her üç gününde de başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz-9 immunreaktivitesini farklı seviyelerde göstermiş, gebeliğin ilerleyen günlerinde (9.gün) hücre ölümü mezometrial alanda bazal zona ilerlemiş ve hücre ölümünü desteklemiştir. İmplantasyon bölgesinde embriyo ve çevresinde hücre ölümü 8.ve 9. günlerde daha fazla gerçekleşmiştir. Moleküler istatistiksel analizler 9. Günde orta seviyede ekspresyon gösterirken, 7 ve 8. günlerde daha az eksprese olmuştur. Bu

sonuçlara bağlı kalarak başlatıcı kaspaz olan kaspaz-9'un siklusun östrus döneminde en yüksek seviyede uterin epitelde hücre ölümüne neden olduğunu, gebelik boyunca 7. 8. ve 9. günlerde ise yedinci günden başlayarak ilerleyen gebelik günlerinde embriyo çevresinde meydana gelen dejeneratif değişiklikler kaynaklı implantasyon alanlarında ve desidual alanlarda apoptoz sürecini hızlandırdığı düşünülmüştür.

LEF-1; Lef proteini yüksek mobilite grubunun kutu transkripsiyon faktörleri olan lenfoid artırıcı faktör ailesinin Wnt proteinleri salgılanan hücrelerde hücrenin kaderini belirleyen ve polariteyi büyüme dengesini sağlayan ligandlar tarafından yönlendirilen gelişimsel bir sinyalizasyon yolağında görev alan proteindir. Lef proteini hücre yüzeyinde transmembran reseptörleri ile wnt ligandının tanınmasını ve normal olarak kararsız armadillo tekrar proteini olan beta kateninini stabilize ederek onu çekirdeğe yeniden yönlendirecek olan kaskadı başlatır. Lef proteini wnt beta kateninin proteinine sınımsız bağlanabilir ve tek bir HMG DNA bağlanma alanları ile hedef genlere tutunabilir (Brown ve Moon, 1998; Cavollo ve ark., 1998; Roose ve ark.,1998; Brannon ve ark.,1999). Mevcut çalışmaların çoğunda Lef/Tcf proteinlerinin işlevine odaklanılmıştır. Embriyogenez sırasında wnt sinyali doku farklılaşmasının sayısız bölgesinde meydana gelir ve bu Lef/Tcf proteinlerinin ekspresyon modeline yansıtılır. Yapılan çalışmalarda bilinen dört memeli Lef/ Tcf proteininin (LEF-1,TCF-2,TCF-3 ve TCF-4) her bir protein için embriyonik ekspresyon düzeyleri farklı seviyelerde gözlemlenmiştir (Oosterwegel ve ark.,1993; van Genderen ve ark.,1994; Kratochwil ve ark.,1996; Korinek ve ark.,1998). Lef proteini Tcf proteini ile beraber kanonikal wnt sinyaline bağlı bir şekilde hücre içerisinde stabilizasyonu ve miktarı artan beta- katenin nükleus içerisinde Lef/Tcf DNA bağlanma proteini ile etkileşirler. Fakat wnt sinyalizasyonu yoksa Lef/Tcf, Groucho proteini ile birleşerek wnt gen ailesi için hedef olan genleri baskırlar. Eğer ortamda beta-katenin var ise Lef/Tcf/Groucho protein kompleksinden Groucho proteininin uzaklaştırılması ve o bölgeye ko-aktivatör olarak gelen CBP ile oluşan yeni bir protein kompleksi, Wnt proteinlerinin hedef genlerinin sentezlemesini uyarır. Bu kompleks aktivatörü ile beraber Brg-1 olarak adlandırılan kromatin yapısını çözen bir proteininde Wnt hedef gen ekspresyonunu arttırmaktadır. (Logan ve Nusse 2004). Farelerde yapılan bir çalışmada Lef-1/Tcf genlerinin mutasyonu sonucu bilinen wnt mutasyonlarının neden olduğu fenotiplerden herhangi birine benzeyen yeni fenotipler üretmediğini, bunlar arasında mezoderm farklılaşması, böbrek gelişimi ve ekstremitelerde ve plasenta oluşumunda eksiklikler olduğunu

göstermişlerdir (Thomas ve ark., 1991; Stark ve ark., 1994; Takada ve ark., 1994; Parr ve McMahon, 1995; Monkley ve ark., 1996). Van Genderen ve ark. (1994)'nın yaptığı bir çalışmada Lef-1 geninin hedeflenen mutasyonu saç folikülleri, meme bezleri ve dişler de dahil olmak üzere birçok organın gelişmesine engel olduğunu göstermiştir. Buna ilaveten Tcf mutasyonunun da T hücre farklılaşmasını engellediğini bildirmişlerdir (Verbeek ve ark., 1995). Doğum sonrasındaki saatlerde, geniş Lef/Tcf ekspresyonu yok olur ve fare dokularında analizi oldukça sınırlıdır (Brown ve Moon 1998). Örneğin bir çalışmada hem Lef-1 hem Tcf-1'in mRNA sınırlı timusta oldukça kolay tespit edilmiştir fakat başka bir dokuda çok daha az mRNA saptanmıştır (Giese ve ark.,1995; Wetering ve ark.,1996; Hsu ve ark.,1998). Lef-1 proteini ve endometrial karsinomlarla ilgili yapılan bir çalışmada endometrial karsinomların % 12-25'inde ortaya çıkan CTNNB1 geninin mutasyonları tipik olarak beta-kateninin sitoplazmik ve nükleer birikiminde artışa neden olduğunu ve bunun da daha sonra Lef-1 ve Tcf ailesi üyelerinin aktivasyonuna yol açtığını göstermiştir. Aktifleşmiş Lef-1 proteini ve mutasyona uğramış beta-katenin arasındaki bu ilişki Lef-1 'in endometrial kanser olgularında moleküllerin düzensizliğe yol açabileceğine dair bir ipucu vermiştir (Machin ve ark., 2002; Moreno-Bueno ve ark., 2002; Konopka ve ark., 2007). Bu literatür bilgisi genel olarak Wnt beta-katenin sinyal yolağının Lef-1 üzerinde uterus büyümesinin düzenlenmesinde hemde uterusun normal gelişimi ve işlevi hakkında katkıda bulunacağını düşündürmektedir (Tulac ve ark., 2003; Mericskay ve ark.,2004; Miller ve Sassoon 1998). Dawne ve arkadaşları (2012)'nın farelerde endometrial bez oluşumu ile ilgili yaptıkları bir çalışmadaki gözlemlerinde uterus gelişimi sırasında ve östrus döneminde lef-1 proteininin ifadesinin olabileceğini gözlemlemişlerdir. Uterus gelişimi sırasında Lef-1 ekspresyonu Wnt beta-katenin sinyal yolunun Lef/ tcf ye bağlı sinyalleşmesinin farelerdeki östrus siklusu sırasında hassas bir düzenlenime sahip olduğunu bildirmişlerdir. Östrus döngüsü boyunca daha çok proöstrus dönemde salgı bezlerindeki hücre proliferasyonunda değişiklik olabileceğini gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada da uterus içerisindeki Lef-1 ekspresyonunun hem gelişim hem de endometrial bezlerin oluşmasında ve kontrolünde etkili olduğunu, Lef-1 yokluğunda ise normal bir endometrium varlığına rağmen, başarısız bir uterus bezi oluşumu ile sonuçlandığını göstermişlerdir. Knockout farelerde lef-1 çalışmasında karakterize edildiğinde bu farelerin meme bezlerinde ve epitelyal mezenkimal etkileşimlerinin örneğin kıl foliküllerinde eksik olduğu gösterilmiştir (van Genderen ve ark.,1994). Tükürük bezlerinin rejenerasyonunun Wnt beta katenin sinyal yoluna bağlı olduğu ve

beta-katenin sinyalinin inhibisyonunun tükürük bezlerinin gelişimini durdurduğunu ileri sürülmüştür (Hai ve ark., 2010). Bütün bu veriler uterus ve tükürük bezindeki bez oluşumuna katkıda bulunan normal süreçlerin Wnt sinyaline ve özellikle uterusu Lef-1 aracılı Wnt sinyaline bağlı olduğunu göstermiştir. Logan ve Nusse (2004) yılında lef-1 geninin nükleus içerisinde kanonikal yolun aktivasyonunu sağladığını ve beta-katenin ile etkileşerek çeşitli gen ekspresyonlarının uyarıldığını gözlemlemişlerdir (Logan ve Nusse, 2004). Reya ve ark. (2000) Lef-1'in endometrium üzerindeki çalışmalarından farklı olarak, B hücre farklılaşmasında eksprese olduğunu ve hücre proliferasyonunda gerekli olduğunu gösteren bir çalışma yapmış fakat hücre farklılaşmasında Lef-1 'in gerekli olmadığını ileri sürmüşlerdir. Wnt sinyalleşmesinin erken evre B lenfositleri için mitojenik olduğuna ve Lef-1 eksikliği olan farelerde B hücrelerinin azalmış büyüme ve hayatta kalmasında normal bir Wnt sinyalinin kaybına neden olan Lef-1'in varlığına bağlı olduğunu düşünmüşlerdir. 2009 yılında yapılan doktora tezi çalışmasında, kısırlarda endometriumun Lef-1 ekspresyonunun östrus döneminde kanonikal yolu uyaran Wnt-7a ile beraber artış gösterdiğini gözlemlenmiştir. Bu duruma bağlı olarak Lef-1'in kanonikal sinyal yolu iletim sisteminin aktivasyonuna bağlı olarak arttığını işaret etmektedir (Atlı, 2009). Lef-1'in östrus ve gebelik dönemindeki varlığı ile ilgili çok fazla çalışmaya rastlanmamıştır, fakat Lef-1'in Wnt sinyal yolağında beta katenin bağımlı transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir. Östrus siklusu dönemlerinde Lef-1 proteini hemen hemen bütün evrelerde aynı seviyede eksprese olmuştur. Aynı zamanda bu proteinin miyometrial ve perimetrial alanlarda da ekspresyon gösterdiği görülmüştür. Östrus siklusunun özellikle metaöstrus döneminde glandular bez gelişimde etkili olduğu bez epitelinde eksprese olmasıyla doğrulanmıştır. Metaöstrus dönemde bez epitelindeki immunlokalizasyonun progesteron ve LH seviyelerinin değişkenlik göstermesinden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür. Literatür bilgisinde uterus bez gelişimine yardımcı olduğu ve daha çok östrus siklusunun proöstrus döneminde en çok eksprese olduğu, gözlemlenen Lef-1 proteini bizim elde ettiğimiz bulgularla bez gelişimine yardımcı olmasıyla doğruluk kazanmakta fakat östrus siklusunun metaöstrusunda bez epitelinde proöstrus döneme göre daha kuvvetli immunreaksiyon göstermesiyle örtüşmemektedir. Bu bilgiler doğrultusunda yapılan moleküler çalışmalarda proöstrus dönemde en az eksprese olan Lef-1 proteini metaöstrus dönemde orta derecede eksprese olduğunu göstererek histolojik çalışmalarımızı desteklemiştir. Gebelikte Lef-1 proteini özellikle gebeliğin 7. gününde implantasyon alanlarında ekspresyon seviyesi oldukça düşüktür. Gebeliğin 8. gününde implantasyon alanlarında ve trilaminar disk hücrelerinin

çekirdeklerinde kuvvetli ve orta kuvvetli immunreaksiyon göstermesi transkripsiyon faktörü olan bu proteinin gebeliğin ilerleyen süreçlerinde çeşitli hücre proliferasyonları olabileceğinden ve beta katenini stabilize ederek çekirdeğe doğru bir sinyalizasyon başlatmış olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır. Elde edilen real time PZR sonuçları 7. günde Lef-1 proteininin çok az çalıştığını doğrulamakta, 8. ve 9. günlerde ise 7. güne oranla daha iyi eksprese olduğunu düşündürmüştür. Bu veriler sonucuna bakılarak gebeliğin ilerleyen günlerine doğru çekirdekdeki lokalizasyonun artış göstermesiyle Lef proteininin Wnt sinyal yolağında transkripsiyon faktörü olmasını doğrular niteliktedir. İmplantasyon ve LEF-1 proteini ilişkisine literatür araştırmalarında çok fazla rastlanılmamış olup, bu nedenle ayrıntılı bir kıyaslama yapılamamıştır.

