



TC.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRE- VE POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE
FARE ENDOMETRİUMUNDAKI NOTCH LİGAND
JAGGED-1 VE JAGGED-2' NİN
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihan ÇINAR

2012

SİVAS



TC.

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRE- VE POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE
FARE ENDOMETRİUMUNDAKİ NOTCH LIGAND
JAGGED-1 VE JAGGED-2'NİN
İMMÜNOLOKALİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihan ÇINAR

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. H.Eray BULUT**

2012

SİVAS

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. H. Eray BULUT

Üye Doç.Dr. Muhittin SÖNMEZ

Üye Doç.Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

ONAY

Bu tez çalışması, 28.08.2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Ömer POYRAZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Fen/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

PRE- ve POSTİMLANTASYON DÖNEMLERİNDE FARE ENDOMETRİUMUNDAKİ NOTCH LİGAND JAGGED-1 VE JAGGED-2'NİN İMMÜNOLOKALİZASYONU

Nihan ÇINAR

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji-Embriyoloji AD.

Danışman: Prof. Dr. H.Eray BULUT

2012

Anahtar sözcükler: Notch Ligand, Jagged-1, Jagged-2, implantasyon, fare

Memelilerde implantasyon, birçok sinyal molekülünün blastosist ile reseptiv endometrium arasındaki haberleşmede rol aldığı karmaşık biyolojik olaylardan biridir. Notch sinyal yolağı ve Notch ligandları Jagged1 ve Jagged2, hücre proliferasyonu, hareketi, hücre-hücre adezyonu, göçü, apoptozu ve invazyonu gibi çok çeşitli hücre fonksiyonlarının gerçekleşmesinde rol oynarlar. Hücre kontrolün çoklu hücre süreçlerindeki rolleri ile kabul edilmesi, Jagged moleküllerinin tümör büyümesi, ilerlemesi, metastaz ve anjiyogenezde etkili olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, fare endometriumunda implantasyon öncesi ve implantasyon döneminde Notch ligand Jag1 ve Jag2'nin immüno lokalizasyonlarının belirlenerek olası rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla vücut ağırlıkları 20-40 gram arasında değişen *Mus musculus* cinsi 40 adet erişkin fare kullanıldı. Normal diyetle beslenen farelere, oda ısısında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyotlar oluşturularak östrus evresine girmeleri sağlandı. Östrus siklusları vajinal smear ile belirlendi. Vajinal tıkaç oluşumuna bakılarak gebelikler tespit edildi. Metöstrus, östrus, proöstrus ve diöstrus evrelerinin herbiri için 5'er fare ile gebeliğin 5., 7., 9. ve 11. günleri için 5'er tane gebe fare kullanıldı. Farelere deney sonunda 200mg/kg sodyum penta-barbital intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulandı ve uterus dokuları incelenmek üzere alındı. Uterus dokularına ışık mikroskopik ve immunofloresans incelemeler için rutin takip protokolleri uygulandı. Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerle

morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilen-eozin, spesifik molekülleri göstermek için ise immunofloresans teknikler uygulandı. Işık ve floresans mikroskopik değerlendirme için alınan kesitler Olympus marka floresans mikroskopta değerlendirilip, uygun alanlardan görüntüler elde edildi.

ABSTRACT**IMMUNOLOCALISATION OF NOTCH LIGAND JAGGED–1 and JAGGED–2 IN
MOUSE ENDOMETRIUM DURING PRE- and POSTIMPLANTATION PERIODS****Nihan ÇINAR****Master of Sciences Thesis, Department of Histology-Embryology****Supervisor: Prof. Dr. H.Eray BULUT****2012****Key words:** Notch Ligand, Jagged–1, Jagged–2, implantation, mouse

Implantation in mammals is a complex biological process that involves an crosstalking between balastocyst and receptive endometrium controlled by different signal molecules. Notch signalling and Notch ligand Jagged1 and Jagged2 are involved in the regulation of many cellular processes including cytoskeletal organization, cell motility, cell cycle progression and growth, apoptosis, gene transcription. Consequently, it is not suprising that Jagged1 and Jagged2 molecules are involved in different steps of tumor development and progression as well as metastasis and angiogenesis.

In the present study, the potential roles of Jagged molecules were investigated using their immunolocalization in the mouse endometrium during pre-and postnatal periods.

To do this, 40 *Mus musculus* mice, weighing 20–40 g were used in the present study. Animals were kept at room temperature and at 12 hours light, 12 hours dark periods and were fed with normal diet in order to get them to estrous cycle. Their estrous cycles were determined by vaginal smear. Their pregnancies were designated by the presence vaginal plug. Metestrus, estrus, proestrus, and diestrus phase groups consisted of 5 mice for each group. Similarly, 5th, 7th, 9th, and 11 th days of pregnancy groups consisted of 5 mice for each group. At the end of experiments, euthanasia was carried out by the injection of 200 mg/kg penthotal sodium intraperitoneally. Uterinal tissues were obtained and processed for light microscopical and immunoflourescence investigtions. Paraffin tissue sections were used for either hemotoxylene-eosin staining to show general morphology and immunoflourescence techniques to show the Notch ligand Jagged1 and Jagged2 expressions in uterinal tissues. Field of views were photographed using an Olympus microscope

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2. 1. Uterus	3
2. 1. 1. Endometriumun Yapısal ve Hücresel Bileşenleri	4
2. 2. Üremenin Hormonal Kontrolü	5
2. 3. Farede Östrus Döngüsü	6
2. 4. Preimplantasyon Döneminde Endometrium ve Stromada Meydana Gelen Değişiklikler	6
2. 5. İmplantasyon	7
2. 5. 1. Apozisyon	7
2. 5. 2. Bağlanma	7
2. 5. 3. Penetrasyon ve İnvazyon	8
2. 6. Plasantasyon ve Plasenta Tipleri	8
2. 7. Stromal Hücreler ve Desidualizasyon	9
2. 8. İmplantasyon ve Desidualizasyon Sırasında Uterin Anjiyogenez	10
2. 9. Endometriumun İmplantasyona Cevabı	11

2. 10. İnsan ve Farede Plasenta Gelişiminin Karşılaştırılması	12
2. 11. Trofoblast Hücre Özelleşmesi	14
2. 12. Notch Gen Ailesi ve Notch Proteinleri	15
2. 12. 1. Notch Ligandları ve Etkileşimleri	17
2. 12. 2. Notch Sinyal Yolağı	18
2. 12. 3. Ligandların İnhibitör Etkileri	20
2. 12. 4. Notch Sinyal Yolağı Fonksiyonları	21
2. 12. 5. Notch ve Hastalıklar	22
2. 12. 6. Notch Ligand Jagged1	23
2. 12. 7. Notch Ligand Jagged2	26
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	29
3. 1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları	29
3. 2. Deney Grupları	29
3. 3. Kullanılan Cihazlar	29
3. 4. Kimyasal Maddeler	30
3. 5. Doku Preparasyonu	30
3. 6. Işık Mikroskobi	30
3. 7. İmmunofloresan Mikroskobi	31
3. 8. Semikantitatif Skorelama Yöntemi	32
4. BULGULAR	32
4. 1. Grup-1 Bulguları	32
4. 1. 1. Östrus Döngüsü Bulguları H-E	32

4. 1. 2. Östrus döngüsü evrelerinde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immünolokalizasyonları	34
4. 2. Grup-2 Bulguları	45
4. 2. 1. Gebeliğin 5. Günü	45
4. 2. 2. Gebeliğin 7. Günü	49
4. 2. 3. Gebeliğin 9. Günü	55
4. 2. 4. Gebeliğin 11. Günü	60
5. TARTIŞMA	66
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	78
8. EKLER-YEREL ETİK KURUL KARARI	110

SİMGE ve KISALTMALAR

Jag-1	Jagged1
Jag-2	Jagged2
Ser	Serrate
DSL	Delta/Serrate/LAG-2
NICD	Notch intraselüler domain
DII	Delta-like
SKIP	Ski-inteacting Protein
LH	Luteinizan hormon
NCS	Nükleer kanal sistemi
TGF	Transforming growth factor
ECM	Ekstraselüler matriks
GnRH	Gonodotropin salgılayıcı hormon
FSH	Folikül stimüle edici hormon
CSF	Koloni Stimüle Edici Faktör
ECD	Ekstraselüler domain
ICD	İntraselüler domain
EGF	Epidermal growth faktör
NRR	Negatif regülatör bölgesi
HD	Heterodimerizasyon domaini

LN	Lin-12-Notch
TAD	Transkripsiyon Aktivatör Domain
NEC	Notch Amino Terminal Fragman
NTM	Notch Karboksi Terminal Fragman
RIP	Regulated Intramembrane Proteolysis
LIF	Lökosit İnhibe Edici Faktör
IL	İnterlökin
PRL	Prolaktin
PAI	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
TNF	Tümör Nekroz Faktör
FasL	Fas Ligand
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
PG	Prostoglandin
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
HCC	Hepatoselüler Karsinoma
E	Embriyonik Gün

ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 4. 1	Diöstrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	35
Tablo 4. 2	Proöstrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	35
Tablo 4. 3	Östrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	36
Tablo 4. 4	Metöstrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	36
Tablo 4. 5	Gebeliğin 5. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	46
Tablo 4. 6	Gebeliğin 7. gününde Jagged1, Jagged2 ve Caspase9'un immüno lokalizasyonları	51
Tablo 4. 7	Gebeliğin 9. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	57
Tablo 4. 8	Gebeliğin 11. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları	63
Şekil 2. 1	İmplantasyon	9
Şekil 2. 2	Notch ve ligandlarının yapısı	17
Şekil 2. 3	Notch'un bölünme aşamaları	20
Şekil 4. 1	Östrus döngüsü evreleri H-E	33
Şekil 4. 2.	Diöstrus evresinde Jag1'in immüno lokalizasyonu	37
Şekil 4. 3	Diöstrus evresinde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	38
Şekil 4. 4	Proöstrus evresinde Jag1'in immüno lokalizasyonu	39
Şekil 4. 5	Proöstrus evresinde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	40
Şekil 4. 6	Östrus evresinde Jag1'in immüno lokalizasyonu	41

Şekil 4. 7	Östrus evresinde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	42
Şekil 4. 8	Metöstrus evresinde Jag1'in immüno lokalizasyonu	43
Şekil 4. 9	Metöstrus evresinde Jag2'in immüno lokalizasyonu	44
Şekil 4. 10	Gebeliğin 5.gününde ışık mikroskopik bulgular	45
Şekil 4. 11	Gebeliğin 5.gününde Jag1'in immüno lokalizasyonu	47
Şekil 4. 12	Gebeliğin 5.gününde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	48
Şekil 4. 13	Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskopik bulgular	49
Şekil 4. 14	Gebeliğin 7.gününde Jag1'in immüno lokalizasyonu	52
Şekil 4. 15	Gebeliğin 7.gününde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	53
Şekil 4. 16	Gebeliğin 7.gününde Caspase9'un immüno lokalizasyonu	54
Şekil 4. 17	Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskopik bulgular	55
Şekil 4. 18	Gebeliğin 9.gününde Jag1'in immüno lokalizasyonu	58
Şekil 4. 19	Gebeliğin 9.gününde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	59
Şekil 4. 20	Gebeliğin 11.gününde ışık mikroskopik bulgular	61
Şekil 4. 21	Gebeliğin 11.gününde Jag1'in immüno lokalizasyonu	64
Şekil 4. 22	Gebeliğin 11.gününde Jag2'nin immüno lokalizasyonu	65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Memelilerde implantasyon, blastosist aşamasındaki embriyo ile reseptiv endometrium arasındaki diyalog sonucu meydana gelen en karmaşık biyolojik olaylardan birisidir. Bu süreçte blastosist tarafından uterinal dokuda birçok genin ekspresyonu indüklenir, blastosiste komşu epitelde adhezyonu sağlayan yeni moleküller açığa çıkar, endometrial stroma hücreleri desidua hücrelerine farklılaşırken ekstraselüler matriks kompozisyonu da tamamen değişir (1). Özellikle kemiricilerde ileri derecede invaziv özelliklere sahip blastosistin antimezometrial alana adhezyonundan sonra implantasyon bölgesinde anjiyogenez, plasentasyon, matriks yıkımı, invazyon kontrolü ve apoptozu yönlendiren yeni moleküllerin katılımıyla süreç daha da karmaşık bir hal alır (2).

Notch geni tek geçişli bir transmembran proteinini kodlar. Memelilerde 4 adet Notch geni (Notch 1–4) ve Delta/Serrate/LAG–2 (DSL) ailesinin Notch ligand üyelerini kodlayan 5 gen; 3 Delta-like (DII1, 3, 4) ve 2 Jagged (Jag1, 2) bulunur (3). Notch'un ligandı ile etkileşimi aktive olmasını sağlar. Notch molekülü S1, S2 ve S3, proteolitik bölünmelerini geçirir ve Notch intraselüler domaini serbest kalır. Serbest kalan NICD nükleusa doğru hareket eder ve burada Enhancer of Split protein kompleksinin bir üyesinin transkripsiyonunu aktive etmek için Supressor of Hairless proteini ile etkileşimde bulunur (4).

Notch ligand Jagged1 hücresele proliferasyonunu ve farklılaşmayı kontrol eden ve aynı zamanda çeşitli malign tümörlerde önemli rollere sahip Notch sinyal yolağının ligandlarından biridir. Kalp, plasenta, böbrek, akciğer, kas, pankreas, göbek bağı ve diğer birçok organda yüksek miktarda ekspresse edilir (5). Bunun yanı sıra malignant tümörleri de içeren birçok hastalıkta önemli rollere sahip bir ligandır. Hepatik çalışmalar Jag1 in fetal ve postnatal olarak hem sağlıklı hem de hastalıklı karaciğerde ekspresse edildiğini göstermiştir. Alagille sendromu, konjenital hepatik fibrozis, kistik fibrozis, akut karaciğer yetmezliği, tyrosinemia ve kronik red gibi hastalıklarda da Jag1 ligandı ekspresse edilir (6).

Jagged2 fetal testis, timus, epidermis, ön bağırsak, dorsal kök gangliyonu ve iç kulakta, kalp, akciğer, timus, iskelet kası, beyin ve testiste, orofaringeal epitelde, gelişen timusta ve dil kaslarında, derinin bazal tabakasında, bıyığın germinatif epitelinde, iç kulaktaki semisirküler kanalların ve kohleanın kıl hücrelerinde ve özofagusta ekspresse edilir (7).

İnsanlarda ortaya çıkan bazı hastalıklar Notch sinyal yolağı ile ilişkili genlerde meydana gelen defektler ile ilişkilidir. İnsan Notch1 ve Notch3 geninde mutasyonlar

subkortikal infarkt ve lökoensefalopati ile beraber seyreden serebral otozomal dominant arteriopati sendromundan (CADASIL) sorumludur (8). Notch1 ve 3 mutasyonları arteriyoller düz kas hücrelerinin kaybolarak yerini granüler eozinofilik materyal ile dolduran bir otozomal vasküler bozukluğa yol açar (8–9). Notch1 sinyal yolağı primer melanom hücre büyümesi ve metastazını artırır. Pankreas kanser çalışmalarında Notch1 downregülasyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre invazyonunu, metastazını ve nörovasküler gelişimi baskıladığı gösterilmiştir (10). Jagged1 genindeki otozomal dominant mutasyon Alagille sendromuna yol açar. Alagille sendromu safra kanalı şekillenmesinde defekte neden olarak karaciğer problemlerine yol açan ve aynı zamanda böbrek, göz, kalp ve iskelet sistemi gelişim bozuklukları ile seyreden bir hastalıktır (11). Notch ligandları Jagged1 ve Jagged2 Notch sinyal yolağını hem aktive hem de inhibe etme özelliğindedirler. Bu da Notch sinyalinin bazı tümörlerin büyümesi ve metastazını artırırken, bazılarının da gerilemesinde rol oynadığını gösterir.

Pek çok organ ve dokuda gerçekleşen çok önemli olaylarda yaşamsal öneme sahip fonksiyonlar yerine getiren Notch sinyal yolağı ve bununla ilişkili Jag1 ve Jag2 ligandlarının gebelikte de çok önemli işlevler yerine getirmesinin beklenmesi doğaldır. Bunlar angiogenez, hücre göçü ve farklılaşması, desidualizasyon, plasantasyon gibi olaylar olabilir. İşte bu amaçla bu çalışmada bir fare modeli kullanılarak gebelikten önce uterusun endometrium tabakasında ve gebelik sırasında desidua, plasenta gibi dokularda Jag1 ve Jag2'nin immüno lokalizasyonları belirlenerek bunların bu dokularda gerçekleşen çeşitli olaylardaki olası rolleri hakkında bazı çıkarımlar elde edilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Uterus

Uterus, blastosist implantasyonu ve gebeliğin devamı için uygun ortamı sağlar. Dişi genital kanallarının köken aldığı parametonefrik (Müller) kanaldan gelişir. İnsanda uterus pelvik kavitenin içerisine konumlanmış, armut biçiminde bir organdır. Ortalama 7,5cm uzunluğunda, üst parçasında 5cm genişliğinde, yaklaşık 2,5 – 4cm kalınlığındadır. Sağ ve sol üst lateralde Fallop tüpleri uterusu giriş yapar. Histolojik olarak fundus, korpus ve serviks olmak üzere 3 bölümden oluşur. Korpus ve fundus benzer histolojik özelliklere sahipken, serviks bazı önemli yapısal farklılıklar gösterir. Görece kalın olan uterus duvarı dıştan içe doğru perimetrium, myometriyum ve endometriyum tabakalarından oluşur (12–13).

Perimetrium en dışta bulunan ve uterusun bazı bölümlerinde ya seroza ya da adventisya özelliğindeki tabakasıdır. Myometriyum ortadaki kas tabakasıdır. Bağ doku demetleri ile birbirine bağlı düz kas demetleri şeklinde tasarlanmış en kalın tabakadır. Uterusun işlevi ile ilgili olarak sınırları tam ayırt edilemeyen 3–4 tabaka şeklinde düzenlenmiştir. Düz kas demetleri iç ve dış tabakada longitudinal, büyük kan damarlarının bulunduğu orta tabakada ise sirküler ve oblik seyir gösterir. Gebelik sırasında hem hipertrofi hem hiperplazi gösteren düz kas hücreleri, protein salgılayan hücrelerin ince yapı özelliklerini de kazanarak aktif olarak kollajen sentezlerler. Böylece gebelikte uterusun kollajen içeriği önemli ölçüde artar (12, 14).

Endometriyum uterusun menstrual siklus sürecinde sürekli yenilenen dinamik mukozasıdır. Bu düzenlenme çeşitli seks steroidlerinin, enzimlerin, hormonların, biyoaktif peptidlerin otokrin ve parakrin etkileşimleri ile sağlanır ve hem implantasyon için hem de gebelik olmayan endometriyumun bütünlüğünün korunmasında önemlidir. Başarılı bir implantasyon için endometrial olgunlaşma ile embriyonik gelişimin senkronizasyonu gereklidir (15). Endometrial tabaka iki katmandan oluşur; yüzeyde yer alan fonksiyonel kısım ve derinde miyometriyuma komşu bulunan bazal kısım. Bazal tabaka menstrual döngüde değişiklik göstermeyen lamina propriya ve kapalı tip bezlerden oluşan kısımdır. Arkuat arterlerden köken alan daha kısa düz arterler bulunur. Fonksiyonel tabaka menstrual siklusta sürekli dökülüp yeniden yapılan yüzeye yakın kısımdır, burada tek katlı silyalı ve salgılayıcı prizmatik yüzey epiteli, bezler ve lamina propriya bulunur. Miyometriyumda bulunan arkuat arterlerden köken alan spiral arterler burada sarmal oluştururlar. Bu oluşum, bezleri ve bağ

dokusunu destekleyen zengin bir kapiller ağ sağlar. Blastosistin implantasyonuna olanak sağlar ve plasentanın maternal bileşenini oluşturur (12–14).

2.1.1. Endometriumun Yapısal ve Hücresel Bileşenleri

Yüzey Epiteli

Yüzeyel epiteli, uterus lümenini çevreleyen, implante olmuş blastosiste komşu ilk maternal ara yüzeydir. 1–6 mm kalınlığında olup, silli ve silsiz hücreleri içeren tek katlı prizmatik epitel ile örtülüdür. Sekretuar faz sürecinde silsiz hücrelerin apikal membranlarında değişim görülür (15). Apokrin sekresyonun göstergesi olarak mikrovilluslar azalırken, apikal çıkıntılar öne çıkmaya başlar. Apikal çıkıntılar, uterin lümeden madde absorbe ederek uterus ortamının ayarlanmasında önemlidir (12, 15).

Bez Epiteli

Basit tübüler yapıda olan bu bezler birkaç silli hücre içerir ve endometriumun derin kısımlarında dallara ayrılarak miyometrium sınırına kadar devam eder. Bezler de menstrual siklus aşamalarında ve gebelik sürecinde hormonal kontrol altında çeşitli değişiklikler gösterir (12).

Stroma

Endometrial stroma, zemin maddesini ve fibriler bileşenleri içeren ekstraselüler matriks ile hücrelerden meydana gelen bağ dokudan oluşur. Stromal hücreler (retiküler hücreler olarak da adlandırılır) fibroblast benzeri hücrelerdir ve matriksi sentezlerler (12, 16). Bağ dokusu fibrilleri çoğunlukla tip III kollajendir. Stromada 11 hücre tipi bulunur. Bunlardan fibroblast, kök hücreleri, B ve T lenfositler ile mast hücreleri stromada sürekli bulunurken, desidial hücreler, endometrial granülositler ve ameboid harekete sahip hücreler stromada geçici olarak bulunurlar. Menstrual siklus sürecinde stromal hücreler çoğalma, farklılaşma ve olgunlaşma süreçlerine girerler (12, 17).

Erken proliferatif fazda stromal hücreler, mezenşimal karakterli farklılaşmamış fibroblasta benzeyen hücre görünümündedirler. Faz ilerlediğinde fibroblasta giderek daha çok benzemeye başlarlar. Stromal hücreler menstrual siklus boyunca ekstraselüler matriksin yeniden oluşturulmasında görevlidir ve bu da ovulasyonun meydana geldiği çevrede ilk görülen değişiktir. Proliferatif sürecin orta- geç dönemlerinde hücrede ökromatin miktarı artar ve belirgin bir nükleolus şekillenir. Hücrede GER miktarı artar. Erken sekretuar faz stroma hücreleri daha fazla ökromatin içerir ve sitoplazmada glikojen birikimi vardır. Stromal hücrelerin bez hücrelerine oranı sekretuar faz sürecinde sıkı bir şekilde korunur (15).

Kan Damarları

Myometriümda uterin ve ovaryan arterlerden kaynaklanan, radial arterleri de veren arkuat arterler mevcuttur. Endometrial- miyometrial kavşak geçitinden sonra bazal (anastomoz yapan) ve spiral (terminal) arterlere dallanırlar. Bazal arter endometriümun bazal tabakasını beslerken spiral arter de fonksiyonel tabakayı besler. Spiral arterlerin dallanması fonksiyonel tabakanın her tarafında meydana gelir. Vücuttaki diğer vasküler yatakların aksine endometrial damarlar menstrual siklus sürecinde büyüme ve gerileme döngüsüne girerler (15, 17). Endometrial kalınlığın arttığı proliferatif fazda büyüme, vasküler ağacın büyümesi ile gerçekleşir. Endometrial mikrovasküler yoğunluğu ile ilgili yapılan ışık mikroskopi çalışmaları burada normal menstrual siklusta çok az değişim olduğunu göstermiştir (15).

Ekstraselüler Matriks

Ekstraselüler matriksin (ECM) başlıca iki fonksiyonu vardır. Birincisi doku için yapısal bir iskelet görevi görür. Gebelikle birlikte endometriümdaki yapı değişir. Doğumdan sonra ekstraselüler matriksin normal haline dönmesi gereklidir. İkinci fonksiyonu integrinler ve diğer reseptörler aracılığıyla yerleşik hücre popülasyonu ile etkileşimde bulunmasıdır. Bu etkileşimler hücre adezyonuna, hücrelerin hayatta kalmasına, büyümelerine, göç etmelerine ve farklılaşmalarına aracılık eder. ECM aynı zamanda sitokinleri, büyüme faktörlerini içerir, ekstraselüler enzim aktivitesi ve hücre fenotipinin değişmesi ile ilgili olabilecek kriptik bilgileri saklar. Kadınlarda menstruasyonda dökülen endometriümun tabakası proliferatif fazda tamamen yenilenir. Hücresel proliferasyonun yanı sıra dar interselüler alanlar içerisine ECM iskeletinin birikimi gereklidir (2, 15).

2.2. Üremenin Hormonal Kontrolü

Pubertenin başlaması ile hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılayıcı hormon (GnRH) hipofiz portal sistem yolu ile hipofiz bezinin ön lobuna taşınarak, FSH ve LH gibi gonadotropik hormonların adenohipofiz hücrelerinden salgılanmasını uyarır. Bu gonadotropinler her 28 günde bir tekrarlanan folliküllerin gelişip olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasını içine alan ovaryum siklusunu ve ovaryal siklus ile eş zamanlı olaylanan uterus, uterus tüpleri, vajina ve meme bezlerinde bir dizi değişikliğe neden olan menstrual siklusu hazırlarlar. Diğer bir deyişle, ovaryal ve menstrual siklusları içine alan ve 28 günde bir tekrarlanan üreme siklusunu düzenlerler (13).

Endometriumda meydana gelen döngüsel değişiklikler hormonların kontrolü altındadır. Menstruasyonu takiben östrojen, kalan epitelin proliferasyonunu ve altındaki stromanın olgun endometriumun normal kalınlığa ulaşması için gereken yenilenmesini sağlar. Ovaryal luteal faz sürecinde progesteronun baskın olması epitelyal hücreleri sekretuar fenotip kazanmaları için zorlar ve endometriumdaki glandular yapıların karmaşıklığını artırır. Orta-geç luteal faz sürecinde subepitelyal stromal hücreler proliferasyon olarak desidualize olmaya başlarlar. Ek olarak, östrojen ve progesteron etkisi altında uterin spiral arterler büyür, hem uzunluklarında hem de kıvrımlarında artış olur. Ovaryal hormonlar aynı zamanda lenfoid hücrelerin endometrial stromaya ve kısmen de desidualize bölgeye infiltrasyonunu düzenler. Tüm bu büyüme ve farklılaşma olayları gelişen embriyonun implantasyonu için bir hazırlık sürecidir (13–14).

2.3. Farede Östrus Siklusu

Dişi sıçan ve farelerde üreme döngüsü diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus olarak 4 evreden oluşur ve östrus siklusu olarak adlandırılır. Bu evrelerin her biri birer gün sürer. Toplamda östrus evresi 4 gündür. Uzun süre çiftleşmeyen dişi hayvanlar anöstrus evresine girerler. Dişi hayvan erkekle birleştirildiğinde dişi tekrar östrus döngüsüne girer (18). Ovulasyon proöstrusta başlar, östrusta biter. Östrus evresinde düşük miktarda olan prolaktin, LH ve FSH proöstrusun ortasında artar. Östrojen düzeyi metöstrusta artar, proöstrus evresinde pik yapar ve östrus evresinde tekrar min seviyeye düşer. Progesteron sekresyonu metöstrus ve diöstrus evrelerinde artarken östrusta azalır. Proöstrus evresinin sonunda ikinci kere pik yaparak en yüksek seviyeye ulaşır (19).

2.4. Preimplantasyon Döneminde Endometrium ve Stromada Meydana Gelen Değişiklikler

Endometriumun proliferatif fazdan sekretuar faza geçişi implantasyon için gerekli reseptivitenin elde edilmesinde önemlidir. Bu süreç progesteron hormonunun kontrolünde gerçekleşir. Endometrium orta sekretuar fazda 10–14 mm kalınlığındadır ve sekretuar aktivite en üst düzeydedir. Endometrial bez epiteli hücrelerinde glikojen ve lipid oluşumu artar (12).

Stromal değişiklikler östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi altında parakrin ve otokrin etkilerle meydana gelir. Stromal bağ doku desiduaya farklılaşırken, stromal hücreler de daha büyük ve poligonal hücreler olan desidual hücrelere farklılaşır. Desidualizasyonun ilk morfolojik belirtisi LH+10 da yüzeysel endometrial tabakanın terminal spiral arterleri

çevreleyen stromal hücrelerde görülmeye başlar. Desidualize hücreler, hücrelerin genişlemesi, nükleusun yuvarlaklaşması, nükleolus sayısının artması, sekretuar apparatusun gelişmesi, sitoplazmada glikojen ve lipid birikimi ile karakterizedir (2, 17). İmplantasyon olmadığı takdirde desidua geçici bir doku olarak izlenir ve bu olay pseudodesidualizasyon adını alır. İmplantasyonun gerçekleşmesi ile desidüal reaksiyon devamlılık gösterir (15).

2.5. İmplantasyon

İmplantasyon, embriyonun uterin duvara tutunması (nidasyon) ve luminal epitelini geçerek endometrial stromaya gömülmesi işlemidir. İmplantasyon süreci üç evreyi içermektedir:

2.5.1. Apozisyon (Yakınlaşma)

Embriyo ile uterus arasında fertilizasyondan 1–2 gün sonra başlayan bir diyalog söz konusudur. Bu diyalog süreci implantasyon zamanına kadar devam eder ve başarılı bir implantasyonun gerçekleşmesiyle yavrunun intrauterin yaşamı boyunca da devam eder. İnsan blastosisti intrüsif-tip epitelial penetrasyon gösterir (15).

İmplantasyon, blastosistin uterin kaviteye ulaşmasından 2–4 gün sonra gerçekleşir. İnsanda implantasyon sahası genellikle midsagittal planda, uterus üst arka duvarıdır. Uterin kaviteye ulaşan blastosist luminal epitel ile yakınlaşır ve temas kurmak için hazırlanır. Blastosistin büyümesi ve kontraksiyonu ile blastosist zona pellucida'dan kurtularak epitel ile temas sağlar. Bu temas için blastosist trofoektoderminin farklılaşmış olması yani blastosistin aktifleşmiş implantasyon yeteneğini kazanmış olması gereklidir. Kemirgenlerde bu süreç stromal ödem nedeniyle uterin kavitenin kapanması ve trofoblastlar ile luminal epitel hücrelerindeki interdigitasyonların kurulması ile sonuçlanır. Progesteron ise bu evrede, hazırlık aşaması ve kapanma için zorunlu bir hormondur (12, 14–15).

2.5.2. Bağlanma (Adhezyon)

Bağlanma evresi için adheziv sinyal sistemleri gereklidir. Yapılan çalışmalarda birçok glikoprotein ve karbonhidrat ligand ve reseptörlerin varlığı luminal epitel hücrelerinde ve trofoblastlarda gösterilmiştir. Başlangıçtaki adhezyona selektinler, transmembran proteinler ve kalsiyum bağımlı lektin domainleri aracılık eder ve bu moleküller tutunmadan önce lökositlerin zincir oluşturup yuvarlanarak hareket etmelerini indükler. Yuvarlanan lökositler β_2 integrinleri ve immünglobulin süper ailesi endotelial reseptörleri ile etkileşim kurarak yapışır. Yapışma kararlılığındaki bağlanma ile indüklenen artış sabitleyici bir adhezyona yol açar, bunu takiben ekstravazasyon gerçekleşir (15). Blastosist ile uterus arasındaki etkileşim

her ikisinin de gelişimleri ve farklılaşmalarındaki senkronizasyona katkıda bulunur. Sinyal yolları trofoektodermin trofoblastı oluşturması için epiteyal- mezenşimal değişimlerini yönlendirir. İmplantasyon sırasında endometrium, koloni stimüle edici faktör-1 (CSF-1), lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve interlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler üretmektedir. Adhezyon evresinin ilerleyen aşamaları, integrinler, kadherinler ve selektinleri de içeren tüm adhezyon molekülleri ile ilişkilendirilmektedir. Erken embriyo adhezyon molekülleri üzerinden, hücre adhezyonunu sağlayan özellikle laminin ve fibronektin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin ekspresyonu endometrial stromada gerçekleşmektedir (15).

2.5.3. Penetrasyon ve İnvazyon

Blastosistin tutunması sonrasında trofoblastların luminal epitele penetrasyonu ve devamında trofoblastların farklılaşarak subepitelyal endometrial stromaya invazyonu, peri-implantasyon sürecinde üçüncü bir evredir. Ancak implante blastosistin, trofoblastlar ile endometrial luminal epitel hücreleri arasında implantasyon sürecinin penetrasyon ve invazyon evresi, memeli türler içerisinde 2 farklı şekilde gerçekleşmektedir.

a. Noninvasive İmplantasyon: Bağlanma evresinde implantasyon süreci duraklar ve noninvasive implantasyon 2 farklı tipte izlenir:

- **Sentrik noninvasive implantasyon:** Gelişen büyüyen embriyo bağlanma evresinden sonra uterus boşluğu içerisinde merkezde yerleşim gösterir. Örnek olarak; ruminantlar, at ve domuz

- **Eksentrik noninvasive implantasyon:** Uterus boşluğunun bir kenarına doğru yaklaşmış eksentrik yerleşimli embriyo implantasyonudur. Genellikle mezometriumun karşıt alanında (antimezometrial kutup) yerleşim gösterir. Örnek olarak sıçan, fare verilebilir.

