

T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE HORMONLARA
BAĞLI β -KATENİN VE NÜKLEER FAKTÖR κ B
DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

Biyolog Yasemin ÖZEREN

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2008

T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE HORMONLARA
BAĞLI β -KATENİN VE NÜKLEER FAKTÖR κ B
DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLER

Biyolog Yasemin ÖZEREN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2008

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	4
4.1. ENDOMETRİYUM.....	4
4.1.1. Endometriyal Siklus ve Hormonal Kontrolü.....	4
4.1.2. Östrojen Hormonu ve Reseptörleri.....	5
4.1.3. Progesteron Hormonu ve Reseptörleri.....	7
4.2. İMPLANTASYON VE ENDOMETRİYUM.....	7
4.2.1. Trofoblast Hücreleri ve HCG.....	8
4.3. HÜCRE SIKLUSU.....	10
4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU.....	11
4.5. β KATENİN.....	11
4.5.1. β Katenin/Wnt Sinyal Yolu.....	12
4.6. NÜKLEER FAKTÖR κ B (NF- κ B).....	14
4.6.1. NF- κ B Sinyal Yolu.....	15
5. MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR.....	16
5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER.....	17
5.2.1. Hücre Kültürü.....	17
5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi.....	17
5.2.2.1. Bromodeoksiüridin İmmünohistokimyası.....	17
5.2.2.2. β Katenin ve NF- κ B İmmünohistokimyası.....	18
5.2.3. İstatistiksel İnceleme.....	18
6. BULGULAR.....	19
6.1. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN BROMODEOKSİÜRİDİN İLE GÖSTERİLMESİ.....	19

6.2. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE β -KATENİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ.....	20
6.3. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE NF- κ B EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ.....	22
7. TARTIŞMA.....	24
8. SONUÇ.....	27
9. TEŞEKKÜR.....	28
10. KAYNAKLAR.....	29

SİMGE VE KISALTMALAR

AEC	: Aminoetilkarbezol
APC	: Adenomatöz polipozis koli
BrdU	: 5- bromo 2'-deoksi-üridin
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
COX-2	: Siklooksijenaz-2
Dsh	: Dishelleved
ER	: Östrojen reseptörü
ERE	: Östrojene duyarlı element
FBS	: Fetal sığır serumu
FSH	: Folikül stimulan hormon
Fzd	: Frizzled
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSK3 β	: Glikojen sentetaz kinaz 3 beta
HCG	: İnsan koryonik gonodatropini
IκB	: İnhibitör kappa B
IκB α	: İnhibitör kappa B alfa
IκB β	: İnhibitör kappa B beta
IκB γ	: İnhibitör kappa B gamma
IκB ϵ	: İnhibitör kappa B epsilon
IKK	: İnhibitör kappa kinaz
IKK α	: İnhibitör kappa kinaz alfa
IKK β	: İnhibitör kappa kinaz beta
LH	: Luteinizan hormon
LIF	: Lösemi inhibitör faktör
LRP	: Reseptör ilişkili Protein
NEMO	: Nükleer faktör- κ B esansiyal modifiye edici
NF-κB	: Nükleer faktör- κ B
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu

PR : Progesteron reseptörü
SHBG : Seks hormonu bağlayan globulin
TCF/LEF : T hücre transkripsiyon faktörü/ Lenfoid çoğaltıcı faktör
VEGF : Vasküler endoteliyal büyüme faktörü
 β TrCP : Beta transdusin tekrarları içeren protein

Araştırma Projesi No : HE/0222007

1. ÖZET

Bu çalışmada in-vitro endometriyum hücre modelinde, progesteron ve östrojen hormonlarına bağlı olarak gelişen endometriyal siklus evreleri ve sinsityotrofoblastlarca sentezlenen insan koryonik gonatotropin hormonuna bağlı olarak β -katenin ve nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolları ile hücre proliferasyonunda meydana gelen değişiklikler immünohistokimyasal olarak incelendi.

Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesinde S fazına özgü bir işaretleyici olan bromodeoksiüridin (BrdU) immünohistokimyası uygulandı. Östrojen inkübasyonu sonrasında BrdU inkorporasyonunda artış izlenirken, progesteron ve insan koryonik gonatotropini uygulaması sonrasında hücre proliferasyon oranlarında bir değişiklik izlenmedi. Endometriyal hücrelerde, plazma membranının intraselüler sınırları boyunca belirgin β -katenin ekspresyonu izlendi. Östrojen ve progesteron hormonlarıyla inkübasyon sonrasında mevcut β -katenin ekspresyonunda bir değişiklik izlenmedi. İnsan koryonik gonatotropini (HCG) ile inkübasyon sonrasında ise membran yerleşimli β -katenin ekspresyonunun azaldığı izlendi. NF- κ B aktivitesi, östrojen ve HCG uygulanan deney grubu hücrelerde kontrol grubuna benzer bulundu. Ancak progesteron uygulanan grupta sitoplazmik NF- κ B ekspresyonunda artış izlendi.

Çalışmamız sonucunda; östrojen hormonu inkübasyonu ile artan S faza özgü BrdU pozitif hücre oranı bu hormon kontrolündeki siklus evresiyle uyumlu bulundu. Plazma membranında lokalize olan adezyon molekülü β -katenin ekspresyonunun, insan koryonik gonatotropini etkisiyle azaldığı belirlendi. İnflamasyon kontrolünde rol oynayan ve steroidlerle etkileşen NF- κ B ekspresyonunun, progesteron hormonuyla ilişki gösterdiği ancak sinsityotrofoblastlar tarafından salınan insan koryonik gonatotropininden bağımsız bir etki gösterdiği sonucuna varıldı.

2. SUMMARY

In this study, in in-vitro endometrial cell model, estrogen and progesterone dependent endometrial cycle stages and β -catenin and nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathways in terms of human chorionic gonadotropin (HCG) hormone that is synthesized by syncytiotrophoblast cells, and changes in the cell proliferation are examined immunocytochemically.

To assess cell proliferation, S-phase specific marker bromodeoxyuridin (BrdU) immunocytochemistry was performed. While an increase in BrdU incorporation was observed after estrogen incubation, there was no change seen in cell proliferation rates after progesterone and HCG applications. In endometrial cells, distinct β -catenin expression was observed across the entire intracellular margin of the plasma membrane. After incubation with estrogen and progesterone, no change in the expression of existing β -catenin was noticed. Also, a significant decrease was observed in membrane-bound β -catenin expression after incubation with HCG. Compared with estrogen and HCG treated experimental cell group, NF- κ B activity was found similar to that of the control cell group. On the other hand, in the progesterone treated group, an increase was observed in cytoplasmic NF- κ B expression.

As a result of our study, S-phase specific marker BrdU-positive cell ratio which is increased by estrogen incubation was found compatible with cycle stages under the control of estrogen hormone. It was determined that the expression of plasma membrane localized cell adhesion molecule β -catenin was decreased by the effect of hormone HCG. Besides playing a role in inflammation control and interacting with steroids, it was decided that NF- κ B expression was related with progesterone hormone; on the other hand it was independent from HCG, which is produced by syncytiotrophoblasts.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Östrojen, progesteron ve insan koryonik gonadotropini (HCG) hormonlarının, insan uterusunda endometriyal hücrelerin büyüme ve gelişmesini uyardığı bilinmektedir. Ayrıca pre ve post implantasyon dönemlerine ait biyolojik olaylar da bu hormonların kontrolünde gerçekleşmektedir (1).

Endometriyum düzenli siklik kanamalarla dökülen ve yenilenen istisna bir dokudur. Bu dokudaki siklik değişiklikler hücre ölümünü takiben hücre proliferasyonunu içeren fizyolojik olayları kapsar. Hücre proliferasyonu dokunun yenilenmesi açısından son derece önemli bir biyolojik olaydır ve hormonlar kontrolünde gerçekleşir (2). β -katenin, hem hücre-hücre adezyon molekülü olarak, hem de Wnt sinyal yolağında önemli rol oynayan bir proteindir. İmplantasyon sırasında endometriyal hücrelerin adezyon moleküllerinde bir dizi değişiklik meydana gelmektedir. Endometriyal siklusun düzenlenmesinden sorumlu steroid hormonlar, endometriyal adezyon moleküllerinin ekspresyon seviyelerinde değişikliğe yol açmaktadır (3). İmplantasyon döneminde sinsityotrofoblastlarca salınan tümör nekroz faktör α (TNF- α) endometriyal hücre adezyon moleküllerinden kaderin ve ilişkili olarak β -katenin, moleküllerinin ekspresyonunu inhibe etmektedir (4). Nükleer faktör- κ B (NF- κ B); transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir ve inflamasyonda enfeksiyonlara karşı immün cevabın hazırlanmasında anahtar rolü üstlenir. Bütün hücre tiplerinde mevcuttur ve hücrel cevap oluşturmada görev alır. NF- κ B, sitoplazmada İnhibitör Kappa B (IkB) ile kompleks oluşturur ve inaktif formda bulunur. İmplantasyonun inflamatuvar bir komponent içerdiği bilinmektedir (5) ancak bu dönemde endometriyal hücrelerde NF- κ B sinyal yolunun rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Çalışmamızda östrojen, progesteron ve HCG hormonlarının endometriyal hücreler üzerindeki etkilerini karakterize etmek için iyi diferansiyel insan endometriyal karsinomundan elde edilen ve implantasyon biyolojisi çalışmak için uygun bir hücre modeli olarak kabul edilen Ishikawa hücre soyu kullanıldı (6). Çalışmamızın amacı; pre ve post implantasyon dönemlerinde etkili olan hormonlar kontrolünde endometriyum hücrelerinde β -katenin ve NF- κ B sinyal yolları ile hücre proliferasyonunda gelişen değişiklikleri tanımlayarak endometriyal kaynaklı fertilité problemi yaşayan hastaların klinik yaklaşımına katkı sağlamaktır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. ENDOMETRİYUM

Uterus duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşur: İç yüzeyi döşeyen endometriyum, kalın düz kas tabakasından oluşan orta tabaka miyometriyum, en dış tabaka ise perimetriyumdur. Endometriyum yüzeyi tek katlı prizmatik silli epitel ile kaplanmıştır. Epitel tabakasının altında uterus bezlerini içeren lamina propria yer alır. Endometriyum işlevsel olarak iki tabakadan oluşur. Menstruasyon evresinde dökülen üst 2/3'lük fonksiyonel tabaka ile menstruasyon sırasında dökülmeyen ve endometriyal siklus sonunda proliferasyon olarak fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlayan alt 1/3'lük bazal tabaka (7).

4.1.1. Endometriyal Siklus ve Hormonal Kontrolü

Ovaryum folikülleri ile korpus luteumdan salgılanan hormonlar (östrojen ve progesteron, HCG) endometriyumda siklik değişikliklere neden olur. Hipotalamus hücreleri tarafından üretilen gonadotropin salgılatıcı hormonu (GnRH), hipofizin ön lobunda üretilen folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormonun (LH) salgılanmasına neden olur (8). FSH ve LH, ovaryumlardan östrojen ve progesteron hormonlarının salınımı sağlar. Östrojen ve progesteron, menstruasyondan ve endometriyal siklustan sorumludur (9). Endometriyumda bulunan östrojen ve progesteron reseptörleri, bu hormonlara karşı cevap oluşmasında önemli rol oynar. Östrojen ve progesteron hormonları steroid yapıdadır. Bu hormonların reseptörleri protein yapıdadır ve yüksek affiniteye sahiptirler (10).

