

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOMETRİAL STROMAL HÜCRELERDE OVARYAN HORMONLAR İLE  
CKAP4 İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Kübra Simay AYDIN AKKURT

TIPTA UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA  
2023



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ENDOMETRİAL STROMAL HÜCRELERDE OVARYAN HORMONLAR İLE  
CKAP4 İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Kübra Simay AYDIN AKKURT

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. N. Dilara ZEYBEK

ANKARA  
2023

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim boyunca bilgisi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, akademik ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Prof. Dr. N. Dilara Zeybek'e,

Histoloji ve Embriyoloji uzmanı olma yolunda bilimsel donanımları, akademik nezaketleri, gerek lisans gerek lisans üstü öğrencilere yaklaşımları ile beni bu mesleğe ait hissettiren ve bana rol model olan Prof. Dr. Fevziye Figen Kaymaz ve Prof. Dr. Pergin Atilla'ya,

Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan, mesleki beceri ve yetkinliklerimde beni destekleyen Prof. Dr. Sevda Müftüoğlu, Prof. Dr. Petek Korkusuz, Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer ve Dr. Öğr. Üyesi Elif Karakoç'a,

Tez çalışmamda laboratuvar altyapısı ve malzeme temini için finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve TÜBİTAK'a,

Yollarımızın kesişmesinden büyük mutluluk duyduğum ve uzmanlıklarını alsalar dahi desteklerini esirgemeyen kıymetli arkadaşlarım Uzm. Dr. Deniz Ekin Erbaş, Uzm. Dr. Süleyman Erol, Uzm. Dr. Sefa Burak Çam ve Uzm. Dr. İlker Levent Erdem'e,

Eğitim ve tez süreçlerimizi birlikte tamamladığımız bana her daim destek olan Dr. Serkan Türel'i'ye ve Dr. Merve Ayan'a,

Beni bugünlere getiren, atmak istediğim her adımda koşulsuz şartsız yanımda olan, arkamda duran ve sevgilerini daima hissettiğim annem Songül Aydın, babam Mehmet Aydın, canım kardeşim Uzm. Ody. Simge Aydın'a,

Eğitim ve tez sürecim boyunca düştüğümde kaldıran, koştuğumda destek olan, sevincimi ve üzüntümü paylaşan biricik eşim Uzm. Dr. Gazi Akkurt'a,

Hayatın sürprizlerle dolu olduğu gerçeğini bu süreçte hayatıma dahil olarak yaşatan ve küçücük hali ile bana oldukça anlayışlı davranan canım kızım Mira Akkurt'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Kübra Simay Aydın Akkurt, Endometrial Stromal Hücrelerde Ovarian Hormonlar ile CKAP4 İlişkisinin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023.** Endometrial stromal hücreler menstrüel siklus ve desidualizasyonda ovarian hormonların etkisi ile değişikliklere uğramaktadır. Bu süreçlerdeki aksaklıklar; infertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları, preeklampsi gibi klinik sonuçlarla karşımıza çıkabilmektedir. CKAP4'ün endometrial stromal hücrelerde varlığı bilinmekle birlikte; ovarian hormon değişikliklerine verilen CKAP4 ekspresyon yanıtı ve desidualizasyon ile ilişkisi bilinmemektedir. Bu amaçla steroid hormonlar (Medroksiprogesteron asetat (MPA) ve 17- $\beta$ -östradiol (E2)) ve/veya cAMP ile uyarılan ve uyarılmayan stromal hücreler 6 grup (kontrol, E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP) oluşturularak 3, 6 ve 9 gün sonunda PRL düzeyi ELISA, CKAP4 immün reaktivitesi akım sitometri, sito-ELISA ve immünofloresan yöntemleri ile gösterilmiştir; CKAP4 ve PCNA ekspresyonu western blot yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. CKAP4'ün endometrial stromal hücrelerde hücre membranı, sitoplazma ve çekirdekte varlığı gösterilmiştir. E2 uygulaması CKAP4'ü sitoplazmada artırırken; MPA ve E2+MPA gruplarında sitoplazmada 6. günde pik 9. günde gerileme gözlenmiştir. Desidualizasyon oluşturulan gruplarda (cAMP, E2+MPA+cAMP) hem sitoplazmada hem de hücre membranında arttığı saptanan CKAP4 ekspresyonu, desidualizasyon ile sitoplazmada CKAP4 sentezinin ve hücre membranına transferinin arttığını göstermiştir. Sonuç olarak, CKAP4 ekspresyonunun steroid hormonlardan etkilendiği, desidualizasyonda CKAP4'ün arttığı gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Desidualizasyon, Endometrial stromal hücre, Progesteron, Östrojen, cAMP, CKAP4

**Destekleyen Kurum:** Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TSA-2020-18507), TÜBİTAK (123S378)

## ABSTRACT

**Kübra Simay Aydın Akkurt, Investigation of the Relationship between Ovarian Hormones and CKAP4 in Endometrial Stromal Cells, Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Histology and Embryology Residency Thesis, Ankara, 2023.** Endometrial stromal cells undergo changes in the menstrual cycle and decidualization with the effect of ovarian hormones. Disruptions in these processes may result in clinical outcomes such as infertility, recurrent pregnancy loss, and preeclampsia. Although the presence of CKAP4 in endometrial stromal cells is known; CKAP4 expression response to ovarian hormone changes and its relationship with decidualization is unknown. For this purpose, 6 groups (control, E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP) stimulated by Medroxyprogesterone acetate (MPA) and 17- $\beta$ -estradiol (E2)) and/or cAMP) was formed and at end of the 3, 6 and 9 days, the PRL level was demonstrated by ELISA, CKAP4 immunoreactivity by flow cytometry, cyto-ELISA, and immunofluorescence methods; CKAP4 and PCNA expressions were determined by western blot. The presence of CKAP4 in the cell membrane, cytoplasm, and nucleus was demonstrated in the endometrial stromal cells. While E2 stimulation increases CKAP4 in the cytoplasm, a peak on the 6th day and regression on the 9th day was observed in the MPA and E2+MPA groups. In decidualized groups (cAMP, E2+MPA+cAMP), increased CKAP4 expression both in the cytoplasm and cell membrane indicated increased synthesis of CKAP4 in cytoplasm and transfer to the cell membrane. In conclusion, it has been shown that CKAP4 expression is affected by steroid hormones, and CKAP4 increases in decidualization.

**Keywords:** Decidualization, Endometrial stromal cell, Progesterone, Estrogen, cAMP, CKAP4

**Supported by:** Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (TSA-2020-18507); TÜBİTAK (123S378)

## İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	iii
TEŞEKKÜR .....	iv
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	x
ŞEKİLLER .....	xii
TABLolar.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Uterus Histolojisi .....	5
2.2 Endometriyum.....	6
2.3 Menstrüel Siklus .....	8
2.3.1 Menstrüel Evre (1-5. günler arası).....	8
2.3.2 Proliferatif Evre (5-14. günler arası) .....	8
2.3.3 Sekretuar Evre (15-27. günler arası) .....	9
2.3.4 İskemik Evre (27- 28. günler) .....	9
2.4 Desidualizasyon .....	10
2.4.1 Desidualizasyonda Progesteron, Östrojen ve cAMP .....	12
2.5 <i>In vitro</i> Desidualizasyon.....	15
2.6 Akt Sinyal Yolağı.....	17
2.7 CKAP4 .....	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	24
3.1 Deney Tasarımı .....	24
3.2 Hücre Kültürü .....	26
3.2.1 hESC Hücre Hattı Kültürü .....	26
3.2.2 Kültür Hücrelerinin Pasajlanması ve Dondurulması .....	26
3.2.3. Kültür Hücrelerinin Sayılması.....	27
3.3 hESC'lerin Ovaryan Hormonlar ile indüksiyonu .....	28
3.3.1 Östrojen (E2) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması. 28	

