T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLİK VE ERKEN GEBE KISRAK ENDOMETRİUMLARINDA WNT (WINGLESS TYPES) GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

MEHMET OSMAN ATLI

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI (VET)

Danışman

PROF. DR. D. ALİ DİNÇ

II. Danışman

DOÇ. DR. AYDIN GÜZELOĞLU

KONYA-2009

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SİKLİK VE ERKEN GEBE KISRAK ENDOMETRİUMLARINDA WNT (WINGLESS TYPES) GENLERİNİN EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

MEHMET OSMAN ATLI

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI (VET)

Danışman

PROF. DR. D. ALİ DİNÇ

II. Danışman

DOÇ. DR. AYDIN GÜZELOĞLU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 08202002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2009

S.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Mehmet Osman ATLI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından **Doğum ve Jinekoloji** Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	**Prof. Dr. Selim ASLAN** Ankara Üniversitesi	İmza
Danışman:	**Prof. Dr. D. Ali DİNÇ** Selçuk Üniversitesi	İmza
İkinci Danışman:	**Doç. Dr. Aydın GÜZELOĞLU** Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	**Prof. Dr. Ahmet SEMACAN** Selçuk Üniversitesi	İmza
Üye:	**Yrd. Doç Dr Ercan KURAR** Selçuk Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza

Prof. Dr. Orhan ÇETİN

Enstitü Müdürü

ii. ÖNSÖZ

Kısraklarda siklus ve erken gebelikte intrauterin mekanizmaları düzenleyen ovaryum, uterus veya embriyo kaynaklı moleküllerin (hormon, protein, vs.) bir kısmının, salgılanma dönemleri ve miktarları araştırılmıştır. Fakat; bu molekülerin luteolizisin oluşumu, gebeliğin şekillenmesi ve embriyonun yaşamının devam ettirilmesinde nasıl etkili olduğu ve hangi mekanizmaların nasıl uyarıldığı veya baskılandığı henüz tam anlamı ile anlaşılamamıştır. Ayrıca kısraklarda özelikle gebeliğin maternal kabulünde rol oynayan molekül veya moleküller günümüzde halen bilinmemektedir. Diğer türlerde bugüne kadar yapılan çalışmalar gebeliğin şekillenmesi ve embriyonun uterusta varlığını devam ettirebilmesi için gerekli mekanizmaların maternal ve/veya embriyonal faktörler tarafından düzenlendiği ortaya konmuştur. Kısraklarda erken gebelik döneminde salgılanan moleküllerin çeşitli sinyal iletim sistemlerini devreye koyarak gebeliğin şekillenmesini ve devamını sağladığı sanılmaktadır. Gebelikteki bu mekanizmaların devreye girmesi ile embriyonun beslenmesi, büyüyüp gelişmesinin sağlanması, immun sisteminin ve luteolizisin baskılanması uyarılmaktadır. Bu mekanizmalar içerisinde bir büyüme faktörü olarak görev yapan Wnt (Wingless Type) gen ailesi ve buna bağlı hücre içi sinyal iletim sisteminin başta insan, fare ve ruminant olmak üzere birçok değişik türde reproduktif olaylarda etkili olduğu gösterilmiştir. Fakat kısraklarda Wnt gen ailesi henüz tanımlanmamıştır. Sunulan bu çalışmada Wnt gen ailesinin siklik ve erken gebe kısrak endometriumda mRNA düzeyinde belirlenmesi, bahsedilen dönemlerde bu genlerin ekspresyon düzeylerinin karakterize edilmesi amaçlanmıştır.

Doktoram süresince bana destek olan danışmanın Prof. Dr. D. Ali DİNÇ'e, moleküler biyolojiyi öğrenmemi sağlayan her konuda her zaman desteğini esirgemeyen ayrıca ikinci tez danışmanım Doç. Dr. Aydın GÜZELOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez süresi boyunca sabırla bana yardımcı olan Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Ercan KURAR'a, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet SEMACAN'a, istatistiksel analizlerin yapımında büyük destek gördüğüm S.Ü. Ziraat Fakültesi Zootekni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a, Real-Time PZR sistemini kullandığımız Afyon Kocatepe

Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Sefa ÇELİK'e, tezin yazımı aşamasında önerdiği düzeltmelerden dolayı Harran Ü. Veteriner Fakültesi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yard. Doç. Dr. Faruk BOZKAYA'ya teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca sunulan çalışmayı destekleyen S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Bu tezi; anneme, kardeşime ve çok sevgili yeğenim Gönül ATLI' ya ithaf ediyorum.

iii. İÇİNDEKİLER..... vi-ix

iv. SİMGELER ve KISALTMALAR..... x-xi

1. GİRİŞ 1-31

1.1. Kısraklarda Östrus Siklusu 1

1.2. Kısraklarda Endometriumun Hücre Yapısı..... 2

1.3. Kısraklarda Luteolizis..... 3

1.4. Gebe Kısraklarda Luteolisizin Engellenmesi 4

1.5. Kısraklarda Erken Gebelikle Embriyonal Dönemle İlgili Olaylar..... 8

1.5.1. Fertilizasyon ve Ovidukt İçerisinde Taşınma 8

1.5.2. Uterustaki Olaylar..... 10

1.5.2.1. Kapsül Yapısının Oluşumu ve Görevi 10

1.5.2.2. Embriyonik Östrojenin Erken Gebelikteki Rolü 11

1.5.2.3. Uterus İçerisinde Embriyonun Göçü 12

1.5.2.4. Fiksasyon ve Orientasyon 13

1.5.2.5. Uterus İçerisinde Embriyonun Beslenmesi 14

1.6. Erken Gebelik Sürecinde Hormonal Değişimler 14

1.7. Genel Olarak Hücre İçi Sinyal Iletim Sistemi 15

1.8. Wingless Type (Wnt) Genlerinin Sinyal İletim Sistemi..... 16

1.8.1. Wnt Proteinleri..... 19

1.8.2. Wnt Proteinlerinin Sentezlenmesi, Olgunlaşması ve Taşınması..... 20

1.8.3. Wnt İnhibitörleri 21

1.8.4. Wnt Sinyal İletim Sisteminin Hücre Yüzeyi Reseptörleri
ve Çalışma Sistemi 22

1.8.5. Wnt Sinyal İletim Sisteminin Sitoplazma Bileşenleri
ve Çalışma Sistemi 24

1.8.5.1. Beta-catenin ve Sitoplazma İçindeki Parçalanma Yolu 26

1.8.5.2. Beta-cateninin Hücre İçi Stabilizasyonu 27

1.8.6. Beta-cateninin Nükleus İçine Girmesi ve TCF ile İlişkisi 27

1.9. Wnt Genlerinin Reprodüktif Olaylar Üzerine Etkileri 29

2. GEREÇ ve YÖNTEM 32-47

2.1. Hayvan Materyali ve Seçimi 32

2.1.1. İnspeksiyon 32

2.1.2. Rektal Muayene 32

2.1.3. Ultrasonografik Muayene 32

2.1.4. Serviksin Durumunun Belirlenmesi 32

2.1.5. İntrauterin Örneklemeler 33

2.1.6. Histopatolojik İncelemeler 33

2.1.7. Aygır Muayenesi 33

2.1.8. Diğer Muayeneler 33

2.2. Bakım ve Besleme 34

2.3. Kısrakların Östrus ve Ovulasyonlarının Düzenlenmesi 34

2.4. Kısrağın Hazırlanması 35

2.5. Tohumlama 35

2.6. Ultrasonografik Muayeneler 35

2.7. Biyopsi Günlerin Belirlenmesi 36

2.8. Biyopsi Alma 36

2.9. Siklik Kısraklarda Progesteron Ölçümü 37

2.10. Total RNA İzolasyonu 37

2.11. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi 38

2.12. Total RNA'dan DNase I Enzimi ile genomik DNA'nın Uzaklaştırılması 39

2.13. Reverze Transkriptaz (RT) Reaksiyonu 40

2.14. Primer Dizaynı 40

2.14.1. Primer Sulandırılması 41

2.15. RT-PZR 41

2.16. Jel Elektroforezi 42

2.17. Elde Edilen PZR Ürününün Doğruluğunun Belirlenmesi 42

2.17.1. Enzim ile Kesme 42

2.17.2. Sekans İşlemi 43

2.18. Real-time PZR 44

2.18.1. Erime Eğrisi Analizi 44

2.19. İstatiksel Analizler 46

2.20. Kullanılan Cihazlar ve Aletler 47

3. BULGULAR 48-78

3.1.Wnt Gen Ailesinin Kısrak Endometriumunda Karakterize Edilmesi 48

3.2. Wnt Sistemine Ait Genlerinin Siklik Kısrakların Endometriumunda Ekspresyonları 48

3.3. Wnt Sistemine Ait Genlerinin Gebe Kısrakların Endometriumunda Ekspresyonları 49

3.4. Gebeliğe Bağlı Değişiklikler 50

4. TARTIŞMA 79–104

5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....105–106

6. ÖZET.....107

7. SUMMARY.....108

8. KAYNAKLAR.....109–119

9. EKLER.....120–121

9. 1. EK-A: Wnt Sistemine Ait Genlerin Primer Çiftleri 120–121

10. ÖZGEÇMİŞ.....122

İV. SİMGELER ve KISALTMALAR

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

APC: Adeno Polipoz Coli

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

bp: baz çifti

cDNA: Komplementary Deoksiribonükleik Asit

CKI: Kazein kinaz 1

Cl: Klorür

CL: Korpus Luteum

Da: Dalton

ddH_2O: Double Distile Su

DEPC: Dietilpirokarbonat

Dkk: Dickkopf

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTP: Nükleotid tri fosfat

DVL: Dishelved

ELISA: Enzim İmmuno Assay

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

FSH: Follikül Stimüle Edici Hormon

FZD: Frizzled Reseptörü

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

GSK3-beta: Glikojen sentaz kinaz–3ß

HE: Hematoksilen-Eozin

HSPG: Heperan sulfat proteoglikan

IFN-τ: Interferon Tau

IM: Intramuskuler

IU: International Unite

IV: İntravenöz

L: Standart

LH: Luteinleştirici Hormon

LRP: Low Density Lipoprotein Reseptör-related protein

M: Molar

Mg: Magnezyum

mg: Miligram

MHz: MegaHerz

mM: mili Molar

mRNA: mesajcı Ribonükleik Asit

ng: Nanogram

PGE_2: Prostaglandin E_2

$PGF_{2\alpha}$:Prostaglangin F_2 alfa

pM: Pikomol

PZR: Polimerize Zincir Reaksiyonu

RE: Restriksiyon Endonukleaz

RNA: RibonükleikAsit

RT: Reverse Transkriptaz

SFRP: FZD Benzeri Reseptör

ß: Beta

Taq: Termuse aquaticus

TBE: Tris Buffer EDTA

WIF: Wnt Inhibitör Faktör

Wls: Wntless proteini

Wnt: Wingless Type

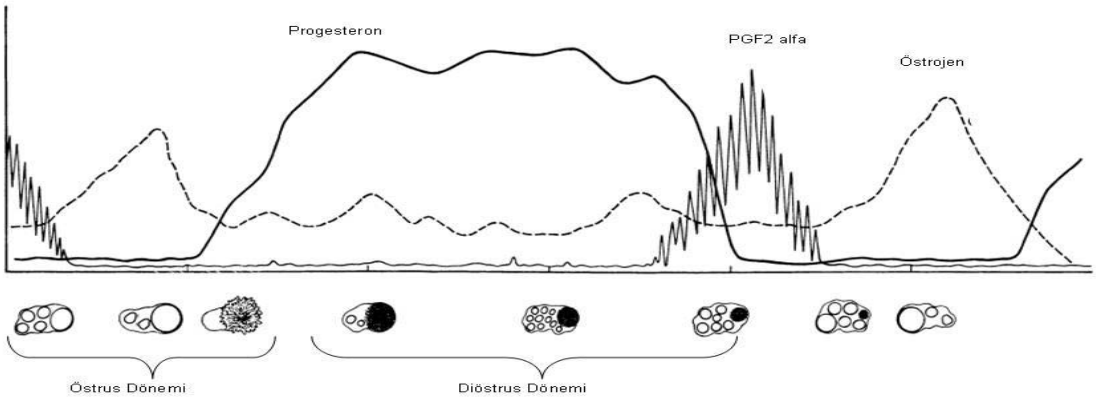
X: katı

α: Alfa

1. GİRİŞ

1.1. Kısraklarda Östrus Siklusu

Kısraklar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup ülkemizin de içinde bulunduğu kuzey yarım kürede Nisan-Eylül ayları arasında, gebe değillerse, düzenli östrus siklusları gösterirler. Östrus siklusunun dönemleri ovaryumlardan ve uterustan salgılanan hormonlar tarafından kontrol edilir. Östrus siklusu, östrojen hormonun etkisi altında olduğu folliküler dönem ve progesteron hormonun etkisi altında olduğu luteal dönem şeklinde ikiye ayrılabilir. Ovulasyon folliküler dönem içerisinde oluşur. Genelde östrus siklusunun folliküler dönemi mevsimin de etkisi ile 2–11 gün arasında değişiklik göstersede luteal dönemin süresi sağlıklı kısraklarda daha sabittir (14–15 gün). Bununla beraber kısraklar arasında bireysel faklılıkların olabileceği ve buna bağlı olarak siklus sürelerinin değişkenlik gösterebileceği unutulmamalıdır. Bu süre aynı kısrak için birbirini izleyen iki siklusta bile değişken olabilmektedir. Bu nedenle genelde kısraklarda iki ovulasyon arasındaki süre bir siklus süresi olarak kabul edilir ve bu süre 21–22 gündür (Şekil 1.1., Deals ve Hugles 1993, Johnson ve Becker 1993, Blanchard ve ark 1998).

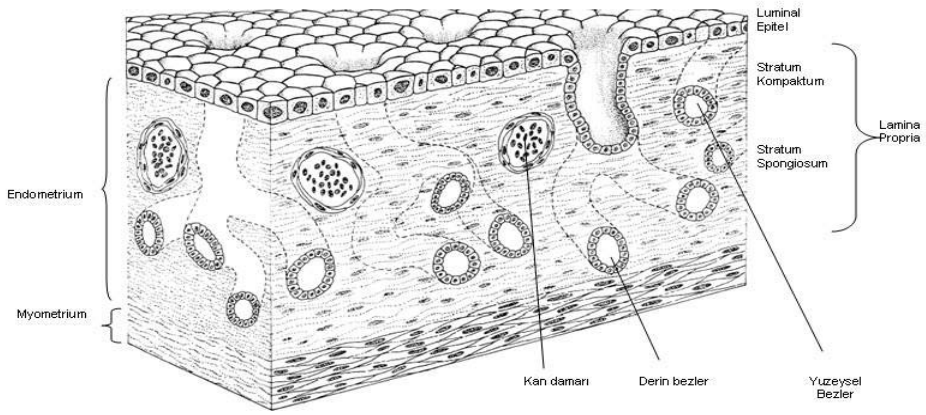


Şekil 1.1 Kısraklarda bir östrus siklusu boyunca östrojen, progesteron ve $PGF_{2\alpha}$'nın salgılanma profili (Alınmıştır; Allen ve Antzank 2000)

1.2. Kısraklarda Endometriumun Hücre Yapısı

Endometrium siklik kısraklarda luteolizisi başlatan $PGF_{2\alpha}$'nın salgılandığı, gebe kısraklarda ise embriyonun içerisinde büyüyüp geliştiği en önemli kısımdır (Şekil 1.2.). Sezona, östrusun dönemlerine ve gebeliğe bağlı olarak endometriumun hücre yapısı ve karakteri değişiklik gösterir (Doig ve Waelchli 1993).

Östrus esnasında luminal ve glandular epiteller kollumnar veya uzun kollumnar bir yapıdadırlar. Epitelin altındaki kapillerlerde çok çekirdekli lökositler gözlenir. Lamina propria bu dönemde oldukça ödemli olup uzamış epitel hücrelerinden dolayı glandular dallanmalar kesit yüzeyinde oldukça büyük görülür, ayrıca glandulalar düzdür ve yumaklanmamıştır. Diöstrus döneminde ise glandular epitel hücreler kollumnar ile kübik bir yapı arasındadır. Glandulaların kesit yüzeyine yansıyan dallanmaları ise yumaklanmıştır. Bu görünüm dizilmiş inci tanelerine benzetilmektedir (Doig ve Waelchli 1993).



Şekil.1.2. Kısrak endometriumunun histolojik yapısı (Alınmıştır; Allen ve Antzack 2000)

Endometriumdaki luminal ve glandular hücre topluluklarının siklusun farklı dönemlerinde (östrus, diöstrus vs.) ovaryumdan salgılanan steroid hormonlar ve lokal etki gösteren büyüme hormonlarının etkisi ile prolifere olduğu, morfolojik veya histolojik yönden değişiklikler gösterdiği bilinmektedir (Pollard 1990, Hess ve ark 2006). Gerstenberg ve ark (1999a, 1999b) monoklonal Ki-67 antijeni kullanarak endometrium hücrelerindeki proliferatif değişikleri östrus siklusu ve gebelikte araştırmışlardır. En belirgin luminal epitel prolifererasyonu östrusta östrojen etkisi altında gözlemişlerdir. Ovulasyondan 5 gün sonra luminal proliferasyonun bazal seviyede olduğunu fakat diöstrusun 3–7. günleri arasında özellikle derin bezlerde sekresyon yapan epitellerinde önemli ölçüde proliferasyon tespit etmişlerdir. Bu proliferasyonun embriyonun uterus içine gireceği 6. günde yeterli histrof salgısı için gerekli olduğunu bildirilmektedirler. Diöstrusun 7. gününden sonra ise progesteronun yüksek olduğu dönemde endometriumda gözlenen proliferasyonun bazal seviyede kaldığını gebelik döneminde ise luminal epitel, süperfisiyal stroma ve glandular epitellerde 14. günden (14. diöstrus ile benzer) sonra yavaş yavaş artan proliferasyonun 18. günde daha da belirginleşmiş olduğunu vurgulamaktadırlar. Bu dönemde embriyonal östrojen vardır ve muhtemelen erken gebelikteki bu proliferasyonun östrojenin etkisi ile oluştuğunu düşünmüşlerdir. Hatta bu durumun fare ve insanlarda endometriumu implantasyona hazırlayan luteal dönemde salgılanan östrojenin etkisine benzediğini bildirmektedirler (Gerstenberg ve ark 1999b, Hess ve ark 2006). Ayrıca anöstrustaki kısraklarda östradiol benzoat ile kombine progesteron uygulandığında süperfisial stratumda hızlı bir proliferasyon sağlandığı yine Gerstenberg ve ark (1999a) tarafından gösterilmiştir.

1.3. Kısraklarda Luteolizis

Kısraklarda luteolizis siklusun 14. gününde endometriumdan ineklerde olduğu gibi pulsatif olarak salgılanan $PGF_{2\alpha}$'nın etkisi ile oluşmaktadır (Kindahl ve ark 1976, Douglas ve Ginther 1976). Siklusun 12 veya 14. gününden önce yapılan total histerektomi sonucu primer Korpus Luteum'un (CL) ömrünü 70 güne kadar uzadığı bildirilmiştir (Ginther ve First 1971). Siklik kısraklarda luteolizisin başladığı gün olduğu

düşünülen 14. günde endometrial oksitosin reseptör (OTR) sayısındaki önemli artış oksitosinin bu mekanizmada etkin rolünün olduğunu göstermektedir (Sharp ve ark 1997). Fakat bu mekanizmada etkin rol oynayan oksitosin ineklerdekinden farklı olarak CL kaynaklı olmayıp hipofiz kaynaklıdır (Behrendt-Adam ve ark 1999). Stout ve ark (1999) tarafından siklik kısraklara eksojen oksitosin uygulaması ile luteolizisin baskılandığının gösterilmesine rağmen 10. günden itibaren uygulanmasının ise luteolizisi hızlandırıldığının gösterilmesi OTR'nin 10. günden sonra duyarlılığının oluştuğu şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca ineklerdekinin aksine kısraklarda luteolitik etkili $PGF_{2\alpha}$ sistemik dolaşıma katılarak luteolizis oluşturmaktadır (Ginther 1998). Başta fonksiyonel ve daha sonra da yapısal olarak gözlenen luteolizis esnasında kandaki progesteron miktarı hızla düşmekte ve luteal hücrelerde programlanmış hücre ölümü (apoptosis) şekillenmektedir (McCracken ve ark 1999).

1.4.Gebe Kısraklarda Luteolisizin Engellenmesi

Gebeliğin devam etmesi tüm hayvan türleri için yukarıda kısaca bahsedilen luteolizis mekanizmasının embriyo tarafından engellenmesi ve progesteron miktarının kanda yüksek düzeyde kalmasına bağlıdır. İnek ve koyunda bu mekanizmada interferon tau (IFN-τ) olarak tanımlanan ve embriyo tarafından salgılanan (10–25. günler) bir molekül etkili rol oynamaktadır (Spencer ve ark 1999, Spencer ve Bazer 2002). Domuzlarda ise yine embriyo tarafından salgılanan östrojenin endojen olarak salgılanan $PGF_{2\alpha}$'nın salgılanma yönünü endokrinden ekzokrine çevirdiği bilinmektedir (Bazer ve Thatcher 1977). *İn vitro* şartlarda kısrak embriyosu ile endometrium inkube edildiğinde endometriumdan $PGF_{2\alpha}$ salınımının durduğu tespit edilmiştir (Berglund ve ark 1982). Bu nedenle anti-luteolitik etkinin embriyonal kaynaklı olduğu kesinlik kazanmıştır. Ayrıca *in vitro* şartlarda at embriyosu ile uterusunu inkube edildildiği sırada embriyoya ait proteinlerini moleküler ağırlıklarına göre seçici geçirgen olarak salan dializ poşetlerine yerleştirilmiş ve uterustan $PGF_{2\alpha}$ salınımını engelleyen molekül veya moleküllerin ağırlığının 1.000–3.500 Dalton (Da) arasında olduğunu tespit edilmiştir (Sharp 2000). Fakat kısraklarda embriyonun salgıladığı ve bu mekanizmayı durdurduğu düşünülen molekül ve/veya moleküller günümüzde henüz karakterize edilememiştir.

Stout ve ark (2004) 10 ile 18. günler arasındaki kısrak embriyosunun ubiquitin (8.500 Da) ve beta-chain insulin (3.500 Da) olarak tanımlanan düşük molekül ağırlığına sahip proteinleri salgıladıklarını göstermişlerdir. İnsulinin 10-18. günler arasında tespit edilebilir düzeyde salgılanmasına rağmen eksojen insulin uygulamasının siklik kısraklarda luteal dönemi uzatmamasından dolayı insulinin bu dönemde gebeliğin tanınmasından daha çok insulin benzeri etki gösteren büyüme faktör sistemine katılarak fötal ve plasental gelişim üzerine etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Ubiquitin molekülünün ise erken gebelik esnasında kapsül veya uterus proteinlerinin hücre içi proteolizis mekanizmasında rol oynadığını ifade etmektedirler.

Kısrakta yapılan çalışmalar ineklerde olduğu gibi IFN-τ benzeri bir molekülün varlığını ortaya koyamamıştır (Baker ve ark 1991). Hatta IFN-τ tarafından uterusta uyarılan Mx geninin mRNA düzeyindeki ekspresyonu ineklerde gebeliğe bağlı olarak siklik hayvanlar ile kıyaslandığında 10 katı bir artış gösterirken kısrak uterusunda Mx geni düşük düzeylerde tespit edilmiş ve gebeliğe bağlı olarak artış göstermemiştir (Hicks ve ark 2003).

Gebe kısraklarda anti-luteolizis, plazma progesteron seviyesindeki düşüş ile değerlendirildiğinde, 14–16. günler arasında ilk ve asıl luteolizisin engellenmesi ve 16–32. günler arasında görülen kanda kısmi progesteron hormonun düşüşü ile ifade edilen ikinci luteolitik etkinin kısmi bir düzeyde tutulduğu dönem olarak ikiye ayrılabilir (Stout ve Allen 2002).

İneklerde IFN-τ'nun; luteolizisin başlaması için gerekli olan endometrial östrojen reseptörü (ÖR) ve OTR'yi kodlayan genlerin transkripsiyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Guzeloglu ve ark 2004). Kısraklarda luteolizisin oluştuğu günlerde gebe kısrakların endometriumdan alınan biyopsilerde ÖRα mRNA ve protein konsantrasyonunda bir azalma olduğu yönünde bulgular elde edilmiştir (Hartt ve ark 2005, McDowell ve ark 1999). Bu yönüyle luteolizis olayının ineklerdeki ile benzer bir mekanizma sonucunda oluştuğu söylenebilir.

Endometrial OTR miktarı gebe ve gebe olmayan kısraklarda ovulasyondan sonraki 12. günde aynı olmakla birlikte oksitosin uyarımlarına karşı siklik hayvanlarda $PGF_{2\alpha}$ salınım cevabı alınırken gebe hayvanlarda cevap alınmaması bu dönemdeki anti-luteolizisin OTR ekspresyonundaki azalmanın dışındaki bir mekanizma ile olabileceğini göstermiştir (Sharp ve ark 1997). Fakat gebe olmayan kısraklarda OTR miktarının luteolizis şekillendiği dönemde artması ise pulsatif $PGF_{2\alpha}$ salgısının OTR'ye bağlı olduğunu destekler niteliktedir (Goff ve ark 1993). Bu çalışmalardan elde edilen çelişkili sonuçlardan dolayı OTR'nün luteolisiz oluşum mekanizmadaki rolü hakkında kesin bir bilgiye ulaşılmamaktadır.

Kısraklarda gebeliğin anne tarafından tanınması ve primer CL yapısından progesteron salgısının devam etmesi gebeliğin devamı için zorunludur (Allen 2001). Domuz ve ruminant embriyolarının aksine, kısraklarda erken gebelik döneminin önemli bir bölümünde (6.5-22. gün) bulunan ve embriyoyu kuşatan glikokaliks yapısındaki kapsül; gebeliğin maternal olarak tanındığı dönemde embriyonun tüm uterusu kapsayacak şekilde büyüyüp uzamasına izin vermez (Oriol ve ark 1993, Ginther 1998). Bu mekanizmada rol oynayan embriyo kaynaklı molekül günümüzde halen karakterize edilememiş olsa da embriyonun tam olarak luteolizisi engelleyebilmek için uterusa girdiği 6. günden fikse olduğu 16. güne kadar uterus içerisinde (korpus ve kornu uteriler içerisinde) dolaşması gerekmektedir (Ginther 1998). McDowell ve ark (1988) kornu ve korpus uteriyi ligatüre ederek embriyonun hareketlerini kısıtladıkları çalışmalarında gebeliklerin devam etmediğini gözlemişlerdir. Ancak uterusa ligatür uygulayarak embriyonun hareketlerini kısıtlama ile birlikte oral yoldan progesteron ile beslenen kısraklarda gebeliğin sürdüğünü bildirmektedirler.

Embriyonun uterus içerisinde hareketliliğinin sağlanması hem maternal hemde embriyonal orijinlidir (Stout ve Allen 2002). Watson ve Sedrich (1989) *in vitro* şartlarda kısrak embriyolarının prostaglandin salgıladığını göstermişlerdir. Stout ve Allen (2002) embriyonun $PGF_{2\alpha}$ ve PGE_2 salgıladığını ve bu salgıların lokal etkisi ile embriyonun uterus içerisinde hareketliliğini sağlamak için myometriumda kontraksiyonların şekillendiğini bildirmektedirler. Bununla beraber endometriumda bu dönemde $PGF_{2\alpha}$

salgısının yoğun olmaması bu etkinin daha çok embriyonal kaynaklı olduğunu göstermektedir. Aurich ve Budik (2004) embriyonal doku örneklerinde gebeliğin 8, 10, 12 ve 14. günlerinde siklooksijenaz–2 (COX–2) geninin sadece 12 ile 14. günlerde yüksek düzeyde eksprese olduğunu göstermişlerdir. Özellikle 14. günde COX–2 ekspresyonunun bilinmeyen bir sinyal ile embriyoda yüksek oranda görülmesinin embriyonal kaynaklı PG'lerin anti-luteolitik etkinin oluşumdaki önemli rolünü destekler niteliktedir.

Stout ve Allen (2002) siklik kısrakların uterus lümeninde $PGF_{2\alpha}$ konsantrasyonunun 14 ve 16. günlerde yüksek, 18. günde ise çok düşük miktarlarda olduğunu vurgulamaktadırlar. Bu durum siklik kısraklarda luteolizis döneminde (14–16. gün) uterus venasındaki $PGF_{2\alpha}$ ve sirkülasyondaki prostaglandin F metabolitleri (PGFM) artışı ile korelasyon içerisindedir (Kindahl ve ark 1982). Ancak 16. günden sonra siklik kısrakların uterus yıkantı sıvısında $PGF_{2\alpha}$ tespit edilemezken gebelerde yüksek miktarlarda belirlenmiştir (Stout ve Allen 2002). Bu artış embriyonal kaynaklı olabileceği gibi, bu dönemde gebe kısraklarda oksitosin uygulamalarına cevap olarak PGFM konsantrasyondaki artış ile birlikte değerlendirildiğinde endometriumun kısa bir baskılanma sonrası tekrar $PGF_{2\alpha}$ salgılama kapasitesi kazandığına işaret etmektedir. Bu dönemde uterus lümeninde yoğun miktarda bulunan $PGF_{2\alpha}$'nın, siklik kısraklarda luteolizis döneminde olduğu gibi, uterus venasına ve sirkülasyona geçmediği tespit edilmiştir (Douglas ve Ginther 1976, Kindahl ve ark 1982). Bu durum 18. günden sonra artan bu $PGF_{2\alpha}$'nın tam olarak bilinmeyen bir mekanizma ile uterus lumeninde tutuluyor olabileceğini akla getirmektedir. Bunun önemi 16. günden sonra da CL'un $PGF_{2\alpha}$ duyarlılığını kaybetmediği ve gebeliğin 32. gününe kadar $PGF_{2\alpha}$'nın luteolitik etkisine oldukça duyarlı olduğu (Kooistra ve Ginther 1976, Vernon ve ark 1981) göz önüne alındığında daha iyi anlaşılacaktır.

Kısrak embriyosunun uterus içerisinde hareketlilik için $PGF_{2\alpha}$ salgıladığı bilinmektedir (Stout ve Allen 2001a). Ancak 14–16. günlerde yıkantı sıvısında hiç bir şekilde $PGF_{2\alpha}$ varlığına rastlanmaması endometriumdan ya hiç $PGF_{2\alpha}$ salgılanmadığına ya da uterus içi bir yıkımlanma mekanizmasının devreye girdiğine işaret etmektedir

(Stout ve Allen 2002). Boerboom ve ark (2004) ovulasyon sonrası 15. günde inceledikleri endometrium biyopsi örneklerinde gebe kısraklarda COX–2 enziminin mRNA ve protein konsantrasyonlarının sikliklere göre daha az olduğunu göstermişlerdir. Ancak Vernon ve ark (1981) *in vitro* olarak gebe ve gebe olmayan kısraklarda siklus boyunca histerektomi ile topladıkları endometrium örneklerinde $PGF_{2\alpha}$ üretim kapasitesini araştırmışlar ve siklik kısrakların endometriumunda 16. güne kadar artan bir kapasite belirlemişler ise de 16. günden sonra bu kapasite hızla kaybolmuştur. Gebe kısrakların endometriumlarında ise aynı şekilde artan bir üretim kapasitesi olduğunu ve hatta 14. günden sonra pik yaptığını belirlemişlerdir. Bu durum, Boerboom ve ark (2004)'nın gebe kısraklarda endometrial COX–2 ekspresyonundaki tespit ettikleri azalma bulgusu ile ters bir durum sergilemektedir.

1.5. Kısraklarda Erken Gebelikte Embriyonal Dönemle İlgili Olaylar

Plasentasyon şekillenmeye başlayıncaya kadar embriyo ortalama 6 günlük ovidukt dönemi, ardından 30–34 günlük uterus dönemi geçirir. Bu dönem içerisinde embriyonun varlığını devam ettirmesi için luteolizis mekanizmasını engellemesi ve büyüyüp gelişebilmesi için ise endometriumdan salgılanan besin maddelerini alması gereklidir (Allen 2005).

1.5.1. Fertilizasyon ve Ovidukt İçerisinde Taşınma

Ovidukt içerisindeki oosit, spermatozoa ile fertilize olup zigotu oluşturur. Zigot içerisinde ilk bölünme ilk 24 saatte görülür ve daha sonraki bölünmeler 12–24 saat aralıklarla olur. İlk bölünmeden sonra embriyonun yapısına katılan her bir hücre blastomer olarak isimlendirilir. Bölünme dönemi bu blastomer yapısının içerdiği hücre sayısına göre 1, 2, 4 ve 16 hücreli dönem olarak adlandırılır. Blastomer yapısı >32 hücreye ulaştığında embriyo kompakt morula aşaması olarak isimlendirilir ve bu dönem ovidukt içerisinde embriyoda meydana gelen son gelişmedir (Vanderwall 1996). Ovidukt epitelinin kısrak embriyosunun gelişimi üzerine etkisi *in vitro* çalışmalar ile tespit edilmiş olsa da (Ball ve Miller 1992) embriyonun gebe olmayan koyun oviduktu

içerisinde de gelişebildiğini gösteren çalışmalar (Fehilly ve Willadsen 1986) bu süreçte mutlaka kısrak ovidukt yapısına ihtiyaç olmadığını göstermektedir. İneklerde ise ovidukt epiteli tarafından üretilen endotelinin doğrudan kontraktilite etkisi ve dolaylı olarak kan akışını değiştirerek gamet transportunu etkilediği bilinmektedir (Betteridge 2000).

Sadece fertilize olan oosit hücresinin oviduktan uterusa taşınması evcil hayvanlar içerisinde yalnız Equide'lere özgü bir durum olup, ilk olarak Van Niekerk ve Gerneke tarafından (1966) tespit edilmiştir. Eğer oosit hücresi fertilize olmadıysa ovidukt içerisinde en fazla istmus-ampulla bölgesine kadar taşınmakta ve burada oldukça belirgin bir şekilde katlaşmış bir yapıda olan ovidukt mukozası içerisinde aylar ile ifade edilen bir süreçte dejenere olmaktadır. İstmus- ampulla bölgesine çiftleşme veya suni tohumlama sonrasında ulaşan spermatozoalar ile fertilize olan oosit ise utero-tubal birleşme noktasını da geçip 144–152. saatte uterusa ulaşmaktadır (Battut ve ark 1997). Gebelikte bu seçici taşıma mekanizmanın nasıl işlediği üzerine yapılan incelemeler sonucunda; Weber ve ark (1991a) gebeliğin 5. günü olan kompakt morula safhasındaki embriyonun yüksek miktarlarda PGE_2 salgıladığını fakat fertilize olmayan oositte bu durumun gözlenmediğini *in vitro* çalışma ile gözlemlemişler ve bu hormonun etkisi ile seçici transportun gerçekleştiğini bildirmektedirler. Ayrıca Weber ve ark (1991b) mezosalpinkslere eksojen olarak minipump yöntemi ile uyguladıkları PGE_2'nin embriyonun uterusa ulaşma süresini kısalttığı göstermişlerdir. Allen ve ark (2006) idiopatik infertilite anamnezine sahip kısrakların mezosalpinksine PGE_2'nin jel tarzında uygulamaları ile %93 oranında gebelik elde etmişlerdir. PGE_2'nin ovidukt mukozasındaki düz kaslar üzerine lokal gevşetici etkisi olmakta ve mukoza yüzeyini örten siliaların hareketine imkan sağlayarak embriyonun uterus içine taşınmasını hızlandırmaktadır. At embriyosunun gebeliğin 144–152. saatlerinde, gelişiminin geç morula ve/veya erken blastosist döneminde uterusa ulaşması 48. saate ulaşan domuz embriyosu (4. hücreli), 72. saatte ulaşan ruminant embriyosu (8. hücreli) ile kıyaslandığında oldukça geçtir (Allen 2005).

1.5.2. Uterustaki Olaylar

1.5.2.1. Kapsül Yapısının Oluşumu ve Görevi

Erken gelişim esnasında embriyo birkaç çeşit ekstraselüler kapsül yapısı ile kuşatılmıştır. Ovulasyon esnasında oositi saran ve zona pellusida olarak adlandırılan bir zar yapısı, eğer oosit fertilize olmuşsa ovidukt orijinli olduğu düşünülen ince düz bir katman ile çevrelenir (Betteridge ve Waelchli 2004). Diğer memelilerde de blastosist yapısının implantasyondan önce zona pellusida yapısının hücresel olmayan bir kapsülle çevrelendiği bildirilmektedir (Denker 2000). Fakat kısraklardaki bu kapsül yapısı uzun süre (6 ile 22. gün arasında) varlığını devam ettirmektedir. Uterusa giren kısrak embriyosu (blastosist aşaması, 6-7. gün) zona pellusida yapısını kaybetmeye başlar ve bu arada trofekdoderm ile zona pellusida yapısı arasında hücresel olmayan glikoprotein yapıda olan bir kapsül yapısı şekillenir. Bu yapı gebeliğin 22. gününe kadar varlığını sürdürmektedir. Kapsül yapısının nasıl kaybolduğuna dair kesin bir bilgi olmasa da bu mekanizmada çeşitli proteazların rol oynadığı düşünülmektedir (Oriol ve ark 1993, Betteridge ve Waelchli 2004). Ayrıca *in vitro* olarak üretilen embriyolarda kapsül oluşmamaktadır (Choi ve ark 2004). Bu kapsül yapısının gebelikteki kesin rolü tam olarak bilinmese de, bu yapı ile ilgili çeşitli görevler öne sürülmüştür. 1-Maternal tanınma mekanizması sürecinde uterus içerisinde dolaşması gereken embriyonun yapısının küresel kalmasını sağlar, 2- Oldukça elastiki bir yapıya sahip olmasından dolayı embriyonun uterus içerisinde myometrial kontraksiyonlara bağlı olarak dolaştığı günlerde embriyoya mukavemet sağlar. 3- Yapısındaki salisilik asitten dolayı embriyoya anti-adeziv bir özellik katar ve bu dönemde embriyoyu immun hücrelerine ve mikroorganizmalara karşı korur. 4-Ayrıca kapsül yapısı maternal kabulde önemli rol oynayan embriyo tarafından üretilen insulin benzeri büyüme faktörü birleştirici protein–3 (IGFBP–3) ile endometrium tarafından üretilen lipokalin yapıdaki uterokalin (P19) proteinin depolanmasını sağlar (Oriol ve ark 1993, Betteridge ve Waelchli 2004, Quinn ve ark 2006).

1.5.2.2. Embriyonik Östrojenin Erken Gebelikteki Rolü

Embriyodan gebeliğin 10. gününden itibaren yoğun bir şekilde östrojen salgılandığı ve bu salgının yüksek miktarlarda 40. güne kadar devam ettiği bilinmektedir (Zavy ve ark 1979, Walters ve ark 2001, Wilsher ve ark 2006). Yapılan bazı çalışmalarda (Vanderwall ve ark 1994, Stout 1997) genel olarak siklik kısraklara uygulanan eksojen östrojen kısrakların % 60'ında CL ömrünü uzatmış, ancak %40'ında ise başarısız olmuştur. Östrojenin başarısız olmasının nedeni açıklanamamıştır. Bu literatür bilgiler ışığında eksojen östrojen uygulamalarının siklik kısraklarda luteotropik (Berg ve Ginther 1978), luteolitik (Allen 1979) veya her iki etkinin birden olduğunu (Vanderwall ve ark 1994, Stout 1997) gösteren birbiri ile çelişkili çalışmalar, östrojenin luteolizisi önlemeye yönelik bir gebelik sinyali olduğu konusunda şüphe uyandırmaktadır.

Bilindiği üzere domuzlarda embriyolardan östrojen salgılanmakta ve bu endometriumdaki $PGF_{2\alpha}$ salgısının yönünü endokrinden ekzokrine çevirmekte; böylece $PGF_{2\alpha}$ uterus içinde tutularak salınım baskılanmadan luteolizis engellenmektedir (Spancer ve Bazer 2002). Kidder ve ark (1955) siklik domuzlara 10–16. günler arasında yaptıkları östradiol benzoate uygulaması CL yapısının ömrünü arttırmış ve yeni siklusun başlamasını geciktirmiştir. Bu nedenle domuzlarda embriyonik östrojen anti-luteolitik sinyal olarak kabul edilmektedir. Kısraklarda ise, Goff ve ark (1993) yaptıkları bir seri çalışmada östradiol'ün uterusun oksitosine duyarlılığını arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca eksojen uzun etkili östrojenlerin intramusküler olarak uygulanması sonucu progesteron seviyesini gebe kısraklarda gebeliği tehlikeye sokacak şekilde azaldığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak embriyonik kaynaklı östradiolün luteolizisi önlemeye yönelik bir maternal kabül sinyali olmadığı sonucuna varılmıştır (Stout ve Allen 2001, Wilsher ve ark 2006).

Anti-luteolitik özelliğinden çok östrojenin uterus içinde embriyonun hareketliliği, uterus tonusunda artışı, uterusta kan akışkanlığının artmasını ve embriyonun yaşaması için endometrial salgılarını uyardığı sanılmaktadır (Stout ve Allen

2001b). Örneğin endometrial sekresyon (histrof veya uterus sütü) içerisindeki total protein ve uteroferrin yönünden artışın östrojen tarafından uyarıldığı gösterilmiştir (McDowell ve ark 1987). Embriyonik östrojenin ayrıca uterustan prostaglandin salgılanmasını uyararak uterus kan akışkanlığını ve uterus tonusunu artırdığı buna bağlı olarakta endometrial sekresyon, besin ve gaz değişimini artacağı bildirilmektedir (Bollwein 1999). Östrojen ayrıca serum IGF–1 miktarını kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli ölçüde arttırabilmektedir (Wilsher ve ark 2006).

Bununla beraber östrojenin metabolitlerinin anti-luteolizis mekanizmasında görev alabileceği yönünde hipotezler de bulunmaktadır (Raeside ve ark 2004).

1.5.2.3. Uterus İçerisinde Embriyonun Göçü

Gebeliğin 6. gününde uterusa ulaşan ve gelişimine devam eden embriyo morula evresinden blasturula evresine geçer. Blasturula evresi morula içerisinde sıvı dolu bir boşluğun (blastosel) şekillenmesi ile karakterizedir. Blastosel şekillendiği evrenin erken döneminde embriyo erken blastosist olarak adlandırılır. Blastosel tamamen şekillendiğinde blastosel embriyo ektodermden köken alan tek sıra halinde döşenmiş hücreler içerir. Bu yapı ayrıca trofoblast olarak tanımlanır. Trofoblast yapısının büyük bir kısmı ileride plasenta yapısının oluşumuna katkıda bulunur. Trofoblast yapımının yanı sıra bir kutupta toplanan hücre topluluğu (Inner Cell Mass, ICM) fötüsu oluşturacak hücreleri oluşturur. Bu blastokoele yapısının tamamen şekillenmesi ile embriyonun çapı hızlı bir şekilde artar ve embriyo bu dönemde genişlemiş (ekspanded) blastosist adını alır. Gebeliğin 6,5. gününde 189 µM, 210 hücreli olan embriyo 7. günde 450 µM ve 1100 hücrelidir. Gebeliğin 10. gününe kadar embriyo blastosist olarak adlandırılır. Bu dönemde (9-12 günler) arasında ICM bir kat hücreli trofoblast yapısının iç yüzeyini örter ve oluşturulan bu boşluk sarı kese olarak isimlendirilir. Bu dönemdeki embriyo 'sarı kese embriyo' olarak da isimlendirilmektedir. Bu sarı kese yapısı uterustan absorbe ettiği tüm molekülleri embriyonun beslenip gelişmesi için kullanılan ilkel bir barsak lümeni gibi vazife görür. Bu sarı kese yapısı kuşlarda olduğu gibi bir besin deposu olarak değil, ancak yapısında gelişen kan damarları sayesinde uterustan absorbe edilen besinlerin saflaştırılarak embriyoya sunulduğu efektif bir organdır. Bu sarı kese yapısı

diğer evcil hayvanların aksine at embriyosunda varlığını plasentasyonun başlayacağı döneme kadar (yaklaşık 40. gün) sürdürür (Vanderwall 1996, Ginther 1998, Sharp 2000, Betteridge 2000).

1.5.2.4. Fiksasyon ve Orientasyon

Fiksasyon olgusu atlarda uterusta tonus artışı, uterus çapında azalma ve embriyo çapındaki artış sonucunda; embriyonun uterus içerisindeki hareketliliğinin azalarak bir kornu uterinin kaudal kısmına yerleşmesi olarak tanımlanabilir. Bu durum gebeliğin yaklaşık olarak 16. gününde görülür (Ginther 1998). Ayrıca fiksasyonda embriyoyu çevreleyen kapsül yapısında bir takım değişiklerinde önemli rolünün olabileceğini akla getirmektedir. Kapsül yapısındaki galaktoz ve N-asetilogalaktoz ile kıyaslandığında salisilik asit düzeyinde önemli bir azalma söz konusudur (Betteridge ve Waelchi 2004). Kapsül yapsısındaki bu tip değişimler 22. günde dejenere olacak bu yapının habercisi olarak da gösterilebilir. Aynı zamanda kapsül yapısındaki salisilik asit miktarındaki azalmaya bağlı olarak fiksasyonun şekillendiği de düşünülebilir (Betteridge 2000). Özellikle insanlarda endometriumdan L-selektin bağlayıcılarının ekspresyonundaki artış blastosist yapısının uterusa tutunduğu dönemde olmaktadır (Fazleabas ve Kim 2003). Betteridge ve Waelchi (2004) fiksasyon öncesi, esnasında ve sonrasında kapsül proteinlerinin ekspresyonunu inceledikleri çalışmalarında kapsül protein kompozisyonunun fiksasyon esnasında hızlı bir şekilde değiştiğini ifade etmektedirler. Ayrıca Quinn ve ark (2006) GM-2 aktivatör proteinin torfoblastlardaki miktarının gebelik başarısını etkilediğini bildirmektedirler.