Uterusun iç tabakasındaki yaklaşık 28 gün süren bu değişikliklere endometriyal siklus denir. Bu sürecin sonunda menstruasyon görüldüğü için menstrual siklus da denir. Her endometriyal siklusta, endometriyum, oogenez sonucunda ovulasyonla atılan matür oositin fertilizasyon olasılığına karşı implantasyon içinde hazırlanır. Endometrial siklus birbirini takip eden 3 evreden meydana gelmektedir (11):

Menstrual evre; siklusun başlangıcı olan 4-5 günlük bir süredir. Fertilizasyon gelişmediği takdirde endometriyumun fonksiyonel tabakasını kanlandıran spiral arterlerde

gelişen kontraksiyonlar sonucu kan akımı azalır ve fonksiyonel tabaka dökülür. Menstrual evrede inflamasyon benzeri bir süreç başlar (11). İnflamasyon; fiziksel, kimyasal ve enfeksiyöz bir ajan sonucu gözlenen doku hasarına karşı vücudun bir cevabıdır. İnflamasyon; sitokinleri, büyüme faktörleri ve prostoglandinleri içeren bazı faktörlerin salınımına yol açmaktadır. Nükleer faktör κ B (NF- κ B), siklooksijenaz 2 (COX-2), prostaglandin ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını indükler ve menstruasyona öncü olan cevabı oluşturur (5).

Proliferasyon evresi (östrojenik evre); östrojen hormonunun kontrolü altındadır ve yaklaşık 9 gün sürer. Endometriyal siklusun 12. ve 13. günlerde östradiol yapımı FSH'nin etkisi ile artar. Bu yüksek östrojen düzeyi, LH'nun üretimini aşırı şekilde artırır. Böylece 14. günde pik yapan LH'a yanıt olarak ovulasyon gerçekleşir. LH düşük düzeyde olursa ovulasyon meydana gelmemektedir (12). Epitel ve bezlerde mitoz meydana gelir. Tubuler endometriyal bezler kıvrımlı bir yapı gösterir. Yüksek östrojen etkisi altında bez epiteli ve stromada östrojen ve progesteron reseptörlerinin sayısı artar (13). Endometriyumun kalınlığı ve su miktarı 2–3 katına ulaşır.

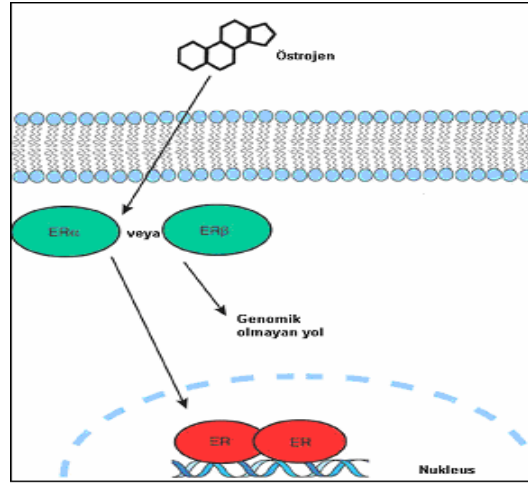
Sekresyon evresi (progestasyonal evre); ovulasyondan sonraki yaklaşık 13 gün süren evredir. Bu evrede endometriyal bezlerden salgı yapımı başlar. Ovaryumlarda korpus luteum gelişir. Korpus luteumdan salgılanan progesteron, endometriyal bezleri uyarak glikojenden zengin bir materyalin oluşmasını sağlar (11). Sekretuar evre, fertilizasyon oluşup-oluşmamasına bağlı olarak farklılık gösterir. Eğer fertilizasyon olmazsa, trofoblastlar gelişmeyeceği ve insan koryonik gonadotropini (HCG) desteği olmayacağından korpus luteum dejenerasyona uğrar, östrojen ve progesteron seviyeleri düşmeye başlar (8). Endometriyum giderek incilir ve menstrual evre başlar. Eğer fertilizasyon olursa, zigot yarıklanmalarını takiben blastosist oluşur. Blastosist endometriyuma implante olmaya başlar. Blastosist endometriyal epitele tutunduktan sonra trofoblastlar hızla çoğalmaya başlar ve yavaş yavaş iki tabakaya ayrılır. Sinsityotrofoblastlarda sentezlenen HCG hormonu, korpus luteumu uyarak östrojen ve progesteron salgılanmasını devam ettirir ve menstruasyon gerçekleşemez (11).

4.1.2. Östrojen Hormonu ve Reseptörleri

Östrojenler 18 karbonlu steroidlerdir. Premenopozal dönemde östrojen over kaynaklıdır. Post menopozal dönemde ise adrenal korteks en önemli kaynaktır. Östrojenler

FSH etkisi altında olan granüloza hücreleri tarafından sentezlenir. Östrojenler plazmada seks hormonu bağlayan globuline (SHBG) bağlı olarak taşınırlar (14). İnsanda üç tip östrojen sentezlenir, östradiol, östron ve östriol. Potent etkisi en yüksek olan östradioldür ve onu östron ve östriol takip eder. Endometriyal siklusun ilk yarısında östrojen hormonu etkisi hakimdir. Endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde, östrojenlerin etkisi altında mitotik indeks ve vaskülarizasyon artar. Proliferasyon oluşur ve oluşan buna bağlı olarak endometriyum kalınlığı artar. Endometriyum bezleri, düz şekillerini korur ve derinliğine büyüme gösterirler (11).

Östrojen reseptörleri sitozolik yerleşimli nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. Östrojen reseptörü alfa ($ER-\alpha$) ve östrojen reseptörü beta ($ER-\beta$) olmak üzere iki adet reseptör belirlenmiştir. $ER-\alpha$ ve $ER-\beta$ benzer büyüklük ve yapısal özelliklere sahiptir. Östrojen, reseptörün karboksil uç kısmına bağlanarak etki göstermektedir (Şekil 1). Çeşitli ısı şok proteinleri (Hsp 90, Hsp 56) östrojenin reseptöre bağlanmasını sağlayarak reseptörde konformasyonel bir değişikliğe neden olmaktadır. Aktivasyondan sonra östrojen reseptör monomerleri arasında protein-protein etkileşimine bağlı olarak dimerleşme ortaya çıkar. DNA'ya bağlanma afinitesinin yüksek olabilmesi için reseptörler arasında ki bu dimerleşmeye ihtiyaç vardır. Reseptör daha sonra duyarlı genlerde östrojene duyarlı elementle (ERE) etkileşerek hedef gen ekspresyonunun uyarımına neden olmaktadır (15,16,17).



Şekil 1: Östrojenin reseptöre bağlanması ve nukleusa transferi sonrası aktivasyonu (18).

Östrojen ve progesteron; pre ve perimplantasyon dönemi boyunca, endometriyumu implantasyona hazırlar ve reseptivitesini düzenler. Endometriyumdaki çok sayıda molekülün salınımı, bu düzenlenmenin sonucunda tetiklenir (19).

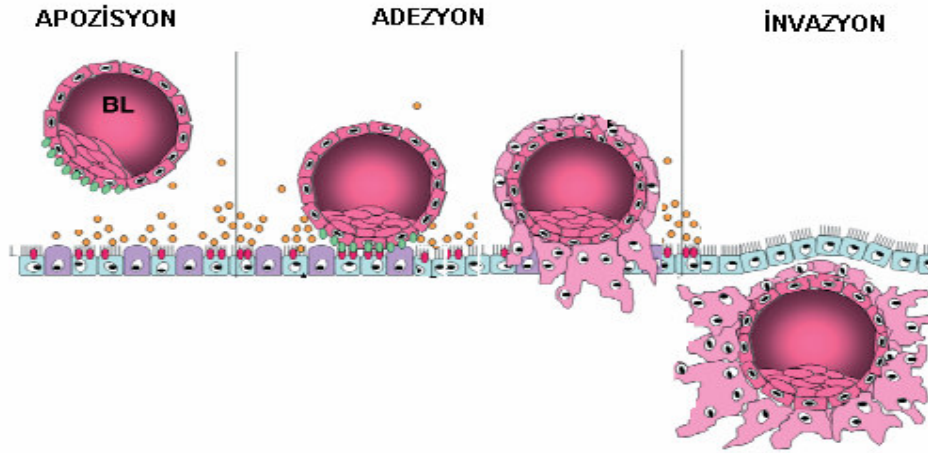
4.1.3. Progesteron Hormonu ve Reseptörleri

Progesteron, 21 karbonlu bir steroid hormondur. Menstrual siklusun ikinci yarısında artar. Ovulasyon sonrası ovaryumda gelişen korpus luteumdan salgılanır. Östrojen reseptörlerini azaltır ve östrojenin uyardığı diğer reseptör sentezlerini inhibe eder. Bu inhibisyon da, östrojenin düzenlediği gen transkripsiyonlarının engellenmesiyle sağlanır (20). Sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve prostoglandinlerin üretimi de yine progesteron ve östrojen tarafından kontrol edilir (21). Progesteron 17- β hidoksisteroid dehidrogenaz (östradiol'ü daha zayıf etkili östron'a çeviren) enziminin aktivitesini artırır. T-lenfositlerini inhibe ederek blastosistin implantasyonunu kolaylaştırır. Progesteron, hedef hücrelerde sitozolde bulunan spesifik bir bağlayıcı proteine bağlanır ve oluşan hormon reseptör kompleksi nukleusa taşınarak hedef gen bölgelerinde transkripsiyonu aktive ederek etki gösterir.

Progesteron reseptörleri (PR) nükleer reseptör ailesinin bir üyesidir. PR ligand yokluğunda transkripsiyonel olarak inaktiftir. Bununla birlikte, ligandın bağlanması ile monomerik reseptör yapısal değişikliğe uğrar ve aktive olur. Diğer bütün nükleer hormonlarda olduğu gibi; PR'de de bir DNA bağlanma bölgesi, bir hormon bağlanma bölgesi ve bir de değişken N-terminal bölgesi mevcuttur (20,22,23).

4.2. İMPLANTASYON VE ENDOMETRİYUM

Embriyo ve endometriyumun aktif bir şekilde aynı anda katıldığı bir hazırlık süreci sonucunda; implantasyon, embriyonun uterus duvarına tutunup içeriye doğru gömülmesi sonucunda gerçekleşen bir süreci ifade eder. İmplantasyon, blastosistin embriyonik kutbundan (iç hücre kümesinin olduğu taraf) başlar. İmplantasyon belirgin, bağlantılı ve ardışık üç evre sonucunda gerçekleşir (Şekil 2). Apozisyon; fertilizasyondan sonra blastosist haline gelmiş olan embriyonun uterusu ulaşması ve implantasyonun gerçekleşeceği uygun yeri seçmesidir. Adezyon; ovulasyondan 7-8 gün sonra zona pellusidadan ayrılmış olan blastosistin endometriyal epitel yüzeyine bağlanmasıdır. Adezyon sekretuar evrede meydana gelir. İnvazyon; embriyonik trofoblastın endometriyuma doğru girmesi sonucunda bazal membranı yok ederek stromaya geçmesi olayıdır (24,25).