3.3.2 Progesteron (MPA) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması .....	29
3.3.3 Östrojen ve Progesteron (E2+MPA) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması .....	29
3.3.4 cAMP İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması.....	29
3.3.5 Östrojen, Progesteron ve cAMP (E2+MPA+cAMP) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması .....	30
3.3.6 Kontrol Grubu Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması .....	30
3.4 Prolaktin ölçümü .....	31
3.4.1 Kullanılan Solüsyonların hazırlanması .....	31
3.4.2 Prolaktin Ölçümünde Kullanılan Protokol.....	32
3.5 Akım sitometri yöntemi ile CKAP4 Pozitif Hücre Yüzdesinin Ölçümü .....	32
3.5.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	32
3.5.2 Akım Sitometri İşaretleme Protokolü .....	33
3.6 Sito-ELISA yöntemi ile CKAP4 miktarının ölçümü.....	35
3.6.1 Solüsyonların hazırlanması .....	35
3.6.2 Sito-ELISA Yöntemi İçin Uygulanan Protokol .....	36
3.7 hESC hücre hattında İmmünofloresan İşaretleme Yöntemi Uygulanması.....	36
3.7.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması .....	36
3.7.2 İmmünofloresan İşaretleme Protokolü .....	37
3.8 Western Blot yöntemi ile CKAP4 ve PCNA Kantitatif Ölçümü.....	38
3.8.1 Western Blot Analizi için Protein İzolasyonu .....	38
3.8.2 BCA ile Protein Konsantrasyonu Belirleme.....	39
3.8.3 SDS-PAGE .....	40
3.9 İstatistiksel Analiz .....	41
4. BULGULAR.....	42
4.1 Ölümsüzleştirilmiş hESC Hücre Hattı Hücrelerinin Faz Kontrast Mikroskobu ile İncelenmesi.....	42
4.2 Hücre Süpernatantında Prolaktin ELISA Ölçümünün Değerlendirilmesi.....	53
4.3. CKAP4 Varlığının Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi .....	55
4.4 CKAP4 Miktarının Sito-ELISA Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	58
4.5 CKAP4 immünofloresan İşaretlenmesinin Değerlendirilmesi .....	61
4.6 CKAP4- PCNA Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi .	71



5. TARTIŞMA .....	75
6. SONUÇLAR .....	85
7. KAYNAKLAR .....	87

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>APF</b>	: Anti proliferatif faktör
<b>BSA</b>	: Sığır serum albümini
<b>C/EBPs</b>	: CCAAT güçlendirici bağlayıcı proteinler (CCAAT-enhancer-binding proteins)
<b>cAMP</b>	: 3',5'-siklik adenosin monofosfat
<b>CKAP4</b>	: Hücre iskeleti ilişkili protein 4
<b>CREB</b>	: cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP response element-binding protein)
<b>CX43</b>	: Konneksin 43
<b>CXCR6</b>	: C-X-C Motif Kemokin Reseptör 6
<b>DAB</b>	: Diamino benzidin
<b>Dkk</b>	: Dickkopf
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DPBS</b>	: Dulbecco'nun fosfatlı tampon solüsyonu
<b>E2</b>	: 17 $\beta$ -östradiol
<b>ECL</b>	: Geliştirilmiş kemilüminesans (Enhanced chemiluminescence)
<b>ECM</b>	: Ekstraselüler Matriks
<b>EPAC</b>	: Siklik adenosin monofosfat tarafından aktive edilen değişim proteini (Exchange protein activated by cyclic adenosine monophosphate)
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü
<b>ERE</b>	: Östrojen yanıt elemanı (Estrogen response element)
<b>ESC</b>	: Endometrial stromal hücre
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FOXO1</b>	: Forkhead box protein O1
<b>FSH</b>	: Folikül uyarıcı hormon
<b>GER</b>	: Granüllü Endoplazma Retikulumu
<b>GPCR</b>	: Gs protein bağlı reseptörler
<b>hESC</b>	: İnsan Endometrial stromal hücresi
<b>HSP</b>	: Isı şok proteinleri
<b>ICSI</b>	: İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu
<b>IGFBP1</b>	: insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1
<b>IUI</b>	: İntra uterin inseminasyon
<b>IVF</b>	: <i>In vitro</i> fertilizasyon
<b>LH</b>	: Luteinizan hormon
<b>MAPK</b>	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
<b>MDCK</b>	: Madin-Darby köpek böbrek (MDCK) epitel hücreleri (Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells)
<b>MPA</b>	: Medroksiprogesteron asetat
<b>PBS</b>	: Fosfat tampon solüsyonu
<b>PDE</b>	: Fosfodiesteraz
<b>PDE</b>	: fosfodiesteraz
<b>PDK1</b>	: Fosfoinositid bağımlı kinaz 1

<b>PFA</b>	: Paraformaldehit
<b>PGR</b>	: Progesteron reseptörü
<b>PGRMC1</b>	: Progesteron reseptör membran komponent-1
<b>PH</b>	: Plekstrin homolog
<b>PI3K</b>	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
<b>PIP2</b>	: Fosfatidilinositol-3,4-difosfat
<b>PIP3</b>	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
<b>PKA</b>	: Protein kinaz A
<b>PKB</b>	: Protein kinaz B
<b>PRL</b>	: Prolaktin
<b>PTGER4</b>	: Prostaglandin E2 reseptör 4
<b>PVDF</b>	: Polivinilidenflorit
<b>RRM2</b>	: Ribonükleosit-difosfat redüktaz alt birimi M2 (Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2)
<b>RTK</b>	: Reseptör tirozin kinaz
<b>SDS-PAGE</b>	: Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
<b>SP-A</b>	: Sürfaktan protein A
<b>TBS-T</b>	: Tris tamponlu solüsyon + Triton-X
<b>tPA</b>	: Doku plazminojen aktivatörü

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kadın genital organlarının şematik çizimi. ....	6
Şekil 2.2. Endometriyumun şematik çizimi. ....	7
Şekil 2.3. Menstrüel siklus süresince endometriyumda yaşanan morfolojik değişimler.....	10
Şekil 2.4. Östrojen, progesteron ve cAMP'nin endometrial stromal hücreler üzerine etkisi. ....	15
Şekil 2.5. AKT izoformları.. ....	18
Şekil 2.6. Akt sinyal yolağının şematik çizimi. ....	19
Şekil 2.7. CKAP4'ün hücrel fonksiyonları ve etkileşimleri.....	21
Şekil 3.1. Çalışmaya ait iş akışı şeması. ....	25
Şekil 4.1. hESC hücre hattına ait hücrelerinin faz kontrast mikrografları. ....	42
Şekil 4.2. Kontrol grubu hESC'lerin faz kontrast mikrografları.....	44
Şekil 4.3. Östrojen ile muamele edilmiş hESC (E2) grubunun faz kontrast mikrografları.....	45
Şekil 4.4. Progesteron ile muamele edilmiş hESC (MPA) grubunun faz kontrast mikrografları.....	47
Şekil 4.5. cAMP ile muamele edilmiş hESC (cAMP) grubunun faz kontrast mikrografları.....	49
Şekil 4.6. Östrojen ve progesteron ile muamele edilmiş hESC (E2 + MPA) grubunun faz kontrast mikrografları. ....	50
Şekil 4.7. Östrojen, progesteron ve cAMP ile muamele edilmiş hESC (E2+MPA+cAMP) grubunun faz kontrast mikrografları.....	52
Şekil 4.8. Deney gruplarında 3. güne ait PRL/total protein oranları.....	53
Şekil 4.9. Deney gruplarında 6. güne ait PRL/total protein oranları.....	54
Şekil 4.10. Deney gruplarında 9. güne ait PRL/total protein oranları.....	54
Şekil 4.11. Triton-X ile permeabilize edilmeyen hESC'lerde 6. güne ait kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında CKAP4 pozitif hücrelerin değerlendirilmesine ait grafikler. ....	56