Orientasyon (dönme) embriyonik diskin sarı kese yapısının ventralinde kalacak şekilde uterus içerisinde dönmesi olarak tanımlanır (Ginther 1998). Fiksasyondan itibaren birkaç gün içerisinde at embriyosu orientasyon işlemini tamamlamaktadır (Silva ve Ginther 2006). Gebeliğin 18. gününde orientasyonun tamamlandığı, orientasyonun tamamlanmasında myometriumdaki kontraksiyonların etkili olabileceği bildirilmiştir (Ginther 1998).

1.5.2.5. Embriyonun Uterus İçerisinde Beslenmesi

Embriyonun uterus içerisinde canlılığını sürdürmesi için endometriumdan salgılan besin maddeleri ile beslenebilmesi gerekir. Bu besin maddeleri özellikle gebeliğin ilk 22 gününde embriyo ile uterus arasında bulunan kapsül yapısından geçerek trofoblastlar tarafından emilir. Bu salgınının oluşmasında asıl etkili hormon gebeliğin devamından da sorumlu olan progesterondur. Kısrak uterusundaki hormon, vitamin ve minerallerden oluşan salgının embriyoya taşınmasını sağlayan proteinler ise retinol binding protein (RBP), uteroferrin ve lipocalin yapıdaki uterokalin (P19) dir (Stewart ve ark 1995, Kennedy 2004). Bu proteinlerden Uterokalinin uterus içerinde varlığı kapsül yapısının varlığını sürdürdüğü süre kadar tespit edilebilir. Bu proteinin in-vitro olarak birçok molekülle bağlanabildiği ayrıca yapısında bir çok esansiyel amino asidi barındırdığı bildirilmiştir (Kennedy 2004).

1.6. Erken Gebelik Sürecinde Hormonal Değişimler

Gebelik süreci boyunca etkili olan ve gebeliğin devamını sağlayan hormon progesterondur. Ovulasyonu takiben oluşan ve gebeliğin 32. gününe kadar tek progesteron kaynağı primer CL dur. Gebeliğin 0–8. günleri arasında plazmada artan progesteron miktarı 16. güne kadar sabit kalır. Kandaki progesteron hormon konsantrasyonunda gebeliğin 16. gününden sonra kısmi bir azalma görülse de, embriyonun trofoblast hücrelerinden salgılanan LH etkili equine chorionic gonadotropin (eCG) etkisi ile 32. günde tekrar artmaya başlamaktadır. Bu dönemde aksesör veya sekonder CL şekillenmesi (40. gün) ile plazma progesteron konsantrasyonu yüksek seviyeye çıkmaktadır (Allen 2001, Saint-Dizier ve ark 2003).

LH hormonunun ovulasyondan sonraki (2. gün) pikinden sonra baskılandığı fakat follikül uyarıcı hormonun (FSH) piklerine (10–12 gün ara ile) devam ettiği; bunun da aksesör veya sekonder CL oluşumu için gerekli folliküllerin gelişimden sorumlu olduğu bilinmektedir (Miller ve ark 1980).

Endometrial kups yapısından eCG salgılanmaya 32. günde başlanır ve pik seviyeye gebeliğin 70. gününde ulaşır. Gebeliğin 120. gününden sonra dejenere olan bu yapılardan eCG üretimi hızla düşer ve birkaç hafta içerisinde plazmada tespit edilmeyecek hale gelir (Allen 2001, Allen 2005).

Östrojen seviyesi ise ovulasyonu takiben hızla düşer ve gebeliğin 30. gününe kadar diöstrüs dönemindeki gibi seyreder. Gebeliğin 35. gününden sonra östrojen miktarındaki artış progesterondaki artış ile paraleldir. Bu dönemde plazmada tespit edilen östrojen ovaryum kaynaklıdır (Allen 2001).

1.7. Genel Olarak Hücre İçi Sinyal İletim Sistemi

Çok hücreli organizmalarda karmaşık vücut yapılarının ve organların şekillenmesi, metabolik faaliyetler, dokuların büyüyüp faklılaşması gibi fonksiyonların yürütülmesi için hücreler arasında mesajları taşıyan sinyal moleküllerin bulunması gereklidir. Bu sistemde meydana gelen aksamalar veya bozukluklar hastalıklara (kanser, otoimmun hastalıklar gibi) sebep olur. Protein, peptit, steroid, aminoasit, lipit türevi vs. yapısında olabilen bu moleküllerden bazıları (hücre dışı sinyal molekülleri) hücre içerisine giremediğinden taşıdığı mesajı yerine ulaştırabilmesi için hücre içi sinyal iletim sistemlerini kullanmak zorundadır. Hedef hücre sinyal molekülünün taşıdığı sinyali hücre membranı üzerindeki uygun reseptörler vasıtası ile alır. Bu moleküllerden bazıları sitoplazmada yapısal değişikliklere neden olurken (plazma membranında elektriksel değişiklikler, metabolik faaliyetler vs.) bir kısmı da sitoplazma üzerinden nükleusa sinyal göndererek transkripsiyon faktörlerini uyarıp bazı genlerin ekspresyonlarını düzenler. Hücre dışı sinyal moleküllerinin kullanıldığı sinyal iletim sistem yolu kısaca; 1) Sinyal oluşturacak hücre tarafından sinyal molekülünün sentezlenmesi ve salgılanması, 2) Sinyal molekülünün hedef hücreye taşınması, 3) Hedef hücredeki reseptörleri ile bağlanma ve aktivasyon, 4) Aktive olan reseptörlere bağlı olarak hücre içinde bir ya da birden fazla hücre içi sinyal iletim yolunun aktivasyonu 5) Hücrenin gelişiminde, metabolizmasında veya fonksiyonunda değişiklik, 6) Sinyal molekülünün bağlı bulunduğu reseptörden ayrılması şeklinde özetlenebilir. Sinyal molekülleri

salgılandığı hücrenin yakınındaki hücreleri (parakrin), uzağındaki hücreleri (endokrin) veya direkt salgılandığı hücreyi (otokrin) etkileyebilir (Berridge 2008).

Gen ekspresyonunun değişmesi ile oluşturulan cevap ilk olarak sinyal molekülünün iletim yolundaki uygun reseptörle bağlanması sonucu oluşur. Daha sonra reseptör ilgili protein kinaz enzimi ile fosforile edilir. Reseptörün fosforilasyonu, sitoplazma içerisindeki ilgili sinyal iletim sistemi bileşenlerinin zincirleme bir şekilde uyarılmasına ve dolayısı ile bu bileşenlerden bazılarının nükleusa geçip, gen ekspresyonunda değişmesi ile sonuçlanan durumu tetikler. Doku ve hücrelerde genlerinin transkripsiyonunu düzenleyen sinyal molekülleri hücrelerin büyüyüp faklılaşması ve organların şekillenmesi gibi olayları tetikler (Berridge 2008). Özellikle çok hücreli canlılardaki vücut yapılarının ve/veya organların gelişip farklılaşması için geliştirici sinyal iletim sistemlerinin birbirleri ile kombine olarak görev yapması gerekir. Bu tip sinyal iletim sistemlerini uyaran moleküller (Wingless type, Hedgehog, Transforming Büyüme Faktör-beta ve Fibroblast Büyüme Faktör gibi) genellikle morfojen olarak isimlendirilirler. Bu salgılanan morfojen moleküller komşu hücrelerdeki hücre içi mekanizmaları aktive ederek hücre için gerekli genlerin ekspresyonunu düzenlerler (Lin 2006).

1.8. Wingless Type (Wnt) Genlerinin Sinyal İletim Sistemi

Hücre içi sinyal iletim sistemi olan ve büyüme faktörü olarak görev yapan Wnt gen ailesi türler arasında oldukça iyi korunmuş olup omurgasız ve omurgalı canlıların gelişiminin çeşitli aşamalarında ve homeostazisin sağlanmasında önemli roller oynamaktadırlar. Embriyonik dönemde hücreler arası iletişimi sağlayan Wnt genlerinde veya sinyal iletim sisteminde meydana gelen mutasyonlar insanlarda kol ve bacakların şekillenmemesi (tetra amelia) ile bazı türlerde beyinin bazı bölgelerinin şekillenmemesi ve böbrek bozuklukları gibi önemli defektleri ortaya çıkarmaktadır (Reya ve Clevers 2005, Clevers 2006). Ayrıca hepatosellüler kanser, kolon kanseri, kemik dansititesinde azalma ve gözde retina bozuklukları gibi hastalıklarda Wnt genlerin veya iletim sisteminde rol oynayan genlerin anormal bir şekilde aktivasyonu veya mutasyonu söz

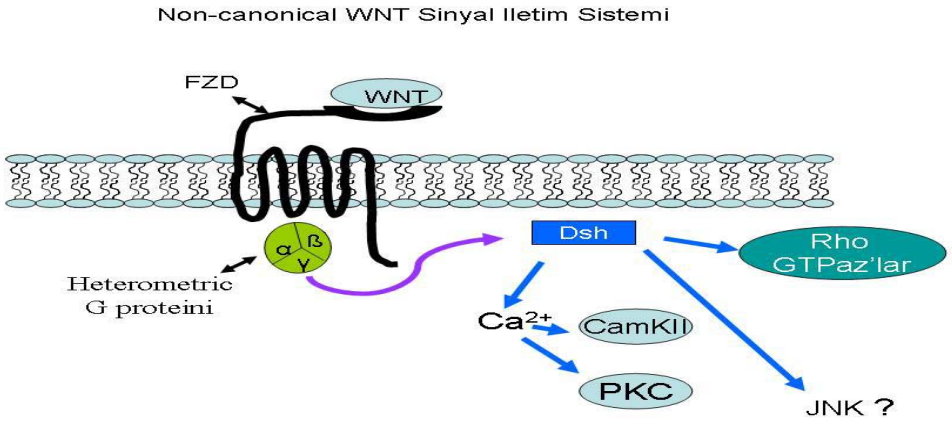
konusudur (Logan ve Nusse 2004, Nusse 2005 Clevers 2006). Bunlarla beraber son yıllarda Wnt sinyal iletim sisteminin kök hücrelerin yenilenmesi ve farklılaşmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Nusse 2008b).

Wnt sinyalinin bir hücreden diğerine ulaşmasında sırasıyla; Wnt genlerinin ekspresyonu, proteininin sentezlenmesi, hücre içerisinde modifikasyonu ve salgılanması, uygun hücre yüzeyi reseptörüne bağlanması, sitoplazma içerisinde ilgili proteinlerin aktivitesini değiştirmesi ve buna bağlı olarak da hedef genlerin aktivitesini düzenlemesi şeklinde bir yol izlemektedir. Bu sinyal iletim sistemi yoluna adını veren gen başta Int–1 (Intergrated protein-1) olarak tanımlanmış daha sonra Rijsewijk ve ark (1987) tarafından Wnt–1 olarak yeniden isimlendirilmiştir. Rijsewijk ve ark (1987) Wnt-1'nin fare meme tümörü virusunun retroviral olarak enfekte edilmesi sonucunda aktive olduğunu gözlemişlerdir. Bu genin aşırı miktarda aktivasyonu meme tümörlerini şekillendirmiştir. Wnt gen ailesi dirozofila sineklerinde segment polarizasyon geni olan Wingless ile orthologdur (biyolojik veya biyokimyasal aktivitesi yönünden benzerlik gösteren). Wingless proteini dirozofila sineklerinin segmentasyonu için gereklidir ve dirozofila sineklerinde kutikula tabakası tekrarlanan segmentler şeklindedir. Normal dirozofila sineklerinde anterior kısım dentin içerirken, posterior kısım kutikuladan yoksundur. Larva dönemindeki bu sineklerde Wingless genlerinin üretiminin engellenmesi uniform olarak dentin tabakası ile donatılmış (segmentasyon şekillenmeyen) mutant sinekleri oluşturmuştur. Ayrıca dirozofila sineklerinin embriyonik dönemdeki kanat ve göz oluşumunda Wingless genlerinin etkili olduğu gözlenmiştir. Wingless genleri hücre yüzeyinde Frizzled (FZD) reseptörü ve hücre içerisinde Dishelved (DVL veya Dsh) ve Rho proteinlerini kullanarak Planar Cell Polaritiy hücre içi sinyal iletim sistemi ile birlikte dirozofila sineklerindeki embriyonal başkalaşımları gerçekleştirirler (Strutt, 2003).

Wnt proteinleri memelilerde başlıca iki çeşit hücre içi sinyal iletim sistemini kullanarak mesajlarını hücreye taşırlar. Birincisi; ß-catenin proteininin anahtar rol oynadığı Canonical sistem, diğeri ise ß-cateninden bağımsız olan Non-canonical iletim sistemidir (Wnt/Ca^{+2}, Wnt/JNK sistemleri). Canonical sinyal iletim sisteminin daha çok

farklılaşma gibi hücrenin kaderinin belirlenmesinde rol oynarken, non-canonical sinyalin hücre hareketleri, morfolojik değişiklikler ve doku organizasyonlarında etkili olduğu düşünülmektedir (Miller ve ark 1999) . Wnt sinyal iletim sistemleri içinde en detaylı araştırılmış olanı Canonical sistemdir. Bu sinyal iletim sisteminde; Wnt proteinlerinin uyarımı sonucunda sitoplazma içerisinde ß-catenin proteininin yıkımlanması engellenmekte ve dolayısı ile sitoplazma içerisinde miktarı artan ß-catenin nükleusa geçip çeşitli gen ekspresyonlarını uyarmaktadır. Bu sistemde Wnt proteinlerinin bağlandığı hücre yüzeyi reseptörleri (FZD ve LRP), sitoplazma içinde hücre yüzeyi reseptörlerine bağlı olarak uyarılan DVL proteini ve ß –catenin'in yıkımlanmasında rol oynayan proteinler (GSK-3 ß, APC, Axin, CK-1α), ß-catenin hücre çekirdeği içerisinde bağlandığı HMG-box transkripsiyon ailesine bağlı T hücresi faktör geni (TCF) rol oynamaktadır (Logan ve Nusse 2004, Lin 2006). Wnt proteinlerinin kullandığı canonical sistem havyan türleri arasında oldukça benzerdir ve iyi korunmuştur (Lin 2006).

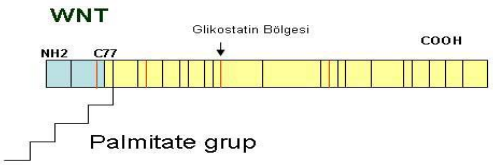
Diğer Wnt sinyal iletim sistemi olan non-canonical sistemde, Wnt proteinleri aktif bir şekilde hücre içi Ca^{+2} salımını uyarır. Buna bağlı olarak Ca^{+2} duyarlı kinazlar; protein kinaz C (PKC) ve calcium/calmodulin-bağımlı kinaz (CamKII) aktive olur (Veeman et al 2003, Nusse 2005, Mikels ve Nusse 2006). Bu yol canonical sinyal kadar iyi araştırılmamış olsa da non-canonical sinyalde FZD reseptörü ile alınan Wnt uyarımının hücre içinde kalsiyum salınımının yanı sıra DVL proteini, Rho ailesine bağlı GTPazlar, heterotrimetric G proteinleri ile JNK, CamKII ve PKC enzimlerinin uyarılmasında etkili olduğu sanılmaktadır (Şekil 1.3., Miller ve ark 1999).



Şekil1.3. Non-canonical Wnt sinyal iletim sisteminin şeması

1.8.1. Wnt Proteinleri

Glikoprotein yapısında olan Wnt proteinlerinin bugüne kadar yapılan çalışmalarda insan ve farede 19, Dirozofilada 7 ve C. Elegansda ise 5 adet olduğu gösterilmiştir (Nusse 2008a). Geçmiş yıllarda Wnt proteinleri fonksiyonel özelliklerinden ziyade aminoasit dizilimlerine göre adlandırılmışlardır. Farklı Wnt proteinleri genellikle benzer yapısal karakteristik özellik gösterirler. Karakteristik özellikleri benzerlik gösterse de her bir Wnt proteini hedef hücrede farklı bir etki oluşturabilir. Wnt proteinlerinin çoğu ortalama 350 aminoasit büyüklüğünde ve 40kDa moleküler ağırlığına sahiptirler. Wnt proteinlerinin yapılarında birçok yüklü rezüdüel bölgeler vardır ve bunlar arasında ortalama olarak 23 ila 25 arasında Cys (sistein) aminoasit bölgelerinin bazıları faklı türler arasında bile oldukça korunmuş kısımlardır. Bu Cys aminoasitlerinin büyük bir kısmı moleküller içi ve arasında disülfid bağlarının şekillenmesine katılırlar. Disulfid bağlarının oluşumuna bağlı olarak Wnt proteinlerin katlaşması ve multimerizasyonu sağlanır. Ayrıca Wnt proteinlerinin N-terminalinde çok sayıda potansiyel N-glikosilasyon oluşturacak bölgeler vardır (Şekil 1.4., Coudreuse ve Korswagen 2007).



Şekil.1.4. Olgun bir Wnt proteinin yapısının şeması

1.8.2. Wnt Proteinlerinin Sentezlenmesi, Olgunlaşması ve Taşınması

Wnt proteinlerinin sentezlendikleri hücrelerde hücreler arasında taşınabilmesi için çeşitli modifikasyonlar geçirmesi gerekmektedir. Wnt proteinlerinin sentezlendikten sonra olgunlaştırılması ve taşınması için glikoz ve lipit parçacıkları ile bazı proteinlerin yapılarına katılmasının gerekli olduğu bilinmektedir (Hausmann ve ark 2007). Wnt proteinlerinin primer aminoasit dizilimine bakılarak bu proteinlerin hidrofilik oldukları düşünülmüş, fakat Wnt proteinlerinin oldukça hidrofobik olmaları ve aktif Wnt proteinlerinin izolasyonlarındaki güçlük yapılarına katılan lipit modifikasyonlarının belirlenmesi ile açıklanmıştır (Willert ve ark 2003). Endoplazmik retikulumda (ER) bulunan Porcupine proteinin inhibe edildiği durumlarda Wnt proteinlerinin hücre dışına çıkamaması ve fonksiyonlarını tamamen yitirmesi bu proteinin Wnt proteinlerinin olgunlaşmasında ve taşınmasında önemli görevlerinin olduğunu göstermiştir. Açiltransferaz enzim ailesinden olan Porcupine Wnt proteinlerinin üzerindeki Cys77 aminoasidine lipit parçacıkları (palmitate grup) bağlar. Palmitate grubunun (Palmitolasyon işlemi) Wnt proteinlerinin tamamına katıldığı sanılmaktadır. Palmitolasyon işlemi ayrıca Wnt proteinlerinin glikolizasyon işlemi için gereklidir (Şekil 1.5., Mikels ve Nusse 2006).

Glikolizasyon işlemi; Wnt proteinleri sentezlendikten sonra ER'ye ulaştıklarında oligosakkarid transferaz (OST) kompleksi peptit çatısının uygun bölgelerine N-linked oligosakkarid zincirleri ilave eder. Fakat bu glikoz moleküllerinin Wnt sentezlenmesi ve fonksiyonları üzerindeki rolü tam anlamı ile anlaşılmamıştır. Diğer morfojen yapıdaki proteinlerde olduğu gibi (Hedgehog gibi), glikolizasyon işleminin Wnt proteinlerinin hücre dışına çıkmak için programlanması ve hürceler arası boşlukta Wnt proteinlerinin ilerleyebilmesine yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Coudreuse ve Korwagen 2007).

Son yıllarda ise Wnt proteinlerini salgılayan hücrelerin bu proteinleri hücre dışına taşıyabilmeleri için Wntless (Wls) isimli çok geçişli bir transmembran proteinine gereksinim olduğu gösterilmiştir. Wls proteininden yoksun hücrelerde Wnt proteinlerinin salgılandığı hücrenin dışına çıkamadığı bildirilmiştir. Wls proteinlerinin

ER, Golgi aygıtı ve daha sonrasındaki taşıma yolları içerisinde bulunduğu ve hücre membranına Wnt proteinlerini taşıdıkları sanılmaktadır (Ching ve Nusse 2006). Wls proteinleri sadece Wnt proteinlerinin taşınmasında görev alırlar ve bundan başka genel bir protein taşıma özellikleri bildirilmemiştir. Ayrıca Porcupine proteinden farklı olarak Wls proteinlerinin herhangi bir enzimsel aktiviteye sahip olmadığı belirlenmiştir (Bartscherer ve ark 2006).

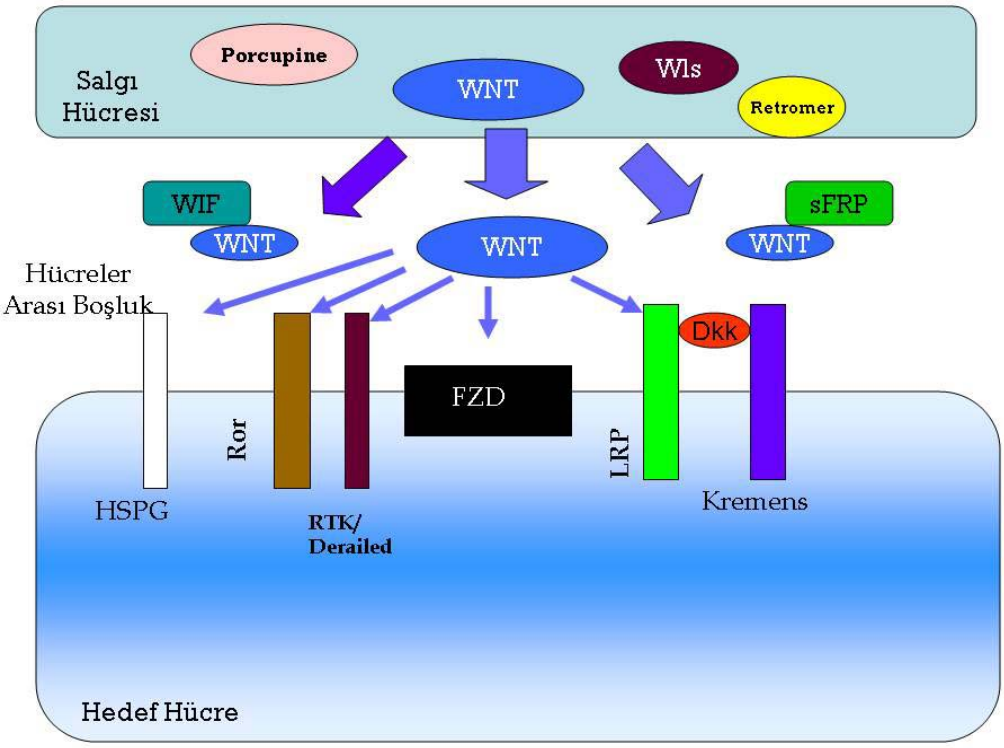
Bunlardan başka, Wnt proteinlerini salgılayan hücrelerde retromer kompleks proteinlerinin (Vps35) yokluğunda Wls proteininin yıkımlandığının gösterilmesi bu proteinlerinde Wnt salgılanmasında rol oynadığını düşündürmektedir (Coudreuse ve ark 2006).

Aktif Wnt proteinlerinin hücreler arası boşlukta izole edilebilmesindeki zorluklar bu proteinlerin hücreler arasında nasıl taşındıkları ve ne kadar uzak mesafelere tanışabildikleri konusunun tam anlamıyla aydınlatılmasında başlıca problemdir. Hücreler arası boşlukta Wnt proteinlerinin bazıları kısa mesafedeki, bazılarının ise daha uzak mesafedeki hedef hücreleri etkilediği sanılmaktadır (Logan ve Nusse 2004, Mikels ve Nusse 2006, Coudreuse ve Korwagen 2007).

1.8.3. WNT İnhibitörleri

Hücre dışına salgılanan Wnt proteinleri hedef hücreye ulaşmadan önce hücreler arası boşlukta çeşitli proteinlerle bağlanarak veya hedef hücre yüzey reseptörü bloke edilerek hedef hücrede etkisinin oluşmasının engellenmesini sağlayan Wnt proteinlerine özgü bazı antagonist proteinlerin olduğu belirlenmiştir (Şeki 1.5.). Bunlardan FZD proteinine benzeyen (SFRP) protein, FZD proteini gibi yapısında Wnt proteinlerinin bağlanabileceği Cys aminoasitinden zengin bölge ihtiva ederler. Fakat bu proteinlerin FZD gibi sinyal iletim sistemini etkileyecek hücre içi kısmı olmadığından Wnt sinyal iletimi bloke edilmiş olur. Diğer bir antagonist ise Wnt-inhibitör-faktör (WIF) proteinidir. Bu proteinde SFRP'de olduğu gibi Wnt proteinleri üzerindeki WIF bölgesi üzerinden Wnt proteinlerini bağlayarak etkisiz hale getirir (Logan ve Nusse 2004). Fakat

SFRP ve WIF proteinlerinin Wnt proteinlerine bağlanarak bu proteinlerin stabilizasyonunu ve hücreler arası boşlukta taşınmaları sağladığı da düşünülmektedir (Uren ve ark 2000). Ayrıca canonical Wnt sinyal iletim sisteminin uyarımını sağlayan ve hücre yüzeyinde FZD reseptörü ile beraber bulunan LRP reseptör proteinini inhibe eden Dickkopf (Dkk) proteinide indirekt olarak canonical yolu bloke eder (Mao ve ark 2002). Dkk protein ailesine vertebralılar dışındaki türlerde rastlanmamıştır (Logan ve Nusse 2004).



Şekil.1.5. Wnt proteinlerinin salgılanması, hücreler arası boşluktaki ve hedef hücredeki etkileşimlerini gösteren şema

1.8.4. WNT Sinyal İletim Sisteminin Hücre Yüzeyi Reseptörleri ve Çalışma Sistemi

FZD reseptörü, G-proteini birleşik reseptör proteinleri ailesinden olup, Wnt sinyal iletim sisteminde Wnt proteinleri için en önemli hücre membranı reseptörü olduğu bilinmektedir. FZD hücre membranı üzerinde yerleşmiş yedi-transmembran (Geçişli) tipinde bir reseptördür. Ayrıca hücre membranının dışında Cys aminoasitinden zengin

uzun bir N-terminal bölgesine sahiptir. Wnt proteinleri direkt olarak FZD reseptörünün hücre dışındaki Cys aminoasitinden zengin kısımlarına bağlanırlar. FZD reseptörü canonical sinyal iletim sistemine ait bir Wnt proteini ile uyarıldığı zaman sitoplazma içerisinde DVL proteinlerini aktive ederler. Bazı FZD reseptörlerinin aktivasyonu sonucunda sitoplazma içerisinde DVL proteinlerinin yanı sıra, GTPazlar ve heterotrimetric G proteinleri de aktive olabilmektedir (Logan ve Nusse 2004). İnsan ve farede 10 farklı FZD reseptörünün olduğu tespit edilmiştir (Nusse 2008a). Bir Wnt proteini birden fazla FZD reseptörüne bağlanabildiği gibi, bir FZD reseptörüne de birden fazla Wnt bağlanabilir. Ancak FZD reseptörlerinin tamamı canonical iletim sisteminde aktif görev almazlar (Şekil 1.7., Chen ve ark 2008).

Wnt sinyal iletim sisteminde etkili olan diğer bir hücre yüzeyi reseptörü de Low Density Lipoprotein Reseptör-related protein (LRP) ailesine ait LRP5 ve LRP6 reseptörleridir. Canonical sinyal iletim sisteminin aktive olması için Wnt proteinlerinin FZD reseptörleri yanı sıra LRP reseptörleri ile de bağ oluşturması gerekmektedir. Wnt proteinleri direkt olarak LRP5/6 reseptörlerine bağlanabilmekte ve bunun sonucu olarak Wnt, FZD ve LRP üçlü kompleksi oluşturulmaktadır (Şekil 1.7., Logan ve Nusse 2004). LRP reseptörlerinin tek bir transmembran bölgesi vardır. Hücre dışındaki bölgesine oranla daha küçük bir hücre içi kısım içerir. Hücre içerisinde ucu Axin proteini ile ilişkilidir. Wnt uyarılarına bağlı olarak LRP proteininin sitoplazmik ucunda yer alan Pro-Pro-Pro-Ser-Pro (PPPSP) bölgesi membrana bağlı Glikojen sentaz kinaz–3ß (GSK-3ß) ve kazein kinaz 1 (CK1) enzimleri ile fosforile edilir. Böylelikle LRP'nin sitoplazmik ucunda Axin proteini toplanır (Sakanaka ve Williams 1999).

Son yıllarda yukarıda bahsedilen bu reseptörler dışında hücre yüzeyinde Wnt proteinlerin bağlanabileceği iki reseptör daha bildirilmiştir (Chen ve ark 2008). Bunlardan biri tek geçişli tirozin kinaz reseptörü olan Ror2'dir. Wnt5a'nın Ror2 reseptörüne bağlanarak ß-catenin yolunun inhibisyonunu sağladığı gösterilmiştir (Schambony ve ark 2007). Diğeri ise a-tipik tirozin kinaz reseptörü olan RTK/Derailed dir (Yosihkawa ve ark 2003). Bu reseptör sinir sisteminin gelişimi üzerine etkilidir. Bu

reseptörlerin uyarılması ile hangi hücre içi sistemlerin aktive olduğu konusundaki bilgiler henüz oldukça sınırlıdır (Şekil 1.5., van Amerongen ve ark 2008).

Ayrıca hedef hücre membranında bulunan heperan sulfat proteoglikan (HSPGs) proteininin Wnt proteini ile ilişkili olduğu, bu ilişkinin diğer reseptörlerle Wnt ilişkisini artırdığı ve Wnt proteinlerinin hücre dışı boşlukta parçalanmasını engelleyerek Wnt sinyal iletim sistemini düzenlediği sanılmaktadır (Şekil 1.5., Coudreuse ve Korwagen 2007).

1.8.5. WNT Sinyal İletim Sisteminin Sitoplazma Bileşenleri ve Çalışma Sistemi

Wnt uyarımları sonrasında sitoplazma içerisinde ilk aktive olan protein, FZD reseptörünün sitoplazmik ucu ile ilişkili olan DVL proteinidir ve memelilerde üç tipi bulunmaktadır (DVL–1, DVL–2, DVL–3). DVL proteininin birçok sinyal iletim sistemi için modülatör rolü olduğu sanılmaktadır (Lin 2006). DVL proteinleri yapısında tüm türlerde korunmuş olan üç bölge vardır. Bu bölgeler amino terminalde DIX, merkezde PZD, ve karboksil terminalde DEP dir . Bu farklı bölgelerin farklı sinyal iletim sistemlerinde etkili olduğu düşünülmektedir (Hsu ve ark 1999). DVL proteinleri sitoplazma içerisinde Axin, GBP/Frat1 ve GSK3- ß ile etkileşerek ß-catenin'in yıkılmamasını engellediği sanılmaktadır (Lin 2006). Wnt proteinlerinin uyarımı sonucunda DVL Par-I tarafından hiperfosforile edilir. Aktif hale geçen DVL proteini sitoplazma içerisindeki GSK-3ß proteinini direkt veya indirekt olarak inhibe eder. ß-catenin'in fosforlanmasından sorumlu mekanizmanın engellenmesini (canonical Wnt sinyal iletim sisteminin aktivasyonu) Wnt uyarımına bağlı olarak FZD tarafından aktif hale geçirilen DVL proteini ile birlikte LRP'nin uç kısmına toplanan Axin proteininin DIX bölgeleri üzerinden bağ oluşturarak düzenledikleri bildirilmiştir (Şekil 1.7., Logan ve Nusse 2004).

Axin, ß-catenini fosforile ederek 26S protezomlar tarafından parçalanmasını sağlayan yapı içerisinde görev alır. Axin proteini üzerinde ß-catenin, GSK3- ß, CKI α, APC, DVL ve LRP proteinleri için uygun bağlanma bölgeleri vardır (Sakanaka ve Williams 1999). Bu proteinin mutasyonu, Wnt uyarımı ile oluşturulan Xenetopus

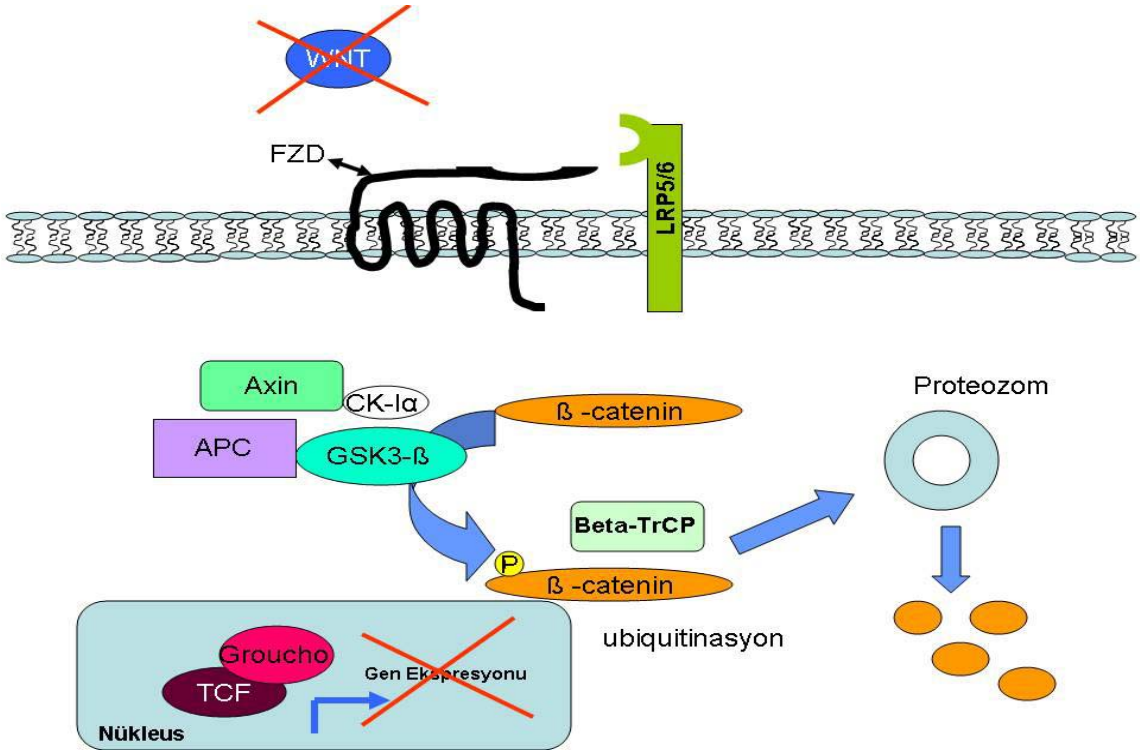
embriyolarında axis duplikasyonunu bloke etmiştir (Itoh ve ark. 1998). Hücre içerisindeki miktarı, diğer Wnt sinyal iletim yolu proteinleri ile karşılaştırıldığında oldukça sınırlıdır (Logan ve Nusse 2004).

APC proteini de Axin proteini gibi, sitoplazma içerisinde ß-catenin'in yıkımlanmasını sağlayan kompleks içerisinde yer alır. Sitoplazma içerisinde Axin ve ß-catenin ile direkt olarak ilişki içindedir. Wnt sinyal iletim sistemini negatif yönde etkiler (Lin 2006). Tümör baskılayıcı özelliği olan APC'nin mutasyonuna bağlı olarak kalıtsal bir kanser olan ailesel adenomatos poliposiz (FAP) şekillendiği bildirilmiştir (Pollakis 1997). Ayrıca APC mutasyonuna bağlı gelişen kolorektal kanserlerde, kanserli hücrelerde ß-catenin birikmesine yol açtığı bildirilmiştir (Bienz ve Hamada 2004). Moleküler ağırlığı Wnt sinyal iletim sisteminde rol oynayan diğer hücre içi proteinleri ile kıyaslandığında oldukça büyüktür (312 kDa). Wnt iletim sistemi dışında, APC proteini hücre göçünü, adezyonunu, siklusunu ve kromozom stabilitesini düzenler. Bunun dışında nükleus içerisine geçen ß-catenini yakalayarak, nükleus dışarısına çıkartılıp, yıkımlanmasını sağlar (Lin 2006).

GSK-3ß-ve CK1α ailesi, serine/threonine(Ser/Thr) protein kinaz enzimdir. Proteinlerin üzerindeki Serine/threonine aminoasitlerini fosforile ederler. ß-catenin N-terminali üzerinde GSK-3ß'nın fosforilasyon gerçekleştirebileceği 4 potansiyel bölge belirlenmiştir. Bu bölgelerin mutasyonuna bağlı olarak ß-catenin hücre içi stabilizasyonu artmaktadır. Direkt olarak GSK3-ß ve CKIα, ß-cateninin fosforlanmasında rol aldığını gösterilmiştir (Aberle ve ark 1997). CKI α tarafından ß-catenin S45 bölgesini fosforile edilmesi, GSK3 ß'nın T41, S37 ve S33 bölgelerinin fosforlanmasını uyarmaktadır. CKIα ve GSK3-ß üzerinde ß-catenin ve Axin proteinine bağlanma bölgeleri vardır (McKay ve ark 2001, Liu ve ark 2002). ß-catenin yıkımlanma kompleksi içerisinde N-terminaldeki Ser/Thr rezidülerini fosforile ederek yıkımlanmasında rol oynayan bu enzimler Wnt sinyal iletim sistemi için negatif etkili iken, aynı enzimlerin Wnt sinyaline bağlı olarak LRP sitoplazmik ucundaki Axin proteininin toplanmasında rol alması (agonist etki) bu sinyal iletim sistemindeki rolünü oldukça karmaşıklaştırmaktadır (Logan ve Nusse 2004, Price 2006).

1.8.5.1. ß -catenin ve Sitoplazma İçindeki Parçalanma Yolu

İlk olarak hücrelerin birbirine bağlanmasını sağlayan e-caterinin hücre içi domain proteini olarak izole edilmiştir. Daha sonraları dirozofila sineklerinde segment Polarity geni olan armadillo proteini ile homologluğunun keşfedilmesi bu proteinin transkripsiyonda da görevleri olduğunu ortaya koymuştur. ß-catenin, Wnt canonical sinyal iletim sistemine ait proteinlerin taşıdığı mesajı nükleusa ileterek gen ekspresyonunu düzenleyen 130 aminoasitlik önemli bir proteindir (Willert and Nusse 1998). Bu proteinin N- terminali hücre içi stabililizasyonu için önemli iken C-terminali DNA bağlanmasını sağlayan bölgeleri ihtiva eder. N-terminali yapısında bulunan dört adet serine/threonine motifi ß-catenin'in CKIα ve GSK3-ß tarafından fosforlanmasını sağlar. Bu kinaz enzimleri ile fosforile edilen ß-catenin'in yapısına ß-TrCP tarafından ubiquitin proteinleri eklenir (Ubiquitinasyon) ve daha sonrada 26S proteozomlar tarafından tanınan ß-catenin'in parçalanması sağlanır (Şekil1.6., Logan ve Nusse 2004, Lin 2006).



Şekil.1.6. Wnt proteini olmadığında ß-catenin'in hücre içindeki parçalanmasını gösteren şema

1.8.5.2. Beta-cateninin Hücre İçi Stabilizasyonu

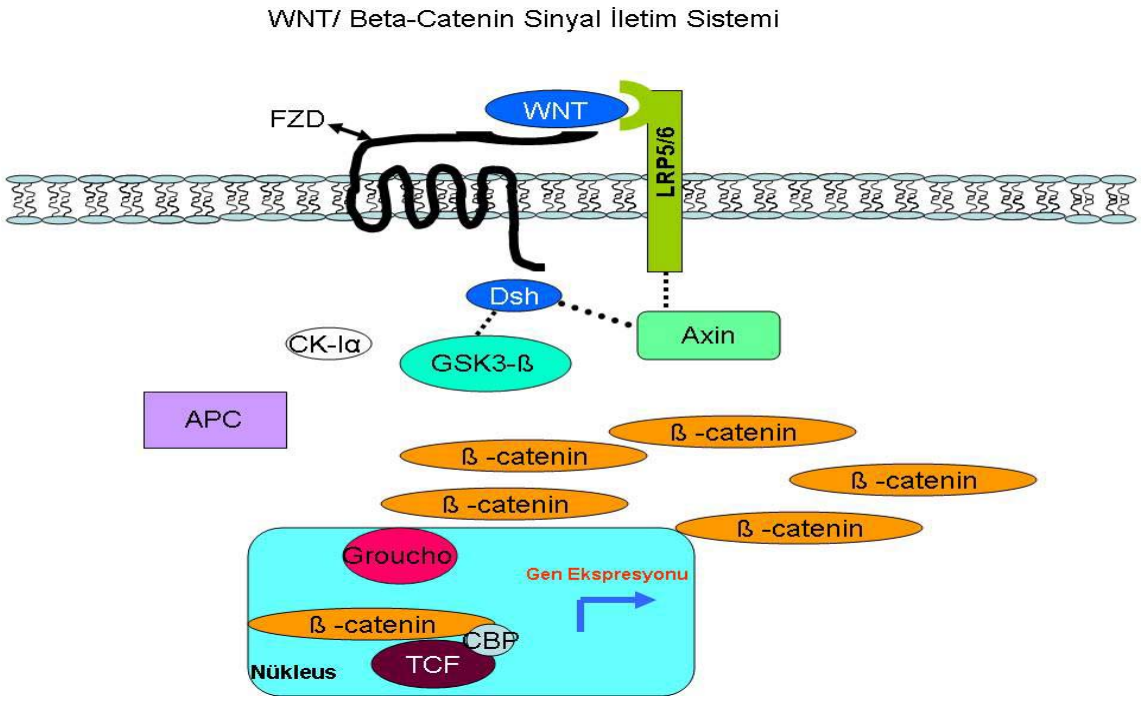
Canonical sinyal iletim sistemini uyaran Wnt proteinlerinin hücre içerisinde istediği etkiyi oluşturabilmesi için ß-catenin'in hücre içi yıkımlanmasını engellemesi gerekmektedir. ß-catenin'in N-terminali hücre içi stabilizasyonunda önemli rol oynar. Hatta N-terminalinde mutasyon şekillenen ß-catenin'in hücre içinde oldukça stabil ve aktif olduğu gözlemiştir. C-terminali DNA'ya bağlanma bölgeleri ihtiva ettiğinden bu bölge Wnt sinyal iletim sistemi için gereklidir. ß-catenin'in hücre içerisinde birikebilmesi için ß-catenin'in yıkımlanmasında görev alan proteinlerin bir şekilde etkilerinin ortadan kalkması gereklidir (Lin 2006). Hücre içinde ß-catenin'in stabilitesini etkilen iki önemli protein; GSK3-ß ve APC proteinleridir (Aberle ve ark 1997). APC'nin özellikle kolorektal kanser olgularında mutant özellikte olmasından dolayı ß-catenin'e bağlanamaz ve bunun sonucu olarak bu hücrelerde ß-catenin düzeyi artmaktadır. Ayrıca GSK3-ß tarafından fosforlile edilen APC'nin ß-catenin'e bağlanma özelliği artar. ß-catenin'in hücre içi stabilizasyonun artmasını açıklayan en önemli teori, GSK3-ß kinaz aktivitesinin azalmasıdır (Logan ve Nusse 2004). Ayrıca DVL proteini, kompleks içerisindeki GSK3-ß'yı bağlayan GBP/Frat proteini ile etkileşime geçerek GSK3-ß'nın ß-catenin'in parçalanmasını sağlayan komplesin içerisinden ayrılması sağlanır (Yost ve ark 1998) . Bununla birlikte Axin proteinin de LRP'nin sitoplazmik ucunda toplanması ß-catenin'in sitoplazma içerisinde yıkımlanmasını olumsuz yönde etkiler (Şekil1.7. Logan ve Nusse 2004).

1.8.6. Beta-catenin'in Nükleus İçine Girmesi ve TCF ile İlişkisi

ß-cateninin hücre çekirdeği içerisine doğrudan girebildiği sanılmaktadır. Canonical Wnt sinyaline bağlı olarak hücre içerisinde stabilizasyonu ve miktarı artan ß-catenin nükleus içerisinde TCF/Lef DNA bağlanma protein ile etkileşir (Şekil 1.7.). Wnt sinyalinin olmadığı durumlarda, TCF/Lef, Groucho proteini ile bağ oluşturarak Wnt gen ailesi için hedef genleri baskılar. ß-catenin olduğu durumlarda ise; TCF/Lef/Groucho protein kompleksinden Groucho proteininin uzaklaştırılması ve bölgeye ko-aktivatör olarak gelen CBP ile oluşan yeni protein kompleksi, Wnt proteinlerinin hedef genlerinin

sentezlenmesini uyarır. Bu kompleks aktivatörünün yanı sıra, Brg-1 (kromatin yapısını çözen bir protein) proteininde Wnt hedef gen ekspresyonunu artmaktadır (Logan ve Nusse 2004). Kromotain ile TCF/ß-catenin kompleksinin aktivitesinin düzenlenmesinde Leglesss ve Pygopos proteinlerinin rol oynadığı, bu genler yönünden mutant olan dirozofila sineklerinde ve memeli hücre kültüründe Wnt sinyal iletim sistemi bozukluğuna benzer bulguların ortaya çıkması bu genlerin önemini göstermiştir (Belenkaya ve ark. 2002).

Bu bahsedilen nükleus proteinleri dışından ß-catenin'in TCF ile etkileşime geçmesini engelleyen proteinlerin varlığı tespit edilmiştir. Bunlar ICAT (İnhibitör ß-catenin ve TCF-4) ve Chibby (Cby) proteinleridir. Bu proteinler ß-catenine bağlanarak, ß-catenin ile TCF'nin kompleks oluşturmasına izin vermezler (Tago ve ark 2000).