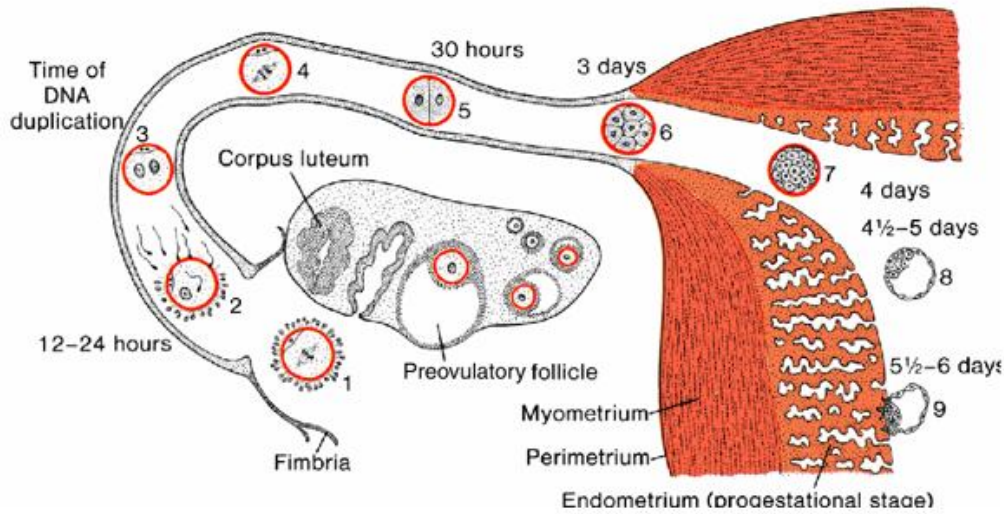
b. İnvazive (İnterstisyel) İmplantasyon

İmplantasyon endometrial stromaya invazyon süreci ile devam eder. Maternal-fetal kontakt kurulması şeklindeki bu implantasyon tipi çoğu memeli türlerde (İnsan, diğer primatlar ve kobaylar) izlenmektedir (20).

2.6. Plasentasyon ve Placenta Tipleri

Plasentasyon süreci endometrial stromaya trofoblastik invazyon ile başlar. Trofoblastlar potansiyel olarak invaziv kapasiteleri olan hücrelerdir. İnvazyon kontrolsüz

olursa uterus ve uterus duvarı boyunca bir yayılım söz konusu olur. Ancak endometriumdan lokal olarak salgılanan sitokinler ve proteaz inhibitörlerin etkisi ile trofoblast invazyonunu kontrol altına alarak sınırlandırır. Ayrıca endometrial stromal hücrelerin farklılaşması ile oluşan desidial hücre tabakası da trofoblastik invazyonu sınırlamaktadır. Trofoblastik aktivitenin kontrolü; büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, enzimlerin, plazminojen aktivatör ve inhibitör faktörlerin arasındaki denge ile sağlanır (IGF, IGF-BP1, CSF-1, LIF, IL-1, MMP, TIMPs, TGF- β , PAI-1, hCG) (15, 20).



Şekil 2. 1: İmplantasyon (13).

2.7. Stromal Hücreler ve Desidualizasyon

Endometrial stromal hücreler ve ekstraselüler matriks bileşenleri menstrual siklusun midsekretuar fazı sırasında implantasyona hazırlık için değişiklikler gösterir (desidualizasyon). Örneğin, hyaluronan artar, tip IV kollajen azalır, tip I ve tip III kollajenin üretimi azalır. Normal siklus döneminde geçici olarak izlenen desidualizasyon, implantasyonun gerçekleşmesiyle implantasyon bölgesinde daha belirgin olmak üzere tüm endometriumda gerçekleşen bir reaksiyon olarak izlenir. Birden fazla blastosistin implante olması durumunda implantasyon alanları, ayrı desidualizasyon ve plasantasyon alanları ile birbirinden ayrılır (17).

Desidial hücreler iri, poligonal hücrelerdir. Sitoplazmalarında lipit ve glikojen birikimi vardır. Desidial stromal hücrelerin α -düz kas aktini, desmin ve vimentin ekspresyonu onları miyofibroblastik aktivite kazandııklarını gösterir (15). Desidial hücreler aynı

zamanda laminin, tip IV kollajen, fibronektin ve heparan sülfat ve proteoglikan içeren ECM proteinleri üretirler. Desidual reaksiyon gebelik boyunca devam eder ve trofoblast invazyonunun derecesi ile ilişkili olarak genişler (15, 17). Bir miktar farklılaşmamış stromal hücre popülasyonu da insan desisuasında mevcuttur. Desidualize stromal hücrelerin prolaktin (PRL), insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) gibi sekretuar ürünleri farklılaşma aşaması için marker olarak kullanılır (15, 21). Desidualizasyon süreci ekstraselüler organizasyonda, sinyal transdüksiyonunda, metabolizmada, hücre adezyonunda, sitoskeletal organizasyonda, farklılaşma ve apoptozda bir takım genlerin ekspresyonunu gerektirir. Bu nedenle desidualize endometrial hücreler, başarılı trofoblast invazyonu ve plasenta şekillenmesi için önemli birçok yeni fonksiyon kazanırlar. Örneğin, spiral arterleri çevreleyen desidualize stromal hücrelerin yüksek oranda doku faktörü (TF) ve plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1, bir fibrinolysis inhibitörü) ekspresse etmeleri menstruasyondan önce ve endovasküler trofoblast invazyonu sürecinde vasküler stabiliteyi korumada primer role sahip olduklarını gösterir. Farklılaşan endometrial stromal hücreler makrofaj inflamatuvar protein-1 β , interleukin (IL)-11, IL-15 ve PRL gibi birçok faktör salgılar. Bu faktörlerin uterin NK hücreleri için kemotaktik, proliferatif ve farklılaşma sinyalleri sağladığı düşünülmektedir (15). Diğer yandan desidua hücreleri, aynı zamanda fetal alloantijenlere cevaben oluşan T-hücre bağımlı immün yanıtı baskılamada gerekli tryptophan-catabolizing enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), tümör nekrosis faktör (TNF)-related apoptosis indükleyici ligand (TRAIL), ve Fas ligand (FasL) ekspresse eder. Ekstraselüler matriksin yeniden oluşumunun, büyüme faktörlerinin ve IGFBP-1 gibi bağlama faktörlerinin sekresyonunun trofoblast invazyonu ve farklılaşmasını düzenlediği düşünülmektedir. İmplantasyon ve plasentanın şekillenmesi inflamatuvar süreç ile ilgilidir. Farklılaşma sürecinde stromal hücreler inflamatuvar sinyallere dirençli hale gelmeye başlarlar ve oksidatif stres savunmasında gerekli manganez superoksid dismutaz (MnSOD) gibi enzimleri ekspresse ederler (15).

2.8. İmplantasyon ve Desidualizasyon Sırasında Uterin Anjiogenez

Üreme siklusu ve gebelik sırasında ovaryum ve uterusunda mevcut vasküler yataktan yeni kan damarları gelişir. Normal bir implantasyonda, desidualizasyon ve plasentasyon sürecinde vasküler permeabilitede artış ve neovaskülarizasyon görülür. Bu süreçlerde östrojen ve progesteron hormonlarının potansiyel etkileri söz konusudur. Vasküler permeabilite ve anjiogenezin düzenlenmesi anjiogenik faktörleri, vazoaktif faktörleri ve

hormonları (vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF reseptörlerini, insulin benzeri büyüme faktörlerini (IGF), anjiopoetinleri, fibroblast growth faktörlerini (FGF), plasenta growth faktör, TGF- β ve hCG'yi) içerir (15).

Kemirgenlerde implantasyonun başlamasının dikkat çekici ilk işareti blastosistin bağlanacağı alanda anjiogenez ve endometrial vasküler permeabilitedeki artıştır. VEGF, bFGF (basic fibroblast growth factor ya da FGF2) ve anjiopoetin embriyogenez sırasında anjiogenez için anahtar mediatörlerdir. Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda östrus siklusu sırasında uterusu VEGF ekspresyonu ve VEGF regülasyon mekanizmasının implantasyonda rollerinin olabileceği gösterilmiştir. Ayrıca VEGF'nin regülasyonu da ovarian steroid hormonların etkisi altındadır. İmplantasyon öncesinde VEGF, luminal epitel hücrelerine yakın yerleşimde eksprese edilirken, implantasyonun başlaması ile stromal bölgede, implantasyon sonrasında ise desidualizasyon alanlarında yaygın olarak eksprese edilmiştir. İmplantasyon sürecinde aktif olarak anjiogenez gerçekleşmektedir ve muhtemelen buna VEGF aracılık etmektedir. bFGF'nin (bazik fibroblast büyüme faktörü), uterusu endometrial ve miyometrial vasküler bazal laminalarda, stromal ve ekstraselüler matris hücrelerinde, glandular ve yüzey epiteli bazal laminalarında immunohistokimyasal analizlerle lokalizasyonları gösterilmiştir. Ayrıca implantasyon ve desidualizasyonda anjiogenez ile ilgili yapılan çalışmalarda FGF araştırılmış ve bFGF'ün periimplantasyon sürecinde ve gebelik sırasında progesteron ve prolaktin etkisiyle ekspresyonlarının up-regüle olduğu gösterilmiştir. Kemirgenlerde anjiogenezin gerçekleştiği periimplantasyon süreci ve gebelik sırasında bFGF ve bFGF reseptörlerinin ekspresyonları artmıştır ve gebelik sırasında uterin sekresyonlarda büyüme faktörlerin varlığı embriyonik gelişimin düzenlenmesinde FGF'ün de rol oynayabileceğini göstermiştir. Anjiopoetinler ise VEGF ve prostaglandinler (PG) ile ilişkili sinyal yolları ile etkileşim içerisindedirler (15–16).

2.9. Endometriumun İmplantasyona Cevabı

İmplantate olan blastosiste cevaben hormonların etkisi ile endometriumun genelinde görülen değişikliklerin yanı sıra lokal olarak da bir yanıt oluşturulur. İmplantasyondan sonra yüzey epiteli hücreleri hipertrofiye uğrar ve sitoplazmalarında glikojen biriktirmeye başlarlar. Yüzeyel kapiller pleksus dilate olur, bu da yüzeyel damarları venül benzeri yapılarla dönüştürür. Endotelyal hücreler silindirik hale gelir. İnsanda implantasyon alanı yakınlarındaki dilatasyon erken villus aşamasına kadar önemsenecek miktarda değildir. Erken

villus aşamasında venüller fazlasıyla dilate olur ve bezlere fark edilir şekilde kan sızıntısı olur. Büyük granüler lenfositler olarak bilinen bir miktar T lenfosit topluluğu gebeliğin birinci trimesterinde artış gösterir (13). İmplantasyon başladıktan sonra stromal fibroblastlar desidual hücrelere farklılıklar. Bu yanıt insanda çok hızlı bir şekilde gerçekleşir. İnsan blastosisti maternal damarları aşındırmadan önce uzağa penetre olur. Trofoblastik plate evresi boyunca, trofoblast sadece epitelin yüzeyine değil bazal laminaya doğru da yayılır. Trofoblastın çevresi tamamen sinsityal trofoblastı ve lakünaları oluşturur. Maternal kan lakünalara dolduğunda, endometrium iyice genişler ve uterin lümene doğru yayılır (14, 16).

2.10. İnsan ve Farede Plasenta Gelişiminin Karşılaştırılması

İnsan ve farede plasenta yapısı farklılıklar içermesine rağmen, gelişimin moleküler mekanizması ve yapıları benzerdir. Dolayısıyla fare, plasental gelişim modelinde sıklıkla çalışılmaktadır.

Farede embriyo implantasyonu desidualizasyonu indükler (22). İnsanda ise desidualizasyonun ilk işareti gebelikten önce normal menstrual siklusun 23. gününde ortaya çıkar. Desidualizasyon uterusun embriyo implantasyonuna hazır hale geldiğine işaret eder (21).

İnsanda tanımlanabilen bir plasenta yapısı gebeliğin 21. gününde ortaya çıkar (21, 23). Blastosist adhezyonunu takiben çok hızlı bir şekilde trofoblast proliferasyonu başlar. Trofoblast hücreleri maternal uterin stromaya invaze olan çok çekirdekli sinsityotrofoblastları oluşturmak için kaynaşır. Trofoblast insanda 2 şekilde farklıdır:

1. Villöz trofoblast: İntervillöz boşluklarda serbestçe yüzen villusların sitotrofoblast hücreleri villöz bazal membrana tutunmuş olarak tek tabakalı epitelyal hücreleri oluşturur. Bu hücreler çoğalır ve kaynaşarak villusların tüm yüzeyini kaplayan bir sinsityotrofoblast oluştururlar (24). Bu membran füzyonu fosfatidilserin flip (25), konneksin-43 (26), kaderin11 (27), ve endojenöz retroviral zarf proteini (28) sentezini gerektirir.

2. Ekstravillöz trofoblast: Uterus duvarı ile temastaki tutundurucu villusların sitotrofoblast hücreleri çoğalırarak bazal membrandan ayrılır. Non-polarize hücrelerin çok tabakalı sütunlarına doğru kümelenerek hızlı bir şekilde uterus duvarına invaze olurlar (29).

İnsanın aksine farede gebeliğin ortasına kadar belirgin bir plasenta yapısı göstermez. Farede plasenta E3.5 blastosist aşamasında, trofoektoderm tabakası iç hücre kitlesinden

ayrıldığında gelişmeye başlar (30). Plasentasyonun ilk adımında trofoektoderm, polar trofoektoderm ve mural trofoektoderm olmak üzere 2 tabakaya ayrılır. E4.5 implantasyon sürecinde mural trofoektoderm, insandaki ekstravillöz sitotrofoblast hücrelerine analog sitotrofoblast dev hücrelerini oluşturmaya başlar. Bu hücre bölünmelerinin durdurur fakat DNA eşlemesi devam eder (endoreduplikasyon) ve poliploid hücreler oluşur. Polar trofoektodermden ise 2 tip hücre farklanır: ekstraembriyonik ektoderm ve ektoplasental kon. Bu sırada embriyonun iç hücre kitlesinden endoderm farklanır. Parietal endoderm hücreleri trofoblast tabakasının bazaline göç ederler ve trofoblast dev hücreleri ile parietal endoderm arasında Reichert membranını oluştururlar. E8.0 de mezoderm hücreleri viseral endodermin iç yüzeyine göç eder ve ilk vasküler hücreleri ve primitif vitellin damarları (visceral yolk sac) oluştururlar. Bu mezoderm hücreleri aynı zamanda allantois mezenşimini de oluşturur ve bu yapı E9–10 da ekstoplasental koni koryonu ile temasta bulunur. E9.0 da koryoallantoik füzyon meydana gelir. Primer villuslar koryonik yüzeye doğru gelişmeye başlar ve kan damarları villöz katlantıları doldurur (24). Dallanma noktaları Gcm1 genini ekspresse eden koryon trofoblast hücreleri tarafından seçilir. Gcm1 ekspresyonu villusların dallanma süreci boyunca devam eder (31). Notch sinyal yolağındaki Notch1/4, Delta-like4, Hey1/Hey2 ve Rbpsuh defektleri koryoallantoik dallanmanın erken dönemde bloke olmasına neden olur. Bu genlerin ekspresyonlarının allantoik mezoderm/kan damarlarında gösterilmesi, fetal vaskülaritenin, kaoryoallantoik arayüzü dallanmasının başlatılmasında önemli olabileceğine işaret edebilir (32). Koryoallantoik plasentada allantoik mezoderm trofoblast hücrelerine invaze olur ve gelişen labirent tabakasının fetal kan damarlarında bir ağ yapısı oluşturur (23). Ekstraembriyonik ektoderm önce koryon tabakasının sonra da labirent tabakasının trofoblast hücrelerini oluşturur. Labirent tabakası gelişirken spongiotrofoblast olarak adlandırılan ektoplasental kon kaynaklı tabaka ile desteklenir. Spongiyotrofoblast, labirent tabakası ile dış dev hücre tabakası arasında kompakt bir hücre tabakası oluşturur ve insandaki sitorrofoblast tabakasına karşılık gelir (33). Gebeliğin ilerleyen evrelerinde spongiyotrofoblast tabakası içerisinde glikojen trofoblast hücreleri farklanmaya başlar ve uterus duvarına invaze olurlar.

E12.5 te tam olarak gelişmiş bir plasenta 3 tabakadan oluşur:

1. Dış maternal tabaka: Maternal damarlar ve desidüadan oluşur.
2. Orta bağlantı bölgesi (junctional zon): Maternal kısmın sınırında bir trofoblast dev hücre tabakasıdır. Eozinofilik sitoplazmaları ile tanımlanan spongiyotrofoblastlar ve trofoblast glikojen hücrelerinden oluşur. Fetal plasentanın uterusu tutunmasını sağlar (34).

3. İç labirent tabakası: Trofoblastlardan gelişir ve fetal kan damarları ile ilişkilidir. Labirent tabakasında trofoblastlar 3 tabakaya farklılaşmaya başlar: Fetal endotel ile temasta olan iki sinsityotrofoblast tabakası ve maternal kan damarları ile temasta olan bir sitotrofoblast tabakası. Böylece bu 3 trofoblast tabakası maternal kanı fetal kandan ayırır. Bu plasenta gelişim tipine hemokorial plasenta denir (22).

2.11. Trofoblast Hücre Özelleşmesi

Trofoblast hücre hattı memeli gelişiminde özelleşen ilk hücre tipidir ve plasentanın epitelyal hücre kompartmanını oluşturmak üzere programlıdır (30, 34). Trofoblast kök hücreleri blastosistten köken alır. Trofoblast hücre hattı farede 4 tip hüreye farklılaşır: trofoblast dev hücreleri, spongiyotrofoblast, glikojen trofoblast hücreleri ve sinsityotrofoblast (35). Trofoblast kök hücrelerinin trofoblast hücrelerine farklılaşmasında fibroblast growth faktör 4 (FGF4), FGF reseptör geni Fgfr2, homeobox transkripsiyon faktör genleri Cdx2 ve Eomes, ayrıca Err2 ve AP γ transkripsiyon faktör genleri önemli rol oynar. Bu genlerin işleyişindeki bir sorun trofoektodermin gelişim bozukluğuna bağlı olarak embriyonik ölüme yol açar (15).

2.11.1. Trofoblast Dev Hücreleri: Büyük, çok nükleuslu, poligonal hücrelerdir. Konseptusun uterusu invazyonuna ve implantasyona aracılık eder. Annede embriyonun büyümesi ve hayatta kalması için gerekli hem lokal hem de sistemik fizyolojik adaptasyonları geliştiren büyüme faktörlerini ve hormonları üretirler. Primer trofoblast dev hücreleri blastosist aşamasındaki mural trofoektodermden köken alırlar. Bu hücreler mitotik bölünmelerinin durdurulmuştur fakat DNA replikasyonu devam eder. Böylece poliploid hücreler oluşur. Ektoplasental koni hücreleri spongiotrofoblast tabakasının prekürsörleridir ve sekonder dev hücrelere farklılaşırlar. Peri-implantasyon blastosistte yalnızca 50 kadar mural trofoektoderm/primer dev hücre bulunurken, ilerleyen birkaç gün içerisinde sekonder dev hücrelerin farklılaşması sürecinde ektoplasental konide trofoblast dev hücrelerinin sayısı 400 ün üzerine çıkar. Trofoblast dev hücrelerinin farklılaşması iki adet basic helix loop helix (bHLH) transkripsiyon faktörü olan Hand1 ve Stra13 ile tetiklenir (15, 30, 35).

2.11.2. Endovasküler Trofoblast Dev Hücreleri: İmplantasyondan sonra trofoblast dev hücrelerinin bir alt popülasyonu spiral arterlere invaze olur ve bu da maternal kanı implantasyon alanına getirir. Dolayısıyla endotel döşeli arterlerin hemokoryal kan

boşluklarına dönüşümünü sağlar. Endovasküler trofoblast dev hücreleri, primer dev hücreler kadar büyük değildir (34).

2.11.3. Spongiotrofoblast: Spongiotrofoblast tabakası plasentanın en dışındaki trofoblast hücre tabakası ile en içteki labirent tabakası arasında yer alan orta tabakadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte yapısal ve sekretuar role sahip olduğu düşünülmektedir. Örneğin maternal kan damarlarının fetal plasentaya ulaşmasını engelleyen Flt1, Prp gibi anti anjiyogenik faktörleri ekspresse eder (15). Spongiotrofoblast tabakasının şekillenmesi ve korunması Mash2 bHLH transkripsiyon faktörüne bağlıdır (36). Primatlarda plasentanın koryonik villuslarını döşeyerek besin taşıma yüzeyi oluşturur. Trofoblast dev hücreleri endoreduplikasyonla oluşan tek nükleuslu poliploid hücreler olmasına karşın sinsityotrofoblast hücreleri, hücre siklusundan ayrılan hücrelerin kaynaşması ile oluşur. Bunun bir sonucu olarak sinsityotrofoblast hücreleri birçok diploid nükleusa sahiptir (15, 37).

2.11.4. Glikojen Trofoblast Hücreleri: İlk olarak spongiotrofoblast tabakasının içinde belirir ve yalnızca gebeliğin ileri döneminde görülür. Embriyonik 12. günden sonra glikojen trofoblast hücreleri uterusu invaze olur. İnvazyonu endovasküler trofoblast dev hücrelerinden farklıdır. Glikojen hücreleri spiral arterlerin içerisi veya yakın alanları dışındaki yerlere invaze olur. Sitoplazmalarında glikojen içeren granüller bulunur fakat fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (15).

Fare ve insan plasentalarının endokrin fonksiyonları da farklıdır. Farede korpus luteum gebelik boyunca progesteron üretir. Fonksiyonu prolaktin-benzeri hormon veya laktojen hormonlar ile kontrol edilir (38). İnsanda ise korpus luteum yapısı 8. haftaya kadar trofoektodermden salgılanan hCG kontrolünde devam eder. Sekizinci haftadan sonra plasental progesteron sinsityotrofoblastlar tarafından üretilir. Korpus luteumun varlığına ihtiyaç kalmaz (39).

Plasental gelişim modelinde fare ile çalışmanın avantajları kısa üreme süresine sahip olmasıdır. Fakat trofoblast invazyonunun insana göre yüzeysel olması ve organ boyutlarının küçük olması ise bir dezavantajdır (20).

2.12. Notch Gen Ailesi ve Notch Proteinleri

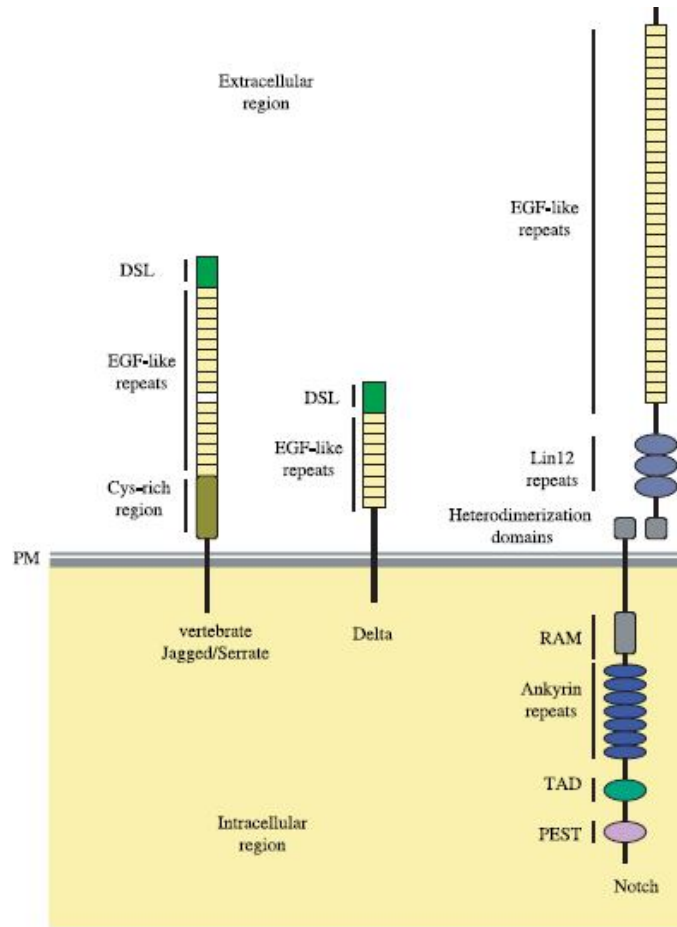
Notch, omurgalı ve omurgasız türlerinde gelişim sürecinde hücre akıbeti kararlarının düzenlenmesi için gerekli olan sinyal reseptörünü kodlayan gerekli bir gendir (40). İlk kez

(1914)'te Dexter tarafından *Drosophila*'da izole edilmiştir. Notch geni tek geçişli bir transmembran proteinini kodlar. Bu transmembran proteini büyük bir ekstraselüler domain (ECD), bir transmembran segment ve bir intraselüler domainden (ICD) oluşur.

- Ekstraselüler domain, 36 adede kadar epidermal growth faktör (EGF) benzeri tekrarlardan ve bir negatif regülatör bölgesinden (NRR) oluşur. NRR, 3 adet Lin-12/Notch tekrarı ve bir heterodimerizasyon domaini (HD) içerir. Fonksiyonu Notch'un ligand bağımsız aktivasyonunu engellemektir.

- Transmembran segment, ligand etkileşim bölgesi Lin-12-Notch (LN) tekrarları olarak bilinen, ekstraselüler domain ile membran bağımlı intraselüler domain arasında etkileşimi modüle eden 3 adet jukstamembran tekrarı içerir (41).

- İntraselüler domainde 4 farklı bölge bulunur: RAM domain, ankyrin tekrarları, transkripsiyon aktivatör domain (TAD) ve PEST (prolin-, glutamat-, serin- threonin- zengin) sekansı içerir. Ankyrin tekrarlarından önce ve sonra iki nükleer lokalizasyon sekansı bulunur (4, 42-43).



Şekil 2. 2: Notch ve ligandlarının yapısı (44).

2.12.1. Notch Ligandları ve Etkileşimleri

Notch reseptörleri 300–350 kDa ağırlığında, tip I transmembran glikoproteinlerdir (45). *Drosophila*' da sadece 1 adet Notch kodlayan gen, 1 Delta ve 1 Jagged homoloğu (Serrate) bulunur. Memelilerde 4 adet Notch geni (Notch 1–4) ve Delta/Serrate/LAG–2 (DSL) ailesinin Notch ligand üyelerini kodlayan 5 gen; 3 Delta-like (DII1, 3, 4) ve 2 Jagged (Jag1, 2) bulunur (3). Delta ve Jagged/Serrate arasındaki ana yapısal fark, Jagged/Serrate'nin ekstraselüler bölgede daha fazla sayıda EGF tekrarları içermesi ve EGF tekrarlarında insersiyonlar bulunmasıdır. Ayrıca membranın yakınında Jagged/Serrate molekülü Delta ligandlarında bulunmayan bir sistein zengin bölge içerir (3, 40). *Drosophila* gelişiminde Delta ile Serrate arasında işlev bakımından da fark olduğu görülür. *Drosophila* gelişiminde Delta, erken dönemde ekspresse edilir ve aktivasyonu sinir sistemi gibi birçok sistemin gelişimi için

gereklidir. Lateral inhibisyon mekanizması ile nörogenezi düzenler. Nöral akıbeti kazanmaya adanmış nöroblastlar Delta ekspresse ederler ve komşu hücrelerde Notch reseptörlerinin aktivasyonu, bu hücrelerin aynı akıbeti kazanmalarını engeller. Aksine Serrate, *Drosophila* gelişiminde geç dönemde ekspresse edilir ve lateral inhibisyonda rolü yoktur. Serrate, anterior solunum deliklerinin ve dorsal-ventral kanat sınırının düzenlenmesinde rol alır (46). Notch yolağındaki ligand bölgesi DSL olarak adlandırılan bir ekstraselüler sistein zengin alandır ve hem Delta hem de Jagged homologlarında bulunur. DSL, Notch ile EGF benzeri tekrarların arasındaki etkileşime aracılık eder (47). İnsanda kromozomal olarak Jagged1 20p11–12, Jagged2 ise 14q32 lokalize olur. Jagged1–2, 16 adet EGF tekrarı taşır ve 10. tekrarda bir insersiyon mevcuttur (48, 49). Notch ligandlarının transmembran proteinler olması nedeniyle hücre-hücre etkileşimi, sinyal yolağını başlatmak için gerekli en önemli koşuldur. Notch'un en önemli özelliği hem transmembran reseptör hem de transkripsiyon faktör olarak hareket etmesidir. Hücre yüzeyinde Notch, komşu hücrelerde ekspresse edilen Delta (DI) veya Jagged (Jag) ligandlarından biri ile etkileşime girebilir (50).

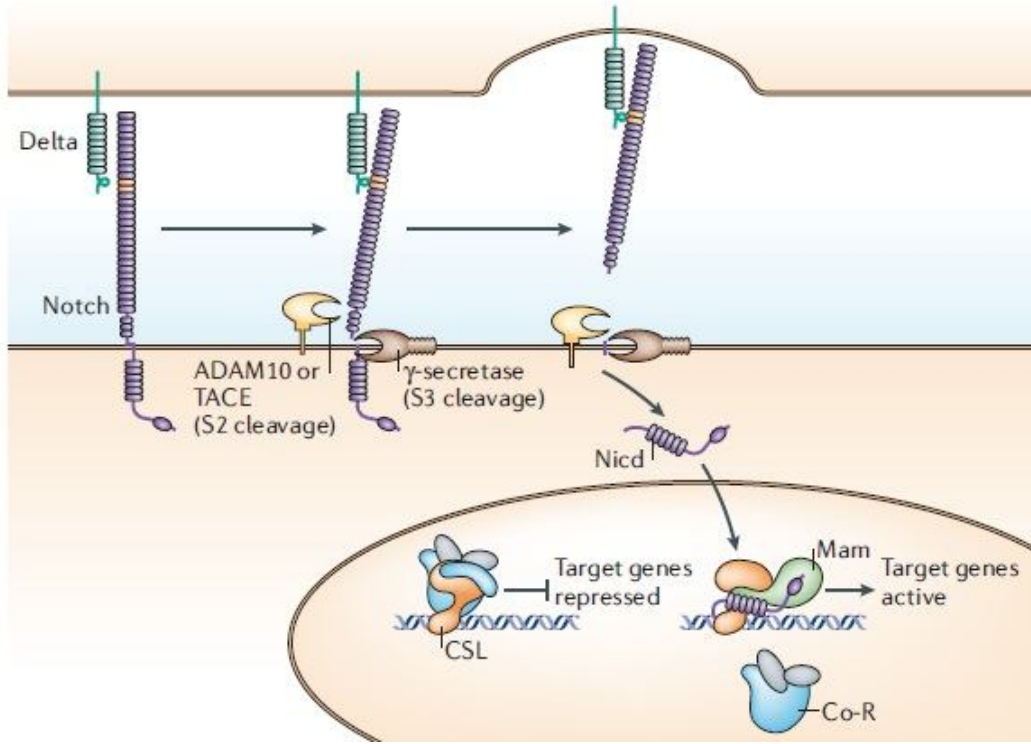
Notch ve ligandları glikoproteinlerdir ve Notch'un glikozilasyonunu reseptörlerin ligand bağlayıcı özellikleri üzerinde regülatör etki gösterir (51). *Drosophila*'da yapılan çalışmalar Notch üzerine etkili iki glikoziltransferaz olduğunu göstermiştir: OFUT1 ve Fringe (52). Omurgalılar 3 adet Fringe homologuna sahiptir: Radical, Manic ve Lunatic Fringe (53).

2.12.2. Notch Sinyal Yolağı

Notch' un ligandı ile etkileşimi aktive olmasını sağlar. Çeşitli gruplardan elde edilen bilgilere göre üç alandaki, S1, S2 ve S3, proteolitik bölünmeleri kapsayan bir Notch aktivasyonun modeli oluşturulmuştur (4, 54). Olgun Notch reseptörü 180-200 kDa amino-terminal (NEC) ve 120 kDa karboksi-terminal (NTM) fragmanlarında oluşan bir heterodimer yapısındadır (55). Bu yapı furin-benzeri konvertaz ile bölünür ve Notch molekülü ekstraselüler domainin çoğunu içeren 180 kDa fragman ve 120 kDa membran bağımlı intraselüler domain ile birlikte kısa bir ekstraselüler sekans olarak ayrılır. Bu bölünmeye S1 bölünmesi denir ve ligand bağlanması gerektirmez. Bölünme sonucu oluşan iki fragman hücre yüzeyinde birbirine non-kovalent olarak bağlı kalır (56). Notch aktivasyonu komşu hücrede ekspresse edilen Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) ailesi transmembran ligandlarının Notch ektodomaininin EGF tekrarlarına bağlanması ile tetiklenir. Bu bağlanma regulated intramembrane proteolysis (RIP) olarak adlandırılan bir proteolitik kaskadı indükler (50, 57).