Şekil 4.12. Triton-X ile permeabilize edilen hESC'lerde 6. güne ait kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında hücre içi ve hücre membranında CKAP4 pozitif hücrelerin değerlendirilmesine ait grafikler.....	57
Şekil 4.13. Kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarının 6.güne ait örneklerinde Triton-X uygulanmadan ve uygulanarak CKAP4 immün reaktivitesinin değerlendirilmesi. ....	58
Şekil 4.14. Deney grupların 3, 6 ve 9. günlerinde CKAP4 immün reaktivitesinin sito-ELISA yöntemi kullanılarak optik dansite ölçümü ile değerlendirilmesi.....	60
Şekil 4.15. Üç, 6 ve 9. günlerde deney gruplarında CKAP4 immün reaktivitesinin sito-ELISA yöntemi kullanılarak optik dansite ölçümü ile değerlendirilmesi.....	60
Şekil 4.16. Kontrol grubu hESC'lerin immünofloresan işaretlemesi. ....	61
Şekil 4.17. Kontrol grubu hESC'lerin CKAP4 immün floresan yoğunluğu.....	62
Şekil 4.18. E2 grubunun immünofloresan işaretlemesi .....	63
Şekil 4.19. E2 grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu .....	63
Şekil 4.20. MPA grubunun immünofloresan işaretlemesi. ....	64
Şekil 4.21. MPA grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu. ....	65
Şekil 4.22. cAMP grubunun immünofloresan işaretlemesi.....	66
Şekil 4.23. cAMP grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu. ....	66
Şekil 4.24. E2+MPA grubunun immünofloresan işaretlemesi. ....	67
Şekil 4.25. E2+MPA grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu. ....	68
Şekil 4.26. E2+MPA+cAMP grubunun immünofloresan işaretlemesi.....	69
Şekil 4.27. E2+MPA+cAMP grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.....	69
Şekil 4.28. Gruplar arası CKAP4 floresan yoğunluğu karşılaştırılması.....	70
Şekil 4.29. Üçüncü güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.....	71
Şekil 4.30. Altıncı güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.....	72
Şekil 4.31. Dokuzuncu güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.....	72

Şekil 4.32. Üçüncü güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları .....	73
Şekil 4.33. Altıncı güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları .....	74
Şekil 4.34. Dokuzuncu güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları .....	74

**TABLULAR**

Tablo 2.1. <i>İn vitro</i> Desidualizasyon Modelleri .....	17
Tablo 3.1. Deney grupları örneklem büyüklüğü.....	31
Tablo 3.2. Akım Sitometri İçin Oluşturulan Gruplar.....	34
Tablo 3.3. BSA protein standartları .....	40
Tablo 3.4. %10 Ayırıcı Jel ve %5 Toplayıcı Jel hazırlamak için kullanılan solüsyonlar	40

## 1. GİRİŞ

Uterus, endometriyum tabakası ile gebelik oluşumu ve sürdürülebilirliği açısından özellikli bir organdır. Endometriyum tabakasının ovaryan hormonlara sekonder uğradığı döngüsel değişikliklere menstrüel siklus adı verilir (1). Menstrüel siklus; menstrüel evre (1-5. gün), proliferatif evre (5-14. gün), sekretuar evre (15-27. gün) ve iskemik evre (27-28. gün) olmak üzere 4 evreden oluşmaktadır (2). Endometriyumda yüzeyi ve bezleri döşeyen epitel hücreleri yanı sıra stromada bulunan endometrial stromal hücreler (ESC) döngüsel süreçte önemli değişimlere uğramaktadır. Proliferatif evrede ESC'lerde mitotik aktivite hakimiyeti gözlenirken, progesteron hormonu etkisi ile erken sekretuar evrede proliferasyon; orta sekretuar evrede mitotik aktivitede azalma, endometriyum yeniden yapılanmasında yavaşlama ve desidualizasyon adı verilen çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişimler gözlenmektedir (2-4).

ESC'ler proliferatif fazda küçük sitoplazma ve uzun, girintili çekirdekler ile fibroblast benzeri bir görünüme sahiptir. Sekretuar evrenin ortalarında hücrelerde çekirdek yuvarlaklaşır, çekirdekçik sayısı artar, granüllü endoplazma retikulumu (GER) ve Golgi aparatının sisternaları dilate olur, sitoplazmada glikojen ve lipid damlacıkları birikir ve mitokondri sayısı artar. ESC'ler hücre iskeletin aktin flamanları yeniden düzenlenerek fibroblast benzeri görünümünden polihedral epiteloid fenotipe geçiş yapar (5,6). Spiral arterlerin çevresinde başlayan bu değişim otokrin ve parakrin yolların etkisi ile tüm stromaya yayılır (7). Oluşan desidualize ESC'ler, plasenta oluşumuna kadar olan süreçte blastosist için ana besin kaynağını oluşturmaktadır (8). Desidual değişimler her ne kadar implantasyonu desteklemekle ilişkili olsa da blastosist varlığından bağımsız olarak her ay gerçekleşmektedir (9). Bu morfolojik ve biyokimyasal değişimler neticesinde desidualize ESC'ler prolaktin (PRL), insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (IGFBP-1) ve ekstraselüler matriks (ECM) proteinlerini sekrete etmeye başlamaktadır (10). ESC'lerde morfolojik değişimin yanı sıra hem invazyon kabiliyetinde hem de migrasyonda artış gözlenmektedir (7,11). İnvazyon ve migrasyon kapasitelerindeki bu artış, desidualizasyon ve implantasyon



süreçlerinde endometrial dokunun yeniden şekillenmesini sağlamaktadır (12). ESC'lerin migrasyonunun insan üreme başarısı üzerinde etkili olabileceği öne sürülmektedir (11).

Progesteron sekretuar evrede ve desidualizasyon sürecinde esas rol oynayan lipofilik yapıda bir hormondur. Hücre zarından serbestçe geçen progesteron, progesteron reseptörüne (PGR) bağlanarak etki etmektedir (13). ESC'lerde progesteron ile PGR etkileşimi PRL ve IGFBP-1 ekspresyon yanıtı oluşturmaktadır (14). PGR'nin desidua spesifik genler üzerinde transkripsiyonel kontrol kazanması için eş zamanlı olarak 3',5'-siklik adenzin monofosfat (cAMP) yolunun aktivasyonu gerekmektedir (15). Östrojen de proliferatif evrede ve desidualizasyonda etkili bir diğer steroid yapılı hormondur ve overlerde oosit çevresini saran granüloza hücreleri tarafından üretilir (2). Östrojen ile östrojen reseptör (ER) etkileşimi sekretuar evrede PGR ekspresyonu artırmakta ve böylece progesteron etkisinin daha belirgin görülmesi sağlanmaktadır (16). cAMP, hücre dışı ligandların Gs protein bağlı reseptörlere (GPCR) bağlanması ile üretilen ve çok sayıda hücreyel yanıtı düzenleyen bir ikincil habercidir (17). Endometriumdaki cAMP seviyeleri özellikle sekretuar fazda daha yüksek saptanmaktadır (18). Hücre içi cAMP konsantrasyonunun yüksek seviyelerde tutulması desidualizasyon için önem arz etmektedir. Diğer hücre tiplerinden farklı olarak ESC'lerde Protein kinaz A (PKA)  $\alpha$  alt biriminin aşağı regülasyonu ile sürekli artan kinaz aktivitesi oluşturulmakta ve desidualizasyon sürecinin devamlılığı sağlanmaktadır (19).

ESC'lerin desidualizasyon süreci gebeliğin kurulması ve sürdürülebilmesi için ön koşullardan biridir. Desidualizasyondaki aksamalar klinikte karşımıza infertilite, implantasyon başarısızlıkları ve subfertilite gibi sonuçlarla çıkabilmektedir (20). Progesteron, östrojen ve cAMP'nin kombine uygulamaları ile desidualizasyonun *in vitro* koşullarda modellenmesi sürecin araştırılması için yaygın olarak tercih edilmektedir (21).