Şekil 2: İmplantasyonun apozisyon, adezyon ve invazyon aşamalarından oluşan ardışık üç evresi izlenmektedir (26).

Adezyon molekülleri; implantasyonun gerçekleşmesinde, sinsityotrofoblastların endometriyuma invazyonunda ve bu invazyon olayının sınırlandırılmasında önemli bir role sahiptir (27,28). Ayrıca adezyon moleküllerinin merkezi sinir sisteminde, hücrel oluşum ve farklılaşmada, fonksiyonel bağlantıların kurulmasında, hücre içi ya da hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde, hücre hareketlerinin organizasyonunda, immün ve inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasında kritik rolleri olduğu görülmüştür (29,30).

4.2.1. Trofoblast Hücreleri ve HCG

Trofoblast, blastosisti uterus duvarına bağlar ve embriyonun beslenmesini sağlar. Trofoblast, iki tabaka şeklinde ortaya çıkar. Koryonik villusu örten iç tabaka sitotrofoblast, dış tabaka ise sinsityotrofoblast adını alır (Şekil 3) (31).

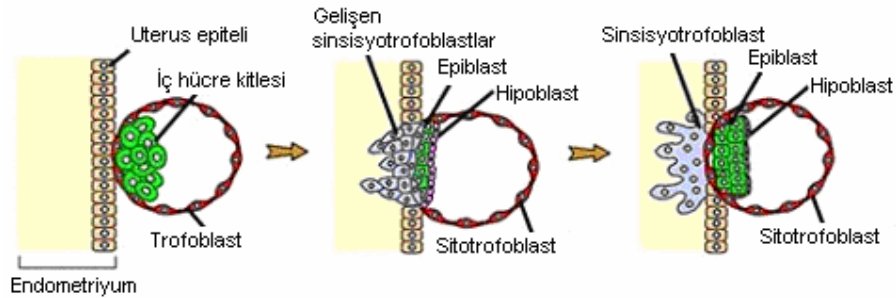
Trofoblast ve endometriyum yüzey epiteli arasındaki başlangıç teması, yüzey epitel hücrelerinin apikal plazma membranları ile trofoblastların plazma membranlarının yaklaşmasıyla meydana gelir. Bu hücreler birbirine paraleldirler ve aralarında 20 nm'lik bir mesafe bulunur. Membran yapının altında bulunan özgün filamentöz ağ, bu hücreler arasındaki hücre-hücre bağlantıları ile hareketsiz bir şekilde desteklenir (32).

Sitotrofoblastlar tek hücreli olarak villus yapısında yer alırlar. Sitotrofoblastlar sitokin ve büyüme faktörleri salgırlar (33). Bazal lamina üzerinde bulunurlar ve hücre sınırları

belirgindir. Sitotrofoblastlar, plasental gelişim sürecinde sinsityotrofoblasta kaynaklık ederler. DNA replikasyonu sonrasında sitotrofoblastlar, mitoz geçirirler. Ancak bu hücrelerin siklik özellikleri farklı olduğundan ve füzyona uğradıklarından başkalaşarak sinsityotrofoblastlara dönüşürler (34).

Sinsityotrofoblastlar amorf şekilli, hücre sınırları belirsiz, çok nukleuslu, şekil ve büyüklüğü değişen hücrelerdir. Sinsityotrofoblastlar; steroidleri, hipofiz hormonlarına benzer hormonları, nörohormonlar-nöropeptidleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgırlar. Blastosistin embriyoner kutbundan ilerleyen sinsityotrofoblastlar, implantasyon alanının ortalarında endometriyal hücrelerin yerine geçerler (11). Sinsityotrofoblastın parmağa benzer çıkıntıları endometriyal epitele doğru uzanır ve bağ dokusu içinde ilerler. Blastosist birinci haftanın sonunda endometriyumun kompakt tabakasına yüzeysel olarak tutunur.

İmplantasyon alanı etrafında stromal bağ dokusu hücreleri glikojen ve lipid ile yüklü hale gelir ve polihedral bir görünüm alır. Bu desidual hücreler bitişik sinsityotrofoblastın penetrasyonu ile dejenere olurlar ve bu sayede sinsityotrofoblastlar parçalanmış maternal dokulardan beslenir. Sinsityotrofoblast tarafından üretilen proteolitik enzimler maternal endometriyumun proteolizini sağlayarak invazyonu kolaylaştırır. Sinsityotrofoblastlar, HCG hormonu üretmeye başlarlar (11).



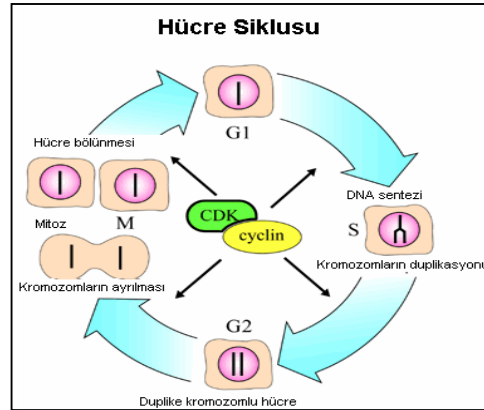
Şekil 3: Trofoblastın, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast tabakalarına farklılaşması ve endometriyal epitele tutunması (35).

HCG, blastosistin trofoblast tabakasından farklılaşan sinsityotrofoblastlarca sentezlenen bir hormondur. 36,7 kDa ağırlığında α ve β olmak üzere iki zincirlidir. Glikoprotein yapıda bir hormondur. Alfa zinciri FSH, LH ve Tiroid Stimulan hormonları ile benzerdir. HCG'nin yarı ömrü 24 saat olup gebeliğin devamında rol oynayan relaksinin salgılanmasını sağlar (36). HCG; COX-2 gen ekspresyonu, prostaglandin biyosentezinde görevli bir enzimi, lösemi inhibitör faktörü (LIF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi birçok uterus faktörünü etkiler (37).

4.3. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu, hücre içeriğinin kopyalandığı ve hücrenin ikiye bölündüğü olayların tümüdür. Siklin ve siklin bağımlı kinazlarca (cdk) kontrol edilen dört farklı evreden oluşur; G1, G2, S ve Mitoz (Şekil 3).

G1 evresi, DNA kopyalanması için moleküllerin sentezi, hücre büyümesi, RNA sentezi ve mitoz için hazırlık safhasıdır. S evresi; DNA sentezi olur ve kromatin oluşması için gerekli nükleoproteinler, histonlar DNA molekülüne taşınıp, birleştirilir. G2 evresi, DNA sentezi biter ve mitoz bölünmenin başladığı evredir. M evresi: Genetik içeriği aynı olan iki yeni hücrenin meydana geldiği evredir. Bir evreden bir diğerine geçiş hücre siklusu kontrol noktaları aracılığıyla gerçekleşir. Hücre siklusunun kontrolü 3 noktada gerçekleşir. Bunlar; G₁, G₂ ve M evresi kontrol noktalarıdır. Bu noktalar sırasıyla; G₁ için S evresine geçişten önceki süreçte, G₂ için M evresine geçişten önceki süreçte, M için de metafaz bitmeden önceki süreçte rol almaktadır (38).



Şekil 4: Hücre siklusunun siklin ve cdk kontrolünde gerçekleşen dört evresi izlenmekte (39).

Hücre proliferasyonunun gösterilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan BrdU inkorporasyonu, DNA sentezinde S fazını göstermek için kullanılır. Timidin analogu olan BrdU in-vitro olarak ortama eklenir ve DNA replikasyonu esnasında timidin yerini alır. BrdU'nun belirlenebilmesi için DNA'nın önce enzimlerle denatüre edilmesi gereklidir. Denatürasyon işleminden sonra BrdU DNA'ya inkorpore olur ve S fazında olan ve ortama verilen BrdU'yu DNA sentezinde kullanan hücreler spesifik anti-BrdU antikolarıyla immünohistokimyasal olarak gösterilebilir (40).

4.4. ISHIKAWA HÜCRE SOYU

Ishikawa hücreleri ilk olarak Nashida tarafından tanımlanmıştır. Bu hücreler, iyi diferansiye olmuş endometriyal kanser hücreleridir. Yapılarında ER ve PR bulunur. Bu özellikleri ile insan endometriyum epitelinin hormonal düzenlenmesi çalışmaları için mükemmel bir model oluşturur (41). Aynı zamanda östrojene bağımlılık göstermemelerinden dolayı, östrojen içermeyen ortamlarda gelişimlerini sürdürebilirler. Üstelik bu hücrelerde, normal endometriyumdaki aynı enzimler ve yapısal proteinler bulunmaktadır. Ayrıca, Ishikawa hücreleri implantasyon biyolojisi çalışmak amacıyla tercih edilen bir hücre soyudur (6).

4.5. β KATENİN

β -katenin 781 aminoasitten oluşan 92kDa'luk bir proteindir. Temel yapısı 100 aminoasitlik bir karboksi-terminal uç ve 130 aminoasitlik bir amino uç ile 42 aminoasitten oluşan arm benzeri tekrar bölgesi (drosophila segment polarite geni armadillo'da tespit edilen tekrar bölgeleri) içerir. Amino ucu β -katenin stabilitesinin sağlanmasında, karboksil ucuda transkripsiyon aktivitesinde önemli rol oynar (42,43).

Arm tekrar bölgesinin süper helikal tarzda bükülmesi, β -kateninin kaderin molekülü, adenomatöz polipozis koli (APC), aksin ve TCF/LEF ailesine bağlanmasını düzenler (44,45). β -kateninin amino terminal ucu serin/treonin içeren ve fosforilizasyon işlevinin olduğu yerdir. Karboksi-terminal ucu ise DNA ile aktivasyona girdiği fonksiyonel bölgesidir (Şekil 5) (43).

β -katenin, epitelyal hücrelerin sitoplazmasında ve plazma hücre membranında yer alır. β -katenin, katenin ailesinin bir üyesidir (β -katenin, α -katenin, γ -katenin). Kateninler arasında α -kateninin görevi, β -katenin ve γ -katenin'in kaderinle birleşimidir (46). Katenin-kaderin kompleksi hücre-hücre adezyonun düzenlemesinde görev alır. Molekül ağırlıkları 120.000-140.000 kDa arasında değişen kaderinler, kalsiyum bağımlı transmembranik yerleşimli homofilik adezyon reseptörleri olup yapıları N ve C terminali içeren iki bölgeden oluşur. Kateninlerle ilişkisini sağlayan özelleşmiş bölge, C terminalinin bulunduğu bölgedir. Doku farklılaşmasında, özellikle de embriyonun preimplantasyonun da önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir. Embriyo henüz morula safhasındayken, blastomerler arasında bağlantının

kurulması ve hücrel bütünlük, kaderinler sayesinde gerçekleşir. Bu olayda özellikle E-kaderin etkin rol oynar (47,48).