Notch' un ligandı ile etkileşimi ektodomaininin dökülmesi ile sonuçlanır ve ekstraselüler bir metalloproteaz alanı (S2 site) açığa çıkar. Bu alan ADAM/TACE (a desintegrin and metalloprotease/ tumour necrosis factor a converting enzyme) ailesinin transmembran proteaz üyesi tarafından bölünmesi için duyarlı hale gelir (4, 58). S2 alanının açığa çıkmasına S2 bölünmesi adı verilir. Ekstraselüler fragman hücre yüzeyinden ayrılır. Serbest kalarak transkripsiyon faktör baskılayıcının ko-aktivatörü gibi hareket eder ve gen ekspresyonunu düzenlediği nükleusa doğru translokasyon gösterir (59–60). S2 bölünmesini takiben transmembran domainin intraselüler parçasında S3 bölünmesi gerçekleşir ve intraselüler domain bölünme ürünü olan NICD' i (Notch intraselüler domain) oluşturmak üzere serbest kalır. Bu bölünmeler katalitik bileşen olarak presenilin içeren γ sekretaz aktivitesi ile gerçekleşir (59). Serbest kalan NICD nükleusa doğru hareket eder ve burada Enhancer of Split protein kompleksinin bir üyesinin transkripsiyonunu aktive etmek için Supressor of Hairless proteini ile etkileşimde bulunur (61). NICD' in hücre kültürü ve transgenik deneylerde aktif Notch reseptörleri gibi davrandığı görülmüştür. Bu nedenle ligand bağlanmasının S2 ve S3 bölünmelerine ve NICD salınımına izin veren konformasyonel değişikliğe yol açtığı düşünülür (40). Notch sinyali ikincil haberci sistemini kullanmaz ve sinyal aktivitesinin düzeyi yalnızca NICD nükleer konsantrasyonuna bağlıdır. İlginç biçimde endojenöz NICD çok düşük konsantrasyonlarda hareket eder (62). CSL ailesinin DNA bağlayıcı proteinleri Notch sinyalin intraselüler transdüksiyonunun merkezindedir. CSL ailesi üyeleri memelilerde CBF/RBPkJ molekülleri içerirler. CSL proteinleri Notch hedef genlerinin enhancer bölgelerini bağlarlar ve bağlanma alanları bu genlerin aktivitesi için gereklidir. Notch aktivitesi ve CSL fonksiyonu ilişkisi hakkında birkaç model öne sürülmüştür fakat temel mekanizma aynıdır. Notch sinyali yokluğunda CSL (CBF1/Su(H)/LAG1), transkripsiyonel ko-represörler ile ilişki kurar ve hedef gen ekspresyonunu kapatır (63). Notch sinyali aktive olduğunda NICD hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için CSL ile bir kompleks oluşturur. NICD ko-represör ile yer değiştirir ve CSL ile ilişki kurarak Mastermind içeren üçlü bir kompleks oluşturur. Bu üçlü yapı da çeşitli transkripsiyon faktörleri ile ilişki kurar (64). Notch aracılı transkripsiyonel aktivasyon NICD' in degradasyonu ile downregüle edilir. Sinyalleşmeyi durduran bu mekanizmada Mastermind, Ski-interacting protein (SKIP) rol alır (65). *C. Elegans'* ta Sel-10 molekülü Notch sinyalinin negatif regülatörü olarak tanımlanmıştır (66). Sel-10 proteininin memeli homoloğu, nükleer NIC in fosforilasyon bağımlı übikütinizasyonunu ve proteozom bağımlı degradasyonunu

uyarabilir (67). SKIP ve Mastermind, NICD i fosforile eden kinazları işe koyar. Fosforile edilmiş alanlardaki Fbw/Sel10 ubiquitinizasyonu NICD in degradasyonuna yol açar ve yeni bir NICD nükleusa girene kadar sinyal olaylarını durdurur (68).



Şekil 2. 3: Notch'un bölünme aşamaları (45)

2.12.3. Ligandların İnhibitör Etkileri

Notch sinyal yolağını aktive etmelerinin yanı sıra Notch ligandları konsantrasyon bağımlı inhibitör etki gösterirler. Düşük ligand miktarı Notch sinyalinin etkisini aktive ederken yüksek miktarda ligand inhibitör etkiyi indükler (69). *Drosophila* kanat gelişimi sürecinde bu mekanizma doğru kanat gelişimi için dorsal/ventral sınırın şekillenmesinde Notch sinyal aktivitesinin kısıtlanmasına katkıda bulunur (69–71). Yüksek ökaryotlarda ligand inhibitör etkisinin rolü büyük oranda açıklanmamıştır fakat bu davranışa örnek olabilecek birkaç çalışma mevcuttur. Tavuk gelişiminde COS-7L ve HEK293 hücreleri örnek çalışmalardan biridir (51, 72). Bir diğer çalışmada insan keratinosit farklılaşma sürecinde yüksek miktarda Delta ekspresyonunun Notch sinyali üzerinde inhibitör etki göstererek

keratinosit farklanmasını engellediği ve böylece kök hücre popülasyonunun korunduğu öne sürülmektedir (73).

2.12.4. Notch Sinyal Yolağı Fonksiyonları

Notch reseptörleri farklılaşma, proliferasyon, hücre-hücre adezyonu gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eder. En önemlisi iki alternatif akıbet arasında karar verilmesine yardımcı fonksiyonudur. Bu rolü geniş bir popülasyon içerisinde “lateral inhibisyon” veya iki kardeş hücre arasında “asimetrik hücre akıbeti (asymmetric cell fate assignation) belirlenmesi şeklinde gerçekleştirir.

Notch’un en iyi karakterize edilmiş fonksiyonu belki de lateral inhibisyonudur. Yaygın gelişimsel potansiyeli oluşturmak üzere programlı bir grup hücreden sadece bir kısmının bu akıbeti kazanması lateral inhibisyon olarak bilinir. Kazanan hücreler, diğer hücreleri aynı akıbeti kazanmamaları için engeller (44). Bu mekanizma en iyi böcek nörogenezinde duyu organ prekürsörlerinde tanımlanmıştır. Gelişim sürecinde nöral potansiyeli sahip olan ve pronöral kümeler olarak bilinen bir grup ektodermal hücre ortaya çıkar. Yüksek Delta miktarı bulunan hücreler nöral akıbeti kazanırken, komşu hücrelerin nöral potansiyeli de Notch sinyal aktivitesi ile engellenir (74). Memelilerde örneğin farelerde yapılan çalışmalar lateral inhibisyonun iç kulaktaki kıl hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynadığını göstermiştir (75).

Notch organizmada pattern şekillenmesine yol açan ikili hücre akıbeti kararlarında rol oynar. Notch’un ikinci görevi asimetrik hücre bölünmesi ile ilişkilidir ve hücre polarizasyonuna dayanır. Asimetrik hücre akıbetinin en iyi örneklerinden biri *Drosophila* nörogenezidir. Notch sinyal yolağı regülatörlerinin eşit potansiyelli yavru hücreler arasında asimetrik dağılımı hücrelerin kimliğini, sinyal gönderen hücre ya da sinyal alan hücre olarak belirler. Bu da Notch’un indükleyici ya da inhibe edici rolü olarak bilinir (76). Bir diğer örnek de Notch’un kök hücre popülasyonunun korunmasındaki görevidir. Notch, embriyonik veya post-embriyonik kök hücre sistemlerinde hücrelerin farklılaşmasını ya da farklılaşmamış evrede kalacağını belirler (77).

Ekstraselüler domaini olmayan Notch ile yapılan çalışmalar Notch’un nörojenik ve miyojenik farklılaşmayı inhibe ettiğini göstermiştir (78–79).

Notch sinyal yolağı reseptörleri *Caenorhabditis elegans* ‘ta germ hücre hattının mitotik bölünmesini indükler (80–81). Bu indüksiyonun yokluğunda, germ hücreleri mitotik siklustan ayrılır, mitoza girer ve gametogenez tamamlanır (82). Aksine aşırı indüksiyon ektopik germ hattı mitozuna yol açar (83). Bu veriler Notch sinyal sisteminin erişkin *C.*

elegans gametogenez sürecinde çok önemli olduğuna ve proliferasyon ile farklılaşma arasında bir denge sağladığına işaret eder.

Notch sinyali hematopoietik gelişim sürecinde birçok hücre hattı kararı ve farklılaşmasında görevlidir. Notch mRNA sı ve protein ekspresyonu insan immatür CD34⁺ hematopoietik progenitörlerinde; lenfoid, myeloid ve eritroid prekürsörlerde; B ve T hücrelerinde, monosit ve nötrofillerde saptanmıştır (84).

Lenfoid sistemde çeşitli gelişimsel kararlar Notch sinyali ile düzenlenir. T ile B hücre hattı seçimleri (85), $\alpha\beta$ ile $\gamma\delta$ T hücre seçimi (86), ve CD4 ile CD8 hücre (87) kararlarında Notch sinyalinin etkili olduğu düşünülür. Myeloid hücre hattında esas fonksiyonunun tersine Notch sinyali, granülosit-monosit progenitör evreden farklılaşmış granülosite değişim evresini olumsuz etkiler (88–89).

Yüksek miktarda aktive Notch hücre hattına spesifik genlerin transkripsiyonel downregülasyonuna yol neden olur. Bu da hücre farklılaşmasının ertelenmesine ve ikinci bir farklılaşma sinyali farklı bir hücre akıbeti belirleyene kadar hücrelerin farklılaşmamış durumda kalmasına ile sonuçlanır (90–91). Notch aktivasyonu bu durumun tam tersine de yol açabilir: hücre hattına spesifik genlerin transkripsiyonu gerçekleşir ve olgun dendritik hücreler farklılaşır (92). Buna benzer veriler rat keratinositlerinde (93) ve insan keratinositlerinde (94) de gözlemlenmiştir. İnsan keratinositleri olgunlaşma aşamalarına göre Notch-1, -2, -3 ve -4 ekspresyon ederler. Jagged peptidi ile muamele edilmesi terminal farklılaşmalarını ve boynuzsu şekilde kümelenmelerini tetikler. Notch-1 sinyali aynı zamanda preadipositlerin (95), rat eritrolösemi hücrelerinin (96), CD8 single pozitif timositlerinin (97) farklılaşması için gereklidir.

2.12.5. Notch ve Hastalıklar

İnsanlarda ortaya çıkan bazı hastalıklar Notch sinyal yolağı ile ilişkili genlerde meydana gelen defektler ile ilişkilidir. İnsan Notch1 ve Notch3 geninde mutasyonlar subkortikal infarkt ve lökoensefalopati ile beraber seyreden serebral otozomal dominant arteriopati sendromundan (CADASIL) sorumludur. Notch1 ve 3 mutasyonları arteriyoller düz kas hücrelerinin kaybolmasıyla yerini granüler eozinofilik materyal ile dolduran bir otozomal vasküler bozukluğa yol açar (8–9). Notch1 sinyal yolağı primer melanom hücre büyümesi ve metastazını artırır (98). Pankreas kanser çalışmalarında Notch1 downregülasyonunun hücre büyümesini inhibe ettiği, hücre invazyonunu, metastazını ve nörovasküler gelişimi baskıladığı gösterilmiştir (10). Jagged1 genindeki otozomal dominant mutasyon Alagille sendromuna yol

açar. Alagille sendromu 2 yaşa kadar teşhis edilebilen, safra kanalı şekillenmesinde defekte neden olarak karaciğer problemlerine yol açan ve aynı zamanda böbrek, göz, kalp ve iskelet sistemi gelişim bozuklukları ile seyreden bir hastalıktır (11, 99). Notch sinyal aktivitesinin bozulması ile ilişkili bir başka hastalık ise T-hücreli akut lenfoblastik lösemidir. Notch heterodimerizasyon domaini veya PEST domaininde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır ve bu kromozomal düzenlenim T hücrelerinde konstitüif Notch aktivitesi ile sonuçlanır (100). Aksine, farede Notch1 mutant hücrelerin deri ve korneal tümör oluşturması Notch'un tümör oluşumunu baskıladığına işaret eder (101). Daha önce yapılan çalışmalar Notch sinyalinin, Ebstein-Barr virüs nükleer antijen-2 (EBNA2) ve insan papillomavirüs E6 ve E7 preteinleri gibi çeşitli viral onkogenleri ve bu virüslerle ilişkili kanserlerin bir kısmının karsinogenezini aktive edebildiği gösterilmiştir (102–103). İnsan ve kemirgenlerdeki nöroblastomları, meme, deri, servikal ve prostat kanserlerini içeren diğer birçok kanser türlerinin Notch proteinler veya ligandlarının ekspresyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (104). İnsan prostat kanserinde ve primer multiple myelomada Jag1 ekspresyonu artar (105–106). Baş ve boyun skuamöz hücre karsinomu (HNSCC) hücrelerinde Jag1 miktarı, tümör kan damarı içeriği ve HNSCC gelişimi ile yakın ilişkilidir (107).

2.12.6. Notch Ligand Jagged1 (Jag1)

Jagged1 hücrel proliferasyonu ve farklılaşmayı kontrol eden ve aynı zamanda çeşitli malign tümörlerde önemli rollere sahip Notch sinyal yolağının ligandlarından biridir. Kalp, plasenta, böbrek, akciğer, kas, pankreas, göbek bağı ve diğer birçok organda yüksek miktarda ekspresse edilir (5). Bunun yanı sıra malignant tümörler de dahil birçok hastalıkta önemli rollere sahip bir ligandır. Hepatik çalışmalar Jag1 in fetal ve postnatal olarak hem sağlıklı hem de hastalıklı karaciğerde ekspresse edildiğini göstermiştir. Alagille sendromu, konjenital hepatik fibrozis, kistik fibrozis, akut karaciğer yetmezliği, tyrosinemia ve kronik red durumlarında Jag1 ligandı ekspresse edilir (6). Ratta karaciğer yaralanmaları ve rejenerasyon modeli çalışmalarında Jag1 molekülünün upregüle edilmesi, Jag1 in karaciğer hücrelerinin çoğalması ile ilişkili olduğunu gösterir (108). HCC dokularında Jag1 neoplastik hücre sitoplazmalarında ekspresse edilir. Aynı zamanda tümör olmayan komşu karaciğer dokusunda da ekspresse edilmesine rağmen ekspresyon miktarı HCC dokularındakinden daha düşüktür. Jag1 hepatoselüler karsinoma (HCC) dokularında yüksek miktarda ekspresse edilir ve hepatitis B virüs X proteini (HBx) ile kolokalizasyon gösterir ve HBx ile direk olarak

etkileşimde bulunur. Bu veriler de HBx ile regüle edilen Jag1 in hepatoselüler karsinoma gelişimine katkıda bulunduğunu gösterir (109). Kemik iliği makrofajları Jag1 ekspresse eder ve bu ekspresyon hematopoietik büyüme faktörleri M-CSF, granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör ve interlökin-3 tarafından upregüle edilir ki bu da büyüme faktörlerinin hematopoetik hücre akıbeti kararlarında Jagged1 aracılığıyla işlev gördüğüne işaret eder (110). Jagged1, primer kemik iliği stroma, fetal karaciğer stroma kültürlerinde (111), mast hücresi ve megakaryosit gibi matür hücrelerde ekspresse edilir (112). Jag1 in kemik iliği makrofajlarında ekspresse edilmesi ve ekspresyonunun sitokinler ile belirgin bir şekilde upregüle edilmesi, hematopoetik sistemdeki makrofajların hematopoezde Jag1 üretimi yoluyla bir rol oynadığına işaret eder (110). Osteoblastik hücrelerde paratiroid hormon reseptörünün aktivasyonu Jagged1 ekspresyonunu, dolayısıyla da Notch sinyali yoluyla hematopoetik kök hücre miktarını artırır (113). Notch sinyal yolağı CD4+ T hücrelerinin efektör veya regülatör T hücrelerine farkanmasında önemli role sahiptir. Jag1 in bloke edilmesi, deneysel otoimmün ensefalomyelit tablosunun daha kötüye gitmesine neden olur ve IL-10 üreten CD4 hücrelerini inhibe eder. Jag2- Notch etkileşimi de otoimmün ensefalomyelitte inflamasyonun düzenlenmesinde rol alır (114). Jag1 insanda epidermisin suprabazal tabakasında ekspresse edilir ve bazal tabakada ekspresse edilen Delta ligandı ile birlikte keratinositleri terminal farkanmaları için indükler (94).

Jag1 aracılı Notch sinyalinin neonatal fare ovaryumunda baskılanması primordiyal folikül oluşumunun azalmasına neden olur (115). Peritoneal makrofajlar kuvvetli Jag1 pozitif boyanma sergilerken, dalak makrofajları ve timustan alınan dendritik hücreler hem Jag1 hem Jag2 pozitif boyanma gösterirler ve bu Notch ligandlarının immatür kompartmanda ekspresse edildiğine işaret eder (116).

Notch ve Jag1 endotelde ekspresse edilir. Delta like-1 veya Jag1 defektli embriyolarda çeşitli kanamalar meydana geldiği gözlemiştir (117). Jag1 aracılı Notch4/int-3 yolağı beyin endotelial mikrodamarlara benzer şekilde mikrovessel-benzeri yapıları indükler. Bu da Notch sinyalinin endotelial hücre farkanmasını ve morfogenezini tetikleyebildiğine işaret eder (118).

Notch genleri erişkin fare ovaryumunda ekspresse edilir ve follikülogenezin düzenlenmesinde rol oynar. Jag1 follikül oluşum aşamalarında ekspresse edilir. Neonatal ovaryumda Jag1 ve Jag2 ekspresse edilir. Jag1 yenidoğan ovaryumunda pregranüloza hücrelerinde ve germ hücrelerinde ekspresse edilir. Yenidoğan 3. govaryumunda Jag1,

primordiyal ve primer folikül oositlerinde ekspresse edilir. Bu veriler Jagged aracılı Notch sinyalinin erken folikül gelişiminde germ hücreleri ile somatik hücre kompartmanları arasındaki etkileşime aracılık etmede role sahip olduğunu gösterir (115).

Jag1 proteini fare ovaryumunda endotel hücrelerinde ve mural hücrelerde ekspresse edilir. Jag1, düz kas hücreleri ile çevrili olgun kan damarlarında ekspresse edilir. Bu veriler korpus luteum oluşurken yeni kan damarlarının oluşumunda Jagged1 aracılı Notch sinyalinin önemli rolü olduğuna işaret eder (119).

Jagged1 farede kemik iliğinde ekspresse edilir. Notch1 makrofaj prekürsörlerinde, olgun makrofajlarda ve fibroblastlarda (112), insanda yüksek miktarda CD34⁺ hücrelerinde (120) ekspresse edilir. Yapılan çalışmalarda Jagged1 transkriptlerinin tam olarak olgunlaşmış mast hücrelerinde ve megakaryositlerde yüksek miktarda, eritrosit ve megakaryosit öncülerinde düşük miktarda (112), kemik iliği fibroblastlarında (121) ekspresse edildiği gösterilmiştir. Tam olarak olgunlaşmış hücrelerin Jagged1 ekspresse etmesi, Jagged1 in bir hematopoietik hücreden diğerine ligand gönderen sinyaller olarak işlev görebileceğini doğrular. Muhtemelen farklılaşmış olgun hücreler, projenitör hücrelerin yüzeylerindeki Notch reseptörlerini aktive etmek için Jagged1 ekspresse ederler. Böylece projenitör hücreler ile farklılaşmış şekilleri arasındaki denge korunmuş olur (112).

Jagged1'in homoloğu olan Ser-1 ekspresyonu farede sıklıkla epitelyal-mezenşimal etkileşim alanları ile ilişkilidir. Ser-1, böbrek ve pankreas gibi bazı organlarda baskın olarak epitelde ekspresse edilirken, gelişen safra kesesi, akciğer ve testiste ise ekspresyon büyük oranda mezenşime özgüdür. Bıyık kıl folikülleri ve palatal katlantılarda hem epitel hem de mezenşimde ekspresyon vardır. Bu veriler hem epitel hem de mezenşiminden gelen sinyallerin Ser-1 ekspresyonunu düzenlemek için karşılıklı etkileştiğini doğrular. Hem dental epitel hem de mezenşim kaynaklı sinyaller gelişen dişteki Ser-1 ekspresyonunu etkilerler (46). Epitelyal-mezenşimal alanlardaki bu kompleks ekspresyon, Ser-1 ekspresyonunun doku etkileşimleri ile düzenlendiğini gösterir. Bu görüş, diş gelişimini inceleyen deneysel çalışmalar ile test edilmiştir (49, 122). Gelişen dişte Ser-1 ilk olarak diş gelişimi için indüktif kapasiteye sahip dental epitelin gelişeceği kısımda ekspresse edilir (E10.5-E11). E12-12,5 de Ser-1 ekspresyonu, mezenşimle temastaki epitel hücrelerinde downregüle edilirken, dental mezenşimde upregüle edilir. Bu ekspresyon patterni tomurcuk (E13-13.5) ve kep (E14.5-15.5) evrelerinde de korunur. E16.5 (erken çan evresi) ten E18.5 e (geç çan evresi) Ser-1 mRNA sı dental papilla mezenşiminde yok olurken, ekspresyon stratum intermedium ve

stellate retikulum epitel hücrelerinde devam eder. Bu evrede iç enamel epitel hücrelerinde/preameloblastlarda ekspresyon yoktur. Ser-1 ekspresyonu diş germini çevreleyen mezenşimde sürer ve dental folikül oluşur. Fare embriyosunda Jagged1 homoloğu olan Ser-1'in ikinci brankial arkusta, otik vezikülde, pronefroz hücrelerinde ve somitlerin sınırında, lens ve ekstremite tomurcuklarında, hem apikal ektodermal halka (AER) epitelinde hem de mezenşimin distal kısımlarında, 4. ventrikülün etrafındaki ventriküler bölgede, gelişen orta beyinde, telensefalonda, dorsal kök gangliyonunda ve spinal kordda ekspresse edildiği saptanmıştır (46).

Jag1 metastatik prostat kanserinde, lokalize prostat kanseri ve benign prostat kanseri ile karşılaştırıldığında çok yüksek miktarda ekspresse edilir. Aynı zamanda yüksek Jag1 ekspresyonu diğer klinik parametrelerden bağımsız olarak birçok lokalize tümörün tekrarlaması ile yakından ilişkilidir. Bu veriler, Jag1 protein miktarı disregülasyonunun prostat kanseri ilerlemesi ve metastazında çok önemli bir role sahip olduğunu ve belki de saldırgan ve yavaş seyirli prostat kanseri ayırımında başarılı bir marker olarak kullanılabileceğine işaret eder (105). Jag1 proteini tarafından aktive edilen Notch sinyali mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşmasını artırır (123). Jag1 protein ekspresyonunun renal hücreli karsinomda normal böbrek dokuları ile karşılaştırıldığında fazla miktarda arttığı belirlenmiştir. Jag protein miktarı ayrıca tümör büyüklüğü ve seyri ile yakından ilişkilidir. Bu veriler renal hücre karsinomunun özellikle de erken evrede teşhis edilebilmesi ve prognozunun belirlenmesi için Jag1 ekspresyonuna bakılmasının yararlı olabileceğini öne sürer (124). Notch sinyali kanser tipine bağlı olarak onkojenik ya da tümör baskılayıcı role sahip olabilir (125).

2.12.7. Notch Ligand Jagged2 (Jag2)

Rat Jagged2 homoloğu fetal testis, timus, epidermis, ön bağırsak, dorsal kök gangliyonu ve iç kulakta yüksek miktarda ekspresse edilir. İki haftalık farede Jag2 transkripti kalp, akciğer, timus, iskelet kası, beyin ve testiste yüksek miktarda ekspresse edilir. İlerleyen günlerde Jag2 ekspresyonu paravertebral damarlarda ve dorsal kök gangliyonunda, orofaringeal epitelde, gelişen timusta ve dil kaslarında, derinin bazal tabakasında, bıyığın germinatif epitelinde, iç kulaktaki semisirküler kanalların ve kohleanın kıl hücrelerinde ve özofagusta ekspresse edilir. İki haftalık ratta Jag2 kalp ve akciğerde yüksek miktarda, timus, kas, beyin, beyincik ve testiste orta derecede, böbrek ve ince bağırsakta düşük miktarda

ekspresye edilir (7). Jag1 ve Jag2 ekspresyonu bazı organlarda birbirleri ile örtüşürken, bazı organlarda farklı ekspresyon patterni sergiler. Örneğin deri epitel, olfaktor epitel, diş tomurcuğu ve dorsal kök gangliyonunda hem Jag1 hem de Jag2 yüksek miktarda ekspresye edilir. Bununla birlikte Jag2 timusta Jag1 e göre daha fazla ekspresye edilmektedir. Notch sinyal sistemi memeli testisinde Jag2 ve Notch1 ile koekspresyon sergileyerek ekspresye edilir. Jag2 ekspresye eden birçok doku aynı zamanda Notch 1 i de ekspresye eder ki bu da, Notch1 in Jagged2 için reseptör olduğunun bir göstergesidir (126).

Jag2 farede gelişen dişte ekspresye edilir. Jag2 defektli homozigot farelerin doğumdan hemen sonra öldüğü, anormal diş morfolojisine sahip olduğu, palatal ve mandibular uzantılar arasında kaynaşma olduğu görülmüştür. Bu bilgiler Jag2 aracılı Notch sinyalinin diş gelişiminde önemli role sahip olduğunu gösterir. Ekspresyonu aynı zamanda odontogenez sürecinde de gereklidir. Farede Jag2 tüm diş gelişim aşamalarda ekspresye edilir. Jag2 geni iç enamel epitelyal hücrelerinin komşu hücre tabakasında ekspresye edilir. İç enamel epitel hücreleri hemen komşuluklarındaki hücreleri lateral inhibisyon yolu ile aynı akıbeti kazanmalarını için baskılar. Bu da Notch sinyalinin hücre akıbeti kararlarında rol oynadığını doğrular (49, 127).

Hem Jag2 hem de Notch1 ekspresyonu rat testisinde ilk olarak doğumdan 19 gün sonra spermatozoidlerde gözlenmiştir. Rat testisi kültürlerine anti Notch1 ve anti Jag2 eklendiğinde yuvarlak ve uzamış spermatidlerin azaldığı ve 9–12 gün sonra tamamen kaybolduğu gözlenmiştir. Diğer yandan spermatozoid miktarı artar. Seminifer tübül çapları küçülür. Fertil insan testis dokusunda hem Notch1 hem de Jag2, spermatozoid ve spermatidlerde ekspresye edilir. Erişkin testiste Jag2 mRNA sının azalması spermatozoid ve spermatid popülasyon oranlarının da azaldığına işaret eder (128).

Jag2 mutant fare ile yapılan bir çalışmada, farede kraniyofasiyal morfogenezde defektler oluşmuş ve fare perinatal dönemde ölmüştür. Mutant farede yarı damak ve dil füzyonu, ön ve arka beyinde sindaktili gözlenir. Ekstremiteler tomurcuklarının apikal ektodermal kabartıları hipeplastiktir, timus gelişimi defektlidir, $\gamma\delta$ T hücre hattı farklılaşmasında da aksaklık meydana gelir. Bu sonuçlar farede Jag2 aracılı Notch sinyalinin bacak tomurcuğu, kraniyofasiyal ve timus gelişiminde çok önemli role sahip olduğunu gösterir. Brankiyal arkların epitelyal hücre tabakasında ve nazal pitlerin etrafında yüksek oranda Jag2 ekspresye edilir. Nazal, dil ve palatal epitel içeren kraniyofasiyal epiteldeki Jag2 ekspresyonu embriyogenez boyunca korunur. E18 Jag2 mutant farelerde timus yapısının

değiştirdiği gözlenmiştir, $\gamma\delta$ T hücre sayısında azalma vardır. Bu da Jag2 aracılı Notch sinyalinin timus gelişimi ve normal sayıda $\gamma\delta$ T hücre farklılaşmasında önemli yeri olduğunu gösterir. $\alpha\beta$ T hücrelerinin Jag2 mutasyonundan etkilenmemesi, bu hücre hattının farklılaşmasında Notch1 proteininin başka bir ligand ile aktive edildiğine işaret eder (129). Jagged, myoblastlarda ekspresye edilen Notch1 i aktive ederek kas hücre farklılaşmasını engeller (130). Endotel hücrelerinde Jag2 ekspresyonu yüksektir (131). Notch1 ve Jag2 ratlarda enterik sinir sisteminde submukozal gangliyonda ve myenterik pleksusta ekspresye edilir. Jag2 birçok nöron alt tipinde ekspresye edilir. Bu veriler Notch 1 ve Jag2 nin erişkin enterik sinir sisteminde nöral hücrelerin fonksiyonu ve korunmasında önemli rollere sahip olduklarına işaret eder. Jag2 gastrointestinal sistem boyunca submukozal ve myenterik pleksustaki iri nükleuslu non-prolifere gangliyonlarda ekspresye edilir (132). Motor nöron üretimi sürecinde motor nöron projenitör domaininde Jag2 proteini geçici olarak ekspresye edilir ve ekspresyon Shh aktivitesi bağımlıdır. Motor nöron oluşum sürecinde Jag2 aktivitesinin azalması prematüre oligodendrosit farklılaşmasına yol açar. Aksine Jag2, Hes5 i aktive ederek oligodendrosit farklılaşmasını engeller. Bu şekilde, Jag2 fonksiyonu ikinci bir oligojenik faz gerçekleşene ve oligodendrositler oluşana kadar, motor nöron projenitör prekürsörlerini korumak için gereklidir (133). Notch1 ve ligandları Jag1–2 nin beyinde ekspresye edilmesi Notch sinyalinin beyinde farklılaşmış nöronlar ve kök hücre üzerinde etkileri olduğuna işaret eder (134). Notch1/Jag2 sinyal sistemi rat testisinde erkek germ hücrelerinin farklılaşmasında rol oynar ve insanda spermatojenik matürasyon arresti olan hastalarda ekspresye edilmez. Notch1/Jag2 sinyal sistemi spermatid olgunlaşma sürecinde Golgi kompleksinden akrozom oluşumunda da önemli role sahiptir (128).

Jagged2 tarafından aktive edilen Notch normal insan CD34⁺ hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını azaltır (90). İlginç olarak rat CD34⁺/c-kit⁺ hücrelerinde Notch aktivasyonu proliferatif potansiyellerini artırır (111).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3. 1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen yaklaşık 20–40 gram ağırlığındaki *Mus musculus* cinsi 40 adet erişkin dişi ve 5 adet erişkin erkek fare kullanıldı. Hayvanlar deney süresince standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendiler. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 07.10.2010 tarih ve B.30.2.CUM.0.01.00.00–50/74 sayılı onay belgesi (EK–1) alınmıştır.

3.2. Deney Grupları

GRUP–1: İki hafta boyunca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodlar 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 ve metöstrus) ve her gün için 5 hayvan olmak üzere 200mg/kg sodyum penta-barbital intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulandı ve uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

GRUP–2: İki hafta boyunca 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodlar sağlanarak normal östrus siklusunun sağlandığı ve gebelik oluşturulacak hayvan grubudur. Östrus siklusları vajinal smear ile belirlendi. Östrus evresinde olan dişi fareler gebelik oluşması için erkek fare kafeslerine alındı. Ertesi gün vajinal plak oluşumuna bakılarak, vajinal plak görülen fareler gebe kabul edilip ayrı kafeslere alındı. Vajinal plağın görüldüğü gün gebeliğin 0,5. günü olarak kabul edildi. Gebe hayvanlara, gebeliğin 5. 7. 9. ve 11. günlerinde her gün için 5 hayvan olmak üzere 200mg/kg sodyum penta-barbital intraperitoneal yoldan verilerek ötenazi uygulandı ve uterus dokuları incelenmek üzere alındı.

3. 3. 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 -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson, USA)

3. 4. Kimyasal Maddeler

- Antikorlar
 - Primer antikorlar
 - Rabbit anti-human Jagged-1 polyclonal antibody unconjugated (H-114): sc-8303 S. Cruz Bio.,
 - Rabbit anti-human Jagged-2 polyclonal antibody unconjugated (H-143): sc-5604 S. Cruz Bio.,
 - Sekonder antikor
 - Goat anti-rabbit IgG- Cy3: AP132C-Millipore
- Crystal Mount Aqueous Mounting
- DAPI (Sigma, 32670)
- Eozin (Biooptica, Milano, Italy)
- Hematoksilen (Biooptica, Milano, Italy)
- Normal goat serum
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, USA)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Citrate buffer 10mM/L pH:6

3. 5. Doku Preparasyonu

Ötenazi sonrasında alınan uterus dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin ile 30-36 saat süre ile fikse edildikten sonra dehidrasyon ve şeffaflandırma basamaklarını takiben parafinde bloklandı.

3. 6. Işık Mikroskopi

Işık mikroskopik incelemeler için parafine gömülen örneklerden Leica mikrotom ile alınan 5µm kalınlığında seri kesitlere genel morfolojiyi göstermek amacıyla hematoksilen-

eozin boyama uygulaması yapıldı. Olympus BX51 (Tokyo, Japan) mikroskobu ile uygun görüntüler alındı.

3.7. İmmünofloresan Mikroskopi

Parafine gömülü doku örneklerinden lamlara alınan 5 µm kalınlığında kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra, ksilolde deparafinizasyon uygulandı. Azalan konsantrasyonlardaki etil alkol serileri ile rehidrate edilen kesitler suda yıkandı ve metanol ile hazırlanmış %2'lik H₂O₂' de 10 dk nonspesifik zemin boyanmasını engellenmek için bekletildi. Mikrodalga fırında 95 °C' de 10 mM sitrat tampon pH:6'da 5 dk antijen retrieval uygulandı. Kesitler PBS-Triton-X 100- Normal goat serum ile 2x10 dk yıkandı. Normal goat serum, Bovine serum albümine, PBS karışımı ile nonspesifik boyamaların engellenmesi için 20 dk oda ısısında inkübe edilen kesitler +4 °C'de 1 gece PBS-Normal goat serum ile 1:25 oranında dilüe edilen primer antikorlar ile inkübe edildi. Bundan sonraki aşamalar oda ısısı ve karanlık ortamda gerçekleştirildi. Kesitler PBS ile 2x5 dk yıkandıktan sonra PBS-Normal goat serum ile 1:700 oranında dilüe edilen sekonder antikor ile 37 °C'de 45 dk inkübe edildi. PBS-Triton X-100-Normal goat serum ile 2x5 dk yıkama yapılan kesitlere 5 dk DAPI (200nm/ml) ile nükleer boyama yapıldı. PBS ile 2x5 dk yıkama yapıldıktan sonra kapatma mediumu ile kesitler kapatıldı ve uygun filtreler kullanılarak bir Olympus BX51 (Tokyo, Japan) floresan mikroskop ile görüntülendi. Negatif kontrol kesitlere primer antikor inkübasyonu yapılmayarak diğer aşamalar aynı şekilde uygulandı.