CKAP4 (Hücre iskeleti ilişkili protein 4), 602 amino asitten oluşan bir tip II transmembran proteindir (22). Çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayarak farklı görevler üstlenir (23). Palmitoilasyon mikrotübüller ile bağlanma, nükleer

lokalizasyon ve hücre membranına transport ile ilişkili iken; fosforillenmesi mikrotübül etkileşimi ile ilişkilidir ve mitoz sırasında arttığı bilinmektedir (24). Ek olarak, CKAP4'ün sülfasyona uğramasıyla potansiyel bir ligand-reseptör bağlanma bölgesi oluşturulmuş olur (25). CKAP4, GER'de sisterna morfolojisinin düzenlenmesinde görev almakta (26) ve GER'de bulunan nanodomainler ile etkileşerek periferik ER tübüllerindeki dinamikleri düzenlemektedir (27). GER'de lokalize iken sitoplazmik kısmı ile mikrotübülleri bağlayarak hücre içi organel dağılımlarını düzenlemekte ve otofajik bozulmayı baskılamaktadır (28). CKAP4'ün baskın lokalizasyonu GER'de olmasına rağmen, farklı hücre tiplerinin membranlarında reseptör olarak işlev gördüğü (29–31) ve bazı hücrelerde çekirdekte de lokalize olduğu gösterilmiştir (24,32–34). Aynı zamanda kanser hücrelerinde  $\alpha 5\beta 1$  integrinin geri dönüşümünü kısıtlayarak, hücre yapışma bölgelerini ve göçü koordine ettiği de kanıtlanmıştır (35). CKAP4 ekspresyonunun kadın genital sisteminde vajina, tuba uterina, serviks, endometriyum, plasenta ve overlerde mevcut olduğu bilinmektedir. Endometriyumda, glandüler hücrelerde yüksek, stromal hücrelerde orta düzeyde varlığı bildirilmiştir (36). Ancak ESC'lerin ovaryan hormon değişikliklerine verdiği CKAP4 ekspresyon yanıtı ve desidualizasyon süreci ile ilişkisi bilinmemektedir. Ayrıca bu süreçlerde ESC'lerde CKAP4'ün hücrenin farklı bölümlerindeki (hücre membranı, sitozol, nükleus) lokalizasyonu gösterilmemiştir.

**Çalışmanın amacı,** menstrüel siklus ve desidualizasyon sürecinde etkili ovaryan hormonların, insan ESC (hESC)'lerde, CKAP4 ekspresyonuna etkisinin belirlenmesidir. Bu amaçla hESC'lerde  $17\beta$ -östradiol (E2), medroksiprogesteron asetat (MPA) ve cAMP ile menstrüel siklusun farklı evre modelleri ve *in vitro* desidualizasyon oluşturularak, CKAP4 ekspresyonunun western blot ile kantitatif olarak saptanması ve hücredeki lokalizasyonunun belirlenmesi için akım sitometri, sito-ELISA ve immüno Floresan işaretleme yöntemleri kullanılması planlanmıştır.

**Çalışmanın hedefleri;**

- 1- hESC'lerin MPA, E2 ve cAMP uygulanarak desidualize edilmesi ve desidualizasyonun, ELISA yöntemi ile besiyerinde prolaktin miktarı ölçülerek değerlendirilmesi,

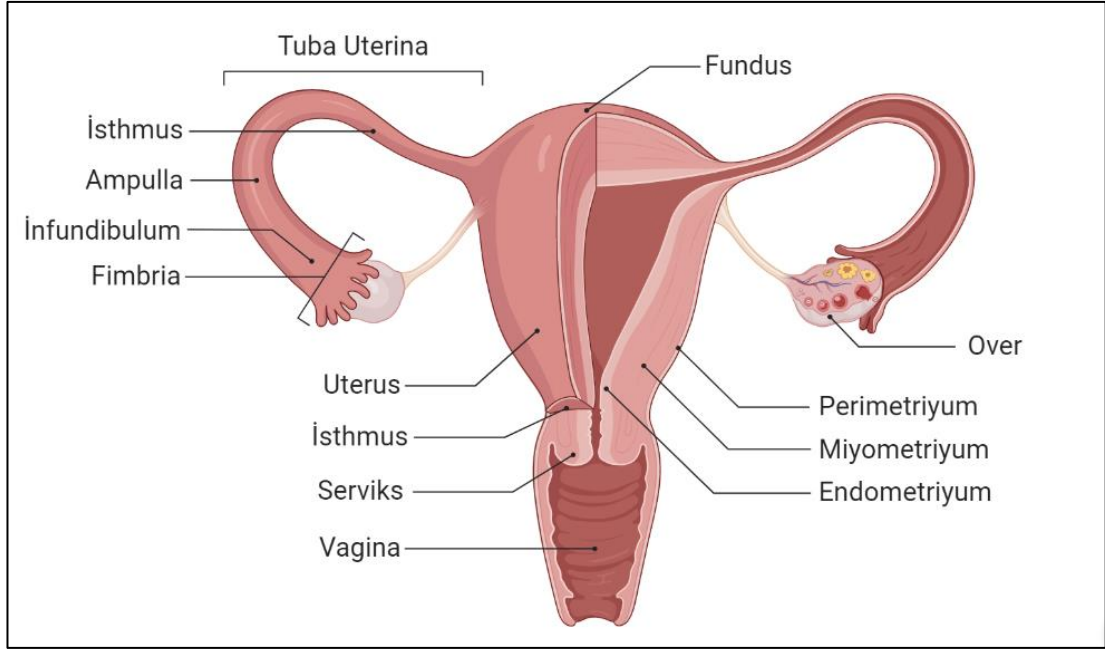
- 2- Desidualize olan ve olmayan gruplarda CKAP4'ün lokalizasyonunun akım sitometri, sito-ELISA ve immünofloresan yöntem kullanılarak gösterilmesi,
- 3- Desidualize olan ve olmayan gruplarda CKAP4 ekspresyonunun western blot yöntemi ile ölçülmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Uterus Histolojisi

Uterus, kadın genital sisteminde tuba uterina ve vajina arasında yer alan; 30-40 gr ağırlığında, yaklaşık 7,5 cm boya; 5 cm ene ve 2,5 cm kalınlığa sahip bir organdır. Anteriorda mesaneye, posteriorda rektuma komşuluğu bulunmaktadır. Anatomik olarak korpus uteri ve serviks olmak üzere iki ana bölümden oluşmaktadır. Korpus uteri; uterusun gövdesi olarak adlandırılan üstte bulunan geniş kısımdır. Fundus adı verilen bölüm üstte sağ ve sol yanlardan tuba uterinalar ile devam eder. Serviks; altta bulunan silindirik şeklindeki kısımdır. Serviks, korpus uteriden isthmus adı verilen bölüm ile ayrılır ve devamında vajina ile ilişkilidir (1).

Uterus duvarı histolojik olarak 3 tabakadan oluşur. Bu tabakalar lümenin dışarı doğru sırası ile; endometriyum (tunika mukoza), miyometriyum (tunika muskularis) ve perimetriyum (tunika seroza)'dur. Endometriyum; en içte bulunan, uterusun mukozası olarak adlandırılan tabakadır. Fonksiyonel ve bazal olmak üzere iki kısımdan oluşur. Üreme çağı boyunca her ay, uterusu embriyo implantasyonuna hazır hale getiren döngüsel değişikliklere uğrar. Miyometriyum; ortada bulunan 3 katmandan oluşan kalın düz kas tabakasıdır. İç ve dış katman uterusun uzun eksenine paralel kas demetleri içerirken, orta katman içerdiği kan damarları ve lenfatiklerden dolayı stratum vasculare adını alır ve buradaki kas demetlerinin halkasal yerleşimi ile diğer katmanlardan ayrılır. Miyometriyum tabakası, tuba uterina ve vajinanın kas tabakası ile devamlılık göstermektedir. Perimetriyum; uterusu dışardan saran seröz tabaka (tunika seroza) veya visseral periton tabakasıdır. İçte ince gevşek bağ dokusu üstte ise mezotel adı verilen tek katlı yassı epitelden oluşur. Pelvik ve abdominal periton ile devamlıdır. Periton uterusun arka yüzeyinin tamamını kaplarken, ön yüzeyinin bir kısmını kaplar, ön yüzeyinin geri kalan kısmı ise adventisya olarak adlandırılan bağ dokusundan oluşur (1) (**Şekil2.1.**).