Şekil.1.7. Wnt/ß-catenin sinyal iletim sistemini gösteren şema

1.9.Wnt Genlerinin Reprodüktif Olaylar Üzerine Etkileri

Wnt ailesi genlerini insan ve diğer memelilerin dişi genital sisteminde hem neonatal süreci kapsayan puberta öncesinde hem de erişkin dönemde görevleri bulunmaktadır. Uterusun morfolojisi, mezenşimal-epitel ilişkinin düzenlemesi, preimplantasyon periyodunda uterusun gebelik için hazırlanması, implantasyon süreci, insan ve ruminantlarda trofoblastların başkalaşımında rol oynadığı gösterilmiştir (Sassoon 1999, Carson 2005, Hayashi ve ark 2007). Ayrıca Wnt sinyal iletim sistemi antagonisti olan SFRP-2'nin uterus epitel hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (Mohammed ve ark 2005)

İnsan endometriumunda mensturel siklus boyunca devamlı olarak Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a ve Wnt7b sentezlenmektedir. Fakat endometrial karsinoma olgularında Wnt2, Wnt3, Wnt4 ve Wnt5a ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir (Bui ve ark 1997). Tulac ve ark (2003) mensturel siklus boyunca insan endometirumunda Wnt7a'nın luminal epitelde sentezlendiğini belirtmişler ve Wnt7a'nın glandular fonksiyonlar için önemli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, Wnt7a knock-out farelerin uteruslarında glandular gelişim olmamaktadır. Hayashi ve ark (2007) pre-implantasyon döneminde Wnt genlerinin ekspresyonundaki günlere göre artma veya azalmanın, koyunlarda uterus/embriyo arasındaki ilişkinin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermişlerdir. Yine Kim ve ark (2003) ruminantlarda maternal kabulü sağlayan IFN-τ'nun endometrial epitelde Wnt7a ekspresyonunu arttırdığını gözlemişlerdir.

Bir büyüme faktörü sinyal iletim sistemi olan Wnt'nin implantasyon sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Farelerde, uterus kornuları ligasyon yöntemi ile birbirlerinden ayrıldığında sadece embriyonun bulunduğu tarafta Wnt sinyal iletim sistemine ait genlerin aktivite olduğu belirlenmiştir. Buna karşın susam yağı verilerek yalancı gebelik durumu oluşturulan farelerde Wnt sinyal iletim sistemi aktive olmamıştır. Bu nedenle, Wnt sinyal iletim sisteminin aktivasyonunun uterusta embriyonun varlığına bağlı olarak oluştuğu kanısına varmışlardır. Farelerde embriyo

transferini takiben Wnt sinyal iletim sistemi antagonisti SFRP2'nin uygulanması implantasyon oranını önemli derecede düşürmüştür (Mohamed ve ark 2005).

Miller ve ark (1998) tarafından östrus siklusu boyunca östrojen ve/veya progesteron hormonu etkisi altındaki uterusta Wnt sinyal iletim sisteminde rol alan genlerin ekspresyonunda artış ve azalmalar olduğunu belirlemişlerdir. Östrojen ve progesteron etkisi ile Wnt sinyal iletim sistemi uterusta hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Progesteron etkisi ile hücrelerde GSK-3β'nın miktarının azalması Wnt sinyal yolunun uyarılması için progesteronun gerekliliğini göstermektedir. Östrojenin ise Wnt sinyal iletim sisteminin tam aktivasyonu (hücre çekirdeğindeki gen aktivasyonu) için gerekli olduğu vurgulanmıştır (Rider 2006). Oehler ve ark (2002) normal endometrial epitel hücrelerini progesteron ve östrojen ile inkube etmişler ve bu hücrelerde ilk olarak Wnt 7a'nın arttığını gözlemişlerdir.

Sikluslar ve gebelik sırasında çeşitli fonksiyonları ile östrojen için primer hedef organ uterustur. Farelerde östrojen uterus epitelinin proliferasyonunu uyarır ve bu da normal epitel morfogenezisinin devam ettirilmesi, hücresel farklılaşma ve salgı faaliyetlerinin devam etmesi için gereklidir. Genel kanı; östrojenin bu etkinliğini dokudaki reseptörleri ile etkileşerek oluşturduğu şeklindedir (Ma ve ark 2003, Paria ve ark 2000). Fakat östrojenin reseptörlerinden bağımsız olarak Wnt iletim sistemini uyardığının belirlenmesi, östrojenin hedef dokudaki etkisini farklı sinyal iletim sistemleri üzerinden de çalışabildiğini göstermektedir (Hou ve ark 2004). Hou ve ark (2004) östrojen reseptöründen bağımsız olarak östrojenin Wnt4, Wnt5 ve FZD2 ekspresyonunu hızlı bir şekilde arttırdığını bildirmektedirler.

Sonuç olarak insan, fare ve ruminantlarda siklus ve erken gebelik boyunca Wnt sinyal iletim sisteminde önemli roller oynayan genlerin ekspresyonunun çeşitli faktörlere bağlı olarak (ovaryum sex steroidleri, IFN-τ gibi) değiştiği bilinmektedir. Hatta reprodüktif olarak implantasyon gibi çok önemli süreçlerin Wnt gen ailesi veya iletim sisteminde rol oynayan genler ile düzenlendiği gösterilmiştir (Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009). Kısraklarda henüz Wnt gen ailesi karakterize edilmemiştir.

Ayrıca; Wnt genlerinin kısraklarda östrus siklusu ve erken gebeliğe bağlı olarak nasıl bir ekspresyon profili sergilediği bilinmemektedir. Kısraklarda östrus siklusu ve erken gebelik boyunca maternal veya embriyonal olarak salgılanan moleküllerin, uterustaki Wnt genleri ve bunların sinyal iletim sisteminde rol oynayan genler üzerinde oluşturacakları değişliklerin tespiti, kısraklarda östrus siklusunun ve gebeliğin moleküler yönünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır. Erken gebelik süresinde at embriyosundan salgılanan yoğun miktardaki östrojenin rolü tam olarak bilinmemektedir. Daha önceden bahsedildiği üzere diğer türlerde maternal hormonlardan olan östrojen veya progesteron Wnt sinyal iletim sistemini üzerine etkilidir. Bu nedenle embriyo kaynaklı östrojenin ve embriyonun uterustaki Wnt sinyal iletim sistemi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi gebeliğin maternal kabulü mekanizmasının daha iyi anlaşılmasına yardımcı olabileceği ve gelecekteki çalışmalara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali ve Seçimi

Çalışmada Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Atçılık Ünitesinde yaşları 5–16 arasında değişen, 450–550 kg vücut ağırlığına sahip ve Henneke ve ark (1984) belirlediği sisteme göre vücut kondüsyon skoru 5–6 olan 10 adet Arap kısrak ve 1 adet aygır kullanıldı.

Çalışmada kullanılmadan önce kısraklara aşağıda belirtilen muayeneler yapıldı;

2.1.1. İnspeksiyon: Vulvar ve perineal bölgenin durumu (bölgedeki lezyon, yaralanmalar vs.) ve duruşu (sarkma ve çökme gibi) belirlenerek normal anatomik duruşa uygunluk kıyaslandı. Caslick index skorlaması Pascoe (1979)'nun bildirdiği sisteme göre yapıldı. Skoru 100 üzerinde olan kısraklara Caslik operasyonu uygulandı. Spekülüm yardımı ile vagina duvarında veya serviks önündeki kalıcı hymen ve pnomovagina gibi patolojiler araştırıldı.

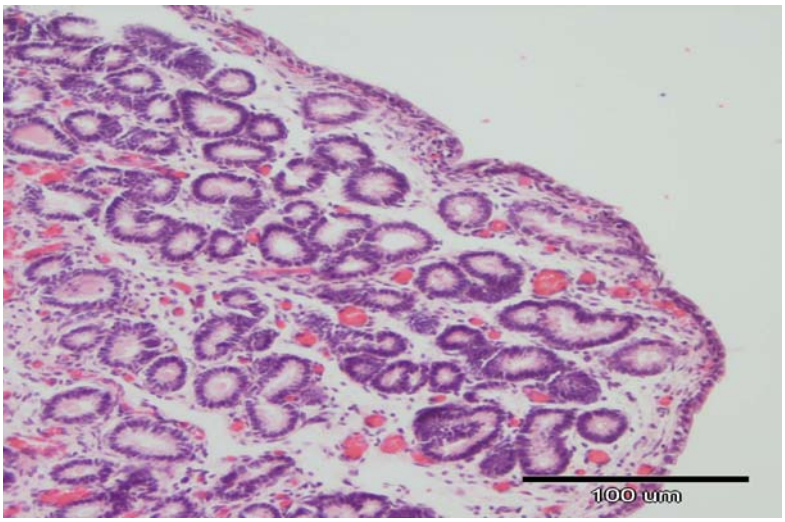
2.1.2. Rektal Muayene: Muayene de sol ovaryumdan başlanarak, sol kornu uteri, korpus uteri, serviks uteri, sağ kornu ve sağ ovaryumum asıcı bağ rehberliğinde normal anatomik yerlerine ve duruşlarının uygunluğu belirlendi.

2.1.3. Ultrasonografik Muayene: Rektal muayene sonrasında dönemsel değişiklikler göz önünde bulundurularak ovaryum ve uterusun durumu, patolojiye yol açabilecek ovaryum tümörleri, kistleri, hematomları, inaktif ovaryum, endometritisler, kistik oluşumlar vs. yönünden incelendi.

2.1.4. Serviksin Durumunun Belirlenmesi: Vaginal yoldan elin baş ve işaret parmakları kullanılarak serviksin açıklığı ve servikal yırtıklar gibi patolojik durumları değerlendirildi.

2.1.5. İntrauterin Örneklemeler: Şüphelenilen durumlarda uterustan çift kılıflı swaplarla (Kruuse, Danimarka) alınan sürüntü ve/veya sıvı örnekleri lam üzerine alınıp kurutulduktan sonra Giemsa boyama tekniği ile uterus sitolojisi yapılarak Polimorf Çekirdekli Lökositler ve Eritrosit varlıkları incelendi. Ayrıca gerek görülen durumlarda bakteriyolojik incelemelere de başvuruldu.

2.1.6. Histopatolojik İncelemeler: Alınan biyopsi örnekleri %10"luk formaldehit solüsyonu ile tespit edildikten sonra parafin içinde bloklanarak kesit alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) boyama yöntemi ile boyanıp, Kenney ve Doig'in (1986) bildirdiği sınıflandırmaya göre değerlendirildi (Resim 2.1).



Resim 2.1. Siklusun luteolizis sonrası östrusta HE ile boyanması sonucunda elde edilen endometrium görüntüsü (Biyopsi derecesi II-A)

2.1.7. Aygır Muayenesi: Penis ve prepisiyumun durumu ile aygırın libidosu gözlemsel olarak değerlendirildi. Suni vajen ile alınan spermanın miktarı spermatozoonların motilitesi, canlılık oranı, patojik durumları belirlendi.

2.1.8. Diğer Muayeneler: Fertiliteyi etkileyebilme olasılığı nedeni ile sistemik muayeneler, ağız ve diş muayenesi, ayak ve tırnak bozuklukları ve paraziter hastalıklar

yönünden incelendi. Alınan kan numunelerinde normal kan parametrelerine (Kan gazları, Eritrosit, Lenfosit sayıları) uygunluk araştırıldı.

Sonuçta yukarıda sayılan tüm muayeneler sonrasında sağlıklı ve parametreleri fertilite sınırları içerisinde kabul edilen aygır ve kısraklar çalışma için kullanıldı. Çalışma süresince gerek görüldükçe muayeneler tekrarlandı.

2.2. Bakım ve Besleme

Aygır ve kısrakların her biri bağımsız bokslarda barındırıldı. Haftada 4 gün ve günde 2 saatten az olmamak üzere kısraklar açık padokta serbest bırakıldı. Tırnak bakımları, tımarları ve günlük altlık değişimi rutin olarak yaptırıldı. Su ihtiyacı hayvan bokslarındaki otomatik suluklardan karşılandı. Yem ihtiyacı pelet yemden, kuru ot ihtiyacı kurutulmuş yonca ile karşılandı. Aylık olarak B kompleks ve E vitamin enjeksiyonu ile 6 ayda bir anti-paraziter oral pasta (Eqvalan, Novakim, Türkiye) yapıldı.

2.3. Kısrakların Östrus ve Ovulasyonlarının Düzenlenmesi

Sezon başlangıcında yapılan ultrasonografi muayenesi ile ovaryumlarında tipik geçiş dönemi follikülleri gözlenen, ovulasyona gitmeyen, herhangi bir dönemde ovaryum üzerinde (gelişen, olgun, gerileyen) CL'i olmayan kısraklar geçiş döneminde olduğu kabul edildi. Kısraklara Intravaginal Progesteron Salan Gereç (PRID, CEVA-DIF, Türkiye) yerleştirildi. Ayrıca kısraklar gündüz saatlerinde dışarıda 2–4 saat bırakılmasıyla gün ışığından daha fazla yararlanmaları sağlandı. PRID çıkartıldığı gün 10 mg dozda intramusküler (i.m.) $PGF_{2\alpha}$ (Dinoprost, Pfizer, Türkiye) enjekte edildikten sonra östrus belirtiler yönünden 4–5 gün süre ile izlendi.

Sezon içerisinde biyopsi örnekleri alınan kısraklara östrusların uyarılması için tek doz 10 mg İ.M. $PGF_{2\alpha}$ enjekte edildi. Uygulama sonrası 4–5 gün içerisinde östrus göstermeyen kısraklara inatçı CL olduğu kabul edilerek 12 saat ara ile çift doz 5 mg İ.M. $PGF_{2\alpha}$ uygulandı.

Ovulasyonların uyarılması amacı ile ovaryum üzerinde ≥ 35mm follikül bulunan östrustaki kısrakların tümüne 1500 IU İ.V. hCG (Chorulon, Intervet, Türkiye) yapıldı.

2.4. Kısrağın Hazırlanması

Kısraklar tohumlama, biyopsi örneği toplama veya muayeneler esnasında travay içerisine alındı. Gerek görülen durumlarda kısraklara sedasyon amacıyla sedatif 0,5-1 ml İ.V. (Domosedan, Pfizer, Türkiye) uygulandı. İntravaginal işlem gerektiren tüm durumlarda önce kuyruk sargı bezi ile sarılıp hayvanın boynuna bağlanan ip vasıtası ile bölgeden uzaklaştırıldı. Ilık temiz su, pamuk ve betadin sabun kombinasyonu (Isosol-Scrub, Merkez Laboratuar, Türkiye) ile perineal alan ve vulva temizlendi. Daha sonra kuru temiz bir kâğıt havlu ile bölge kurulandı.

2.5. Tohumlama

Östrusta olduğu tespit edilen bir kısrak zapt-ı raptı sağlanarak fantom olarak kullanıldı. Sıcaklığı 40–45 ^{o}C olan suni vajen (Colarado tipi) prosedüre uygun bir şekilde hazırlandıktan sonra aygır fantoma atlatılarak sperma suni vajenin toplama kadehine alındı. Yaklaşık 9 ml sperma (750 milyon) 1,5 ml penisilin (Dipenisol, Bayer, Türkiye) ilavesinden sonra sulandırılma yapılmadan enjektör içerisinde intra-uterin katater ile östrustaki kısrağın uterusu içerisine bırakıldı.

2.6. Ultrasonografik Muayeneler

Kısraklarda folliküler gelişme, ovulasyonlar, CL gelişimi, uterustaki endometrial ödemleşme ve gebelik tespiti gibi durumlar ultrasonografi ile 6–8 MHz'lik Linear prob kullanılarak yapıldı. Folliküler gelişmeler ovaryum üzerindeki folliküllerin çapları ölçülerek izlendi. Ovulasyon 12 saat ara ile yapılan muayenelerde izlenen >35mm follikülün olmaması ve yerinde gelişen CL yapısının gözlenmesi ile belirlendi. Siklusun dönemlerinin belirlenmesi ve östrus tespiti için Atlı ve ark (2005) bildirdiği sisteme göre

uterustaki ödem derecesi skorlandı. Ovulasyonu takiben (0. gün) 10. günden başlayarak uterus içerisindeki embriyoya ait non-ekoik kesenin görülmesi ile 22.günde ise embriyoya ait kalp atımlarının belirlenmesi ile gebelikler teşhis edildi.

Bunların dışında biyopsi sonrası komplikasyonların (endometritis gibi) izlenilmesinde ultrasonografiden yararlanıldı.

2.7. Biyopsi Günlerinin Belirlenmesi

Ovulasyon günü 0. gün olarak kabul edildi. Tohumlanan ve embriyo tespit edilen kısraklarda gebelik günleri 0. gün kriter alınarak belirlendi. Siklik günlerin belirlenmesinde kısraklarda ovulasyon gününün belirlenmesinin yanı sıra ultrasonografi ile endometrial ödemleşme skoru (diöstrus için ödem yok veya östrus için ödemli olması gibi) ve 12 saatte bir alınan kan örneklerinden plazma progesteron hormonunun miktarının tespiti ile karar verildi. Çalışma için kısraklardan bir aşım sezonu boyunca her bir grubun her bir günü için dört adet, aynı gün için birden fazla aynı kısrağın numunesi olmamak şartı ile gebe grupları kendi içersinde 15, 18 ve 22. günler, siklik gruplar 0.gün, geç diöstrus ve luteolizis sonrası östrusta olacak şekilde ayrıldı.

2.8. Biyopsi Alma

Biyopsi öncesi rektal muayene ile dışkı kitleleri rektumdan uzaklaştırılıp uterus konumu belirlendikten sonra perineal alan daha önce bahsedildiği (2.4) gibi temizlendikten sonra sağ kola rektal muayene eldiveni giyildi. Bunun üzerine steril cerrahi eldiven geçirildi. Vulva dudakları iki yana aralanarak steril jel ile kayganlaştırılmış sağ kol ile intravaginal olarak girildi. Serviksin durumu değerlendirilip, duruma göre eğer kapalı ise sağ elin işaret parmağı kullanılarak gevşetildi. Otoklavda sterilize edilen biyopsi pensi sol ele alınarak sağ el rehberliğinde vajina ve serviksi geçerek uterus içerisine yerleştirildi. Biyopsi pensi uterus içerisinde iken sağ el dışarıya çıkartılıp rektal olarak girilerek biyopsi pensine yön verildi. Siklik kısrakta bir önceki numune sağ kornuya doğru alınmışsa sol kornuya doğru, gebe ise

gebelik kesesine en yakın noktaya doğru yönlendirilen biyopsi pensinin ağzı sol el kullanılarak açıldı. Rektum içerisindeki sağ el kullanılarak bir parça endometriumun pensin ağzının içerisine girmesi sağlandı. Daha sonra ağzı kapatılan pens en az 90 derece döndürülerek parçanın tamamen kopması sağlandı. Alınan endometrium örneği 1,5 ml'lik steril ependorf tüp içerisine alınarak sıvı nitrojen içersinde hemen donduruldu ve RNA izolasyonu yapılıncaya kadar -70˚C muhafaza edildi.

Biyopsi sonrası olabilecek enfeksiyonları önlemek için uterusa 2 tüp intrauterine köpük (Fatroximin, İtalya) veya 15 ml %10'luk gentamisin (Gentavet, Türkiye) + kristalize penisilin (4.000.000 IU**,** I.E**.**Ulagay, Türkiye) kombinasyonu verildi. Bu tedavi oksitosin (20 IU İ.M., Vetaş, Türkiye) veya 5mg $PGF_{2\alpha}$ ile desteklendi. Uterus lavajı gerektiren durumlarda ucunda balon olan uterus yıkama kateteri ile 37–45 ˚C arasında ılıtılmış serum fizyolojik (Fizyol, Vetaş, Türkiye) uterus içerisinde verilip, sifon yöntemi ile geri alındı.

2.9. Siklik Kısraklarda Progesteron Ölçümü

Siklik kısraklarda biyopsi gününden en az iki gün öncesinden başlanarak 9 ml ETDA'lı vakumlu tüplere V. Jugularisten kan alındı. Alınan kan laboratuarda santrifüj edilerek plazma kısmı alındı. Toplanan plazmalar ölçüm yapılıncaya kadar -20˚C de muhafaza edildi. Ölçümler ELISA yöntemi (Progesterone II kiti, Almanya) ile beşeri laboratuarda yaptırıldı. Ölçülen progesteron değerlerine göre kan progesteron seviyesi biyopsi yapılan güne kadar yüksek devam ediyorsa geç diöstrüs, en az iki numunede progesteron seviyesi 1 ng/ml altında ise luteolizis sonrası östrus olarak değerlendirildi.

2.10. Total RNA İzolasyonu

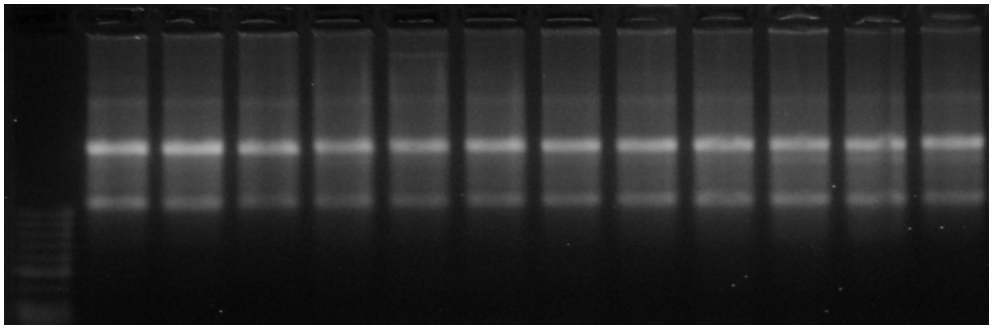
Endometrial biyopsi örneği (yaklaşık 50 mg) 1,6 ml Trizol (Fenol/Kloroform, Trigent, ABD) içerisinde homojenize edildi. Homojenizatörde dokunun tamamen parçalanmasının ardından 1,6 ml'lik RNA solüsyonu iki ependorf tüpe eşit olarak bölündü. Ependorf tüpe alınan 800 µl süspansiyon üzerine 200 µl kloroform eklenerek

vorteksle karıştırıldı. Oda ısısında 10 dakika bekletinen örnekler +4˚C soğutmalı santrifürüjde 12700 g hızda 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısım başka bir ependorf tüpe alttaki fazlar bozulmadan alındı. Yaklaşık 500 µl süpernatant üzerine 600 µl butanol ilave edildi. Karışım alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde 12700 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek oluşan RNA peletinin dipte çöktürülmesi sağlandı. Pelet üzerindeki butanol ilave edilen süpernatant kısım döküldükten sonra 3 defa (sırası ile %70, %70, %95) soğuk etanol ile yıkama işlemi, +4˚C'de 7700g hızda 5'er dakika yapıldı. RNA peleti yeterince kurutulduktan sonra 100 µl steril DEPC- ddH_2O içerisinde çözdürüldü.

2.11. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

Elde edilen total RNA kalitesi ve miktarının belirlenmesi için Nanodrop kullanıldı. Blank belirlenmesi için RNA'ların içerisinde çözündürüldüğü DEPC'li su (ddH_2O) cihazın okuma yüzeyine damlatıldı. Daha sonra cihaz RNA okunma modunda iken 2µl RNA örneği steril pipet ucu ile aletin okuma yüzeyine damlatılarak ölçümler yapıldı. RNA miktarı ng/µl şeklinde belirlendi. Ayrıca izolasyon sırasında oluşabilecek fenol, protein ve genomik (g) DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A_{260}/A_{280} ve A_{260}/A_{230} oranları değerlendirildi. Oranları A_{260}/A_{280} için 2 ± 0,1 ve A_{260}/A_{230} için 2 -2,4 arasında olan RNA örnekleri cDNA yapımında kullanıldı.

RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1µg/10µl konsantrasyonundaki RNA üzerine 6X yükleme boyasından 2µl konularak %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Etidium Bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantları UV-translüminatör üzerinde bant kalitesi gözle ve görüntüleme sisteminden alınan resim ile değerlendirilerek yapıldı. RNA jelinde 28S ve 18S RNA bantları 28S üzerindeki yüksek moleküler ağırlığa sahip RNA'lar ve yükleme kuyucuklarında gDNA varlığına bakıldı. RNA kalitesi yönünden değerlendirmede RNA'nın smear gibi yayılıp yayılmadığı ve 28S bant yoğunluğunun 18S bant yoğunluğundan 2 veya 2,5 katı olması kriterleri kullanıldı. (Resim 2.2)

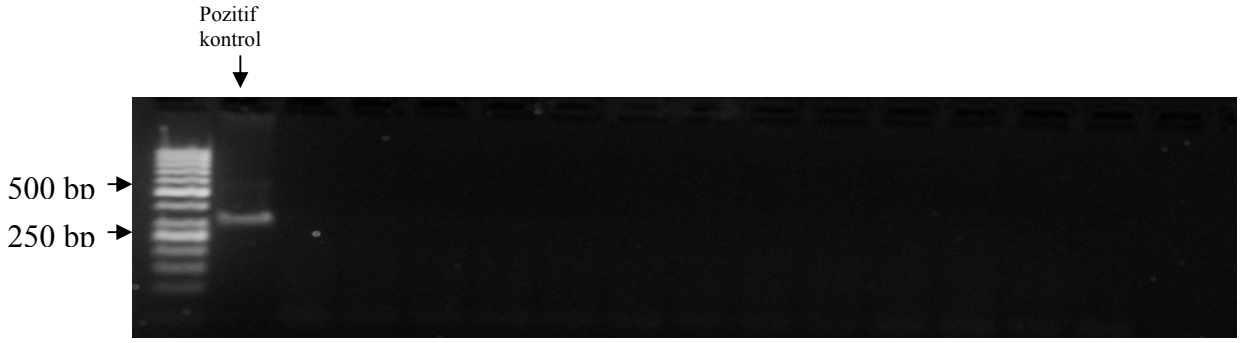


Resim 2.2.Total RNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü

2.12. Total RNA'dan DNase I Enzimi ile genomik DNA'nın Uzaklaştırılması

Nanodropta ölçümleri yapılan RNA'ların konsantrasyonları 2µg/20µl olacak şekilde DEPC-ddH_2O kullanılarak eşitlendi. Daha sonra DNase I (Fermentas, ABD) enzim reaksiyonu üretici firmanın protokolüne göre uygulandı. Bu protokole göre 2µg/20µl total RNA üzerine 2 µl DNase I reaksiyon karışımı ve 2 µl DNase I enzimi konularak su banyosunda +37˚C 30 dakika bekletildi. Reaksiyon durdurulması için 2 µl ETDA ilavesi ile +65˚C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.

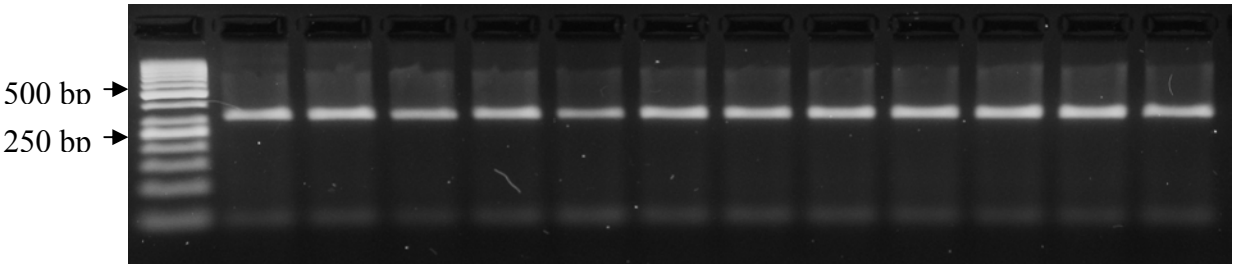
İşlem sonrasında gDNA kontaminasyon varlığının kontrol edilmesi için DNase I ile muamele edilmiş RNA örnekleri GAPDH primer çifti ile Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PZR) Touchdown protokolü kullanılara yükseltgendi. Bu işlem sonrasında %2'lik agaroz jelde GAPDH sinyali vermeyen RNA örnekleri gDNA yönünde temizlenmiş kabul edildi (Resim 2.3).



Resim 2.3.Total RNA DNase I enzimi ile muamele edildikten sonra GAPDH primerleri ile PZR yükseltgenmesinin ardından %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

2.13. Reverze Transkriptaz (RT) Reaksiyonu

DNase I enzimi ile gDNA uzaklaştırılmasının ardından 2µg/20µl total RNA'dan tek zincir cDNA üretilmesi RevertAid First Strand cDNA Sentez kiti (Fermentas, ABD) kullanılarak gerçekleştirdi. Buna göre 1µl Oligo dT ve 1µl Random hekzamer 2µg/20µl total RNA üzerine ilave edildi. Su banyosunda +70˚C 5 dakika bekletildikten sonra 8µl 5X cDNA reaksiyon karışımı, 2 µl RNAse inhibitörü, 4µl dNTP ilave edilerek +25˚C su banyosunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra 2µl Reverse Transkriptaz enzimi ilave edilerek önce +25˚C 10 dakika sonra +37˚C 60 dakika su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon +70˚C su banyosunda 10 dakika bekletilerek durduruldu. Reaksiyon gerçekleşip gerçekleşmediği ve kalitesinin belirlenmesi amacıyla elde edilen cDNA templeyt olarak kullanılarak GAPDH primerleri ile TouchDown protokolü ile PZR'da yükseltgendi. Elde edilen PZR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülüp, cDNA'lerin kalitesi kontrol edildi (Resim 2.4).



Resim 2.4. RT Reaksiyonu sonrasında total RNA'dan elde edilen cDNA GAPDH primerleri ile PZR yükseltilmesinin ardından elde edilen %2'lik agaroz jel resmi

2.14. Primer Dizaynı

Çalışmada kullanılacak Wnt gen ailesi ve sinyal iletim sistemine ait genlerin mRNA ve DNA dizi bilgileri Gen Bankası (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) üzerinden elde edildi. Alınan mRNA sekansları internetteki Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/) IDT primer dizaynı (http://eu.idtdna.com/home/home.aspx) ve Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu) primer dizayn programları kullanılarak hem RT-PZR hemde Realtime-PZR"da kullanılabilecek primerler dizayn edildi. Real time-PZR için özellikle primerlerin self ve/veya hetero dimer oluşturmamasına dikkat edildi. Bu amaç için Wang ve Seed (2007)'ın bildirdiği

kriterler göz önüne alındı. Dizayn edilen primerlerin çoğaltığı bölgenin baz dizilimi Primer Search Version 1.0. (Kav 2007) programından elde edildi. Primer dizayn programından elde edilen ileri (forward) ve geri (reverse) primerlerin doğruluğu ve çoğaltılacak bölge yine Gen Bankasındaki BLAST programı kullanılarak kontrol edildi. Çoğaltılacak olan bölge ile ileri ve geri PZR primerlerin en az üç farklı türde (insan, maymun, fare, ruminant vs.) aynı gen bölgesini göstermesi (korunmuş bölgeler) ancak at için bilinen farklı bir gen olmamasına dikkat edildi. Dizayn edilen PZR primerleri Metabion (Almanya) firmasına sipariş edildi.

Wnt genlerinin 17'sine (Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt16), antagonsitlerin 6'sına (Dkk1, Dkk2, SFPR1, SFRP2, SFRP5, Wif-1), hücre yüzey reseptörü FZD6, LRP6, sitoplazma kompanenti DVL-2, GSK3-beta, Beta-catenin, nükleer faktör Lef-1, Wnt genleri tarafından uyarılan MSX2 ve MYC genlerine ve housekeping gene olarakta GAPDH genine primerler dizayn edildi (Bkz. EK-A.)

2.14.1. Primer Sulandırılması

Liyofilize haldeki primerler 50 pMol/µl konsantrasyonunda 10 mM Tris-EDTA içersinde çözdürüldü. Daha sonra her bir genin ileri ve geri primerleri eşit miktarlarda karıştırılarak primer karışımı hazırlandı. Ana stokta kontaminasyon olmaması için ayrı bir yerde muhafaza edildi (-20˚C).

2.15. RT-PZR

RT reaksiyonu kullanılarak total RNA'dan elde edilen cDNA'lardan spesifik primerleri kullanılarak araştırılacak genin PZR'da yükseltgenmesi sağlandı. PZR reaksiyonu 15µl olacak şekilde 200µl'lik RNase ve DNase yönünden temiz (free) steril PZR tüpü içerisine 1x Mg++ free PZR solüsyonu, 0,125mM dNTP, 1,5 mM MgCl++, 0,35 Unite *Taq* polymeraz (Fermentas, ABD), 5'er pMol ileri ve geri primerler ve 2µl cDNA katılarak reaksiyon miksi hazırlandı. Touchdown PZR koşulları başta 4 dakika

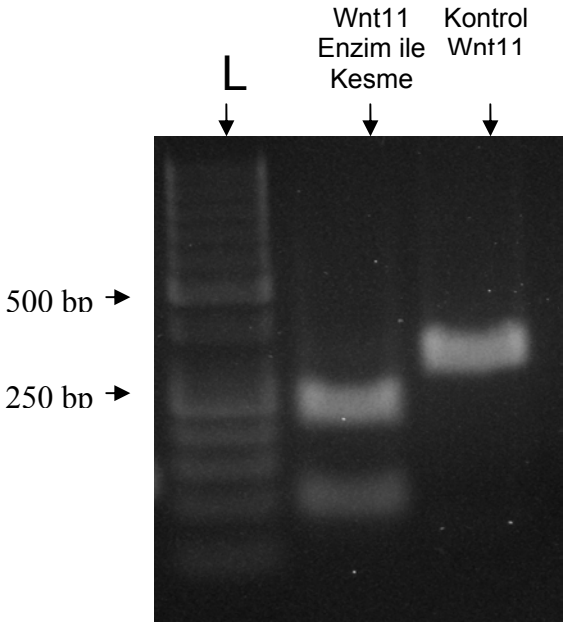
95˚C'de denatürasyon ardından toplam 16 siklus; 30 saniye 94˚C, 60˚C"den 52˚C"ye her bir siklusta 0,5˚C düşecek şekilde 30 saniye bağlanma ısısı, 30 saniye 72˚C uzama ısısı uygulandı. Ardından PZR reaksiyonuna 94˚C 30 saniye denatürasyon, 52˚C 30 saniye ve 72˚C 30 saniye şeklinde 25 siklus devam edildi. Daha sonra 72˚C'de 10 dakika tutulduktan sonra PZR ürünü +4˚C'ye soğutuldu.

2.16. Jel Elektroforezi

Elde edilen 15 µl'lik PZR ürünü üzerine 6X yükleme boyasından 3µl ilave edilerek santifüj edildi. Önceden %0.5'lik TBE ile doldurulmuş tank içerisine hazırlanan %2'lik agaroz jel yerleştirdikten sonra jel kuyucuklarına PZR ürünü yüklendi. Jel tankına 85 V elektrik enerjisi uygulanarak bantlar UV-translüminatör üzerinde belirlenebilecek şekilde oluncaya kadar yürütüldü. EtBr ile görünürleştirilen bantların resimleri UV-translüminatör üzerine yerleştirilen görüntüleme sistemi ile çekilip bilgisayara kayıt edildi.

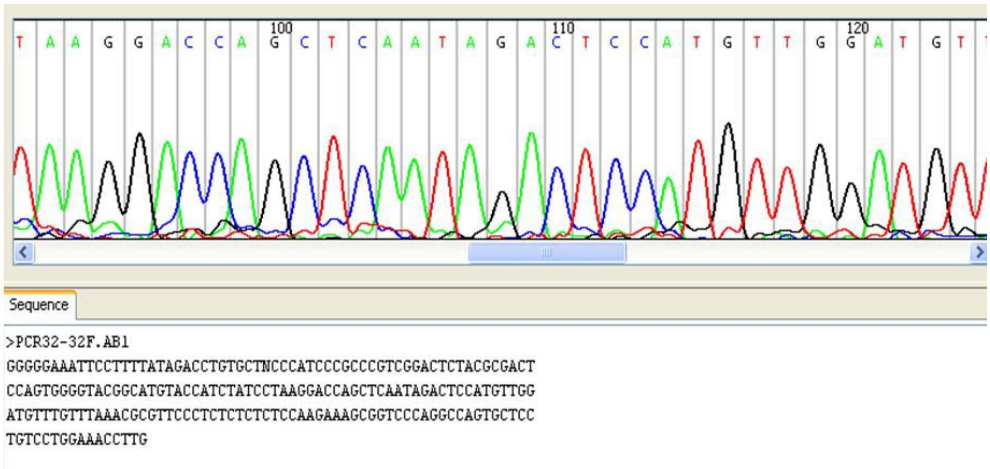
2.17. Elde edilen PZR ürününün Doğruluğunun Belirlenmesi

2.17.1. Restriksiyon Enzimleri (RE) ile Kesme: İlk olarak yukarıda bahsedildiği şekilde PZR ile spesifik gen ürünü elde edildi. Elde edilen PZR ürününden 10µl %2'lik jelde standart ile yürütülerek ürünü bant büyüklüğü doğrulandı. Belirlenen PZR ürününün DNA dizi bilgileri Primer Search Version 1.0. (Kav 2007) programına ileri ve geri primerleri ile birlikte girilerek çıkartıldı. PZR ürününün nükleotid dizilimlerinin, web tabanınlı RestrictionMapper (www.restrictionmapper.org) programı kullanılarak, RE haritası belirlendi. PZR ürününü kesen enzimlerin protokollerine uyularak 10µl PZR ürünü, Buffer, ddH20 ve enzim 200µl'lik tüpe konuldu. Kontrol reaksiyonu enzim dışında diğer bileşenler (10µl PZR ürünü, Buffer, ddH20) konularak hazırlandı. Hazırlanan tüpler +37˚C su banyosunda protokole uygun olarak PZR ürünün kesilmesi için (30 dakika veya 16 saat) bekletildi. Kesilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jele kontrol grubu ve standart ile birlikte yüklendi. EtBr ile görünürleşitirilen bantların jel görüntüleme sistemi ile fotoğrafları çekildi (Resim 2.5.).



Resim 2.5. Wnt11'in (297 bp) restriksiyon endonükleaz (Hinf1) ile 204 bp'den kesilmesi

2.17.2. Sekans İşlemi: Her bir gen için spesifik PZR ürünü hazırlandı. Bu ürünler ileri ve geri primerleri ayrı ayrı tüplerde olacak şekilde İontek (İstanbul, Türkiye) firmasına sekans yapılması için gönderildi. Firma tarafından PZR ürünü saflaştırıldıktan sonra ileri ve geri primerlerle dizi analizi işlemi yapıldı. Firmadan işlem sonrasında gönderilen DNA dizilerinin Gen Bankasındaki BLAST programı kullanılarak doğruluğu kontrol edildi (Şekil 2.1).



Şekil.2.1. MSX2 genine ait DNA dizisi

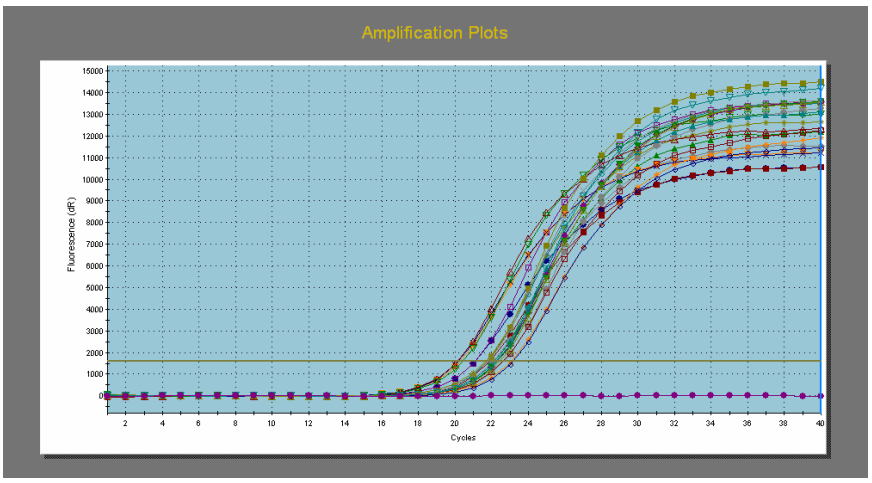
2.18. Real time PZR

Real time PZR ile genlerin farklı siklik ve gebe dönemlerindeki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlandı. Boya olarak çift iplikçili DNA'ya bağlanabilen SyberGreen kullanıldı. Reaksiyon SyberGreen içeren 2X olan master miskten (Fermentas, ABD) 1X olacak şekilde; 10µl miks, 5 pMol ileri, 5 pMol geri Real Time PZR için uygun primer, 1µl cDNA templeyt toplam volümü 20µl olacak şekilde steril ddH_2O su ile tamamlandı. Reaksiyon steril 8'li PZR tüpleri içinde gerçekleştirdi. Reaksiyonun ısı profili +95˚C 10 dakika, 40 siklus (95˚C 30 saniye, 60˚C 1 dakika, 72˚C 30 saniye) olacak şekilde ayarlandı. Optik ölçümler her siklusun 60˚C'deki bağlanma ısısının hemen bitiminde cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı. Daha sonra 95˚C 1 dakika ısıtılıp, 55 ˚C düşürülen ısı 95˚C'ye kadar tekrar kademeli olarak ve bu ısılar içerisindeki her 1˚C artışta optik ölçümler yapılarak melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirildi. Real-time PZR'da optik analiz sonucu elde edilen veriler (Ct) olarak kayıt edildi. Negatif kontrol olarak temleyt içermeyen (ddH_2O) aynı miktardaki miks kullanıldı (Şekil 2.2). Real-time PZR'da elde edilen ürünler %2'lik agaroz jel de yürütüp bant büyüklükleri gözlemlenerek doğru ürün olduğu teyit edildi. Elde edilen Ct değerlerinin normalizasyonunda housekeping GAPDH geninin Ct değeri kullanıldı.

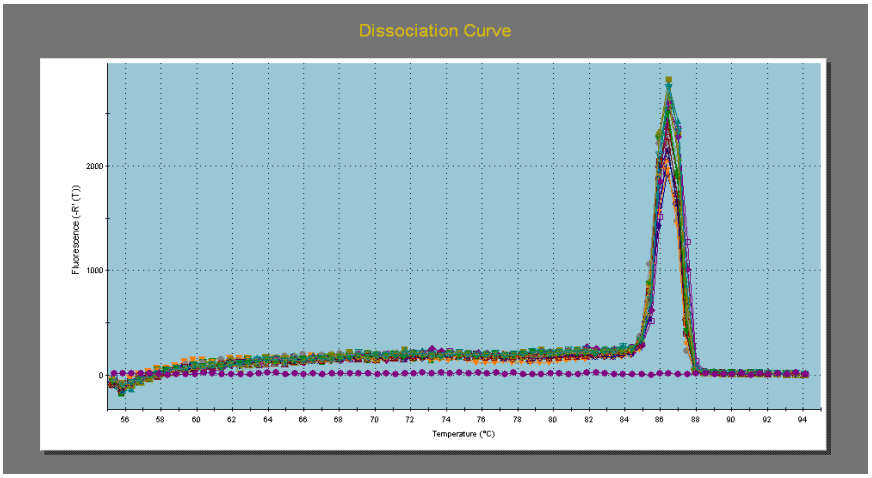
Ayrıca çalışmada ekspresyon saptanan genler için dokudan total RNA izole edilip Real-time PZR sürecine kadar geçen tüm aşamalar tekrarlanarak teknik tekrar yapıldı. Bu duruma real-time PZR gözlenen ekspreyon faklılıklarının teknik hatalardan kaynaklanmaması engellemek için ihtiyaç duyuldu.

2.18.1. Erime Eğrisi Analizi

Yapılan erime eğrisi analizinden elde edilen ayrışma eğrisi grafik üzerinde incelendi. Tüm pozitif tüplerin aynı ısı aralığında pik yapmasına, negatif kontrolde ise primer dimere bağlı oluşan piklerin pozitif örneklerle aynı noktalarda pik görülmemesi veya hiç pik yapmaması kriterleri kullanıldı (Şekil 2.3)



Şekil 2.2. Lef–1 geninin Real-Time Ekspresyon grafiği



Şekil 2.3. Lef-1 geninnin Erime Eğrisi Analizi

2.19. İstatiksel Analizler

Çalışmanın istatistik analizleri GenStat (Release 8) programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Siklik ve Gebelik günleri kendi içlerinde (Siklik ve Gebelik) aşağıdaki modele göre karşılaştırılmıştır;

$$y_{ijk} = \mu + Gün_i + K_j(Gün_i) + e_{ijk}$$

y_{ijk} = *i*.günde, *i*. günün içindeki *j*. kısrağın *k*. teknik tekrar normalize edilmiş gen expresyonu,

μ = genel ortalama,

$Gün_i$: *i*. günün etkisi,

$Kısrak_j$($Gün_i$): *i*. gündeki *j*. Kısrağın şansa bağlı etkisi

e_{ijk}: *i*.günde, *i*. günün içindeki *j*. kısrağın *k*. teknik tekrar model ile açıklanamayan kısmı (hata)

Siklik hayvanların LD ve AL günleri ile gebeliğin 15 ve 18. günleri aşağıdaki modele göre karşılaştırılmıştır;

$$y_{ijk} = \mu + statü_i + K_j(statü_i) + e_{ijk}$$

y_{ijk} = *i*.statüde, *i*. statüdeki *j*. kısrağın *k*. teknik tekrar normalize edilmiş gen expresyonu,

μ = genel ortalama,

$statü_i$: *i*. statünün etkisi,

$Kısrak_j$($statü_i$): *i*. statüdeki *j*. Kısrağın şansa bağlı etkisi

e_{ijk}: *i*.statüde, *i*. statü içindeki *j*. kısrağın *k*. teknik tekrar model ile açıklanamayan kısmı (hata)

İstatistiksel önem P<0,05 ve P<0,10'e göre değerlendirilmiştir.

Grafikler üzerinde farklı harflerle gösterilen barlar istatistiksel olarak birbirlerinden farklıdır.