3.8. Semikantitatif Skorlama Yöntemi

Pre ve postimplantasyon periyotlarında, uterus dokularında görüntülenen Jag1 ve Jag2 ekspresyonlarının şiddeti semikantitatif skorlama yöntemiyle belirlendi ve sonuçlar tablolar halinde bulgular bölümünde gösterildi.

4. BULGULAR

Notch ligand Jagged1 ve Jagged2'nin pre- ve post- implantasyon evrelerindeki fare endometriumundaki ekspresyonları semi-kantitatif skorlama yöntemiyle belirlenerek sonuçlar Tablo 4.1 – 4.8 de verilmiştir.

4. 1. Grup–1 Bulguları

Gebelik oluşturulmayan hayvan grubunda farelerdeki östrus siklusu evrelerinin histolojik özelliklerine göre diöstrus, proöstrus, östrus ve metöstrus olarak siklus evreleri değerlendirildi. Her evre için hematoksilin-eozin boyama ile ışık mikroskopide genel morfolojiye ait bulgular ve Notch ligand Jagged1 ve Notch ligand Jagged2 için immüno Floresan boyamalar ile immüno Floresan mikroskopi bulguları elde edildi.

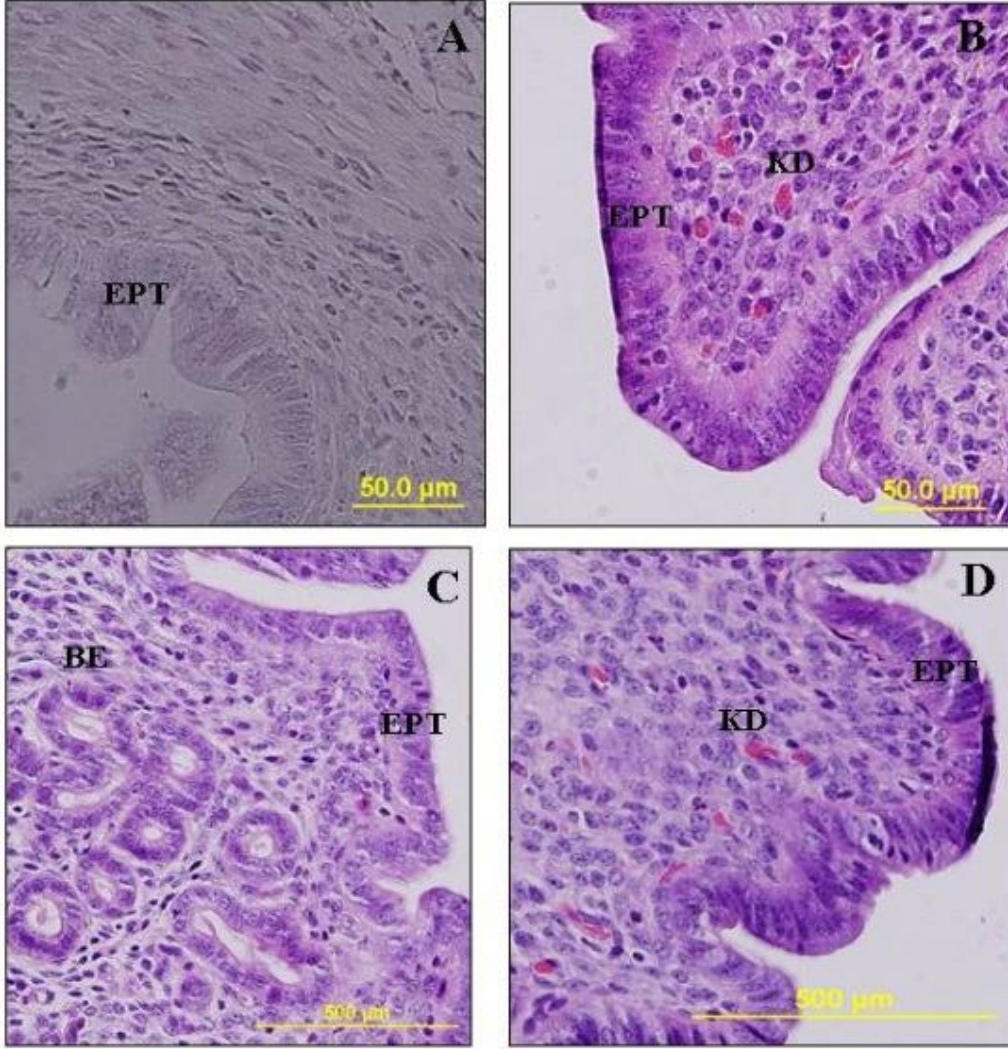
4. 1. 1. Östrus döngüsü bulguları H-E

Diöstrus evresinde, uterus lümeni yarık şeklindedir. Kübik- prizmatik luminal epitel ve mitotik figür ve nadir dejeneratif hücreler, atrofik ve kollabe endometrial bezler, stromal ödem ve stromada polimorfonükleer lökositler izlendi (Şekil 4.1. A).

Proöstrus evresinde, lümen epiteli prizmatik yapıda gözlenirken, epitel hücrelerinde mitotik figürler varlığını sürdürüyordu. Bu evrede dejenerasyon gözlenmezken, mukozada çok az sayıda lökosit izlendi. Endometrial bezler hipertrofik yapıda olup, vaskülarizasyon ve ödem artışı belirgindi (Şekil 4.1. B).

Östrus evresinde, bez ve luminal epitelde mitotik aktivite kaybı, hücrel dejenerasyonlar ve lökosit infiltrasyonu izlendi. Luminal epitele kadar uzanan stromal vaskülarizasyon artışı izlendi (Şekil 4.1. C).

Metöstrus evresinde, bez ve luminal epitelde vakuolar dejenerasyonlar izlenirken, mitotik aktivitenin tekrar başlaması, azalan lökosit infiltrasyonu ve azalan vaskülarizasyon izlendi (Şekil 4.1. D).



Şekil 4. 1. Östrus döngüsü evreleri: A-diöstrus, B-proöstrus, C-östrus, D-metöstrus (EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, KD: Kan Damarı)

4. 1. 2. Östrus döngüsü evrelerinde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immünolokalizasyonları

(Tablo 4.1-4' te ekspresse oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir).

Jagged1: Östrus döngüsünün diöstrus ve proöstrus evresinde luminal epitelde güçlü Jag1 ekspresyonu izlendi (Şekil 4.2. A-B, Şekil 4.4. A-B) Östrus ve metöstrus evresinde ise luminal epitelde ekspresyonun azaldığı görüldü (Şekil 4.6. A-B, Şekil 4.8. A-B). Diöstrus, proöstrus ve östrus evresinde endometrial stroma hücrelerinde güçlü Jag1 ekspresyonu görülürken (Şekil 4.2. B, Şekil 4.4. B-D, Şekil 4.6. B-D), metöstrus evresinde bunun oldukça zayıf olduğu izlendi (Şekil 4.8. B). Bez yapısında diöstrus evresinde en güçlü lokalizasyon izlenmiştir (Şekil 4.2. B). Proöstrus ve östrus evresinde ekspresyonun azaldığı (Şekil 4.4. C, Şekil 4.6. C), metöstrus evresinde de oldukça zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 4.8. B). Myometrium tabakasında östrus döngüsünün tüm evrelerinde zayıf Jag1 ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.2. C, Şekil 4.4. E, Şekil 4.6. E, Şekil 4.8. A). Perimetrium tabakasında diöstrus ve proöstrus evresinde orta derecede ekspresyon izlenirken (Şekil 4.2. C, Şekil 4.4. E), östrus ve metöstrus evresinde bunun oldukça zayıf olduğu izlendi (Şekil 4.6. A, Şekil 4.8. C). Bununla birlikte tüm evrelerde perimetriumdaki damarlarda yüksek oranda Jag1 immünolokalizasyonu izlendi (Şekil 4.8. C).

Jagged2: Lümen epitelinde Jag1 ekspresyonuna benzer şekilde diöstrus ve proöstrus evresinde güçlü (Şekil 4.3 A-B, Şekil 4.5. A-B), östrus ve metöstrus evresinde zayıf Jag2 lokalizasyonu izlendi (Şekil 4.7. A-B, Şekil 4.9. A-B). Endometrial stromada da Jag1 ile benzer şekilde diöstrus, proöstrus ve östrus evresinde endometrial stroma hücrelerinde güçlü Jag2 ekspresyonu izlenirken (Şekil 4.3. B, Şekil 4.5. B-D, Şekil 4.7. B-D), metöstrus evresinde bunun oldukça zayıf olduğu görüldü (Şekil 4.9. B). Myometrium ve perimetrium tabakalarında diöstrus evresinde zayıf olan Jag2 ekspresyonu (Şekil 4.3. C), proöstrus evresinde orta derecede izlendi (Şekil 4.5. E). Östrus ve metöstrus evrelerinde ise bunun zayıfladığı görüldü (Şekil 4.7. E, Şekil 4.9. C).

Tablo 4. 1. Diöstrus evresinde Jagged1 ve Jagged'nin immünolokalizasyonları

Diöstrus Evresi	Jagged1	Jagged2
Luminal Epitel	+++	+++
Endometrial Stroma	+++	+++
Endometrial Bezler	+++	+++
Myometrium	+	+
Perimetrium	++	++

Tablo 4. 2. Proöstrus evresinde Jagged1 ve Jagged'nin immünolokalizasyonları

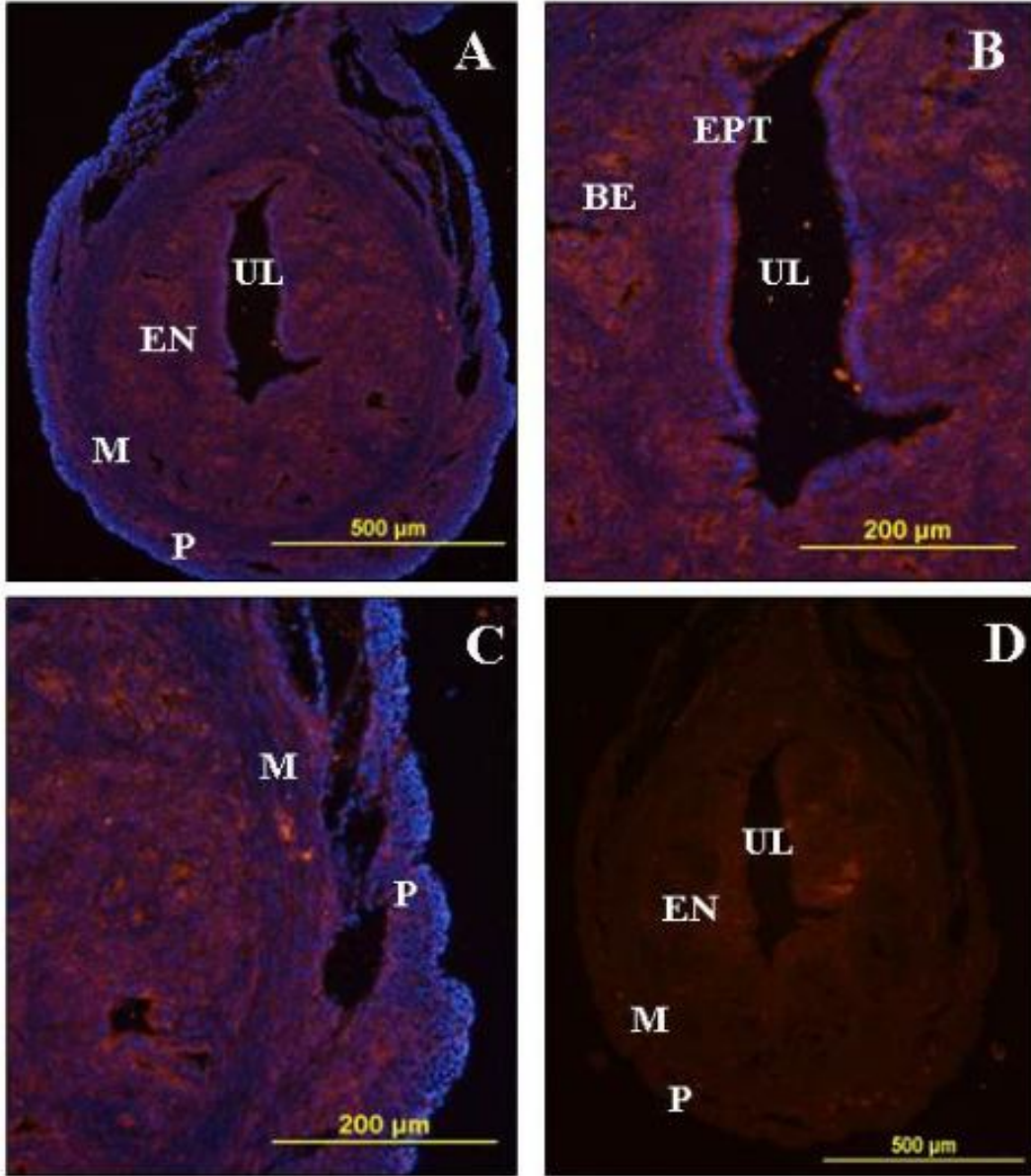
Proöstrus Evresi	Jagged1	Jagged2
Luminal Epitel	+++	+++
Endometrial Stroma	+++	+++
Endometrial Bezler	++	+++
Myometrium	++	++
Perimetrium	++	++

Tablo 4. 3. Östrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları

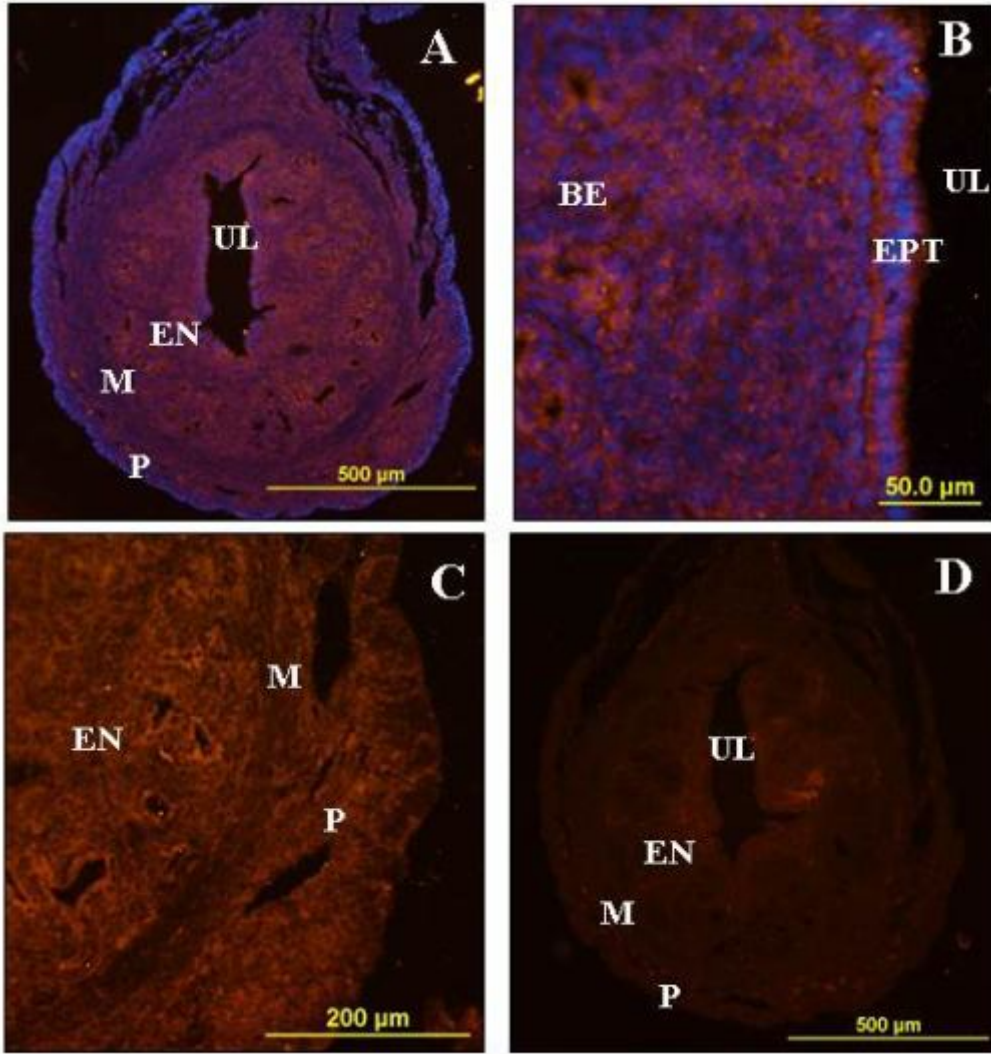
Östrus Evresi	Jagged1	Jagged2
Luminal Epitel	++	++
Endometrial Stroma	+++	+++
Endometrial Bezler	++	++++
Myometrium	+	++
Perimetrium	+	+

Tablo 4. 4. Östrus evresinde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları

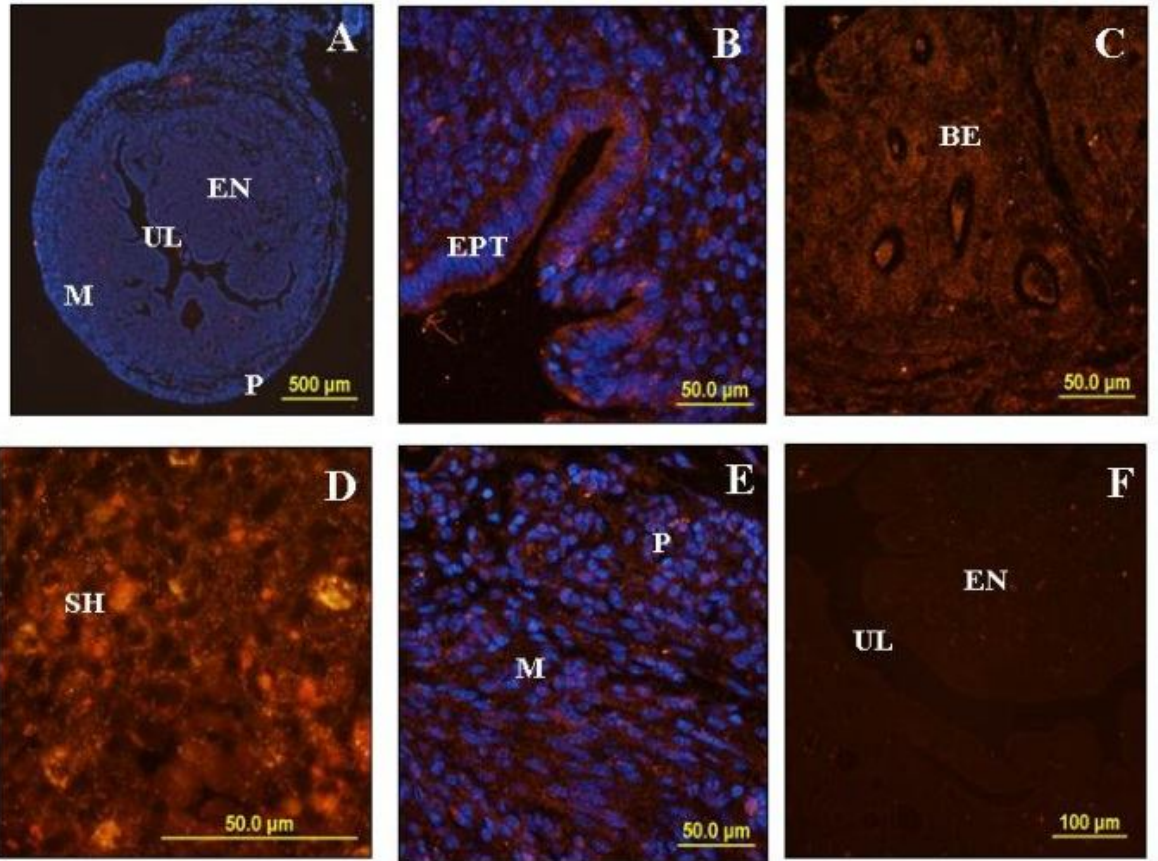
Metöstrus Evresi	Jagged1	Jagged2
Luminal Epitel	++	++
Endometrial Stroma	+	+
Endometrial Bezler	++	++
Myometrium	+	+
Perimetrium	+++	+



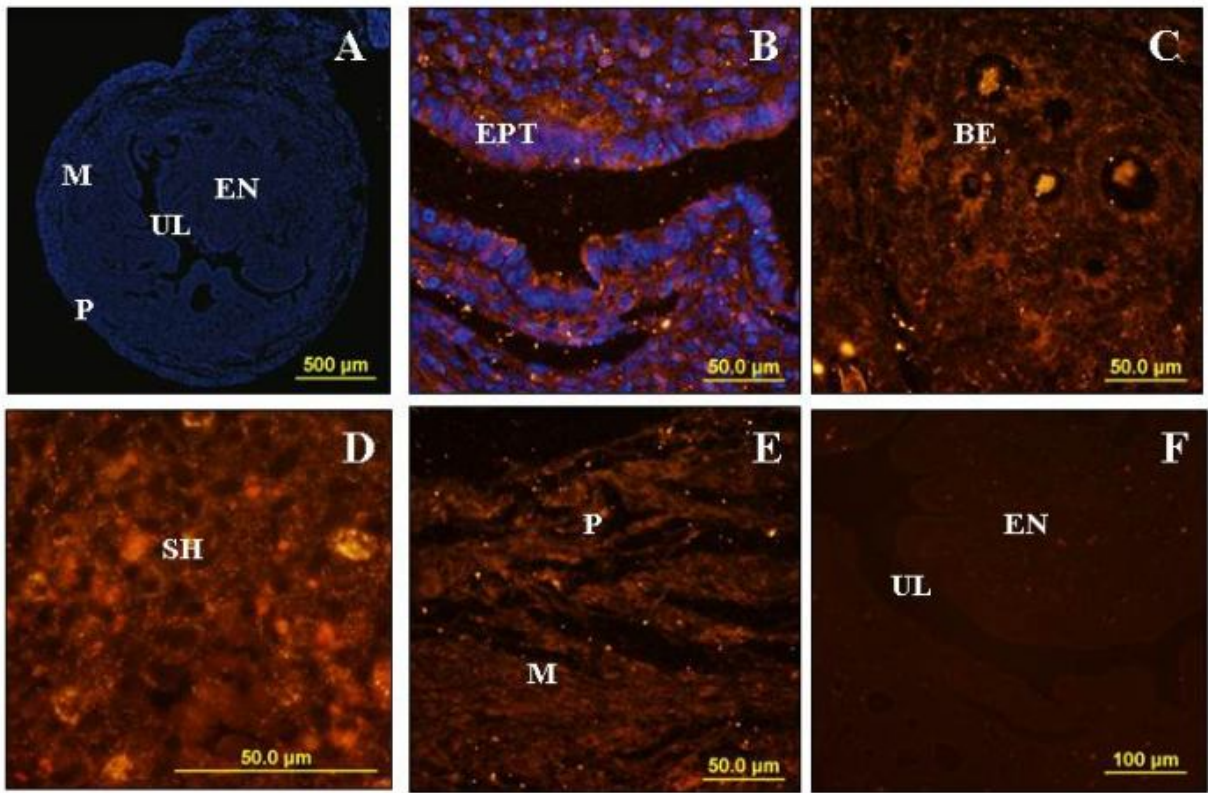
Şekil 4.2. Diöstrus evresinde Jag1'in immünelokalizasyonları (A, B, C). Negatif kontrol kesit (D) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



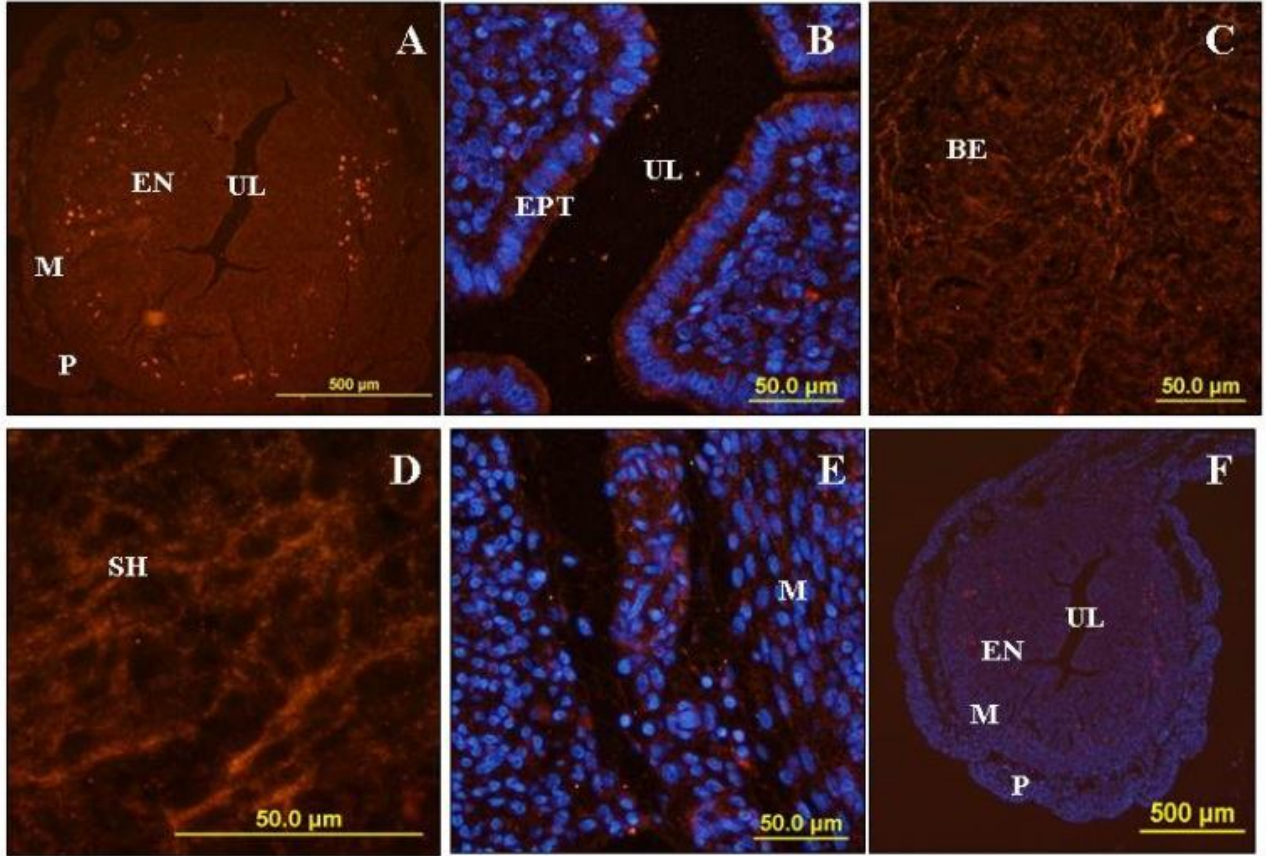
Şekil 4.3. Diöstrus evresinde Jag2'nin immünolokalizasyonları (A, B, C). Negatif kontrol kesit (D) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



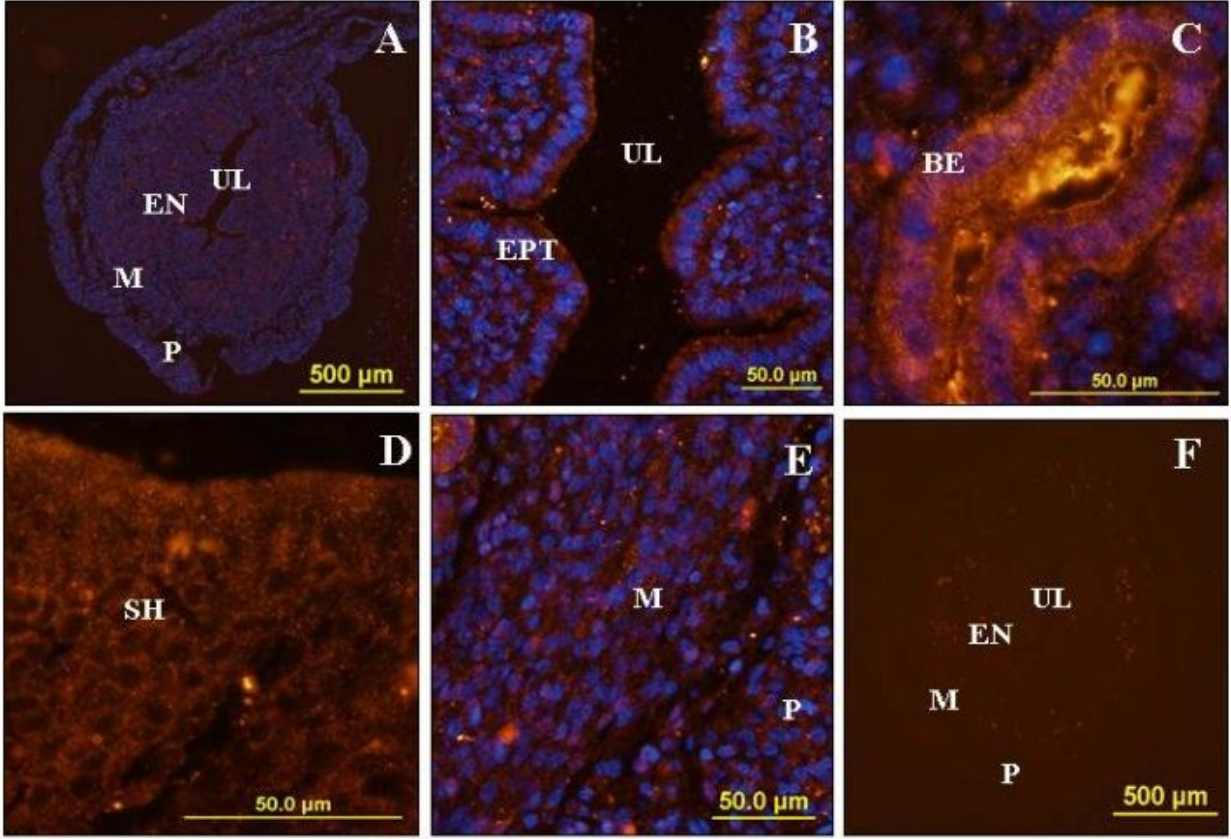
Şekil 4.4. Proöstrus evresinde Jag1'in immünolokalizasyonları. (A, B, C, D, E). Negatif kontrol kesit (F) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, SH; Stroma Hücresi, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



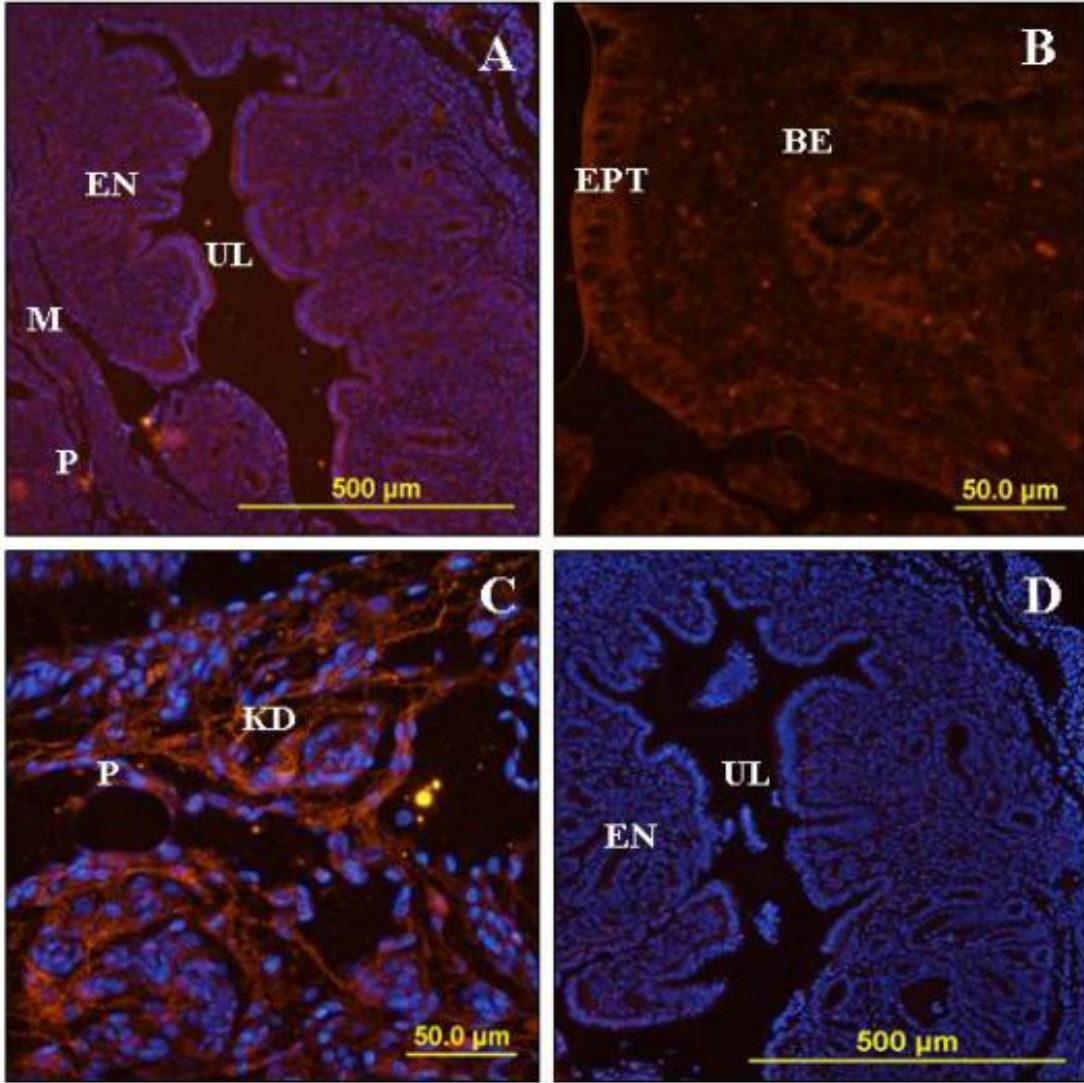
Şekil 4.5. Proöstrus evresinde Jag2'nin immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). Negatif kontrol kesit (F) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, SH; Stroma Hücresi, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