β -katenin; hücre-hücre adezyonu, embriyonik gelişim, hücre diferansiyasyonu ve malign tümör transformasyonuna dahil olan multifonksiyonel bir proteindir. β -katenin hücre tomurcuklanmasını etkiler, dorsovertebral asimetride ve dolayısıyla da vücut ekseninin embriyolojik oluşumunda direk rol oynar. Zonula aderens bağlantı kompleksindeki fonksiyonu ile yara iyileşmesinde etkilidir ve oluşacak defektler kanser gelişimine yol açabilir (49).

4.5.1. β Katenin/WNT Sinyal Yolu

β -kateninin, hücre-hücre adezyonunda ve Wnt sinyal yolunda önemli rolleri bulunmaktadır (50). β -katenin etkilerinin ortaya çıkması için ilk olarak Wnt proteinlerinin frizzled (Fzd) ailesine ait reseptörlere bağlanması ve Wnt sinyalizasyon yolunun aktifleşmesi gerekir (43). Wnt proteinleri, hücre diferansiyasyonu, migrasyonu, hücre polaritesi ve proliferasyonunda rol oynayan sinyal proteinlerinden meydana gelir. Bu Wnt proteinleri de Wnt1 ve Wnt5a'dan oluşur. Wnt1 proteinleri Xenopus'un erken embriyolojik gelişimini etkilediği gibi, Wnt5a proteinler de morfogenez hareketleri etkiler ve Wnt1 sınıfı proteinleri antagonize ederler. Bu iki sınıf wnt proteinin farklı etkileri onlarla ilintili iki sinyal ileti yolağı olmasından kaynaklanır. Kanonikal olarak bilinen Wnt1 sınıfı proteinlerin görev aldığı yolak, genellikle β -katenin üzerinden sinyal iletilmesini ve kök hücrelerin kendilerini korumasını sağlar fakat kanser hücrelerinin malign karakter kazanmasında da rol oynar. Wnt5a sınıfı proteinlerle ilişkili kanonikal olmayan yolak ya da başka bir deyişle Wnt / Ca^{++} yolağı ise hücre içi kalsiyum salınımını artırarak sinyal iletilmesinde, hücre göçünde ve dokuların organizasyonunda görev alırlar (51).

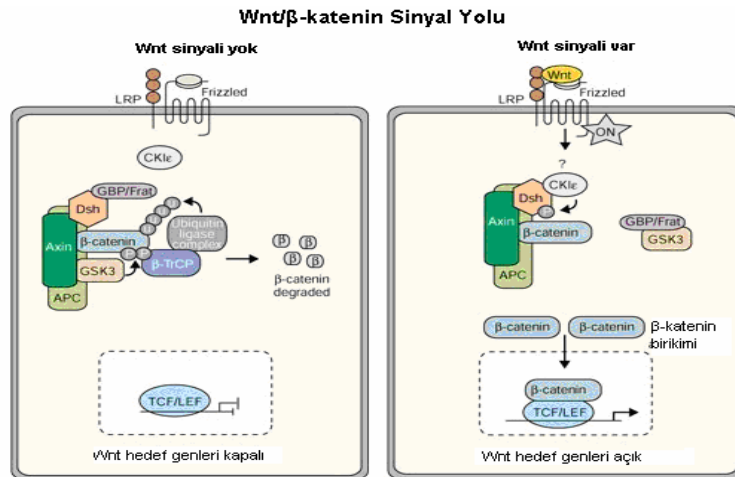
Wnt ligandları Fzd reseptörleri ve ko-reseptörleri LRP5 ve LRP6 (Reseptör İlişkili Protein) bağlanarak sinyal yolağını başlatırlar. Wnt/ β -katenin sinyali sadece Fzd ve LRP5/6 Wnt ligandları ile kompleks oluşturduğu zaman aktive olur. Dickkopf (Dkk) proteinleri LRP ko-reseptörlerine bağlanıp, Wnt'nin LRP'lerle etkileşimini engelleyerek potansiyel olarak Wnt sinyalini inhibe eder ve başlamadan bu yola engel olabilirler (52).

Wnt sinyal yolu aktif olduğunda; Wnt'nin Fzd reseptörüne bağlanması, sitoplazmada DSH (Dishevelled) aktivasyonuna ve aksin'in yıkımına neden olur. DSH'in aktivasyonu

sonucunda Glikojen sentetaz kinaz 3 β (GSK-3 β) inhibe olur ve β -katenin fosforilasyonu gerçekleşmez. β -katenin sitoplazmada birikir ve sitoplazmadaki bu birikim neticesinde nukleusa transloke olur. β -katenin birikimi sonucu sitoplazmada başlıca iki mekanizma tetiklenir. Birinde; β -katenin hücre membranındaki Kaderin'in hücre içi bölümüne bağlanarak, hücreler arasındaki bağlantıyı güçlendirir. Diğerinde ise; nukleusa girerek TCF/LEF transkripsiyonel faktörüne bağlanır ve bu sayede hücre proliferasyonunu ve polarizasyonunu değiştirir (Şekil 4) (53,54).

Wnt sinyal yolu aktif değilse DSH de aktif değildir ve kazein kinaz 1'in β katenini serin 45 bölgesinden işaretlemesinin ardından GSK3 β ; threonin 41, serin 35 ve serin 33'ü sırasıyla fosforilize eder. Fosforilize β katenin, E3 ubikuitin ligaz kompleksi olan β transdusin tekrarları içeren protein (β -TrCP) tarafından bağlanır. β -TrCP, β -kateninin proteozom tarafından tanınmasını ve yıkılmasını sağlar. Özetle GSK3 β , APC ve aksinden oluşan kompleks β -kateninin proteozom tarafından tanınmasını sağlayarak, yıkımına yol açar (55,56).

76 aminoasitten oluşan bir polipeptid olan ubikuitin, bir proteinin lizis yan zincirlerinin amino grubuna bağlanarak o proteini işaretler. Daha sonra bu yapıya yeni ubikuitinler eklenerek bir multiubikuitin zinciri oluşturulur. Böylece çok sayıda ubikuitin ile işaretlenmiş olan protein oldukça iri ve çok sayıda alt birimden oluşmuş bir proteaz kompleksi olan proteozom tarafından yıkılır (57). Bu durumda β -katenin miktarı sitoplazma ve nukleusta yok denecek kadar azdır. Wnt/ β -kateninin sinyal ileti yolağının sorumlu olduğu proliferasyon ve farklılaşma ile ilgili hedef genler, yardımcı reseptör proteini ile bağlı olan TCF/LEF transkripsiyon faktörleri tarafından baskılanmaktadır (42).



Şekil 5: Wnt/ β -katenin sinyal yolağı (58).

Nükleer β -katenin; çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eden TCF/LEF ile bir kompleks oluşturur ki bu TCF/LEF yapısı da c-myc, c-jun, fra-1 ve cyclin D1 içerir. Daha önceden de ifade edilen hücre döngüsünün G1 ile S fazı arası, β -katenin ekspresyonu ile bloke olur ve bu da DNA hasarına neden olur. Wnt sinyal iletim yolağında bulunan β -katenin, APC, Aksin ve Tcf-1 gibi çeşitli proteinler, onkogen veya tümör supressörü olarak da önemli rollere sahiptir. Bu supressörlerden Aksin, APC/GSK3 β /CKI α kompleksine bağlanan intersellüler proteindir (59,60). Tümör hücrelerinde β -kateninin fosforilasyonunu inhibe eden mekanizmalar, E3 ubiquitin ligaz reseptörü ile β -TrCP arasındaki etkileşimi bloke eder. Ubiquitin'in düzenli proteozomal degradasyondan kaçarak stabilize olmasının bir sonucu olarak β -kateninin onkogenik aktivasyonu ortaya çıkar. β -kateninin stabilitesinin ve aktivitesinin temel regülatörü; β -TrCP-1 ve β -TrCP-2 içeren, β -TrCP alt familyası olan F-box proteinleridir (49).

4.6. NÜKLEER FAKTÖR- κ B (NF- κ B)

NF- κ B; (nükleer faktör-kappa B), transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir. Bütün hücre tiplerinde bulunur ve stres, sitokinler, serbest radikaller, ultraviyole ışınları, bakteriyel ve viral ajanlar gibi uyarılara hücrel cevap oluşturmada görev alır.

NF- κ B, indükleyici nitrik oksit sentaz ve COX-2 gibi indükleyici enzimler, büyüme faktörleri, kemokinler, adezyon molekülleri ve proinflamatuvar sitokinleri kodlayan genlerin regülasyonu ile immün ve inflamatuvar cevapların oluşturulmasında önemli rol oynar (61).

NF- κ B; ailesinin her üyesi rel-homoloji domain (RHD) denen amino-terminal bir alan içerir. Bu alanda DNA-bağlanma, dimerizasyon alanı ve nükleer lokalizasyon sinyal (NLS) bölgesi bulunur.

Memeli hücrelerinde NF- κ B ailesinin üyesi olan beş protein saptanmıştır:

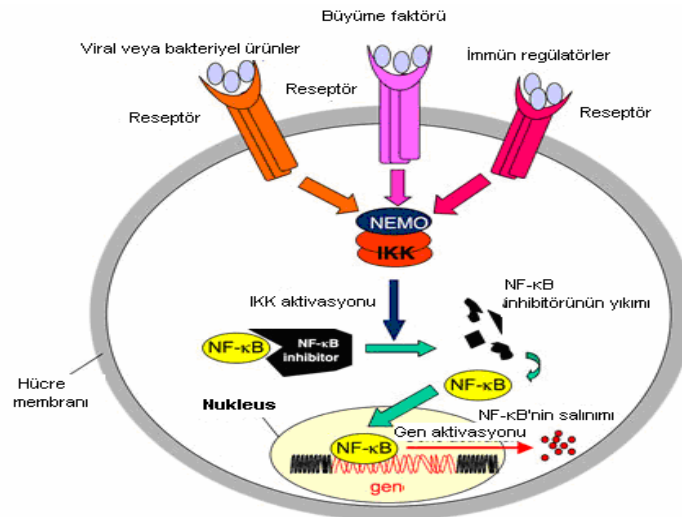
1. NF- κ B; 1 (p50/p105)
2. NF- κ B; 2 (p52/p100)
3. RelA (p65)
4. RelB
5. c-Rel

NF- κ B; Rel ailesi üyelerinin hetero ve homodimerler olarak düzenlenmiştir. NF- κ B'nin homodimer ve heterodimerleri sitoplazma içindedirler. Sitoplazmik bir inhibitör protein olan I κ B tarafından inhibe edilirler (61).

NF- κ B aktivitesinde; I κ B- β , I κ B- α , I κ B- γ , I κ B- ξ ve Bcl-3 rol oynar. NF- κ B'nin aktivasyonunda en önemli basamak I κ B'ların 700–900 kDa multimerik kompleksler ile fosforilasyonudur; bunun sonucunda I κ B kinaz (IKK) kompleksi oluşur. IKK kompleksi iki katalitik alt üniteden (IKK1 / IKK α ve IKK2/ IKK β) oluşur (61). IKK α ve IKK β kinazları NF- κ B yolağı için iki kritik aktive edicidir. Bu iki kinaz aynı zamanda, β -Katenin fonksiyonlarının regülasyonu açısından da önem taşır (62). NF- κ B için gerekli alt düzenleyiciler ise NEMO, IKK, FIP-3'tür. NEMO'nun kendisi kinaz olmamakla beraber önemli protein-protein ilişkisine aracılık eder (63).