2.20. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

Homojenizatör	SilentCrusherM Heidolph, ALMANYA
Soğutmalı Santrifüj	320 Hettich , ALMANYA
Su Banyoları	Nüve, Termal, TÜRKİYE Memmert ALMANYA
PZR ThermoCycler	MyCycler™ ThermoCycler BIO-RAD, ABD
Real time PZR Sistemi	Stratagene, ABD
Nanodrop 100	Thermo Fisher Scientific Inc. ABD
Jel Görüntüleme Sistemi	VWR International, ALMANYA
-80 ˚C Derin Dondurucu	MDF-U 3286S SANYO, JAPONYA
Otomatik Pipet seti 0,2-2, 2-20, 20-200, 100-1000	Eppendorf, ABD
Falco 100 6-8 MHz Ultrasonografi Cihazı	Pie Medical , HOLLANDA
Otoklav	HIYAMARA, JAPONYA
Mini Santrifüjler	VWR International, ALMANYA
UV-Transluminatör	Ultra-Violet Products, ABD
Vorteks	VWR International, ALMANYA
Hassas tartı	AJ-CE/AJH-CE VİBRA, TÜRKİYE
pH metre	3510 JENWAY, İNGİLTERE
Biyopsi pensi	Kruuse, DANİMARİKA
Azot tankı	Air LIQUIDE DMC, FRANSA
-20 ˚C Dondurucu	Beko, TÜRKİYE
Mikrodalga fırın	Beko, TÜRKİYE
Yatay Jel Elektroforez Seti	VWR International, ALMANYA

3. BULGULAR

3.1. Wnt Gen Ailesinin Kısrak Endometriumunda Karakterize Edilmesi

Wnt genlerinden Wnt2 (Resim 3.1A), Wnt2b (Resim 3.2A), Wnt4 (Resim 3.3A), Wnt5a (Resim 3.4A), Wnt5b (Resim 3.5A), Wnt7a (Resim 3.6A), Wnt8a (Resim 3.7A), Wnt9b (Resim 3.8A), Wnt10b (Resim 3.9A), Wnt11(Resim 3.10A), Wnt16 (Resim 3.11A) genleri, Wnt antagonistleri SFRP1 (Resim 3.12A), SFRP2 (Resim 3.13A), SFRP5 (Resim 3.14A), Dkk1 (Resim 3.15A), Dkk2 (Resim 3.16A), Wif-1 (Resim 3.17A), hücre yüzeyi reseptörleri FZD6 (Resim 3.18A) ve LRP6 (Resim 3.19A), sitoplazmik DVL-2 (Resim 3.20A), GSK3- ß (Resim 3.21A), ve ß-catenin (Resim 3.22A), nükleer Lef-1 (Resim 3.23A) ve Wnt sinyal iletim sisteminin hedef genlerinden MSX2 (Resim 3.24A) ile Myc (Resim 3.25A) ekspresyonları RT-PZR yöntemi ile kısrak endometeriumda ovulasyon gününde (0.gün), geç diöstruste (LD), luteolizis sonrası östrusta (AL) ile gebeliğin 15. (P15), 18. (P18) ve 22. (P22) günlerinde gözlenmiştir. Wnt gen ailesine ait Wnt1, Wnt3, Wnt6, Wnt7b, Wnt8b ve Wnt14 genlerinin gerek siklik gerekse gebe kısrakların uterus endometriumunda araştırılan günlerde ekspresyon göstermedikleri tespit edilmiştir.

3.2. Wnt Sistemine Ait Genlerinin Siklik Kısrakların Endometriumunda Ekspresyonları

Wnt2 (Resim 3.1B) ve Wnt8a (Resim 3.7B) genleri östrüs siklusunun araştırılan günlerinde farklılık göstermemiştir. Wnt2b (Resim 3.2B), Wnt5a (Resim 3.4B), Wnt9b (Resim 3.8B), Wnt10b (Resim 3.9B), Wnt11 (Resim 3.10B) ve Wnt16 (Resim 3.11B) genlerinin ekspresyonlarının geç diöstrüs döneminde ovulasyon ve luteolizis sonrası östrus ile kıyaslandığında önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir ($P < 0,05$). Wnt5b (Resim 3.5B) ise ovulasyon gününde diğer iki güne oranla önemli miktarda yüksek bulunmuştur ($P<0,05$). Wnt7a (Resim 3.6B) geninin ekspresyonu diöstrüs döneminde ovulasyon günü ve luteolizis sonrasına göre önemli miktarda baskılanmıştır ($P <0,05$). Wnt4 (Resim 3.3B) ise luteolizis sonrasında önemli oranda artış göstermiştir.

Wnt antagonistlerinden SFRP1 (Resim 3.12B) geninin ekspresyonu geç diöstrüs döneminde baskılanırken (P<0,05), SFRP2 (Resim 3.13B) ve SFRP5 (Resim 3.14B)'in ekspresyonlarında siklus boyunca değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte Dkk1 (Resim 3.15B) ve Wif–1 (Resim 3.17B) genlerinin ekspreyonları geç diöstrüs döneminde luteolizis sonrası östrus ve ovulasyon günü ile kıyaslandığında önemli ölçüde artmıştır (P<0,05). Dkk2'nin (Resim 3.16B) ekspresyonunda siklus boyunca önemli değişiklik gözlenmemiştir.

Wnt proteinlerinin bağlandığı hücre yüzey reseptörlerinden FZD6 (Resim 3.18B) ve LRP6 (Resim 3.19B)' proteinlerinin gen düzeyindeki ekspresyonu değişiklik göstermemiştir. Sitoplazmik proteinlerden DVL-2 (Resim 3.20B), GSK3- ß (Resim 3.21B) ve Beta-Catenin (Resim 3.22B) genlerinin ekspresyonları siklus boyunca değişmemiştir. Nükleustaki Lef-1 (Resim 3.23B) genin ekspresyonu luteolisiz sonrası östrus döneminde önemli derecede uyarılmıştır (P<0.05). Wnt sinyalin hedef genlerinden MSX2 (Resim 3.24B) ekspresyonu değişiklik göstermezken, Myc (Resim 3.25B) geninin ekspresyonu geç diöstrus döneminde artmıştır (P<0,05).

3.3. Wnt Sistemine Ait Genlerinin Gebe Kısrakların Endometriumunda Ekspresyonları

Wnt genlerinin ekspresyonu 0. gün ve gebeliğin 15., 18., 22. günleri ile kıyaslanmıştır. Buna göre Wnt5a (Resim 3.4C), Wnt 11 (Resim 3.10C) gebeliğin 15 ve 18. günlerinde artmıştır (P<0,05). Wnt2b (Resim 3.2C) ise gebeliğin 15. gününde artmıştır (P<0,05). Wnt16 (Resim 3.11C) ise gebelik boyunca hafif artış eğilimindedir (P<0,09). Wnt2 (Resim 3.1C), Wnt5b (Resim 3.5C) ile Wnt7a (Resim 3.6C) tüm erken gebelik süresince baskılanmıştır (P<0,05). Bununla birlikte Wnt4 (Resim 3.3C), Wnt8a (Resim 3.7C), Wnt10b (Resim 3.9C), Wnt9b (Resim 3.8C) 0. gün ve erken gebelik boyunca değişiklik göstermemiştir.

Wnt antagonistlerinin ovulasyon günü ile erken gebelik günleri kıyaslandığında SFRP2 (Resim 3.13C), SPRP5 (Resim 3.14C) ve Dkk2 (Resim 3.16C) genlerinin

ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir. Dkk1 (Resim 3.15C) erken gebelik boyunca ve Wif-1'in (Resim 3.17C) ise 15 ve 18. günlerde ekpresyonu artarken, SFRP1 (Resim 3.12C) erken gebelik boyunca baskılanmıştır (P<0,05).

Hücre yüzeyi reseptörleri FZD6 (Resim 3.18C) ve LRP6 (Resim 3.19C), sitoplazmik komponentlerden DVL-2 (Resim 3.20C), GSK3-ß (Resim 3.21C) ve ß-catenin (Resim 3.22C) ekspresyonlarında erken gebeliğe bağlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Nüklear Lef-1 (Resim 3.23C) geni gebeliğin 18. gününde baskılanmıştır (P<0,05). Wnt genlerin aktive ettiği MSX2 (Resim 3.24C) ve Myc (Resim 3.25C) genlerinde erken gebelik boyunca değişiklik olmamıştır.

3.4. Gebeliğe Bağlı Değişiklikler

Geç diöstrus dönemi ile gebeliğin 15. günü kıyaslandığında Wnt genlerinden sadece Wnt8a ekspresyonun önemli ölçüde baskılandığı (P<0.05) Wnt4'ün ise arttığı gözlendi (P<0.06). Wnt2, Wnt2b, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11 Wnt16'nın ekspresyonları aynı dönem içerisinde değişmemiştir (Çizelge 3.1.).

Wnt genlerini inhibe eden SFRP1, SFRP2, SFRP5, Dkk1, Dkk2 ve Wif-1 ile hücre yüzeyi proteini olan FZD6 ve LRP6, sitoplazmik kompanentler DVL-2, GSK3-ß, ß-catenin, nükleus faktörü Lef-1 ve Wnt genlerinin uyardığı MSX2 genlerinde geç diöstrus ve 15. gün gebelik kıyaslandığında önemli bir değişiklik olmamıştır. Sadece Myc geni diöstruse göre (P<0,08) baskılandığı gözlendi (Çizelge 3.1.).

Luteolizisten sonra östrus ile gebeliğin 18. günü kıyaslandığında ise Wnt genlerinden Wnt7a'nın gebelikte baskılanmış (P<0,05), Wnt5a (P<0.08) ekspresyonu ve Wnt16 hafif artma göstermiş (P<0,09) diğer Wnt genlerinin (Wnt2, Wnt2b, Wnt4, Wnt5b, Wnt8a, Wnt9b, Wnt11, Wnt10b) ekspresyonu değişmemiştir (Çizelge 3.2.).

Wnt antagonistlerinden Dkk1 ve Wif-1 gebeliğe bağlı ekspresyonu artmış, SFRP1'inki ise azalmıştır (P<0,05). Diğer antagonistlerde (Dkk2, SFRP2, SFRP5)

değişiklik gözlenmemiştir. Wnt genlerinin hücre yüzey reseptörleri (FZD6 ve LRP6) ile sitoplazmik proteinlerin (DVL-2, GSK3-ß, ß-catenin) miktarları değişiklik göstermemiştir. Nükleer faktör Lef-1 ekspresyonu gebeliğe bağlı azalmasına rağmen Wnt genlerinin situmüle ettiği MSX2'in ekspresyonu gebeliğe bağlı artmıştır ($P<0,05$). Myc ise değişmemiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.1. Geç luteolizis (LD) ile gebeliğin 15. günü (P15) karşılaştırıldığında Wnt genlerdeki ekspresyon seviyelerinin önem derecesini gösteren çizelge

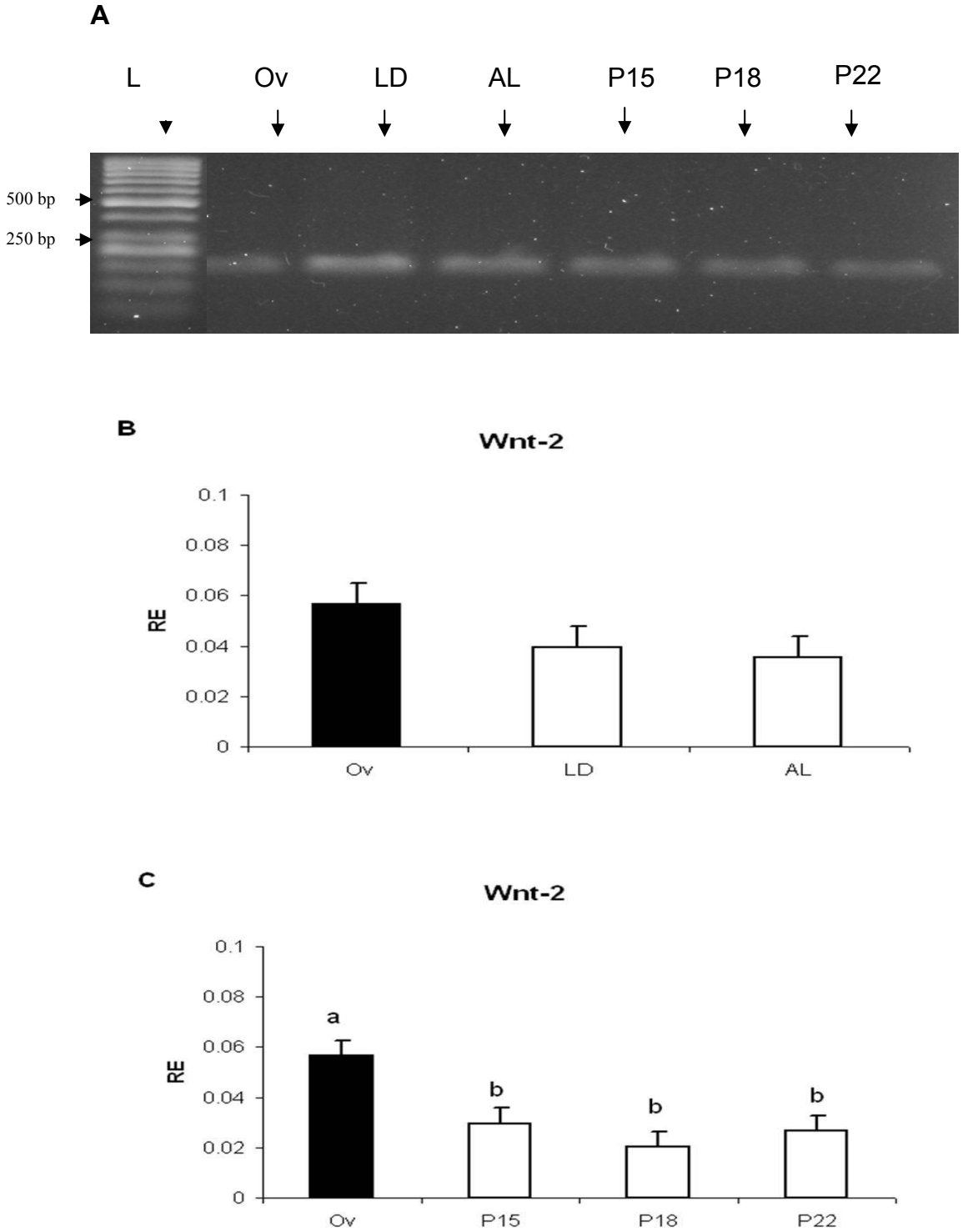
	LD	**P15**	**P değeri**
Wnt2	0,03948	0,02961	0,289
Wnt2b	0,05888	0,05096	0,549
Wnt4	0,00653	0,01303	0,059*
Wnt5a	0,2144	0,2256	0,750
Wnt5b	0,004057	0,005207	0,267
Wnt7a	0,0003388	0,0001560	0,200
Wnt8a	0,0006442	0,0003184	0,02**
Wnt9b	0,001851	0,002285	0,576
Wnt10b	0,00554	0,00332	0,117
Wnt11	0,04185	0,03505	0,245
Wnt16	0,002277	0,002420	0,886
SFRP-1	0,06696	0,0622	0,765
SFRP-2	0,00350	0,00629	0,301
SFRP-5	0,00385	0,00441	0,778
Dkk-1	0,2663	0,3411	0,420
Dkk-2	0,001508	0,001755	0,694
Wif-1	0,1112	0,2015	0,261
FZD6	0,0905	0,0748	0,636
LRP6	0,0964	0,1251	0,242
DVL-2	0,1450	0,2644	0,101
Gsk3-beta	0,2708	0,2145	0,420
Beta-catenin	1,424	3,297	0,108
Lef-1	0,1215	0,0967	0,341
Msx-2	0,2619	0,2957	0,664
Myc	0,03289	0,02455	0,078*

*P<0.10
**P<0.05

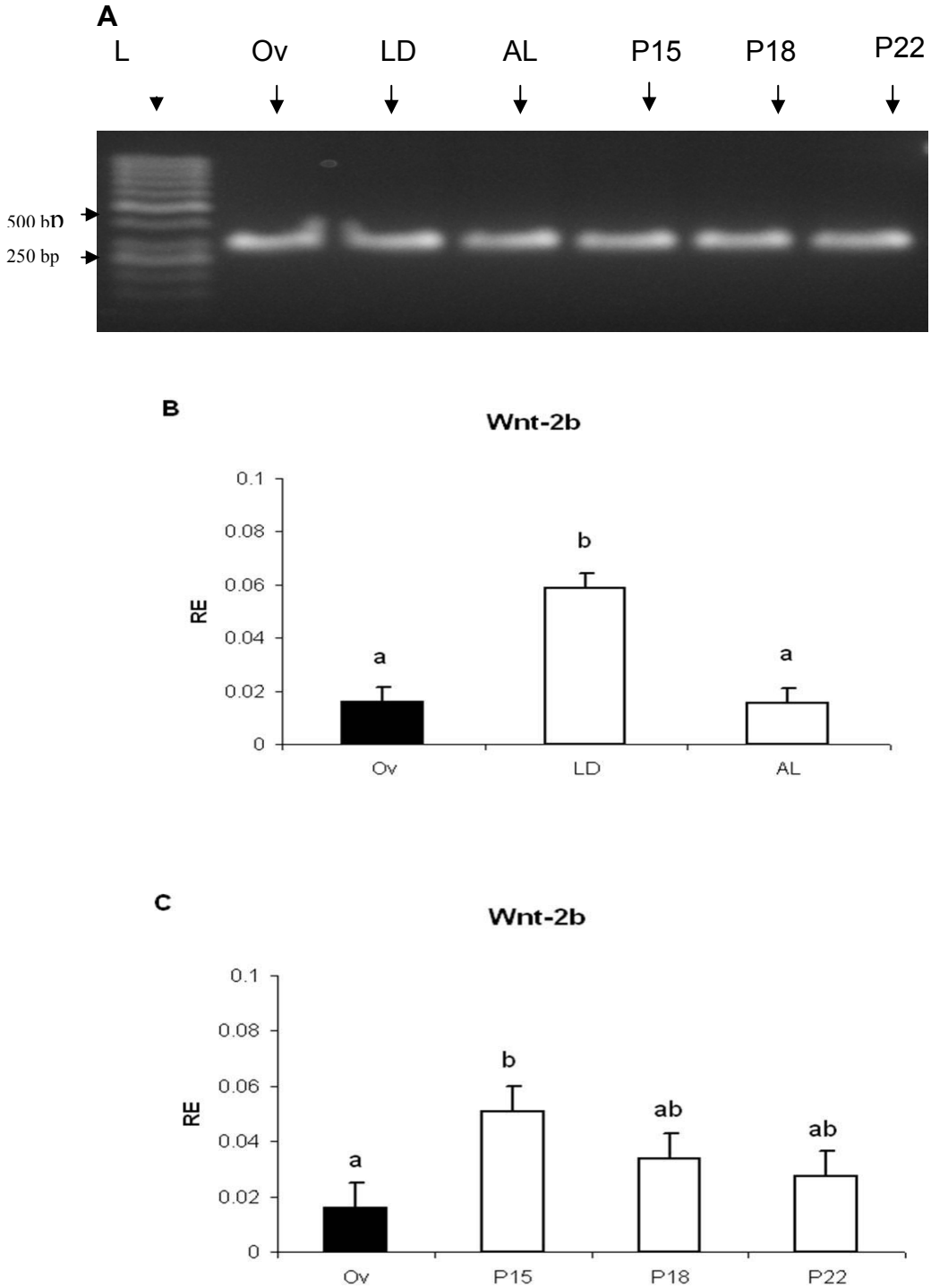
Çizelge 3.2. Luteolizis sonrası östrus (AL) ile gebeliğin 18. günü (P18) karşılaştırıldığında Wnt genlerdeki ekspresyon değişiklerinşn önem derecesini gösteren çizelge

	AL	**P18**	**P değeri**
Wnt2	0.03553	0.02012	0.234
Wnt2b	0.01564	0.03362	0.282
Wnt4	0.01389	0.01418	0.95
Wnt5a	0.0865	0.1911	0.08*
Wnt5b	0.003305	0.002344	0.283
Wnt7a	0.004888	0.000693	0.035**
Wnt8a	0.0008871	0.0006065	0.677
Wnt9b	0.000688	0.001784	0.424
Wnt10b	0.002308	0.00280	0.696
Wnt11	0.02203	0.04322	0.170
Wnt16	0.001152	0.00246	0.089*
SFRP-1	0.2109	0.0593	0.021**
SFRP-2	0.0099	0.00371	0.302
SFRP-5	0.002398	0.00401	0.365
Dkk-1	0.00332	0.17852	0.002**
Dkk-2	0.001433	0.00174	0.728
Wif-1	0.00973	0.10830	0.001*
FZD6	0.0727	0.0873	0.684
LRP6	0.1040	0.0973	0.787
DVL-2	0.1158	0.1566	0.420
Gsk3-beta	0.205	0.241	0.702
Beta-catenin	2.137	1.749	0.619
Lef-1	0.2450	0.0647	0.001**
Msx-2	0.1490	0.3423	0.022**
Myc	0.01965	0.0245	0.457

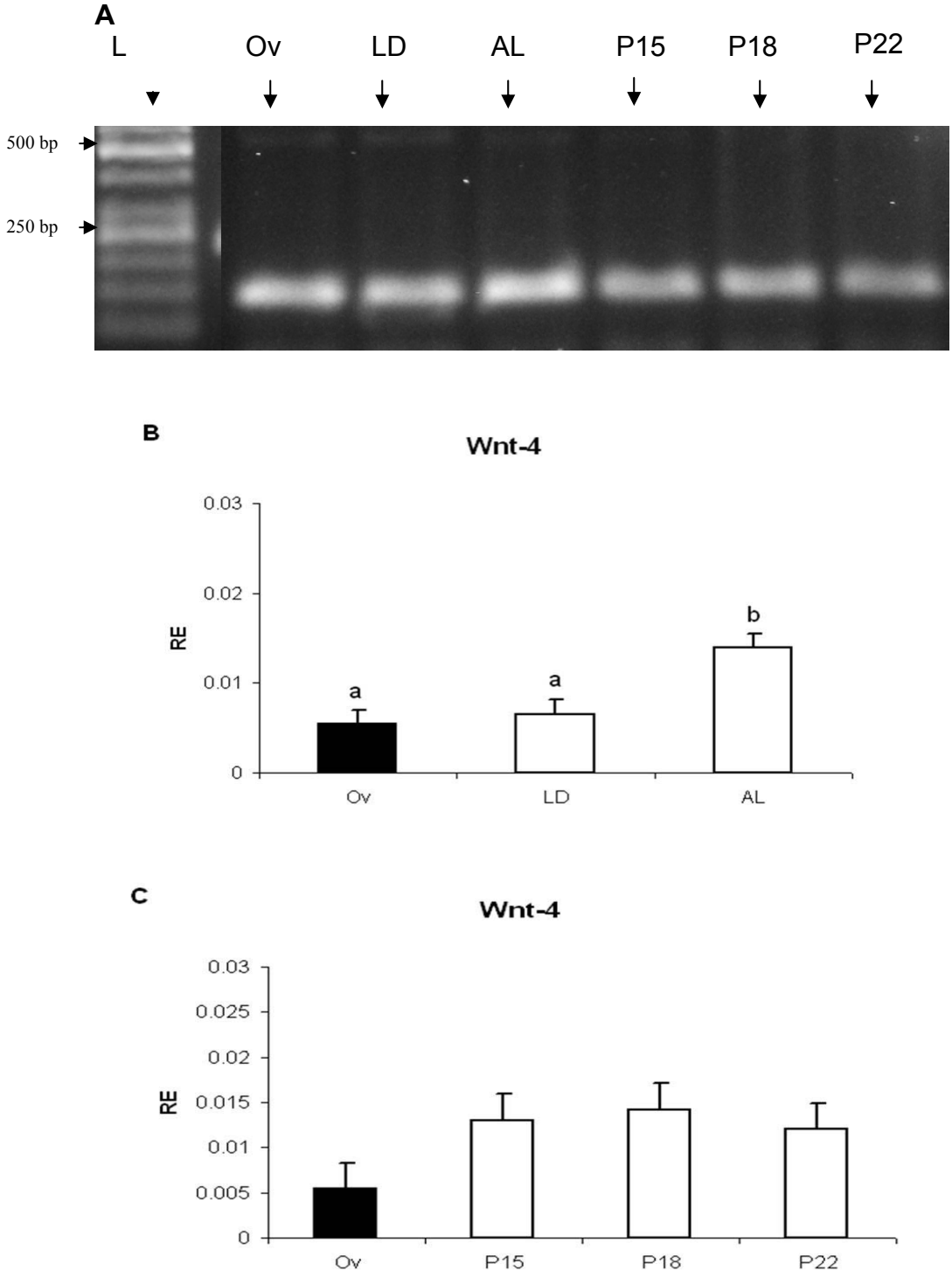
*P<0.10
**P<0.05



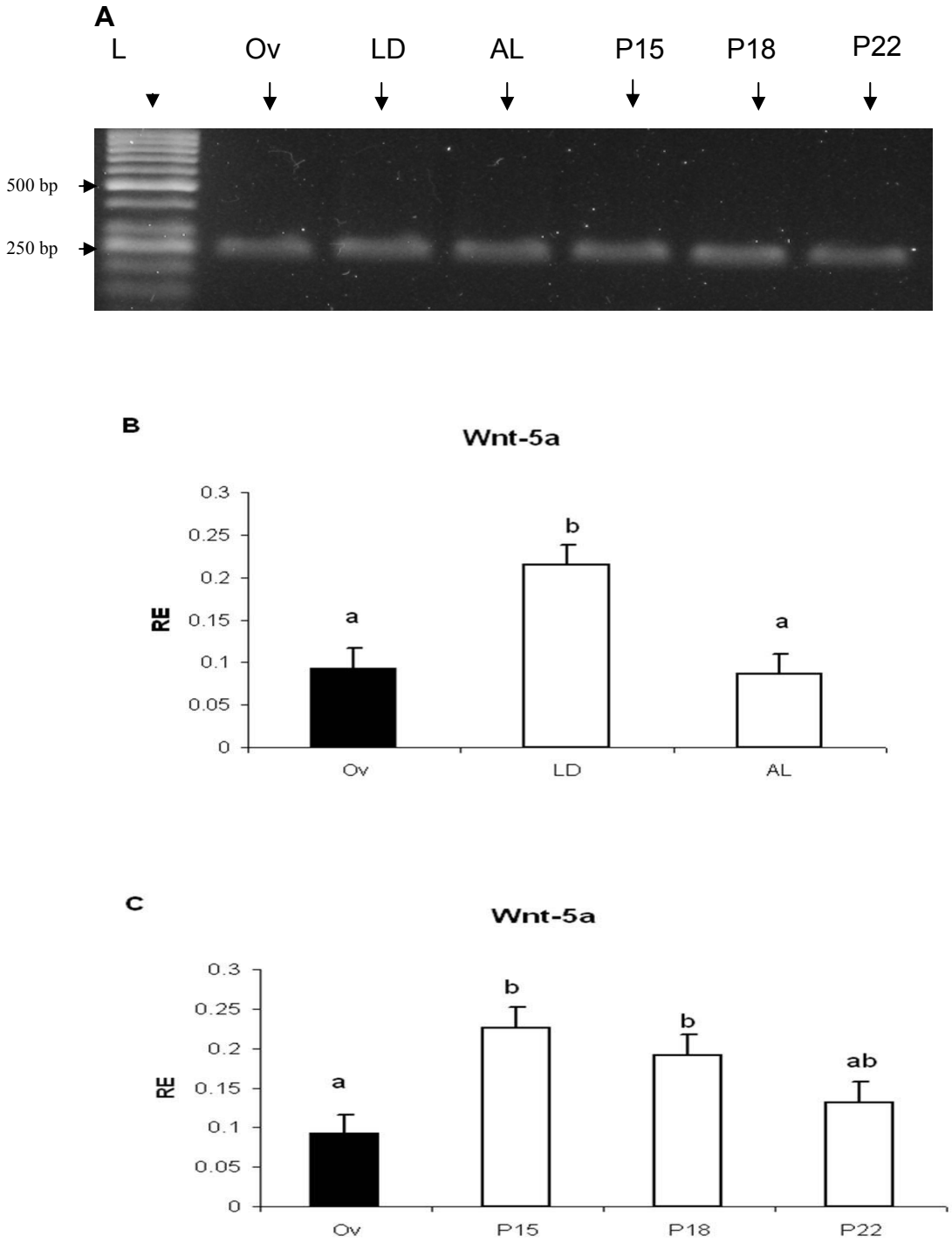
Resim 3.1: Wnt2'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



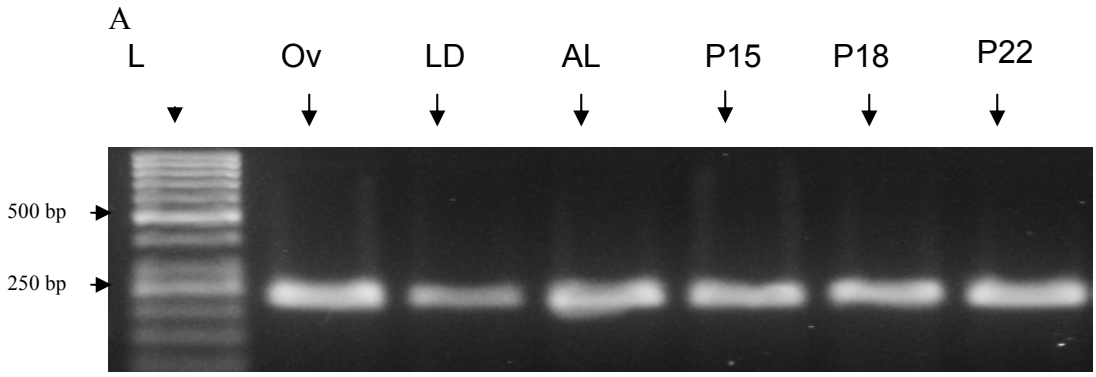
Resim 3.2.: Wnt2b'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

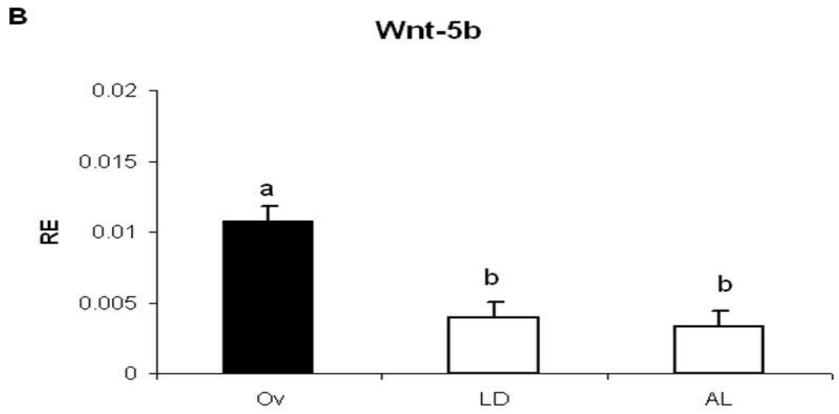


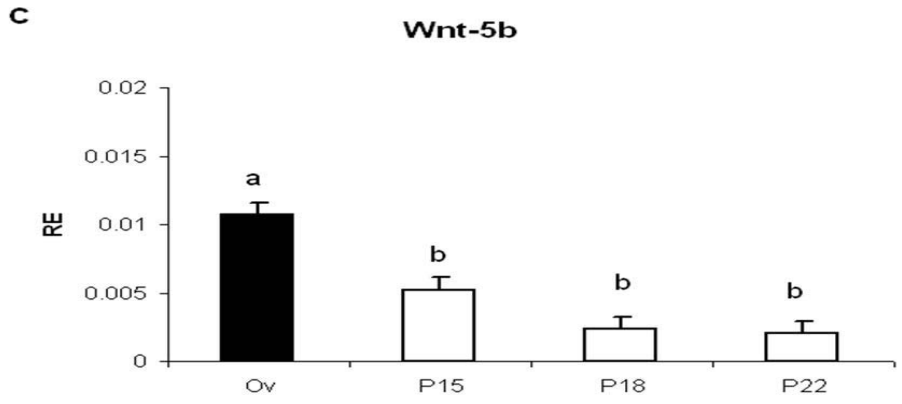
Resim 3.3: Wnt4'ün A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



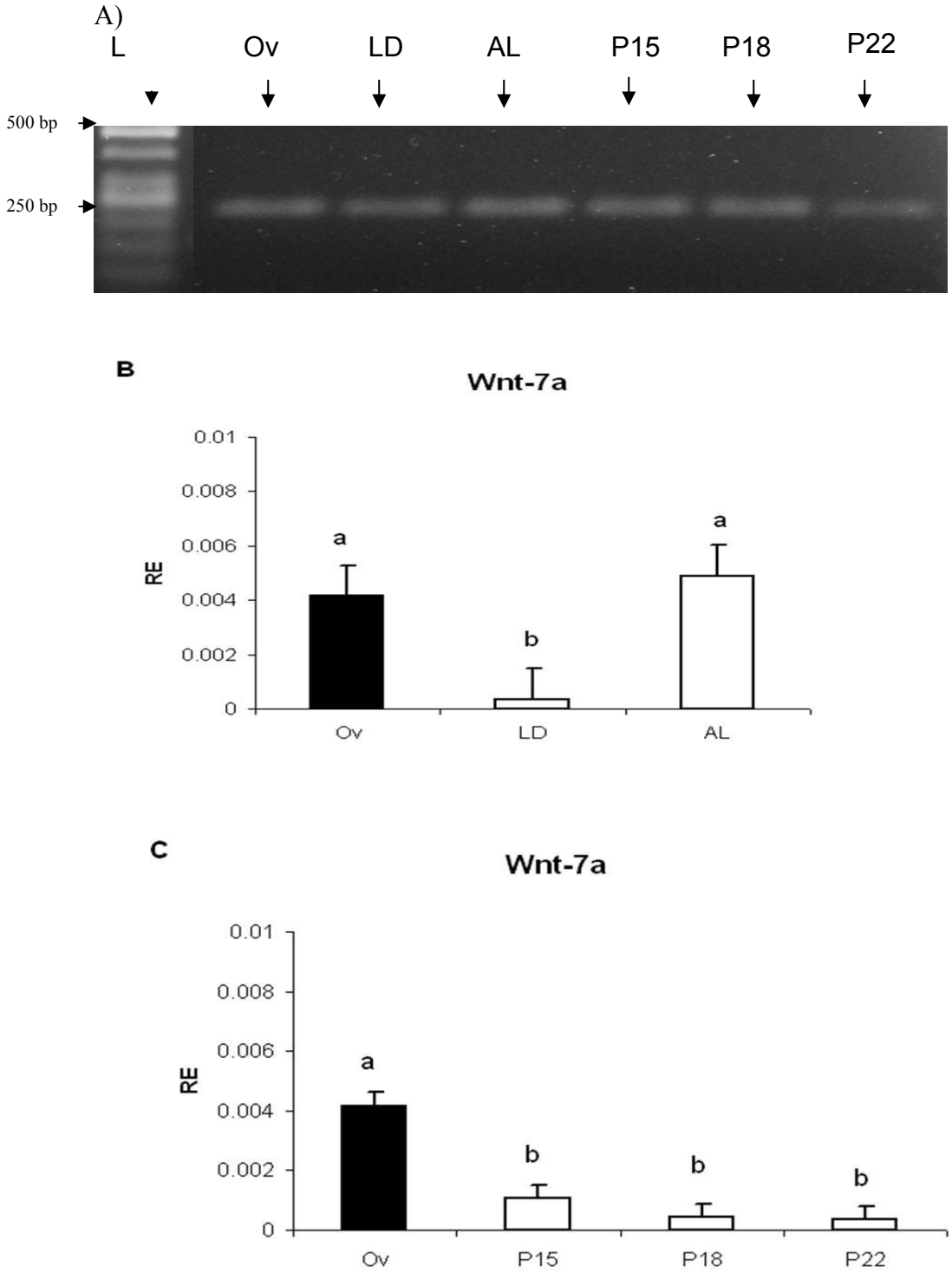
Resim 3.4: Wnt5a'nın A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



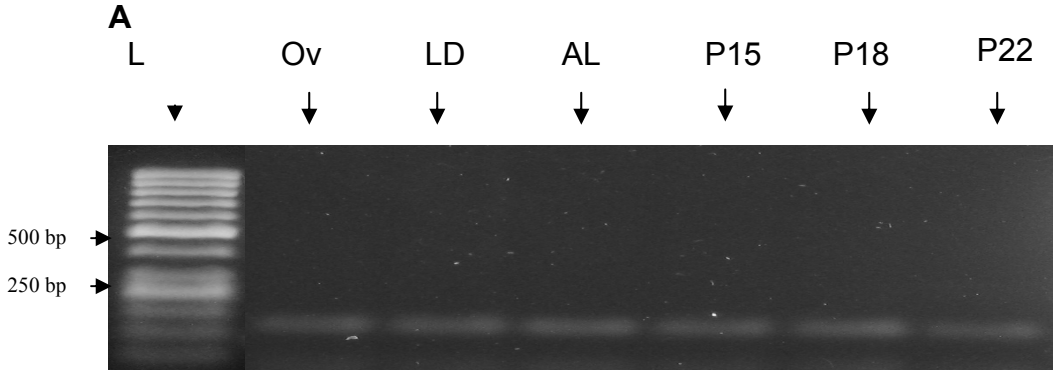


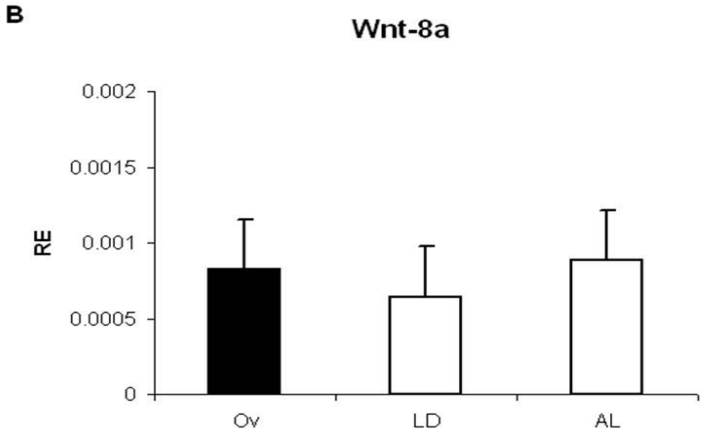


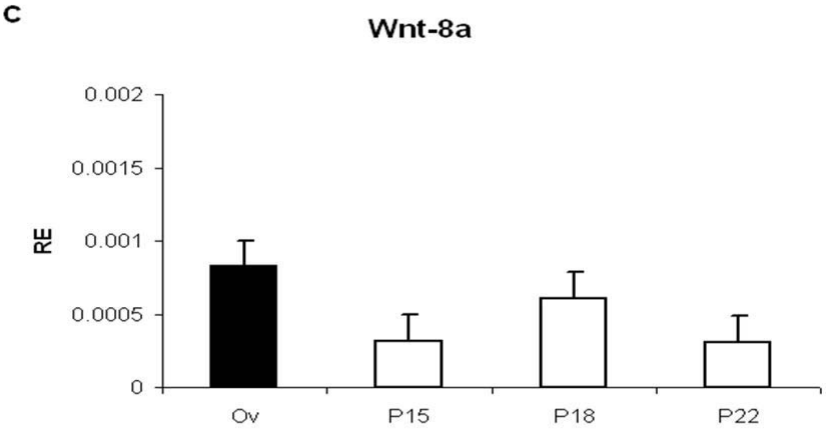
Resim 3.5: Wnt5b'nin A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



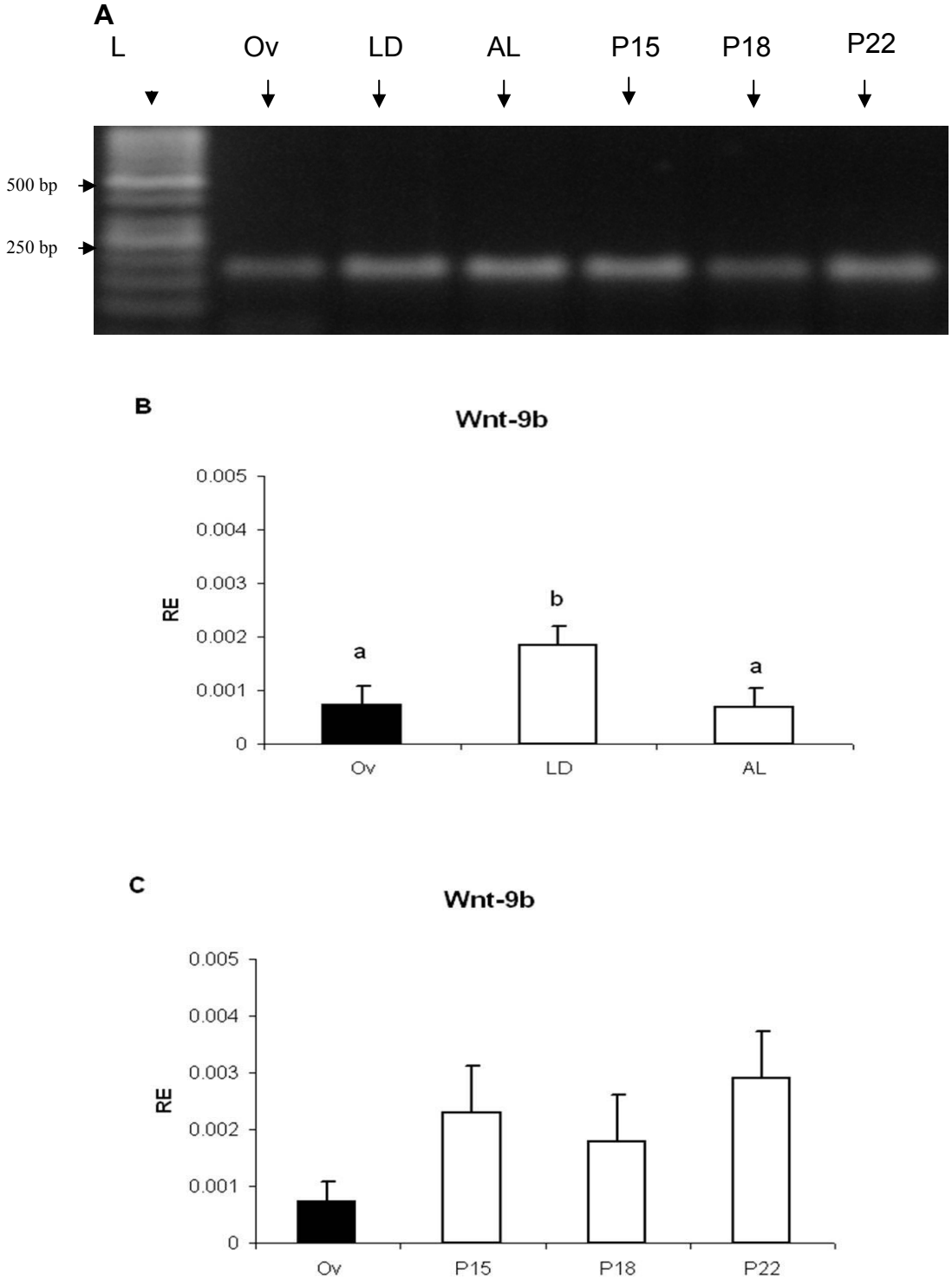
Resim 3.6: Wnt7a'nın A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



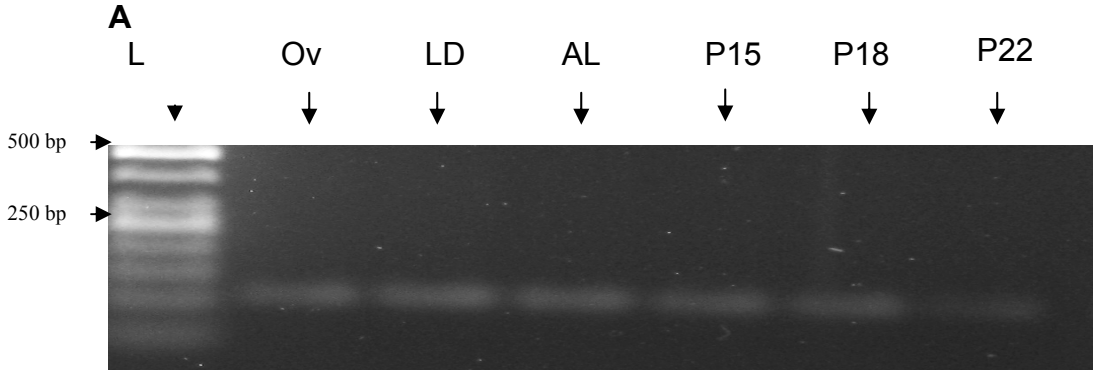


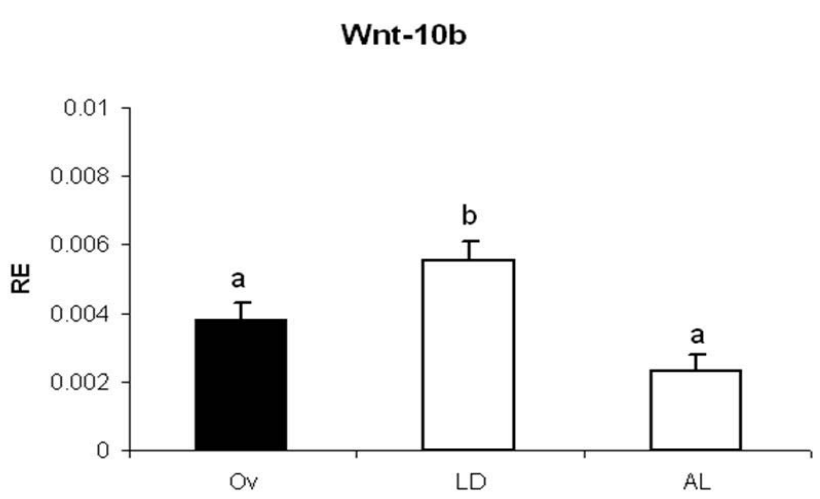


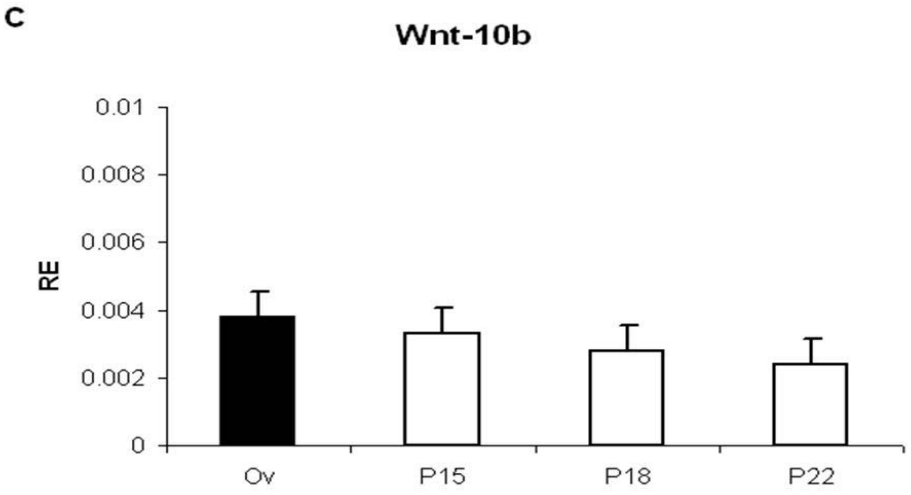
Resim 3.7: Wnt8a'nın A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