TCF; Tcf molekülü Wnt beta-katenin bağımlı bir proteindir. Wnt proteininin reseptörlerine bağlanmasıyla hücre zarına gelen sinyalizasyon sitozolde yer alan yıkıcı kompleksin dağılmasına neden olmaktadır. Yıkılan bu kimyasal kompleksin fosforillenme etkisinden kurtulan β -katenin çekirdek içerisine girerek, sitoplazmaya gelen sinyali doğrudan çekirdeğe aktarır (Komiya ve Habas, 2008; Shitashige ve ark., 2008). Beta-katenin molekülü çekirdeğe girdiği andan itibaren sinyal yolunun hedef aldığı birçok molekülle (c-myc, gastrin, n-myc cyclin d1 vb.) iletişim kurarak gen transkripsiyonunu sağlar. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının çekirdek aktivasyonunda görevli biyomoleküller, ‘T-cell factor (TCF)/Lymphoid enhancer factor-1 (LEF-1) transkripsiyon faktörü’olarak tanımlanmıştır. Bu mekanizma şöyle açıklanmıştır; TCF transkripsiyon faktörleri çekirdek içerisinde bulunarak DNA’ya bağlanıp gen transkripsiyonunu aktif hale getirirler. Bu yüzden birçok hücresel süreçte hayati öneme sahiptir (Willert and Jones, 2006). TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin C-terminal uçlarında “AGATCAAAGGG” dizisinden oluşmuş nükleotidler DNA bölgesini tanıyan ve buraya bağlanan bir DNA bağlanma bölgesi bulunur (Mulholland ve ark.,2005).Bu bölge high-mobility group (HMG) olarak isimlendirilir. DNA’ya bağlanan faktörler genlerdeki transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlarlar (Lusting ve Behrens., 2003). Bu mekanizmanın N-terminalinde ise β -katenin bağlanma domaini olan aminoasitlerin bağlanma bölgesi bulunur (Graham ve ark., 2000, Xu ve Kimelman, 2007). Çekirdekte bu transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonu aktiveşirebilmeleri için β -katenin proteinine bağlanması zorunludur. Bu sebepten β -kateninin transkripsiyon faktörü TCF/LEF’in bir ko-aktivatörü olduğu bilinmektedir (Graham ve ark., 2000, Chen ve ark., 2008). Beta-katenin bağlanmasıyla oluşan bu yapı “ β -katenin-TCF/LEF1

transkripsiyon kompleksi'' olarak tanımlanmaktadır ve oluşan bu kompleksin DNA'ya bağlanarak hedef genleri oluşturacağı saptanmıştır (Graham ve ark., 2000; Lustig ve Behrens, 2003; Xu ve Kimelman, 2007).

Carl ve ark. 2007 yılında yaptığı bir çalışmada TCF/LEF transkripsiyon faktörlerinin çalışma mekanizması Wnt beta-katenin sinyal yolağı inaktif haldeyken, transkripsiyon faktörlerinin de inaktif halde olması gerektiğini savunmaktadır. Sinyal yolağı inaktif durumdayken aktif olan yıkıcı kompleks etkisi ile parçalanan beta-katenin çekirdeğe giremez ve beta-katenin çekirdeğe giremediği için transkripsiyon faktörlerine bağlanamadığından onları da aktive edemez demiştir. Bu sonuçla genlerin transkripsiyonun engellendiğini, ve çekirdek içerisinde bulunan Groucho/TLE (Transducin-like-Enhancer of split) ve C-terminal bağlanma proteinleri (CtBP) gibi çeşitli diğer proteinler de TCF/LEF transkripsiyon faktörlerine bağlandığını söylemiştir (Carl, 2007). Bu bağlanma transkripsiyon faktörlerini inaktif tutmayı sağlar. Bu yüzden bu proteinler transkripsiyon inhibitörleri olarak bilinmektedirler. Sinyal mekanizmasında öncelikle sinyal çekirdeğe ulaşmadan çekirdekte bulunan TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörü farklı inhibitör proteinlerle bağlı bir halde ve inaktif durumda bulunmaktadır. Çekirdeğe girmiş olan beta-kateninin görevi ise inhibitör proteinlerin TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinden ayrılarak aktif bir özellik kazanmasını sağlamasıdır (Willert ve Jones, 2006; Shitashige ve ark., 2008). Bundan dolayı beta-katenin çekirdek içerisinde birden fazla yardımcı molekülle etkileşime girer ve çok kompleks yapılar oluşturur. Beta-katenin ve yardımcı moleküllerinin oluşturduğu bu multiprotein yapıdaki kompleks TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerine bağlanır (Graham ve ark., 2000, Lustig ve Behrens, 2003). Bu bağlanmanın görevi tamamen inhibitör proteinlerin TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinden ayrılarak aktif hale getirilmesinin sağlanmasıdır (Chen ve ark., 2008). Sonuç olarak yeni oluşmuş TCF/LEF-1- β -katenin transkripsiyon kompleksi DNA'nın uygun alanına bağlanarak transkripsiyonu başlatmış olacaktır. Böylece çekirdeğe geçmiş olan sinyal, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun hedef aldığı c- myc", "cyclin d1", "follistatin", "survivin", "vegf", "mmp-7", "gastrin" ve "conductin" gibi birden fazla gen ifadesini aktif hale getirir bu durum ise hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre göçü gibi çok önemli süreçlerin gerçekleşmesini sağlar (Ziegler ve., 2005).

T hücre faktörü olarak bilinen Tcf proteini katenin bozunma inhibisyonu sitozolik birikimi, nükleer alımını ve lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü olan Lef-1 'e Tcf

familyası transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını uyarır (Hoppler ve Kavanagh, 2007; Willert ve Jones, 2006). Uyarılmamış olan hücrelerde ise Lef/Tcf groucho transdusin benzeri (TLE) ailesi proteinleri gibi başka koruyucularda transkripsiyon inhibitörleri olarak görev yaparlar (Buscarlet ve Stifani., 2007). Bu özelliklerle beraber Wnt aktivasyonu üzerine bu reseptörler TCF/LEF için aktivasyon bölgesi sağlarlar. Aktif TCF/LEF hücre proliferasyonunda ve invazyonunda rol alan siklin, D1 gibi hedef genlerin ekspresyonlarını indükler (Willert ve Jones, 2006). Pollheimer ve arkadaşları (2006) ekstravillöz trofoblastların ya da trofoblast oluşumunda ve farklılaşmasında TCF7L2 olarak ya da TCF-4'ün sentezlenmesi ile ilişkilendirmişlerdir. Sonderegger ve ark (2010) yaptığı bir çalışmada rekombinant Wnt ile *in vitro* stimülasyon, trofoblastlarda ve diğer hücrelerde kanonikal olmayan sinyal yollarını da aktive edebileceğini bildirmişlerdir. Bu gözlemlerden yola çıkarak kanonikal wnt sinyal yolunun ve ekstravillöz trofoblast oluşumunun düzenleyicilerini tanımlamak adına küçük interferans RNA'sı siRNA aracılı gen susturulmasını kullanarak TCF-4 proteininin trofoblast düzeyini ve integrin gibi promigratör genlerin ekspresyonunu kontrol ettiği bilgisi verilebilir. TCF-4 proteini ile ilgili yapılan immunfloresan çalışmalarda ilk trimesterdeki plasental dokuların çekirdek baskılıyıcıları ve aktivatörleri erken plasental dokuların immunfloresan çalışmaları EVT oluşumu üzerine kanonikal Wnt yolağının transkripsiyonel bileşenlerinin indüksiyonu olduğunu ortaya çıkarmıştır. TCF-3 ve TCF-4 proteinlerinin nonproliferatif fazlarda negatif ekstravillöz trofoblastlarda oldukça fazla miktarda olduğu gösterilmiştir. Buna ilaveten başka hücrelerde de Wnt/Tcf sinyalinin bir hedef geni olarak tarif edilen transkripsiyon faktörü Snail 1 ekspresyonu ile de ilişkilendirilmiştir (Ten Berge ve ark.,2008; Yook ve ark.,2006). Bu protein wnt sinyal yolağında anahtar bir rol oynar (Florez, 2007, Weedon, 2007). Çekirdekte TCF7L2'nin beta -katenine bağlanması ile siklin D1 gibi β - hücre çoğalmasında görev almış hedef genlerin transkripsiyonunu indüklemesiyle önemlidir. Siklin D1, β -hücre proliferasyonunun en kilit belirleyicilerindedir (Lyssenko, 2008). Wnt ligantlarının FZD reseptörlerinin LRP6 ve TCF7L1-TCF7L2 'nin insan plasentası ve çeşitli trofoblast hücre hatlarında olduğunu bulmuşlardır. Farelerde ise kanonikal wnt sinyal yolu implantasyon için gerekli olan blastosist-uterus etkileşimlerini koordine etmede merkezi bir rol oynayacağını bildirmişlerdir (Mohamed ve ark., 2005). TCF7L2 (tcf4) wnt sinyal yolunun bir parçası olan ve (CTNNB1) için nükleer reseptör olarak görev alan transkripsiyon faktörüdür (Smith, 2007).

Özkan (2013)'ın yaptığı bir çalışmada TCF7L2 gen ürününün Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki görevi göz önüne alındığında, TCF7L2 rs7903146 varyantıyla kanser gelişimini etkileyebileceği düşünülmüştür. Burwinkel ve ark. (2006), Naidu ve ark. (2012) ve Connor ve ark. (2012) yaptıkları farklı çalışmalarda ise TCF7L2 varyantlarının meme kanseri oluşumu riski ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır. Benzer şekilde Folsom ve ark. (2008), Hazra ve ark. (2008) ve Sainz ve ark. (2012) tarafından yapılan bağımsız çalışmalarda ise TCF7L2 varyantları ile kolon kanseri arasındaki potansiyel bağlantıya dikkat çekilmiştir.