**Şekil 2.1. Kadın genital organlarının şematik çizimi. Kadın genital sistemi overler, tuba uterinalar, uterus, serviks ve vajinayı içerir. Uterus en içte endometriyum, ortada miyometriyum ve en dışta perimetriyum tabakasından oluşmaktadır. (Bu şekil BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.)**

## 2.2 Endometriyum

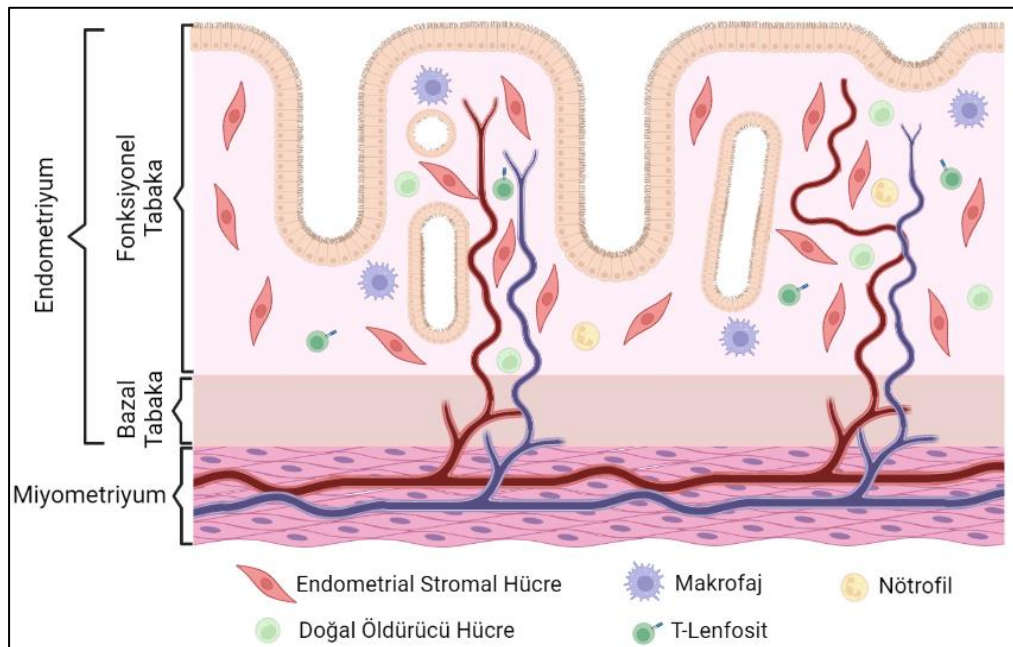
Endometriyum uterusun lümenine bakan yüzeyinde lokalize tabakadır. Yüzeyi tek katlı prizmatik biçimli sekretuar hücreler ile döşelidir. Bu hücreler silyum ve mikrovillus olarak farklı tipte apikal yüzey farklanmalarına sahiptir (37,38). Epitel hücreleri lateral yüzeylerde sıkı bağlantı birimleri ve desmozomlarla birbirine bağlanmışlardır. Hücre çekirdekleri oval ya da yuvarlak şekilde olup merkezi yerleşimlidir. Homojen kromatin dağılımına ve bir veya iki çekirdekçiğe sahiptir (39).

Epitelin altında gevşek bağ dokusu yapısına sahip lamina propria tabakası bulunur. Epitel hücreleri bu tabakaya doğru girintiler yaparak tübüler bezlerin oluşumunu sağlar. Endometrial bezler de silyumlu ve mikrovilluslu prizmatik hücreler ile döşelidir (39). Bu hücreler de luminal epitel hücrelerine benzer şekilde oval çekirdeğe, belirgin çekirdekçiklere, hücreler arası sıkı bağlantı birimleri ve desmozomlara sahiptir (40). Silyumlu ve mikrovilluslu hücre dağılımları menstrüel siklusun farklı dönemlerinde değişiklik göstermektedir.

Bez yapılarının arasında kalan bağ dokusu alanı; endometrial stroma olarak isimlendirilir. Damar yapıları, endometrial stromal hücreler (ESC), ekstraselüler

matriks ve immün sistem hücreleri endometrial stromanın bileşenleridir. Uterin arterden dallanan ve miyometriyum tabakasını besleyen arkuat arterler, radyal arter adını alarak endometriyum içine dağılır. Endometriyumun bazal tabakasında düz devam eden bu arterler fonksiyonel tabakada kıvrıntılı hal alarak spiral arterler olarak adlandırılmaktadır (41). Endometriyumda ESC'ler spiral arterlerin arasında stromaya yayılmış olarak bulunan oval şekilli ökromatik çekirdeğe ve belirgin bir çekirdekçiğe sahip hücrelerdir. Hücre içi organel dağılımı ve miktarları menstrüel siklus sürecinde farklılıklar göstermektedir (42). Tip 1, 3, 5, 6 kolajen, tenaskin ve fibronektin üretimi yaparak ekstraselüler matriks oluşumunu sağlamaktadır (43).

Üreme çağında endometriyum yapısal ve fonksiyonel olarak farklı iki tabaka içerir; 1- fonksiyonel tabaka, 2- bazal tabaka. Fonksiyonel tabaka, endometriyumun 2/3 üst kısmı ifade eder (41). Bu bölüm daha çok kan damarı ve hücresel bileşen içerirken, menstrüel siklus boyunca dejenere olup yenilenerek periyodik değişiklik gösterir. Bazal tabaka, 1/3 alt kısmı ifade eder. Uterus bezlerinin dallanmış son kısımlarını barındırır ve fibröz tipte bağ dokusu içerir. Doğumda ve menstrüasyonda korunarak fonksiyonel tabakanın yenilenmesini desteklemektedir (2,41) (**Şekil2.2.**).



**Şekil 2.2. Endometriyumun şematik çizimi.** Endometriyum, daha çok kan damarı ve hücresel komponent içeren fonksiyonel tabaka ve uterus bezlerinin dallanmış son kısımlarını ve fibröz tipte bağ dokusu içeren bazal tabakadan oluşmaktadır. (Bu şekil BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.)

### 2.3 Menstrüel Siklus

Endometriyumun fonksiyonel tabakası, overlerden salınan hormonlara yanıt olarak çeşitli döngüsel değişimler gösterir. Hipofiz ön lob hormonlarından olan Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH), overlerden östrojen ve progesteron salgılanmasını uyarır ve düzenler. Foliküllerin çevresini döşeyen granüloza hücreleri tarafından östrojen, ovulasyon sonrası oluşan korpus luteumdan ise progesteron salgılanmaktadır (41). Bu hormonlara sekonder gelişen endometriyum yanıtına menstrüel siklus adı verilmektedir. Menstrüel siklus 4 evreden oluşmaktadır; menstrüel evre (1-5. gün), proliferatif evre (5-14. gün), sekretuar evre (15-27. gün) ve iskemik evre (27-28. gün) (2) (**Şekil 2.3.**).

#### 2.3.1 Menstrüel Evre (1-5. günler arası)

Menstrüel evrenin ilk günü menstrüel döngünün başlangıcı olarak kabul edilir. İskemik fazı takiben fonksiyonel tabakanın yıkılan epitel ve stromal hücrelerinin, uterus bezlerinin salgıları, arteriyel ve venöz kan ile atılması sürecidir. Kanama evresi 4-5 gün süreyle devam eder ve her döngüde yaklaşık 35-40 ml kan kaybı meydana gelmektedir (41). Süreç sonunda endometrial kalınlık 1 mm civarında saptanır (2).

#### 2.3.2 Proliferatif Evre (5-14. günler arası)

Proliferatif evre, menstrüasyonun bitiminden itibaren devam eden 9 günlük süreci ifade eder. Olgunlaşan foliküllerden salınan östrojenin etkisi ile endometriyumun fonksiyonel tabakasının yeniden yapılandığı evredir (2). Endometriyumun bazal tabakasında bulunan uterus bezlerine ait epitel hücreleri bez yapılarının yeniden oluşumunu sağlarken, luminal yüzeyi döşemek için göç etmeye de başlarlar (44). Glandüler epitel hücreleri erken proliferatif fazda tek katlı prizmatik özellikteyken, geç proliferatif evrede yalancı çok katlı prizmatik epitel özelliği gösterir (45). Yeniden oluşturulan bez yapıları proliferatif evre sonunda dar bir lümen ve hafif kıvrıntılı yapıya sahiptir (2). Epitel hücrelerinin yanı sıra stromada bulunan ESC'ler ve endotel hücrelerinde de mitotik aktivite artışı görülmektedir (2). ESC sayısında artış beraberinde ECM yapımında artışı getirmektedir. ESC'ler erken proliferatif evrede daha yoğun çekirdeğe sahip iken, geç proliferatif evrede hücrelerde ökromatik

çekirdek ve artmış GER varlığı dikkat çeker (45). Endometrial stromada bazalde bulunan arterler de proliferatif evrede yüzeye doğru yeniden yapılanmaktadır (41).