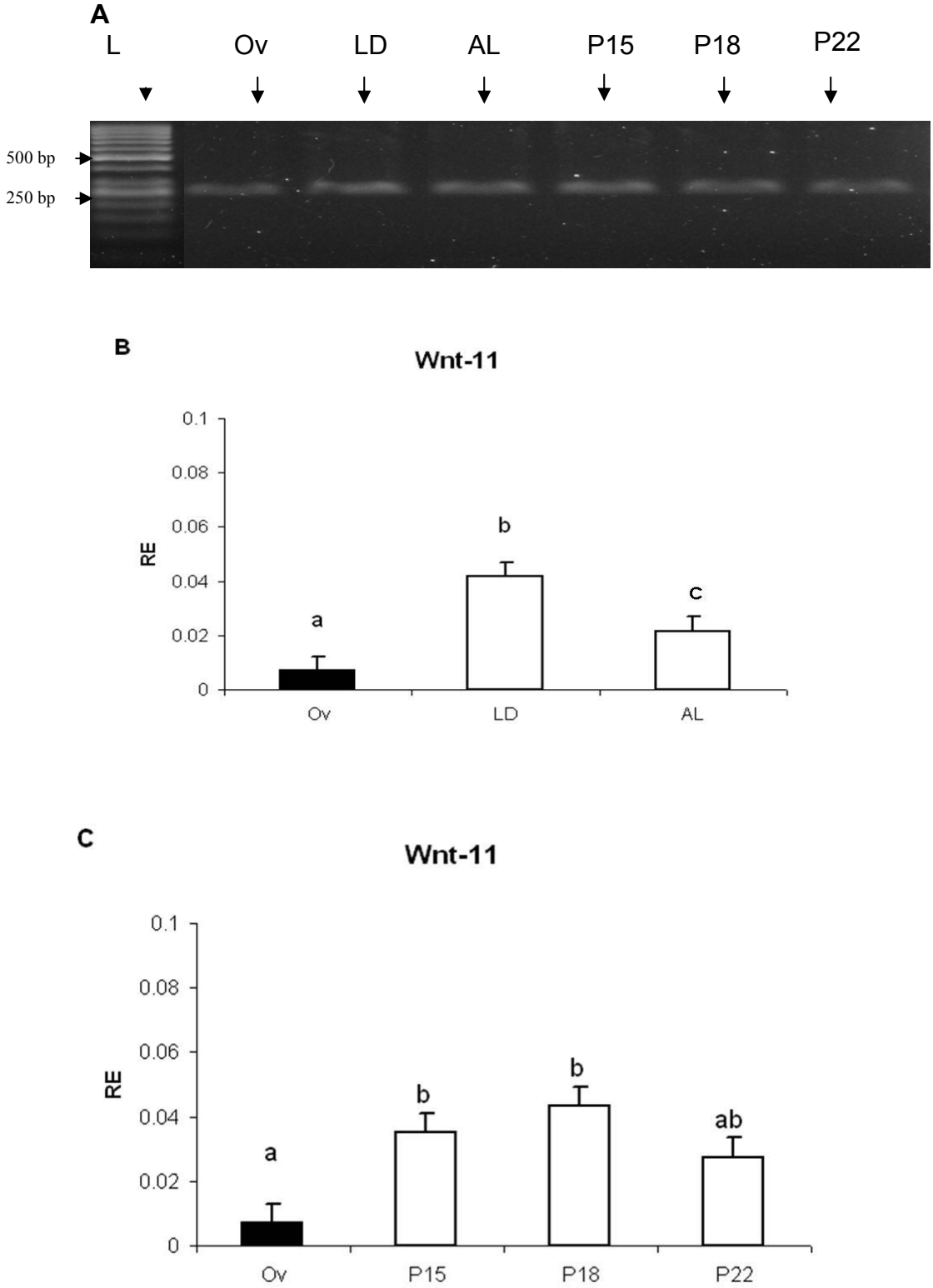
Resim 3.8: Wnt9b'nın A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



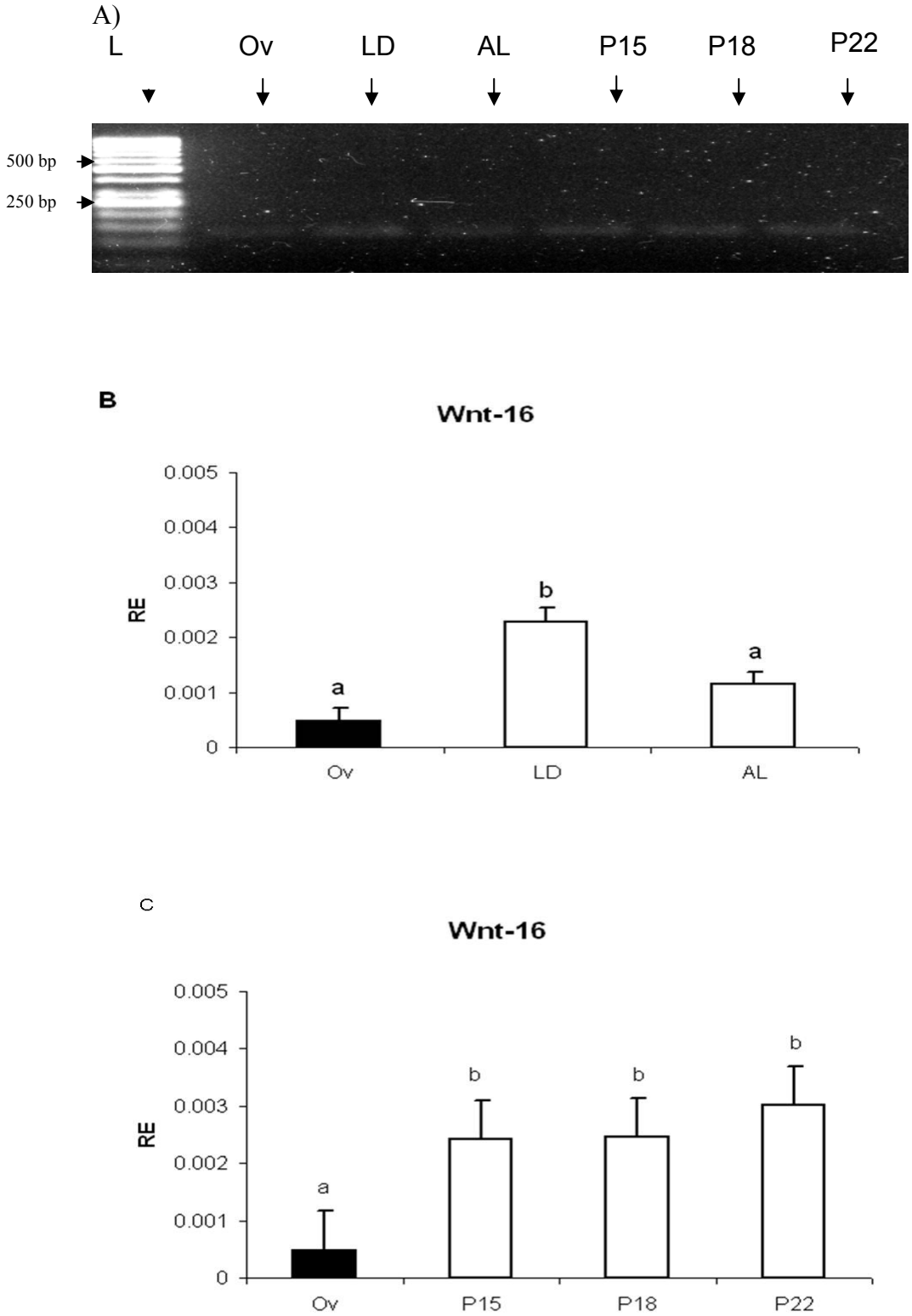




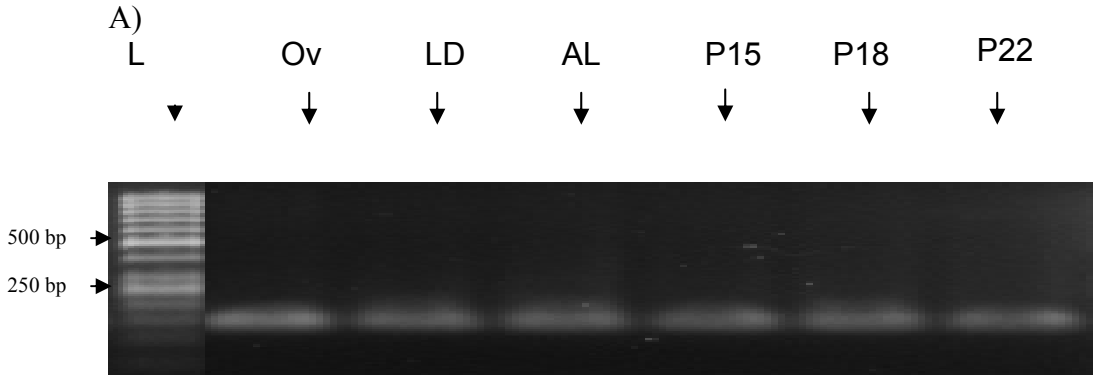
Resim 3.9: Wnt10b'nın A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

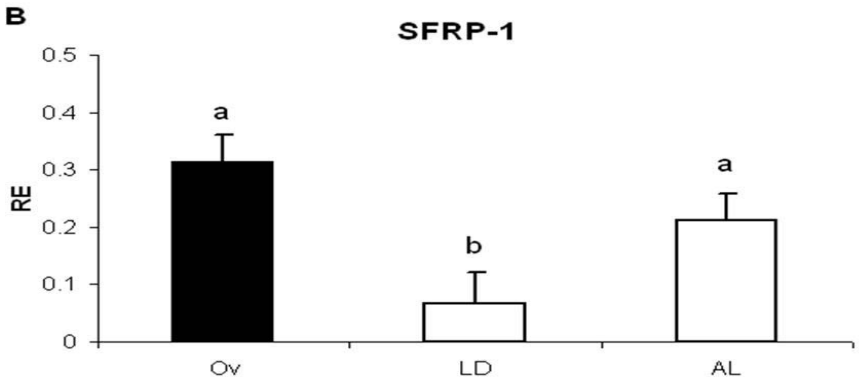


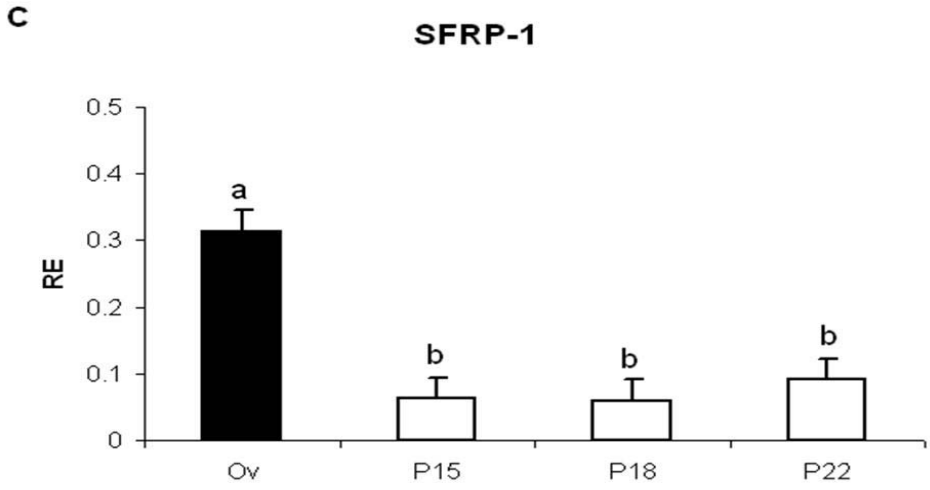
Resim 3.10: Wnt11'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



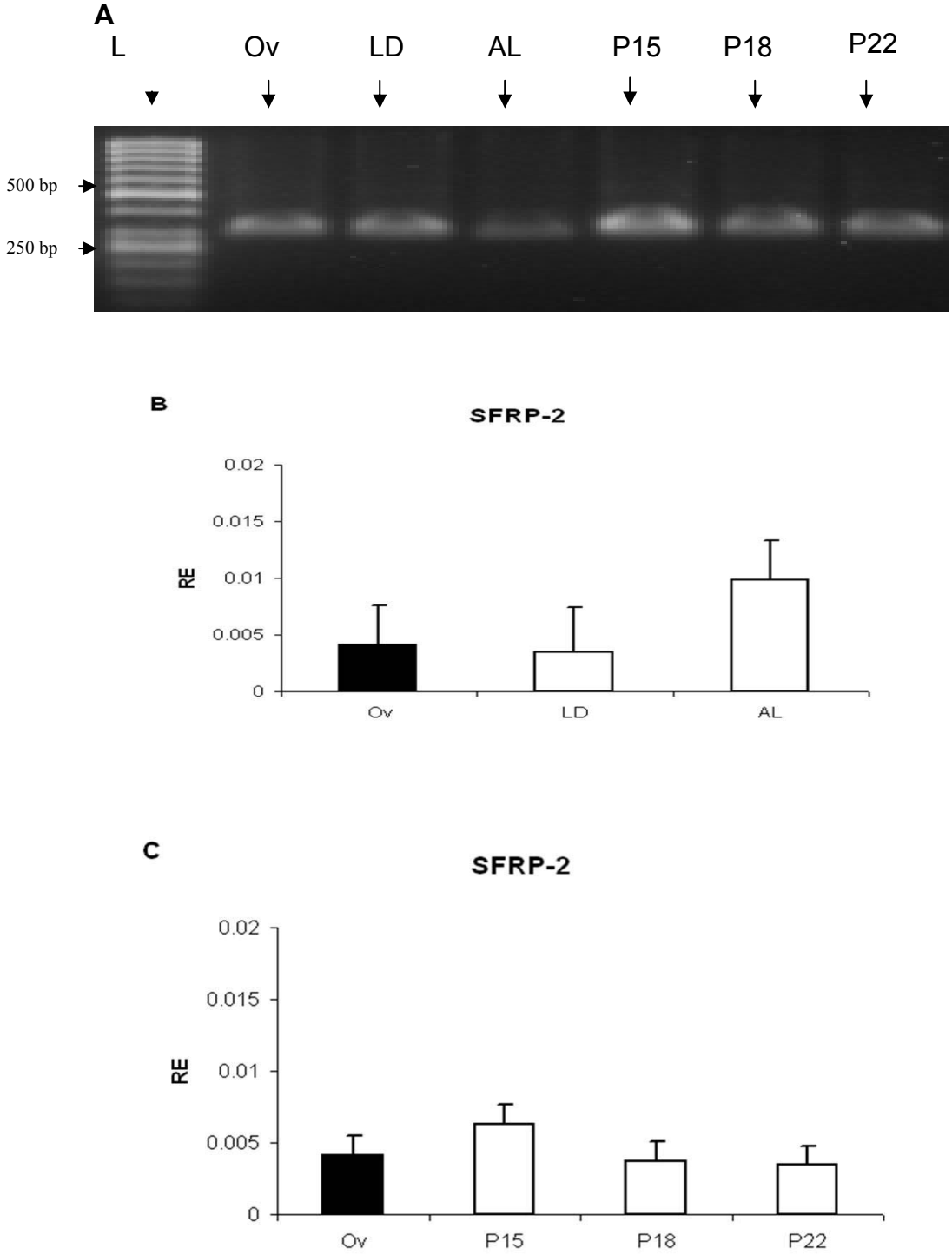
Resim 3.11: Wnt16'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



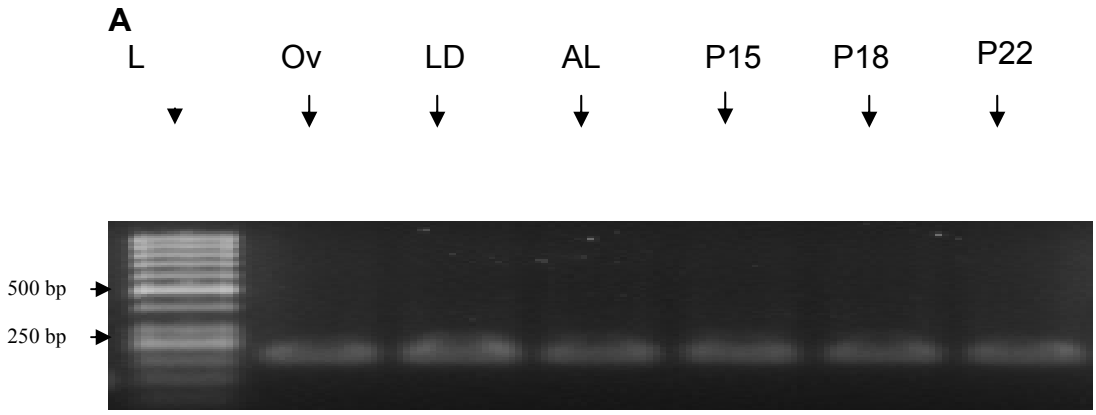


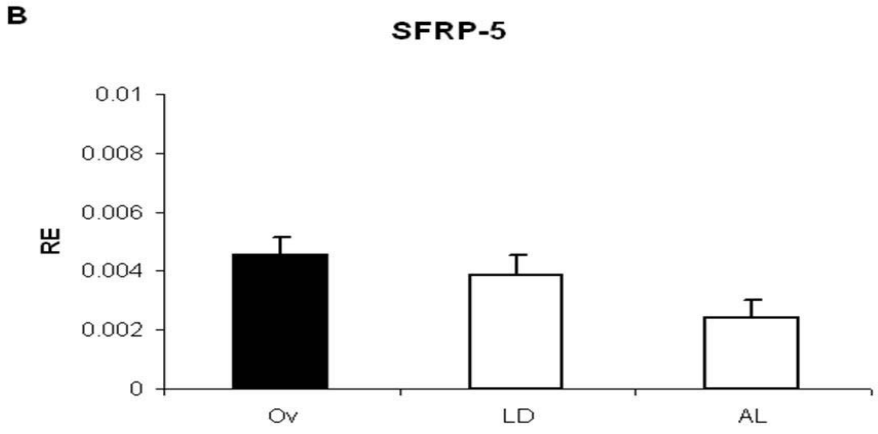


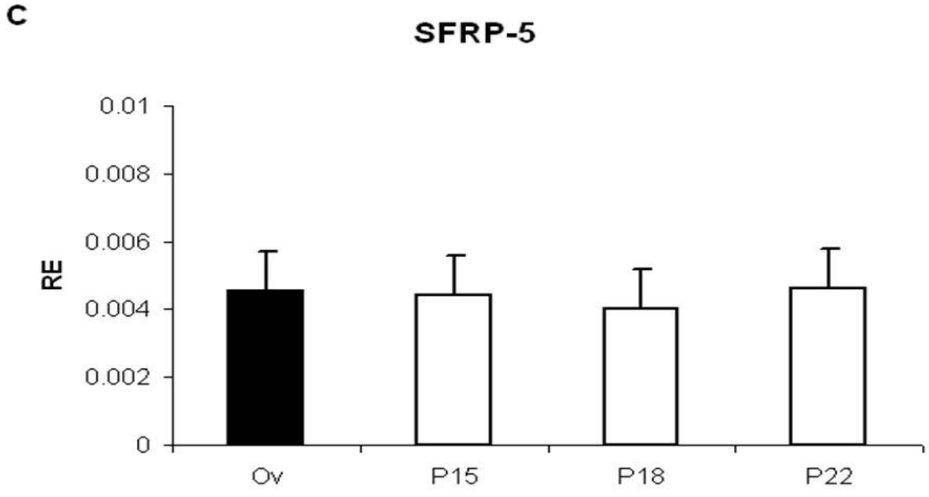
Resim 3.12: SFRP-1'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



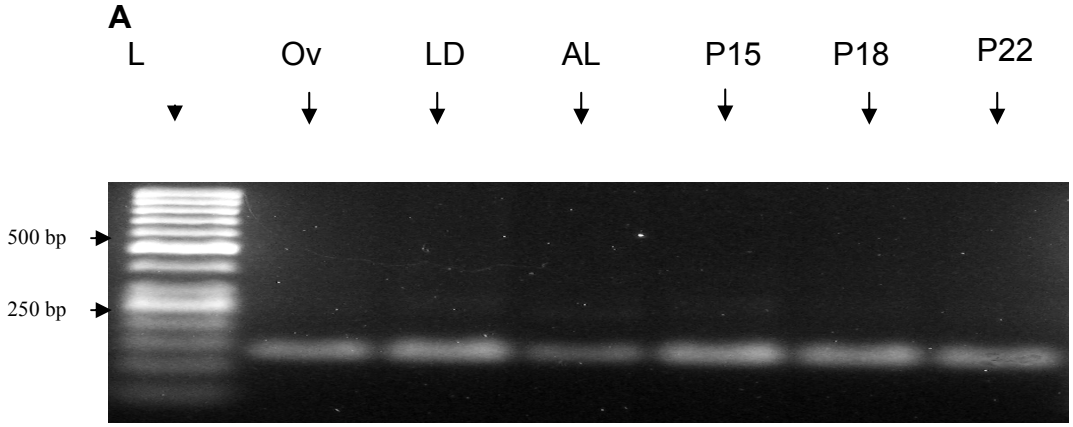
Resim 3.13: SFRP2'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

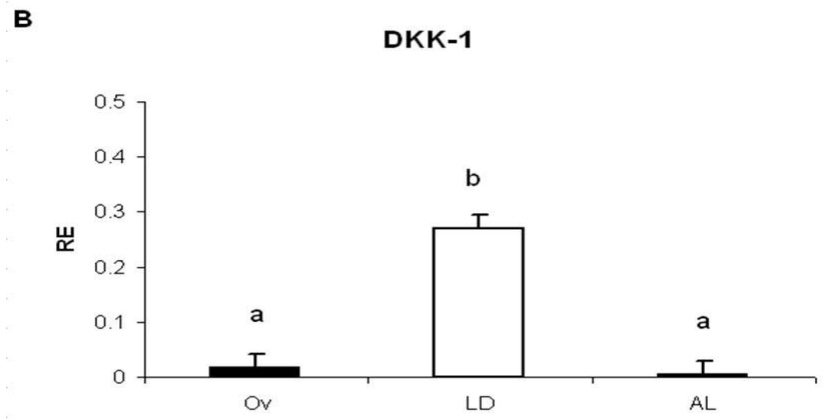


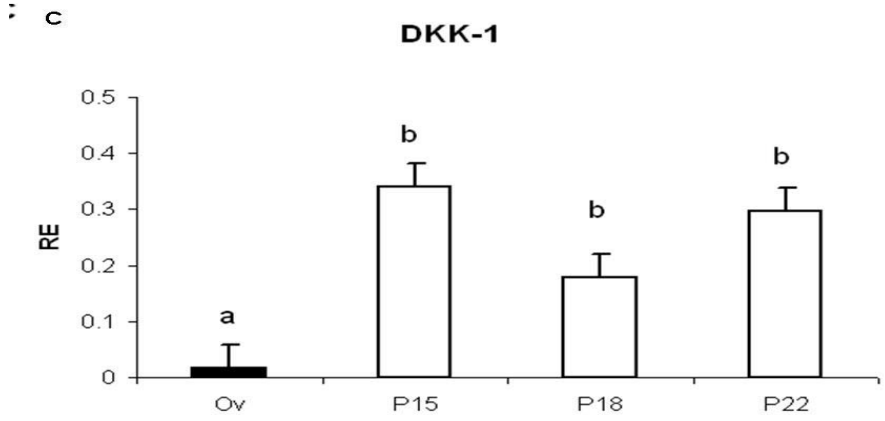




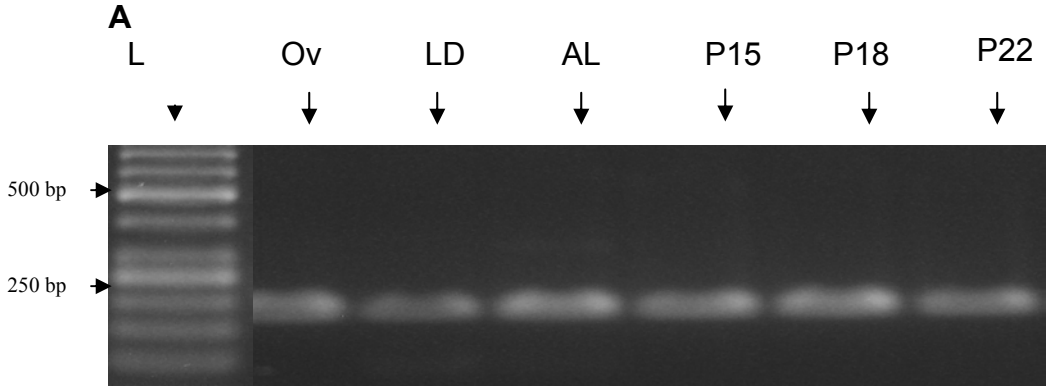
Resim 3.14: SFRP5'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

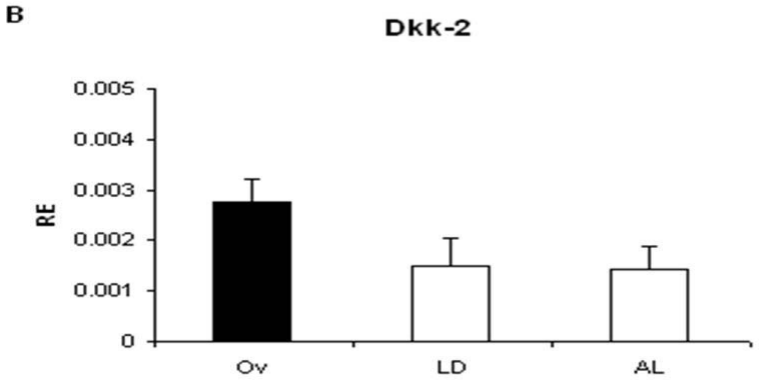


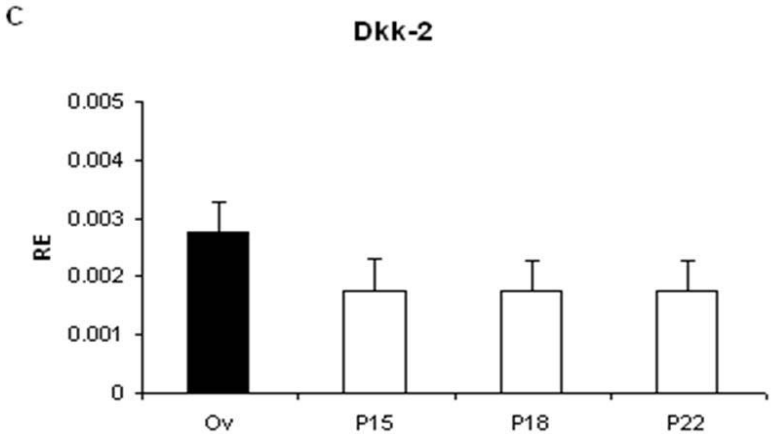




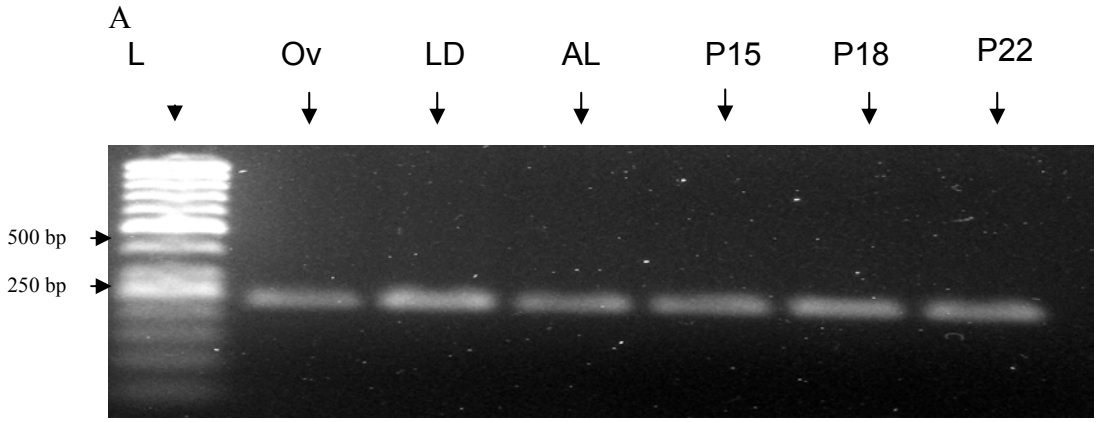
Resim 3.15: Dkk1'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

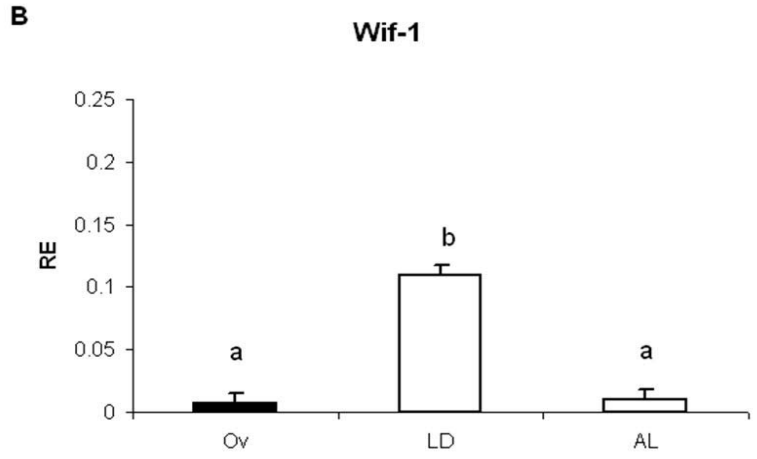


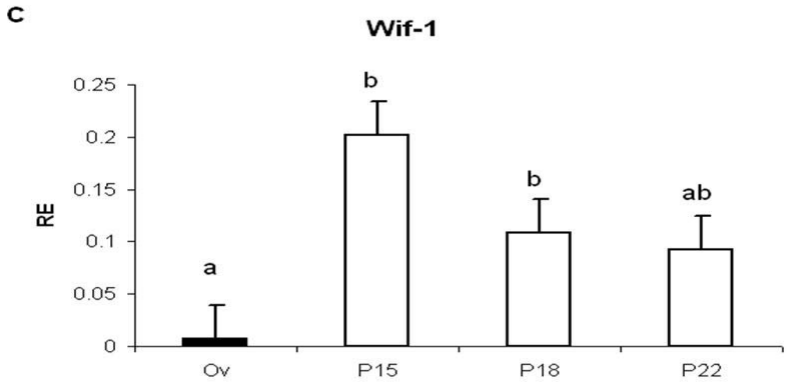




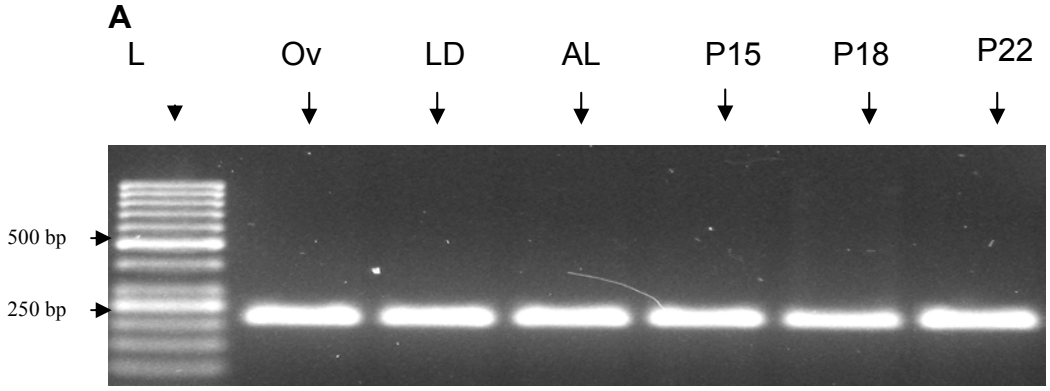
Resim 3.16: Dkk2'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

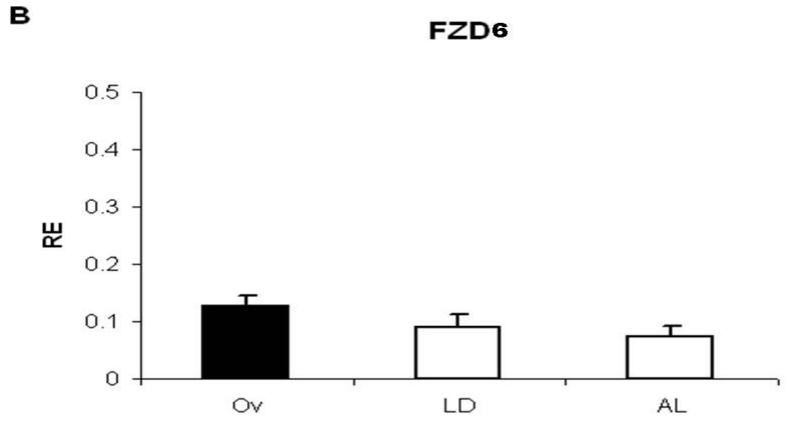


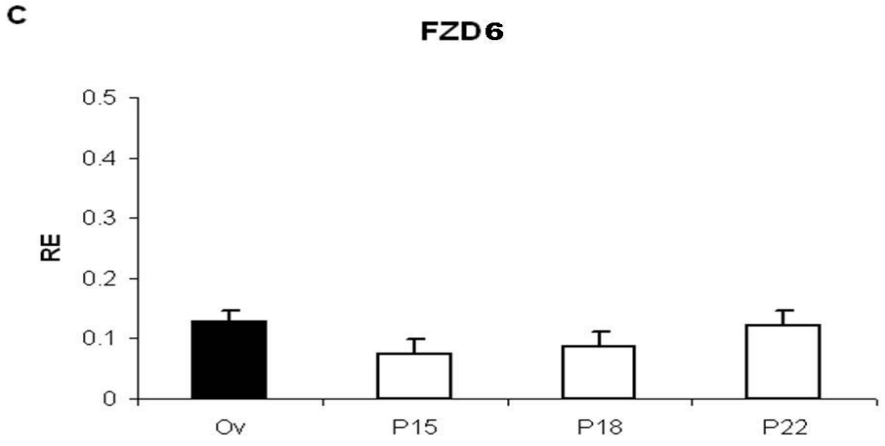




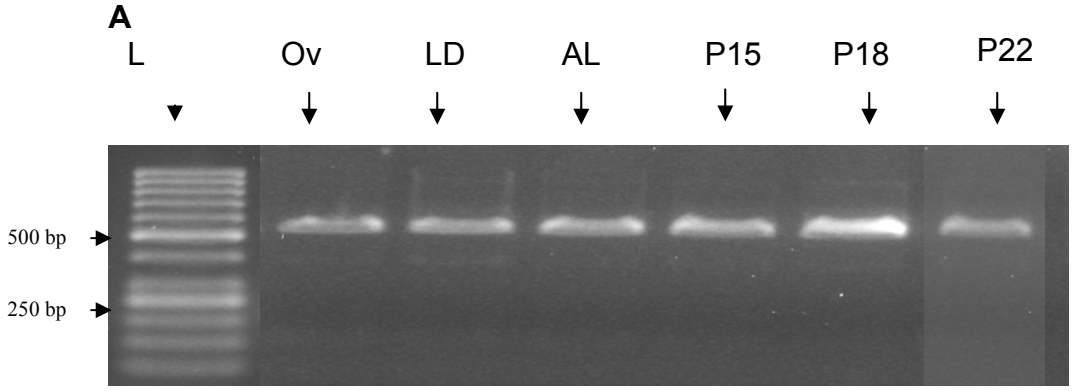
Resim 3.17: Wif-1'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

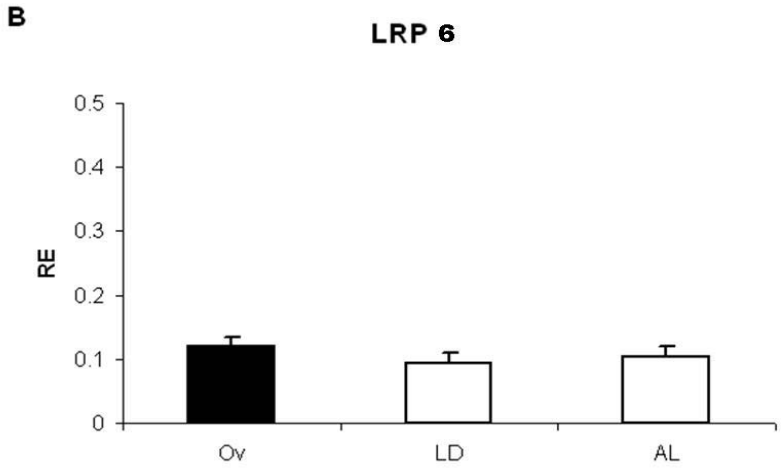


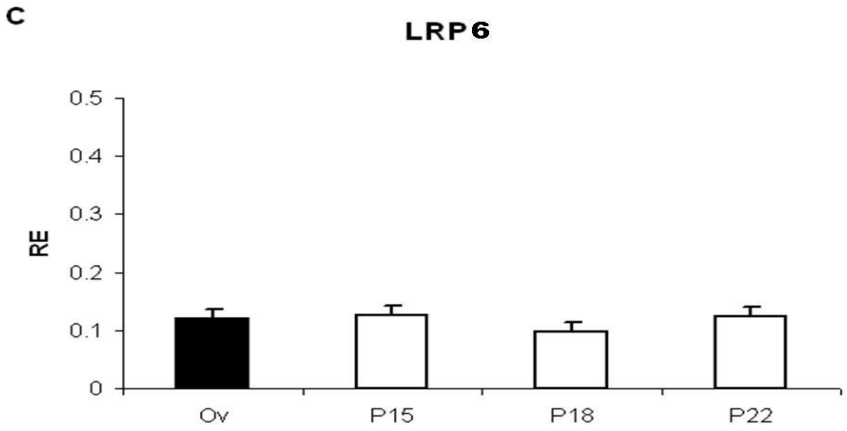




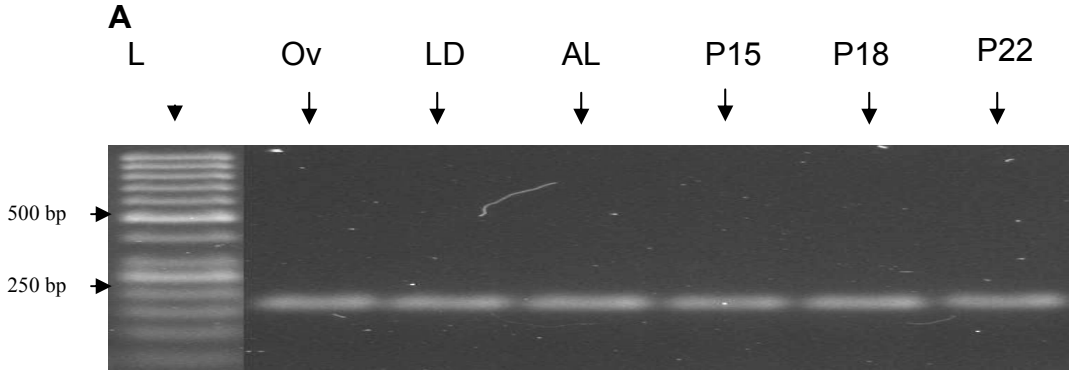
Resim 3.18: FZD6'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

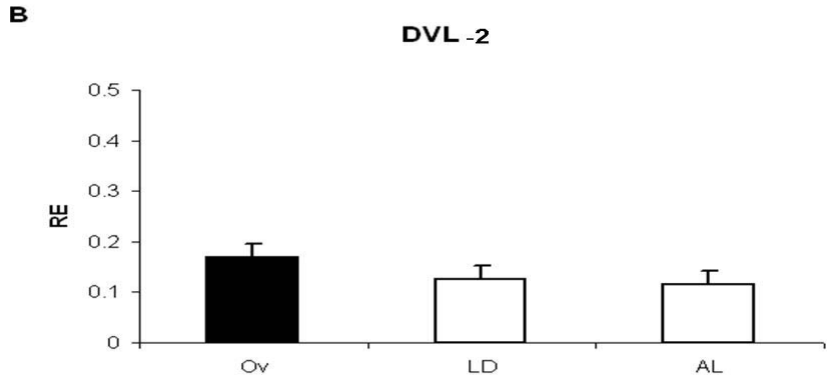


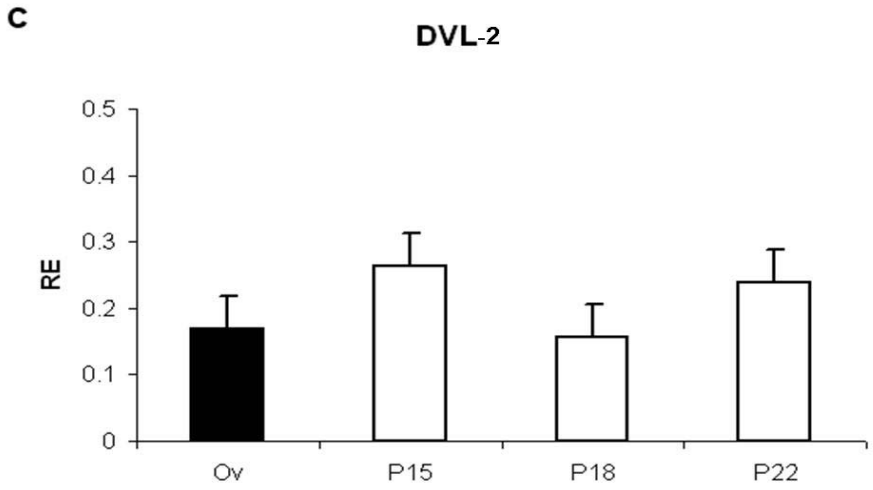




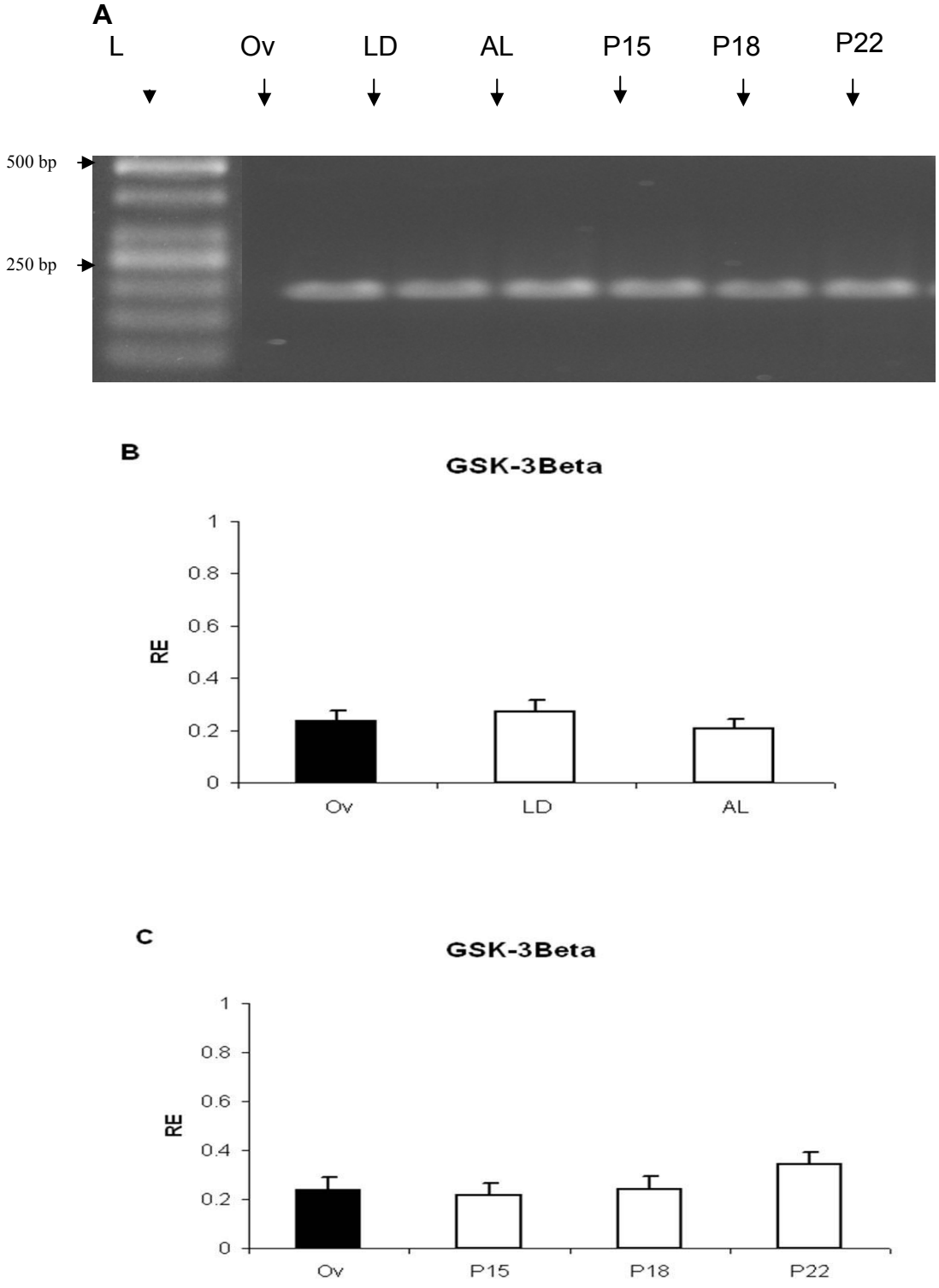
Resim 3.19: LRP6'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