4.6.1. NF- κ B Sinyal Yolu

NF- κ B; transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir. NF- κ B; inhibitörü olan I κ B ile kompleks halde inaktif olarak sitoplazma içinde bulunur. Ligandlar, hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlandıklarında, NF- κ B'nin uyarı düzenleyici proteinleri olan, I κ B- α ve I κ B- β 'nin N-terminallerindeki serin 32 ve 36 kalıntıları, fosforilize olur. Fosforilasyon sonrası I κ B'ler ubiquitinize olur ve proteolitik yolla yıkılırlar. I κ B nin yıkımı sonrası sitoplazmada serbest kalan NF- κ B nükleusa transloke olur. Aktive NF- κ B; nükleusta spesifik genlerin başlatıcı veya arttırıcı bölgelerine bağlanarak ilişkili transkripsiyonu düzenler (64,65).



Şekil 8: NF- κ B sinyal yolunun aktivasyon mekanizması (66).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

- 1) 17- β -estradiol, Sigma
- 2) Hidroksiprogesteron kaproat, Schering,
- 3) HCG, Organon, 5000 IU/ml
- 4) NaCl, Atabay AT091-950
- 5) Na₂HPO₄, Riedel-de Häen 81890
- 6) NaH₂PO₄, Riedel-de Häen 8210A
- 7) HCl, Merck K23226314 632
- 8) DMEM, Sigma D5546
- 9) Nutrient mixture F-12, Sigma N6658
- 10) L-Glutamin, Biological Industries 03-020-IC
- 11) Penisilin+Streptomisin, Biological Industries 03-031-1C
- 12) Fetal Sığır Serumu, Seromed S0115
- 13) Anti- β -katenin antikoru, Cell Signaling Techonology, 9562
- 14) Anti-BrdU antikoru, Neomarkers MS-1058
- 15) Anti NF- κ B antikoru, Santa Cruz, Sc-109
- 16) Histostain Plus Kit, Zymed 85-8943
- 17) Aminoetilkarbazol (AEC), Lab Vision TA-060-HA
- 18) Metanol, Riedel-DC-Haen 24229
- 19) Tripsin EDTA, Biological Industries 243338
- 20) DMSO, Sigma D 2650
- 21) Borik Asit, Sigma B0252
- 22) Sodyum tetra borat, Sigma B0127
- 23) Tripan mavisi, Sigma

5.2. KULLANILAN YÖNTEMLER

5.2.1. Hücre Kültürü

İyi diferansiye endometriyum tümöründen elde edilmiş hücre soyu olan Ishikawa hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS) ve antibiyotikler (100 unite/ml penisilin G, 100 µg/ml streptomisin) içeren Dulbecco's modified Eagle's /F12 medyum içerisinde 37 °C de %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli inkübatörde büyütüldü. Deneyleerde, kontrol grubu hücreler normal medyumları içerisinde tutuldu. Östrojenin etkilerini belirlemek amacıyla oluşturulan deney grubunda medyum içerisinde 0.4 µM 17-β-estradiol eklendi. Progesteronun etkilerinin inceleneceği gruba 1 µg/ml hidroksiprogesteron kaproat uygulandı. İnsan koryonik gonadotropin grubuna ise 20 ng/ml ilaç uygulandı. Tüm çalışma gruplarında 24 saatlik inkübasyon sonrasında deney sonlandırıldı.

5.2.2. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi

5.2.2.1. BrdU İmmünotokimyası

Hücreler lameller üzerinde ekildikten 2 gün sonra PBS ile yıkayıp metanol ile 5 dakika -20°C'de fikse edildi. Proliferasyon indeksi tayini için S faza özgü BrdU işaretlemesi kullanıldı. Anti- BrdU monoklonal antikoru ile immünotokimyasal boyama yapılacak hücreler, fiksasyon öncesi BrdU (1mM) ile 1 saat 37°C'de inkübe edildi. PBS yıkamalarını takiben hücrelerin çift zincirli DNA'sı 2N HCl ile 37°C'de 30 dakika denatüre edildi. Borat tampon ile (pH 8) nötralize edildikten sonra, PBS yıkamalarını takiben spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için bloking işlemi uygulandı (Histostain Plus Kit, Zymed).

Anti-BrdU mouse monoklonal antikoru (NeoMarkers) ile 1 saat oda ısısında (1.5/300) inkübe edildi. Sırasıyla streptavidin ve biyotin-HRP bağlı sekonder antikorlarla 20 dakika inkübasyon gerçekleştirildi (Histostain Plus Kit, Zymed). Aminoetilkarbazol (AEC) kromojeni uygulaması sonucu oluşan spesifik kırmızı renk reaksiyonu, Olympus BX 50 ışık mikroskobunda değerlendirildi.

5.2.2.2. β -katenin ve NF- κ B İmmünohistokimyası

NF- κ B ve β -katenin ekspresyon düzey ve lokalizasyonlarının immünohistokimyasal incelemesi için lameller üzerine ekilmiş olan hücreler -20°C de metanol ile 5 dakika fikse edildi. Spesifik olmayan boyanmaları engellemek için non-immün serumla (Histostain Plus Kit, Zymed) 20 dakika bloklama işlemi yapıldı. Bu işlem sonrasında anti- β -katenin monoklonal primer antikoru ile $5\mu\text{l/ml}$ dilüsyonda, anti-NF- κ B rabbit poliklonal primer antikoru ile $3.5\mu\text{l/ml}$ dilüsyonda oda ısısında bir saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben biotinle işaretli sekonder antikor 20 dakika uygulandı. PBS yıkamalarını takiben streptavidin enzim konjugatıyla 20 dakika inkübasyon yapıldı ve yıkamalar sonrasında AEC kromojeni uygulandı. Kromojen aşamasında invert mikroskopta yapılan incelemede spesifik renk reaksiyonu izlendikten sonra reaksiyon durduruldu. Su bazlı kapatma solüsyonuyla örnekler kapatıldı. Daha sonra Olympus BX 50 ışık mikroskopunda değerlendirilerek fotoğraflandırdı.

5.2.3. İstatistiksel İnceleme

BrDU işaretli S fazındaki hücrelerin oranı üç kez tekrarlanan deney sonuçlarının değerlendirilmesiyle hesaplandı. Proliferasyon indeksi, mikroskop alanındaki pozitif işaretli hücrelerin/toplam hücre sayısına oranı alınarak bulundu.

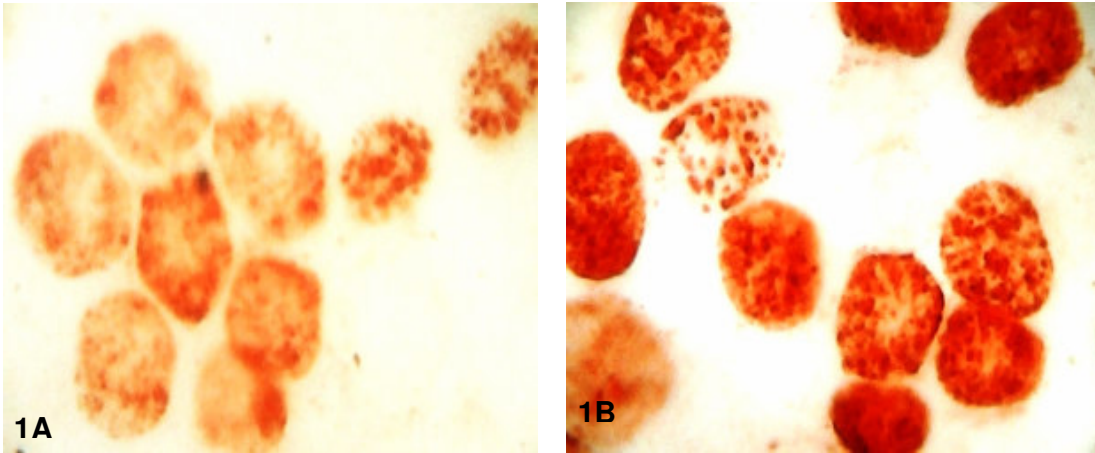
İstatistiksel inceleme, Sosyal Bilimler için İstatistik Programı (SPSS 10.0) ile çoklu grup karşılaştırmaları için Kruskal Wallis, ikili grup karşılaştırmaları için Mann Whitney-U testleri uygulanarak değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN BROMODEOKSİÜRİDİN İLE GÖSTERİLMESİ

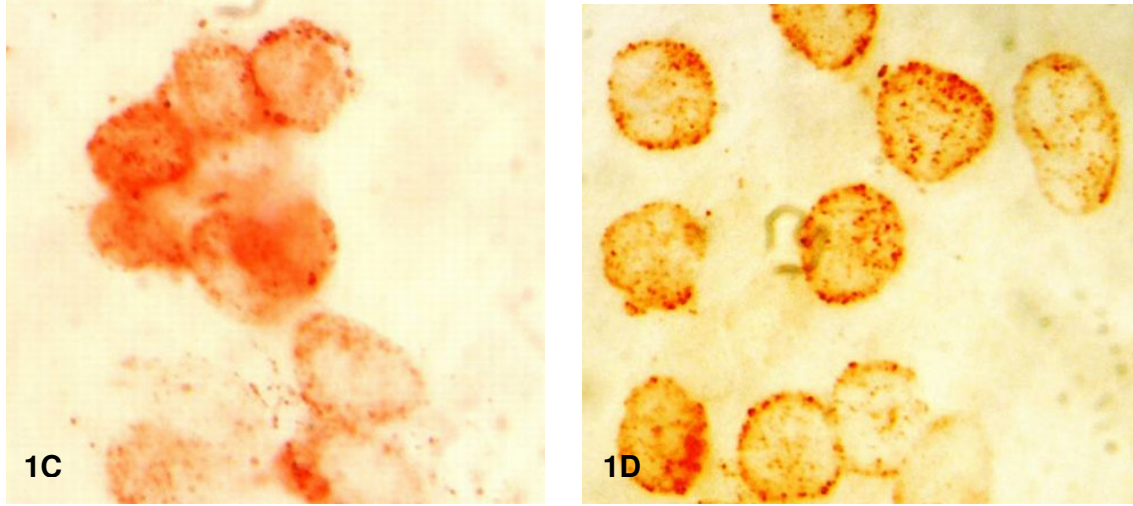
Endometriyal siklus evrelerinde rol alan östrojen, progesteron ve implantasyonda rol oynayan sinsisyotrofoblastlarca sentezlenen insan koryonik gonadotropinin endometriyum hücrelerinde proliferasyon üzerine etkileri S fazındaki hücrelerin işaretlenmesi temeline dayanan BrdU immünohistokimyası ile gösterildi.

Kontrol grubu hücrelerde saptanan BrdU işaretli S faz hücreleri oranı (56.50 ± 7.87) (Resim 1A) ile karşılaştırıldığında 24 saatlik 17- β -östradiol inkübasyonu sonrasında BrdU işaretli hücre oranında (67.00 ± 6.42) artış saptandı. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Ayrıca östrojen uygulanan hücrelerde BrdU inkorporasyonunda belirgin olarak artış izlendi (Resim 1B).