Bu çalışmalardan bağımsız olarak rat endometriumunda yaptığımız çalışmalarda ratların östrus siklusu boyunca dört evrede de özellikle, endometrial bazal stroma alanlarında orta kuvvetli ve kuvvetli şekilde immunreaksiyon göstermesi burada yer alan hücrelerin çekirdeklerinde bir transkripsiyon varlığını desteklemiş fakat östrus, metaöstrus ve diöstrus dönemlerde uterus epitelinde lokalize olmaması henüz bilinmeyen faktörlerin etkili olabileceğini düşündürmüştür. Siklusun dört evresinde de Real time PZR sonuçlarına göre, östrus siklusu özellikle östrus dönemde en iyi eksprese olurken diğer evrelerde orta seviyede gen ifadesi göstermiştir. İmplantasyon ve Tcf ilişkisi düşünüldüğünde gebeliğin yedinci günü Tcf molekülü için primer desidual alanlarda kan damarı çevresinde kuvvetli immunreaksiyon göstermesi wnt sinyal yolağının implantasyon aşamasında beta-katenin TCF/LEF-1 transkripsiyon yolunun gebeliğin başlangıcından itibaren görev almasını destekler nitelikte olmuştur. Özellikle gebeliğin ilerleyen günlerinde sekizinci ve dokuzuncu günde spesifik özellik gösteren TCF molekülünün embriyo hattında sitoplazma da değil de daha çok çekirdekte boyanmasının yanında dev trofoblast hücrelerinin çekirdeklerinde de lokalize olması çekirdek içerisinde bir transkripsiyon olduğunu göstermekte bu sonucun ise desidual hücrelerin çekirdeklerindeki farklılaşmadan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Primer ve sekonder desidual alanlarda yer alan desidual hücrelerin çekirdeklerini boyaması beta-katenin proteininin parçalanarak sitoplazmadan girdiğini ve sinyalin çekirdeğe ulaştığını bu sayede TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin inhibitörler tarafından baskılanmayarak Wnt/beta-katenin sinyal yolunda hedef genlerde transkripsiyonu gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır. Real time PZR istatistikleri yedinci günde ortalama bir ekspresyon göstermiş, sekizinci günde histolojik çalışmaları daha az doğrular nitelikte çalışırken, dokuzuncu günde ekspresyon yeniden orta seviyeye inerek çalışmalarımızı desteklemiştir. Elde ettiğimiz bulgular sonucu TCF

molekölünün TCF/LEF-1 ile beraber bir transkripsiyon faktörü olduğu gebeliğin ilerleyen dönemlerinde daha etkili olabileceğini göstermiştir.



6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Wnt sinyali, Wnt molekülleri ve Wnt ligandları, Frizzled alıcıları membran alıcıları olan çeşitli faktörlerle, Wnt sinyali inhibitör faktörlerini içerir. Rat endometriumunda, hem östrus siklusu döneminde hem de gebeliğin 7. 8. ve 9. günlerinde, Wnt sinyal yolağı molekülleri olan Wnt-3, Wnt-7a, β -katenin, kaspaz-9, LEF-1 ve TCF'nin ekspresyonları, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının bu süreçlerde etkili olduğu ve bu sinyal yolağında rol alan faktörlerin aktivitelerini desteklemiştir. Wnt sinyalizasyonunun, gelişim ve hücre ölümünün belirlenmesinde oldukça önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Östrus siklusunun farklı dönemlerinde, Wnt sinyal yolağı moleküllerinin stromal alanlar, bez epiteli, uterus epiteli ve kan damarlarında, insanlardaki sekresyon (luteal) ve proliferasyon dönemleri baz alınarak karşılaştırılmış ve farklı ekspresyon seviyeleri, östrojen ve progesteron miktarına göre değişiklik göstermiştir. Hücre ölümü (apoptoz), hücre çoğalması, plasantasyon, embriyo gelişimi, desidualizasyon ve transkripsiyon gibi olaylarda, Wnt sinyal moleküllerinin etkileri olduğu ve bu mekanizmaları kontrol ettikleri bilinmektedir.
- Başarılı bir implantasyonun gerçekleşebilmesi, uterus epiteli ve uterus glandular bezlerinin gelişimi için Wnt sinyal yolağı moleküllerinden Wnt-7a'nın, bu süreçlerde önemli bir rolü olduğu, desidual hücrelerde ve implantasyon alanlarında, hücre çekirdeğinde meydana gelen transkripsiyonun beta-katenin bağımlı TCF/LEF-1 proteinlerince gerçekleşmiştir.
- Beta- katenin östrus siklusu boyunca endometriumda farklı bölgelerdeki lokalizasyonları takip edilmiştir. Uterus epitelinde, bez epiteli ve stromal bölgelerde farklı seviyelerde lokalizasyon göstermiştir. Farklı seviyelerdeki bu lokalizasyonun ise progesteron ve östrojen hormonları etkisinde olabileceği düşünülmüş ve gebelik dönemi endometriumunda embriyo hattında, stromal alanlarda, bez epitelinde izlenen kuvvetli immunreaktivite beta-kateninin sitoplazma içerisinde aktif olup çekirdekte ve hücreler arası membranlarda, etkili olduğunu ispatlamıştır. Buradan wnt sinyal yolağında beta-katenin molekülünün endometrial siklus ve gebelik dönemi günlerinde yıkımı gerçekleşmeyerek maksimum seviyede bulunduğu ve buna bağlı olarak hücre çekirdeğinde aktif rol almasıyla sinyal yolağını aktive ettiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuçlara

bağlı kalarak beta-katenin proteininin Wnt sinyal yolağı için önemli bir etken olduğunu göstermiştir.

- Rat endometriumunda östrus siklusu dönemlerinde ve gebeliğin çalışıldığı 7. 8 ve 9. günlerde, uterin epitelde, stromal alanlarda, embriyo alanlarında, kan damarları ve desidual bölgelerde Wnt sinyal yoluna bağlı kalarak, kaspaz ailesi üyelerinden kaspaz-9'un hücrenin programlı ölümünü (apoptoz) başlattığı bilinmektedir.
- Peri-implantasyon süreci boyunca, Wnt moleküllerinin hem kanonikal hem de nonkanonikal sinyal yollarını kullanarak, fonksiyon görebileceklerini ve her bir molekülün endometriumda, moleküler çalışmalarla da desteklendiği gibi, farklı ekspresyonları ve farklı fonksiyonları olabileceği sonuçlarına ulaşılmıştır.
- Wnt-3 molekülünün östrus siklusu dönemlerinde stromal alanlar baza alınarak insanlardaki proliferatif fazın denk geldiği düşünülen proöstrus ve östrus dönemlerde, sekretuar faza denk geldiği düşünülen metaöstrus ve diöstrusa göre artış gösterdiği görülmüş ve bu sonucun proliferatif fazda östrojen etkisiyle stromal alanlarda meydana gelen değişiklikten kaynaklı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Gebelik dönemi düşünüldüğünde ise Wnt-3 molekülünün implantasyonda rol aldığı görülmüştür.
- Wnt sinyal yolağının, kanonikal yol üzerinden aktivasyonu implantasyonda blastosist- uterus etkileşimlerinin koordine edilmesinde çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir.

6.2. Öneriler

- ✓ Son yıllarda yapılan birçok araştırma, implantasyon döneminde uterus endometriyumunda meydana gelen morfolojik ve moleküler değişiklikleri anlamaya yöneliktir. Bununla birlikte bu sürecin nasıl tetiklendiği ya da hangi mekanizmaların buna neden olduğu, hala tam olarak anlaşılamamıştır. Sunulan bu çalışmadan elde edilen veriler, Wnt-3, Wnt-7a, β -katenin, kaspaz-9 ve LEF-1/TCF proteinlerinin, normal östrus siklusu ve gebelik sırasında uterus endometriyumunda ortaya çıkan değişikliklerde oynadıkları rollerinin bilinmesine katkı sağlayacaktır.
- ✓ Wnt sinyal yolağı moleküllerinden Wnt-3'ün, implantasyon ve ratların östrus siklusu dönemlerinde, çok fazla çalışma yapılmamış olmasına rağmen, implantasyon döneminde etkili olabileceği düşünülmektedir.
- ✓ Beta-katenin, Wnt sinyal yolağının en önemli bileşenidir ve implantasyon için oldukça önemlidir. Bu molekülün implantasyonun farklı günlerinde ne tür etkileri olduğu incelenmelidir.
- ✓ Wnt-7a, uterus dokusu ve implantasyon için oldukça önemli bir moleküldür. Gebeliğin başlangıcında ve ileri aşamasında, uterus epiteli ve glandular bez oluşumunda olası etkilerini tespit etmek amacıyla yeni çalışmalar planlanmalıdır.
- ✓ Transkripsiyon molekülleri (TCF ve LEF-1) çekirdek için spesifik olup gebelik, kanser ve beyin tümörleri olgularındaki etkileri sorgulanmalıdır. Bu moleküllerin uterusun perimetrial ve miyometrial alanlardaki ekspresyon düzeyleri araştırılmalıdır.
- ✓ Kaspaz-9, apoptoz sürecinde yer alan önemli bir Wnt sinyal yolağı proteindir. Kaspaz-9 ve kaspaz ailesinin diğer üyelerinin, implantasyon döneminde endometriyumda, başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazlarla beraber, ekspresyon düzeyleri incelenmelidir.
- ✓ Wnt sinyal yolağı molekülleri, steroid hormonlardan etkilendikleri için, ovaryum dokusu üzerindeki olası etkileri belirlenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Abrahamsohn, P., A., (1983). Ultrastructural study of the mouse antimesometrial decidua. *Anatomy and Embryology*, 166(2), 263-274.
- Abrahamsohn, P. A., Zorn, T. M. (1993). Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology*, 266(6), 603-628.
- Adams, J. M., Cory, S., (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(1), 61-66.
- Adrain, C., Martin, S., J., (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(6), 390-397.
- Ahşap, G., A., Fata, J., E., Watson, K., L., Khokha, R., (2007). Hormones circulating in the rodent uterus and the oestrus phase prescribe cellular and stromal remodeling. *Reproductive*. 133: 1035–1044
- Akcali, K., C., Khan, S., A., Moulton, B., C., (1996). Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium. *Endocrinology*, 137(7), 3123-3130.
- Alden, R., H., (1947). Origin and activity of primary trophoblast giant cells during implantation (days 4-6) in the albino rat. *The Anatomical Record*, 97(3), 317.
- Altunkaynak, B., Z., Özbek, E., (2008). Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir. *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6(2), 93-104.
- Andrew, G., R., Catherine, B., Christopher S., P., (2001). What is apoptosis, and why is it important, *BMJ: British Medical Journal*, 322(7301), 1536.
- Aplin, J., D., Glasser, S., R., Fazleabas, A., T., (2008). *The Endometrium: Molecular, Cellular and Clinical Perspectives*. Informa.
- Arslan, G., (2012). Pre- ve Postimplantasyon dönemlerinde Fare Endometriumunda Rhokinaz A'nın İmmunlokalizasyonu. (Yüksek lisans tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Atlı, M., O., (2009). Sıklık ve Erken Gebe Kısırak Endometriumlarında WNT (Wingless Types) Genlerinin Ekspresyonunun Araştırılması, (Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).