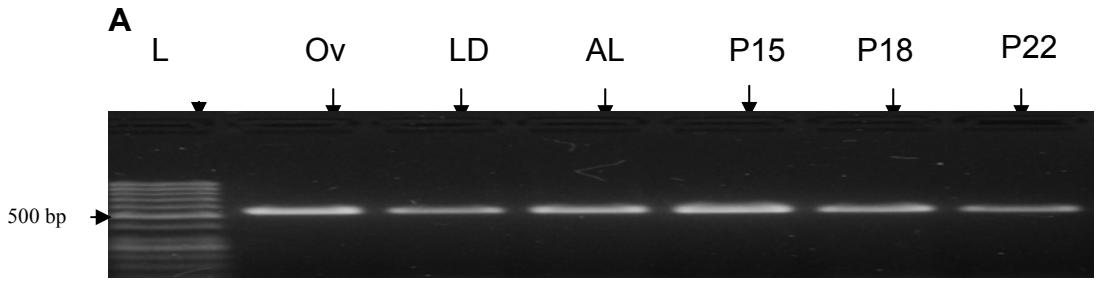


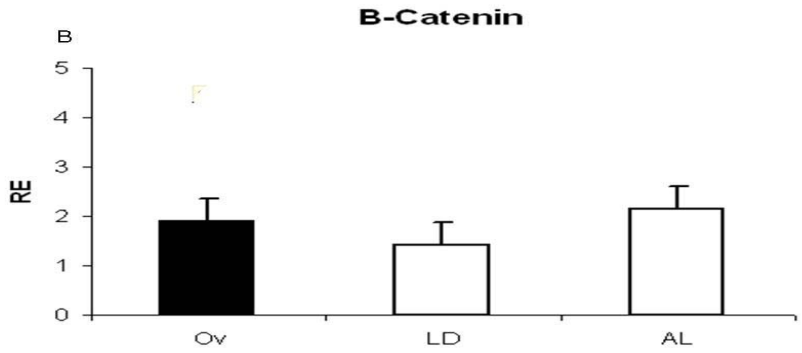


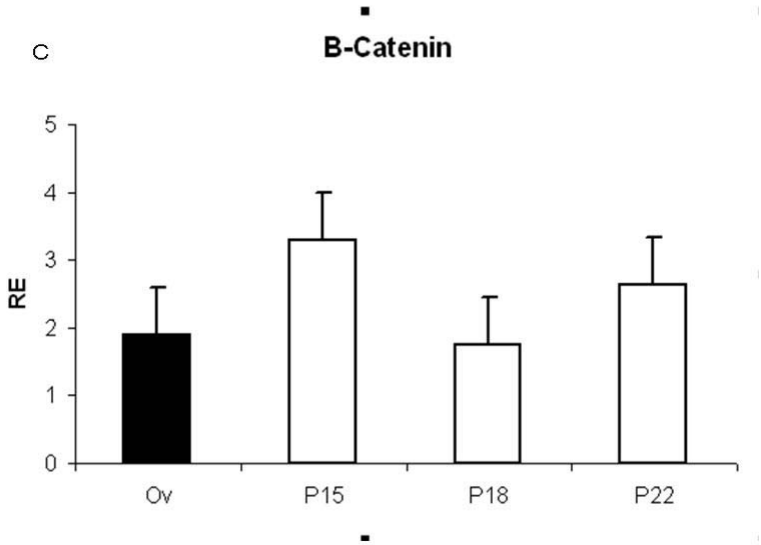
Resim 3.20: DVL-2'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



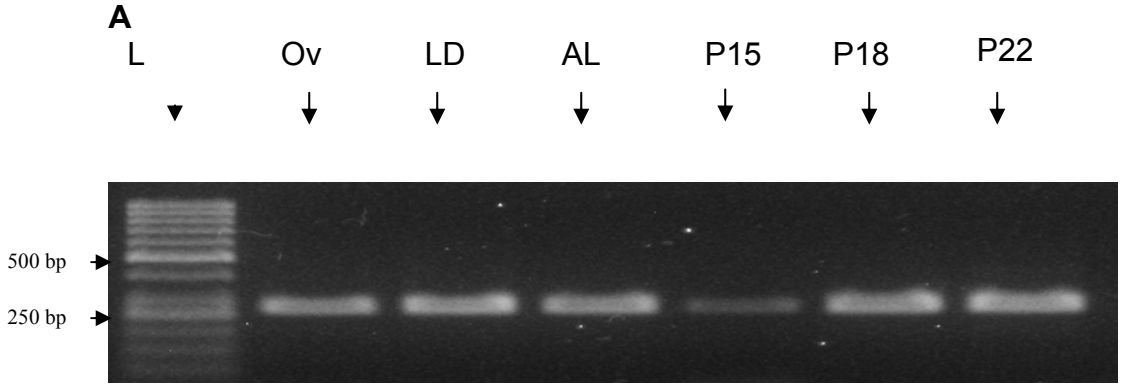
Resim 3.21: GSK3-ß'nin A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

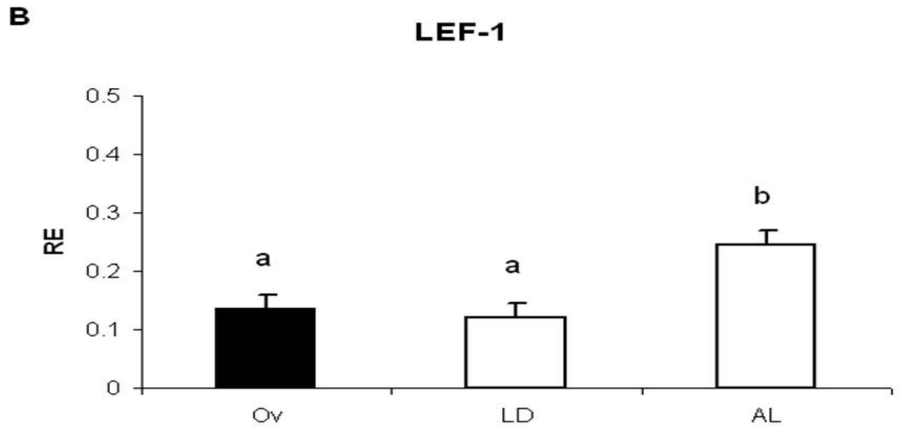


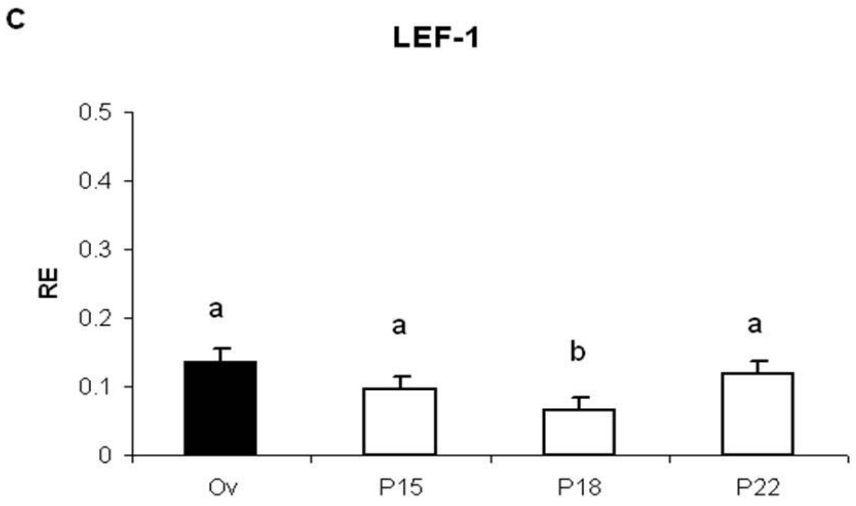




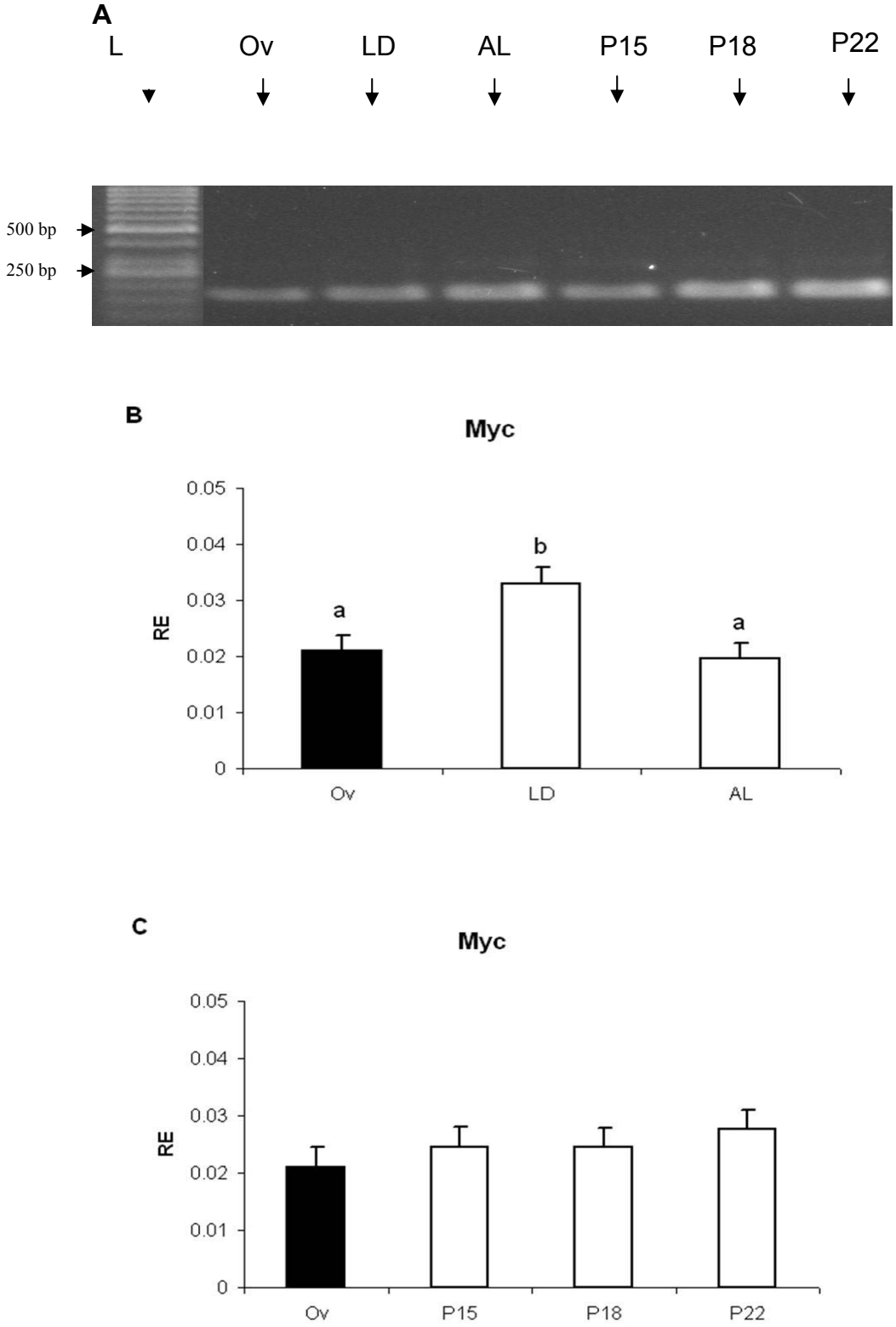
Resim 3.22: ß-catenin'in A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



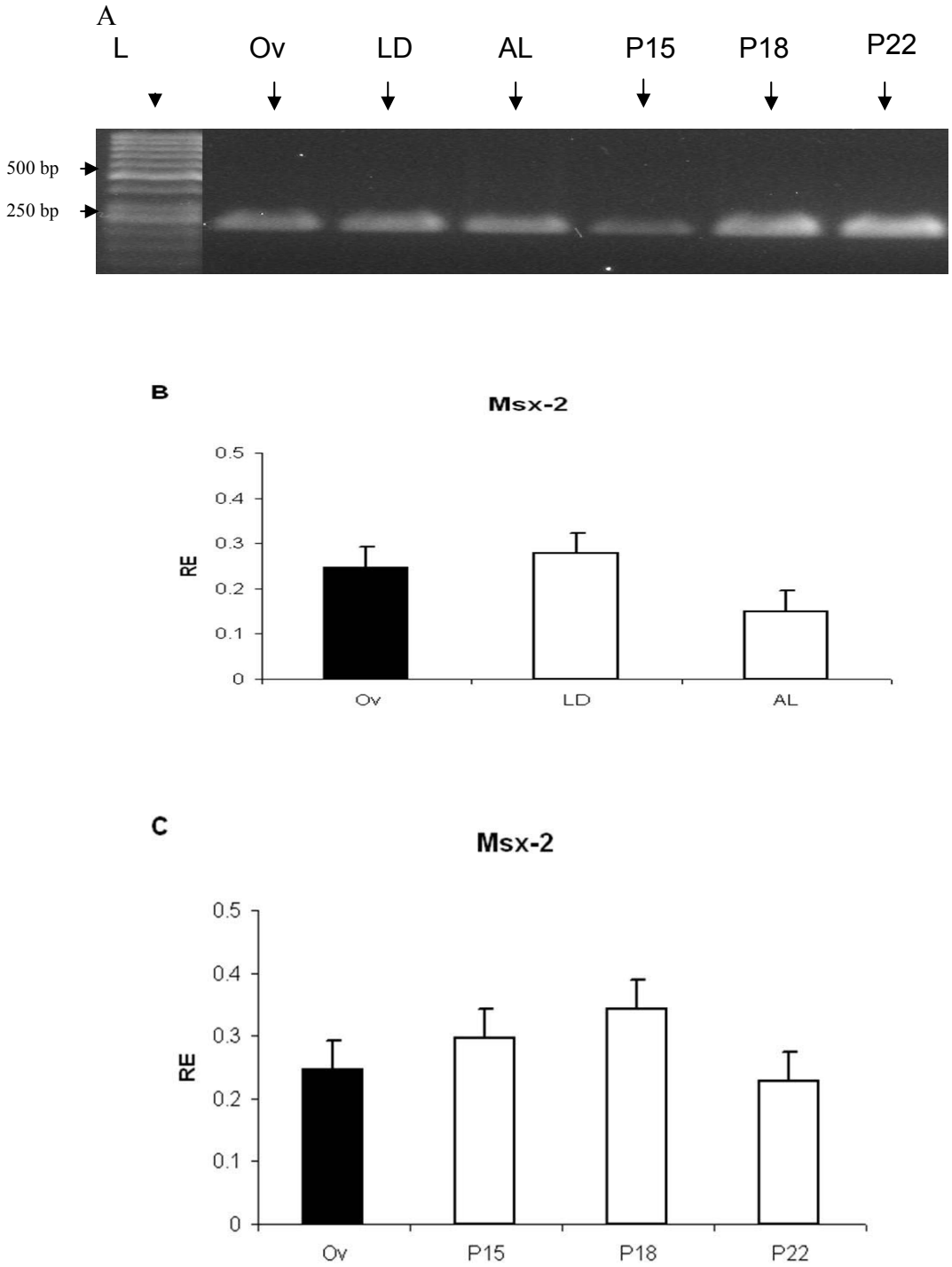




Resim 3.23: Lef-1'nin A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



Resim 3.24: Myc'nin A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.



Resim 3.25: MSX2'nin A) PZR ürününün %2'lik agarose jelde görünümü, B) siklik ve C) gebe kısraklarda endometriumda Real-time PZR ile gösterilmesi.

4.TARTIŞMA

Çalışmada 10 adet kısraktan gebelik ve siklusun farklı günlerinde toplanan 24 adet biyopsi örneği kullanılmıştır. Siklus günleri plazma progesteron konsantrasyonu ve ultrasonografi ile endometrial ödem derecesi belirlenerek, gebelik günleri ise embriyo tespit edilerek gerçekleştirilmiştir.

Gebe kısraklarda biyopsi işlemi embriyonun uterustaki konumunun tespit edilmesinin ardından embriyoya en yakın yerden alınarak yapılmıştır. Bunun nedeni henüz implante olmamış ve kapsül yapısından dolayı uterus içerisine fazlaca yayılmamış olan kısrak embriyoları için endometriumda embriyonun varlığına bağlı oluşabilecek mRNA düzeyindeki ekspresyon farklılıklarının gösterilmesinde daha doğru sonuç vereceği düşünülmüştür. Nitekim; Haneda ve ark (2009) 25. günde gebe kısrak uterusunda gebe kornu ile gebe olmayan kornu arasında endometrial Interlökin-1 (IL-1) ekspresyonununda önemli ölçüde farklılıklar belirlemişlerdir. Siklik kısraklarda ise tüm endometrium aynı dönemlerde salgılanan maternal hormonların (progesteron, östrojen ve $PGF_2\alpha$) etkisinde olduğu için spesifik bir biyopsi yeri belirlenmesi ihtiyacı duyulmamıştır.

Gebe ve siklik numunelerden total RNA'ların elde edilmesinde Fenol/Kloroform esasına dayanan Trizol yöntemi kullanılmıştır. Atlı ve ark (2009) beş farklı RNA izolasyon yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada, Trizol yötemini ile oldukça iyi kalitede ve miktarda total RNA elde edildiğini bildirmektedirler. Sunulan çalışmada; Trizol yöntemi ile olgun mRNA'ların yanı sıra henüz yapım veya modifikasyon aşamasındaki mRNA'lar, ribozomal RNA'lar, yüksek moleküler ağırlıktaki RNA'lar, taşıyıcı RNA'lar ve daha küçük moleküler ağırlıktaki RNA'lar total RNA olarak ve bir kısım gDNA ile birlikte izole edilmiştir. Nükleusların da parçalanması ile henüz yapım aşamasındaki mRNA'ların da elde edilmesi sadece hücre içerisinde ömürleri kısa olan olgun mRNA elde edilmesi ile tespit edilecek gen ekspresyonundan daha güvenilir sonuç vermektedir (Farrell 2005).

RT-PZR ve/veya Real Time RT-PZR işlemlerinde, kontamine gDNA spesifik primer ile ürün oluşturduğu zaman mRNA'ların yanısıra gDNA'dan kaynaklanan miktar da ölçüleceğinden dolayı yanlış sonuçlar ortaya çıkarabilir (Farrell 2005). Çalışmadaki bazı genler için kullanılan spesifik primerler gDNA'yı templeyt olarak kullanmakta ve PZR ürünü oluşturmaktadır. Bu durumun önlenebilmesi için DNase I enzimi kullanılarak total RNA'dan gDNA kontaminasyonu temizlenmiştir. Daha sonra total RNA kullanılarak, gDNA kullanıldığında aynı büyüklükte ürün veren, GAPDH primerleri ile PZR yapılmış ve gDNA kontaminasyonuna bağlı GAPDH bantlarının oluşmamasıyla total RNA eldesinin gDNA yönünden temiz olduğu gösterilmiştir. Böylelikle çalışmada belirlenen ekspresyon farklıkları sadece RNA'dan kaynaklanmaktadır. Bu yöntemin RT işlemi esnasında gDNA varlığına bağlı kontaminasyonun gösterilmesi için kullanılan RT negatif reaksiyonu için alternatif olduğu söylenebilir.

Sunulan çalışmada RT reaksiyonu hem oligo dT hem de random hekzamer primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT reaksiyonu, sadece mRNA için spesifik olan oligo dT primerlerinin yanında random hekzamer primerler ilave edilmesi sonucunda henüz poli-adenil ilave edilmemiş, modifikasyonun çeşitli aşamalarındaki mRNA'ların miktarının da ölçüme yansıtılmasından dolayı ekspresyon farklılıkların belirlenmesinde daha doğru sonuç vereceği düşünülmektedir.

Hem PZR hemde Real-time PZR için en uygun primerlerin belirlenmesi için birden fazla primer dizayn programı kullanılmıştır. Bu işlem sonrasında dizayn edilen primerlerin büyük bir bölümü hedef cDNA ile PZR'da primer dimer oluşturmamış, oluşturanlar ise erime eğrisi analizinde bakılarak primer dimer ürününün çoğaltılan bölgenin erime ısısı içerisine girmiyor olması sağlanmıştır. Ayrıca primer belirlenirken elde edilen primer çiftlerinin etkinliğinin (efficiency) %100 olabilmesi hedeflenmiştir ve bu amaçla mümkün olan en küçük PZR ürününü verebilecek primer çifti kullanılmıştır. Kısraklarda karakterize edilen Wnt gen ailesine ait sekanslar Gen Bankası üzerinde tahmin edilen sekans bilgisi olarak verildiğinden, primer dizayn programlarından elde edilen primerlerin ve gen bölgesinin BLAST programı ile kısrakta sadece ilgili bölgeyi

çoğaltıyor olması koşulu ile en az üç farklı türde de büyük benzerlikle aynı gen bölgesini çoğaltıyor olmasına önemle dikkat edilmiştir. Çoğaltılan RT-PZR ürünleri uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile hem de gen bölgesinin DNA dizi analizi yapılması ile amaçlanan hedef gen olduğundan emin olunmuştur.

Touchdown PZR esnek bağlanma ısısı ile farklı Tm özelliğine sahip PZR primerlerinin aynı PZR protokollerinde çoğalmasına olanak sağlamaktadır. Dolayısı ile PZR analizlerinde farklı $MgCl^{++}$ konsantrasyonlarının ve farklı bağlanma derecelerinin optimizasyonu için gradient PZR'ye olan gereksinim ortadan kalmaktadır (Don ve ark 1991). Sunulan çalışmada da genlerin tamamında 60–52 ˚C bağlanma ısı aralığı uygulanarak Touchdown PZR koşullarında araştırılan gen bölgelerinin çoğaldığı gözlenmiştir.

Real-time PZR işleminin normal PZR yöntemi ile kıyaslandığında avantajları; her siklus sonunda çoğaltılan hedef genin miktarını ölçülmesine fırsat tanıyan floresan özelliğinin olması ve PZR işlemi sonrasında agaroz jel elektroforezinde PZR ürünlerini yürütülüp daha sonra çekilen resimden piksel sayma özelliğine dayanan metotlara göre daha güvenilir olmasıdır. Zaten PZR'de 40 siklus sonunda tüpün içerisindeki ürün plato noktasında ulaştığı için, örnekler arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesine dayanan piksel analizi yapılması çok sağlıklı olmamaktadır. Ayrıca her bir gen için ayrı ayrı siklus saysını belirlemek oldukça zaman alıcıdır ve Real-time PZR normal PZR'ye göre daha düşük templeyt cDNA miktarına ihtiyaç duymaktadır (Shipley 2007). Bu nedenle sunulan çalışmada farklı dönemlerde gen ekspresyon farklılıklarının gösterilmesi için Real-time PZR'den yararlanılmıştır.

Sunulan bu çalışma; kısrak endometriumda Wnt genleri, antagonistleri ile hücre içi sinyal iletimini sağlayan sistemdeki diğer bileşenlerin mRNA düzeyinde ekspresyonunu araştıran ilk çalışmadır. Wnt sinyal iletim sistemi; özellikle embriyonik dönemde doku ve organların farklılaşması ile embriyonik kök hücre çalışmalarında ve ayrıca sinyal iletim sistemine bağlı bozukluklar sonucu başta insanlarda olmak üzere birçok farklı türde ortaya çıkan çeşitli kanser ve malformasyon olgularında oldukça iyi

araştırılmış genlerdir (Clevers 2006, Nusse 2008b). Yine embriyonal dönemde reprodüktif doku ve organların gelişimi üzerine etkili olduğu knock-out (herhangi bir genin biyoteknolojik yöntemler kullanılarak genomdan silindiği) fareler üzerinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Sassoon 1999). Özellikle yetişkin canlılarda endometriumda maternal ve/veya embriyonik kaynaklı hormonların etkisi ile siklus günleri içerisinde veya gebelik boyunca Wnt genlerinden bazılarının önemli değişiklikler göstermesi, büyüme faktörleri ailesinden olan bu genlerin endometriumda gebeliğin şekillenmesi, implantasyon, embriyonun büyüyüp beslenmesi gibi durumlarda diğer faktörler ile koordineli olarak rol aldığını göstermektedir (Sassoon 1999, Mohamed ve ark 2005, Hayashi ve ark 2007). Farelerde hem embriyonal dönemdeki uterus bezlerinin gelişimde hem de östrus siklusu boyunca Wnt genlerinin var olduğu gözlenmiştir (Miller ve ark 1998). Ayrıca gebelik boyunca uterusta ve blastosist aşamasındaki embriyoda varlıkları gösterilmiştir (Kemp ve ark 2005, Hayashi ve ark 2009). Koyunlarda bu genlerin neonatal dönem içerisinde ve erken gebelik süresince uterus ile embriyonun çeşitli bölgelerinde ekspresyonu saptanmıştır (Hayashi ve Spencer 2006, Hayashi ve ark 2007). İnsanlarda yine seksüel siklus içerisinde ve endometriozis olgularında Wnt sinyal iletim sistemine ait genlerin mRNA düzeyinde eksprese olduğu bilinmektedir (Tulac ve ark 2003, Tulac ve ark 2006, Gaetje ve ark 2007).

Mohammed ve ark (2005) Wnt sinyal iletim sisteminin farelerde implantasyonun gerçekleşmesi için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Mericskay ve ark (2004) farelerde embriyonal dönemde uterus mezenşim dokusu ile epitel doku ilişkisi ve bezsel gelişimin Wnt genlerinin etkisi ile olduğunu açıklamışlardır. Ayrıca Hayashi ve ark (2009) yine fare uterusunda bu genlerin gebeliğin oluşumunda ve devam etmesinde rollerinin olduğunu göstermişlerdir. Tulac ve ark (2003) ise Wnt genlerinden bazılarının insanlarda menstürel siklusun proliferatif ve sekretorik fazında ekspresyonlarında değişmeler olduğunu bildirmektedirler. Hayashi ve Spencer (2006) neonatal kuzularda Wnt sinyal iletim sisteminin endometrial bezlerin gelişiminde önemli roller oynadığını açıklamışlardır. Yine aynı grup farklı bir çalışmalarında (Kim ve ark 2003) koyunların erken gebeliği süresince embriyonal kaynaklı IFN-τ'nun Wnt gen ekspresyonunu düzenlediğini vurgulamaktadırlar. Sunulan çalışmada; bazı Wnt genlerinin siklusa bağlı

ve bazılarının da hem siklus hem de gebeliğe bağlı olarak ekspresyon profillerinin değiştiğinin gösterilmesi bu genlerinde yukarıda anılan türlerde olduğu gibi kısraklarda da reprodüktif olayların oluşum sürecinde rollerinin olduğunu göstermektedir.

Wnt genleri bir büyüme faktörü gen ailesi olup hem embriyonal hayatta hem de yetişkin metabolizmasının düzenlenmesinde çok önemli görevler üstlenirler (Logan ve Nusse 2004). Wnt sinyal iletim sistemini aktive eden Wnt proteinlerinin hücre içerisindeki mekanizmaları ya ß-catenin üzerinden veya Ca^{2+}/JNK üzerinden aktive ettiği bilinmektedir (Veeman ve ark. 2003, Logan ve Nusse 2004). Bunların dışında, trozin kinaz reseptörleri olan Ror2 ve RTK/Derailed ile Wnt proteinlerinin etkileştiği gösterilmiştir (van Amerongen ve ark 2008). Canonical sinyal iletim sisteminde Wnt proteinleri hücre membranında FZD ve LRP proteinleri ile etkileşime geçerek sitoplazma içerisindeki ß-catenin'in yıkımlanmasını engellemektedirler. Stabilize olan ß-catenin molekülü ise nükleus içerisine geçip DNA üzerindeki TCF proteinleri ile etkileşerek çeşitli genlerin aktivasyonu düzenler (Nusse, 2008a). Özellikle canonical yolun uyarılması yetişkin organizmalarda kanser oluşumunu tetiklemesinin yanı sıra, dokuların homeostazisi, hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunda rol oynadığı sanılmaktadır (Logan ve Nusse 2004). Non-canonical sinyal iletim sistemi ise ß-catenin'den bağımsızdır. Non-canonical Wnt'lerin ise hücrenin morfolojik özelliklerinin değişmesini ve hücre hareketlerini uyardığı bilinmektedir (Miller ve ark 1999). İnsanlarda östrus siklusunun farklı dönemlerinde Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt8b, koyunlarda neonatal dönemde Wnt2, Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt11, erken gebelik döneminde neonatal döneme ek olarak Wnt5b, farelerde implantasyon döneminde Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11, Wnt16, domuzlarda ise Wnt7a ve Wnt5a ekspresyonlarını saptanmıştır (Tulac ve ark 2003, Hayashi ve Spencer 2006, Hayashi ve ark 2007, Kiewisz ve ark 2008, Hayashi ve ark 2009) Sunulan çalışmada; canonical sinyal iletim yolunu aktive eden Wnt2, Wnt2b, Wnt7a, Wnt8a ile birlikte non-canonical sinyal iletim sistemini aktive eden Wnt5a, Wnt5b, Wnt11 ve Wnt16 proteinleri ve henüz tam anlamıyla klasifiye edilmeyen Wnt4, Wnt9b, Wnt10b'nin mRNA düzeyinde ekspresyonları kısrak endometriumunda östrus siklusunun ve erken gebeliğin araştırılan günleri boyunca belirlenmiştir. Diğer Wnt genlerinin ise (Wnt1,

Wnt3, Wnt6, Wnt7b, Wnt8b, Wnt14) araştırılan dönemlerde ekspresyonlarına rastlanılmamıştır.

Wnt genlerinin hedef dokulardaki etkilerini inhibe ettiği bilinen FZD reseptör proteinlerine benzeyen, fakat hücre içerisinde aktif domaini olmadığı için Wnt sinyal iletim sistemini inaktive eden SFRP ailesi, yine bu aileye mensup Wif–1 ve LRP proteinini inhibe ederek canonical yolu engelleyen Dkk1 başlıca spesifik antagonistlerdir (Logan ve Nusse 2004). İnsanlarda endometriumda frpHE ve Dkk1, koyunlarda erken gebelik boyunca sadece Dkk1, neonatal dönemde SFRP1, SFRP2, SFRP4 ve Dkk1'in ekprese olduğu belirlenmiştir (Tulac ve ark 2003, Hayashi ve Spencer 2006, Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada ise kısrak endometriumda araştırılan SFRP1, SFRP2, SFRP5, Wif–1, Dkk1 ve Dkk2'nin hem siklus günleri hem de gebelik günlerinde eksprese olduğu gözlenmiştir.

İnsanlarda (Tulac ve ark 2003) siklus içerisinde FZD6, LRP6, ß-catenin, DVL, GSK3ß, koyunlarda erken gebelik ve neonatal dönemde (Hayashi ve ark 2007) FZD6, FZD8, LRP5, LRP6, GSK3-ß, ß-catenin, e-catenin, Myc, MSX2, ve domuzlarda erken gebelikte (Kiewisz ve ark 2008) ß-catenin ve e-catenin'in eksprese olduğunu bildirilmektedir. Sunulan çalışmada siklik ve gebelik günlerinde araştırılan hücre yüzey reseptörü FZD6 ve LRP6, sitoplazma içerisinde DVL-2, ß-catenin, GSK-3ß, nükleus içi transkripsiyon faktörü Lef-1 ve Wnt uyarımları sonucunda aktive olduğu bilinen MSX2 ve Myc genlerininde kısrak endometriumunda varlığı gözlenmiştir.

Kısraklar diğer evcil hayvan türleri ile kıyaslandığında oldukça uzun bir süre (ortalama 7 gün) östrojenin etkisi altında östrus dönemi gösterirler. Ovulasyon genelde bu faz içerisinde gözlenir. Diöstrus döneminde ise başlıca hormon progesterondur (Jonhson ve Becker 1993). Aslında diöstrus dönemi embriyo için içerisinde gelişip büyüyeceği uterus ortamını hazırlar ve eğer kısrak tohumlanmış ve bununla birlikte uterus içerisinde sağlıklı bir embriyo varsa luteolizis oluşmadan diöstrus dönemi devam eder (Blanchard ve ark 1998). Kısrak endometriumu, siklus ve gebeliğin dönemlerine göre maternal olarak salgılanan hormonlar (östrojen, progesteron, lokal etkili hormonlar

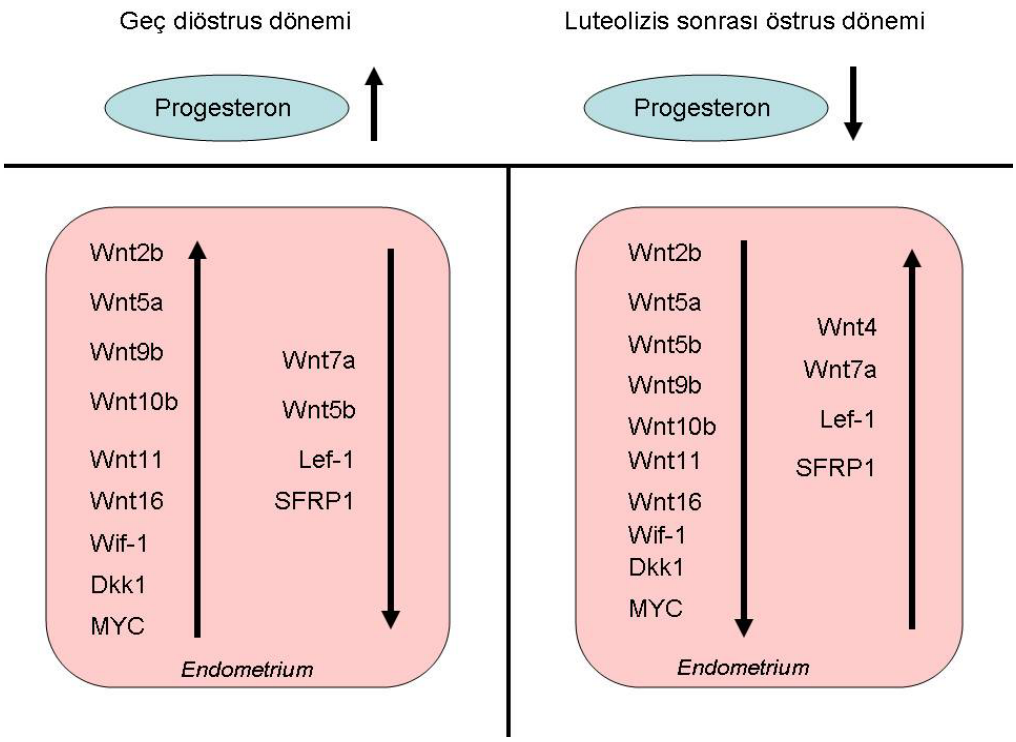
gibi) ve embriyonik faktörler etkisi ile fizyolojik ve morfolojik özellikleri bakımından oldukça değişiklik göstermektedir (Gerstenberg ve ark 1999a, 1999b). Özellikle siklus süresince ovaryumdan salgılanan östrojenin etkisi ile endometrium katmanları bu dönemde oldukça belirginleşir ve ödemleşir (Atlı ve ark 2005). Bu dönemde büyüyen follikülden salgılan ve artan östrojenin etkisi ile endometriumun süperfisiyel katmanı, luminal epitel katmanı, bezlerdeki ve stratum kompaktum katındaki epitel hücreler oldukça proliferedirler (Gerstenberg ve ark 1999a). Östrus dönemindeki belirgin endometrial katlaşma ovulasyon zamanı yaklaştıkça östrojendeki düşüş ile birlikte azalır (Blanchard ve ark 1998). Ayrıca ovulasyon gününün belirlenmesinde kısraklarda ovulasyon gününde östrusa oranla azalan endometrial ödem derecesi kriter olarak kullanılmaktadır (Atlı ve ark 2005). Ovulasyon şekillenmesi ile birlikte kan plazma progesteron hormon miktarı da artmaya başlar (Daels ve Hugles 1993). Östrojenik etki altında iken artan proliferasyon ovulasyonun ardından hızlı bir şekilde düşüş gösterir (Gerstenberg ve ark 1999a). Kısraklarda diöstrus olarak tanımlanan dönem insan ve fare için sekretorik faz olarak anılmaktadır. Sekretorik dönemde derin glandular dokulardaki proliferasyon artar. Bu artış özellikle gebelik döneminde embriyonun beslenebilmesi için gerekli endometrial salgıların artışına sebep olur (Gerstenberg ve ark 1999a). Diğer hayvan türlerinde de özellikle sekretorik artışın embriyonun büyümesi ve yaşamını devam ettirmesi için gerektiği bildirilmiştir (Bartol ve ark 1999). Ayrıca insanlarda da gebeliğin ilk trimesterinde embriyonun büyümesi ve beslenebilmesi için uterus salgıların gerekliliği vurgulanmaktadır (Burton ve ark 2002). Kısraklarda gebelik döneminde ise 10. günden itibaren embriyodan salgılanan östrojenin de etkisi ile endometriumun bazı katmanlarında 14. günde artan proliferasyon 18. günde belirginleşir. Bu proliferasyonun embriyonun beslenip büyüyebilmesi için hücrelerden salgılarına devam etmesinde gereklidir (Gerstenberg ve ark 1999b). Endometrium içerisinde siklusun dönemleri veya gebeliğe bağlı olarak görülen hücresel değişimler esnasında bazı Wnt genlerinin ekspresyonlarının değiştiği diğer türlerde (Miller ve ark 1998, Tulac ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009) bildirilmiştir. Sunulan çalışmada kısrak endometriumda da bazı Wnt genlerinin ekspresyonlarının diğer türlerde olduğu (Miller ve ark 1998, Tulac ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007, Satterfield ve ark 2008, Hayashi

ve ark 2009) gibi maternal progesteron ve östrojen veya embriyoya bağlı faktörler ile siklus günleri içerisinde veya erken gebelik boyunca düzenlendiği gözlenmiştir.

Sunulan çalışmada östrus siklusu süresince bakıldığında, 0. gün, geç diöstrus ve luteolizisten sonraki östrus döneminde Wnt ailesine ait bazı genlerin ekspresyon düzeyleri değişiklik göstermiştir. Wnt genlerinden Wnt2, Wnt8a, antagonistler Dkk2, SFRP2 ve SFRP5 ile birlikte iletim sistemine ait hücre yüzey reseptörleri FZD6 ve LRP6, sitoplazma içi kompanentleri B-catenin, GSK3-B ve DVL-2 ile Wnt genlerinin uyardığı MSX2 miktarları değişmemiştir. Bu durum; bu genlerinin ekspresyonunun siklus boyunca etkili olan ovaryum kaynaklı östrojen ve progesteron hormonlarının etkisinden bağımsız olduğuna işaret etmektedir. Bununla beraber; nükleer aktivatör olan Lef-1 ve Wnt hedef geni olan Myc miktarlarında siklus boyunca önemli ölçüde değişiklikler belirlenmiştir. Plazma progesteron seviyesinin yüksek olduğu geç diöstrus döneminde Wnt2b, Wnt5a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11 ve Wnt16 ile birlikte Wnt antagonistlerinden Dkk1, Wif-1 ve Wnt hedef genlerinden Myc mRNA miktarlarında önemli ölçüde artış olmuştur. Diöstrus dönemi progesteron etkisi altında sekretorik bir dönemdir ve bu dönemde uterusta embriyonun beslenmesi için gereken historof (Uterus sütü) salgıları artmıştır (Bartol ve ark 1999, Burton ve ark 2002). Diöstrus içerisinde artan Wnt genlerinden Wnt5a, Wnt11 ve Wnt16 non-canonical sinyal iletim sistemine ait genlerdir. Bu iletim sisteminde Wnt'ler hücre yüzeyi reseptörlerinden sadece FZD'ye bağlanırlar. Sunulan çalışmada; non-canonical Wnt olan Wnt5a, Wnt11 ve Wnt16 ekspresyonlarının attığı dönemde, LRP'yi bağlayarak Wnt/ß-catenin yolunun aktivasyonu engelleyen Dkk1'inde önemli miktarda artması kısrak endometriumunun diöstrus döneminde non-canonical sistemin etkili olduğuna işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar bu genlerdeki artış ve baskılanmanın sistemik progesteron ve östrojen tarafından düzenlendiğini göstermektedir (Şekil 4.1.).

Siklusun östrus dönemi endometriumun yüzeysel katmanlarında proliferasyonun arttığı bir dönemdir (Gerstenberg ve ark 1999a). Sunulan çalışmada östrus esnasında Wnt4, Wnt7a, SFRP1, ve Lef-1'in mRNA düzeyindeki ekspresyonu, progesteron etkisi altındaki diöstrus dönemi ile kıyaslandığında, önemli bir şekilde artış göstermiştir.

Wnt7a canonical iletim sistemini kullanan bir proteindir. Lef -1 ise canonical sistem tarafından uyarılan bir nükleer aktivatördür. Wnt4 ve SFRP1'in östrojenik etki ile uyarıldıkları bilinmektedir (Miller ve ark 1998, Fukuhara ve ark 2002). Wnt7a ve SFRP1'nın hücre proliferasyonundan ziyade prolifere olan hücrelerin apoptozisini engellediği gösterilmiştir (Carta ve Sassoon 2004, Fukuhara ve ark 2002). Wnt4'ün ise proliferasyondan sorumlu olduğu bilinmektedir (Miller ve ark 1998). Bu genler araştırıldığı çalışmaların ışığında, östrojenik etki altında kısrak endometriumda artış gösteren Wnt4'ün proliferasyondan sorumlu olduğu, Wnt7a ve SFRP1'in rolünün ise prolifere olan bu hücrelerin apoptozise gitmesini engellenmesi olduğu söylenebilir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Östrus siklusu içinde endometriumda artan veya azalan Wnt genlerini gösteren şema

Fare ve koyun endometriumda Wnt sinyal iletim sistemine ait genlerin ekspresyonunda gebelik süresince meydana gelen bazı değişimler bu genlerinin erken gebelik esnasında endometrial fonksiyonlar için önemli olduğunu göstermektedir (Mohamed ve ark 2005, Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009). Hayashi ve ark (2009) gebe fare endometriumunda Wnt4'ün ekspresyonunun implantasyonla birlikte arttığını ve 7. günde miktarının 1. günün 15 katına kadar ulaştığı bildirilmiştir. Ayrıca Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b implantasyon esnasında implantasyon bölgesinde arttığını vurgulamaktadırlar. Wnt11'in implantasyondan önce 4. günde luminal epitelde ve yüzeysel bezlerde miktarının arttığını, Wnt16'nın ise luminal epiteli çevreleyen stromada lokalize olduğu bildirmektedirler (Hayashi ve ark 2009). Koyunlarda ise hem endometriumda hem de embriyonun trofektoderm katmanında Wnt genlerinin ekpresyonuna bakılmıştır. Bu genlerden Wnt2 ekspresyonunun öncelikli olarak endometrial stromada olduğu, embriyonun trofektoderm katmanında ise bunun düşük düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Wnt2b'nin embriyoda eksprese olduğu saptanmıştır. Wnt4 ekspresyon düzeyinin ise endometrial stromada minimal iken gebeliğin 16.-20. günleri arasında önemli miktarda arttığını gözlemişlerdir. Wnt5a ve Wnt5b miktarının endometriumun luminal epitelin altındaki stromanın stratum kompaktum katmanında yoğun bir şekilde olduğu ve düşük düzeyde de olsa luminal epitelde varlığı gözlenmiştir. Wnt5a ve Wnt5b eskpresyonuna ise embriyoda rastlanmamıştır. Wnt7a luminal ve süperfisiyel glandular epitelde gözlenmiş ve gebelik günlerine göre miktarının değiştiği belirlemiştir. Wnt11 yoğun olarak endometrial bezlerde, düşük düzeyde luminal epitelde saptanmış ve miktarının gebelik boyunca değişmediği bildirilmiştir (Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada ovulasyon günü (0. gün) ile gebeliğin 15, 18 ve 22. günleri içerisinde Wnt genlerinin ekspresyon profilleri değerlendirildiğinde Wnt2, Wnt7a ve Wnt5b'nin 0. günle kıyaslandığında erken gebelik boyunca baskılandığı saptanmıştır. Lef -1 gebeliğin 18. gününde azalmıştır. Non-canonical Wnt5a ve Wnt11 gebeliğin 15 ve 18. günlerinde ovulasyon günü ile kıyaslandığında önemli ölçüde artış göstermiştir. Bununla birlikte canonical Wnt2b gebeliğin 15. gününde artarken, Wnt16 gebelik günleri içerisinde 0. güne göre kıyaslandığında miktarı hafif yükselme eğilimindedir ($P<0,09$). Wnt antagonistlerinden

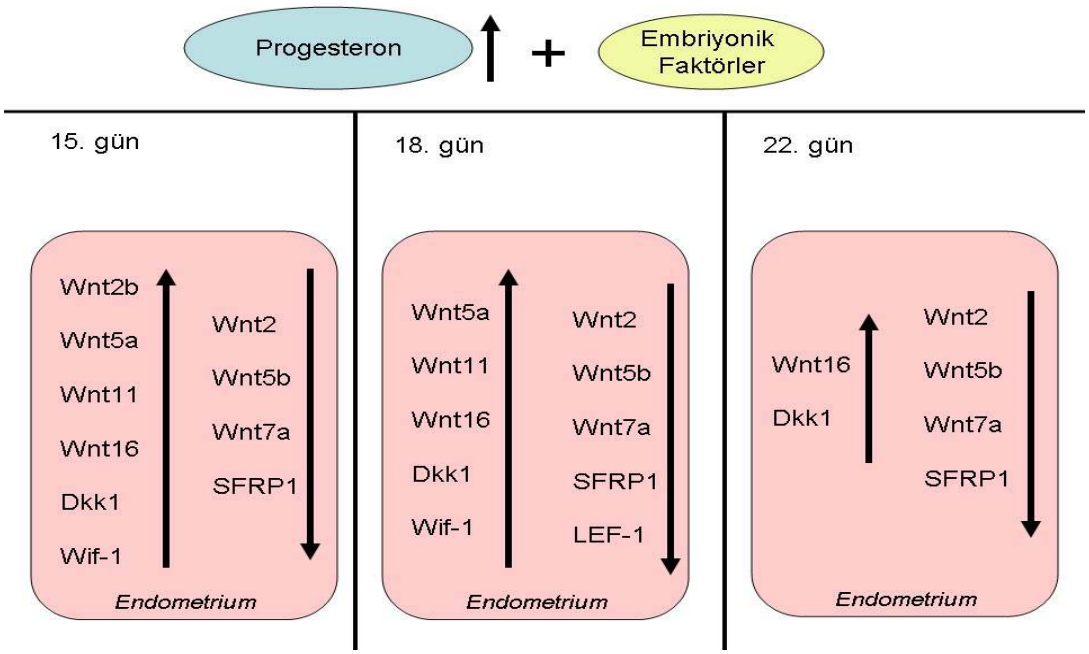
Dkk1 gebelik boyunca, Wif-1 ise 15 ve 18. günlerde 0. güne göre artış göstermiştir. Non-canonical Wnt5a, Wnt11 veWnt16, canonical Wnt2b ile birlikte Wnt antagonistlerinden Dkk1 ve Wif-1 ekspresyonları gebeliğin 15. günü ve östrus siklusunun progesteronun yüksek olduğu geç diöstrus döneminde benzer bir profil sergilemektedir. Bu durumdan bu genlerin gebelikten ziyade sistemik progesteron etkisi ile düzenlendiği sonucu çıkmaktadır. Wnt11'nin diğer türlerde endometrial bezlerde proliferasyonu ve sekresyonu uyarma fonksiyonunun, kısraklarda mRNA düzeyinde erken gebeliğin 15. ve 18. günlerinde 0. gün ile kıyaslandığında önemli ölçüde artığı dikkate alınırsa, kısraklar içinde geçerli olduğu söylenelebilir (Şekil 4.2.).