Resim 1A, B: Kontrol grubu endometriyal hücrelerde BrdU işaretli S fazındaki hücreler (A). 17- β -östradiol inkübasyonu uygulanan östrojen grubu hücrelerde işaretli S faz hücreleri ve BrdU inkorporasyonunda artış izlenmekte (B).X600

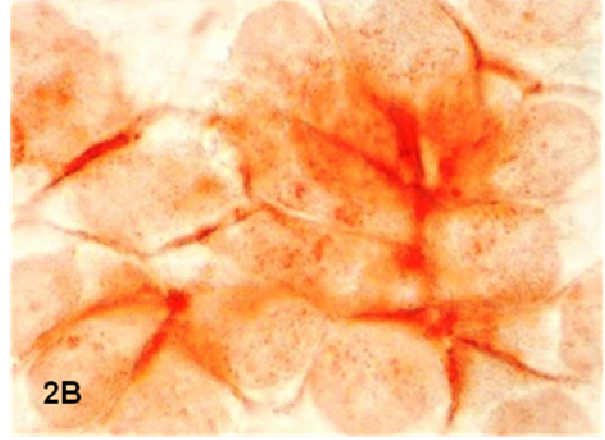
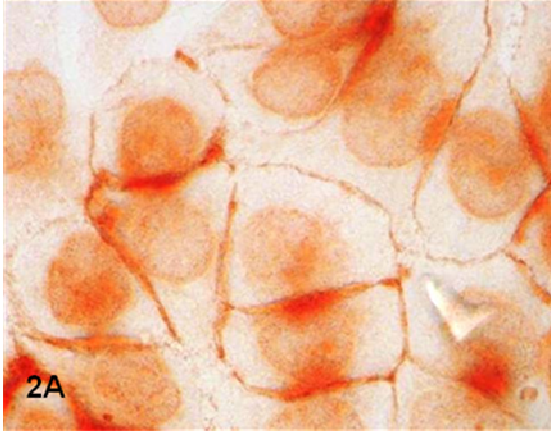
Progesteron ve insan koryonik gonadotropini uygulanan (Resim 1C ve 1D) deney grubu hücrelerde S fazındaki hücrelerin oranları (sırasıyla 55.70 ± 6.21 ve 57.30 ± 5.41) kontrol grubuyla benzer bulundu. Progesteron ve insan koryonik gonadotropini deney gruplarının proliferasyon indeksleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$). Bu deney gruplarında BrdU inkorporasyonunun da kontrol grubu hücrelerle benzer yoğunlukta olduğu gözlemlendi.



Resim 1C, D: Progesteron uygulanan endometriyal hücreler (C) ve HCG uygulanan hücrelerde (D) kontrol grubuna benzer proliferatif hücre oranları izlendi.X600

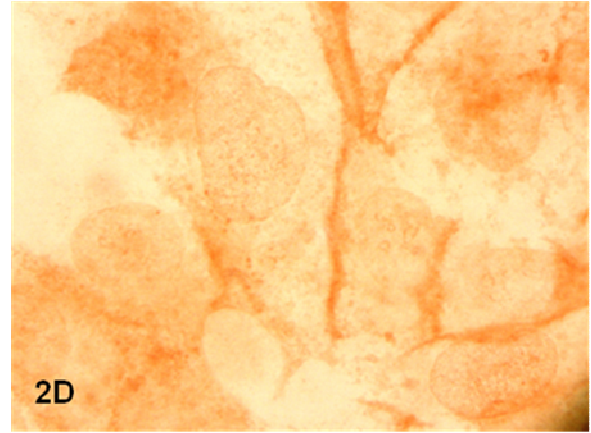
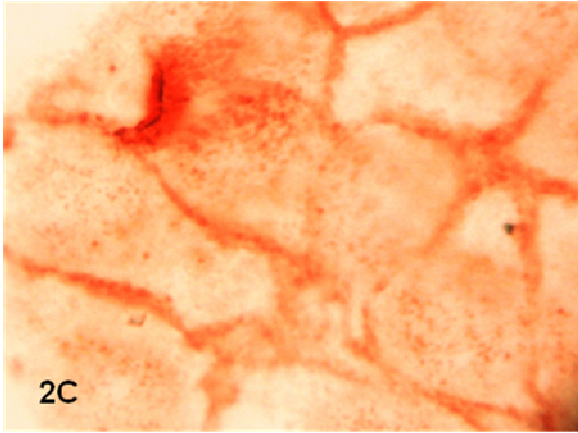
6.2. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE β -KATENİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

Kontrol grubunda, β -katenin ekspresyonu endometriyal hücrelerde plazma membranının intraselüler sınırları boyunca belirgin olarak izlendi (Resim 2A). Östrojen inkübasyonu sonrasında, hücrelerde β -katenin ekspresyonunda bir değişiklik gözlenmedi ve ekspresyon kontrol grubu hücrelere benzer şekilde membrana lokalize olarak izlendi (Resim 2B).



Resim 2A, B: Kontrol grubu (A) ve 17- β -östradiol inkübasyonu uygulanan (B) hücrelerde β -katenin ekspresyonu plazma membranına lokalize ve benzer immün yoğunlukta izlendi. X600

Progesteron uygulanan deney grubunda, kontrol ve östrojen gruplarına benzer olarak plazma membranına lokalize β -katenin ekspresyonu izlendi (Resim 2C). İnsan koryonik gonadotropini ile 24 saatlik inkübasyon sonrasında ise membran yerleşimli β -Katenin ekspresyonunun kısmen azaldığı izlendi (Resim 2D).

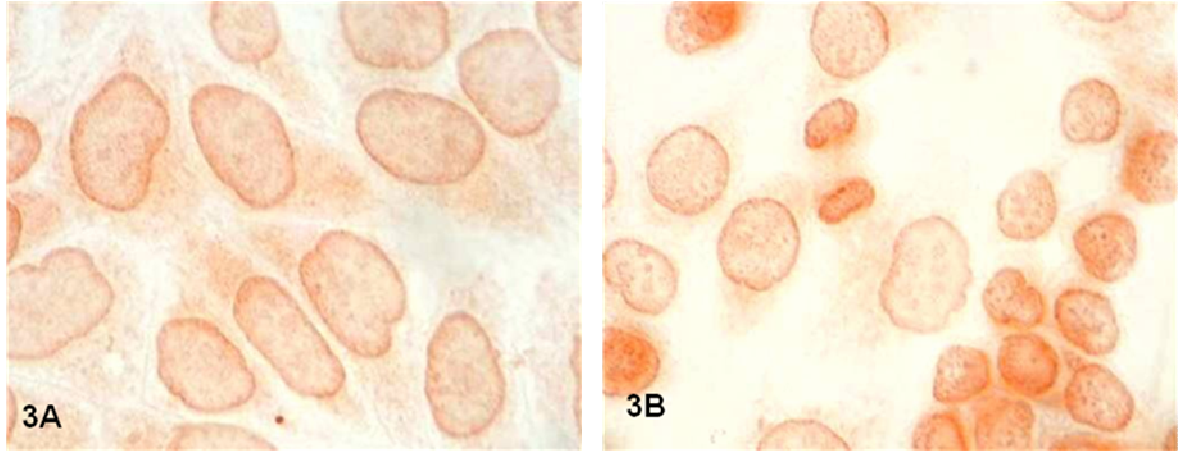


Resim 2C, D: Progesteron uygulanan endometriyal hücrelerde β -katenin ekspresyon ve lokalizasyonunda bir değişiklik izlenmedi (C). HCG uygulanan hücrelerde (D) plazma membranındaki β -katenin ekspresyonunda azalma izlendi. X600

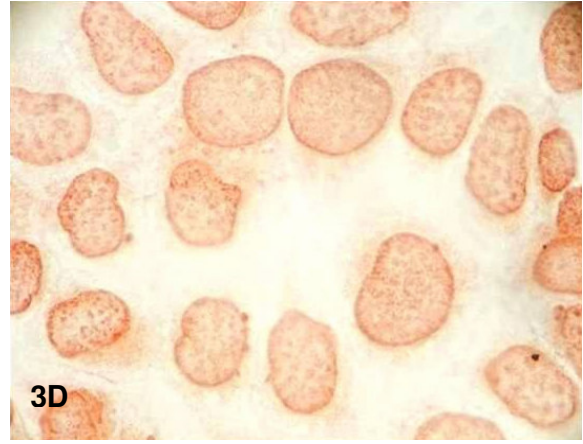
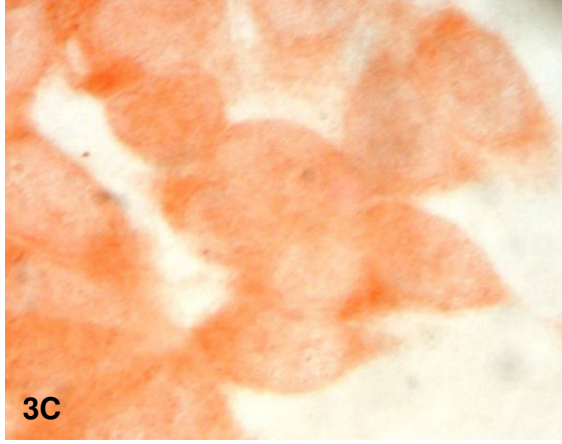
6.3. ÖSTROJEN, PROGESTERON VE HCG HORMONLARININ ENDOMETRİYUM HÜCRELERİNDE NF-κB EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

NF-κB aktivitesi, NF-κB ailesinin alt üyesi olan p65'e özgü anti- NF-κB primer antikor ile yapılan immünohistokimya ile belirlendi. Kontrol grubu endometriyal hücrelerde sınırlı bir nükleer NF-κB ekspresyonu izlendi (Resim 3A). 17-β östradiol uygulanan grubun NF-κB ekspresyon düzeyi kontrol grubu hücrelerle karşılaştırıldığında belirgin bir değişiklik izlenmedi (Resim 3B).

Progesteron uygulanan grupta ise sitoplazmik NF-κB ekspresyonunda bir artış izlendi (Resim 3C). HCG uygulanan deney grubunda ise NF-κB ekspresyon düzeyleri kontrol ve östrojen gruplarına benzer özellikte izlendi (Resim 3D).