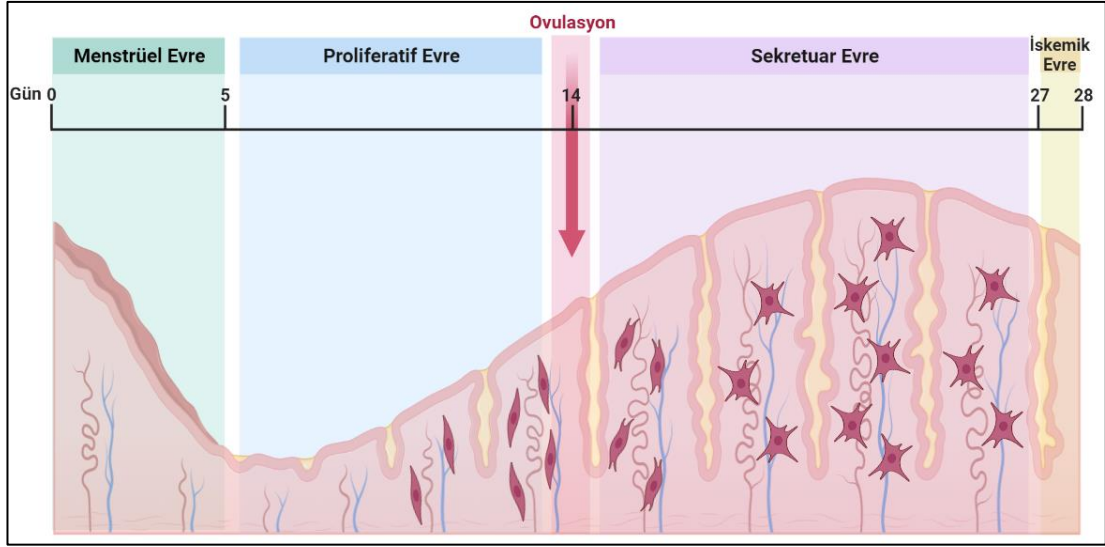
### **2.3.3 Sekretuar Evre (15-27. günler arası)**

Menstrüel siklusun 14. gününde LH pikinin ovulasyonu tetiklemesinin ardından sekretuar evre başlar. Gelişen korpus luteumdan salgılanan progesteron, sekretuar fazının esas hormonudur. Sekretuar evre; erken, orta ve geç olmak üzere 3 fazda incelenmektedir. Progesteron seviyesi erken sekretuar evrede yükselmeye başlarken, orta sekretuar evrede pik yapmakta ve geç sekretuar evrede düşmektedir (46,47). Yükselen progesteron ESC'lerin erken sekretuar evrede proliferere olmasını sağlarken (3); orta sekretuar evrede endometriyumdaki mitotik aktivite iyice azalır, yeniden yapılanma yavaşlar (4). Progesteron etkisi ile bez epitelinde glikojenden zengin sekresyon artışı başlar (48). Bez yapıları dilate olur, kıvrımlar belirgin hale gelir ve lümeni salgı ile dolar. Bu evre 12-13 gün kadar sürer ve endometriyum kalınlığı 7mm'yi bulur (2). Bu süreçte spiral arterler endometriyumun yüzeyine kadar uzar ve kıvrıntılı görünüme sahip olur. Spiral arterlerin çevresindeki ESC'lerde ise desidualizasyon adı verilen morfolojik ve metabolik değişimler başlar ve bu değişimler zamanla tüm stromaya yayılır. Endometrial bağ dokusundaki sıvı artışı ile birlikte bu evrede stroma ödemli bir görünüme sahip olur (41).

### **2.3.4 İskemik Evre (27- 28. günler)**

Gebelik gelişmemesi durumunda korpus luteum geriler ve östrojen, progesteron salgılanması azalır (2). Hormonal değişimlerin etkisi ile menstrüasyondan 2 gün önce spiral arterlerde aralıklı kontraksiyonlar oluşur ve normal kan akışında azalma meydana gelir. Kontraksiyonlar neticesinde dokuda, iskemiye sekonder hipoksi hakim olur. Süreç fonksiyonel tabakanın nekroza gitmesi ve devamında menstrüasyonun gerçekleşmesi ile devam eder (2,41).





**Şekil 2.3. Menstrüel siklus süresince endometriyumda yaşanan morfolojik değişimler.** Menstrüel siklus 4 evreden oluşmaktadır; (1) Fonksiyonel tabakanın yıkıldığı menstrual evre (1-5. gün), ovulasyona kadar fonksiyonel tabakanın yeniden yapılandırıldığı proliferatif evre (5-14. gün), mitotik aktivitenin sınırlandırıldığı ve ESC'lerin desidualize olduğu sekretuar evre (15-27. gün) ve gebelik gelişmemesi durumunda spiral arter kontraksiyonuna sekonder, fonksiyonel tabakada iskemi ve nekrozun görüldüğü iskemik evre (27-28. gün). (Bu şekil BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.)

#### 2.4 Desidualizasyon

Sekretuar evrenin ortalarında progesteron artışı, östrojen, cAMP ve lokal parakrin faktörlerin etkisi ile endometriyumun stromal kompartımanında meydana gelen değişikliklere desidualizasyon adı verilmektedir (49). Desidua terimi ilk kez Dr. William Potts Dewees'a ait "Diseases of Females" kitabında uterus kavitesinde gözlenen yumuşak süngerimsi yapı için kullanılmış; ölmek, düşmek veya ayrılmak anlamına gelen latince "decidere" fiilinden türetilmiştir. Desidualizasyon temelde embriyo implantasyonu ve plasentanın gelişimi için geçirilen bir süreç olsa da her menstrüel siklusta blastosist varlığından bağımsız gerçekleşmektedir. Sinsityotrofoblast invazyonu ve plasenta oluşumu sırasında artan progesteron seviyeleri ile desiduanın varlığı devam ettirilmektedir (9). Desidua, gelişen embriyo için besin sağlama, kontrolsüz trofoblast invazyonunu engelleme ve embriyoyu maternal rejeksiyondan koruma görevlerini üstlenmektedir (50,51). Gebelik gerçekleşmemesi durumunda ise progesteron seviyelerindeki ani düşüşü takiben

iskemik faz ve menstrüel kanama sonucu endometriyumun fonksiyonel tabakası dökülmektedir (2).

ESC'ler proliferatif fazda, küçük sitoplazma ve uzun, girintili çekirdekleri ile fibroblast benzeri bir görünüme sahiptir. Menstrüel siklusun 23. gününde, sekretuar fazda ESC'lerde morfolojik ve biyokimyasal farklılaşma ilk olarak spiral arterlerin çevresinde ESC'lerde başlar. Bu hücrelerde çekirdek yuvarlak bir hal alır, çekirdekçik sayısı artar, GER ve golgi aparatının sisternaları dilate olur ve sitoplazmada glikojen ve lipid damlacıkları birikir. Yüksek metabolik aktiviteye bağlı olarak da mitokondri sayısında artış görülmektedir (52). ESC'ler hücre iskeletin aktin flamanları yeniden düzenlenerek fibroblast benzeri görünümünden polihedral şekilli epitelooid fenotipe geçiş yapar (5,6). Değişim otokrin ve parakrin yolların etkisi ile tüm stromaya yayılır (7).

Desidua esas olarak şu şekilde büyür: (1) halihazırda farklılaşmış desidual hücre popülasyonunun periferinde yeni hücrelerin çoğalması ve farklılaşması (apozisyonel büyüme) ve (2) desidual hücrelerin farklılaşması sırasında hücre hacminde artış. Buna ek olarak, desidual hücreler polinükleer ve poliploid hale gelir ve hücre bölünmesi ve sitokinez tamamlanmadan tekrarlanan DNA replikasyon döngüleri ile elde edilen yüksek düzeyde DNA içeriği gösterir.