Kiewisz ve ark (2008) domuzlarda uterus içerisinde embriyonik östrojenin etkili olduğu erken gebeliğin 15. ve 16. günlerinde Wnt5a'nın miktarının arttığını göstermesi, gebeliğin 15. ve 18. günlerinde kısraklarda artan Wnt5a ekspresyonu ile benzerdir. Elde edilen verilere bakılarak non-canonical yolu uyaran Wnt5a, Wnt 11 ve Wnt16'in diöstrus döneminde olduğu gibi erken gebelik süresincede de embriyonun beslenip büyüyebilmesi için endometrial fonksiyonları parankim etki ile proliferasyon ve sekresyonu yönünde uyararak düzenlediği kanısına varılmaktadır (Şekil 4.2.).

Kısraklarda erken gebelik boyunca endometriumda meydana gelen olaylar bazı yönleri ile diğer hayvan türleri ile kıyaslandığında farklılıklar gösterir. Örneğin; kısrak embriyosu gebeliğin ilk 16 günü uterus içerisinde hareketlidir (Ginther 1998). Ayrıca embriyonun trofoblastik hücrelerinin endometriumla iletişimini embriyonun etrafını saran glikokaliks yapısındaki kapsül engellemektedir (Oriol ve ark 1993). Fakat gebeliğin maternal kabulü esnasında endometrial COX2 mekanizması ve ÖR alfa miktarının azalması ruminantlar ile benzerlik göstermektedir (Boerboom ve ark 2004, Hartt ve ark 2005, Guzeloglu ve ark 2009a, 2009b). Ayrıca domuzlardaki gibi kısrak embriyosu da östrojen salgılamaktadır (Zavy ve ark 1979). Östrojenin luteolizis üzerindeki etkisi tam anlamı ile tespit edilemediğinden embriyonal kaynaklı östrojenin uterusta implante olmamış embriyonun beslenip gelişmesi için gerekli maddelerin sentezlenmesi sağlayacak bezsel gelişim ve proliferasyonu uyardığı sanılmaktadır (McDowell ve ark 1987). Ayrıca McDowell ve ark (1987) tarafından embriyonik

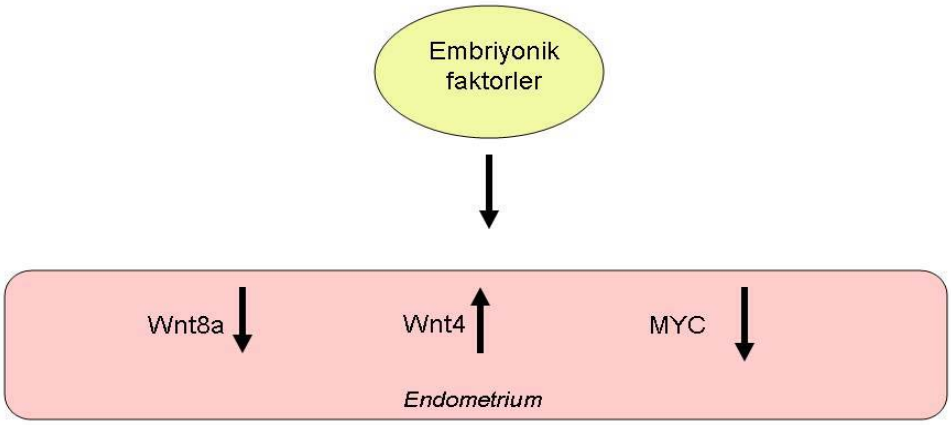
östrojenin uterustaki histrof salgısının miktarı ve özelillerini artırdığıda bildirilmiştir. Östrojen hem neonatal dönemde hem de yaşam süresi boyunca reprodüktif organların fonksiyonlarını düzenleyen ve çeşitli genlerin ekspresyonlarını etkileyen önemli bir steroid hormondur (Ma ve ark 2003). Uterus ise östrojenin etkilerinin gözlendiği en önemli organdır. Östrojenin bu etkilerini ÖRα ve ÖRß olmak üzere iki nükleer reseptörü aracılığı ile yaptığı bilinmektedir (Das ve ark 2000, Groothuis ve ark 2007). Fakat son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, östrojenik etkinin bazen kendi reseptörlerinden bağımsız olarakta uyarılabileceğini göstermiştir (Das ve ark 2000, Rider ve ark 2006). ÖR knock-out farelerde veya ÖR antagonisti kullanılan bir çalışmada östrojenin uterusta Wnt4, Wn5a ve FZD2 ekspresyonunun arttırdığı gösterilmiştir (Hou ve ark 2004). Endometriumda bilinen en önemli östrojenik etkiler proliferasyonu uyarması, hücresel farklılaşma, sekretorik etki, luteolizisin başlatılması ve implantasyonun düzenlenmesi şeklinde sayılabilir (Hess ve ark 2006). Özellikle ovaryumlardan salgılanan östrojenin endometrial proliferasyonun ve implantasyonun uyarılmasında Wnt sinyal iletim sisteminide aktive ettiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Miller ve ark 1998, Mohammed ve ark 2004). Bununla birlikte reprodüktif organların gelişip başkalaştığı dönemlerde de östrojen Wnt gen ailesi üzerine etkili bulunmuştur. Miller ve ark (1998) prenatal dönemde dietilstilbestrol uygulamasının Wnt7a'yı baskılayarak dişi üreme sisteminin anormal gelişimine neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Katayama ve ark (2006) yetişkin olmayan dişi ratlara dietilstilbestrol uygulaması sonrasında Wnt7a'nın uterustaki ekspresyonun önemli ölçüde azaldığını, Wnt4 ve Wnt5a'nın uygulamanın başlarında artış göstermesine rağmen 24–48 saat içerisinde onlarında ekspresyon seviyelerinin azaldığının bildirtmektedirler. Siklus gösteren yetişkin farelerde östrojen Wnt4 ekspresyonunu artırırken, Wnt5a ekspresyonunu baskılamıştır. Wnt7a'nın ise Wnt5a'da olduğu gibi miktarının diöstrusta yüksek olduğunu vurgulanmaktadır (Miller ve ark 1998). Östradiol ile kanserojen etkili zerenol gibi östrojenlerinde endometrial hücrelerde Wnt7a'yı baskıladığı, östrojenin Wnt7a üzerindeki etkisinin Ishıkawa kanser hücrelerinde ÖR'ye bağımlı olduğu gösterilmiştir (Wagner ve Lehmann 2006). Ayrıca öncesinde östradiol uygulanan progesteron uygulamaları normal epitel hücrelerinde Wnt7a miktarını arttırmıştır (Oehler ve ark 2002). Kısraklarda endometrium siklusun östrus döneminde sistemik östrojen, gebelikte ise 10. günden itibaren kısrak

embriyosundan salgılanan lokal östradiol etkisi altındadır (Zavy ve ark 1979, Janson ve Backer 1993). Gesterberg ve ark (1999b) östrodiolün gebeliğin 18. gününden itibaren endometriumun çeşitli katmanlarında proliferasyon artışını etkilediğini bildirmektedirler. Embriyonik östrojenin luteolizisi engellemeye yönelik bir sinyal olduğu da henüz şüphelidir (Raeside ve ark 2004). Daha çok endometriumda büyüme faktörlerini uyardığı sanılmaktadır. Ayrıca gebeliğin ÖR'ün uterusta artışını baskıladığı (Güzeloğlu ve ark 2009a) göz önüne alındığında embriyonik östrojenin Wnt gibi büyüme faktörlerini ÖR'den bağımsız olarak düzenliyor olabileceği söylenebilir. Gebelikte embriyonik östrojen varken Wnt2b 15. günde, Wnt5a, Wnt11 ve Wif-1 15 ve 18. günde, Dkk1 gebelik boyunca, ovulasyon günü ile kıyaslandıklarında miktarları artmıştır. Wnt16 ise aynı dönemde hafif yükselme eğilimindedir (P<0,09). Aynı dönemde embriyonik östrojen varken Wnt2, Wnt5b, Wnt7a, SFRP1 gebelik boyunca baskılanmıştır. Lef-1 ise 18. günde azalma göstermiştir. Gebe olmayan kısraklardaki Wnt genlerinin siklus profili dikkate alındığında gebelik boyunca Wnt2 dışındaki Wnt gen ailesine ait genlerdeki değişimlerin kandaki yüksek progesteron seviyesi ile ilişkili olduğu sanılmaktadır (Şekil 4.2.).



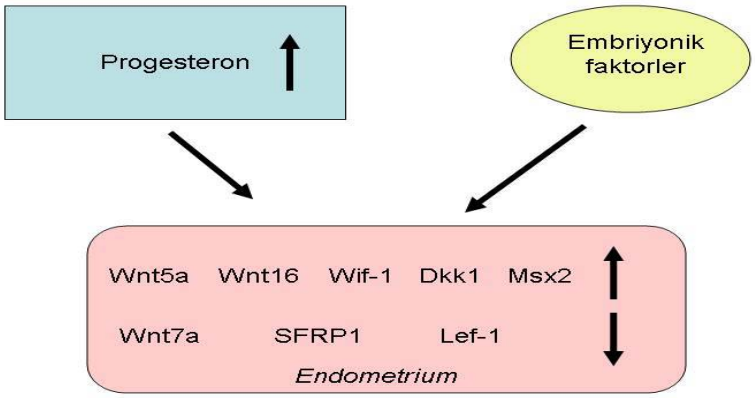
Şekil 4.2. Erken gebelik günleri içinde 0. güne göre Wnt genlerinde gözlenen değişiklikleri gösteren şema

Ayrıca geç diöstrus ile karşılaştırıldığında gebeliğin 15. gününde Wnt4 ekspresyonu endometriumda artış gösterirken Wnt8a ve Myc ise baskılanmaktadır. Her iki dönemde kanda progesteron hormonunun yüksek olduğu zamanlardır. Sadece siklusun diöstrus dönemi ile gebeliğin 15.günü kıyaslandığında östrojen etkisi ile uyarılan Wnt4 ekspresyonundaki artışın aradaki tek fark olan embriyo kaynaklı östrojenden olacağı düşünülmektedir. Yine siklus içerisinde Wnt8a ekspresyonunun değişmediği ve Myc ekspresyonun ise diöstrusta arttığı dikkate alındığında embriyonik faktörlerin Wnt8a ve Myc'yi baskıladığı söylenebilir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Geç diöstrüs dönemi (*progesteron yüksek, embriyo yok*) ile karşılaştırıldığında gebeliğin 15. gününde (*progesteron yüksek*) sadece embriyo varlığına bağlı olarak değiştiği düşünülen Wnt gen ekpsresyonlarındaki değişiklikleri gösteren şema

Luteolizis sonrası östrus dönemi ile karşılaştırıldığında Wnt7a, SFRP1 ve Lef-1 gebeliğin 18. gününde önemli ölçüde baskılanmıştır. Aynı dönemde Dkk1, Wif-1, MSX2 genleri ise önemli ölçüde artış göstermiştir. Wnt5a ve Wnt16 ise yükselme eğilimi göstermişlerdir (P<0,09). Maternal hormon düzeylerine göre kıyaslandığında luteolizis sonrası östrus östrojenik hormonun etkisi altındaki dönem, gebeliğin 18. günü ise yüksek progesteron etkisi altında diöstrus benzeri bir dönemdir. Bu genlerin siklus içerisinde izledikleri profiller dikkate alındığında Wnt7a ve Lef–1'in diöstrusta baskılanması bu genlerin gebelik esnasında sirkülasyondaki yüksek progesteron etkisi ile baskılandığı sonucunu çıkarmaktadır. Artış gösteren genlerden Wnt5a, Wnt16, Dkk1 ve Wif-1 ise diöstrusta yüksek miktarda oldukları dikkate alınırsa bu genlerinde progesteron etkisi ile ekspresyonlarının arttığı söylenebilir. MSX2 ise siklus içerisinde değişiklik göstermemesine rağmen gebeliğin 18. gününde ekspresyonunun artması bu genin embriyonik faktörler ile uyarıldığını düşündürmektedir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Luteolizis sonrası östrus dönemi (*progesteron yok, embriyo yok*) ile karşılaştırıldığında gebeliğin 18 gününde endometriumda Wnt gen ekpsresyonlarındaki değişiklikler ve bunları etkileyen olası faktörleri gösteren şema

Erken gebelik süresince 0. gün ve karşılaştırmalı siklus günleri (LD, AL) ile kıyaslandığında Wnt9b, Wnt10b, hücre yüzey reseptörleri FZD6, LRP6, intrasitoplazmik proteinler DVL-2, GSK3-ß ve ß-catenin ile antagonistler Dkk2, SFRP2

ve SFRP5 mRNA düzeyindeki ekspresyonlarında bir faklılık gözlenmemiştir. Elde edilen bu sonuçlara bakıldığında bu genlerin endometriumdaki ekspresyonlarının erken gebelik süresince düzenlenmesinde maternal ya da embriyonik faktörlerin etkili olmadığı görülmektedir.

Canonical etkili Wnt8a'nın Xenopus embriyolarında ikinci bir axis şekillenmesini indüklediği halde bu durumun non-canonical etkili Wnt5a ile durdurulması Wnt/Ca^{+2} sinyal iletim sisteminin Wnt/ß-catenin sinyal iletimi üzerine antagonist etkisinin olduğunu göstermektedir (Torres ve ark 1996). Ayrıca kanseri indükleyen canonical yolun aksine non-canonical Wnt5a'nın tiroid kanser hücreleri ve melenoma hücrelerinde tümör baskılayıcı etki göstermesi bu teoriyi destekler niteliktedir (Katoh 2005). Sunulan çalışmada; non-canonical Wnt'lerin (Wnt5a, Wnt11 ve Wnt16) diöstrus esnasında yüksek olduğu dönemde en önemli canonical Wnt'lerden biri olan Wnt7a'nın baskılanması, Wnt7a'nın ekspresyonun arttığı östrusta ise non-canonical Wnt'lerin baskılanıyor olması bu teoriyi destekler niteliktedir. Ayrıca yine canonical yolu uyaran Wnt8a'nın geç diöstrus ile kıyaslandığında 15. gün gebelikte, Wnt2 ise gebelik boyunca baskılanırken, non-canonical Wnt'lerin artması yine bu teori ile uyuşmaktadır. Ancak canonical olduğu bilinen Wnt2b ve non-canonical Wnt5b bu teori ile uyuşmayan bir ekspresyon profili sergilemişlerdir. Bu durum; aynı dönemde artan ve özellikle canonical yolu antagonize eden Dkk1'in işlevinin Wnt2b'nin etkisinin ortadan kaldırmak olduğu söylenebilir. Ayrıca bazı Wnt'lerin farklı FZD reseptörlerini kullanarak değişik sinyal iletim sistemlerini aktive ettiğide gözden kaçırılmamalıdır (Carmon ve Loose 2008; Nusse 2008a). Örneğin; Carmon ve Loose (2008) Wnt7a'nın FZD5 reseptörüne bağlanarak Wnt/beta-yolununu uyarmasına rağmen, FZD10 ile bağlanarak non-canonical yolu uyardığını göstermişlerdir. Kısrak endometriumunda Wnt2b ve Wnt5b'nin lokalizasyonunu gösterilmesi bu durumun daha iyi anlaşılmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Sunulan çalışmada Real-time PZR ile östrus siklusu ve erken gebelik boyunca Wnt genlerinin bazılarında siklus içerisinde dönemsel ve/veya gebeliğe bağlı ekspresyon faklılıkları gösterilmiştir. Östrus siklus dönemlerine ve gebeliğe bağlı veya gebelik ile

siklus günleri karşılaştırıldığında faklılık gösteren genler aşağıda tek tek diğer türlerdeki bilinen fonksiyonları ile birlikte değerlendirilmeye çalışılacaktır.

Canonical yolu aktive eden Wnt2 proteininin fare uterusunda plasentasyonu uyardığı gösterilmiş, Wnt2 knock-out farelerin doğum ağırlıklarının düşük ve perinatal ölüm oranının %50 olduğu saptanmıştır (Monkey ve ark 1996). Wnt2 geninin ayrıca hücreden hücreye iletişimin düzenlemesinde rolünün olduğu bilinmektedir (Levay-Young ve Navre 1992). Wnt2 geninin ekspresyonunun baskılanmasının mutant glioma hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu gösterilmiştir (Pu ve ark 2009). Ayrıca Wnt2'nin insanlarda gastrointestinal kanserler için bir marker olduğu, uyarılması ile gastro-intestinal sistem kanserlerini tetiklediği bildirilmektedir (Katoh 2005). Hayashi ve ark (2007) gebe koyun endometriumda erken gebelikte Wnt2'nin eksprese olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca insan meme dokusunda östrojen etkisi ile Wnt2 geninin anormal şekilde aktivasyonu proliferasyonu uyarmıştır (Vendrell ve ark 2004). Sunulan çalışmada; östrus siklusu boyunca uterusta ekspresyonu değişmeyen Wnt2, 0. günle kıyaslandığında gebelik süresince baskılanmıştır. Maternal hormonlara bağlı olarak değişiklik göstermeyen Wnt2 ekspresyonunun gebelik boyunca baskılanması bu etkinin embriyodan salınan faktörler ile oluştuğunu göstermektedir. Wnt2'nin plasentasyonda rol oynadığı düşünülürse, bu çalışmada araştırılan gebelik günlerinde henüz plasentasyon başlamamıştır. Bu genin baskılanmasının, embriyo henüz kapsül yapısında olduğu için, endometriumda erken bir plasentasyon oluşumunu engellediği düşünülebilir.

Sunulan çalışmada; siklus esnasında progesteron miktarının yüksek olduğu diöstrus döneminde Wnt2b'nin ekspresyonu arttığı ve luteolizis sonrası östrojen etkisi altında baskılandığı gözlenmiştir. Gebelikte ise Wnt2b ovulasyon gününe göre kıyaslandığında gebeliğin 15. gününde artmıştır. Wnt2b proteininin de canonical sinyal iletim sistemini kullandığı, koyun embriyosunun trofektoderm katmanında (Hayashi ve ark 2007) ve fare embriyosunda 6,5. günden sonra (Kemp ve ark 2005) miktarının arttığı bildirilmiştir. Neonatal koyun uterusunda ise Wnt2b'nin stromada eksprese olduğu, eksojen östrojen uygulamasına bağlı olarak miktarının azaldığı bildirilmiştir (Hayashi ve Spencer 2006). Elde edilen verilere bakıldığında Wnt2b'nin progesteron etkisi altındaki

uterusta artması nedeniyle bu genin hem diöstrusta hem de gebelikte endometrial fonksiyonları düzenlenmesinde rol oynadığı söylenebilir.

Wnt4 geninin hem canonical hem de non-canonical sinyal iletim sistemlerini kullandığını ifade eden çalışmalar Wnt4'ün sinyal iletim sistemi içerisindeki rolünü anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Miyakoshi ve ark 2008). İnsanlarda meme bezlerinin gelişimi aşamasında Wnt4'ün rol oynadığı bilinmektedir (Heikkila ve ark 2001). Ayrıca Wnt4'ün cinsiyete özgün reprodüktif organların gelişim içinde gerekli olduğu gösterilmiştir (Vainoi ve ark 1999). Wnt4'ün fare uterusunda implantasyon öncesi ve sonrası günlerde ekspresyonunda meydana gelen değişikler bu genin farelerde implantasyonda rolünün olduğuna işaret etmektedir (Hayashi ve ark 2009). Wnt4'ün desidüalizasyon aşamasında stromal hücre proliferasyonunu uyardığı bildirilmiştir (Dey 1996). Daikoku ve ark (2004) farelerde imlantasyon döneminde Wnt4'ün endometrial prolifesyonda rol oynadığı bildirmektedirler. Yine Hayashi ve ark (2009) Wnt4'ün östrojen uygulanan overektomize ratlarda ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmektedirler. Ayrıca siklus içerisinde ratlarda Wnt4 ekspresyonu diöstrus döneminde miktar olarak tespit edilemez ölçüde az iken, östrus esnasında östrojen etkisi ile Wnt4 artmasını östrojenin Wnt4'ü düzenlediği şeklinde yorumlanmıştır (Miller ve ark 1998). Sunulan çalışmada da benzer bir şekilde Wnt4 geninin ekspresyonu östrus siklusu içerisinde sadece östrojenin etkili olduğu luteolizis sonrası östrus döneminde artmıştır. Bu dönem östrojen etkisi ile proliferasyonun uyarıldığı zaman olarak değerlendirilirse Wnt4'ünde kısraklarda endometrial proliferasyonda rol oynadığına işaret etmektedir. Wnt4 ayrıca geç diöstrus dönemi ile kıyaslandığında erken gebelikte de artış göstermiştir ($p<0.06$). Bu durum; embriyonun erken gebelikte östrojen salgıladığı da dikkate alındığında uterusta embriyoya bağlı endometrial Wnt4 ekspresyonunun uyarılarak erken gebelik süresince implantasyon şekillenene kadar embriyonun ihtiyacı olan besin maddelerinin sağlanabilmesi için endometrial proliferasyonu düzenlediği sonucunu çıkarmaktadır.

Sunulan çalışmada; Wnt5a ekpsresyonu hem diöstrus döneminde hem de gebeliğin 15 ve 18. günlerinde 0. gün ile kıyaslandığında önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca

luteolizis sonrası östrus dönemi ile gebeliğin 18. günü kıyaslandığında Wnt5a'nın gebelerde yüksek olduğu gözlenmiştir. Non-canonical sinyal iletim sistemini kullanan Wnt5a'nın insanlarda mezenşim ve endometrial hücreleri arasında etkileşimin düzenlenmesinde önemli rolleri vardır (Merisckay ve ark 2004). Genital tüberkülün şekillenmesinde de rol oynadığı bildirilmiştir (Heikkila ve ark 2001). Tulac ve ark (2003) insanlarda bu genin siklusun fazlarına bağlı olarak değişiklik göstermediğini vurgulamaktadılar. Farelerde ise Wnt5a'nın diöstrus döneminde uterusun hem stromasında hem de epitel hücrelerinde ekspresyonu tespit edilmiş ve özellikle östrojen seviyesinin yüksek olduğu zaman ise Wnt5a'yı uterus epitelinde baskıladığı sanılmaktadır (Miller ve ark 1998). Fare embriyosunda implantasyon sonrası dönemde miktarının önemli ölçüde artmış olduğu gözlenirken (Kemp ve ark 2005), pre-implantasyon periyodu esnasında koyun embriyolarında Wnt5a'nın ekspresyonu tespit edilememiştir (Hayashi ve ark 2007). Ayrıca koyunlarda trofektoderm göçünün non-canonical Wnt genleri tarafından belirlendiği bildirilmiştir. Wnt5a'nın embriyonik kök hücrelerinde endotelial farklılaşmayı uyardığı bildirilmektedir (Yang ve ark 2009). Catalano ve ark (2007) progesteron etkisi altında bulunan kadınlara progesteron reseptör inhibitörü mifepristone uygulayarak progesteronu etkisini engellemişler ve Wnt5a'ın endometriumda miktarının arttığını bildirmişlerdir. Bu artışı mestrual siklus içerisinde mezenşim epitel ilişkisi ile endometrial epitelin yenilenmesine bağlamışlardır. Kiewizs ve ark (2008) kısraklar gibi gebeliğin erken döneminde östrojen salgılayan domuzlarda Wnt5a ekspresyonunu 9.gün ile kıyaslandığında 12. günde önemli ölçüde azaldığını 15–16. günde ise tekrardan arttığının göstermişlerdir. Kısrak endometriumda progesteron etkisi ile siklus süresince ve gebelikte artan Wnt5a'nın embriyonun büyüyüp gelişebilmesi için uterusta gerekli proliferatif ve sekretorik fonksiyonları düzenlediği düşünülmektedir.

Wnt5b'nin koyun endometriumda gebeliğin 10 ile 20. günleri arasında luminal epitelin altındaki stratum kompaktum tabakasında miktarının fazla olduğu, fakat endometrial epitelde minimal düzeyde de olsa varlığı gösterilmiştir (Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada; Wnt5b en yüksek miktarda ovulasyon gününde saptanmış, hem gebelik hem de siklusun diğer günleri boyunca baskılanmıştır. 0. günde östrojen

seviyesinin azaldığı ve progesteron seviyesinin artmaya başladığı gözönünde tutlması gereken önemli bir noktadır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde Wnt5b'nin hem yüksek progesteron hem de yüksek östrojen etkisi altında iken baskılandığı sonucunu çıkarmaktadır.

Wnt7a'nın reprodüktif kanalın anterior-posterior aksis oluşumunun yanı sıra uterus düz kasları ve uterus fonksiyonlarının devamlığı için gerekli olduğu bildirilmesine rağmen yetişkin uterusundaki rolü tam olarak belli değildir (Sassoon 1999) Ayrıca embiyonal hayatta Wnt7a mutasyonlarına bağlı olarak müllerian kanalın başkalaşmasında anomaliler şekillendiği bildirilmektedir (Miller ve ark 1998). Wnt7a'nın Wnt/ß-catenin yolunu aktive ettiği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Logan ve Nusse 2004). Son yıllarda endometriozis olgularında Wnt7a ekspresyonunun arttığının gösterilmesi insanlarda bu genin uterus patoloji ile de ilişkilendirilmesine neden olmuştur (Gaetje ve ark 2007). Farelerde embriyonal hayatta uterus bezlerinin gelişimi ve implantasyon döneminde ise implantasyon şekillenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Miller ve ark 1998, Hayashi ve ark 2009). Wnt7a knock-out farelerde uterus fonksiyonları için önemli olan HOXA10 ve HOXA11 genlerinde fonksiyon kaybı meydana gelmiştir (Miller ve Sassoon 1998). Birçok türde luminal epitelden salgılandığı ve stroma hücrelerini parankim olarak etkilediği bilinmektedir (Miller ve ark 1998, Tulac ve ark 2003, Kim ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007). Koyunlarda hem luminal epitelde hem de süperfisiyel glandular epitelde eksprese olduğu gösterilmiştir (Hayashi ve ark 2007). Miller ve ark (1998) siklik farelerde Wnt7a ekspresyonunun yüksek progesteron etkisi altındaki diöstrus döneminde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Oehler ve ark (2002) normal endometrial hücre kültüründe östrojen sonrası progesteron uygulamasının Wnt7a'nın ekspresyonunu arttırdığını bildirmektedirler. İnsanlarda ise siklusun sekretorik fazında Wnt7a ekspresyonu azalma eğilimindedir (Tulac ve ark 2003). Overiektomize ratlara uygulanan eksojen progesteronun Wnt7a ekspresyonunu önemli ölçüde azaltması progesteronun Wnt7a üzerine sitimüle edici etkisini gösteren yukarıdaki çalışmalar ile çelişmektedir. Ayrıca siklik koyunlarda Wnt7a ekspresyonu 10. günden sonra önemli ölçüde azalma göstermiştir (Kim ve ark 2003). Sunulan çalışmada; siklus içerisinde progesteronun etkili olduğu geç diöstrus

döneminde Wnt7a ekpsresyonunun önemli ölçüde baskılandığı gözlenmiştir. Bu durum kısrak uterusunda sistemik progesteronun Wnt7a ekspresyonu baskıladığına işaret etmektedir.

Gebe koyunlarda Wnt7a ekpresyonu gebeliğin 10. günde belirlenirken 12 ve 14. günde tespit edilemediği ve 16 günden sonra endometriumda önemli ölçüde artış gösterdiği bildirilmiştir. Siklik koyunlarda da IFN-τ'nun intra-uterin uygulaması endometriumda Wnt7a gen ekspresyonunu artırmaktadır (Kim ve ark 2003). Ayrıca recombinant koyun IFN-τ proteininin insan parental hücre kültüründe Wnt7a ekspresyonunu önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Gebeliğin 10. gününde IFN-τ salgısı olmadığı bilinmektedir (Bazer 1989). Fakat gebeliğin 16. gününden sonra IFN-τ salınımı ile paralel olarak Wnt7a ekpsresyonunun da artmaya başlaması ve 20. günde ise maksimum seviye ulaşması INF-tan'nun Wnt7a ekspresyonunu uyardığı şeklinde yorumlanabilir. Gebe kısrak uterusunda IFN-τ'nun tespit edilememiş olması ve de IFN-τ'nun tarafından uyarılan Mx proteinin sentezinde bir değişiklik olmaması IFN-τ'nun kısrak embriyosundan salgılanmadığına işaret etmektedir (Baker ve ark 1991, Hicks ve ark 2005). Kısraklarda olduğu gibi domuz embriyoları da östrojen salgılarlar (Kidder ve ark 1955). Kiewisz ve ark. (2008) erken gebelikte domuz endometriumunda Wnt7a ekspresyonunun 9. gün ile kıyaslandığında 12. günde baskılandığını göstermişlerdir. Sunulan çalışmada da bu çalışamaya paralel olarak Wnt7a ekspresyonun erken gebelik boyunca baskılandığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakılırsa hem gebelikte hem de siklusta Wnt7a'nın baskılanması bu etkinin sistemik progesteron ile oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca kısraklarda implantasyon dönemi diğer hayvan türleri ile kıyaslandığında oldukça geç olduğundan, Wnt7a gen ekspresyonunun, koyunlarda ve farelerde olduğu gibi, implantasyon döneminde araştırılması gerekmektedir. Eğer kısraklarda da benzer fonksiyonları varsa Wnt7a ekspresyonunun gebeliğin daha ileri dönemlerinde artabileceği söylenebilir.

Sunulan çalışmada kısrak endometriumunda Wnt8a'nın mRNA düzeyinde varlığı RT-PCR ile gözlenmiştir. Koyun ve insanda ise endometriumda Wnt8a varlığı gösterilmemiştir (Tulac ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007). Wnt8a, sinyalini nükleusa ß-

catenin üzerinden ulaştırmaktadır (Torres ve ark 1996). Wnt8a fare embriyosunda implantasyon sonrasında mRNA düzeyinde önemli ölçüde artış göstermiştir (Kemp ve ark 2005). Eksojen Wnt8a'nın kurbağa embriyolarında yine ß-catenin üzerinden yeni bir aksis şekillenmesini uyardığı da bilinmektedir (Sokol ve ark 1991). Meme kanser hücre kültüründe (MCF-7) östradiol ile uyarıma sonucunda Wnt8b regülasyonu artarken, Wnt8a östradioldan etkilenmemiştir (Saitoh ve ark 2002). Ekspresyon farklılıkları yönünden bakıldığında ise hem erken gebelik süresince hem de siklus boyunca ekspresyon miktarı değişmemiştir. Sadece geç diöstrus dönemi ile kıyaslandığında Wnt8a ekspresyonu 15. gündeki gebe kısraklarda baskılanmıştır. İki döneminde yüksek progesteron etkisi altında olduğu düşünülürse 15. gün gebelikte Wnt8a'daki baskılanmanın embriyo kaynaklı olduğu söylenebilir. Bu baskılanmanın erken gebelikte endometriumdaki rolünün anlaşılması yeni çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir.

Wnt9b'nin endometriumda ekspresyonu diğer türlerde henüz gösterilmemiştir (Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009). Fare embriyosunda ise eksprese olduğu saptanmıştır (Kemp ve ark 2005). Sunulan çalışmada at endometriumunda eksprese olduğu gözlenmiştir. Siklusta progerteron etkisi altındaki geç diöstrus döneminde Wnt9b'nin ekspresyonu artmıştır. Gebelik günleri ve karşılaştırılmalı siklus günlerinde ise ekspresyonunda farklılık gözlenmemiştir. Bu nedenle uterustaki fonksiyonu tam anlaşılamamıştır.

Wnt10b'nin ekspresyonu ile ilgili koyun ve fare endometriumunda herhangi bir veri mevcut değildir (Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009). Bui ve ark (1997) normal insan endometriumunda Wnt10b'yi tespit edemediklerini, sadece kanserli endometrial hücre kültüründe eksprese olduğu bildirmişlerdir. Fare embriyolarında ise blastosist aşamasında ekspresyonun yüksek olduğu gözlenmiştir (Kemp ve ark 2005). Ayrıca saç follikülündeki epitelyum hücrelerinin farklılaşmasında rolü olduğu bildirilmektedir (Ouji ve ark 2008). Sunulan çalışmada Wnt10b'de Wnt9b'de olduğu gibi sadece diöstrustaki kısraklarda östrus ile kıyaslandığında yüksek olduğu gözlenmiştir. Gebelik döneminde ise mRNA düzeyi bir farklılık göstermemesinden

dolayı bu genin de erken gebelik döneminde kısrak endometriumdaki ne gibi bir fonksiyonu olabileceği hakkında bir fikir ileri sürülememiştir.

Wnt11 proteini, hücre içerisinde Wnt5a'da olduğu gibi non-canonical sistemi kullanmaktadır (Miller ve ark 1999). Barsak epitel hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı ve hücre içi yapılanmasını ß-catenin'den bağımsız olarak düzenlediği bildirilmiştir (Ouko ve ark 2004). Uterus gelişimi üzerindeki fonksiyonları Wnt11 knock-out fareler yaşatılamadığından tam olarak bilinememektedir (Majumdar ve ark 2003). Dört günlük fare embriyolarında sistemik östrojenin etkisi ile miktarı artmaktadır (Mohamed ve ark 2004). Hayashi ve ark (2009) overiektomize ratlarda tek doz progesteronun endometriumda Wnt11'in mRNA düzeyini arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca, Wnt11 miktarı progesteron seviyesinin yüksek olduğu gebeliğin 4. gününde artmaktadır. Koyun endometrial bezlerinde pre-implantasyon periyodu esnasında Wnt11'in ekspresyonunun tespit edilmesi Wnt11 fonksiyonunun endometriumda parankim etki oluşturarak embriyonun uzamasını uyardığı şeklinde açıklanmıştır (Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada da Wnt11, progesteron etkisindeki diöstrus döneminde ve gebeliğin 15 ve 18. günlerinde ovulasyon gününe göre (0. gün) mRNA düzeyinde yüksek bulunmuştur. Progesteron etkisi altında miktarının artması bu genin endometriumun çeşitli katmanlarında proliferasyon ve sekresyonda görev alabileceğini düşündürmektedir. İmmunohistokimya veya in-situ hibridizasyon gibi yöntemler kullanılarak lokalizasyonun belirlenmesi ile Wnt 11'in endometrial bezler üzerine etkisi daha iyi açıklanabilecektir.

Sunulan çalışmada Wnt16 diöstrusta, östrusa oranla yüksek bulunmuştur. Gebelik günleri arasında ve luteolizis sonrası östrus dönemine göre gebeliğin 18. gününde Wnt16'nın mRNA düzeyindeki ekspresyonu artış eğilimindedir. Wnt16'nın implantasyon dönemindeki fare uterusunda luminal epitelin hemen altındaki stroma katında miktarının 4. günde artığı tespit edilmiş, ayrıca overiektomize farelerde progesteron diğer non-canonical Wnt'lerden Wnt11 ekspresyonunu arttırmasına rağmen Wnt16'yı baskılamıştır (Hayashi ve ark 2009). Elde edilen bu sonuçlar diğer non-canonical Wnt genleri gibi Wnt16'nın da endometriumda embriyonun yaşamını

sürdürebilmesi için gerekli düzenlemelerin yapılmasında görev aldığını düşündürmektedir.

Wnt proteinlerinin hücre yüzey reseptörü olan LRP5/6 proteinlerini bağlayarak canonical sinyal iletim sistemini engelleyen Dkk1'in, sistemik progesteron hormonu etkisi ile aktive olduğu bilinmektedir (Mao ve ark 2002, Tulac ve ark 2007). Tulac ve ark (2003) insan endometriumunda sekretorik fazda Dkk1'in miktarının önemli ölçüde arttığını bildirmektedirler. Gebe koyun endometriumunda gebeliğin 16 ile 20. günleri arasında uterus stromasında Dkk1 miktarının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Koyunlarda, erken gebelik süresince Dkk1'in trofoblastik hücrelerin uterus stromasına migrasyonunu sınırladığı sanılmaktadır (Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada insan ve koyun çalışmalarına (Tulac ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007) paralel olarak progesteron etkisi altında hem diöstrusta hem de erken gebelik boyunca Dkk1 önemli ölçüde artış göstermiştir. Araştırılan günlerde kısrak embriyosu henüz glikokaliks yapısındaki bir kapsül ile çevrili olduğundan bu günlerde trofoblast migrasyonu ile Dkk1 arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Ancak progesterona bağlı olarak çok önemli oranda artış gösteren ve bu düzeyini erken gebelik boyunca devam ettiren Dkk1 ekspresyonunun kısrak endometriumunda yukarıda bahsedilen fonksiyonu dışında ne tür bir görevinin olduğunun belirlenmesi Wnt sinyal iletiminin daha iyi anlaşılması için önem arz etmektedir.

SFRP ailesi yapısal olarak hücre yüzeyindeki FZD reseptörüne benzerlik gösterir. Fakat, hücre içi domaini olmadığından dolayı hücreler arası boşluktaki Wnt proteinleri bu SFRP reseptörleri ile bağlandığında hücre içine herhangi bir sinyal iletimi gerçekleştiremedikleri düşünülmektedir (Logan ve Nusse 2004). Farelerde SFRP2 reseptörü vasıtası ile özellikle implantasyonda rol oynayan Wnt/ß-catenin mekanizmasının inhibe edildiği ve implantasyonun önemli oranda engellendiği gözlenmiştir (Mohamed ve ark 2005). Menstürel siklus içerisinde insanlarda östrojenik etkisindeki proliferatif fazda frpHE'in ekspresyonunun önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (Tulac ve ark 2003). Koyunlarda ise neonatal dönem içerisinde bezlerden yoksun olan karunkular bölgelerde SFRP2 ekspresyonu artarak Wnt sinyalini

inhibe ettiği ve endometrial anjiogenezisi ve bezsel gelişimi sadece interkarunkular bölgeye sınırlandırdığı gözlenmiştir. Neonatal kuzulara östrojen uygulanması ise bu genin ekspresyonunu bezlerden yoksun olan karunkular hem de intrerkarunkular bölgelerde artırmıştır (Hayashi ve Spencer 2006). Yüksek östrojenik etki altındaki uterus leomiyom olgularında da SFRP1'in miktarının arttığı gözlenmiştir. Bu artışın SFRP1'nin bu kanser hücrelerinin proliferasyonundan çok apoptozislerini engelleyerek yayılmasını sağladığı sanılmaktadır (Fukuhara ve ark 2002). Sunulan çalışmada SFRP1 sistemik östrojenin etkili olduğu siklusun luteolizis sonrası östrus fazında önemli artış göstermiş ve progesteron etkisi altındaki tüm dönemlerde baskılanmıştır. Ancak erken gebelik günlerinde embriyonik östradiol'ün varlığına rağmen ekspresyon seviyesi artış göstermemiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında SFRP1'nin endometrial ekspresyon profili diğer türler ile benzer bulunmuştur ve bu genin uterustaki ekspresyonunun sistemik progesteron ve östrojen etkisi ile düzenlendiği söylenebilir.

Wif-1 proteini SFRP ailesinde olduğu gibi Wnt proteinlerini hücreler arası boşlukta yakalayarak hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşimi engellerler (Nusse ve Logan 2004). Aşırı miktarda salgılanması kurbağa embriyolarında somitlerin oluşumunu etkilerken, retinada rod üretimini Wnt4 aktivitesini engelleyerek inhibe eder (Hsieh ve ark 1999, Hunter ve ark 2004). Fare embriyolarında embriyonik hayatın 4–8,5. günleri arasında önemli ölçüde eksprese olduğu bildirilmektedir (Kemp ve ark 2005). İnsan, koyun, fare endometriumunda gebelik veya siklus içersindeki salgılanma profili ile ilgili bir bilgi mevcut değildir (Tulac ve ark 2003, Hayashi ve ark 2007, Hayashi ve ark 2009). RT-PZR ile embriyonun beyin, göz, akciğer gibi birçok dokusunda tespit edilebileceği bildirilmiştir. Beyindeki miktarı beyinin değişik bölgelerinde farklılık göstermektedir (Hunter ve ark 2004, Hu ve ark 2008). Sunulan çalışmada Wif-1'nin kısrak endometriumunda hem gebelikte hem de siklus süresinde ekspresyonu tespit edilmiştir. Wif-1, Dkk1'de olduğu gibi siklusun geç diöstrus döneminde önemli bir şekilde artmıştır. Gebelik günlerinde ise 0. güne kıyaslandığında 15 ve 18. günlerde ekspresyonu artış göstermiştir. Yüksek progesteron etkisi altında olan geç diöstrus döneminde ve gebeliğin 15. gününde miktarlarının farklılık göstermemesi bu genin ekspresyonunun embriyonik faktörlerden ziyade progesteron etkisi altında arttığını

ortaya koymaktadır. Ayrıca, Wif-1 kısrak endometriumunda Dkk1 ile benzer bir profil sergilemiştir.

Lef-1 geni nükleus içerinde canonical yolun aktive ettiği ß-catenin ile etkileşerek çeşitli gen ekspresyonlarını uyarmaktadır (Logan ve Nusse 2004). Gebe koyun endometrium epitelinde eksprese olduğu bilinmektedir (Hayashi ve ark 2007). Kısrak endometriumunda Lef-1 ekspresyonu östrus esnasında canonical yolu uyaran Wnt7a ile birlikte artış göstermiştir. Bu durum, Lef-1 ekspresyonunun canonical sinyal yolu iletim sisteminin aktivasyonu neticesinde arttığına işaret etmektedir. Gebeliğin 18. gününde luteolizis sonrası östrus dönemi ile kıyaslandığında Wnt7a ile birlikte önemli ölçüde azalma göstermesi bu hipotez ile örtüşmektedir.