Resim 3A, B: Kontrol grubu endometriyal hücreler (A) ve 17-β östradiol uygulanan hücrelerde NF-κB ekspresyon düzeyi kontrol grubu hücrelere benzer immün yoğunlukta izlendi. X600



Resim 3C, D: Progesteron uygulanan endometriyal hücrelerde sitoplazmik NF- κ B ekspresyonunun arttığı izlendi (C). HCG uygulanan hücrelerde (D) ise NF- κ B ekspresyonu kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi. X600

7. TARTIŞMA

Endometriyum, steroid hormonların kontrolü altındadır. Östrojen, progesteron ve HCG hormonları, endometriyal siklus sırasında önemli rol oynar. Endometriyal siklusun ilk evresi östrojen hormonun kontrolü altındadır. Östrojen hormonunun epiteliyal hücrelerde ve endometriyum bezlerinde proliferasyona yol açtığı bilinmektedir (12). Çalışmamızda da 17- β östradiol inkübasyonu uygulanan deney grubunun proliferasyon değeri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında işaretli S faz hücre oranının ve BrdU inkorporasyonun arttığı izlenmiştir. Progesteronun, endometriyum yüzey epitel ve bezlerinde östrojenin etkisini inhibe ederek proliferasyonu azalttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (67,68). Çalışmamızda 24 saat progesteron inkübasyonu uygulanan hücrelerin proliferasyon oranlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında inhibisyon izlenmedi. Bu sonuç, progesteronun proliferasyonu inhibe edici etkisinin zamana bağlı olarak değişebileceğini düşündürmektedir. İnsan koryonik gonadotropin hormonunun ise endometriyum stromal hücrelerinde proliferasyonu inhibe edici etki gösterdiği bildirilmiştir (69,70). Ancak HCG'nin endometriyum yüzey epiteli ve bez hücrelerinde proliferasyon üzerine olan etkileri in-vivo ve in-vitro çalışmalarla netlik kazanmamıştır. Çalışmamızda epiteliyal endometriyum hücrelerinde, deney grubuna uygulanan doz ve sürede HCG'nin proliferasyon oranlarını artırıcı ya da inhibe edici bir etkisi gözlenmemiştir. Elde ettiğimiz sonuç bize epiteliyal hücrelerin stromal hücrelerden farklı özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Adezyon molekülleri; implantasyonun gerçekleşmesinde, trofoblastın endometriyuma invazyonunda ve sınırlandırılmasında önemli rol oynar (19). Ayrıca, merkezi sinir sisteminde hücrel oluşum ve farklılaşmada, fonksiyonel bağlantıların kurulması, hücre içi ya da hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde, hücre hareketlerinin organizasyonunda, immün ve inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasında adezyon moleküllerinin oldukça önemli rolleri olduğu tanımlanmıştır (29,30).

Kaderin; adezyon moleküllerinden biri olup, kateninlerle kompleks oluşturarak hücreler arası adezyonu düzenler. E-kaderinin, doku farklılaşmasında, özellikle de embriyonun preimplantasyonunda önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (30). E-kaderin ektoderm veya endoderm kaynaklı proliferasyon olan tüm epitelyal hücrelerde ekspres edilir. E-kaderin epitelyal hücreler arasında adezyon oluşumunda ve onları bir arada tutmada anahtar role sahiptir (71). E-kaderin hücre iskeletine α , β ve γ katenin molekülleri aracılığıyla bağlanır.

β -katenin hücre-hücre adezyonunda, wnt sinyal yolağında, embriyonik gelişimde, hücre farklılaşmasında ve malign tümör transformasyonunda rol oynayan multifonksiyonel bir proteindir (42). E-kaderin, α ve β -katenin mRNA'sı endometriyumun proliferasyon evresinde sekretuar fazla karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük bulunmuştur (72). Östrojen hormonu kontrolünde gerçekleşen proliferasyon evresi ve progesteron kontrolünde gerçekleşen sekretuar evreye ait in-vitro çalışma modeli gruplarımızda β -katenin ekspresyon düzeylerinde bir farklılık saptamadık. Sıçan ovaryumlarında yapılan bir çalışmada, HCG verilmesi sonrası α -katenin ve E-kaderin ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (73). Ayrıca korpus luteumda yapılan bir çalışmada HCG verilmesini takiben okludin protein ekspresyonunda azalma saptanmıştır (74). Mevcut çalışmalar HCG'nin reproduktif organ ve oluşumlarda hücre adezyon moleküllerinde bir azalmaya yol açtığını göstermektedir. Biz de, endometriyal epitel hücrelerinde HCG hormonu ile inkübasyon sonrasında membran yerleşimli β -Katenin ekspresyonunun azaldığını tespit ettik. Bu bulgu, implantasyon döneminde trofoblastların invazyonu sürecinde endometriyum hücreleri arasındaki adezyon molekülleri ekspresyonunda olası bir değişikliğin gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Ovaryum yüzey epiteli hücrelerinde gonadotropinlere yanıt olarak N kaderinin azaldığı ve β -kateninin hücre zarından, sitoplazmaya ve nukleusa doğru dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Kaderinin olmadığı ortamda ise β -katenin birikiminin, indüklenmiş TCF transkripsiyon aktivasyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (75). Çalışmamızda endometriyal epitel hücrelerinde HCG varlığında adezyon bölgesinde azalmış bulunan β -kateninin ekspresyonunun sitoplazmik yada nükleer ekspresyona yol açmadığını gördük. Bu sonuçlar, wnt sinyal yolundan bağımsız etki gösterdiğini ve β -kateninin fosforile olarak yıkıldığını düşündürmektedir.

NF- κ B, transkripsiyon faktörü olan bir protein kompleksidir. Bütün hücre tiplerinde bulunur. NF- κ B; yangı olayında ve enfeksiyonlara karşı immün cevabın hazırlanmasında anahtar rol üstlenir (61). NF- κ B de β -katenin gibi, gen ekspresyonu ve hücre proliferasyonu açısından önemli bir regülatör proteindir (76). β -katenin seviyelerinin regülasyonunda önemli bir rolü bulunan GSK-3 β 'nin; NF- κ B aktivasyonunun regülasyonu açısından da önemli bir kinaz olduğu ortaya çıkarılmıştır (62).

Endometriyal siklusun üç evresi değerlendirildiğinde; östrojenik ve mensturasyon evrelerinde NF- κ B'nin aktif olduğu, progesteronun ise aktivitesini azalttığı bildirilmiştir (5). Progesteron reseptöründen yoksun nakavt farelerde uterusu yüksek inflamasyon görülmesi

sonucu, progesteron reseptör aktivitesinin NF-κB aracılı inflamatuvar cevapda etkili olduğu ileri sürülmüştür (77). Shyamala ve Guiot'a göre; ekzojen östrojen, fare uterusundaki NF-κB aktivasyonunu indüklemektedir (78). İn-vitro deneyler; progesteronun, progesteron reseptörü ve p65 proteini arasındaki inaktif kompleks formasyonunu indükleyerek NF-κB'nin transkripsiyonel aktivasyonunu baskıladığını ortaya çıkarmıştır (79). Çalışmamızda, progesteron uygulanan grupta anti-NF-κB'nin p65 alt ünitesine ait immün ekspresyonun sitoplazmik olduğu ve diğer deney gruplarına göre artmış olduğu izlendi. Sitoplazmik lokalizasyonlu ekspresyon NF-κB'nin inaktif formda olduğunu göstermekte ve progesteronun NF-κB aracılı inflamatuvar yanıt oluşumunu inhibe ettiğini desteklemektedir. Ancak östrojen uygulanan deney grubu, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında NF-κB'nin transkripsiyon aktivasyonunu artırdığını destekleyen nükleer ekspresyon artışı tespit edilmemiştir.

İmplantasyon dönemi endometriyumun inflamatuvar bir süreci olarak değerlendirilmekte ve NF-κB sinyal yoluyla ilişkilendirilmektedir. İmplantasyon ve ilk trimesterde endometriyal NF-κB'nin immüsupresif mekanizmanın düzenlemesiyle ilişkili olarak inhibe olduğu ileri sürülmüştür (80). Çalışmamızda ise HCG uygulanan deney grubunda NF-κB ekspresyon düzeyinde kontrol grubu hücrelerle karşılaştırıldığında bir inhibisyon izlenmedi. Ancak NF-κB ve implantasyon sürecine ilişkin yeterli veri mevcut olmayıp bu ilişkinin farklı in-vivo ve in-vitro deney modellerinde araştırılması gerekmektedir.

8. SONUÇ

- Endometriyum steroid hormonların etkisi altında siklik değişikliklere uğrayan dinamik bir dokudur. Siklik değişiklikler endometriyumu olası bir fertilizasyon için hazırlar. Fertilizasyon gerçekleşirse gelişen blastosistin endometriyuma implantasyonundan sonra gebeliğin devamında steroid hormonların yanı sıra HCG’de rol oynar.
- Çalışmamızda, endometriyum hücrelerinde 17-β-östradiol inkübasyonunun kontrol grubuyla karşılaştırıldığında BrdU işaretli S faz hücre sayısını anlamlı olarak artırdığı saptandı. Progesteron ve HCG hormonlarının ise hücre proliferasyonu üzerine bir etkisi saptanmadı.
- Hücre-hücre adezyonunda rol oynayan β-katenin proteininin kontrol grubu hücrelerin plazma membran sınırları boyunca eksprese olduğu izlendi. Steroid türevi, 17-β-östradiol ve progesteron hormonlarının bu ekspresyon düzeyinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığı izlendi. HCG uygulanan hücrelerde membrana lokalize olan β-katenin ekspresyonunun azaldığı izlendi.
- 17-β-östradiol ve HCG uygulanan hücreler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hücrede inflamatuvar yanıtın oluşmasıyla ilişkili olan NF-κB aktivitesinde bir değişiklik izlenmedi. Progesteron uygulanan hücrelerde ise NF-κB’nin inaktif formu olan sitoplazmik NF-κB ekspresyonun arttığı izlendi.
- Endometriyumun siklik değişikliklerinin düzenlenmesinden sorumlu östrojen ve progesteron hormonları ile trofoblastik hücrelerce üretilen gebeliğe özgü HCG’nin endometriyumda hücre proliferasyonu, β-katenin düzenlenmesi ve NF-κB inflamatuvar hücre yanıtının gelişmesinde farklı etkilere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmamda bana yardımcı olan ve desteğini hiç esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK'e teşekkür ederim. Seminerlerimiz sırasında bizlerle bilgilerini paylaşan Prof. Dr. Nedret ALTIOK'a teşekkür ederim. Çalışmamızda kullandığımız hücrelerin temininde yardımcı olan Doç. Dr. Ümit KAYIŞLI'ya, deneylerim aşamasında laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Bio. Melike ERSÖZ'e, ayrıca Bio. Türkan SARIOĞLU'na, Enstitü Sekreterimiz sevgili arkadaşım İlknur KARAOSMANOĞLU'na destekleri için teşekkür ederim.

Sevgili aileme bana desteklerinden dolayı ve her zaman yardımcı olan asla eksiklerini hissetmediğim tüm dostlarıma teşekkür ederim.