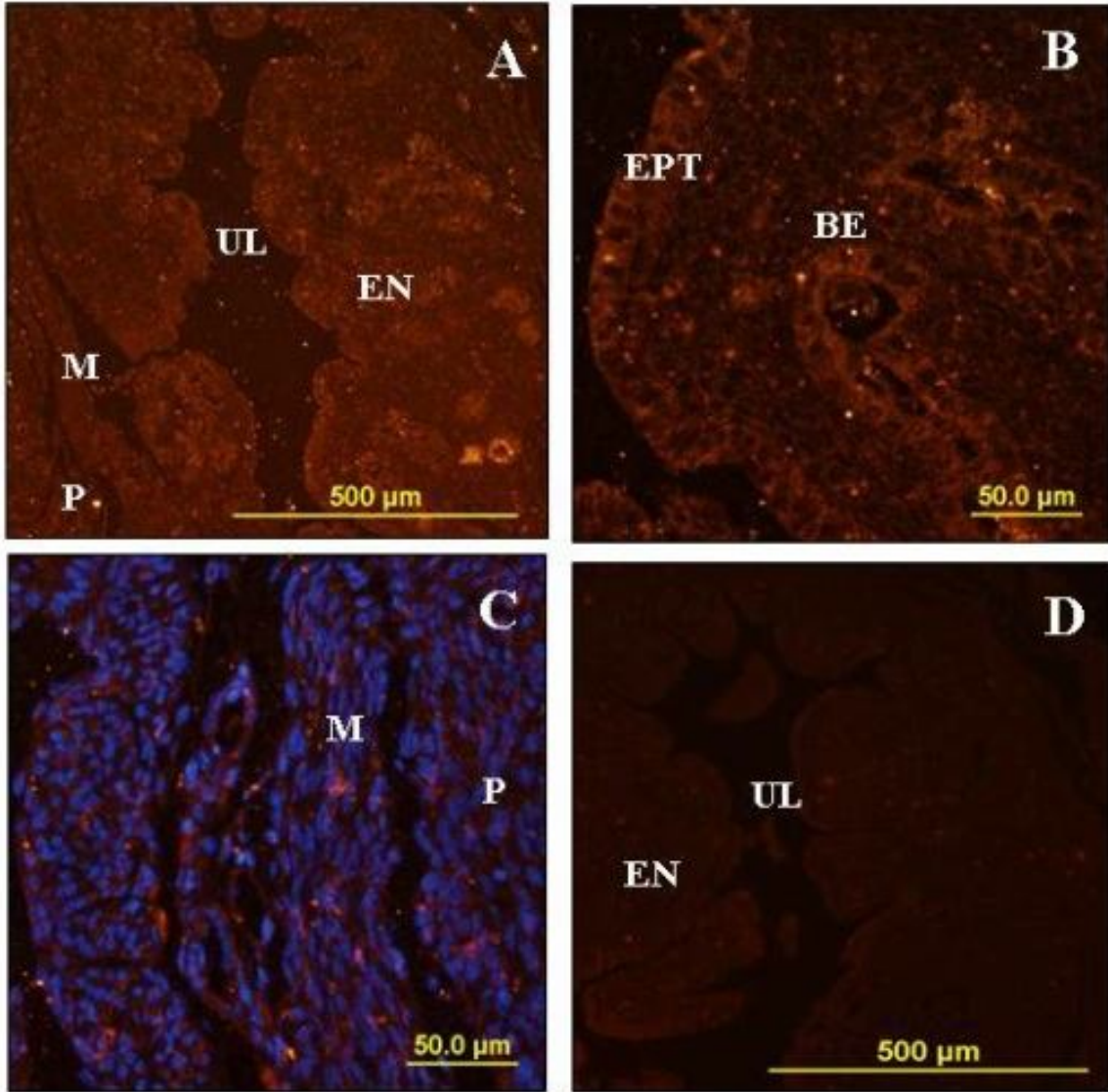
Şekil 4.6. Östrus evresinde Jag1'in immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). Negatif kontrol kesit (F) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, SH; Stroma Hücresi, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



Şekil 4.7. Östrus evresinde Jag2'nin immünolokalizasyonları (A, B, C, D, E). Negatif kontrol kesit (F) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, SH; Stroma Hücresi, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)



Şekil 4.8. Metöstrus evresinde Jag1'in immünolokalizasyonları. (A, B, C). Negatif kontrol kesit (D) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, KD:Kan Damarı, EN: Endometrium, M: Myometrium, P: Perimetrium)

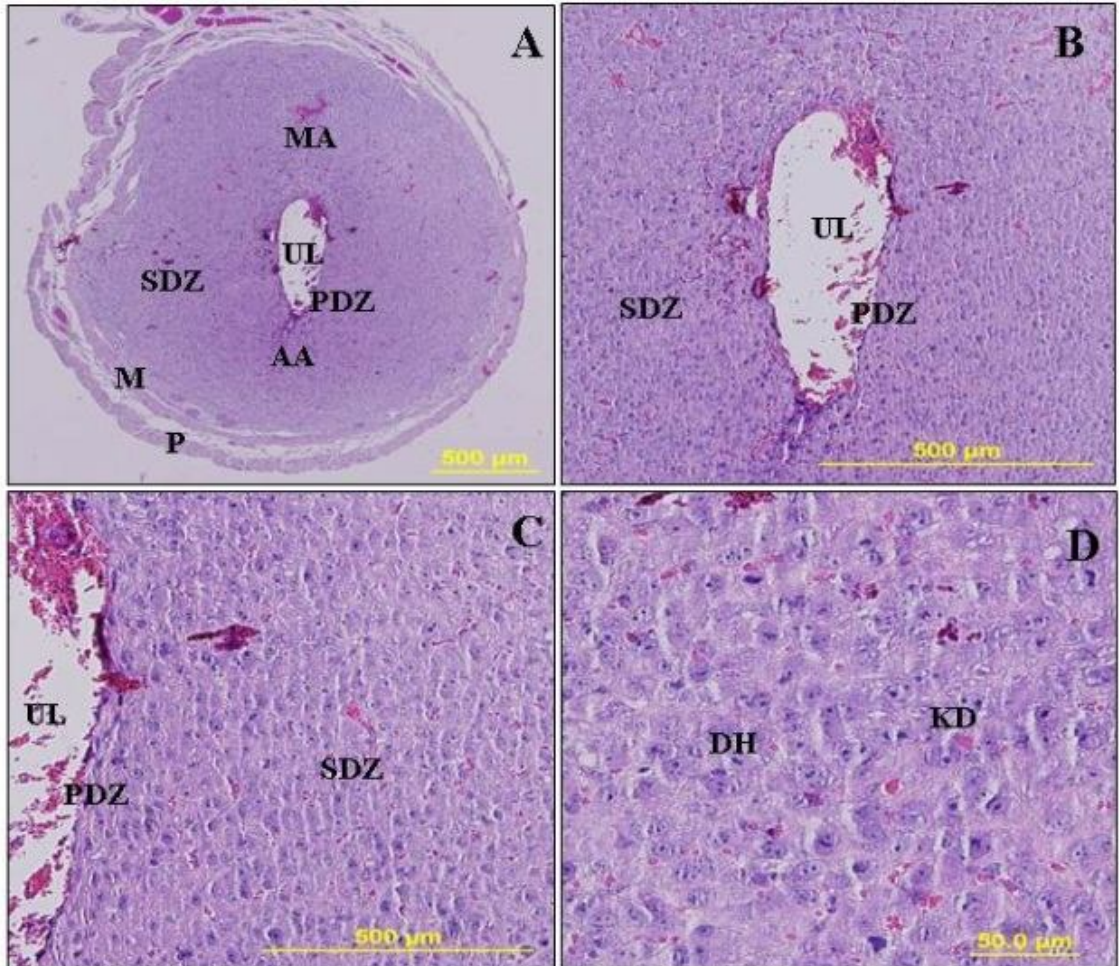


Şekil 4.9. Metöstrus evresinde Jag2'nin immünolokalizasyonları (A, B, C). Negatif kontrol kesit (D) (UL: Uterus Lümeni, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, EN: Endometrium, M: Myometrium, P

4. 2. Grup–2 Bulguları

4. 2. 1. Gebeliğin 5. Günü

Işık mikroskopi bulguları: Embriyonun yerleştiği antimezometrial alanda embriyonun bulunduğu boşluğu çevreleyen yassı çekirdekli, mekik şekilli küçük primer desidual hücreler izlendi. Myometriuma komşu kısımda yer alan kapsül yapısındaki fibroblastların yassı çekirdekli, mekik şekilli küçük predesidual hücelere farklılığı görüldü. Predesidual hücrelerin primer desiduayı çevreleyen büyük, poliploid sekonder desidua hücrelerine farklılığı görüldü. Desidual hücreler arasında kan damarlarının varlığı belirgindi. Mezometrial alandaki kan damarlarının antimezometrial alandan daha fazla genişlediği görüldü (Şekil 4.10. A-D).



Şekil 4.10. Gebeliğin 5.gününde ışık mikroskobik bulgular. (UL: Uterus Lümeni, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, DH: Desidual Hücre, KD: Kan Damarı, M: Myometrium, Perimetrium)

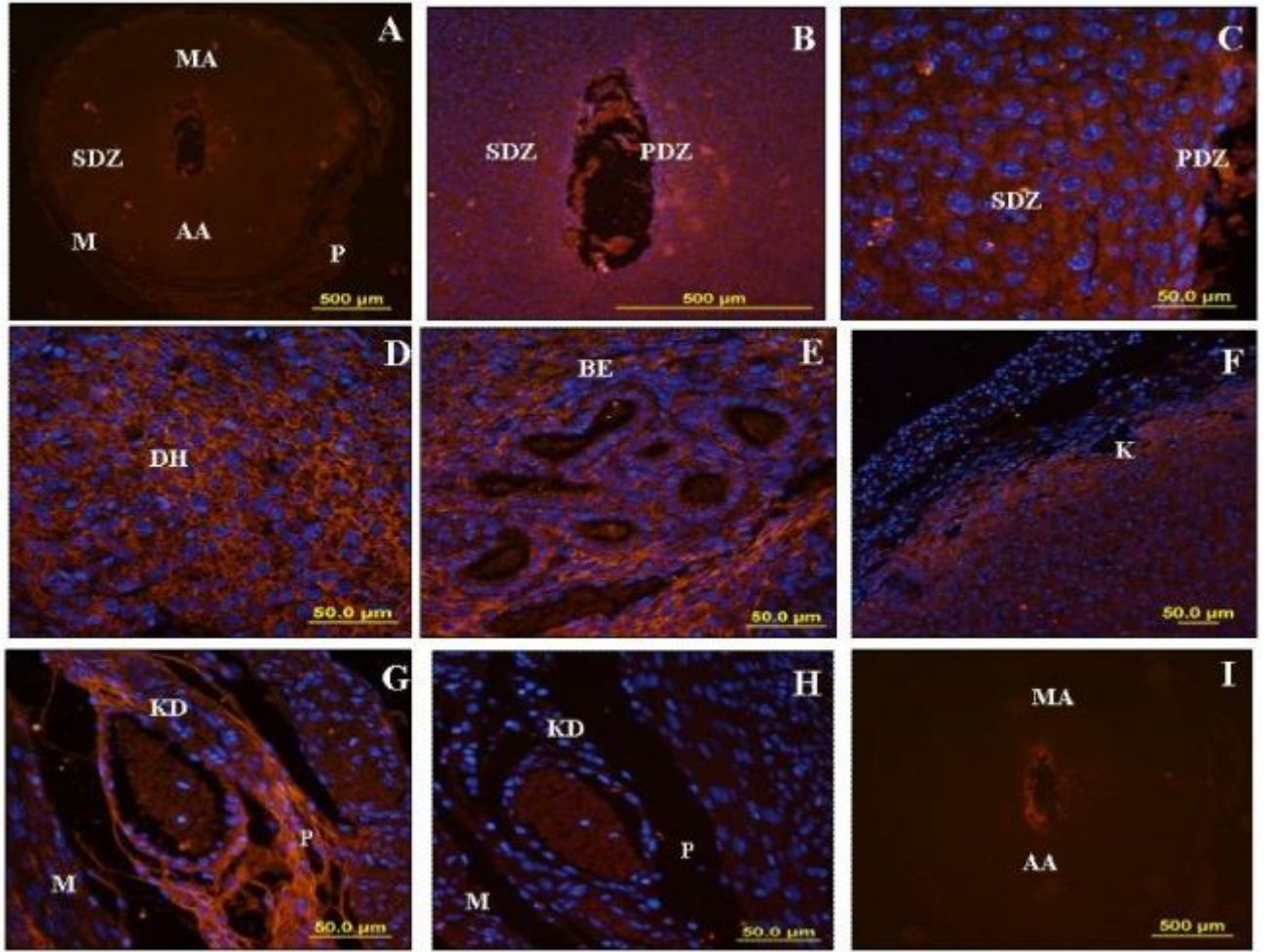
Gebeliğin 5. gününde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immüno lokalizasyonları
(Tablo 4.5. te ekspresyon eoldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Jagged1: Bez epitelinde orta derecede ekspresyon izlendi (Şekil 4.11. E). Endometriumun stromal hücrelerinin predesidual hücrelere farklı olduğu myometriuma komşu kapsül yapısının yüksek miktarda Jag1 ekspresyon ettiği görüldü (Şekil 4.11. F). Sekonder desidual hücrelerde, predesidual hücrelere göre daha az ekspresyon izlenirken, primer desidual hücrelerinin de sekonder desidualdan daha az olmak üzere yaklaşık olarak aynı derecede Jag1 ekspresyon ettiği görüldü (Şekil 4.11. A-D). Miyometrial düz kas hücrelerinde kuvvetli ekspresyon vardı (Şekil 4.11 G). Perimetrium tabakasında bulunan kan damarlarının endotelinde, bu damarları çevreleyen bağ doku hücrelerinde ve kas hücrelerinde çok kuvvetli ekspresyon izlendi (Şekil 4.11. G).

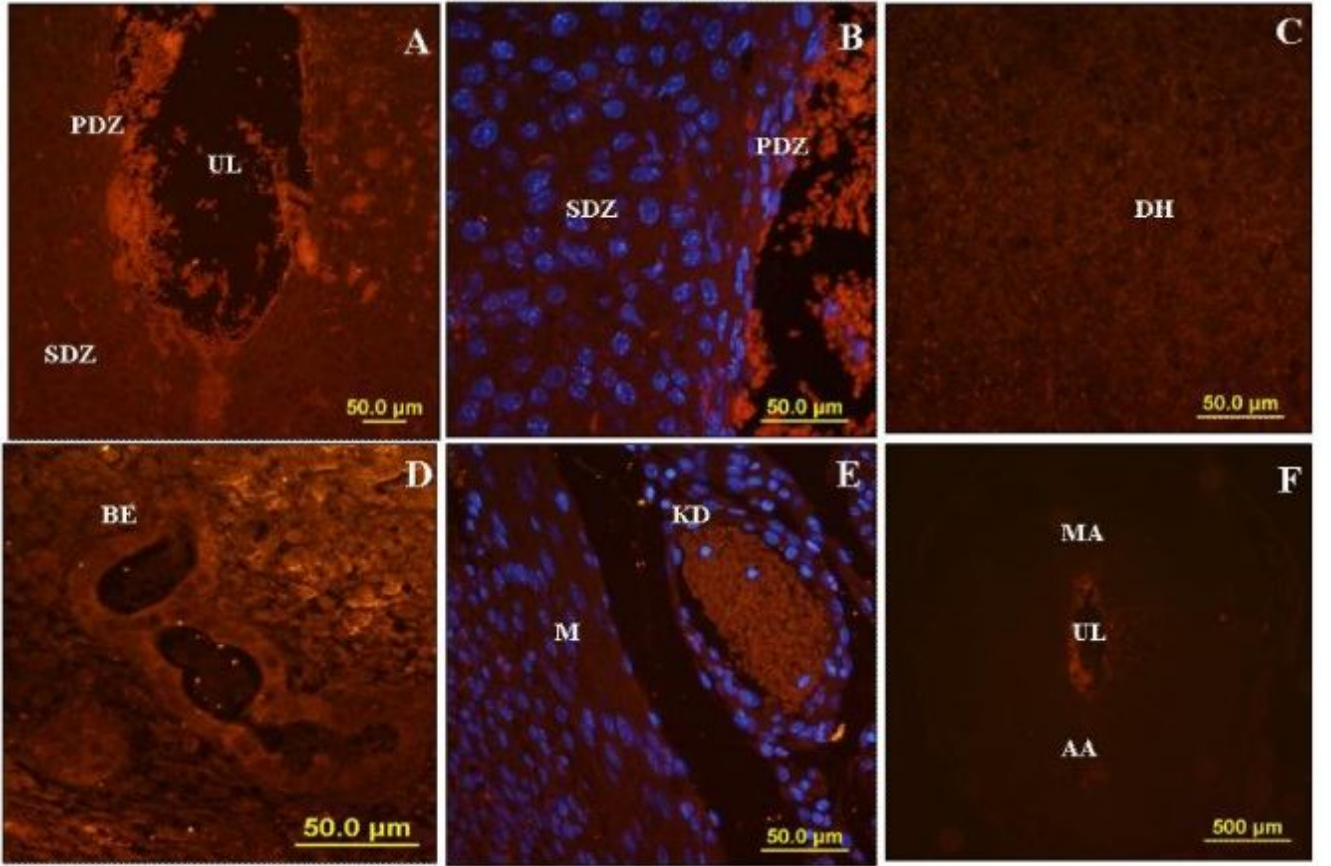
Jagged2: Bez epitelinde Jag1 ile benzer şekilde orta derecede Jag2 immüno lokalizasyonu vardı (Şekil 4.12. D). Primer ve sekonder desidual bölgelerinde Jag1'e göre Jag2 ekspresyonu daha zayıftı (Şekil 4.12. A-C). Miyometrial düz kas hücrelerinde ve perimetrium tabakasında ekspresyon yoktu (Şekil 4.12. E).

Tablo 4. 5. Gebeliğin 5. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları

E5	Jagged1	Jagged2
Bezler	++	++
Primer Desidual Zon	++	+
Sekonder Desidual Zon	++	+
Kapsül	+++	+++
Myometrium	+++	0
Perimetrium	+++	0



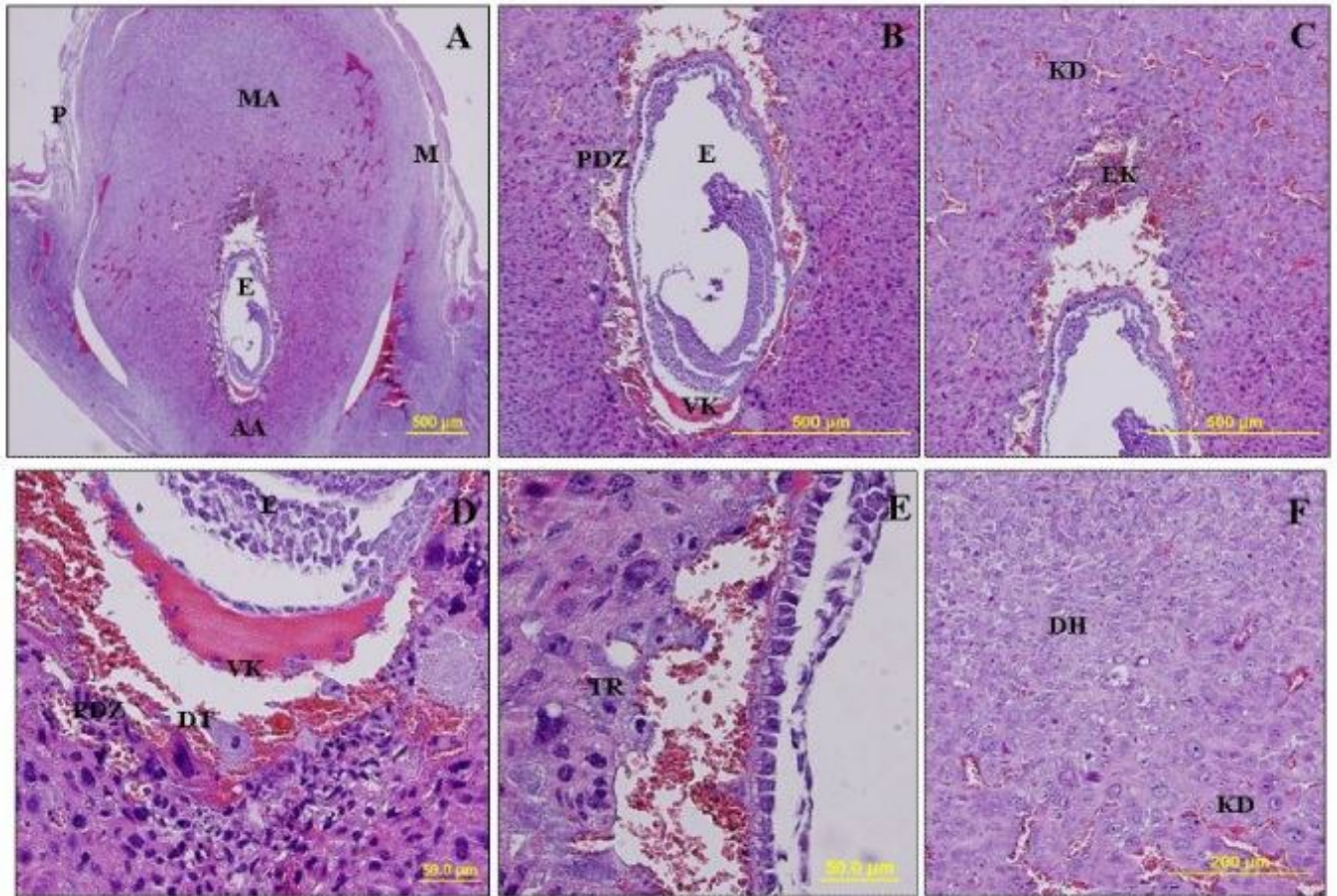
Şekil 4.11. Gebeliğin 5.gününde Jag1'in immüno lokalizasyonu. (A, B, C, D, E, F, G). Negatif kontrol kesit (H-I) (UL: Uterus Lümeni, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, DH: Desidual Hücre, KD: Kan Damarı, BE: Bez Epiteli, K: Kapsül, M: Myometrium, Perimetrium)



Şekil 4.12. Gebeliğin 5.gününde Jag2'nin immünolokalizasyonu (A, B, C, D). Negatif kontrol kesit (E-F) (UL: Uterus Lümeni, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, DH: Desidual Hücre, KD: Kan Damarı, BE: Bez Epiteli, M: Myometrium, Perimetrium)

4. 2. 2. Gebeliğin 7. Günü

Işık Mikroskopi Bulguları; Antimezometrial alanda gelişen embriyonun varlığı izlendi. Embriyoyu çevreleyen poliploid, iri çekirdekli trofoblast hücrelerinin yassı çekirdekli, iğ şekilli primer desidual hücreler arasına invaze olduğu ve burada bulunan kan damarları ile ilişki kurduğu gözlemlendi. Dev trofoblast hücrelerinin bu günde oluştuğu izlendi. Antimezometrial alanda vitellus kesesi oluşumu başlamıştı. Mezometrial alanda ekto plasental koni yapısının şekillenmişti. Myometriuma komşu kapsül yapısında endometrial stromanın pre-desidual hücrelere farklılığı gözlemlendi. Sekonder desidual hücrelerin varlığı belirgindi. Mezometrial desiduanın antimezometrial desiduaya göre daha erken gelişim safhasında olduğu ve buradaki kan damarlarının daha fazla genişlediği gözlemlendi (Şekil 4.13. A-F).



Şekil 4.13. Gebeliğin 7.gününde ışık mikroskobik bulgular. (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, DH: Desidual Hücre, KD: Kan Damarı, DT: Dev Trofoblast, TR: Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, EK: Ekto plasental Koni, M: Myometrium, Perimetrium)

Gebeliğin 7. gününde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immüno lokalizasyonları

(Tablo 4.6 da ekspresse oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

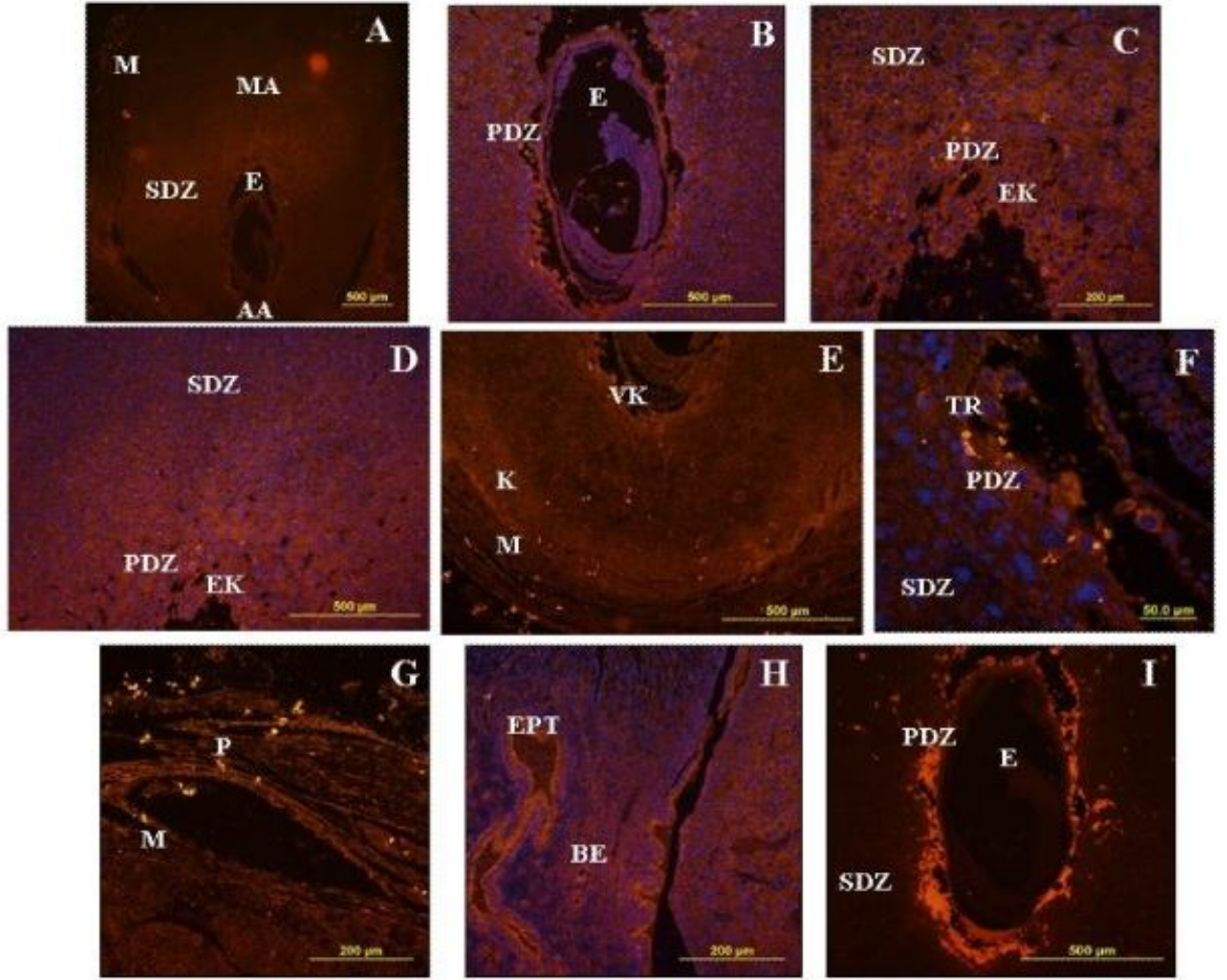
Jagged1: Ektoplasental koni hücrelerinde çok kuvvetli Jag1 ekspresyonu izlendi (Şekil 4.14. C-D). Embriyoyu çevreleyen trofoblast hücrelerinde de kuvvetli Jag1 lokalizasyonu görüldü (Şekil 4.14. F). Primer desidua hücrelerinin sekonder desidua hücrelerine göre daha az Jag1 ekspresse ettiği gözlemlendi (Şekil 4.14. A-D). Myometriuma komşu kapsül yapısının sekonder desiduanın belirgin bir şekilde daha fazla Jag1 ekspresse ettiği görüldü (Şekil 4.14. E). Desidual kan damarlarında da çok kuvvetli ekspresyon izlendi. Myometriuma orta derecede immüno lokalizasyon görüldü (Şekil 4.14. G). Perimetrium ve buradaki kan damarlarının, interimplantasyon alanındaki epitel ve bez hücrelerinin de kuvvetli Jag1 ekspresse ettiği izlendi (Şekil 4.14. G-H).

Jagged2: Ektoplasental koni hücrelerinde ve embriyoyu çevreleyen trofoblast hücrelerinde çok kuvvetli Jag2 ekspresyonu görüldü (Şekil 4.15. A-D). Primer desidua hücreleri sekonder desidua hücrelerine göre daha az Jag2 ekspresyonu gösterdiler (Şekil 4.15. B, D). Myometriuma komşu kapsül yapısının sekonder desiduanın belirgin bir şekilde daha fazla Jag2 ekspresse ettiği izlendi. Desidual kan damarlarında da çok kuvvetli lokalizasyon vardı (Şekil 4.15. D-E). Myometriuma orta derecede ekspresyon görüldü. Perimetrium ve burada yer alan kan damarlarının Jag2'ye göre daha fazla Jag2 ekspresse ettikleri görüldü. (Şekil 4.15. G). İnterimplantasyon alanındaki epitel ve bez hücrelerinde de kuvvetli Jag2 lokalizasyonu vardı (Şekil 4.15. H).

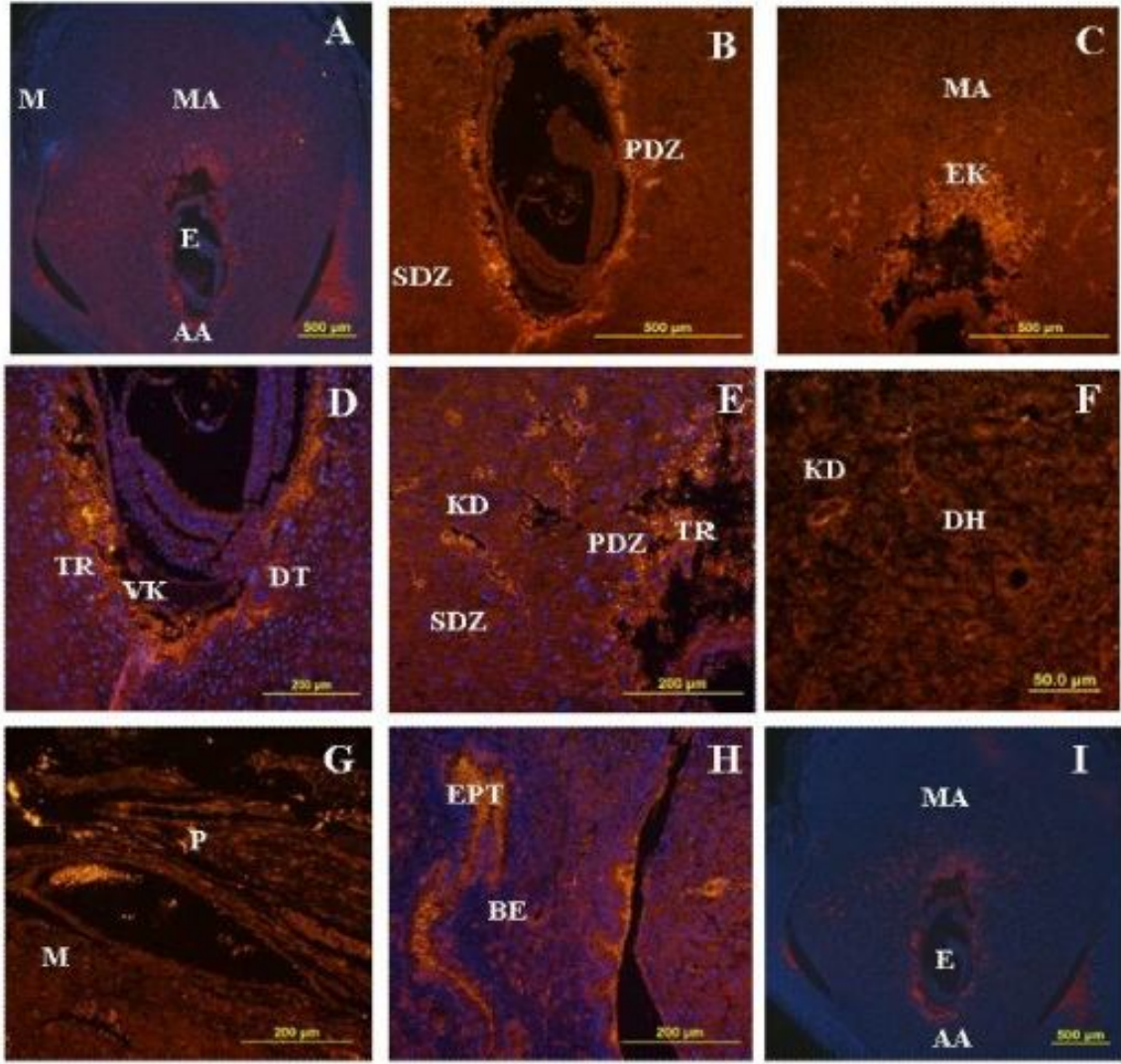
Caspase9: Trofoblast hücreleri ile ilişkide olan bazı primer desidua hücrelerinin çok kuvvetli caspase9 ekspresse ettikleri görüldü (Şekil 4.16. A-C).