- Bany, B., M., Harvey, M., B., Schultz, G., A., (2000). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(1), 125-134.
- Barker, N., (2008). The canonical Wnt/ β -catenin signalling pathway. In *Wnt Signaling* (pp. 5-15). Humana Press.
- Barkett, M., Xue, D., Horvitz, H., R., Gilmore, T., D., (1997). Phosphorylation of I κ B- α inhibits its cleavage by caspase CPP32 in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 272(47), 29419-29422.
- Behrens, J., Jerchow, B., A., Würtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Birchmeier, W., (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Science*, 280(5363), 596-599.
- Behrens, J., Von, Kries, J., P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592), 638.
- Berk, S., Elegans, C. (2006). Reconstructon of protein-protein and protein-interferon networks of Wnt signaling in *C. elegans*. Izmir Institute of Technology, Chemical Engineering, 36-86.
- Berridge, M., J., (2012). Cell Signaling Biology, <http://www.auburn.edu/academic/classes/biol/6190/CellSignalingBiology/csb001.pdf>
- Bienz, M., Waltzer, L., (1998). Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, 395(6701), 521.
- Bilić, J., Huang, Y., L., Davidson, G., Zimmermann, T., Cruciat, C., M., Bienz, M., Niehrs, C., (2007). Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 316(5831), 1619-1622.
- Bischof, P., Haenggeli, L., Campana, A., (1995). Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *American Journal of Reproductive Immunology*, 34(4), 225-230.
- Bourne ed. (1980) International Review of Cytology, Vol. Volume 68: Academic Press 251-306.

- Bovolenta, P., Rodriguez, J., Esteve, P., (2006). Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development*, 133(22), 4399-4408.
- Brannon, M., Brown, J., D., Bates, R., Kimelman, D., Moon, R., T., (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout Xenopus development. *Development*, 126(14), 3159-3170.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R., T., Kimelman, D., (1997). A β -catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in Xenopus. *Genes Development*, 11(18), 2359-2370.
- Brown, J., D., Moon, R., T., (1998). Wnt signaling: why is everything so negative. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 182-187.
- Brunner, E., Peter, O., Schweizer, L., Basler, K., (1997). pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in Drosophila. *Nature*, 385(6619), 829.
- Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X., (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15(1), 269-290.
- Bulmer, D., Dickson, A., D., (1961). The fibrinoid capsule of the rat placenta and the disappearance of the decidua. *Journal of Anatomy*, 95(Pt 3), 300.
- Burwinkel, B., Shanmugam, K. S., Hemminki, K., Meindl, A., Schmutzler, R., K., Sutter, C., Frank, B., (2006). Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) variant is associated with familial breast cancer risk: a case-control study. *BMC Cancer*, 6(1), 268.
- Buscariet, M., Stifani, S., (2007). The 'Marx' of Groucho on development and disease. *Trends in Cell Biology*, 17(7), 353-361.
- Büyükgebiz, O., Caferler, J., S., (2001). Apoptoz. *Sendrom*, 13, 102-7.
- Can, A., (2014). Kök hücre biyolojisi türleri ve tedavide kullanımları, 1. Baskı, *Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara*.
- Carl, M., Bianco, I. H., Bajoghli, B., Aghaallaei, N., Czerny, T., Wilson, S., W., (2007). Wnt/Axin1/ β -catenin signaling regulates asymmetric nodal activation, elaboration, and concordance of CNS asymmetries. *Neuron*, 55(3), 393-405.

- Carmon, K., S., Loose, D., S., (2008). Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. *Molecular Cancer Research*, 6(6), 1017-1028.
- Carson, D., D., Bagchi, I., Dey, S., K., Enders, A., C., Fazleabas, A., T., Lessey, B., A., Yoshinaga, K., (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223(2), 217-237.
- Carter, A., M., (2007). Animal models of human placentation—a review. *Placenta*, 28, S 41-S47.
- Cavallo, R., A., Cox, R., T., Moline, M., M., Roose, J., Polevoy, G., A., Clevers, H., Bejsovec, A., (1998). Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 395(6702), 604.
- Cesur, İ., (2010). Wnt antagonistlerinin pre ve post-implantasyon dönemlerinde sıçan endometriumundaki immunolokalizasyonu. (Uzmanlık Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Chen, Q., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Wang, S., Cao, Y., Duan, E., (2009). Embryouterine cross-talk during implantation: the role of Wnt signaling. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 15(4), 215-221.
- Chen, S., Guttridge, D., C., You, Z., Zhang, Z., Fribley, A., Mayo, M. W., Wang, C., Y., (2001). Wnt-1 signaling inhibits apoptosis by activating β -catenin/T cell factor-mediated transcription. *The Journal of Cell Biology*, 152(1), 87-96.
- Chen, T., Yang, I., Irby, R., Shain, K., Wang, H., Quackenbush, J., Yeatman, T., J., (2003, January). Regulation of caspase expression and apoptosis by APC. In *Annals of Surgical Oncology* (Vol. 10, No. 1, pp. S23-S23). 530 Walnut ST, Philadelphia, PA 19106-3621 USA: Lippincott Williams Wilkins.
- Chen, X., Yang, J., Evans, P. M., Liu, C., (2008). Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 40(7), 577-594.
- Cheng, C., W., Smith, S., K., Charnock-Jones, D., S., (2008). Transcript profile and localization of Wnt signaling-related molecules in human endometrium. *Fertility and Sterility*, 90(1), 201-204.
- Ching, W., Nusse, R., (2006). A dedicated Wnt secretion factor. *Cell*, 125(3), 432-433.

- Clancy, K., B., (2009). Reproductive ecology and the endometrium: physiology, variation, and new directions. *American Journal of Physical Anthropology*, 140(S49), 137-154.
- Clevers, H., (2006). Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469-480.
- Cobas, M., Wilson, A., Ernst, B., Mancini, S. J., MacDonald, H. R., Kemler, R., Radtke, F., (2004). β -catenin is dispensable for hematopoiesis and lymphopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, 199(2), 221-229.
- Connor, A., E., Baumgartner, R., N., Baumgartner, K., B., Kerber, R., A., Pinkston, C., John, E., M., Slattery, M., L., (2012). Associations between TCF7L2 polymorphisms and risk of breast cancer among Hispanic and non-Hispanic white women: the Breast Cancer Health Disparities Study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(2), 593-602.
- Cooke, P., S., Spencer, T., E., Bartol, F., F., Hayashi, K., (2013). Uterine glands: development, function and experimental model systems. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 19(9), 547-558.
- Coudreuse, D., Korswagen, H., C., (2007). The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134(1), 3-12.
- Couse, J., F., Korach, K., S., (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocrine reviews*, 20(3), 358-417.
- Cunha, G., R., (1976). Epithelial-stromal interactions in development of the urogenital tract. In *International Review of Cytology* (Vol. 47, pp. 137-194). Academic Press.
- Curtin, J., F., Cotter, T., G., (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling*, 15(11), 983-992.
- Çınar, N., (2012). Pre- ve Postimplantasyon Dönemlerinde Fare Endometriumundaki Notch Ligand Jagged-1 ve Jagged-2'nin İmmunlokalizasyonu. (Yüksek lisans tezi Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- D'Souza S., S., Daikoku T., Farach-Carson MC, Carson DD. Heparanase expression and function during early pregnancy in mice. *Biology of Reproduction*, 2007; 77:433–441.

- Dai, D., Moulton, B., C., Ogle, T., F., (2000). Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members. *Biology of Reproduction*, 63(1), 188-195.
- Damcott, C., M., Pollin, T., I., Reinhart, L., J., Ott, S., H., Shen, H., Silver, K., D., Shuldiner, A., R., (2006). Polymorphisms in the transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene are associated with type 2 diabetes in the Amish: replication and evidence for a role in both insulin secretion and insulin resistance. *Diabetes*, 55(9), 2654-2659.
- Damsky, C., H., Librach, C., Lim, K., H., Fitzgerald, M., L., McMaster, M., T., Janatpour, M., Fisher, S., J., (1994). Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development*, 120(12), 3657-3666.
- Daniel, N., N., Korsmeyer, S., J., (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Dash, P., (2008). Apoptoz. <http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/apoptosis/>
- Daugherty, R., L., Gottardi, C., J., (2007). Phospho-regulation of β -catenin adhesion and signaling functions. *Physiology*, 22(5), 303-309.
- Davidson, L., M., Coward, K., (2016). Molecular mechanisms of membrane interaction at implantation. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 108(1), 19-32.
- de Vries, W., N., Evsikov, A., V., Haac, B., E., Fancher, K., S., Holbrook, A., E., Kemler, R., Knowles, B., B., (2004). Maternal β -catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*, 131(18), 4435-4445.
- Demir, R., (1995). *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. Palme Yayıncılık. Ankara
- Demir, R., (1997). Functional differentiation of the blastocystic ring trophoblast cells in the rat. *Biomedical Reviews*, 8, 127-132.
- Donma, M., M., Donma, O., (2010). Wnt signaling pathway in cardiovascular and other clinical diseases. *Turkiye Klinikleri Cardiovascular Sciences*, 22(1), 93-103.
- Dorsky, R., I., Moon, R. T., Raible, D., W., (1998). Control of neural crest cell fate by the wnt signalling pathway. *Nature*, 396(6709), 370.

- Dönmez, H., G., Demirezen, Ş., Beksaç, M., S., (2011). WNT/Beta-Katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri. *Deu Med J.* 2011;25(3): 189-199
- Du, S., J., Purcell, S., M., Christian, J., L., McGrew, L., L., Moon, R., T., (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Molecular and Cellular Biology*, 15(5), 2625-2634.
- Duc-Goiran, P., Mignot, T., M., Bourgeois, C., Ferre, F., (1999). Embryo–maternal interactions at the implantation site: a delicate equilibrium. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 83(1), 85-100.
- Duriez, P., Shah, G., M., (1997). Cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death. *Biochemistry and Cell Biology*, 75(4), 337-349.
- Duval, A., Rolland, S., Tubacher, E., Bui, H., Thomas, G., Hamelin, R., (2000). The human T-cell transcription factor-4 gene: structure, extensive characterization of alternative splicings, and mutational analysis in colorectal cancer cell lines. *Cancer Research*, 60(14), 3872-3879.
- Earnshaw, W., C., Martins, L., M., Kaufmann, S., H., (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68(1), 383-424.
- Eastman, Q., Grosschedl, R., (1999). Regulation of LEF-1/TCF transcription factors by Wnt and other signals. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(2), 233-240.
- Ellies, D., L., Church, V., Francis-West, P., Lumsden, A., (2000). The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development*, 127(24), 5285-5295.
- El-Shershaby, A., M., Hinchliffe, J., R., (1975). Epithelial autolysis during implantation of the mouse blastocyst: an ultrastructural study. *Development*, 33(4), 1067-1080.
- Enders, A., C., Schlafke, S., (1967). A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *American Journal of Anatomy*, 120(2), 185-225.
- Erdem, F., Alper D., Adhezyon Molekülleri. *T Klin J Med Sci*, (1997). 17: 75-77.

- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M., T., Görgün, M., Ilgaz, C., (2007). Özel Histoloji. 2. Baskı. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi
- Erkoçak, A., (1982). Özel Histoloji. 4. Baskı. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi.
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Martinou, J., C., (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *The Journal of Cell Biology*, 143(1), 217-224.
- Etheridge, S., L., Spencer, G., J., Heath, D., J., Genever, P., G., (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 22(5), 849-860.
- Finn, C., A., Bredl, J., C., S., (1973). Studies on the development of the implantation reaction in the mouse uterus: influence of actinomycin D. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34(2), 247-253.
- Fisher, A., L., Caudy, M., (1998). Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates. *Genes Development*, 12(13), 1931-1940.
- Fitzgerald, J., S., Poehlmann, T., G., Suman, P., Gupta, S., K., Schleussner, E., Markert, U., R., (2007). Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and trophoblast invasion. *Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*, 4(6), 322-330.
- Florez, J., C., (2007). The new type 2 diabetes gene TCF7L2. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, 10(4), 391-396.
- Folsom, A., R., Pankow, J., S., Peacock, J., M., Bielinski, S., J., Heiss, G., Boerwinkle, E., (2008). Variation in TCF7L2 and increased risk of colon cancer: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Diabetes Care*. 31: 905–909
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P., H., Debatin, K., M., (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Medicine*, 2(5), 574.

- Fujiwara, H., Yoshioka, S., Tatsumi, K., Kosaka, K., Satoh, Y., Nishioka, Y., Fujii, S., (2002). Human endometrial epithelial cells express ephrin A1: possible interaction between human blastocysts and endometrium via Eph-ephrin system. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 87(12), 5801-5807.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., Debatin, K., M., (1997). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Research*, 57(17), 3823-3829.
- Gaetje, R., Holtrich, U., Karn, T., Cikrit, E., Engels, K., Rody, A., Kaufmann, M., (2007). Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertility and Sterility*, 88(6), 1534-1540.
- Galan, A., O'Connor, J., E., Valbuena, D., Herrero, R., Remohí, J., Pampfer, S., Simón, C., (2000). The human blastocyst regulates endometrial epithelial apoptosis in embryonic adhesion. *Biology of Reproduction*, 63(2), 430-439.
- Gao, C., Chen, Y., G., (2010). Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cellular Signalling*, 22(5), 717-727.
- Gartner, L., P., Hiatt, J., L., (2007). Female Reproductive System. *Color Textbook of Histology*. 3rd Ed., 2007; 461-487.
- Gelety, T., J., Buyalos, R., P., (1995). The influence of supraphysiologic estradiol levels on human nidation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 12(7), 406-412.
- Gellersen, B., Brosens, J., J., (2014). Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocrine Reviews*, 35(6), 851-905.
- Giese, K., Cox, J., Grosschedl, R., (1992). The HMG domain of lymphoid enhancer factor 1 bends DNA and facilitates assembly of functional nucleoprotein structures. *Cell*, 69(1), 185-195.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J., R., Grosschedl, R., (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Development*, 9(8), 995-1008.
- Giese, K., Kingsley, C., Kirshner, J., R., Grosschedl, R., (1995). Assembly and function of a TCR alpha enhancer complex is dependent on LEF-1-induced DNA bending and multiple protein-protein interactions. *Genes Development*, 9(8), 995-1008.

- Giudice, L., C., Mark, S., P., Irwin, J., C., (1998). Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface1. *Journal of Reproductive Immunology*, 39(1-2), 133-148.
- Gordon, M., D., Nusse, R., (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors and multiple transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*.
- Gökçimen, A., Temel, S., (2004). *İmplantasyon ve Moleküler Etkileşimler. SDÜ. Tıp Fak Derg*, 11, 25-33.
- Graham, T. A., Weaver, C., Mao, F., Kimelman, D., Xu, W., (2000). Crystal structure of a β -catenin/Tcf complex. *Cell*, 103(6), 885-896.
- Green, D., R., Reed, J., C., (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.
- Gürsoy, E., Koptagel, E., Ergin, K., (2009). Hücre dokuları, genel embriyoloji, dişi üreme sistemi, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 196-201.
- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., Kemler, R., (1995). Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development*, 121(11), 3529-3537.
- Hagen, T., Sethi, J., K., Foxwell, N., Vidal-Puig, A., (2004). Signalling activity of beta-catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochemical Journal*, 379(2), 471-477.
- Hai, B., Yang, Z., Millar, S., E., Choi, Y., S., Taketo, M., M., Nagy, A., Liu, F., (2010). Wnt/ β -catenin signaling regulates postnatal development and regeneration of the salivary gland. *Stem Cells and Development*, 19(11), 1793-1801.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G., S., Henderson, J., T., Woo, M., Soengas, M., S., Potter, J., (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94(3), 339-352.
- Hampton, M., B., Orrenius, S., (1998). Redox regulation of apoptotic cell death in the immune system. *Toxicology Letters*, 102, 355-358.
- Harwood, B., N., Cross, S., K., Radford, E., E., Haac, B., E., De Vries, W., N., (2008). Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse

- ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. *Developmental Dynamics*, 237(4), 1099-1111.
- Hassa, O., Aştı, R., N., (1997). Embriyoloji. Genişletilmiş 3.Baskı. Yorum Matbaa Sanayii,71.
- Hausmann, G., Banziger, C., Basler, K., (2007). Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 331.
- Hayashi, K., Burghardt, R., C., Bazer, F., W., Spencer, T., E., (2007). 164 Potential Regulation of Peri-Implantation Ovine Conceptus Growth and Differentiation by the Wnt Signaling System. *Reproduction, Fertility and Development*, 19(1), 199-199.
- Hayashi, K., Erikson, D., W., Tilford, S., A., Bany, B., M., Maclean, J., A., Rucker III, E., B., Spencer, T., E., (2009). Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. *Biology of Reproduction*, 80(5), 989-1000.
- Hazra, A., Fuchs, C., S., Chan, A., T., Giovannucci, E., L., Hunter, D., J., (2008). Association of the TCF7L2 polymorphism with colorectal cancer and adenoma risk. *Cancer Causes Control*, 19(9), 975-980.
- He, T., C., Sparks, A., B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Da Costa, L., T., Kinzler, K., W., (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281(5382), 1509-1512.
- Hendrickx, M., Leyns, L., (2008). Non-conventional Frizzled ligands and Wnt receptors. *Development, Growth Differentiation*, 50(4), 229-243.
- Hengartner, M., O., Ellis, R., Horvitz, R., (1992). *Caenorhabditis elegans* gene ced-9 protects cells from programmed cell death. *Nature*, 356(6369), 494.
- Hoppler, S., Kavanagh, C., L., (2007). Wnt signalling: variety at the core. *Journal of Cell Science*, 120(3), 385-393.
- Hopwood, D., H., Levison, D., A., (1976). Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *The Journal of Pathology*, 119(3), 159-166.
- Horst, P., H., Wang, Y., van der Zee, M., Burger, C., W., Blok, L., J., (2012). Interaction between sex hormones and WNT/ β -catenin signal transduction in

- endometrial physiology and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 358(2), 176-184.
- Hou, X., Tan, Y., Li, M., Dey, S., K., Das, S., K., (2004). Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Molecular Endocrinology*, 18(12), 3035-3049.
- Hsu, S., C., Galceran, J., Grosschedl, R., (1998). Modulation of transcriptional regulation by Lef-1 in response to Wnt-1 signaling and association with β -catenin. *Molecular and Cellular Biology*, 18(8), 4807-4818.
- Hu, Y., Benedict, M., A., Wu, D., Inohara, N., Núñez, G., (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4386-4391.
- Huang, H., C., Klein, P., S., (2004). The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biology*, 5(7), 234.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B., G., Kemler, R., (1996). Nuclear localization of β -catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of Development*, 59(1), 3-10.
- Huelsken, J., Behrens, J., (2002). The Wnt signaling pathways. *J Cell Sci*, 115: 3977-78
- Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., Birchmeier, W., (2000). Requirement for β -catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 567-578.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A., (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *The EMBO journal*, 17(5), 1371-1384.
- Israels, L.,G., Israels, E., D., (1991). Apoptosis. *The Oncologist* 4:3329.
- Jin, T., (2008). The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 51(10), 1771.
- Johnson, M., L., Harnish, K., Nusse, R., Van Hul, W., (2004). LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(11), 1749-1757.

- Joswig, A., Gabriel, H., D., Kibschull, M., Winterhager, E., (2003). Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 44.
- Junqueira, L., C., Carneiro, J., (2006). (Çeviri Editörleri; Aytekin, Y. And Solakoğlu, S) .Temel Histoloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, s:458
- Kaloğlu, C., Gürsoy, E., Onarlioğlu, B., (2003). Early maternal changes contributing to the formation of the chorioallantoic and yolk sac placentas in rat: a morphological study. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 32(4), 200-206.
- Kamijo, T., Rajabi, M. R., Mizunuma, H., Ibuki, Y., (1998). Biochemical evidence for autocrine/paracrine regulation of apoptosis in cultured uterine epithelial cells during mouse embryo implantation in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 4(10), 990-998.
- Kara, B., (2010). Sebebi Açıklanamayan İnfertil Olgularda Wnt / β -Katenin Yolağının Yeri ve Önemi (Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi).
- Karaöz, E., (2002). Özel histoloji. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları
- Katz, S., Abrahamson P., A., (1987). Involution of the anti-mesometrial decidua in the mouse. *Anat. Embryol.* 176: 251 \pm 258
- Katz, S., Abrahamsohn, P., A., (1981). Ultrastructural observations on the involution of the mouse antimesometrial decidua. In *Acta Anatomica* (Vol. 111, No. 1-2, pp. 72-73).
- Kayışlı, Ü., A., Asar, M., Demir, R., (2000). Distributions and Possible Roles of Laminin, Fibronectin and Their Receptor Subunits Integrin β 4 and α 5 in Remodelling of Extracellular Matrix during Decidualization in Rats. *Turkish Journal of Biology*, 24(3), 379-396.
- Kemler, R., (2003). Classical cadherins. *Journal Of Clinical Endocrinology Metabolism*, 88(8): 3860–3866
- Kemp, C., Willems, E., Abdo, S., Lambiv, L., Leyns, L., (2005). Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and

- postimplantation development. *Developmental dynamics: an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 233(3), 1064-1075.
- Kengaku, M., Capdevila, J., Rodriguez-Esteban, C., De La Peña, J., Johnson, R., L., Belmonte, J., C., I., Tabin, C., J., (1998). Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud. *Science*, 280(5367), 1274-1277.
- Kerr, J., F., Wylie, A., H., Currie, A., R., (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26:239-257.
- Kierszenbaum, A., L., Demir, R., (2006). *Histoloji ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık.
- Kiewisz, J., Kaczmarek, M., M., Blitek, A., Bodek, G., Ziecik, A., J., (2008). Expression Profile of the Wnt 5a, Wnt 7a, beta-catenin and E-cadherin Genes in the Endometrium during Peri-Implantation Period in Pigs. In *Reproduction In Domestic Animals* (Vol. 43, pp. 92-92). 9600
- Kikuchi, A., Kishida, S., Yamamoto, H., (2006). Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental Molecular Medicine*, 38(1), 1.
- King, K., L., Cidlowski, J., A., (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annual Review of Physiology*;60:601-17.
- Kliman, H., J., (2000). Uteroplacental blood flow: the story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. *The American Journal of Pathology*, 157(6), 1759.
- Knöfler, M., Pollheimer, J., (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Frontiers in Genetics*, 4, 190.
- Kohn, A., D., Moon, R., T., (2005). Wnt and calcium signaling: β -catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38(3-4), 439-446.
- Kokawa, K., Shikone, T., Nakano, R., (1996). Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 81(11), 4144-4147.