10. KAYNAKLAR

1. Tatsumi K, Higuchi T, Fujiwara H, Nakayama T, Itoh K, Mori T, Fujii S, Fujita J. Expression of calcium binding protein D-9k messenger RNA in the mouse uterine endometrium during implantation. *Mol Hum Reprod.* 1999, 5:153–161.
2. Tabibzadeh S. The signals and molecular pathways involved in human menstruation, a unique process of tissue destruction and remodelling. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2:77-92.
3. Tabibzadeh S, Babaknia A. The signals and molecular pathways involved in implantation, a symbiotic interaction between blastocyst and endometrium involving adhesion and tissue invasion. *Mol Hum Reprod.* 1995, 10:1579-1602.
4. Walter FB, Boulpaep LE. Medical Physiology. Elsevier Saunders, 2005.
5. Modugno F, Ness BR, Chen C, Weiss SN. Inflammation and endometrial cancer: A Hypothesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005, 14:1-8.
6. Heneweer C, Schmidt M, Denker HW, Thie M. Molecular mechanisms in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in human uterine Ishikawa cells. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2005, 2:1-11.
7. Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer E. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod.* 2001, 65:1311–1323.
8. Sadler T.W. Langman’s Medical Embryology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
9. Sherman BM, Korenman SG. Hormonal characteristics of the human menstrual cycle throughout reproductive life. *J Clin Invest.* 1975, 55:699-706.
10. Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BCJM. The Science behind 25 Years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev.* 2006, 27:170–207.
11. Moore, Persaud. İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.
12. Ganong, W.F. Tibbi Fizyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.
13. Hegele-Hartung C, Chwalisz K, Beier HM. Distribution of estrogen and progesteron receptors in the uterus: an immunohistochemical study in the immature and adult pseudopregnant rabbit. *Histochemistry.* 1992, 97:39-50.
14. Davis SR, Dinatale I, Rivera-Woll L, Davison S. Postmenopausal hormone therapy: from monkey glands to transdermal patches. *J Endocrinol.* 2005, 185:207–222.

15. Lannigan DA, Notides AC. Estrogen receptor selectively binds the "coding strand" of an estrogen responsive element. *Proc Natl Acad Sci*. 1989, 86:863-867.
16. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006, 116:561-570.
17. Kuntz MA, Shapiro DJ. Dimerizing the Estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. *J Biol Chem*. 1997, 272: 27949–27956.
18. Weatherman RV. Untangling the estrogen receptor web. *Nat Chem Biol*, 2006, 2:175-176.
19. Tinel H, Denker HW, Thie M. Calcium influx in human uterine epithelial RL95-2 cells triggers adhesiveness for trophoblast-like cells. Model studies on signalling events during embryo implantation. *Mol Hum Reprod*. 2000, 6:1119-1130.
20. Conneely OM. Perspective: female steroid hormone action. *Endocrinology*. 2001, 142:2194-2199.
21. Kelly RW, King AE, Critchley HO. Cytokine control in human endometrium. *Reproduction*. 2001, 121:3-19.
22. Hovland AR, Powell RL, Takimoto GS, Tung Lin, Horwitz KB. An N-terminal inhibitory function, IF, suppresses transcription by the A-isoform but not the B-isoform of human progesterone receptors. *J Biol Chem*. 1998, 273: 5455–5460.
23. Anderson E. The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*. 2002, 4:197-201.
24. Paria BC, Huet-Hudson YM, Deyt SK. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci*. 1993, 90:10159-10162.
25. Achache H, Revel A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update*, 2006, 12: 731–746.
26. Fitzgerald JS, Poehlmann TG, Suman P, Gupta SK, Schleussner E, Markert UR. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and trophoblast invasion. *J Reproduktionsmed Endokrinol*. 2007, 4:322–330.
27. Aplin JD. Adhesion molecules in implantation. *Rev Reprod*, 1997, 2: 84-93.
28. Sugihara K, Sugiyama D, Byrne J, Wolf DP, Lowitz KP, Kobayashi Y, Kabir-Salmani M, Nadano D, Aoki D, Nozawa S, Nakayama J, Mustelin T, Ruoslahti E, Yamaguchi N, Fukuda MN. Trophoblast cell activation by trophinin ligation is implicated in human embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci*. 2007, 104:3799–3804.

29. Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther.* 2004, 36:41.
30. Ergüler G, Demir N, Demir R. Adhezyon Moleküllerinin Yapısal Özellikleri ve fonksiyonları. *T Klin J Med Sci.* 2002, 22:313-327.
31. Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci.* 1991, 99:681-692.
32. Lunghi L, Ferretti EM, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007, 5:1-14.
33. Caniggia I, Lye SJ, Cross JC. Activin is a local regulator of human cytotrophoblast cell differentiation. *Endocrinology.* 1997, 138:3976-3986.
34. Maltepe E, Krampitz GW, Okazaki KM, Red-Horse K, Mak W, Simon MC, Fisher SJ. Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development.* 2005, 132: 3393-3403.
35. http://www.sciwrite.caltech.edu/journal03/A-L/imagesal/lin_files/image008.jpg.
36. Özge Tuncer. Plasenta Previa ve Risk Faktörleri. *İzmir Atatürk Eğitim Ve Araştırma Hastanesi.* 2007, 1-81.
37. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005, 1477-7827.
38. Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Current Sci.* 2001, 81:515-522.
39. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001./press.html.
40. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JPA. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998, 51:716-724.
41. Castelbaum AJ, Ying L, Somkuti SG, Sun J, Ilesanmi AO, Lessey BA. Characterization of integrin expression in a well differentiated endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997, 82:136-142.
42. Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. Oncogenes and cell proliferation. *Gene Develop.* 1998, 8:95-102.
43. Hagen T, Sethi JK, Foxwell N, Vidal-Puig A. Signalling activity of β -catenin targeted to different subcellular compartments. *Biochem J.* 2004, 379:471-477.
44. Luu HH, Zhang Ruiwen, Haydon RC, Rayburn El, Kang Q, Si W, Park JK, Wang H, Peng Y, Jiang W, He TC. Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway as Novel Cancer Drug Targets. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004, 4: 653-671.
45. Abraham Kierszenbaum MD, PhD, Histology and Cell Biology. Mosby, 2006.

46. Kemler R. Classical cadherins. *Semin Cell Biol.* 1992, 3:149–155.
47. Erdem F, Alper D. Adhezyon Molekülleri. *T Klin J Med Sci.* 1997, 17:75-77.
48. Emrah Sert. Meme kanserinde β -Catenin'in prognostik rolü. *Atatürk Üniversitesi.* 2007, 1-62.
49. Ougolkov A, Zhang B, Yamashita K, Bilim V, Mai M, Fuchs SY, Minamoto T. Associations among β -TrCP, an E3 ubiquitin ligase receptor, β -Catenin, and NF- κ B in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004, 96:1161-1170.
50. Schohl A, Fagotto F. β -catenin, MAPK and Smad signaling during early *Xenopus* development. *Development.* 2002, 129:37-52.
51. Van GME, Daemen MJ, Smits JF, Blankesteyn WM. The wnt-frizzled cascade in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.* 2002, 55:16–24.
52. He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/ β -catenin signaling: Arrows point the way. *Development.* 2004, 131:1663-1677.
53. Shimizu H, Julius MA, Giarr M, Zheng Zhili, Brown AMC, Kitajewski J. Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of β -catenin. *Cell Growth Differ.* 1997, 8:1349-1358.
54. Tortes MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew L, Randall T. Moon. Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J Cell Biol.* 1996, 133:1123-1137.
55. Amit S, Hatzubai Ada, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Yinon, Alkalay I. Axin-mediated CKI phosphorylation of β -catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Gene Develop.* 2002, 16:1066–1076.
56. Schwarz-Romond T, Asbrand C, Bakkers Je, Küh M, Schaeffer HJ, Huelsken J, Behrens J, Hammerschmidt M, Birchmeier W. The ankyrin repeat protein diversin recruits casein kinase I ϵ to the β -catenin degradation complex and acts in both canonical Wnt and Wnt/JNK signaling. *Gene Develop.* 2002, 16:2073–2084.
57. Güney Y, Bilgihan A. Ubikitin sistem. *T Klin Tıp Bilimleri,* 2002, 22:616-620.
58. Miller JR, The Wnts. *Genome Biol.* 2001, 3001:1-15
59. Lim SC, Lee MS. Significance of E-cadherin/Beta-catenin complex and cyclin D1 in breast cancer. *Oncol Rep.* 2002, 9:915-928.

60. Miller JR, Hocking AM, Brown JeD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways. *Oncogene*. 1999, 18:7860-7872.
61. Tripathi P, Aggarwal A. NF- κ B transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current Sci*. 2006, 90:519-531.
62. Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, M I. Verma, Byers S, Gaynor RB. Regulation of β -catenin function by the I κ B kinases. *J Biol Chem*. 2008, 276:1-58.
63. Prajapati S, Gaynor RB. Regulation of IKK γ /NEMO function by IKK β -mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002, 277:24331-24339.
64. Schmitz ML, Bacher S, Dienz O. NF- κ B activation pathways induced by T cell costimulation. *Faseb J*. 2003, 17:2187–2193.
65. Tergaonkar V, Bottero V, Ikawa M, Li Q, Verma IM. I κ B Kinase-independent I κ B α degradation pathway: functional NF- κ B activity and implications for cancer therapy. *Mol Cell Biol*. 2003, 23:8070–8083.
66. <http://www.pasteur.fr/recherche/unites/reac/en/im/ANFkBcyclec.jpg>.
67. Dean L, Felix MJC. The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception*. 1998, 57:399-403.
68. Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Uchikawa J, Itoh K, Konishi I. Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003, 88:871–878.
69. Kayisli UA, Selam B, Guzeloglu-Kayisli O, Demir R, Arici A. Human chorionic gonadotropin contributes to maternal immunotolerance and endometrial apoptosis by regulating Fas-Fas ligand system. *J Immunol*. 2003, 171:2305-2313.
70. Ku SY, Choi YM, Suh CS, Kim SH, Kim JG, Moon SY, Lee JY. Effect of gonadotropins on human endometrial stromal cell proliferation in vitro. *Arch Gynecol Obstet*. 2002, 266:223-8.
71. Pötter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev*. 1999, 20:207.
72. Das C, Kumar VS, Gupta S, Kumar S. Network of cytokines, integrins and hormones in human trophoblast cells. *J Reprod Immunol*. 2002, 53:257-268.
73. Sundfeldt K, Piontekewitz Y, Billig H, Hedin L. E-cadherin–catenin complex in the rat ovary: cell-specific expression during folliculogenesis and luteal formation. *J Reprod Fertil*. 2000, 118:375–385.

74. Groten T, Fraser H.M, Duncan W.C, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C. Cell junctional proteins in the human corpus luteum: changes during the normal cycle and after HCG treatment. *Hum Reprod.* 2006, 21:3096–3102.
75. Pon YL, Wong AST. Gonadotropin-induced apoptosis in human ovarian surface epithelial cells is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the β -Catenin/ T-Cell factor signaling pathway. *Mol Endocrinol.* 2006, 20:3336–3350.
76. Sun J, Hobert ME, Duan Y, Rao AS, He TC, Eugene B. Chang, and James L. Madara. Crosstalk between NF- κ B and β -catenin pathways in bacterial-colonized intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005, 289:129-137.
77. Burg BVD, Saag PTVD. Nuclear factor-kappa-B/steroid hormone receptor interactions as a functional basis of anti-inflammatory action of steroids in reproductive organs. *Mol Hum Reprod.* 1996, 2:433-438.
78. Shyamala G, Guiot MC. Activation of NF- κ B-specific proteins by estradiol. *Proc Natl Acad Sci.* 1992, 89:10628–10632.
79. Kalkhoven E, Wissink S, Der Saag PT, Van Der Burg B. Negative interaction between the RelA (p65) subunit of NF- κ B and the progesterone receptor. *J Biol Chem.* 1996, 271:6217–6224.
80. King AE, Critchley HOD, and Kelly RW. The NF- κ B pathway in human endometrium and first trimester decidua. *Mol Hum Reprod.* 2001, 7:175-183.