Tablo 4. 6. Gebeliğin 7. gününde Jagged1, Jagged2 ve Caspase9'un immüno lokalizasyonlar

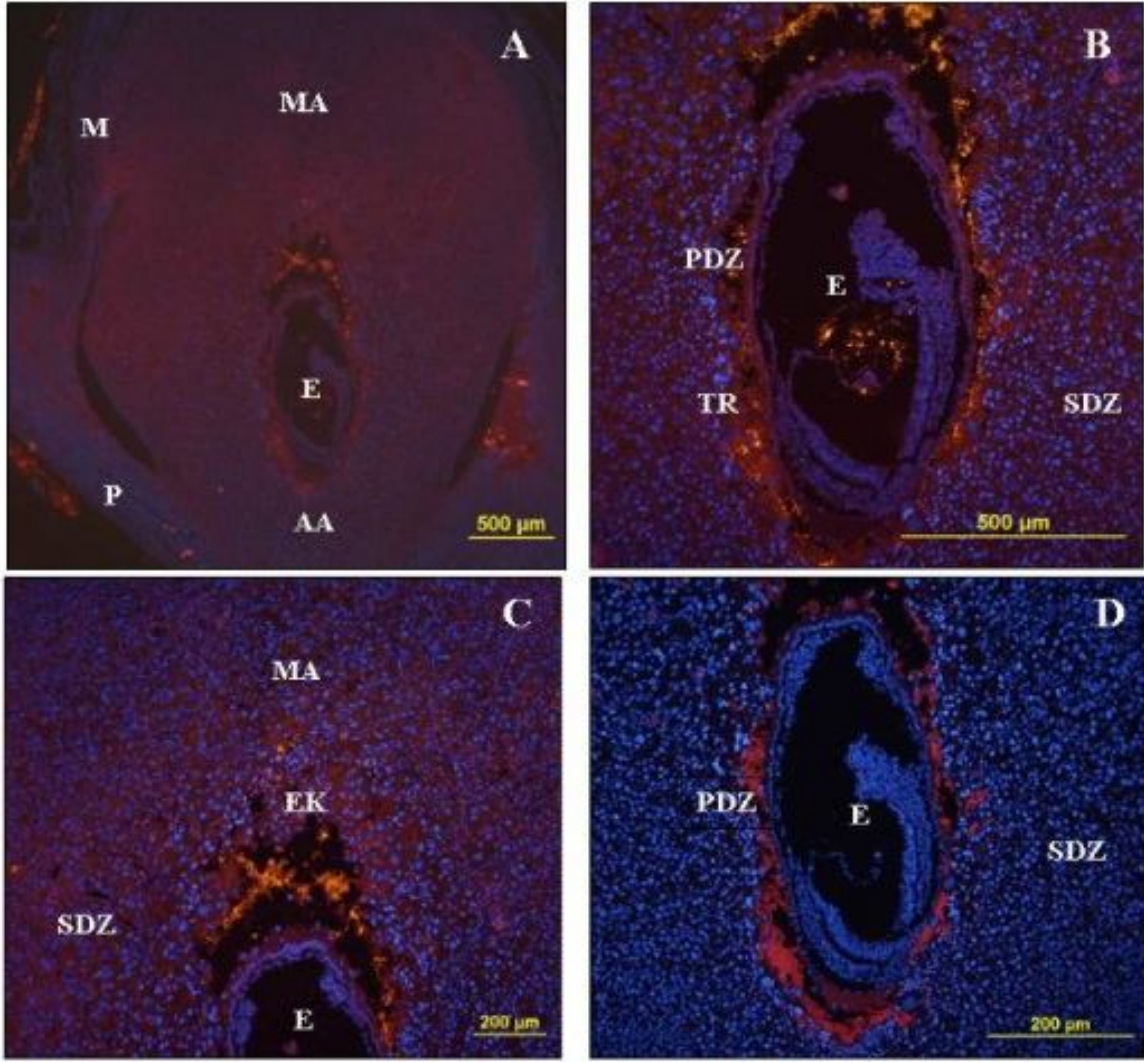
E7	Jagged1	Jagged2	Caspase9
Ektoplasental Koni	++++	++++	+++
Trofoblast Hücreleri	+++	+++	++++
Primer Desidual Zon	++	++	
Sekonder Desidual Zon	+++	+++	
Kapsül	++++	++++	
Desidual Kan Damarı	++++	++++	
Myometrium	++	++	
Perimetrium	++++	+++	
İnteimplantasyon Epitel	++++	++++	
İnterimplantasyon Bez	++++	++++	



Şekil 4.14. Gebeliğin 7.gününde Jag1'in immünolokalizasyonu (A, B, C, D, E, F, G, H). Negatif kontrol kesit (I) (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, TR: Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, EK: Ektoplasental Koni, K: Kapsül, M: Myometrium)



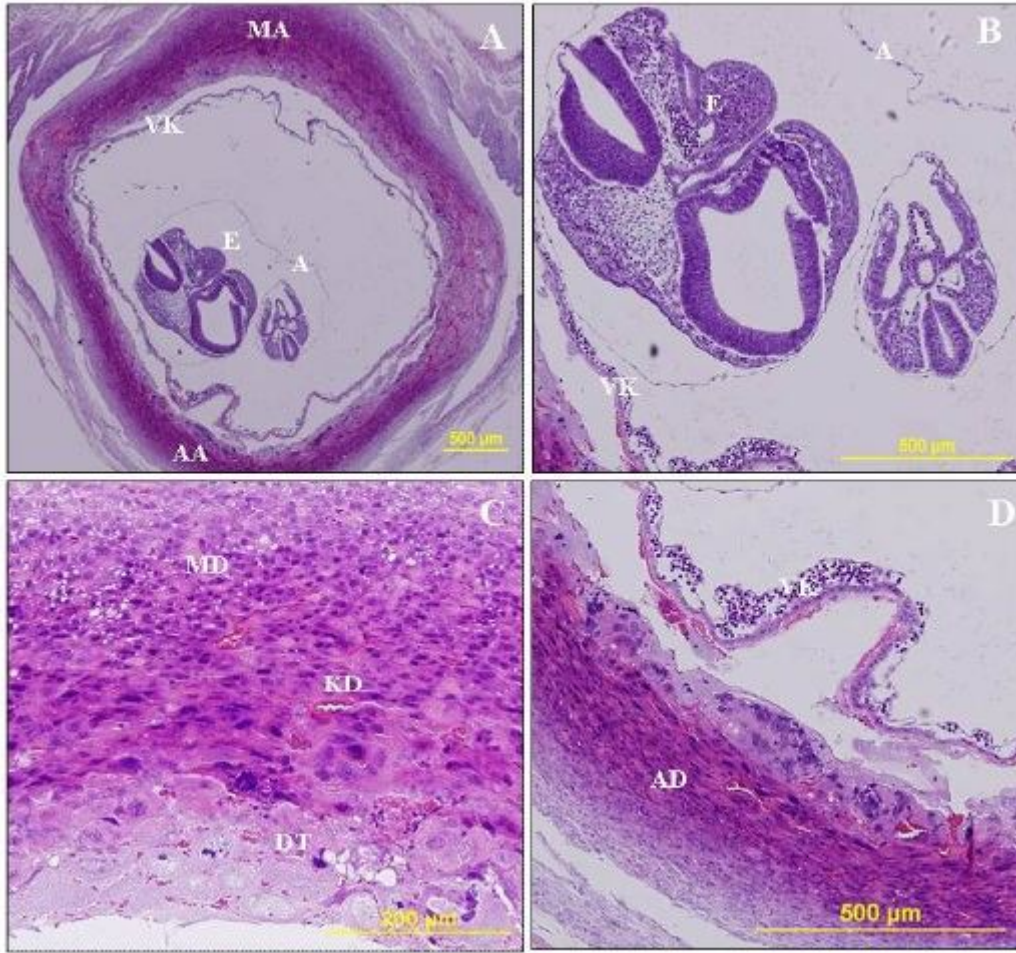
Şekil 4.15. Gebeliğin 7.gününde Jag2'nin immüno lokalizasyonu (A, B, C, D, E, F, G). Negatif kontrol kesit (H) (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, DH: Desidual Hücre, KD: Kan Damarı, DT: Dev Trofoblast, TR: Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, EK: Ektoplasental Koni, M: Myometrium)



Şekil 4.16. Gebeliğin 7.gününde Caspase9'un immünolokalizasyonu (A, B, C). Negatif kontrol kesit (D) (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometrial Alan, PDZ: Primer Desidual Zon, SDZ: Sekonder Desidual Zon, TR: Trofoblast, EK: Ektoplasental Koni, M: Myometrium, P: Perimetrium)

4.2.3. Gebeliğin 9. Günü

Işık Mikroskopi Bulguları: Gebeliğin bu döneminde plasentanın desidual hücreleri içeren maternal ve ok çekirdekli dev trofoblast hücreleri içeren fetal plasentadan oluştuğu gözlemlendi. Dev trofoblast hücrelerinin arasında ve maternal plasentada genişlemiş kan damarları vardı. Embriyoyu çevreleyen amnion zarının bir bazal membran üzerine oturmuş tek katlı yassı hücrelerden oluşan katlantılı bir yapıda olduğu gözlemlendi. Vitellus kesesinin endoderm hücrelerinden ve mezotelden oluştuğu ve burada yer alan kan damarları içerisinde hematopoetik hücrelerin varlığı görüldü (Şekil 4.17. A-D).



Şekil 4.17. Gebeliğin 9.gününde ışık mikroskobik bulgular. (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometiral Alan, MD: Mezometrial Desidua, AD: Antimezometrial Desidua, DT: Dev Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, A: Amnion, KD: Kan Damarı)

Gebeliğin 9. gününde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immüno lokalizasyonları

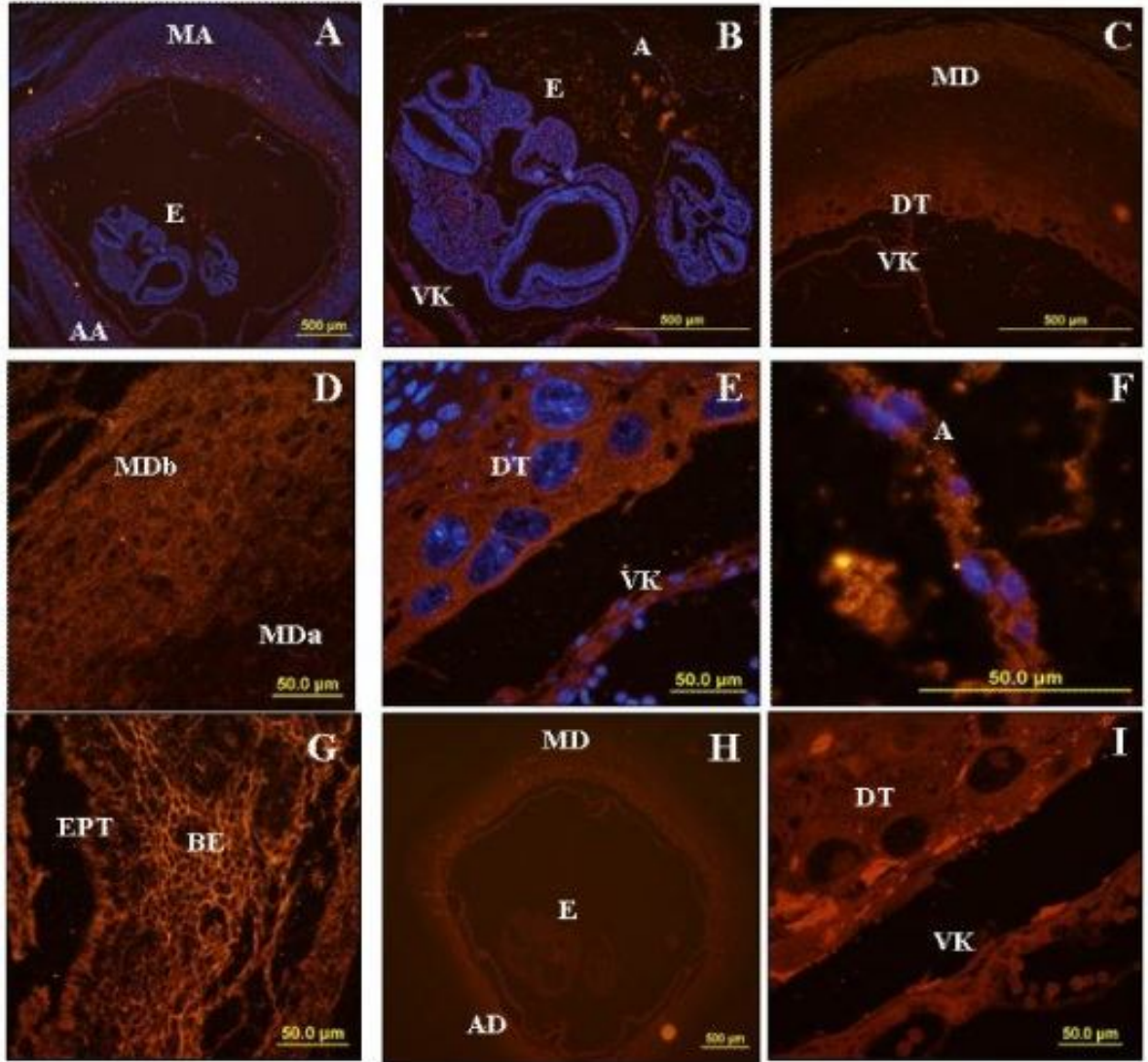
(Tablo 4.7 de ekspresyon oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Jagged1: Embriyoyu çevreleyen amnion zarında ve vitellus kesesinde kuvvetli ekspresyon mevcuttu (Şekil 4.18. A-C, E-F). Ayrıca fetal plasentanın dev trofoblast hücrelerinde de Jag1'in çok kuvvetli ekspresyon edildiği gözlemlendi (Şekil 4.18. E). Maternal plasentanın bazal kısımlarında orta derecede lokalizasyon görülürken, apikalinde ekspresyon yoktu (Şekil 4.18. D). Mezometrial alanda yer alan bezlerde ekspresyon olmadığı, bezleri çevreleyen stromada ise bunun kuvvetli olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18. G). Stromada gebeliğin 5. günündeki bezler ile karşılaştırıldığında daha kuvvetli ekspresyon izlendi (Şekil 4.18. G). Bu alanda yer alan kan damarı endotelinde gebeliğin 5. ve 7. günlerinde olduğu gibi kuvvetli ekspresyon görüldü.

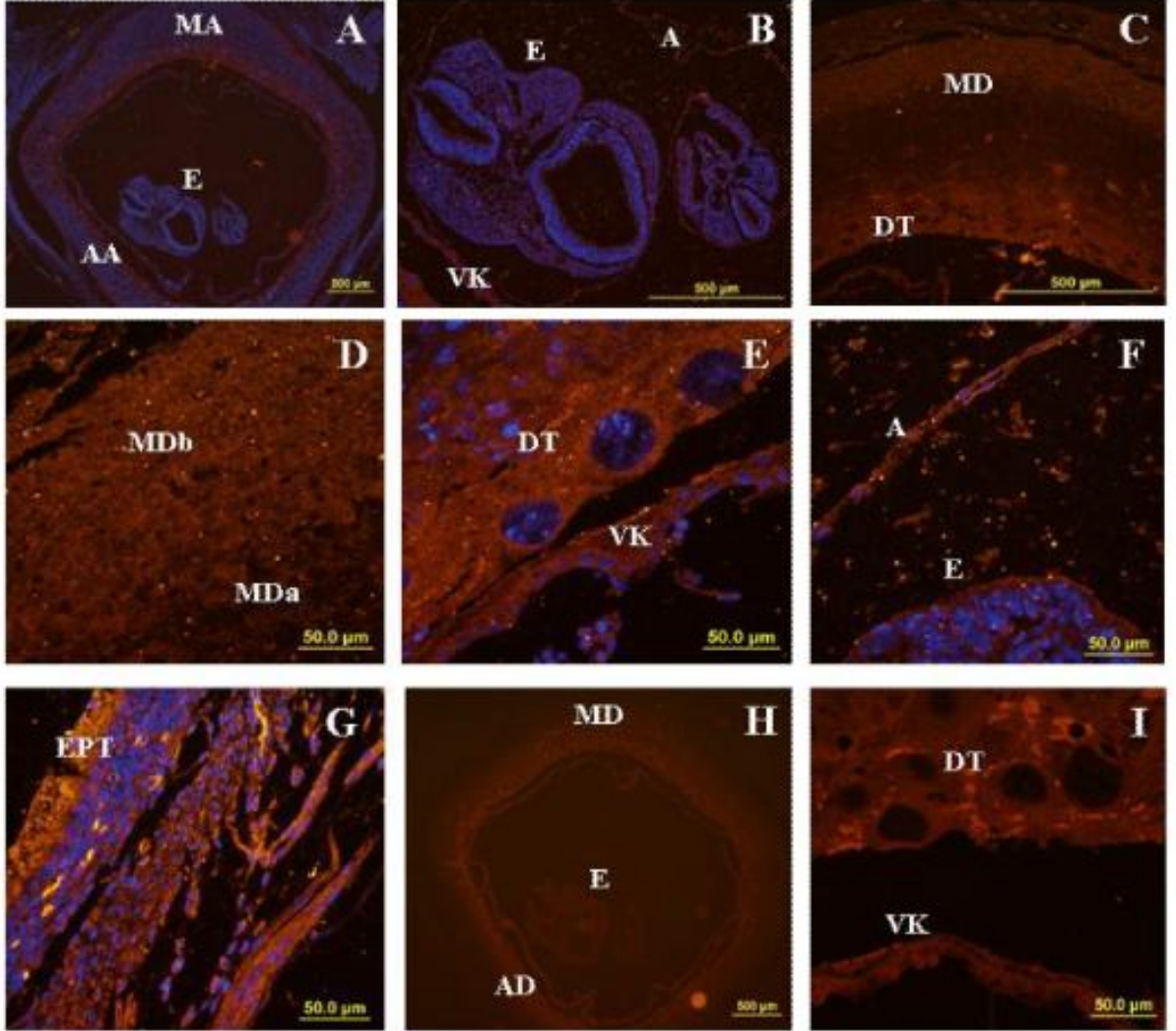
Jagged2: Amniyon zarında, vitellus kesesinde ve dev trofoblast hücrelerinde Jag1'de olduğu gibi çok kuvvetli yerleşim mevcuttu (Şekil 4.19. A-B, E, F). Maternal plasentanın bazal kısımlarında orta derecede ekspresyon izlenirken, üst kısımlarında ekspresyon yoktu (Şekil 4.19. C-D). Mezometrial alandaki bezlerde immüno lokalizasyon görülmezken, stromada kuvvetli ekspresyon izlendi (Şekil 4.19. G). Ayrıca Jag1 ile karşılaştırıldığında ekspresyonun daha kuvvetli olduğu görüldü. Bu alanda yer alan kan damarı endotelinde gebeliğin 5. ve 7. günlerinde olduğu gibi kuvvetli lokalizasyon vardı.

Tablo 4. 7. Gebeliğin 9. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları

E9	Jagged1	Jagged2
Amniyon	+++	+++
Vitellus Kesesi	+++	+++
Dev Trofoblast	+++	+++
Maternal Plasenta Bazalis	++	++
Maternal Plasenta Apikalis	0	0
Myometrium	+++	+++
Perimetrium	+++	+++
İnterimplantasyon Epitel	+++	+++
İnterimplantasyon Stoma	+++++	+++++
İnterimplantasyon Bez	0	0



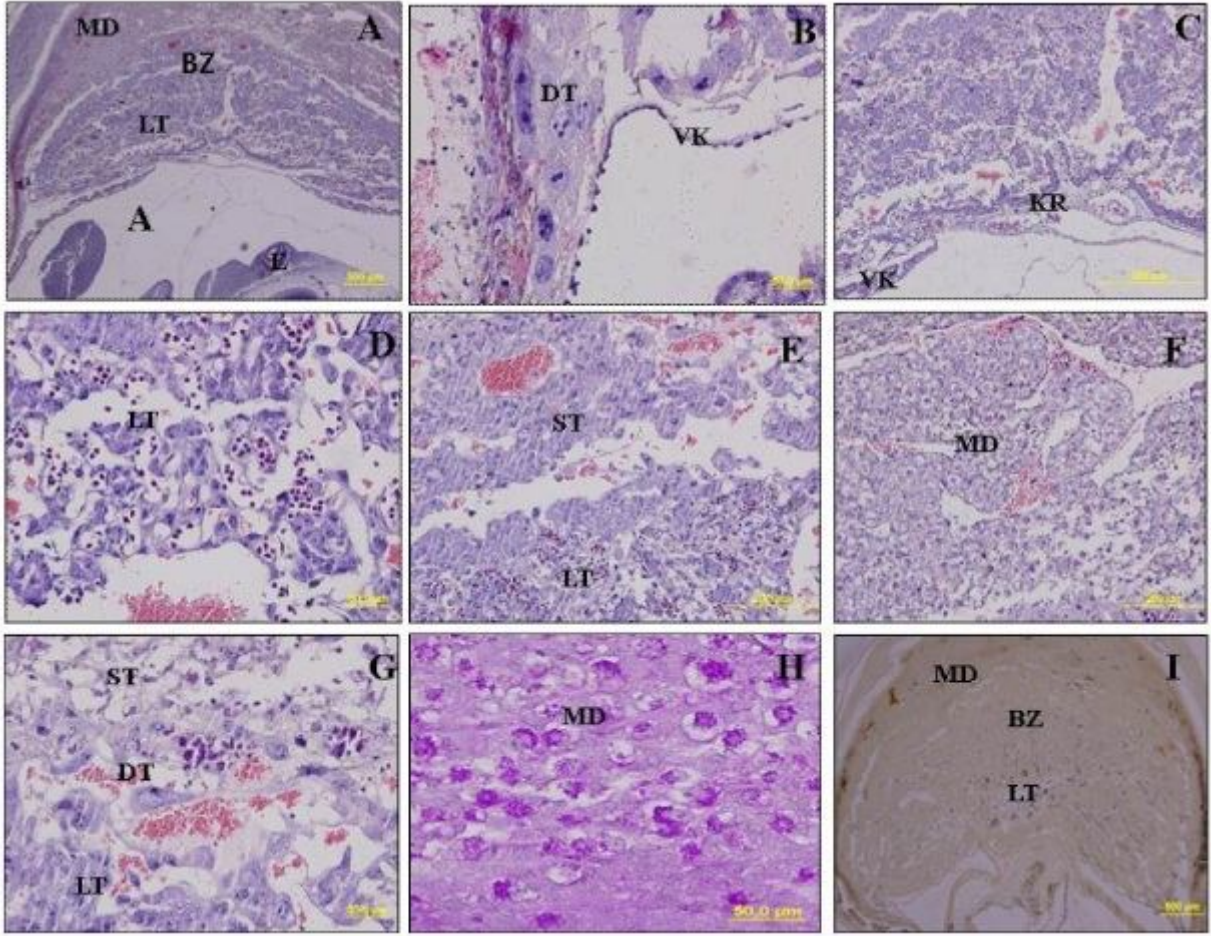
Şekil 4.18. Gebeliğin 9.gününde Jag1'in immünolokalizasyonu (A, B, C, D, E, F, G). Negatif kontrol kesit (H-I) (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometiral Alan, MD: Mezometrial Desidua, MDb: Materna Desidua Bazalis, Mda: Maternal Desiduaapikalis, AD: Antimezometrial Desidua, DT: Dev Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, A: Amniyon, KD: Kan Damarı, EPT: Epitel, BE: Bez Epiteli)



Şekil 4.19. Gebeliğin 9.gününde Jag2'nin immünolokalizasyonu (A, B, C, D, E, F, G). Negatif kontrol kesit (H-I) (E: Embriyo, MA: Mezometrial Alan, AA: Antimezometiral Alan, MD: Mezometrial Desidua, MDb: Maternal Desidua Bazalis, Mda: Maternal Desiduaapikalis, AD: Antimezometrial Desidua, DT: Dev Trofoblast, VK: Vitellus Kesesi, A: Amniyon, KD: Kan Damarı, EPT: Epitel)

4. 2. 4. Gebeliğin 11. Günü

Işık Mikroskopi Bulguları: Gebeliğin bu döneminde plasentanın labirent tabakası, spongiotorofoblast ve trofoblast dev hücrelerinden oluşan bağlantı zonu ve maternal desidua yapısından oluşan tam gelişmiş bir plasenta yapısında olduğu gözlemlendi. Labirent tabakasında anne ile fetüs arasında madde alışverişini sağlayan, fetüs kaynaklı trofoblast hücrelerinin maternal kaynaklı endotellerin yerini alan yeni bir damar yapısının oluştuğu görüldü. Spongiyotrofoblast tabakasının üzerinde, plasentanın maternal ve fetal kısımlarını ayıran trofoblast dev hücrelerinin varlığı belirgindi. Maternal desiduanın iri, poliploid olgun desidual hücrelerden oluştuğu gözlemlendi. Dev trofoblast hücrelerinin arasında ve maternal plasentada genişlemiş kan damarları mevcuttu. Embriyoyu çevreleyen amnion zarının bir bazal membran üzerine oturmuş tek katlı yassı hücrelerden oluşan katlantılı bir yapıda olduğu gözlemlendi. Vitellus kesesinin endoderm hücreleri ve mezotelden oluştuğu ve burada yer alan kan damarları içerisinde hematopoetik hücrelerin yer aldığı görüldü. Labirent tabakasının hemen altında ise koryon yapısının varlığı belirgindi (Şekil 4.19).



Şekil 4.20. Gebeliğin 11.gününde ışık mikroskopik bulgular, Hematoksilen-Ezoin: A-G, PAS: H, Gümüşleme: I (E: Embriyo, MD: Maternal Desidua, BZ: Bağlantı Zonu, ST: Spongiotrofoblast, DT: Dev Trofoblast, LT: Labirent Tabakası, VK: Vitellus Kesesi, A: Amniyon)

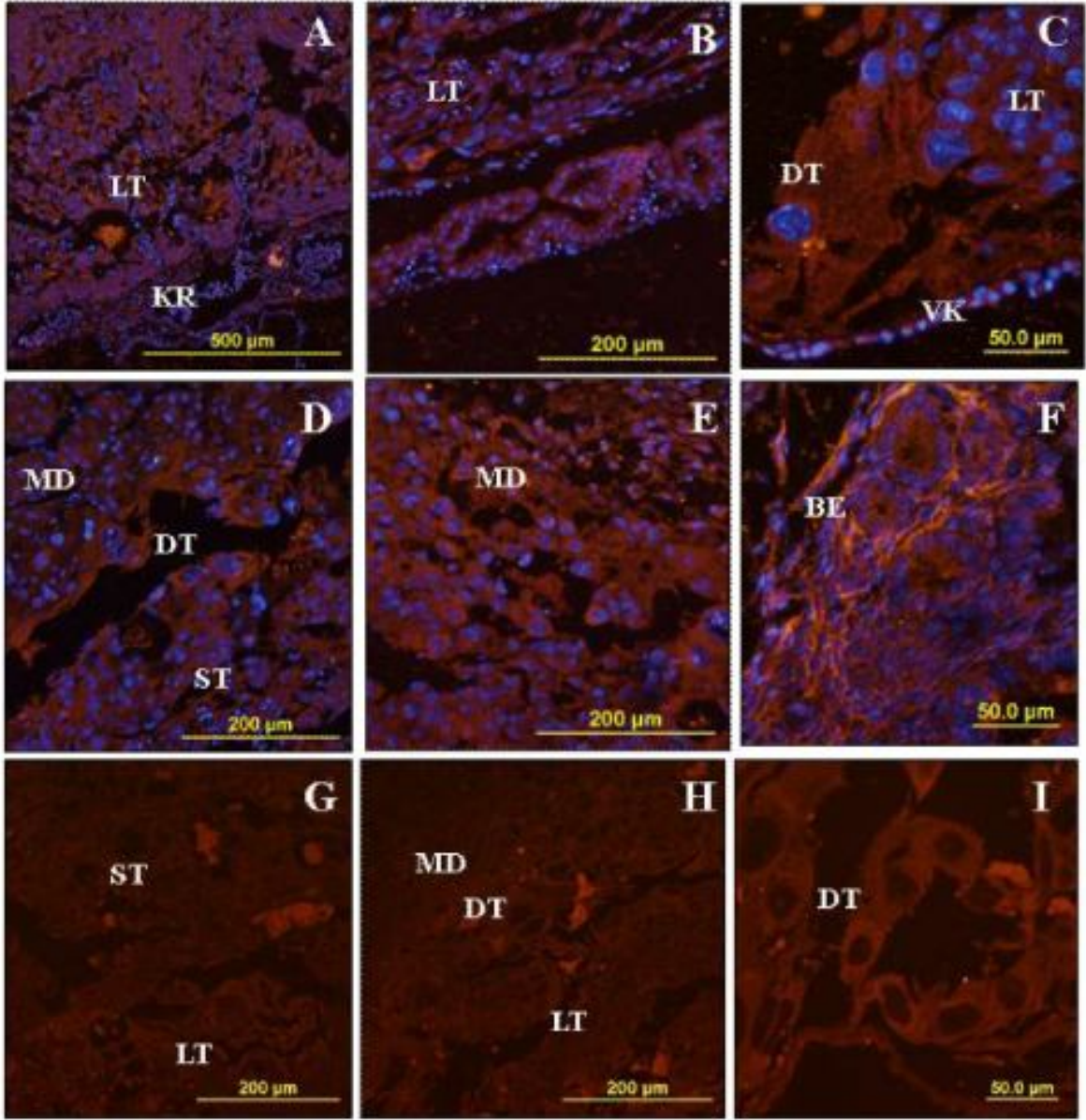
Gebeliğin 11. gününde Notch ligand Jagged1 ve Jagged2 immüno lokalizasyonları
(Tablo 4.7 de ekspresyon oldukları lokalizasyonlar gösterilmiştir)

Jagged1: Koryon ve plasentanın labirent tabakasında orta derecede Jag1 ekspresyonu izlendi (Şekil 4.20. A-B). Plasentanın orta bağlantı bölgesindeki spongiotrofoblast tabakası hücrelerinde orta derecede, dev trofoblast hücrelerinde ise daha güçlü lokalizasyon vardı (Şekil 4.20. C-D). Maternal desidua hücrelerinde de orta derecede ekspresyon gözlemlendi (Şekil 4.20. D-E). İnterimplantasyon alanındaki bezlerde ekspresyon görülmezken, bezleri çevreleyen stroma hücrelerinde gebeliğin 9. gününde olduğu gibi kuvvetli ekspresyon izlendi (Şekil 4.20. F).

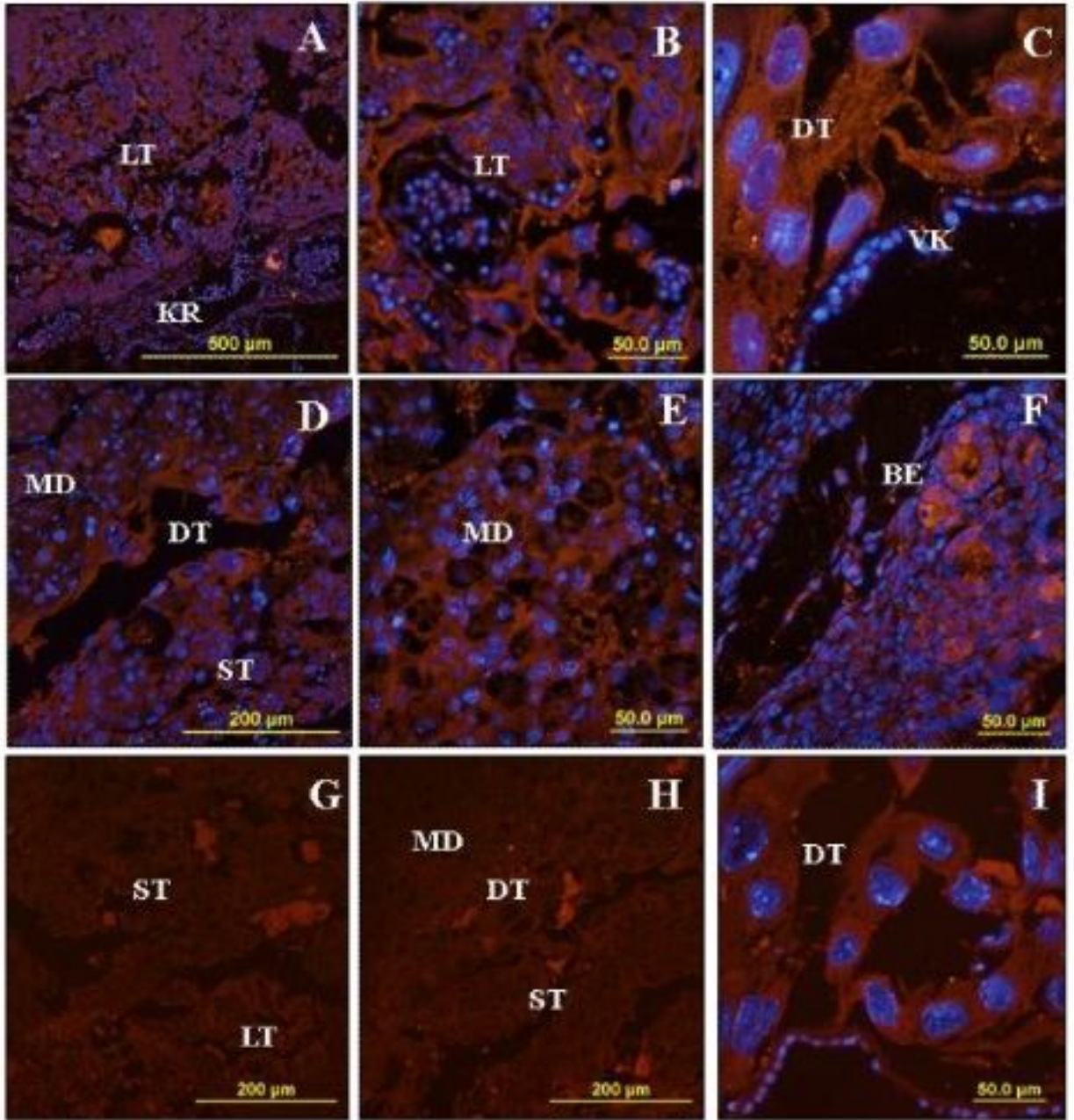
Jagged2: Koryon ve plasentanın labirent tabakasında Jag1 ile karşılaştırıldığında daha güçlü immüno lokalizasyon gözlemlendi (Şekil 4.21. A-B). Plasentanın orta bağlantı bölgesindeki spongiotrofoblast tabakası hücrelerinde orta derecede, dev trofoblast hücrelerinde ise kuvvetli ekspresyon vardı (Şekil 4.21. C-D). Maternal desidua hücrelerinde de orta derecede lokalizasyon görüldü (Şekil 4.21. D-E). İnterimplantasyon alanındaki bezlerde ekspresyon görülmezken, bezleri çevreleyen stromada bu daha zayıftı (Şekil 4.21. F).