Oluşan bu desidualize ESC'ler, plasenta oluşumuna kadar olan süreçte blastosist için ana besin kaynağını oluşturmaktadır (53). ESC'ler geç sekretuar evrede, ECM içine doğru psödopodia benzeri uzantılar gönderirken, hücre içi fagozom ve lizozomların sayısı da artmaktadır (52). Bu değişimlere ek olarak adezyon (yapışma) kompleks proteini olan kadherin ailesi üyesi Cadherin-11, özellikle spiral arterleri çevreleyen ESC'lerde, desidualizasyon süreci ile artmakta ve komşu hücreler arasındaki homofilik etkileşimleri kolaylaştırmaktadır (54). Bu morfolojik ve biyokimyasal değişimler neticesinde desidualize ESC'ler PRL, IGFBP-1 ve ECM proteinlerini sekrete etmeye başlamaktadır (10). ECM elemanlarından tip I kolajen, tip III kolajen ve tip VI kolajen endometrial stroma içinde siklus boyunca yaygın şekilde bulunmaktadır. Desidualizasyon ile birlikte ECM; tip IV kolajen, laminin, fibronektin ve heparan sülfattan zengin bir yapı halini alır (55). Desidual hücreler

vimentin ve desmin için pozitif fakat sitokeratin için negatif işaretlenme göstermekte ve bu özellikleriyle epitel ve trofoblast hücrelerinden kolayca ayırt edilebilmektedir (56).

#### **2.4.1 Desidualizasyonda Progesteron, Östrojen ve cAMP**

Desidualizasyonu kontrol eden en önemli ve olmazsa olmaz mekanizma hormonal kontrol mekanizmasıdır. ESC'de meydana gelen morfolojik ve hücre içi değişimlerden sorumlu ana hormon progesteron iken, östrojen de süreçte progesterona destek olmaktadır (19). Östrojen ve progesteron etkileşimi ile özellikle sekretuar fazda yükselen cAMP seviyeleri desidualizasyon için önemlidir (18,19).

#### **Progesteron**

Progesteron lipofilik yapıda bir hormondur ve hücre zarından serbestçe geçebilmektedir. Hücredeki etkilerini PGR'e bağlanarak ve ya GPCR üzerinden göstermektedir (4,57,58). Hücre zarından geçen progesteron, sitoplazmik-nükleer reseptörlerden biri olan PGR'e bağlanarak etki etmektedir (13). Ligand bağlanmamış PGR, çok birimli bir kompleks halinde bulunmaktadır (59). Ligand bağlanması, PGR'de konformasyonel değişikliği tetiklemekte ve süreç hedef genlerin promotörlerine bağlanma ile sonuçlanmaktadır. Bu bağlanma ile hedef genlerin transkripsiyonu desteklenmekte ya da baskılanmaktadır (60). ESC'de progesteron ile PGR etkileşimi PRL ve IGFBP-1 ekspresyon yanıtı oluşturmaktadır (14). PGR'nin desidua spesifik genler üzerinde transkripsiyonel kontrol kazanması için eş zamanlı olarak cAMP yolunun aktivasyonu gerekmektedir (15).

PGR'nin, tek bir gende bulunan farklı promotörlerden türetilen 2 baskın izoformu bulunmaktadır; PGR-A ve PGR-B. PGR-B, PGR-A'dan farklı olarak, amino terminalinde fazladan 164 amino asit içermektedir (61). PGR-B ekspresyonu ESC'de proliferatif fazın ortasında pik yapıp sonrasında azalması ve buna ek olarak PGR-A ekspresyonunun sekretuar fazda ve gebelikte stromada yüksek olması, PGR-A'nın desidualizasyonda baskın izoform olarak adlandırılmasına yol açmaktadır (62,63). PGR-B ise ESC farklılaşmasında daha etkin rol oynamaktadır (64). PGR-A ve B'nin progesteron duyarlı hücrelerde farklı gen ağlarını yönettiği gösterilmiştir. Ligand

bağlanmış PGR-A esas olarak PGR-B'nin inhibitörü olarak görev almakla beraber IGFBP-1 ve PRL promotörlerinin daha güçlü transaktivatörüdür (14).

Progesteron aynı zamanda PGR'e bağlanarak, GPCR ile etki eden çeşitli maddelerle hücre içi cAMP seviyelerini artırmaktadır (65). Progesteronun, hücre membranındaki Progesteron reseptör membran komponent-1 (PGRMC1), progestin ve adipo Q gibi reseptörlere bağlanarak genomik olmayan yolu aktif hale getirdiği kabul edilmektedir (66,67). Bu reseptörlere ek PGR-B'nin de mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) yolağını aktifleştirerek genomik olmayan yola aracılık edebileceği gösterilmiştir (68) (**Şekil 2.4.**). Ayrıca progesteron etkisi ile sekretuar fazda ESC'de WNT sinyal yolağı inhibitörü olan Dickkopf'un (Dkk) da ekspresyonunun arttığı saptanmıştır ve böylece farklı sinyal yolları üzerinden de sürecin yönetildiği gösterilmiştir (69,70).

### **Östrojen**

Östrojen de bu süreçte etkili bir diğer steroid yapılı hormondur. Östron, östradiol ve östriol olmak üzere üç alt tipi mevcuttur. Östradiol en etkin alt tipi olup overlerde folikül çevresini saran granüloza hücreleri tarafından üretilir (2). Hücre canlılığı ve hayatta kalma, hücre proliferasyonunu düzenleme üzerine etkileri mevcuttur (71). Östrojen, bu etkilerini genomik ve genomik olmayan yollar üzerinden gösterir. ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$ 'a bağlanan östrojen farklı hücre tiplerine ve çevresel etkilere göre çeşitli gen ekspresyonlarını genomik yol üzerinden artırıp azaltmaktadır (72). Uterusta baskın olan reseptör tipi ER- $\alpha$  iken, overlerde ER- $\beta$  aracılı etkinin hakim olduğu belirtilmiştir (73). Östrojen-ER etkileşimi sonrasında çekirdeğe transfer ve östrojen yanıt elemanı (estrogen response element (ERE))'nin hedef genin promotör bölgesine bağlanması gerçekleşerek genomik yol aktive olur (74). Klasik genomik yolun yanı sıra protein-protein etkileşimi sonucu hücre içi sinyal yollarının (PKA, MAPK, fosfatidilinositol-3-kinaz (PI3K)-Akt yolağı) düzenlenmesi ile genomik olmayan yol üzerinden de etkisini göstermektedir (75–77) (**Şekil 2.4.**).

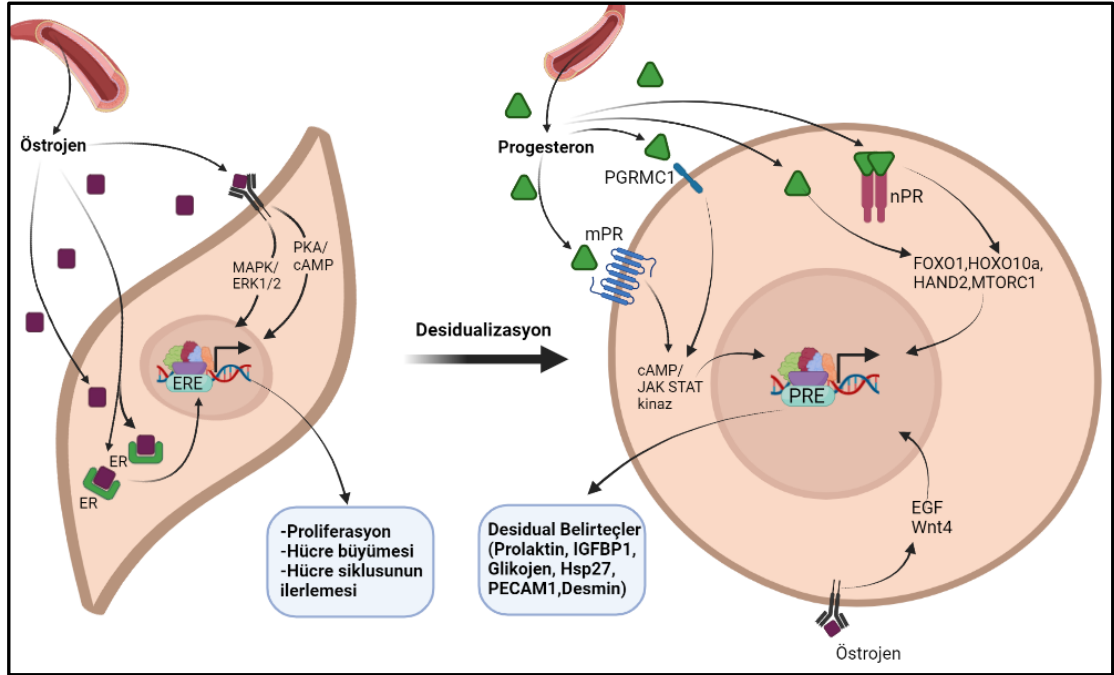
Östrojen ESC'lerde hücre proliferasyonunu uyarmak, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini sağlamak ve proliferatif evrede ESC'ler üzerinden parakrin etkileşimlerle anjiyogenezi artırmak gibi etkilere sahipken, sekretuar evrede PGR