- Kolligs, F., T., Bommer, G., Göke, B., (2002). Wnt/beta-catenin/tcf signaling: a critical pathway in gastrointestinal tumorigenesis. *Digestion*, 66(3), 131-144.
- Komiya, Y., Habas, R., (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75.
- Konopka, B., Janiec-Jankowska, A., Czapczak, D., Paszko, Z., Bidznski, M., Olszewski, W., Goluda, C., (2007). Molecular genetic defects in endometrial carcinomas: microsatellite instability, PTEN and beta-catenin (CTNNB1) genes mutations. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(6), 361-371.
- Korach, K., S., (1999). Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?. *Endocrine Reviews*, 20(3), 358-417.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J., Clevers, H., (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature Genetics*, 19(4), 379.
- Korinek, V., Barker, N., Willert, K., Molenaar, M., Roose, J., Wagenaar, G., Clevers, H., (1998). Two members of the Tcf family implicated in Wnt/ β -catenin signaling during embryogenesis in the mouse. *Molecular and Cellular Biology*, 18(3), 1248-1256.
- Kosova, F., Ari, Z., (2011). Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2(1).
- Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J., Grosschedl, R., (1996). Lef1 expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Development*, 10(11), 1382-1394.
- Kraus, C., Liehr, T., Hülsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., Grzeschik, K., H., Ballhausen, W., G. (1994). Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics*, 23(1), 272-274.
- Kraus, C., Liehr, T., Hülsken, J., Behrens, J., Birchmeier, W., Grzeschik, K., H., Ballhausen, W., G., (1994). Localization of the human β -catenin gene (CTNNB1) to 3p21: a region implicated in tumor development. *Genomics*, 23(1), 272-274.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C., (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163.

- Kroemer, G., Reed, J., C., (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine*, 6(5), 513.
- Lammi, L., Arte, S., Somer, M., Järvinen, H., Lahermo, P., Thesleff, I., Nieminen, P., (2004). Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer. *The American Journal of Human Genetics*, 74(5), 1043-1050.
- Ladeira, D., Bagci, H., Malinowski, A., R., Brown, K., E., Soza-Ried, J., Feytout, A., Brockdorff, N., (2015). Jarid2 coordinates nanog expression and PCP/Wnt signaling required for efficient ESC differentiation and early embryo development. *Cell Reports*, 12(4), 573-586.
- Lawn, A., M., (1969). Ovarian Physiology [Abridged] Uterine Implantation of the Mammalian Ovum.
- Lee, D., Long, S., A., Adams, J., L., Chan, G., Vaidya, K. S., Francis, T., A., Richardson, S., (2000). Potent and selective nonpeptide inhibitors of caspases 3 and 7 inhibit apoptosis and maintain cell functionality. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), 16007-16014.
- Levanon, D., Goldstein, R., E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Groner, Y., (1998). Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11590-11595.
- Levine, J., E., Norman, R. L., Gliessman, P., M., Oyama, T., T., Bangsberg, D., R., Spies, H., G., (1985). In vivo gonadotropin-releasing hormone release and serum luteinizing hormone measurements in ovariectomized, estrogen-treated rhesus macaques. *Endocrinology*, 117(2), 711-721.
- Li, F., Chong, Z., Z., Maiese, K., (2006). Winding through the WNT pathway during cellular development and demise. *Histology and Histopathology*, 21(1), 103.
- Li, H., Colbourne, F., Sun, P., Zhao, Z., Buchan, A., M., (2000). Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 31(1), 176-182.
- Lien, W., H., Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Development*, 28(14), 1517-1532.

- Lloyd, S., Fleming, T., P., Collins, J., E., (2003). Expression of Wnt genes during mouse preimplantation development. *Gene Expression Patterns*, 3(3), 309-312.
- Logan, C., Y., Nusse, R., (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 781-810.
- Lohmiller, J., L., Swing, S., P., (2006). Reproduction And Breeding. In: Suckow M. A, Weisbroth S. H, Franklin C.L, Editors. *The Laboratory Rat*. Academic Press 148-153.
- Love, J., J., Li, X., Case, D., A., Giese, K., Grosschedl, R., Wright, P., E., (1995). Structural basis for DNA bending by the architectural transcription factor LEF-1. *Nature*, 376(6543), 791.
- Lowry, W., E., Blanpain, C., Nowak, J., A., Guasch, G., Lewis, L., Fuchs, E., (2005). Defining the impact of β -catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Development*, 19(13), 1596-1611.
- Lundkvist, Ö., (1978). Morphological studies of the stromal changes after artificial induction of the decidual reaction in rats. *Cell and Tissue Research*, 194(2), 287-296.
- Lustig, B., Behrens, J., (2003). The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 129(4), 199-221.
- Luu, H., H., Zhang, R., Haydon, R., C., Rayburn, E., Kang, Q., Si, W., He, T., C., (2004). Wnt/ β -catenin signaling pathway as novel cancer drug targets. *Current Cancer Drug Targets*, 4(8), 653-671.
- Lyssenko, V., (2008). The transcription factor 7-like 2 gene and increased risk of type 2 diabetes: an update. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, 11(4), 385-392.
- Machin, P., Catusus, L., Pons, C., Muñoz, J., Matias-Guiu, X., Prat, J., (2002). CTNNB1 mutations and β -catenin expression in endometrial carcinomas. *Human Pathology*, 33(2), 206-212.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B., M., Glinka, A., (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/ β -catenin signalling. *Nature*, 417(6889), 664.

- Mao, J., Wang, J., Liu, B., Pan, W., Farr III, G. H., Flynn, C., Wu, D., (2001). Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular Cell*, 7(4), 801-809.
- Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K., Tsuruo, T., (1995). Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 217(3), 1185-1192.
- Mendoza-Rodríguez, C., A., Merchant-Larios, H., Segura-Valdez, M., D., L., Moreno-Mendoza, N., Cruz, M. E., Arteaga-López, P., Cerbón, M., (2002). Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development*, 61(4), 445-452.
- Mericskay, M., Kitajewski, J., Sassoon, D., (2004). Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 131(9), 2061-2072.
- Mignotte, B., Vayssiere J., L., (1998). Mitochondria and apoptosis *Eur J Biochem*, 252:115
- Mikels, A., J., Nusse, R., (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25(57), 7461.
- Miller, C., Sassoon, D., A., (1998). Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, 125(16), 3201-3211.
- Miller, C., Pavlova, A., Sassoon, D., A., (1998). Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mechanisms of Development*, 76(1-2), 91-99.
- Miller, J., R., (2001). The wnts. *Genome Biology*, 3(1), 1.
- Miller, J., R., Hocking, A. M., Brown, J. D., Moon, R., T., (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene*, 18(55), 7860.
- Miller, J., R., (2002). The Wnts. *Genome Biol* 3(1):Reviews3001

- Mohamed, O., A., Dufort, D., Clarke, H., J., (2004). Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identify a candidate pathway for embryo-maternal signaling at implantation. *Biology of Reproduction*, 71(2), 417-424.
- Mohamed, O., A., Jonnaert, M., Labelle-Dumais, C., Kuroda, K., Clarke, H., J., Dufort, D., (2005). Uterine Wnt/ β -catenin signaling is required for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(24), 8579-8584.
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Clevers, H., (1996). XTcf-3 transcription factor mediates β -catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 86(3), 391-399.
- Monga, S., P., S., (2005). Michalopoulos GK. The wnt/ β -catenin pathway. Book chapter, Signaling Pathways in Liver Diseases, Part-II: 173-192.
- Monkley, S., J., Delaney, S., J., Pennisi, D., J., Christiansen, J., H., Wainwright, B., J., (1996). Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development*, 122(11), 3343-3353.
- Moon, R., T., Kohn, A., D., De Ferrari, G., V., Kaykas, A., (2004). WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 691.
- Moore, K., L., Persaud, T., V., N., Torchia, M., G., (2011). *The Developing Human E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Moore, K., L., Persaud, T., V., N., Yıldırım, M., Okar, İ., Dalçık, H., (2002). *Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara.
- Moore, K., L., TVN, P., (2009). Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri. (Çev: S. Müftüoğlu, P. Atilla, F. Kaymaz) Güneş Kitabevi, Ankara.
- Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Sanchez, C., Sarrío, D., Cassia, R., García-Rostán, G., Esteller, M., (2002). Abnormalities of the APC/ β -catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene*, 21(52), 7981.
- Mourik, M., S., Macklon, N., S., Heijnen, C., J., (2009). Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment. *Journal of Leukocyte Biology*, 85(1), 4-19.

- Mulholland, D., J., Dedhar, S., Coetzee, G., A., Nelson, C., C., (2005). Interaction of nuclear receptors with the Wnt/ β -catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know?. *Endocrine Reviews*, 26(7), 898-915.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P., (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 3046-3050.
- Munshi, N., Merika, M., Yie, J., Senger, K., Chen, G., Thanos, D., (1998). Acetylation of HMG I (Y) by CBP turns off IFN β expression by disrupting the enhanceosome. *Molecular Cell*, 2(4), 457-467.
- Na, J., Lykke-Andersen, K., Padilla, M., E., T., Zernicka-Goetz, M., (2007). Dishevelled proteins regulate cell adhesion in mouse blastocyst and serve to monitor changes in Wnt signaling. *Developmental Biology*, 302(1), 40-49.
- Naidu, R., Yip, C., H., Taib, N., A., M., (2012). Genetic variations in transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene: association of TCF7L2 rs12255372 (G/T) or rs7903146 (C/T) with breast cancer risk and clinico-pathological parameters. *Medical Oncology*, 29(2), 411-417.
- Nicholson, D., W., (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and Differentiation*, 6(11), 1028.
- Noort, M., Meeldijk, J., van der Zee, R., Destree, O., Clevers, H., (2002). Wnt signaling controls the phosphorylation status of β -catenin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17901-17905.
- Nusse, R., (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research*, 15(1), 28.
- Nusse, R., (2012). Wnt signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(5), a011163.
- Nusse, R., Varmus, H. (1992). Wnt genes. *Cell* 69:1073-87
- Okamura, R., M., Sigvardsson, M., Galceran, J., Verbeek, S., Clevers, H., Grosschedl, R., (1998). Redundant regulation of T cell differentiation and TCR α gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*, 8(1), 11-20.