Tablo 4. 8. Gebeliğin 9. gününde Jagged1 ve Jagged2'nin immüno lokalizasyonları

E11	Jagged1	Jagged2
Koryon	++	+++
Labirent Tabakası	++	+++
Spongiotrofoblast Tabakası	++	++
Dev Trofoblast	+++	+++
Maternal Desidua	++	++
İnterimplantasyon Stoma	+++	+
İnterimplantasyon Bez	0	+++



Şekil 4.21. Gebeliğin 11.gününde Jag1'in immünolokalizasyonu (A, B, C, D, E, F). Negatif kontrol kesit (G, H, I) (MD: Maternal Desidua, ST: Spongiotrofoblast, DT: Dev Trofoblast, LT: Labirent Tabakası, KR: Koryon, VK: Vitellus Kesesi, BE: Bez Epiteli)



Şekil 4.22. Gebeliğin 11.gününde Jag2'nin immünolokalizasyonu (A, B, C, D, E, F). Negatif kontrol kesit (G, H, I) (MD: Maternal Desidua, ST: Spongiotrofoblast, DT: Dev Trofoblast, LT: Labirent Tabakası, KR: Koryon, VK: Vitellus Kesesi, BE: Bez Epiteli)

5. TARTIŞMA

Memelilerde implantasyon blastosist ile reseptiv endometrium arasında haberleşme sağlayan birçok sinyal molekülünün de rol aldığı karmaşık bir olaydır. İnsanda ve farede gebelik sürecinde invazyon, plasentasyon gibi aşamalar farklılık göstermesine karşın temel mekanizma aynıdır. İnsanda luteal evrede blastosist indüksiyonundan bağımsız olarak desidualizasyon süreci gerçekleşirken, farede gelişen blastosistin 4.5 gününde implante olması ile desidualizasyon indüklenir (22). İnsanda yaklaşık 7. günde embriyo uterus duvarına implante olur. Her iki türde de desidualizasyon süreci aynıdır. Primer desidua hücreleri embriyoyu çevreleyen alanda yer alan birkaç sıra yassı nükleuslu, iğ şekilli hücreden oluşur. Sekonder desidual zon, primer desiduayı çevreleyen poliploid, iri, poligonal şekilli hücrelerden oluşur. Embriyonun endometriuma implante olduğu alan antimezometrial kutuptur ve embriyonun büyüüp geliştiği alan olarak kalır. Embriyonun bulunmadığı karşı taraf ise mezometrial kutuptur ve plasenta bu alanda gelişir. Embriyo implantasyonu ile antimezometrial kutup gelişmeye başlarken, mezometrial kutup gelişimi daha sonra başlar. Fare ve insanda hemokoryal plasenta gelişir (15, 20). Bu iki türde plasenta yapıları farklılık gösterse de tabakaların temel işlevleri aynıdır.

Memelilerde 4 adet Notch geni (Notch 1–4) ve Delta/Serrate/LAG–2 (DSL) ailesinin Notch ligand üyelerini kodlayan 5 gen; 3 Delta-like (DII1, 3, 4) ve 2 Jagged (Jag1, 2) bulunur (3). Notch sinyal yolağı gelişim sürecinde hücre akıbeti kararlarında rol alır. Bunun yanı sıra farklılaşma, proliferasyon, hücre-hücre adezyonu gibi çeşitli hücresel süreçleri kontrol eder (44). Yapılan çalışmalar Notch sinyal yolağı moleküllerinin plasentada eksprese edildiğini göstermiştir (135–136).

Gebelik öncesinde uterus ve gebelik sonrasında da desidua, endometrium ve plasenta gibi alanlarda etkili olan oldukça karmaşık sinyal yollarının aydınlatılması, bunlarla ilişkili moleküllerin varlığının saptanmasıyla mümkündür. Dolayısıyla da bu, gebeliğin tüm süreçlerinin anlaşılmasında çok önemli yer tutar. Bu amaçla bu çalışmada Notch gen ailesi üyelerinden Notch ligand Jagged1 ve Jagged2'nin pre ve post implantasyon dönemlerinde fare uterus endometriumundaki immüno-lokalizasyonları araştırılmıştır.

5.1. Notch Sinyal Yolağı ve Desidualizasyon

Kemirici ve insan gebeliklerinde embriyo lümen epiteline tutunur ve endometrium stromasına invaze olur. Steroid hormonların etkisi altında embriyoyu çevreleyen stromal hücreler değişikliğe uğrarlar. Bu süreç desidualizasyon olarak bilinir ve implantasyon için gerekli bir ön koşuldur. Farede blastosistin epitele tutunması ile desidualizasyon indüklenir. Önce antimezometrial alanda desidualizasyon başlar. Mezometrial alanda desidual reaksiyon daha geç başlar ve antimezometrial alandan geç gelişir. Endometrial stromal hücreler ve ekstraselüler matriks bileşenleri desidualizasyon sürecinde değişiklik gösterirler. Hyaluron artar, tip IV kollajen azalır, tip I ve tip III kollajenin üretimi azalır (17). Desidualizasyon iki yönde gerçekleşir. Myometriuma komşu alanda endometriumun iç şekilli, yassı çekirdekli fibroblastları bulunur. Bu alan kapsül yapısı olarak bilinir. Desidualizasyon sürecinin başlaması ile kapsüldeki fibroblastlar düzensiz, yassı çekirdekli predesidual hücrelere farklılaşırlar. Burada yoğun bir aktivite söz konusudur. Çalışmamızda 5. günde myometriuma komşu kapsül yapısında sekonder ve primer desiduadan çok daha güçlü ve belirgin bir Jag1 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Jag2 ligandında ise bu şekilde farklı bir ekspresyon gözlenmemiştir. 7. Günde ise hem Jag1'in hem de Jag2'nin kapsül yapısında kuvvetli lokalizasyon gösterdiği izlenmiştir. Jagged1'in hücrel farklılaşmayı ve proliferasyonu kontrol ettiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin Nickoloff ve arkadaşları (2002) Jag1 ligandının insanda epidermisin suprabazal tabakasında ekspresse edildiğini ve bazal tabakada ekspresse edilen Delta ligandı ile birlikte keratinositleri terminal farklılaşmaları için indüklediğini kanıtlamışlardır (94). Kohler ve arkadaşları (2004) ise ratta karaciğer yaralanmaları ve rejenerasyon modeli çalışmalarında karaciğer hücrelerinin proliferasyon sürecinde Jag1 molekülünün upregüle edildiğini göstermiştir (108). Bu veriler gelişimin erken döneminde Jag1 aracılı, ilerleyen dönemde ise hem Jag1 hem de Jag2 aracılı Notch sinyalinin predesidual hücre farklılaşmasına ve proliferasyonuna aracılık ettiğine işaret eder.

Predesidual hücreler olgunlaşarak sekonder desidual hücreleri oluştururlar. Hücreler genişler, nükleus yuvarlaklaşır, nükleolus sayısı artar, sekretuar apparatus gelişir, sitoplazmada glikojen ve lipid birikir. Desidual hücreler laminin, tip IV kollajen, fibronektin, heparan sülfat ve proteoglikan içeren ECM proteinleri üretirler. Desidualize stromal hücrelerin prolaktin (PRL), insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) gibi salgısal ürünler, farklılaşma aşaması için marker olarak kullanılır (15). Çalışmamızda sekonder desiduada

gebeliğin 5. gününde Jag1'in orta derecede, Jag2' nin de az miktarda ekspresse edildiği gösterilmiştir. Yedinci günde hem Jag1 hem de Jag2 ekspresyonlarının artması, bu ligandların desidua hücrelerinin olgunlaşma sürecinde farklılaşmayı etkileyen potansiyel bir role sahip olduklarını gösterir.

Embriyoyu çevreleyen trofoblastların etrafında mekik şekilli, yassı çekirdekli primer desidua hücreleri bulunur. Trofoblast hücreleri primer desidual hücreler arasına invaze olur ve buradaki primer desidua hücreleri ölmeye başlarlar. Böylece trofoblast invazyonu yayılarak, trofoblastların endometrial kan damarları ile ilişki kurması sağlanır. Ayrıca embriyonun büyümesi için yeterli alan oluşturulur. Desidua, büyüme faktörleri ve sitokinleri sağlamanın yanısıra maternal kan damarlarının şekillenmesini de destekler. Böylece gelişen embriyo için besin maddesi sağlanmasına yardımcı olur (15, 17). Yaptığımız çalışmada gebeliğin 5. gününde primer desiduada orta derecede Jag1, az miktarda Jag2 ekspresse edildiği, 7. günde Jag1 ekspresyonunun değişmediği, Jag2 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu veriler 7. günde trofoblast hücrelerindeki yüksek Jag1 ve Jag2 ekspresyonau ile birlikte değerlendirildiğinde primer desidua ile trofoblast hücrelerinin Notch sinyal yolağı aracılığıyla etkileşimde bulunduğu, desidua yapısının trofoblast invazyonunun kontrolü sürecinde Notch sinyal yolağının etkisi olabileceğine işaret eder. Desidual reaksiyon gebelik boyunca devam eder ve trofoblast invazyonunun derecesi ile ilişkili olarak genişler (15). Çalışmamızda gebeliğin 9. gününde mezometrial alanda yer alan maternal desiduanın bazal kısmında güçlü Jag1 ve Jag2 ekspresyonu olduğu, apikalinde ise ekspresyon olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda gebeliğin 11. gününde maternal desiduanın hem apikalinde hem de bazalinde orta derecede Jag1 ve Jg2 ekspresyonun olduğu izlenmiştir. Gebeliğin ilerlemesi ile maternal desiduanın embriyonun büyümesi ve fetal plasentanın gelişmesine olanak sağlamak için bir yandan gerilediği bir yandan da gebelik boyunca desidualizasyonun devam ettiği bilinmektedir. Çalışmamızdan elde edilen veriler değerlendirildiğinde maternal desiduanın bazal kısmında yüksek Jag1 ve Jag2 ekspresyonu olması gebeliğin 9. ve 11. günlerinde Notch sinyal yolağının desidualizasyon sürecinin devamı ve korunması için potansiyel bir role sahip olabileceğine işaret eder. Bununla birlikte 9. günde apikal kısımda ekspresyon olmaması da gelişimin bu gününde Notch sinyal yolağının baskılanarak desiduanın gerileme sürecine katkıda bulunabileceğine işaret edebilir.

Falco ve arkadaşları (2007) insanda hem proliferatif hem de invaziv ekstravillöz trofoblast hücrelerinin sitoplazmalarında Jag1 proteinini yüksek miktarda ekspresse ettiğini göstermiştir (135). Bu veriler Notch sinyal yolağının trofoblast hücrelerinde aktive edilerek invazyonda rol aldığına, primer desidal hücrelerin de aktive edilerek trofoblast invazyonunun sınırlandırılmasına katkıda bulunabileceğine işaret eder.

5.2. Notch ve Anjiyogenez

Plasenta gelişimi için embriyonik/fetal sitotrofoblast hücreleri ile maternal hücreler arasında etkileşime gereksinim vardır. İnterstisyel invazyon sürecinde sitotrofoblast hücreleri desidual, myometrial ve immün hücreler ile kaynaşır. Endovasküler invazyon sürecinde sitotrofoblast hücreleri maternal spiral arterleri işgal ederler. Maternal endotel ve düz kas duvarı bölgeleri ile yer değiştirerek maternal ve fetal hücrelerden oluşan, arteriol çapını artıran yeni bir damar yapısı oluştururlar. Bu süreçte endotel hücrelerinde arteriyel fonksiyonda rol alan vasküler tip hücre adhezyon molekülleri, anjiyogenik faktörler ve Ephrin ailesi üyelerinin ekspresyonları baskılanır (137). Uyttendaele ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada Jag1 aracılı Notch4/int-3 yolağının beyin endodermiyal yapılara benzer şekilde damar yapılarının oluşumunu indükleyebildiği gösterilmiştir (118). Başka bir çalışmada Delta like-1 veya Jag1 defektli embriyolarda çeşitli kanamaların meydana geldiği gözlenmiştir (117). Bu veriler Notch'un kan damarı şekillenmesinde rolü olduğunu, Notch sinyalinin endotel hücre farklanmasını ve morfogenezini tetikleyebildiğini gösterir. Farede Notch1, 2 ve 4'ün endotel hücrelerinde ekspresse edildiği bilinmektedir (138). Yapılan bir çalışmada Notch aktivitesi inhibisyonunun damar gelişiminde önemli bir molekül olan ephrinB2 ekspresyonunun indüklenmesinde başarısız olduğu gösterilmiştir. Notch ligandlarının da endotelde ekspresse edildiği ve damar gelişimi için gerekli olduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Sıçanda 9. günde antimezometrial alandaki trofoblast dev hücreleri desidual hücrelerle etkileşimde bulunur. Buradaki desidual hücrelerin programlı ölümü ile kan damarları ile dev trofoblast hücreleri kan damarları ile ilişki kurar. Böylece trofoblast dev hücreleri vitellus kesesi plasantasyonunun kurulmasına aracılık eder (54). Çalışmamızda fare gelişimin 7-7.5. günündeki ışık mikroskopik incelemelerinde antimezometrial alanda farklı trofoblast hücreleri ve dev trofoblast hücrelerinin bazı desidual hücrelerin programlı ölümü ile desidualdaki kan damarları ile ilişki kurduğu ve bu hücre ölümünün genişleyerek vitellus kesesi anjiyogenezinin başladığı görülmüştür. Bu yapı vitellus kesesinin temelini

oluşturur. Vitellus kesesi plasenta gelişene kadar embriyonun beslenmesine yardımcı olur. Xue ve arkadaşları (1999). Jagged1 geninde meydana gelen hasarın vitellus kesesi anjiyogenezinde defektlere neden olduğunu göstermiştir (117). Çalışmamızda gelişimin 7. Günde antimezometriyal alanda dev trofoblast hücrelerinde, bunların ilişkide olduğu primer desidua hücrelerinde ve desidual kan damarlarında Jag1 ve Jag2 ekspresse edildiği gösterilmiştir. Bu veriler Xue ve arkadaşlarının elde ettiği veriler ile tutarlı olarak Jag1 ile birlikte Jag2' nin de vitellus kesesi gelişiminde indükleyici etkisi olduğunu gösterir. Bunun yanısıra çalışmamızda 9. ve 11. günlerde de vitellus kesesinin Jag1 ve Jag2'yi yüksek miktarda ekspresse ettiği gösterilmiştir. Bu da Jag1 ve Jag2'nin vitellus kesesi anjiyogenezinde farklanma ve proliferasyona etkisi olduğunun bir göstergesi olabilir.

Normal endotelde bir miktar ekspresse edilen Jag1 ve Jag2 ligandlarının, endotelial soyulma sonrasında yenilenen endotelde ekspresyonlarının önemli miktarda arttığı gösterilmiştir (139). Ekspresyon, hücrelerin yenilenme sürecinde, göç etme ve proliferasyonu aşamalarında korunur ancak yaralanmadan yaklaşık 4 hafta sonra migrasyon ve proliferasyon durduğunda azalır (140). Benzer şekilde düz kas hücrelerinde de yaralanma sonrasında Jag1 ve Jag2 ekspresyonu artar. Bu veriler Notch reseptörleri ekspresyonlarının endotelial hücre/düz kas hücresi etkileşimi ile ilgili olabileceğini, Jagged/Notch sinyalinin vasküler dallanma sürecinde hücrel farklanmayı düzenlediğinin bir işareti olabilir (139).

Farede Notch2'nin delesyonu arterial invazyonun azalmasına, maternal kan damarlarının daralmasına ve plasental perfüzyonun azalmasına yol açar (141). Çalışmamızda 11. günde labirent ve spongiotrofoblast tabakalarındaki trofoblast hücrelerinde Jag1 ve Jag2'nin ekspresse edildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda preeklempsi vakalarında ikinci trimesterde alınan biyopsi örneklerinde damarlarda, endovasküler ve perivasküler sitotrofoblastlarda Jag1'in ekspresse edilmediği gösterilmiştir (141). Preeklempside azalmış Jag1 ekspresyonu ile başarısız vasküler remodellenme arasında bir ilişki olması, sağlıklı gebeliklerde damarlarda Jag1 ekspresse edilmesi, Notch sinyal yolağının insan spiral arter remodellenmesinde önemli bir fonksiyonel role sahip olduğuna işaret eder. Farede yapılan çalışmalarda da Notch ailesi genlerinde meydana gelen delesyonların vasküler defektlere neden olduğu ve fare embriyolarının maternal dokunun yetersiz kalması sonucu, yeterli madde alışverişi sağlanamadığından öldüğü gösterilmiştir (142). Çalışmamızda gebeliğin 5, 7, 9 ve 11. günlerinde ve östrus evrelerinde perimetrium tabakasındaki damarlarda ve desidual

zonda gelişen damarlarda çok yüksek derecede Jag1 ve Jag2 ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Bu da anjiyogenez sürecinde Notch sinyal yolağının Jag1 ve Jag2 ligandları üzerinde etki gösterdiğine işaret edebilir.

5.3. Notch Sinyal Yolağı ve Trofoblast Hücre Etkileşimleri

İmplantasyon süreci üç evreyi içerir: Apozisyon, adezyon ve penetrasyon-invazyon. İmplantasyon sürecinde en önemli özellik ilk aşamada trofoblast hücrelerinin oluşumu ve uterin mukozaya invazyonudur. Trofoblast hücrelerinin uterin duvara invazyonu hemokoryal plasentanın karakteristik özelliğidir. Blastosist, uterus duvarına temas eder etmez trofoblast hücre farklanması başlar. İnvaziv özellikteki trofoblast, primer desidual hücrelerle etkileşimde bulunur ve bu alandaki primer desidua hücreleri ölerek trofoblast invazyonuna olanak sağlar. Trofoblast hücreleri desidual kan damarları ile ilişki kurarak buradaki maternal endotellerin yerini alırlar. Böylece fetus ile anne arasında madde alışverişinin sağlanması için gereken ilk düzenlemeler sağlanmış olur. Trofoblastik aktivitenin kontrolü; büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, enzimlerin, plazminojen aktivatör ve inhibitör faktörlerin arasındaki denge ile sağlanır (IGF, IGF-BP1, CSF-1, LIF, IL-1, MMP, TIMPs, TGF- β , PAI-1, hCG) (15). İnsanda Jagged1 proteini birinci trimesterde sitorofoblast tabakasında güçlü ekspresyon gösterirken, sinsityotrofoblast tabakasında zayıf bir ekspresyon gösterir. Üçüncü trimesterde sinsityotrofoblast tabakasındaki ekspresyon artar. Hem proliferatif hem de invaziv ekstravillöz trofoblast hücrelerinin sitoplazmalarında Jag1 proteini yüksek miktarda bulunur (135). Gelişen farede iç hücre kitlesini çevreleyen trofoblast, polar trofoektoderm adını alır ve proliferasyona devam ederek labirent tabakasının öncülü olan koryonu ve spongiyotrofoblast öncülü olan ektoplasental koniyi oluşturur. İç hücre kitlesine komşu olmayan mural trofoektoderm ise trofoblast dev hücrelerini oluşturur (36). Mash-2 çoğalan trofoblast hücrelerinin korunması için çok önemli bir moleküldür ve dev hücre farklanmasını bloke edebilir. Böylece mevcut dev hücre prekürsörlerinin korunmasını sağlar (37). Trofoblast dev hücreleri büyük, çok nükleuslu, poligonal hücrelerdir. Konseptusun uterusu invazyonuna ve implantasyona aracılık ederler. Annede embriyonun büyümesi ve hayatta kalması için gerekli hem lokal hem de sistemik fizyolojik adaptasyonları geliştiren büyüme faktörlerini ve hormonları üretirler (15). Ratta 9. günde antimezometrial alandaki trofoblast dev hücreleri desidual hücrelerle etkileşimde bulunur. Bu alanda bazı desidual hücrelerde programlı hücre ölümü gerçekleşir böylece dev trofoblast hücreleri kan damarları ile ilişki kurar. Dev

trofoblast hücreleri vitellus kesesi plasentasyonunun kurulmasına aracılık eder (1, 33). Farede plasentanın gelişmesiyle birlikte trofoblast dev hücreleri maternal-plasental ara yüzde yer alır ve steroid ve peptid hormonları sentezleyen oldukça aktif hücrelerdir. Çalışmamızda, 7. 9. ve 11. günlerde dev trofoblast hücrelerinin güçlü bir şekilde Jag1 ve Jag2 pozitif boyanma özelliği gösterdiği izlenmiştir. Bu da Jag1 ve Jag2'nin dev hücre farklanmasında rolü olduğunu, vitellus kesesi plasentasyonunun kurulmasında aracılık ettiğini gösterir.

Notch-2 geninin fare plasentasında E10.5'te spongiotrofoblast ve dev trofoblast tabakasında ekspresse edildiği gösterilmiştir. Spongiotrofoblast tabakasında hem Mash-2 hem de Notch-2 ekspresse edilmesi trofoblast gelişiminde Notch sinyal yolağının önemli rol oynadığını gösterir. Bununla birlikte maternal desidua ve fetal hücrelerde Delta-1 ve Serrate-1'in ekspresyonunun gözlenmemesi, Notch-2 geninin bu oluşumda başka bir ligand aracılığıyla aktive edildiğine işaret eder (36). Yaptığımız çalışmada, gelişimin 7. gününde embriyoyu çevreleyen trofoblast hücrelerinin çok güçlü Jag1 ve Jag2 pozitif boyanmaları Notch sinyal yolağının Jag1 ve Jag2 ligandları aracılığıyla aktive olarak trofoblast gelişimi ve invazyonunda rol alabileceğine işaret edebilir. Çalışmamızda gelişimin 7. gününde spongiotrofoblast tabakasının öncülü olan ektoplasental koni hücrelerinde yüksek derecede Jag1 ve Jag2 ekspresyonu gösterilmiştir. Hunkapiller ve arkadaşlarının (2011) yaptığı çalışmada insan plasentasında sitotrofoblast hücrelerinin Jag1 ekspresse ettiği kanıtlanmıştır. Preeklampsi vakalarında endovasküler ve perivasküler trofoblast hücrelerinde Jag1'in ekspresse edilmemesi, trofoblast hücrelerinde ekspresse edilen Notch sinyal yolağının trofoblast vasküler invazyonunda önemli rolü olduğunu gösterir. Bu çalışmada aynı zamanda yetersiz Mash-2 ekspresyonunun spongiyotrofoblast ve koryon tabakalarının gelişmemesine neden olduğu gösterilmiştir (141). Çalışmamızda gebeliğin 11. gününde labirent tabakasındaki damarları oluşturan trofoblast hücrelerinin de güçlü Jag1 ve Jag2 pozitif boyandıkları izlenmiştir. Faredeki spongiotrofoblast tabakası insanda sitotrofoblast tabakasına karşılık gelir. Bu veriler çalışmamızdan elde edilen bulgularla birlikte değerlendirildiğinde Jag1 ve Jag2 ligandları ile aktive olan Notch sinyal yolağının trofoblast gelişimi, labirent ve spongiotrofoblast tabakalarının doğru bir şekilde düzenlenimi için gerekli olduğu ve Mash-2 ile etkileşimde bulunduğuna işaret edebilir.

Bir çalışmada insan sitotrofoblast hücrelerinin kültür ortamında farklılaşma ve invazyon sürecini içeren başlangıç aşamalarında Jag1'i ekspresse etmediği ancak maternal spiral arteriollerle ilişki kurduğu süreçte Jag1 ekspresyonunun upregüle edildiği, Jag2

ligandının ise ekspresse edilmediği. Farede yapılan çalışmalarda Notch aktivitesi E7.5' ta invaziv trofoblastların kaynağı olan ektoplasental koni sınırındaki birkaç hücrede görülmüştür. İnsan plasental trofoblast hücre kültüründe yapılan bir başka çalışmada Notch sinyali inhibisyonunun invazyonu azalttığı gösterilmiştir. Şiddetli seyreden preeklampsi sendromunda sitotrofoblast invazyonunun azaldığı hatta bazı vakalarda tamamen başarısız olduğu bilinmektedir (141). Bu veriler, çalışmamızda trofoblast invazyonunun gerçekleştiği 7. günde trofoblast hücrelerindeki Jag1 ve Jag2 ekspresyonlarının güçlü olması ile birlikte değerlendirildiğinde Notch sinyalinin trofoblast hücre invazyonunda önemli role sahip olduğunu göstermektedir. Bir kültür çalışmasında fare trofoblast kök hücrelerinin Notch ailesinin tüm üyelerini ekspresse ettiği gösterilmiştir (143). Gelişimin 8.5–10.5 günleri arasında implantasyon alanının periferindeki bir grup dev trofoblast hücresinin Notch aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Bu da insandaki maternal-fetal arayüzey analogu olan bağlantı zonundaki büyüyen trofoblast hücre popülasyonuna eşdeğerdir (141). Çalışmamızda da 11. günde spongiotrofoblast ve trofoblast dev hücrelerinden oluşan bağlantı zonunda Jag1 ve Jag2 güçlü bir şekilde ekspresyon göstermiştir. Bu verilerle birlikte farede spiral arter ilişkili dev trofoblast hücrelerinin endovasküler invazyonları esnasında Notch sinyalinin bu hücrelerde önemli ölçüde arttığına işaret eder (141). Bu veriler sitotrofoblast hücrelerinin Notch reseptör ve ligand ekspresyonlarını farklılaşma ve invazyon aşamalarına önemli ölçüde artması nedeni ile trofoblast hücrelerindeki Notch reseptör ve ligand ekspresyonlarının farklılaşma ve invazyon süreçlerine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir (141).

5.4. Notch Sinyali ve Apoptoz

Apoptoz embriyonik gelişimin başlangıcından başlayarak ileri evrelere kadar birçok süreçte rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Notch sinyal yolağının apoptoz ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalardan elde edilen verilerle kanıtlanmıştır. Örneğin nöral gelişim çalışmalarında Notch1'in erken nöral projenitör hücrelerinde aktive edilmesinin apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Böylece memeli nöral gelişiminde Notch sinyal yolağı projenitör kimliğin korunmasında ve nöronal farklılaşmanın baskılanmasında rol alır (144). Başka bir çalışmada ise nöral projenitör hücrelerde Notch sinyal yolağı aktivasyonunun projenitör hücrelerin farklılaşmasını ve göç etmelerini engelleyerek dinlenme evresinde kalmalarını indüklediği, böylece mevcut projenitör havuzun korunmasını sağladığı gösterilmiştir (145). Milan ve arkadaşlarının (2002) yaptığı çalışmada *Drosophila* retinasında, kanat sınırlarında ve

duyu organlarında Notch aktivasyonunun hücre ölümünü tetiklediği gösterilmiştir (146). Diğer taraftan memeli lenfosit gelişiminde Notch sinyali T hücrelerini apoptozdan korurken (147), B hücrelerinde apoptozu indükler (148).

Memelilerde üreme döngüsünde ve gelişim süreçlerinde apoptoz vazgeçilmez bir mekanizmadır. İnsan endometriumunda orta ve geç luteal fazda apoptoz meydana geldiği ve böylece fonksiyonel tabakanın döküldüğü bilinmektedir. Apoptozun desidualizasyon ve implantasyon sürecinde önemli olabildiğine dair kanıtlar mevcuttur. İnsanda 19–20. günlerde implantasyon penceresi başlangıcında bazal tabakadaki bezlerin epitellerinde ilk apoptoz işaretleri görülürken, luteal faz sürecinde fonksiyonel tabakadaki bez epitelinde de apoptoz görülür. Proliferasyon ve apoptoz inhibitörü olan bcl-2 ekspresyonu bu alanlarda oldukça kısıtlıdır. Bu veriler bcl-2 ekspresyonunun koruyucu etkisinin kaybolması ile artış gösteren apoptozun endometriumun başarılı bir implantasyona hazırlanması için önemli olduğuna işaret eder (149). Ratta yapılan çalışmalarda östrus, metöstrus evrelerinde ve implantasyon sürecinde bez epitelinde apoptoz olduğu (150) ve bunun bcl-2 ve bax proteinleri ekspresyonlarının konsantrasyonuna bağlı olabileceği gösterilmiştir (151). İmplantasyonun başlangıç aşamasında, implantasyon alanında uterus epitelinde apoptoz meydana gelmesi implantasyon için önemli bir adımdır. İlerleyen implantasyon ile birlikte desidual hücrelerin de trofoblast invazyonuna ve embriyo büyümesine olanak sağlamak için ve koryoallantoik plasentanın gelişimi için bir apoptoz mekanizması ile gerilemesi gerekir. E8' de desidua bir yandan gerilemeye başlar. Endometrial fibroblastlar periimplantasyon sürecinde kollajen fibrilleri fagosite ederler ve hemen sonra da desidual hücreler bu fibrilleri degrade ederler (17). Desidudaki ekstraselüler ve intraselüler kolajen degradasyonu dokunun sert bütünlüğünün bozulmasına, gelişen trofoblastın invazyonuna yardımcı olur ve ekstraselüler besin moleküllerinin açığa çıkarak büyüyen hücrelerin kan dolaşımına verilmesini sağlar (152). İnvaziv periyodun sonunda (E10.5) mezometrial desidua gelişimine devam ederken, antimezometrial desidua gerilemeye başlar (21). E9–11. günlerde fare antimezometrial alanındaki olgun desidual hücreler kademeli olarak ölür. Sağlıklı desidual hücrelerden salgılanan hidrolitik enzimler matris bileşenlerinin ortadan kaldırılmasını sağlar ve böylece embriyonun gelişimi için yeterli alan sağlanır (153). Ratta 10. günde mezometrial alanda koryoallantoik plaseenta oluşumu gerçekleşir. Konseptusu iki nükleuslu dev trofoblast hücreleri çevreler (42). Çalışmamızda gebeliğin 9. gününde farede de koryoallantoik plasentanın gelişmeye başladığı, 11. gününde ise tam olarak geliştiği izlenmiştir. Mezometrial

alandaki bu koryoallantoik oluşum maternal desiduanun gerilemesini gerektirir. Ratta desidualizasyon ve implantasyon, embriyoyu çevreleyen desidual hücrelerde artan bax proteini ekspresyonu ve azalan bcl-2 ekspresyonu ile ilişkili olan kademeli apoptoz ile yakından ilişkilidir (151). Bcl-2'nin gebe olmayan endometriumda stroma ve bez epitelinde de luteal faz boyunca süren ekspresyonu gösterilmiştir (154). İnsan plasentasında bcl-2'nin koryonik villusların sinsityorofblast tabakasında ekspresse edildiği ve bunun da trofoblast kitlesinin gebelik boyunca korunması için bir mekanizma olabileceği ileri sürülmüştür. Başarısız gebeliklerde ise bcl-2 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür (155). Yapılan bir çalışmada bcl-2'nin T hücrelerinde Notch1'in fonksiyonunun düzenlenmesinde bir rolü olduğu gösterilmiştir (156).

Farede polar trofoektoderm maternal kan desteğine ulaşmak için gelişen desiduya invaze olur. Bu süreç desidual dokunun adım adım gerilemesi ile gerçekleştirilir. Farede E4.5'te proapoptotik bax proteini embriyoyu çevreleyen sınırlı olarak primer desidual zonda ekspresse edilirken, bu ekspresyon sekonder desidual zona yayılır. E6.5'te Bax ekspresyonu antimezometrial desidudan myometrial duvara kadar lokalizasyon gösterir ve Bax ekspresyonu mezometrial alanda da başlar. Aksine Bcl2 E4.5'te primer desidual zonda ekspresyon göstermezken, Caspase-9 desiduada ekspresse edilir. Başlatıcı kaspaz olan Caspase9 E4.5'te gelişen desiduada yerleşiktir ve ekspresyon gelişen desidia ile paralel olarak yayılır (157). Notch sinyal yolağının Bcl-2, Bax proteini, caspase3 ve caspase9 sinyal yolları ile ilişkili olduğuna dair veriler elde edilmiştir fakat henüz ilişkileri ve mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir (158).