Myc geninin Wnt'lerin aktive ettiği hedef genlerden olduğu gösterilmiştir. Myc geni bir trankripsiyon faktörü olup, DNA bağlanarak gene ekspresyonlarını düzenler (Nusse 2008a). Trofektoderm hücrelerinde Wnt7a ile Myc'nin mRNA düzeyinde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir (Hayashi ve ark 2007). Sunulan çalışmada ise Myc kısrak endometriumda siklus içerisinde Wnt7a'nın baskılandığı geç diöstrusta ekspresyonu artmıştır. Gebeliğin 15. günü ile geç diöstrus kıyaslandığında ise Myc geni gebelikte baskılanmıştır. Bu sonuçlar embriyonik faktörlerin Myc ekspresyonunun gebeliğin 15. gününde baskıladığına işaret etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; sunulan çalışmada Wnt gen ailesi, Wnt genlerinin antagonistleri ve bu gen ailesine ait sinyal iletim sisteminde rol oynayan faktörlerin kısrak endometriumda mRNA düzeyindeki ekspresyonları ilk defa RT-PZR ile belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada araştırılan dönemlerde ekspresyon farklılıkları Real-time RT-PZR kullanılarak gösterilmiştir. Wnt genlerinden Wnt1, Wnt3, Wnt6, Wnt7b, Wnt8b, Wnt14'ün ise kısrak uterusunda ekspresyonları saptanamamıştır. Wnt genlerinin değişik türlerde yetişkin uterusundaki fonksiyonlarını gösteren çalışma sayısı oldukça az olduğu için bazı Wnt genlerinin uterusta ne gibi fonksiyonlar üstlendiği konusunu tam anlamıyla tartışılamamıştır. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde bazı Wnt genlerinin siklus ve erken gebelik içerisindeki profili diğer türler ile benzerlik göstermiştir. Bazı Wnt genlerinin ise kimi türlerde ekspresyonlarının gösterilmesine rağmen kısrak endometriumda eksprese olmadığı, bazı Wnt genlerinin ise kimi türlerde ekspresyonu uterusta belirlenmemesine karşın kısrak endometriumunda eksprese olduğu gözlenmiştir. Siklus içerisinde bakıldığında canonical yolu aktive eden bazı genler ile birlikte non-canonical Wnt genlerinin ekspresyonu progesteron hormonu etkisi altındaki dönemde diğer günler ile kıyaslandığında yüksek bulunmuştur. Aynı dönem içerisinde canonical yolu inhibe eden Dkk1 geninin ekspresyonununda önemli ölçüde artış göz önüne alındığında diöstrusta endometriumumda proliferasyon ve sekresyon faaliyetlerini düzenlemekte Non-canonical Wnt genlerinin etkin olduğu söylenebilir. Erken gebelik süreci içerisinde bazı Wnt genlerinin ekspresyon profili yine progesteron hormonun etkisinde olan geç diöstrus dönemi ile benzerlik göstermiştir. Bu durum bu genlerin ekspresyonlarının embriyonik faktörlerden ziyade maternal progesteron ile düzenlendiği sonucunu çıkarmaktadır. Gebeliğin 15 ve 18. günleri ile karşılıklı kıyaslama günü olarak kabul edilen geç diöstrus ve luteolizis sonrası östrus ile kıyaslandığında gebeliğin bazı Wnt genlerinin ekspresyonunu arttırırken bazılarının ise ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür. Özellikle Wnt2, Wnt8a, Wnt4, Myc, MSX2'in endometriumdaki mRNA düzeyindeki değişimlerinin embriyonal kaynaklı faktörlerden olduğu sanılmaktadır. Ayrıca gebelik ve siklus günlerinde Non-canonical Wnt'ler ile bazı canonical Wnt'lerin

ekspresyon profilleri dikkate alındığında birbirilerini antagonize ettikleri söylenebilir. Siklus esnasında östrojen Wnt7a ekspresyonunu kısrak uterusunda önemli ölçüde arttırırken, embriyonik östrojenin Wnt7a üzerine böyle bir etkisi araştırılan gebelik günlerinde gözlenmemiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde başta embriyonun gelişip yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli endometriumda proliferasyon, farklılaşma, sekresyon gibi faaliyetlerinin yapılması ve endometriumun yapılandırılması için, diğer hayvan türlerinde olduğu gibi, maternal ve/veya embriyonik faktörler ile Wnt genlerinin hem siklus hem de erken gebelik içerisindeki ekspresyon profilinin düzenlediği söylenebilir. Wnt genlerinin endometrium üzerindeki fonksiyonlarının daha iyi anlaşılabilmesi için bu genlerin uterus katmanlarında nerede eksprese olduğunu gösteren daha ileri düzey çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6.ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTİSÜ

Siklik ve Erken Gebe Kısrak Endometriumlarında WNT (Wingless Types) Genlerinin Ekspresyonunun Araştırılması

Mehmet Osman ATLI

Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ/KONYA-2009

Wnt genlerinin bir çok türde reprodüktif olayların düzenlenmesinde önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. Fakat Wnt genleri kısrak endometriumunda henüz karakterize edilmemiştir.

Bu çalışmanın amacı siklik kısraklarda siklusun ovulasyon günü (0. gün) geç diöstrus ve luteolizis sonrası östrus ile birlikte gebeliğin 15., 18. ve 22. günlerinde Wnt sinyal iletim sistemine ait genlerin ekspresyon seviyelerinin mRNA düzeyinde belirlenmesidir. Bu amaç için yukarıda bahsedilen her bir gün için 4'er adet olacak şekilde reprodüktif yönden sağlıklı kısraklardan biyopsi örnekleri toplanmıştır. Siklusun günleri kan progesteron düzeyi ve ultrasonografi ile tespit edilmiştir. Ayrıca gebeliklerin teşhisinde de utrasonografiden yararlanılmıştır. Toplanan biyopsi örneklerinden total RNA izole edilerek RT reaksiyonu ile cDNA'ya çevrilmiştir. Kısrak endometriumda PZR ile 17 Wnt geni içinden Wnt2, Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b Wnt7a, Wnt8a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, Wnt sinyal iletim sistemi antagonistlerinden SFRP1, SFRP2, SFRP5, Dkk1, Dkk2, Wif-1, hücre yüzey reseptörü FZD6 ve LRP6, intrasitoplazmik kompanentlerden DVL-2, GSK3-beta, Beta-catenin, nükleer faktör Lef-1 ve Wnt genlerinin aktive ettiği Myc ile MSX2 genlerinin endometriumda siklik ve gebe günlerin tamamında ekspresyon tespit edildi. Real-time PZR ile bu genlerin siklik ve gebe günlerdeki ekspresyon farklılıkları araştırılmıştır. Normalize edilmiş data mixed model ANOVA kullanılarak analiz edildi ve gruplar arası farkların belirlenmesi için least significant difference test kullanıldı. Siklus günleri içerisinde Wnt2b, Wnt5a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, Dkk1, Wif-1 ve Myc genlerinin geç diöstrus döneminde miktarları önemli ölçüde artmıştır ($P<0,05$). Wnt7a ve SFRP1 geç diöstrus döneminde baskılanmıştır ($P<0,05$). Wnt5b ekspresyonu geç diöstus ve luteolizis sonrası östrusta ovulasyona göre azalmıştır ($P<0,05$). Wnt4 ve Lef-1 ise sadece luteolizis sonrası östrusta artmıştır ($P<0,05$). Erken gebelikte ovulasyon günü ile kıyaslandığından Wnt2, Wnt5b, Wnt7a ve SFRP1 gebelik günleri içerisinde baskılanmıştır ($P<0,05$). Non-canonical Wnt5a, Wnt11 ile antagonist Wif-1'in ekspresyonu gebeliğin 15. ve 18. günlerinde artmıştır ($P<0,05$). Wnt2b ise sadece gebeliğin 15. gününde artmıştır ($P<0,05$). Dkk1'in gebelik süresince ekspresyonu artmıştır ($P<0,05$). Wnt16 ise erken gebelik boyunca artış eğilimindedir ($P<0,09$). Siklusun geç diöstrus dönemi ile gebeliğin 15. günü kıyaslandığında, Wnt8a ($P<0,05$) ve Myc ($P<0,08$) gebeliğin 15. gününde baskılanmış, Wnt4'ün ekspresyonu artmıştır ($P<0,06$). Luteolizis sonrası östrus ile 18. gün gebelik kıyaslandığında Wnt7a, SFRP1, Lef -1 baskılanmış, Dkk1, Wif-1 ve MSX2 genleri ise aynı dönemde ekspresyonları artış göstermiştir ($P<0,05$). Aynı karşılaştırma günlerinde Wnt5a ve Wnt16 gebeliğin 18. gününde artış eğilimindedir ($P<0,09$).

Sonuç olarak; Wnt gen ailesi ve bunlara ait sinyal iletim sistemi kompanentleri ilk defa kısrak endometriumunda karakterize edilmiştir. Elde edilen verilere bakıldığında östrus esnasında bu genlerden bazılarının ekspresyonunun maternal hormonların etkisi ile değiştiği söylenebilir. Benzer bir şekilde erken gebeliğin bu genlerin ekspresyonunu düzenlediğinin gösterilmesi, Wnt genlerinin daha henüz uterus içerisine implante olmayan embriyonun büyüyüp gelişmesi için erken gebelik boyunca endometriumda proliferasyon ve sekresyon fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Wnt genleri; Endometrium; Kısrak

7. SUMMARY

T.C.
SELCUK UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Investigation on Expression of WNT (Wingless Type) Genes in the Endometrium of Cyclic and Early Pregnant Mare

Mehmet Osman ATLI

Department of Obstetrics and Gynaecology (Veterinary Science)

Ph.D. Dissertation /KONYA-2009

Wnt genes have important roles in reproductive events of many species. To our knowledge, there is no data concerning the Wnt family genes expression in equine endometrium.

The objective was to characterize Wnt genes in equine endometrium in different stages of estrous cycle and early pregnancy. Expression of Wnt genes and their steady state mRNA levels were evaluated from endometrial biopsy samples of reproductively sound mares on day of ovulation (d0, n=4), late diestrus (LD, n=4) and after luteolysis in estrus phase (AL, n=4) of the estrous cycle. The stages of estrous cycle were confirmed by plasma progesterone concentrations measured daily and ultrasound examinations. Also, on days 15 (P15), 18 (P18) and 22 (P22) of early pregnancy, biopsy samples were collected (n=4 for each day). Pregnancies were confirmed by ultrasonography. Total RNA was extracted and converted to cDNA by using Reverse Transcriptase reaction. PCR amplifications showed that out of 17 Wnt genes, Wnt2, Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt7a, Wnt8a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11 and Wnt16 were present in the endometrium in all stages of estrous cycle and pregnancy. Also, Wnt antagonists SFRP1, SFRP2, SFRP5, Dkk1, Dkk2, Wif-1, cell membrane receptors FZD6 and LRP6, cytoplasmic DVL-2, GSK3-beta, Beta-catenin, nuclear transcription factor Lef-1 and Wnt target genes Myc and MSX2 expressions were observed in both cyclic and early pregnant endometrium. Relative quantifications were made by Real time-PCR. A mixed model of ANOVA was fitted on the normalized data and least significant difference test was employed to determine significantly different groups. Wnt2b, Wnt5a, Wnt9b, Wnt10b, Wnt11, Wnt16, Dkk1, Wif-1 and Myc were upregulated in LD compared to d0 and AL ($P<0.05$). Wnt7a and SFRP1 expressions were downregulated in LD ($P<0.05$). Wnt5b expression was attenuated in both LD and AL compared to d0 ($P<0.05$). Wnt4 and Lef-1 expressions were only upregulated in AL compared to d0 and LD ($P<0.05$). In early pregnancy, Wnt2, Wnt5b, Wnt7a ve SFRP1 expression were downregulated compared to d0 ($P<0.05$). Non-canonical Wnt5a, Wnt11 and antagonist Wif-1 were upregulated on days P15 and P18 ($P<0.05$). Wnt2b only increased on day P15 ($P<0.05$). Pregnancy increased the amount of Dkk1 ($P<0.05$). During the early pregnancy, increase in Wnt16 expression was slightly significant ($P<0,09$). Compared to LD, Wnt8a ($P<0.05$) and Myc ($P<0.08$) decreased on P15, while Wnt4 was upregulated ($P<0.06$). When AL and P18 were compared, Wnt7a, SFRP1, Lef-1 expressions were downregulated while Dkk1, Wif-1 ve MSX2 were upregulated ($P<0.05$). Also, in the same comparison days, Wnt5a and Wnt16 tended to be upregulated on day P18 ($P<0.09$).

In conclusion, Wnt genes, their antagonists and their associated signal transduction components were, the first time, characterized in equine endometrium. Some of Wnt genes were regulated by the maternal hormones during the estrous cycle. Similarly, these genes also seem to be regulated during early pregnancy, therefore it can be suggested that regulation of some Wnt genes in endometrium may be mediating the endometrial proliferative and secretory functions to support the growth and nourishment of unattached embryo in uterus during early pregnancy.

Key Words: Wnt genes, Endometrium, Mare

8. KAYNAKLAR

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. EMBO J. 1997; 75:3797-804.

2. Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN. Re-establishment of oviductal patency and fertility in infertile mares. Anim Reprod Sci. 2006;94:242-3.

3. Allen WR. In maternal recognition of pregnancy In: Whelan J editor, Excerpta Medica, Amsterdam; 1979. p. 323-46.

4. Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. Reprod Dom Anim. 2001;36: 121-31.

5. Allen WR. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. Anim Reprod. 2005; 2:209-23.

6. Allen WR, Antzack DF. Reproduction and modern breeding technologies in the mare. In: Bowling AL, Ruvinsky A, editors, The Genetic of the Horse, Walingford, CABI Publishing, 2000, p. 307-42.

7. Atlı MO, Çetin H, Korkmaz Ö. Safkan arap kısraklarında östrüs ve ovulasyon günlerindeki endometrial ödem derecesi. Vet Bil Derg. 2005; 21:65-8.

8. Atlı MO, Ozsensoy Y, Guzeloglu A, Kurar E. At endometriumunda gen transkripsiyon analiz çalışmalarında beş farklı RNA izolasyon yönteminin karşılaştırılması. IV Veteriner Ulusal Biyokimya Kongresi, (Baskıda) 2-4 Temmuz 2009, İstanbul, Türkiye.

9. Aurich C, Budik S. Expression of enzymes involved in the synthesis of prostaglandins in early equine embryos. Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare, Abstract Book, p31-32, 13th–16th November 2004 Barbados, West Indies.

10. Baker CB, Adams MH, McDowell KJ. Lack of expression of alpha or omega interferons by the horse conceptus, J Reprod Fertil Suppl. 1991;44: 439–43.

11. Ball BA, Miller PG. Survival of equine embryos co-cultured with equine oviductal epithelium from the four- to eight-cell to the blastocyst stage after transfer to synchronous recipient mares, Therio. 1992;37:979-91.

12. Bartol FF, Wiley AA, Floyd JG, Ott TL, Bazer FW, Gray CA, Spencer TE. Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. J Reprod Fertil Suppl. 1999; 54:287-302.

13. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M. Secretion of Wnt ligands requires evi, a conserved transmembran protein. Cell. 2006;125: 523-33.

14. Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. Equine Vet J Suppl. 1997;25: 60-2.

15. Bazer FW, Thatcher WW. Theory of maternal recognition of pregnancy in swine based on estrogen controlled endocrine versus exocrine secretion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ by the uterine endometrium. Prostaglandins. 1977;14:397–401.

16. Bazer FW. Establishment of pregnancy in sheep and pigs. Reprod Fertil Dev. 1989;1:237-42.

17. Behrendt-Adam CY, Adams MH, Simpson KS, McDowell KJ. Oxytocin-neuropyhsin I mRNA abundance in equine uterine endometrium. Dom Anim Endoc. 1999;16:183-92.

18. Belenkaya TY, Han C, Standley HJ, Lin X, Houston DW, Heasman J. Pygopus encodes a nuclear protein essential for wingless/Wnt signaling. Development. 2002; 129: 4089-101.

19. Berg SL, Ginther OJ. Effect of estrogens on uterine tone and lifespan of the corpus luteum in mares. J Anim Sci. 1978;47:203–8.

20. Berglund LA, Sharp DC, Vernon MW, Thatcher WW. Effect of pregnancy and collection technique on prostaglandin F in the uterine lumen of Pony mares. J Reprod Fertil Suppl. 1982;32: 335-41.

21. Berridge MJ. Cell signaling pathways. Cell Signaling Biology, 2008; (cited 2008, Feb 10). Available form URL: http://www.cellsignallingbiology.org/

22. Betteridge KJ. Comparative aspects of equine embryonic development. Anim Reprod Sci. 2000;60-61: 691-702.

23. Betteridge KJ, Waelchli RO. Equine embryo encapsulation: ephemeral, essential and enigmatic. Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III, Abstract book: p59-61, 13th–16th November 2004 Barbados, West Indies.

24. Bienz M, Hamada F. Adenomatous polyposis coli proteins and cell adhesion. Curr Opin Cell Biol. 2004;16: 528-35.

25. Blanchard TL, Varner DD, Schumacher J. Manual of equine reproduction. Mosby-year Book, Inc, 1998.

26. Boerboom D, Brown KA, Vaillancount D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Dore M, Sirois J. Expression of key prostaglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. Biol Reprod. 2004;70:391-9.

27. Bollwein H, Braun J. Follicular dynamics after treatment with hCG for ovulation induction in mares. Tierarztl Prax . 1999;27:47-51.

28. Bui TD, Zhang L, Rees MC, Bicknell R, Harris AL. Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma. Br J Cancer. 1997;75:1131-6.

29. Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E. Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:2954-9.

30. Carmon KS, Loose DS. Secreted frizzled-related protein 4 regulates two Wnt7a signaling pathways and inhibits proliferation in endometrial cancer cells. Mol Cancer Res. 2008;6:1017-28.

31. Carson DD. Uterine sensing of the embryo. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102: 8397-8

32. Carta L, Sassoon D. Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth. Biol Reprod. 2004;71:444-54.

33. Catalano RD, Critchley HO, Heikinheimo O, Baird DT, Hapangama D, Sherwin JR, Charnock-Jones DS, Smith SK, Sharkey AM. Mifepristone induced progesterone withdrawal reveals novel regulatory pathways in human endometrium. Mol Hum Reprod. 2007;13:641-54.

34. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. Acta Biophys Sin. 2008;40:577-82.

35. Ching W, Nusse R. A dedicated Wnt sectetion factor. Cell. 2006;125:432-3.

36. Choi YH, Roasa LM, Love CC, Varner DD, Brisko SP, Hinrichs K. Blastocyst formation rates in vivo and in vitro of in vitro matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Biol Reprod. 2004;70: 1231-8.

37. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and diease. Cell. 2006;127:469-77.

38. Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. Development. 2007;134:3-12.

39. Coudreuse DY, Roël G, Betist MC, Destrée O, Korswagen HC. Wnt gradient formation requires retromer function in Wnt-producing cells. Science. 2006;312:921-4.

40. Daels PF, Hughes JP. The normal estrous cycle. In: Mckinnon AO, Voss JL, editors, Equine Reproduction, 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. p.121-33.

41. Daikoku T, Song H, Guo Y, Riesewijk A, Mosselman S, Das SK, Dey SK. Uterine Msx-1 and Wnt4 signaling becomes aberrant in mice with the loss of leukemia inhibitory factor or Hoxa-10: evidence for a novel cytokine-homeobox-Wnt signaling in implantation. Mol Endocrinol. 2004;18:1238-50.

42. Das SK, Tan J, Raja S, Halder J, Paria BC, Dey SK. Estrogen targets genes involved in protein precessing calcium homeostasis and ;Wnt signaling in the mouse uterus independent of estrogen receptor-α and –β. J Biol Chem. 2000;275:28834-42.

43. Denker HW. Structural dynamics and function of early embryonic coats. Cell Tiss Org. 2000;166:180-207.

44. Dey SK 1996 Implantation. In: Adashi EY, Rock JA, Rosenwaks Z, eds. Reproductive endocrinology surgery and technology. New York: Lippincott-Raven; 421–34.

45. Doig PA, Waelchli RO. Endometrial Biopsy. In: Mckinnon AO, Voss JL, editors, Equine Reproduction, 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1993. p.225-33.

46. Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acid Research. 1991:19: 4008.

47. Douglas RH, Ginther OJ. Concentration of prostaglandins F in uterine venous plasma of anesthetized mares during the estrous cycle and early pregnancy. Prostaglandins. 1976;11: 251-60.

48. Farrell, RE. RNA Methodologies,: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization, Elsevier Academic Press Inc., 3rd ed., USA, 2005.

49. Fazleabas AT, Kim JJ. Development. What makes an embryo stick? Science. 2003;299: 355-6.

50. Fehilly C, Willadsen W. Embryo manipulation in farm animals, In: Clarke JR. Editor. Oxford Review of Reproductive Biology. Clarendon; Press Oxford. 1986. p. 379-413.

51. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S. Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:1729-36.

52. Gaetje R, Holtrich U, Karn T, Cikrit E, Engels K, Rody A, Kaufmann M. Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. Fertil Steril. 2007;88:1534-40.

53. Gerstenberg C, Allen W R, Stewart F. Cell proliferation patterns in the equine endometrium throughout the non-pregnant reproductive cycle. J Reprod Fertil 1999a; 116:167-73.

54. Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. J Reprod Fertil. 1999b; 117:143-52.

55. Ginther OJ, First NL. Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. Am J Vet Res. 1971;32: 1687-91.

56. Ginther OJ. Equine Pregnancy: Physical Interactions Between the Uterus and Conceptus, 44th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. p.73-104. 15-20 July 1998 Baltimore, Maryland, USA.

57. Goff AK, Sirois J, Pontbriand D. Effect of oestradiol on oxytocin-stimulated prostaglandin $F_{2\alpha}$ release in mares. J Reprod Fertil. 1993;98: 107-12.

58. Groothis PG, Dassen HHN M, Romano A, Punyadeera C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. Hum Reprod. 2007;13:405-17.

59. Guzeloglu A, Bilby TR, Meikle A, Kamimura S, Kowalski A, Michel F, MacLaren LA, Thatcher WW. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: II. Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. J Dairy Sci. 2004;87:3268-79.

60. Guzeloglu A, Atli MO, Kurar E, Semacan A, Aslan S, Kayıs SA, Celik S. Estrogen Receptor (ER) α, ERβ and Progesterone Receptor (PR) Expression in Equine Endometrium during Estrous Cycle and Early Pregnancy. Proc. 13th Ann Conference European Society Dom Anim Reprod. 2009a, (Article in press), Glent, Belgium.

61. Guzeloglu A, Atli MO, Kurar E, Semacan A, Aslan S, Kayıs SA, Celik S. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. 42th Proc Society Study Reprod. 2009b (Article in press) Pensilvania, USA

62. Haneda S, Nagaoka K, Nambo, Kikuchi M, Nakano M, Matsuib M, Miyake M, Makelod Y, Imakawa K. Interleukin-1 receptor antagonist expression in the equine during pre-implantation period. Dom Anim Endoc (in press). 2009. DOI:10.1016/j.domaniend.2008.11.006

63. Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnancy mares. Reprod. 2005;130:241-5.

64. Hausmann G, Bazinger C, Basler K. Helping wntless take flight: how Wnt proteins are secreted. Nature. 2007;8: 331-6.

65. Hayashi K, Burghardt RC, Bazer FW, Spencer TE. WNTs in the ovine uterus: potential regulation of peri-implantation ovine conceptus development, Endocrinol. 2007;148:3496-506.

66. Hayashi K, Erikson DW, Tilford SA, Bany BM, Maclean JA, Rucker EB, Johnson GA, Spencer TE. Wnt genes in the mouse uterus: potential regulation of implantation. Biol Reprod (in press). 2009; DOI: 10.1095/biolreprod.108.075416

67. Hayashi K, Spencer TE. WNT pathways in the neonatal ovine uterus: Potential specification of endometrial gland morphogenesis SFRP2. Biol Reprod. 2006;74: 721-733.

68. Heikkila M, Peltoketo H, Vainio S.Wnts and the female reproductive system. J Exp Zool. 2001;290:616-23.

69. Henneke DR, Potter GD, Kreider JL. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency of mares. Therio.1984;21:897-909.

70. Hess A P, Nayak NR, Giudice LC. Oviduct and Endometrium: Cyclic Changes in the Primate Oviduct and Endometrium In Neill JM eds chief, Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Elsevier Academic Press Inc 3th ed, USA, 2006, p.337-382.

71. Hicks BA, Etter SJ Carnahan KG, Joyce MM, Assiri AA, Carling SJ, Kodali K, Johnson GA, Hansen TR, Mirando MA, Woods GL, Vanderwall DK, Ott TL. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. J Anim Sci. 2003;81: 1552–61.

72. Hou X, Tan Y, Li M, Dey SK, Das SK. Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. Mol Endocrinol. 2004;18: 3035-49.

73. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid I.B, Nathans J. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. Nature. 1999;398: 431–436.

74. Hsu W, Zeng, L, Costantini, R. Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. J Biol Chem. 1999;274: 3439-45.

75. Hu YA, Gu X, Liu J, Yang Y, Yan Y, Zhao C. Expression pattern of Wnt inhibitor factor 1(Wif1) during the development in mouse CNS. Gene Expr Patterns. 2008;8:515-22.

76. Hunter DD, Zhang M, Ferguson JW, Koch M, Brunken WJ. The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development. Mol Cell Neurosci. 2004;27:477-88.

77. Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. Axis determination in Xenopus involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. Curr. Biol. 1998;8: 591-4.

78. Johnson AL, Becker SE. Hormonal control of ovulation in the mare. Anim Reprod Sci. 1993;33: 209-26.

79. Kav K. Primer Research Version 1.0. 2007; (cited 2007, May 12). Available form URL: http://veteriner.selcuk.edu.tr/bolum/mikrobiyoloji/web/kav.htm

80. Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K. Differential expression patterns of Wnt and beta-catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17alpha-ethynyl estradiol. Toxicol Sci. 2006;91:419-30.

81. Katoh M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review). Oncol Rep. 2005;14:1583-8.

82. Kemp C, Willems E, Abdo S, Lambiv L, Leyns L. Expression of all Wnt genes and their secreted antagonists during mouse blastocyst and post-implantation development. Dev Dyn. 2005;233:1064-75.

83. Kennedy MW (2004) Uterocalin-provider of essential lipids and aminoacids to the pre-placentation equine conceptus. Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III HavemeyerFoundation Monograph Series No 16, Eds: Stout TAE, Wade JF. p53-56. 13th–16th November 2004 Barbados, West Indies.

84. Kenney RM, Doig PA. Equine endometrial biopsy. In Marrow DA ed, Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia. WB. Saunders Company, 2nd ed. 1986, p.723-729.

85. Kidder HE, Casida LE, Grummer RH. Some effects of estrogen injections on the estrual cycle of gilts, J Anim Sci. 1955;14: 470–4.

86. Kiewisz J, Kczmarek MM, Blitek A, Bodek G, Ziecik AJ. Expression profile of the Wnt5a, Wnt7a, Beta-catenin and E-Cadherin genes in the endometrium during peri-implantation period in pigs. Reprod Dom Anim. 2008;43:92.

87. Kim S, Choi Y, Bazer FW, Spencer TE. Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1. Endocrinology. 2003;144: 5203-14.

88. Kindahl H, Edqvist LE, Bane A and Grandstrom E The release of prostaglandin F_2 alpha as reflected by 15-keto-13,14-dihydroprostaglandin F_2 alpha in the peripheral circulation during normal luteolysis in heifers, Prostaglandins. 1976; 11: 871-8.

89. Kindahl H, Knudsen O, Madej A, Edqvist LE. Progesterone, prostaglandin F-2 alpha, PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in the mare, J Reprod Fertil Suppl. 1982;32: 353-9.

90. Kooistra LH, Ginther OJ. Termination of pseudopregnancy by administration of prostaglandin F2 alpha and termination of early pregnancy by administration of prostaglandin F2 alpha or colchicine or by removal of embryo in mares, Am J Vet Res. 1976;37: 35-9.

91. Levay-Young BK, Navre M. Growth and developmental regulation of wnt-2 (irp) gene in mesenchymal cells of fetal lung. Am J Physiol. 1992;262:L672-83.

92. Lin X. Wnt Signaling and Transcriptional Regulation. In Gen Expression and Regulation. Ed. Ma J. Springer Higher Education Press, China, 2006. p. 519-532.

93. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg, GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. Cell. 2002;108: 837-47.

94. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. Ann Rev Cell Dev Biol. 2004;20: 781-810.

95. Ma W, Song H, Das SK, Paria BC, Dey SK. Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100: 2963-8.

96. Majumdar A, Vainio S, Kispert A, McMahon J, McMahon AP. Wnt11 and Ret/Gdnf pathways cooperate in regulating ureteric branching during metanephric kidney development. Development. 2003;130:3175–85.

97. Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling. Nature. 2002;417:664-7.

98. McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event, Physiol Rev. 1999;79: 263-324.

99. McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W. Comparison of progesterone and progesterone + oestrogen on total and specific uterine proteins in pony mares. Reprod Fert Suppl. 1987;35: 335-42

100. McDowell KJ, Sharp DC, Grubaugh W, Thatcher WW, Wilcox CJ. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares, Biol Reprod. 1988;39: 340–8.

101. McDowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS. Changes in equine endometrial oestrogen receptor alpha and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids, J Reprod Fertil. 1999;117: 135-42.

102. McKay RM, Peters JM, Graff JM. The casein kinase I family in Wnt signaling. Dev Biol. 2001;235: 388-96.

103. Mericskay M, Kitajewski J, Sassoon D. Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. Development. 2004;13:2061-72.

104. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. Oncogene. 2006;25: 7461-8.

105. Miller C, Pavlova A, Sassoon DA. Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. Mech Dev. 1998;76: 91-9.

106. Miller C, Sassoon DA. Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. Development. 1998;125:3201-11.

107. Miller JR, Hocking A, Brown JD, Moon R. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/Beta-catenin and Wnt/Ca^{+2} pathways. Oncogene. 1999;18: 7860-72.

108. Miller KF, Berg SL, Sharp DC, Ginther OJ. Concentrations of circulating gonadotropins during various reproductive states in mares, Biol Reprod. 1980;22: 744-50.

109. Miyakoshi T, Takei M, Kajiya H, Egashira N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. Expression of Wnt4 in human pituitary adenomas regulates activation of the beta-catenin-independent pathway. Endocr Pathol. 2008;19:261-73.

110. Mohamed OA, Dufort D, Clarke HJ. Expression and estradiol regulation of Wnt genes in the mouse blastocyst identfy a candidate pathway for embryo-maternal signalng at implantation. Biol Reprod. 2004;71: 417-24.

111. Mohamed OA, Jonnaert M, Labelle-Dumais C, Kuroda, Clarke H. Uterine Wnt/Beta-catenin signaling is requried for implantation. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102: 8579-84.

112. Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH, Wainwright BJ. Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. Development. 1996;122:3343-53.

113. Nusse R. Wnt homepage. 2008a (cited 2008 Dec 16). Available from URL: http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html

114. Nusse R. Wnt singnaling and Stem cell control. Cell Res. 2008b;18: 523-7.

115. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. Cell Res 2005;15: 28-32.

116. Oehler MK, MacKenzie IZ, Wallwiener D, Bicknell R, Rees MC. Wnt-7a is upregulated by norethisterone in human endometrial epithelial cells: a possible mechanism by which progestogens reduce the risk of estrogen-induced endometrial neoplasia. Cancer Letter. 2002; 186: 75-81.

117. Oriol JG, Sharom FJ, Betteridge KJ. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule, J Reprod Fert. 1993;99: 653–64.

118. Ouji Y, Yoshikawa M, Moriya K, Nishiofuku M, Matsuda R, Ishizaka S. Wnt-10b, uniquely among Wnts, promotes epithelial differentiation and shaft growth. Biochem Biophys Res Commun. 2008;367:299-304

119. Ouko L, Ziegler TR, Gu LH, Eisenberg LM, Yang VW. Wnt11 signaling promotes proliferation, transformation, and migration of IEC6 intestinal epithelial cells. J Biol Chem. 2004;279:26707-15.

120. Paria BC, Lim H, Das SK, Reese J, Dey SK. Molecular signaling in uterine receptivity for implantation. Cell Dev Biol. 2000;11: 67-76.

121. Pascoe RR. Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. J Reprod Fertil Suppl. 1979; 27:299-305.

122. Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochim Biophys Acta. 1997;1332; 127-47.

123. Pollard JW. Regulation of polypeptide growth factor synthesis and growth factor-related gene expression in the rat and Mouse uterus before and after implantation. J Reprod Fert. 1990;88: 721-31.

124. Price MA. CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling. Gene Dev. 2006;20: 399-410.

125. Pu P, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, Wang G, Jiang H. Downregulation of Wnt2 and beta-catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. Cancer Gene Ther. 2009;16:351-61.

126. Quinn BA, Caswell DE, Lillie BN Waelchli RO, Betteridge KJ and Hayes MA. The GM2-activator protein is a major protein expressed by the encapsulated equine trophoblast, Anim Reprod Sci. 2006;94: 391-4.

127. Raeside JI, Christie HL, Renaud RL, Waelchli RO, Betteridge KJ. Estrogen metabolism in the equine conceptus and endometrium during early pregnancy in relation to estrogen concentrations in yolk-sac fluid, Biol Reprod. 2004;71: 1120-7.

128. Reya T, Clevers H. Wnt signaling in stem cell and cancer. Nature. 2005;434: 843-50.

129. Rider V, Isuzugawa K, Twarong M, Jones S, Cameron B, Imakawa K, Fang J. Progesterone initiates Wnt/Beta-catenin signaling but estradiol is required for nuclear activation and synchronous proliferation of rat uterine stromal cells. Endocrinology. 2006;191: 537-48.

130. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell. 1987;50: 649-57.

131. Saint-Dizier M, Chopineau M, Dupont J, Deals PF, Combarnous Y. Expression and binding activity of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptors in the primary corpus luteum during early pregnancy in the mare, Biol Reprod. 2003; 69: 1743-9.

132. Saitoh T, Mine T, Katoh M. Up-regulation of WNT8B mRNA in human gastric cancer. Int J Oncol. 2002:20;343-8.

133. Sakanaka C, Williams LT. Functional domains of axin. J. Biol. Chem. 1999;274: 14090-3.

134. Sassoon D. Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. Mol Cell Endoc. 1999;158: 1-5.

135. Satterfield MC, Song G, Hayashi K, Bazer FW, Spencer, TE. Progesterone regulation of the endometrial Wnt system in the ovine uterus. Reprod Fertil Dev. 2008;20:935-46.

136. Schambony A, Wedlich D. Wnt-5A/Ror2 regulates expression of XPAPC through an alternative non-canonical signaling pathway. Dev Cell. 2007;12: 779−92.

137. Sharp DC The early fetal life of the equine conceptus, Anim Reprod Sci. 2000; 60-61: 679-89.

138. Sharp DC, Thatcher MJ, Salute ME and Fuchs AR. Relationship between endometrial oxytocin receptors induced prostaglandin F2 alpha release during the oestrous cycle and early pregnancy in pony mares, J Reprod Fertil. 1997; 109, 137-44.

139. Shipley GL. An introduction to real time PCR. In Dorak MT, editor. Real Time PCR, New York; Taylor & Francis Group. 2007. p. 1-32.

140. Silva LA, Ginther OJ. An early endometrial vascular indicator of completed orientation of the embryo and the role of dorsal endometrial encroachment in mares, Biol Reprod. 2006;74: 337-43.

141. Sokol S, Christian JL, Moon RT, Melton DA. Injected Wnt RNA induces a complete body axis in Xenopus embryos. Cell. 1991;67:741-52.

142. Spencer TE, Bazer FW. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy, Front Biosci. 2002;7: 1879-98.

143. Spencer TE, Stagg AG, Ott TL, Johnson GA, Ramsey WS, Bazer FW. Differential effects of intrauterine and subcutaneous administration of recombinant ovine interferon tau on the endometrium of cyclic ewes, Biol Reprod. 1999;6: 464-70.

144. Stewart F, Charleston B, Crossett B, Barker PJ and Allen WR. A novel uterine protein that associates with the embryonic capsule in equids, J Reprod Fertil. 1995;105: 65-70.

145. Stout TAE. Maternal recognition of pregnancy in the mare, PhD thesis, University of Cambridge, UK, 1997.

146. Stout TAE, Lamming GE, Allen WR. Oxytocin admistration prolong luteal function in cyclic mares. J Reprod Fert. 1999;116: 315-20.

147. Stout TAE, Allen WR. Prostaglandins drive intrauterine migration of the equine conceptus, Reproduction. 2001a;121: 771-5.

148. Stout TAE, Allen WR. Oestrogens and pregnancy maintaince in the mare: for and against?. Pferdeheilkunde. 2001b:17;579-82.

149. Stout TAE, Allen WR. Prostaglandin E2 and F2 alpha production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushing recovered from early pregnant and dioestrous mares, Reproduction. 2002;123: 261-8.

150. Stout TAE, Rambags BPB, van Tol THA, Colenbranger B. Low molecular weight proteins secreted by the early equine conceptus, Proceedings of a Workshop on Maternal Recognition of Pregnancy in the Mare III HavemeyerFoundation Monograph Series No 16, Eds: Stout TAE, Wade JF. p. 50-52, 13th–16th November 2004 Barbados, West Indies.

151. Strutt D. Frizzled signaling and cell polarization in Drosophila and vertebrates. Development. 2003;130: 4501-13.

152. Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S. Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. Genes Dev. 2000;14: 1741–9.

153. Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, De Marais AA, McGrew LL, Moon RT. 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;1123–37.

154. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, Germeyer A, Lessey BA, Taylor RN, Suchanek E, Giudice LC. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. J Clin Endoc Metab. 2003;88: 3860-6.

155. Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC. Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91:1453-61.

156. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, Cumberledge S, Rubin JS. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. J Biol Chem. 2000;275: 4374-82.

157. Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature. 1999;397:405-9.

158. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative Wnt signaling is initiated by distinct receptors. Science Signal. 2008; 1:9.

159. Van Niekerk CH, Gerneke WH Persistence and parthenogenesis cleavage of tubal ova in the mare, Onderstepoort J Vet Res. 1966;33: 195-231.

160. Vanderwall DK. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability, Vet Clin North Am Eq Pract. 1996;12: 61-81.

161. Vanderwall DK, Woods GL, Weber JA, Lichtenwalner AB Corpus luteal function in non-pregnant mares following intrauterine administration of prostaglandin E2 or estradiol-17b. Therio. 1994;42: 1069–83.

162. Veeman MT, Alexrod JD, Moon R. A second canon: functions and mechanisms of Beta-catenin-independent Wnt signaling. Dev Cell. 2003;5: 367-77.

163. Vendrell JA, Magnino F, Danis E, Duchesne MJ, Pinloche S, Pons M, Birnbaum D, Nguyen C, Theillet C, Cohen PA. Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation. J Mol Endocrinol. 2004;32:397-414.

164. Vernon MW, Zavy MT, Asquith RL, Sharp DC Prostaglandin F2 alpha in the endometrium: steroid modulation and production capacities during the estrous cycle and early pregnancy, Biol Reprod. 1981;25: 581-9.

165. Wagner J, Lehmann L. Estrogens modulete the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells. Mol Nutr Food Res. 2006;50: 368-372.

166. Walters KW, Roser JF, Anderson GB. Maternal-conceptus signaling during early pregnancy in mares: oestrogen and insulin-like growth factor I. Reproduction. 2001;121: 331-8.

167. Wang X, Seed B. High-throughput primer and probe design. In Dorak MT, editor. Real Time PCR, New York; Taylor & Francis Group. 2007. p. 93-106.

168. Watson ED, Sertich PL Prostaglandin production by horse embryos and the effect of co-culture of embryos with endometrium from pregnant mares, J Reprod Fertil. 1989;8: 331-6.

169. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 hastens oviductal transport of equine embryos, Biol Reprod. 1991a; 45: 544-6.

170. Weber JA, Freeman DA, Vanderwall DK, Woods GL. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos, Biol Reprod. 1991b;45: 540-3.

171. Willert K, Nusse R. β-catenin: a key mediator of ,Wnt signaling. Curr Opin Genet Dev. 1998;8: 95-102.

172. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. Nature. 2003;423: 409-14.

173. Wilsher S, Kölling M, Allen WR. The effects estrogen during early pregnancy in the mare on serum progestagen and IGF-I levels and embryonic growth, Anim Reprod Sci. 2006;94: 381-2.

174. Yang DH, Yoon JY, Lee SH, Bryja V, Andersson ER, Arenas E, Kwon YG, Choi KY. Wnt5a is required for endothelial differentiation of embryonic stem cells and vascularization via pathways involving both Wnt/beta-catenin and protein kinase Calpha. Circ Res. 2009;104:372-9.

175. Yoshikawa S, McKinnon RD, Kokel M, Thomas JB. Wnt-mediated axon guidance via the Drosophila Derailed receptor. Nature. 2003, 422: 583−8.

176. Yost C, Farr GH Pierce SB, Ferkey DM, Chen MM, Kimelman D. GBP, an inhibitor of GSK-3, is implicated in Xenopus development and oncogenesis. Cell. 1998; 93: 1031–41.

177. Zavy JT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. J Reprod Fertil Suppl. 1979;27:403-11

9. EKLER

EK-A: Wnt Sistemine Ait Genlerin Primer Çiftleri

Gen		Primer 5'-3'	Gen bankası Erişim kodu	Baz Çifti	Endometriumda ekspresyonu
Wnt-1	Forward	aacgtagcctcttccacgaa	XM_001504141	247	Yok
	Reverse	aacctcggttgacgatcttg			
Wnt2	Forward	gtgtgacaatgtgccaggtc	NM_001114150	198	Var
	Reverse	cgactacttcggagcaggac			
Wnt2b	Forward	cgagagtgtcaacaccagtt	XM_001494990.	324	Var
	Reverse	atccttaagcctcttctcct			
Wnt3	Forward	ctcggctatgaacaagcaca	XM_001487899	198	Yok
	Reverse	gtgcttctccaccaccatct			
Wnt4	Forward	catgaacctccacaacaacg	XM_001501510	167	Var
	Reverse	cgccatcaaacttctccttc			
Wnt5a	Forward	ccttcgcccaggttgtaata	XM_001499658	262	Var
	Reverse	gaggtgttatccacggtgct			
Wnt5b	Forward	actgcagcactgtggacaac	XM_001489931	233	Var
	Reverse	gcggtagccatactccacat			
Wnt6	Forward	ccagatgatgggccttctaa	XM_001867424	218	Yok
	Reverse	aactggaactggcactctcg			
Wnt7a	Forward	ggggactatgaaccggaaag	XM_001489623	245	Var
	Reverse	cattgcggaactgaaactga			
Wnt7b	Forward	gcatacaagcagatgcagga	XM_001488532	177	Var
	Reverse	ctggtactggcactcgttga			
Wnt8a	Forward	tttgcttgggaacgctggaact	XM_001502601	154	Var
	Reverse	gtcacccatgctacagttcttggt			
Wnt8b	Forward	ggggattttgacaactgtgg	XM_001500014.	224	Yok
	Reverse	ttacacgtgcgtttcatggt			
Wnt9b	Forward	gagaggtttcaaggagacag	XM_001494855	181	Var
	Reverse	ggtgctgtacttgaggttg			
Wnt10b	Forward	gatacccacaaccgcaactc	XM_001504138	110	Var
	Reverse	gggtctcgctcacagaagtc			
Wnt11	Forward	gcgcctctctggaaatgaagtgta	XM_001495163	297	Var
	Reverse	tgttgcattgcctgtcctgtgt			
Wnt14	Forward	ctcccagtgatcccgtgtat	XM_001493167	245	Yok
	Reverse	aggaggacggagaaaaccat			
Wnt16	Forward	aaatgcgcaggagagaaaaa	XM_001917229	135	Var
	Reverse	tgcattctctgccttgtgtc			

Gen		Primer 5'-3'	Gen bankası Erişim kodu	Baz Çifti	Endometriumda ekspresyonu
SFRP1	Forward	agtacgactacgtgagcttccagt	XM_001910853	142	Var
	Reverse	ttgggcagcaccatcttcttgt			
SFRP2	Forward	gacctggacgaaaccatcc	AV592376	346	Var
	Reverse	tggtcttgctcttggtctcc			
SFRP5	Forward	tagagaatggggaacggaag	XM_001917053.1	226	Var
	Reverse	ttcttcttgtcccagcggta			
WIF-1	Forward	ctgtgtcactccgggtttct	XM_001490597	250	Var
	Reverse	tgagcagaggtctccttggt			
Dkk1	Forward	accttggatgggtactccagaaga	XM_001503294	137	Var
	Reverse	atcttggaccagaagtgtctggca			
Dkk2	Forward	gagatcgaaaccacggtcat	XM_001503589.	181	Var
	Reverse	gagatcgaaaccacggtcat			
FZD6	Forward	ttgttggcatctctgctgtc	XM_001494281.1	222	Var
	Reverse	ccatggatttggaaatgacc			
LRP6	Forward	ttgggctgattcagatctcc	NM_002336	532	Var
	Reverse	ctggaactgggactctgagc			
DVL-2	Forward	tttcactcttccccgaaatg	XM_001504764	185	Var
	Reverse	ccatgtctgtgtggatggag			
Beta-catenin	Forward	ggtgggctgcagaaaatggtt	NM_001904	567	Var
	Reverse	gatggcaggctcagtgatgtcttc			
GSK-3 Beta	Forward	agcgtgagactcgtgatcct	XM_001502467	171	Var
	Reverse	aaaagggggtagggaatcct			
Lef-1	Forward	gagatacccgccttctaccc	XM_001503026.1	281	Var
	Reverse	tgaggcttcacgtgcattag			
MSX2	Forward	tgcaagcagcatccatctac	XM_001502790	240	Var
	Reverse	ggtcgcttagggtggtgtaa			
Myc	Forward	cataaatgtctgccggtgtg	XM_001504412.1	183	Var
	Reverse	gagccgaagtagcattccag			
GAPDH	Forward	atcaccatcttccaggagcgaga	NM_002046.3	341	Var
	Reverse	gtcttcgggtggcagtgatgg			

10. ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Osman ATLI 1979 yılında ŞANLIUFRA'da doğdu. Harran Üniversitesi Veteriner Faültesinden 2001 yılında Veteriner Hekim ünvanı alarak mezun oldu. Aynı yıl, Harran Ünivesitenin Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji AD'da yüksek lisansa başlayıp, 2004 yılında Bilim Uzmanı olarak mezun oldu. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Jinekoloji AD 2005 yılında doktora eğitimine başladı. Halen aynı bölümde doktora eğitimine devam etmektedir.