- Olson, E., N., Schneider, M., D., (2003). Sizing up the heart: development redux in disease. *Genes Development*, 17(16), 1937-1956.
- Oltval, Z., N., Milliman, C., L., Korsmeyer, S., J., (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*, 74(4), 609-619.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Timmerman, J., Kruisbeek, A., Destree, O., Meijlink, F., Clevers, H., (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development*, 118(2), 439-448.
- Oosterwegel, M., van de Wetering, M., Timmerman, J., Kruisbeek, A., Destree, O., Meijlink, F., Clevers, H., (1993). Differential expression of the HMG box factors TCF-1 and LEF-1 during murine embryogenesis. *Development*, 118(2), 439-448.
- Orchard, M., D., Murphy, C., R., (2002). Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. *Acta Histochemica*, 104(2), 149-155.
- Orth, K., Chinnaiyan, A., M., Garg, M., Froelich, C., J., Dixit, V., M., (1996). The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *Journal of Biological Chemistry*, 271(28), 16443-16446.
- Oruç, M., E., Berk, S., (2006). Reconstruction of protein-protein and domain-domain interaction networks of Wnt signaling in *C. elegans*. Chemical Engineering, İzmir Institute of Technology 91-104.
- Ougolkov, A., Zhang, B., Yamashita, K., Bilim, V., Mai, M., Fuchs, S. Y., Minamoto, T., (2004). Associations among β -TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, β -catenin, and NF- κ B in colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 96(15), 1161-1170.
- Ovalle, W., K., Nahirney, P., C., (2009). Temel histoloji (Netter), 4. Baskı, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara.

- Özkan, N., E., (2013). TCF7L2 geni ve 8Q24 bölgesi varyantlarının C-MYC gen anlatımı ve kolorektal kanser riski üzerinde olası etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul
- Palaparti, A., Baratz, A., Stifani, S., (1997). The Groucho/transducin-like enhancer of split transcriptional repressors interact with the genetically defined amino-terminal silencing domain of histone H3. *Journal of Biological Chemistry*, 272(42), 26604-26610.
- Palmer, A., M., Greengrass, P., M., Cavalla, D., (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect*, 13(6), 378-384.
- Panhuysen, M., Weisenhorn, D., M., V., Blanquet, V., Brodski, C., Heinzmann, U., Beisker, W., Wurst, W., (2004). Effects of Wnt1 signaling on proliferation in the developing mid-/hindbrain region. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 101-111.
- Paria, B., C., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Dey, S., K., (2000). Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. In *Seminars in Cell Developmental Biology* (Vol. 11, No. 2, pp. 67-76). Academic Press.
- Paria, B., C., Reese, J., Das, S., K., Dey, S., K., (2002). Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges. *Science*, 296(5576), 2185-2188.
- Parkening, T., A., Collins, T., J., Smith, E., R., (1982). Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH, and prolactin in aging C57BL/6 mice at various times of the estrous cycle. *Neurobiology of Aging*, 3(1), 31-35.
- Parr, B., A., McMahon, A., P., (1995). Dorsalizing signal Wnt-7a required for normal polarity of D-V and A-P axes of mouse limb. *Nature*, 374(6520), 350.
- Parr, E., L., Parr, M., B., (1989). Epithelial cell death during rodent embryo implantation. In *Blastocyst Implantation. Boston: Serono Symposia USA Adams Publishing Group* (pp. 105-115).
- Parr, E., L., Tung, H., N., Parr, M., B., (1987). Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biology of Reproduction*, 36(1), 211-225.

- Parr, M., B., Parr, E., L., (1986). Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans. *Biology of Reproduction*, 34(2), 393-403.
- Peifer, M., McCrea, P., D., Green, K., J., Wieschaus, E., Gumbiner, B., M., (1992). The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *The Journal of Cell Biology*, 118(3), 681-691.
- Piacentini, M., Autuori, F., (1994). Immunohistochemical localization of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo implantation and post-partum involution. *Differentiation*, 57(1), 51-61.
- Polakis, P., (2000). Wnt signalling and cancer. *Genes Dev.*14(15):1837-51.
- Pollheimer, J., Loregger, T., Sonderegger, S., Saleh, L., Bauer, S., Bilban, M., Knöfler, M., (2006). Activation of the canonical wntless/T-cell factor signaling pathway promotes invasive differentiation of human trophoblast. *The American Journal of Pathology*, 168(4), 1134-1147.
- Potts, D., M., (1969). The ultra-structure of egg implantation. *Adv. Reprod. Physiol.* 4: 241 ± 267
- Ranger, A., M., Malynn, B., A., Korsmeyer, S., J., (2001). Mouse models of cell death. *Nature Genetics*, 28(2), 113.
- Red-Horse, K., Zhou, Y., Genbacev, O., Prakobphol, A., Foulk, R., McMaster, M., Fisher, S., J., (2004). Trophoblast differentiation during embryo implantation and formation of the maternal-fetal interface. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(6), 744-754.
- Reya, T., O'Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., Grosschedl, R., (2000). Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 13(1), 15-24.
- Reya, T., Rudolf, G. (1998). Transcriptional regulation of B-cell differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 10(2), 158-165.
- Rider, V., Isuzugawa, K., Twarog, M., Jones, S., Cameron, B., Imakawa, K., Fang, J., (2006). Progesterone initiates Wnt-β-catenin signaling but estradiol is required

- for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal Cells. *Journal of Endocrinology*, 191(3), 537-548.
- Riese, J., Yu, X., Munneryn, A., Eresh, S., Hsu, S., C., Grosschedl, R., Bienz, M., (1997). LEF-1, a nuclear factor coordinating signaling inputs from wingless and decapentaplegic. *Cell*, 88(6), 777-787.
- Roose, J., Huls, G., Van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Clevers, H., (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the β -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, 285(5435), 1923-1926.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., Clevers, H., (1998). The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, 395(6702), 608.
- Ross, H.M., Kaye G.I., Pawlina, W., (2003). *Histology, A Text and Atlas*. 4th ed. Baltimore: Lippincott Williams Wilkins
- Ross, S., E., Hemati, N., Longo, K., A., Bennett, C., N., Lucas, P., C., Erickson, R., L., MacDougald, O., A., (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289(5481), 950-953.
- Sadler, T., W., (2008). *Langman's Medical Embryology*, 11th ed., Lippincott Williams Wilkins, Hagerstown, Page Count: 371.
- Sainz, J., Rudolph, A., Hoffmeister, M., Frank, B., Brenner, H., Chang-Claude, J., Försti, A., (2012). Effect of type 2 diabetes predisposing genetic variants on colorectal cancer risk. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 97(5), E845-E851.
- Salamonsen, L., A., Evans, J., Nguyen, H., P., Edgell, T., A., (2016). The microenvironment of human implantation: determinant of reproductive success. *American Journal of Reproductive Immunology*, 75(3), 218-225.
- Sassoon, D., (1999). Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 158(1-2), 1-5.
- Savill, J., Fadok, V., (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*, 407(6805), 784.

- Schlafke, S., Enders, A., C., (1975). Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biology of Reproduction*, 12(1), 41-65.
- Schohl, A., Fagotto, F., (2002). β -catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development*, 129(1), 37-52.
- Searle, J., (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*, 17(2), 229-259.
- Selleri, C., Sato, T., Del Vecchio, L., Luciano, L., Barrett, A., J., Rotoli, B., Maciejewski, J., P., (1997). Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon- α in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 89(3), 957-964.
- Sert, E., (2007). Meme kanserinde β -catenin'in prognostik rolü. Atatürk Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi, 22-62.
- Shiama, N., (1997). The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends in Cell Biology*, 7(6), 230-236.
- Shiina, H., Igawa, M., Breault, J., Ribeiro-Filho, L., Pookot, D., Urakami, S., Kaneuchi, M., (2003). The human T-cell factor-4 gene splicing isoforms, Wnt signal pathway, and apoptosis in renal cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 9(6), 2121-2132.
- Shikone, T., Yamoto, M., Kokawa, K., Yamashita, K., Nishimori, K., Nakano, R., Y., O., (1996). Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 81(6), 2376-2380.
- Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T., (2008). Wnt signaling inside the nucleus. *Cancer Science*, 99(4), 631-637.
- Shulewitz, M., Soloviev, I., Wu, T., Koeppen, H., Polakis, P., Sakanaka, C., (2006). Repressor roles for TCF-4 and Sfrp1 in Wnt signaling in breast cancer. *Oncogene*, 25(31), 4361.
- Smaili, S., Hsu, Y., (2000). Mitochondria in Ca^{+2} signaling and apoptosis. *J. Bioener and Biomem.* 32(1):35-46.

- Smith, C., A., Shoemaker, C., M., Roeszler, K., N., Queen, J., Crews, D., Sinclair, A., H., (2008). Cloning and expression of R-Spondin1 in different vertebrates suggests a conserved role in ovarian development. *BMC Developmental Biology*, 8(1), 72.
- Smith, M., S., Freeman, M., E., Neill, J., D., (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219-226.
- Smith, U., (2007). TCF7L2 and type 2 diabetes, we WNT to know. *Diabetologia*, 50(1), 5-7.
- Sonderegger, S., Haslinger, P., Sabri, A., Leisser, C., Otten, J., V., Fiala, C., Knofler, M., (2010). Wingless (Wnt)-3A induces trophoblast migration and matrix metalloproteinase-2 secretion through canonical Wnt signaling and protein kinase B/AKT activation. *Endocrinology*, 151(1), 211-220.
- Sonderegger, S., Pollheimer, J., Knöfler, M., (2010). Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation—review. *Placenta*, 31(10), 839-847.
- Spierings, D., C., de Vries, E., G., Vellenga, E., van den Heuvel, F., A., Koornstra, J., J., Wesseling, J., de Jong, S., (2004). Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 52(6), 821-831.
- Stark, K., Vainio, S., Vassileva, G., McMahon, A., P., (1994). Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature*, 372(6507), 679.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V., M., (2000). Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 217-245.
- Sunder, S., Lenton, E., A., (2000). Endocrinology of the peri-implantation period. *Best Practice Research Clinical Obstetrics Gynaecology*, 14(5), 789-800.
- Şeftalioğlu, A., (2003). Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi 4. Baskı. Ankara: Alp Ofset Matbacılık s.69
- Şeftalioğlu, A., (1998). Genel ve Özel insan Embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Tıp ve Teknik Yayıncılık