Gelişim sürecinde trofoblast ve maternal kan arasındaki uterin bariyerin uzaklaştırılması gereklidir. Trofoblast hücrelerinin invaziv özellikte olmaları bu uterin bariyerin uzaklaştırılmasında rol oynadıklarına işaret eder (159, 160). Çalışmamızda 7. günde primer desidual zondaki bazı primer desidia hücrelerinde başlatıcı kaspaz olan kaspaz9'u ekspresse ettikleri görülmüştür. Bu veriler çalışmamızdaki 7. günde antimezometrial alandaki primer desidual hücrelerinde programlı hücre ölümü gerçekleştiğini gösterir. Böylece trofoblast hücrelerinin invazyonu ve embriyo büyümesi için yeterli alan sağlanır ve trofoblast hücreleri maternal kan damarları ile ilişki kurarak vitellus kesesi plasentasyonu gelişir. Çalışmamızda 7. günde sekonder desidudaki bazı hücrelerde de kaspaz9 lokalizasyonu görülmüştür. Fakat bu ekspresyonun apoptoz ile ilişkili olup olmasadığını anlamak için detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Notch sinyal yolağının apoptoz üzerindeki etki mekanizması değişkendir. Örneğin nöral projenitör hücrelerde Notch aktive olarak apoptozu indüklerken (144). Pankreas kanserinde apoptozun Notch-1 downregülasyonu ile indüklendiği görülmüştür (10). Notch ligandlarının konsantrasyon bağımlı inhibitör etki gösterdikleri bilinmektedir. Düşük ligand miktarı Notch sinyalinin etkisini aktive ederken yüksek miktarda ligand inhibitör etkiyi indükler (69). Çalışmamızda Jag1 ve Jag2 ligandlarının primer desidua alanlarında genel olarak güçlü ekspresyon sergilediği görülmektedir. Bu da burada görülen kaspaz9 ekspresyonu ile birlikte değerlendirildiğinde Notch sinyal yolağının plasentadaki apoptoz mekanizmasına ligandların yüksek konsantrasyon bağımlı etkisi ile katılabileceğini gösterir.

Çalışmamızda Jag1 ve Jag2' nin sadece gebelik sürecinde değil normal östrus döngüsünde tüm evrelerde uterusun tüm tabakalarında lokalize oldukları gösterilmiştir. Bu nedenle, üreme döngüsünde endometriumun yapılanma aşamasındaki stromal hücrelerin farklanması, proliferasyonu, apoptozu, anjiyogenezin remodellenmesi, uterusun implantasyona hazırlanması süreçlerinde Jag1 ve Jag2 aracılı Notch sinyal aktivasyonunun önemli olduğu ileri sürülebilir.

Bu çalışmada pre ve post implantasyon dönemlerinde Jag1 ve Jag2'nin trofoblast hücrelerinde, desidua hücrelerinde, kas ve damar yapılarında, plasentayı oluşturan tabakalarda ekspresyonu izlendi. Notch ligandı olan Jagged1 ve Jagged2 implantasyon sürecinde önemli olan trofoblast invazyonu, gebeliğin devamı ve korunması için gerekli desidualizasyon, anjiyogenez ve apoptoz süreçlerinde önemli rol oynayabilir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

✓ Pre ve post implantasyon süreçlerinde fare endometriumunda, Jagged1 ve Jagged2 ekspresyonlarının varlığı, dolayısıyla Notch proteinlerinin üreme döngüsü, implantasyon ve plasenta oluşum süreçlerinde etkili oldukları ve bu süreçlerde fonksiyon gören Notch sinyal yolağının aktivitelerini Notch ligand Jagged1 ve Jagged2'nin sıkı kontrolü altında gerçekleştirdikleri,

✓ Başarılı bir implantasyonun gerçekleştirilebilmesinde Notch genlerinin ve Notch ligandlarının önemli rollerinin olduğu,

✓ Desidualizasyon, plasentasyon, anjiogenez süreçlerinde Notch sinyal yolağının hücre çoğalması, farklılaşması, göç, apoptoz ve homeostaziste etkileri bilinen Notch protein ailesi üyelerinin aktivitelerini sınırlandırdıkları ve kontrol ettikleri,

✓ Bununla birlikte, pre ve post implantasyon süreçlerinde, Notch ligandlarının Notch sinyal yolağı üzerinden ayrı ayrı ve/veya aynı sinyal yolunda fonksiyon gördükleri,

✓ Ayrıca, farklı dokularda farklı lokalizasyonlarda farklı Notch proteinlerin fonksiyon görebileceği ve/veya farklı sinyal yolaklarını kullanabildikleri, sonuçlarına ulaşılmıştır.

✓ Notch sinyal yolağı ailesi üyelerinin, hangi sinyal yolağına veya yolaklarına spesifite gösterdikleri, hangi ligand moleküllerin hangi Notch proteinine ve/veya reseptörüne spesifite gösterdiği yapılacak çalışmalarla tam ve kesin olarak açığa çıkarılmalıdır.

✓ İmplantasyon başarısızlığı olduğu durumlarda, aberrant Notch ligand sinyal yolları akla gelecek olan ilk parametreler arasında yer alabilecektir.

✓ Çünkü yakın gelecekte bu moleküller, ilaç olarak kullanımı sağlanabilecek moleküller olabileceklerdir.

7. KAYNAKLAR

1. Kaloglu C, Gursoy E, Onarlioglu B. (2003). Early Maternal Changes Contributing to the Formation of the Chorioallantoic and Yolk Sac Placentas in Rat: a Morphological Study, *Anat Histol Embryol.* Aug;32(4):200–6.
2. Kaloglu C, Onarlioglu B. (2000). Sıçan implantasyonunda decidualizasyon ve ekstraselüler matriks değişiklikleri, Doktora tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas.
3. Maine EM, Lissemore JL, Starmer WT. (1995). A phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Notch-related genes, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4, 139–149.
4. Mumm JS, Kopan R. (2000). Notch signaling: from the outside in, *Dev Bio*, 228:151–65.
5. Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E. (1999). Human ligands of the Notch receptor, *Am. J. Pathol*, 785–794.
6. Louis AA, Van Eyken P, Haber BA, Hicks C, Weinmaster G, Taub R, Rand EB. (1999). Hepatic jagged-1 expression studies, *Hepatology* 30, 1269–1275.
7. Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J. (1997). Isolation and Functional Analysis of a cDNA for Human Jagged2, a Gene Encoding a Ligand for the Notch1 Receptor, *Mol Cell Biol.* Oct;17(10):6057–67.
8. Gridley T. (2003). Notch signaling and inherited disease syndromes, *Human Molecular Genetics* 12, R9–R13.
9. Harper JA, Yuan JS, Tan JB, Visan I & Guidos CJ. (2003). Notch signaling in development and disease, *Clinical Genetics*, 461–472.

10. Wang Z, Zhang Y, Li Y, Banerjee S, Liao J, Sarkar FH. (2006). Downregulation of Notch-1 contributes to cell growth inhibition and apoptosis in pancreatic cancer cells, *Mol. Cancer Ther.* 5, 483–493.
11. Artavanis-Tsakonas S. (1997). Alagille syndrome-a notch up for the Notch receptor, *Nature Genetics*, 16 212–213.
12. Junqueira LC, Carneiro J. (2003). *Temel Histoloji* (Çeviri Editörü: Aytekin Y, Solakoğlu S) Nobel Tıp Kitabevleri, ISBN: 975-420-467-5.
13. Sadler TW. (2008). *Langman's Medical Embryology*, 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Hagerstown, Page Count: 371.
14. Moore KL, Persaud TVN. (2007). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, With The Collaboration of Mark G. Torchia. 8th ed., Saunders-Elsevier; Elsevier Science Health Science div, Saint Louis, Page Count: 522.
15. Aplin JD, Fazleabas AT, Glasser SR, Giudice LC. (2008). *The Endometrium. Molecular, Cellular, and Clinical Perspectives*. 2 th ed., Informa Healthcare, United Kingdom, Page Count 922.
16. Kliman H. (2000). Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion, *Am. J. Pathol*, 157, 1759–1768.
17. Lawn AM, Wilson EW, Finn CA. (1971). The ultrastructure of human decidual and predecidual cells, *J Reprod Fertil.* Jul;26(1):85–90.
18. Long JA, Evans HM. (1922). The estrous cycle in the rat and its associated phenomena, *Memories of- University of California*, 6: 1–148.
19. Spornitz UM, Socin CD, David AA. (1999). Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium, *The Anat. Rec*, 116–126.

20. Carter AM. (2007). Animal Models of Human Placentation e A Review, *Placenta* 28, Supplement, S41-S47.
21. Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. (2010). Endometrial decidualization: of mice and men, *Semin Reprod Med.* Jan;28(1):17–26.
22. Enders A. (1965). A comparative study of the fine structure of the trophoblast in several hemochorial placentas, *Am. J. Anat.*, 29–67.
23. Malassine A, Frenzo JL, Evain-Brion D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model *Human Reproduction Update*, 531–539.
24. Watson ED, Cross JC. (2005). Development of Structures and Transport Functions in the Mouse Placenta, *Physiology*, 20:180–193.
25. Adler R, Ng A and Rote N. (1995). Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, *JAR. Biol Reprod*, 53, 905–910.
26. Cronier L, Frenzo J-L, Defamie N, Pidoux G, Bertin G, Guibourdenche J, Pointis G. and Malassine A. (2003). Requirement of GAP junctional intercellular communication for human villous trophoblast differentiation, *Biol. Reprod*, 63, 1472–1480.
27. Getsios S, and MacCalman CD. (2003). Cadherin–11 modulates the terminal differentiation and fusion of human trophoblastic cells in vitro, *Dev Biol*, 257, 41–54.
28. Blond J-L, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, Mandrand B, Mallet F and Cosset FL. (2000). An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor, *J. Virol.*, 74, 3321-3329.

29. al-Lamki RS, Skepper JN and Burton GJ. (1999). Are human placental bed giant cells merely aggregates of small mononuclear trophoblast cells? An ultrastructural and immunocytochemical study, *Hum Reprod*, 14, 496–504.
30. Cross JC, Werb Z, and Fisher SJ. (1994). Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle, *Science*, 266: 1508–1518.
31. Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, and Cross JC. (2000). The glial cells missing–1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta, *Nat Genet*, 25: 311–314.
32. Saxton TM, Cheng AM, Ong SH, Lu Y, Sakai R, Cross JC, Pawson T. (2001). Gene dosage-dependent functions for phosphotyrosine-Grb2 signaling during mammalian tissue morphogenesis, *Curr Biol* 11: 662–670.
33. Rossant J, Cross JC. (2001). Placental development: lessons from mouse mutants, *Nat Rev Genet*, 2: 538–548.
34. Adamson SL, Lu Y, Whiteley KJ, Holmyard D, Hemberger M, Pfarrer C and Cross JC. (2002). Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta, *Dev Biol*, 250, 358–373.
35. Cross JC, Simmons DG, and Watson ED. (2003). Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree, *Ann NY Acad Sci*, 995: 84–93.
36. Nakayama H, Liu Y, Stifani S, Cross JC. (1997). Developmental Restriction of Mash–2 Expression in Trophoblast Correlates With Potential Activation of the Notch–2 Pathway, *Dev Genet*. 21(1):21–30.
37. Cross JC, Flannery ML, Blonar MA, Steingrimsson E, Jenkins NA, Copeland NG, Rutter WJ, Werb Z. (1995): Hxt encodes a basic helix-loop-helix transcription factor that regulates trophoblast cell development, *Development* 121:2513–2523.

38. Strauss J III, Martinez F, Kiriakidou M. (1996). Placental steroid hormone synthesis: unique features and unanswered questions, *Biol. Reprod*, 54, 303–311.
39. Jameson J, and Hollenberg A. (1993). Regulation of chorionic gonadotropin gene expression, *Endocr. Rev*, 14, 203–221.
40. Bray S. (1998). Notch signalling in *Drosophila*: three ways to use a pathway, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 9 591–597.
41. Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME. (1995). Notch signaling, *Science*, 225–32.
42. Baron M, Aslam H, Flaszka M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, et al. (2002). Multiple levels of Notch signal regulation, *Mol Membr Biol*, 19:27–38.
43. Lubman OY, Korolev SV, Kopan R. (2004). Anchoring notch genetics and biochemistry; structural analysis of the ankyrin domain sheds light on existing data, *Molecular Cell* 13, 619–626.
44. Fiúza UM, Arias AM. (2007). Cell and molecular biology of Notch, *J Endocrinol*. 194(3):459–74.
45. Bray SJ. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9):678–89.
46. Mitsiadis TA, Henrique D, Thesleff I, Lendahl U. (1997). Mouse Serrate-1 (Jagged-1): expression in the developing tooth is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and fibroblast growth factor-4, *Development* 124, 1473–1483.
47. Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis- Tsakonas S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor, *Cell* 67, 687–699.

48. Chitnis A, Henrique D, Lewis J, Ish-Horowicz D, Kintner C. (1995). Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta, *Nature*, 375:761–766
49. Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. (1995). Expression of Notch 1, 2, and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J Cell Biol*, 130:407–418.
50. Fehon RG, Kooh PJ, Rebay I, Regan CL, Xu T, Muskavitch MA & Artavanis-Tsakonas S. (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*, *Cell* 61, 523–534.
51. Sakamoto K, Ohara O, Takagi M, Takeda S, Katsube K. (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification, *Developmental Biology* 241, 313–326.
52. Okajima T, Xu A, Lei L, Irvine KD. (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding, *Science* 307, 1599–1603.
53. Dale JK, Maroto M, Dequeant ML, Malapert P, McGrew M & Pourquie O. (2003). Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock, *Nature*, 421 275–278.
54. Baron M, Aslam H, Flaszka M, Fostier M, Higgs JE, Mazaleyrat SL, et al. (2002). Multiple levels of Notch signal regulation, *Mol Membr Biol*, 19:27–38.
55. Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S. (1997). Intracellular cleavage of Notch leads to a heterodimeric receptor on the plasma membrane, *Cell*, 90:281–291.

56. Rand MD, Grimm LM, Artavanis-Tsakonas S, Patriub V, Blacklow SC, Sklar J, et al. (2000). Calcium depletion dissociates and activates heterodimeric Notch receptors. *Mol Cell Biol*, 20:1825–35.
57. Weinmaster G. (1998). Notch signaling: direct or what?, *Curr Opin Genet Dev*, 8:436-442.
58. Nichols JT, Miyamoto A, Olsen SL, D'Souza B, Yao C, Weinmaster G. (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur, *Journal of Cell Biology* 176, 445–458.
59. Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS. (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain, *PNAS* 93, 1683–1688.
60. Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM. (1996). KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis, *Science*, 273:1227–31.
61. Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. (1995). Signalling downstream of activated mammalian Notch, *Nature* 377, 355–358.
62. Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R. (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain, *Nature* 393, 382–386.
63. Kao HY, Ordentlich P, Koyano-Nakagawa N, Tang Z, Downes M, Kintner CR, Evans RM & Kadesch T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes and Development* 12, 2269–2277.
64. Kovall RA. (2007). Structures of CSL, Notch and Mastermind proteins: piecing together an active transcription complex, *Current Opinion in Structural Biology* 17, 117–127.
65. Zhou S, Fujimuro M, Hsieh JJ, Chen L, Miyamoto A, Weinmaster G, Hayward SD. (2000). SKIP, a CBF1-associated protein, interacts with the ankyrin repeat domain of

- NotchIC to facilitate NotchIC function, *Molecular and Cellular Biology* 20, 2400–2410.
66. Hubbard EJ, Wu G, Kitajewski J, Greenwald I. (1997). *sel-10*, a negative regulator of *lin-12* activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev*, 11:3182–93.
 67. Oberg C, Li J, Pauley A, Wolf E, Gurney M, Lendahl U. (2001). The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog, *J Biol Chem*, 276:35847–53.
 68. Fryer CJ, White JB & Jones KA. (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover, *Molecular Cell* 16, 509–520.
 69. Micchelli CA, Rulifson EJ, Blair SS. (1997). The function and regulation of cut expression on the wing margin of *Drosophila*: Notch, wingless and a dominant negative role for Delta and Serrate, *Development* 124, 1485–1495.
 70. de Celis JF, Garcia-Bellido A & Bray SJ. (1996). Activation and function of Notch at the dorsal–ventral boundary of the wing imaginal disc, *Development*, 122 359–369.
 71. Jacobsen TL, Brennan K, Arias AM & Muskavitch MA. (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*, *Development*, 125 4531–4540.
 72. Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le Roux I, Pourquie O, Ish-Horowicz D & Lewis J. (1997). Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta– Notch signalling in the embryonic chick retina, *Current Biology*, 7 661–670.
 73. Ladi E, Nichols JT, Ge W, Miyamoto A, Yao C, Yang LT, Boulter J, Sun YE, Kintner C, Weinmaster G. (2005). The divergent DSL ligand Dll3 does not activate Notch signaling but cell autonomously attenuates signaling induced by other DSL ligands, *Journal of Cell Biology* 170, 983–992.

74. Martin-Bermudo MD, Carmena A, Jimenez F. (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification, *Development* 121, 219–224.
75. Kiernan AE, Cordes R, Kopan R, Gossler A & Gridley T. (2005). The Notch ligands DLL1 and JAG2 act synergistically to regulate hair cell development in the mammalian inner ear, *Development* 132, 4353–4362.
76. Le Borgne R, Schweisguth F. (2003). Unequal segregation of neuralized biases Notch activation during asymmetric cell division, *Developmental Cell* 5, 139–148.
77. Chiba S. (2006). Notch signaling in stem cell systems, *Stem Cells*, 24 2437–2447.
78. Coffman CR, Skogland P, Harris WA, and Kintner CR. (1993). Expression of an extracellular deletion of Xotch diverts cell fate in *Xenopus* embryos, *Cell* 73, 659–671.
79. Nye JS, Kopan R, and Axel R. (1994). An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells, *Development (Camb.)* 120, 2421–2430.
80. Kimble J, White JG. (1981). On the control of germ cell development in *Caenorhabditis elegans*, *Dev Biol*, 81:208–219.
81. Henderson ST, Gao D, Lambie EJ, Kimble J. (1994). lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*, *Development*, 120(10):2913–24.
82. Austin J, Kimble J. (1987). glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*, *Cell*, 51:589–599.
83. Fitzgerald K, Greenwald I. (1995). Interchangeability of *Caenorhabditis elegans* DSL proteins and intrinsic signaling activity of their extracellular domains in vivo, *Development*, 121:4275–4282.

84. Ohishi K, Varnum-Finney B, Flowers D, Anasetti C, Myerson D, Bernstein ID. (2000). Monocytes express high amounts of Notch and undergo cytokine specific apoptosis following interaction with the Notch ligand Delta-1, *Blood*, 95:2847.
85. Wilson A, MacDonald HR, Radtke F. (2001). Notch 1-deficient common lymphoid precursors adopt a B cell fate in the thymus, *J. Exp. Med*, 194:1003.
86. Washburn T, Schweighoffer E, Gridley T, Chang D, Fowlkes BJ, Cado D, and Robey E. (1997). Notch activity influences the $\alpha\beta$ versus $\gamma\delta$ T cell lineage decision, *Cell*, 88:833.
87. Robey E, Chang D, Itano A, Cado D, Alexander H, Lans D, Weinmaster G, Salmon P. (1996). An activated form of Notch influences the choice between CD4 and CD8 T cell lineages, *Cell* 87:483.
88. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M. (2000). The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells, *J. Exp. Med*, 192:1365.
89. Tan-Pertel HT, Walker L, Browning D, Miyamoto A, Weinmaster G, Gasson JC. (2000). Notch signaling enhances survival and alters differentiation of 32D myeloblasts, *J. Immunol*, 165:4428.
90. Carlesso N, Aster JC, Sklar J, Scadden DT. (1999). Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics, *Blood*, 93:838.
91. Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation, *EMBO J*, 18:2196.
92. Weijzen S, Velders MP, Elmishad AG, Bacon PE, Panella JR, Nickoloff BJ, Miele L, and Kast WM. (2002). The Notch Ligand Jagged-1 Is Able to Induce Maturation of Monocyte-Derived Human Dendritic Cells, *J Immunol*, 2002, 169(8):4273-8.

93. Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, et al. (2001). Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation, *EMBO J*, 20:3427.
94. Nickoloff BJ, Qin JZ, Chaturvedi V, Denning MF, Bonish B, and Miele L. (2002). Jagged-1 mediated activation of notch signaling induces complete maturation of human keratinocytes through NF-kB and PPAR γ , *Cell Death Differ*, 9:842.
95. Garces C, Ruiz-Hidalgo MJ, de Mora JF, Park C, Miele L, Goldstein J, Bonvini E, Porras A, and Laborda J. (1997). Notch-1 controls the expression of fatty acid-activated transcription factors and is required for adipogenesis, *J. Biol. Chem*, 272:29729.
96. Shelly LL, Fuchs C, Miele L. (1999). Notch-1 prevents apoptosis in murine erythroleukemia cells and is necessary for differentiation induced by hybrid polar drugs, *J. Cell Biochem*, 73:164.
97. Yasutomo K, Doyle C, Miele L, Germain RN. (2000). The duration of antigen receptor signalling determines CD4⁺ versus CD8⁺ T-cell lineage fate, *Nature* 404:506.
98. Balint K, Xiao M, Pinnix CC, Soma A, Veres I, Juhasz I, Brown EJ, Capobianco AJ, Herlyn M, Liu JZ. (2005). Activation of Notch1 signaling is required for b-catenin-mediated human primary melanoma progression, *J. Clin. Invest*, 3166–3176.
99. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J et al. (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1, *Nature Genetics* 16, 243–251.
100. Wang W, Struhl G. (2004). Drosophila epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch, *Development* 131, 5367–5380.

101. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, Hui CC, Clevers H, Dotto GP, Radtke F. (2003). Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat. Genet.* 33, 416–421.
102. Weijzen S, Zlobin A, Braid M, Miele L, Kast WM. (2003). HPV16 E6 and E7 oncoproteins regulate Notch–1 expression and cooperate to induce transformation, *J. Cell Physiol.* 194, 356–362.
103. Zimmer-Strobl U, Strobl LJ. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein–Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes, *Semin. Cancer Biol.* 11, 423–434.
104. Lai EC. (2004). Notch signaling: control of cell communication and cell fate, *Development*, 131:965–73.
105. Santagata S, Demichelis F, Riva A, Varambally S, Hofer MD, Kutok JL, Kim R, Tang J, Montie JE, Chinnaiyan AM, Rubin MA, Aster JC. (2004). Jagged1 expression is associated with Prostate Cancer Metastasis and Recurrence, *Cancer Res*, 64(19):6854–7.
106. Undt F, Probsting KS, Anagnostopoulos I, Muehlinghaus G, Chatterjee M, Mathas S, Bargou RC, Manz R, Stein H, Dorken B. (2004). Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells, *Blood* 103, 3511–3515.
107. Zeng Q, Li S, Chepeha DB, Giordano TJ, Li J, Zhang H, Polverini P, Nor J, Kitajewski J, Wang CY. (2005). Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling, *Cancer Cell* 8, 13–23.
108. Kohler C, Bell AW, Bowen WC, Monga SP, Fleig W, Michalopoulos GK. (2004). Expression of Notch–1 and its ligand Jagged–1 in rat liver during liver regeneration, *Hepatology* 39, 1056–1065.
109. Gao J, Chen C, Hong L, Wang J, Du Y, Song Y, Shao X, Zhang J, Han H, Liu J, Fan D. (2007). Expression of Jagged1 and its association with hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma, *Biochem Biophys Res Commun*, 356(2):341–7.

110. Nomaguchi K, Suzu S, Yamada M, Hayasawa H, and Motoyoshi K. (2001). Expression of Jagged1 gene in macrophages and its regulation by hematopoietic growth factors, *Exp Hematol*, Jul;29(7):850–5.
111. Varnum-Finney B, Purton LE, Yu M, Brashem-Stein C, Flowers D, Staats S, Moore KA, Le Roux I, Mann R, Gray G, Artavanis-Tsakonas S, Bernstein ID. (1998). The Notch ligand, Jagged–1, influences the development of primitive hematopoietic precursor cells, *Blood* 91:4084.
112. Singh N, Phillips RA, Iscove NN, Egan SE. (2000). Expression of notch receptors, notch ligands, and fringe genes in hematopoiesis, *Exp Hematol*, May;28(5):527–34.
113. Weber JM, Forsythe SR, Christianson CA, Frisch BJ, Gigliotti BJ, Jordan CT, Milner LA, Guzman ML, Calvi LM. (2006). Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells, *Bone* 39, 485–493.
114. Elyaman W, Bradshaw E, Zhu B, Trenado A, Liu Y, Yagita H. (2008). Non-redundant Roles of Jagged1 and Jagged2 in Regulating Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Clin Immunol*, 127():S51.
115. Trombly DJ, Woodruff TK, Mayo KE. (2009). Suppression of Notch Signaling in the Neonatal Mouse Ovary Decreases Primordial Follicle Formation, *Endocrinology*, 150(2):1014–24.
116. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K, Kunisato A, Takahashi T, Hirai H. (2002). Expression of Notch ligands, Jagged1, 2 and Delta1 in antigen presenting cells in mice, *Immunol Let*, 81(1):59–64.
117. Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T. (1999). Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1, *Hum. Mol. Genet.* 8, 723–730.

118. Uyttendaele H, Closson V, Wu G, Oise Roux F, Weinmaster G, Kitajewski J. (2000). Notch4 and Jagged-1 Induce Microvessel Differentiation of Rat Brain Endothelial Cells, *Microvascular Research* 60, 91–103.
119. Vorontchikhina MA, Zimmermann RC, Shawber CJ, Tangb H, Kitajewski J. (2005). Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation, *Gene Expr Patterns*, 5(5):701–9.
120. Milner LA, Kopan R, Martin DI, Bernstein ID. (1994). A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34 hematopoietic precursors, *Blood*, 83:2057.
121. Jones P, May G, Healy L, et al. (1998). Stromal expression of Jagged1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells, *Blood*, 92:1505.
122. Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. (1993). Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development, *Cell* 75, 45–58.
123. Li H, Yu B, Zhang Y, Pan Z, Xu W, Li H. (2006). Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes, *Biochem Biophys Res Commun*, Mar 10;341(2):320–5.
124. Wu K, Xu L, Zhang L, Lin Z, Hou J. (2011). High Jagged1 Expression Predicts Poor Outcome in Clear Cell Renal Cell Carcinoma, *Jpn J Clin Oncol*, 41(3):411–6.
125. Miele L, Golde T, Osborne B. (2006). Notch signaling in cancer, *Curr Mol Med*, 6:905–18.
126. Shawber C, Boulter J, Lindsell CE, Weinmaster G. (1996). Jagged2: a serratelike gene expressed during rat embryogenesis, *Dev Biol*, 180(1):370–6.
127. Mitsiadis TA, Regaudiat L, Gridley T. (2004). Role of the Notch signalling pathway in tooth morphogenesis, *Archives of Oral Biology* 50, 137–140.

128. Hayashi T, Kageyama Y, Ishizaka K, Xia G, Kihara K, Oshima H. (2001). Requirement of Notch 1 and Its Ligand Jagged 2 Expressions for Spermatogenesis in Rat and Human Testes, *J Androl*, 22(6):999–1011.
129. Jiang R, Lan Y, Chapman HD, Shawber C, Norton CR, Serreze DV, Weinmaster G, Gridley T. (1998). Defects in limb, craniofacial, and thymic development in Jagged2 mutant mice, *Genes Dev*, 12: 1046–1057.
130. Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G. (1995). Jagged: a mammalian ligand that activates Notch1. *Cell*, 80(6):909–17.
131. Tsai S, Fero J, Bartelmez S. (2000). Mouse Jagged2 is differentially expressed in hematopoietic progenitors and endothelial cells and promotes the survival and proliferation of hematopoietic progenitors by direct cell-to-cell contact, *Blood* 96:950.
132. Sander GR, Brookes SJ, Powell BC. (2003). Expression of Notch1 and Jagged2 in the Enteric Nervous System, *J Histochem Cytochem*, Jul;51(7):969–72.
133. Rabadn MA, Cayuso1 J, Cruz C, Briscoe J, Mart E. (2009). Expression of Jagged2 in the ventral spinal cord depends on Shh activity and controls the switch from neurogenesis to Oligodendrogenesis, *Mechanisms of Development*, 126():S318-S318.
134. Stump G, Durrer A, Klein AL, Luˆtolf S, Suter U, Taylor V. (2001). Notch1 and its ligands Delta-like and Jagged are expressed and active in distinct cell populations in the postnatal mouse brain, *Mechanisms of Development* 114, 153–159.
135. De Falco M, Cobellis L, Giraldi D, Mastrogiacomo A, Perna A, Colacurci N, Miele L, De Luca A. (2007). Expression and Distribution of Notch Protein Members in Human Placenta Throughout Pregnancy, *Placenta*, 28(2–3):118–26.
136. Herr F, Schreiner I, Baal N, Pfarrer C, Zygmunt M. (2011). Expression patterns of Notch receptors and their ligands Jagged and Delta in human placenta, *Placenta*, Aug;32(8):554–63.

- 137.Red-Horse K, Kapidzic M, Zhou Y, Feng KT, Singh H, Fisher SJ. (2005). EPHB4 regulates chemokine-evoked trophoblast responses: a mechanism for incorporating the human placenta into the maternal circulation, *Development* 132, 4097–4106.
- 138.Zimrin AB, Pepper MS, McMahon GA, Nguyen F, Montesano R, Maciag T. (1996). An antisense oligonucleotide to the notch ligand jagged enhances fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vitro, *J. Biol. Chem.* 271, 32499–32502.
- 139.Lindner V, Booth C, Prudovsky I, Small D, Maciag T, Liaw L. (2001). Members of the *Jagged/Notch* Gene Families Are Expressed in Injured Arteries and Regulate Cell Phenotype via Alterations in Cell Matrix and Cell-Cell Interaction, *Am J Pathol*, 159(3):875–83.
- 140.Clowes AW, Clowes MM, Reidy MA. (1986). Kinetics of cellular proliferation after arterial injury, III. Endothelial and smooth muscle growth in chronically denuded vessel, *Lab Invest*, 54:295–303.
- 141.Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, Plaks V, Maltepe E, Kitajewski J, Cross JC, Fisher SJ. (2011). A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia, *Development*. Jul;138(14):2987–98.
- 142.Roca C, Adams RH. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling, *Genes Dev.* 21, 2511–2524.
- 143.Cormier S, Vandormael-Pournin S, Babinet C, Cohen-Tannoudji M. (2004). Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development, *Gene Expr. Patterns* 4, 713–717.
- 144.Yang X, Klein R, Tian X, Cheng HT, Kopan R, Shen J. (2004). Notch activation induces apoptosis in neural progenitor cells through a p53-dependent pathway, *Dev Biol.* 269(1):81–94.

145. Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS. (2001). Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 128, 689– 702.
146. Milan M, Perez L, Cohen SM. (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing, *Dev. Cell* 2, 797– 805.
147. Miele L, Osborne B. (1999). Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis, *J. Cell. Physiol.* 181, 393–409.
148. Morimura T, Goitsuka R, Zhang Y, Saito I, Reth M, Kitamura D. (2000). Cell cycle arrest and apoptosis induced by Notch1 in B cells, *J. Biol. Chem.* 275, 36523– 36531.
149. von Rango U, Classen-Linke I, Krusche CA, Beier HM. (1998). The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod.* Nov;13(11):3177–89.
150. Parr EL, Tung HN, Parr MB. (1987). Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats, *Biol Reprod.* Feb;36(1):211–25.
151. Akcali KC, Khan SA, Moulton BC. (1996). Effect of decidualization on the expression of bax and bcl-2 in the rat uterine endometrium, *Endocrinology* vol. 137 no. 7 3123– 3131.
152. Fainstat T. (1963). Extracellular studies of uterus. I. Disappearance of the discrete collagen bundles in endometrial stroma during various reproductive states in the rat, *Am J Anat.* 112: 337–369.
153. Ten Cate AR, Deporter DA (1975). The degradative role of the fibroblast in the remodeling and turnover of collagen in soft connective tissue, *Anat Rec.* 182: 1–14.
154. Koh EAT, Illingworth PJ, Duncan WC, et al. (1995). Immunolocalisation of bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy, *Hum. Reprod.*, 10, 1557–1562.

- 155.Sakuragi N, Matsuo H, Coukos G, et al. (1994). Differentiation-dependent expression of the BCL-2 proto-oncogene in the human trophoblast lineage, *J. Soc. Gynecol. Invest*, 1, 164–172.
- 156.Sionov RV, Kfir-Erenfeld S, Spokoini R, Yefenof E. (2012). A Role for Bcl-2 in Notch1-Dependent Transcription in Thymic Lymphoma Cells, *Advances in Hematology*, doi:10.1155/2012/435241.
- 157.Joswig A, Gabriel HD, Kibschull M, Winterhager E. (2003). Apoptosis in uterine epithelium and decidua in response to implantation: evidence for two different pathways, *Reprod Biol Endocrinol*. 1:44.
- 158.Okuyama R, Nguyen BC, Talora C, Ogawa E, di Vignano AT, Lioumi M, Chiorino G, Tagami H, Woo M, Dotto GP. (2004). High Commitment of Embryonic Keratinocytes to Terminal Differentiation through a Notch1-caspase 3 Regulatory Mechanism, *Dev Cell*. 2004 Apr;6(4):551–62.
- 159.Fisher SJ, Cui TY, Zhang L, Hartman L, Grahl K, Zhang GY, Tarpey J, Damsky CH. (1989). Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro, *Cell Biol*. Aug;109(2):891–902.
- 160.Schlafke S, Enders AC. (1975). Cellular Basis of Interaction Between Trophoblast and Uterus at Implantation, *Biol Reprod*. Feb;12(1):41–65.