- Şimşek, F., Vatanserver, H., S., (2014). Apoptotik ve otofajik ölümlerde hücre içi organizasyon. *Yeni Tıp Dergisi*, 31(1), 6.
- Takada, S., Stark, K., L., Shea, M., J., Vassileva, G., McMahon, J., A., McMahon, A., P., (1994). Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Development*, 8(2), 174-189.
- Tan, X., Martin, S., J., Green, D., R., Wang, J., Y., (1997). Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor-and CD95-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 272(15), 9613-9616.
- Tanır, H., G., Demirezen, Ş., (2009). Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 29(5), 1292-1297.
- Tao, X., J., Sayegh, R., A., Tilly, J., L., Isaacson, K., B., (1998). Elevated expression of the proapoptotic BCL-2 family member, BAK, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertility and Sterility*, 70(2), 338-343.
- Taylor, R., C., Cullen, S., P., Martin, S., J., (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews Molecular cell Biology*, 9(3), 231.
- Ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., Nusse, R., (2008). Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell Stem Cell*, 3(5), 508-518.
- Thomas, K., R., Musci, T., S., Neumann, P., E., Capecchi, M., R., (1991). Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell*, 67(5), 969-976.
- Thomas, K., R., Musci, T., S., Neumann, P., E., Capecchi, M., R., (1991). Swaying is a mutant allele of the proto-oncogene Wnt-1. *Cell*, 67(5), 969-976.
- Thornberry, N., A., (1998). Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry Biology*, 5(5), R97-R103.
- Thornberry, N., A., Lazebnik, Y., (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
- Thornberry, N., A., Bull, H., G., Calaycay, J., R., Chapman, K., T., Howard, A., D., Kostura, M., J., Elliston, K., O., (1992). A novel heterodimeric cysteine

- protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes. *Nature*, 356(6372), 768-774.
- Tian, Q., Jin, H., Cui, Y., Guo, C., Lu, X., (2005). Regulation of Wnt gene expression. *Development, Growth Differentiation*, 47(5), 273-281.
- Tomatır, A., G., (2003). Apoptoz: programlı hücre ölümü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 23(6), 499-508.
- Tong, Y., Lin, Y., Zhang, Y., Yang, J., Zhang, Y., Liu, H., Zhang, B., (2009). Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics*, 10(1), 15.
- Travis, A., Amsterdam, A., Belanger, C., Grosschedl, R., (1991). LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Development*, 5(5), 880-894.
- Tulac, S., Nayak, N., R., Kao, L., C., Van Waes, M., Huang, J., Lobo, S., Giudice, L. C., (2003). Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 88(8), 3860-3866.
- Tung, H., N., Parr, M., B., Parr, E., L., (1986). The permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: an ultrastructural tracer and freeze-fracture study. *Biol Reprod*, 35(4), 1045-58.
- Üren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W., G., Muraiso, K., Bottaro, D., P., Rubin, J., S., (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 275(6), 4374-4382.
- Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N., McMahon, A., P., (1999). Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature*, 397(6718), 405.
- Van Amerongen, R., Nusse, R., (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205-3214.

- Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H., (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 745-752.
- Van de Wetering, M., Castrop, J., Korinek, V., Clevers, H., (1996). Extensive alternative splicing and dual promoter usage generate Tcf-1 protein isoforms with differential transcription control properties. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 745-752.
- Van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., Van Beest, M., Van Es, J., Loureiro, J., Peifer, M., (1997). Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, 88(6), 789-799.
- Van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D., Clevers, H., (1991). Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *The EMBO Journal*, 10(1), 123-132.
- Van der Horst, P., H, Wang, Y., Van der Zee, M., Burger, C., W., Blok, L., J., (2012). Interaction between sex hormones and Wnt/b-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol*.358:176–84.
- Van Genderen, C., Okamura, R., M., Farinas, I., Quo, R. G., Parslow, T., G., Bruhn, L., Grosschedl, R., (1994). Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes development*, 8(22), 2691-2703.
- Vaskivuo, T., E., Stenbäck, F., Karhumaa, P., Risteli, J., Dunkel, L., Tapanainen, J., S., (2000). Apoptosis and apoptosis-related proteins in human endometrium. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 165(1-2), 75-83.
- Veeman, M., T., Axelrod, J., D., Moon, R., T., (2003). A second canon: functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Developmental Cell*, 5(3), 367-377.
- Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., Te Riele, H., van de Wetering, M., Clevers, H., (1995). An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature*, 374(6517), 70.

- Walsh, J., Andrews, P., W., (2003). Expression of Wnt and Notch pathway genes in a pluripotent human embryonal carcinoma cell line and embryonic stem cells. *Apmis*, *111*(1), 197-211.
- Waltzer, L., Bienz, M., (1998). Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling. *Nature*, *395*(6701), 521.
- Wang, J., Armant, D., R., (2002). Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst implantation. *Cells Tissues Organs*, *172*(3), 190-201.
- Wang, J., Chun, H., J., Wong, W., Spencer, D., M., Lenardo, M., J., (2001). Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(24), 13884-13888.
- Wang, Q., T., Piotrowska, K., Ciemerych, M., A., Milenkovic, L., Scott, M., P., Davis, R., W., Zernicka-Goetz, M., (2004). A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Cell*, *6*(1), 133-144.
- Wang, Y., Macke, J., P., Abella, B., S., Andreasson, K., Worley, P., Gilbert, D., J., Nathans, J., (1996). A large family of putative transmembrane receptors homologous to the product of the Drosophila tissue polarity gene frizzled. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(8), 4468-4476.
- Wansleben, C., Meijlink, F., (2011). The planar cell polarity pathway in vertebrate development. *Developmental Dynamics*, *240*(3), 616-626.
- Waterman, M., L., Fischer, W. H., Jones, K., A., (1991). A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor C alpha enhancer. *Genes Development*, *5*(4), 656-669.
- Weedon, M., N., (2007). The importance of TCF7L2. *Diabet Med.* *24*:1062–1066.
- Welsh, A., O., Enders, A., C., (1991). Chorioallantoic placenta formation in the rat: I. Luminal epithelial cell death and extracellular matrix modifications in the mesometrial region of implantation chambers. *American Journal of Anatomy*, *192*(3), 215-231.
- Welsh, A., O., Enders, A., C., (1985). Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration. *American Journal of Anatomy*, *172*(1), 1-29.

- Welsh, A., O., Enders, A., C., (1993). Chorioallantoic placenta formation in the rat. III. Granulated cells invade the uterine luminal epithelium at the time of epithelial cell death. *Biology of Reproduction*, 49(1), 38-57.
- Widelitz, R., (2005). Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: recent progress. *Growth Factors*, 23(2), 111-116.
- Widmann, C., Gibson, S., Johnson, G., L., (1998). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *Journal of Biological Chemistry*, 273(12), 7141-7147.
- Willert, K., Jones, K., A., (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Development*, 20(11), 1394-1404.
- Willert, K., Nusse, R., (1998). β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics Development*, 8(1), 95-102.
- Willert, K., Shibamoto, S., Nusse, R., (1999). Wnt-induced dephosphorylation of axin releases β -catenin from the axin complex. *Genes Development*, 13(14), 1768-1773.
- Wodarz, A., Nusse, R., (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 14(1), 59-88.
- Wyllie, A., H., (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556.
- Wyllie, A., H., Kerr, J., F., R., Currie, A., R., (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. In: G., H., Bourne ed. *International Review of Cytology*, Vol. Volume 68: Academic Press 251306.
- Xie, H., Tranguch, S., Jia, X., Zhang, H., Das, S., K., Dey, S., K., Wang, H., (2008). Inactivation of nuclear Wnt- β -catenin signaling limits blastocyst competency for implantation. *Development*, 135(4), 717-727.
- Xu, W., Kimelman, D., (2007). Mechanistic insights from structural studies of β -catenin and its binding partners. *Journal of Cell Science*, 120(19), 3337-3344.
- Yochum, G., S., Cleland, R., Goodman, R., H., (2008). A genome-wide screen for β -catenin binding sites identifies a downstream enhancer element that controls c-Myc gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 28(24), 7368-7379.

- Yook, J. I., Li, X., Y., Ota, I., Hu, C., Kim, H., S., Kim, N., H., Fearon, E., R., (2006). A Wnt–Axin2–GSK3 β cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nature Cell Biology*, 8(12), 1398.
- Yun, M., S., Kim, S., E., Jeon, S., H., Lee, J., S., Choi, K., Y., (2005). Both ERK and Wnt/ β -catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *Journal of Cell Science*, 118(2), 313-322.
- Zeng, X., Huang, H., Tamai, K., Zhang, X., Harada, Y., Yokota, C., Wynshaw-Boris, A., (2008). Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 135(2), 367-375.
- Zhang, Q., Yan, J., (2016). Update of Wnt signaling in implantation and decidualization. *Reproductive Medicine and Biology*, 15(2), 95-105.
- Ziegler, S., Röhrs, S., Tickenbrock, L., Möröy, T., Klein-Hitpass, L., Vetter, I., R., Müller, O., (2005). Novel target genes of the Wnt pathway and statistical insights into Wnt target promoter regulation. *The FEBS Journal*, 272(7), 1600-1615.

8. EKLER

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

02.02.2017

Sayı : 65202830-050.04.04- 23
Konu : Etik Kurul Kararı.

Sayın

Prof.Dr. Hüseyin Eray BULUT
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji A.D

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 02.02.2017 tarihinde Prof. Dr. Haki KARA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

Prof.Dr. Hüseyin Eray BULUT'un yürütücülüğünü yapmış olduğu ve yardımcıları Yüksek Lisans öğrencisi Tuğba DAĞDEVİREN'in 27.01.2017 tarih ve 12 sayılı "**Peri-implantasyon Döneminde Sıçan Endometriumunda Wnt-β Katenin Yolağının TCF, LEF ve CASPASE 9 ekspresyonundaki rolü.**" isimli Yüksek Lisans Tezi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eray BULUT
Üye

Katılmadı

Prof. Dr. İhsan HUBBEZOĞLU
Üye

Katılmadı

Yrd.Doç.Dr.Erhan YÜKSEL
Üye

Katılmadı

Özcan KARATAŞ
Sivil Üye

Katılmadı

Prof. Dr. Mustafa TURAN
Üye

Katılmadı

Doç. Dr. Bülent SARAC
Üye

Katılmadı

Yrd.Doç.Dr.Hakan İŞİDAN
Üye

Katılmadı

Prof. Dr. Haki KARA
Başkan

Katılmadı

Prof. Dr. Zübeyda Akın POLAT
Üye

(izimli)

Yrd.Doç.Dr.M. Önder KARAYİĞİT
Üye

(izimli)

Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN
Üye - Başkanvekili

Katılmadı

Hilmi GÜL
Sivil Üye

Katılmadı

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Tuğba DAĞDEVİREN
Doğum Yeri ve Tarihi	Niksar-1991
Medeni Hali	Bekar
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Ana Bilim Dalı Temel Tıp Bilimleri
E-posta Adresi	dagdevirentuba@gmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Fatih Anadolu Lisesi, 2009
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü; 2014
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2015
Ünvan	Biyolog

İş Tecrübesi

Yüksek Lisans Öğrencisi, 2015-