ekspresyonu artırmakta ve böylece progesteron etkisinin daha belirgin görülmesini sağlamaktadır (78–80). Progestin sinyalleri ise parakrin etkiyle östradiolün lokal inaktivasyonuna sebep olmaktadır. Böylece sekretuar evrede endometrial epitel hücrelerinin östrojene bağlı büyümesinin önüne geçilmektedir (16).

### **cAMP**

cAMP, hücre dışı ligandların GPCR'e bağlanması ile üretilen ve çok sayıda hücre sel yanıtı düzenleyen bir ikincil habercidir. Gonadotropinler, prostaglandinler, relaksin gibi hormonların GPCR'e bağlanması sonucu membrana bağlı adenilat siklaz aktive olarak, ATP'den cAMP oluşumuna yol açmaktadır (17) (**Şekil 2.4.**). Progesteron da Wnt5a'nın ekspresyonunu artırarak sekrete olan Wnt5a ile GPCR üzerinden hücre içi cAMP artışını desteklemektedir (81). Endometriyumda cAMP seviyeleri özellikle sekretuar fazda daha yüksek saptanmaktadır (18). Hücre içi cAMP seviyeleri spesifik fosfodiesterazlar (PDE) tarafından inaktif formuna hidrolizi katalizlenerek kontrol edilmektedir (82). cAMP'nin hücre içinde birikimi sonucu, ana hedef proteini olan PKA aktifleşmekte; böylece çeşitli transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi sağlanmaktadır. CCAAT güçlendirici bağlayıcı proteinler (CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs)), Forkhead box protein O1 (FOXO1), cAMP yanıt elemanı bağlayıcı protein (cAMP response element-binding protein (CREB)) desidualizasyon sürecinde görev alan temel transkripsiyon faktörlerindedir (58).

EPAC (Exchange protein activated by cyclic adenosine monophosphate), doğrudan cAMP tarafından aktive edilen proteinlerdir. EPAC1 ve EPAC2 olmak üzere iki izoformu vardır. EPAC'lar, Rap1 ve Rap2'de GDP ile GTP değişimi ile kalsiyum homeostazisi ve hücre iskeleti dinamiklerinde ve dokunun yeniden yapılanmasında etkilidir. EPAC1, EPAC2'nin siRNA aracılı susturulması sonucu ESC farklılaşmasını engellediği bulunmuştur (83). Hücre içi cAMP konsantrasyonunun yüksek seviyelerde tutulması desidualizasyon için önemlidir. Diğer hücre tiplerinden farklı olarak ESC'lerde PKA  $\alpha$  alt biriminin aşağı regülasyonu ile sürekli bir artan kinaz aktivitesi oluşturulur ve desidualizasyon sürecinin devamlılığı sağlanmış olur (19).



**Şekil 2.4. Östrojen, progesteron ve cAMP'nin endometrial stromal hücreler üzerine etkisi.** (Bu şekil BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.)

### 2.5 *In vitro* Desidualizasyon

Endometriyum nispeten kolay elde edilebilen bir dokudur ve desidualizasyon çalışmaları endometrial biyopsilerden elde edilen stromal hücreler ile primer hücre kültürleri kurularak yapılabilmektedir. Primer hücre kültürü için kullanılan yaygın protokolda işlem öncesi 3 ay süre ile hormon tedavisi görmemiş, düzenli menstrüel sıklusa sahip, endometrial disfonksiyonu olmayan hasta seçimi esastır. Küretaj yolu ile elde edilen endometrial doku örnekleri steril besiyerine alınıp ardışık yıkamalar ile temizlenerek küçük parçalara ayrılır. Sonrasında kollajenaz ve DNaz-1 ile muamele edilerek mekanik ve enzimatik olarak parçalanır. Filtre yardımı ile ESC'ler ayrıştırılıp flasklara ekilerek primer hücre kültürü kurulmuş olur (84,85). Primer hücre kültürü kurmak her ne kadar yapılabilir olsa da bu şekilde elde edilen hücreler sınırlı bölünme yeteneğine sahiptir ve bu durum uzun süreli ve çok tekrarlı *in vitro* çalışmalar için sınırlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu sebeple hücre bankalarının geliştirilen ölümsüzleştirilmiş hücre hatları *in vitro* deneyler için iyi bir alternatif olarak kullanılmaktadır. T0533-Immortalized Human Endometrial Stromal Cells (hESC) hücre hattı da malign olmayan uterin miyoma sahip erişkin kadınların biyopsi örneklerinden elde edilen ESC'lere telomeraz muamelesi ile oluşturulmuş ölümsüzleştirilmiş hücre

soyudur (86). Karyotip anomalisi içermeyen ve steroid hormonlara desidualizasyon yanıtı oluşturabilen bu hücreler kanser, implantasyon çalışmalarının yanı sıra desidualizasyon modellemelerinde de tercih edilmektedir (86–88).

Gerek primer hücre kültürü ile gerek ticari olarak elde edilmiş olan hESC'ler *in vitro* ortamda progesteron, östrojen ve cAMP ile muamele edilerek desidualizasyon gerçekleştirilebilmektedir (85). *In vitro* desidualizasyon modellemesi için çok sayıda protokol belirlenmiştir (19) (**Tablo 2.1.**). Uygulanan protokollerde ilaç seçimi ve tedavi süresi gibi farklılıklar olsa da hESC'lerde morfolojik değişimlerin gözlenmesi ve desidual belirteçlerin varlığının saptanması ile desidualizasyon sürecinin modellendiği kanıtlanmıştır (19). Yaygın olarak kullanılan protokoller; östrojen ve progesteronun beraber uygulanması, cAMP uygulanması; cAMP ve progesteronun beraber uygulanması ve cAMP, progesteron ve östrojenin beraber uygulanması şeklindedir (19,89,90). *In vitro* desidualizasyon modeli hESC'lerdeki farklanma ve süreçle ilgili yeni bilgilerin edinilmesi için iyi bir alternatif olarak kullanılmaktadır.

**Tablo 2.1. *In vitro* Desidualizasyon Modelleri**

<i>Uygulama protokolü</i>	<i>Uygulama süresi</i>
<b><i>Endometrial Eksplantlar</i></b>	
<i>P4±E2</i>	6-10 gün
<i>P4</i>	2-28 gün
<b><i>Primer hESC Kültürü</i></b>	
<i>8-Br-cAMP</i>	12-24 saat
<i>8-Br-cAMP</i>	1-3 gün
<i>8-Br-cAMP</i>	2 gün
<i>8-Br-cAMP</i>	2-4 gün
<i>CRH</i>	8 gün
<i>db-cAMP</i>	4 gün
<i>FSH±LH /hCG</i>	4-6 gün
<i>MPA</i>	10-20 gün
<i>MPA + cAMP</i>	4-10 gün
<i>MPA + E2 + aktivin A</i>	10 gün
<i>MPA + E2 + PGE2</i>	3 gün
<i>P4 + E2</i>	10-15 gün

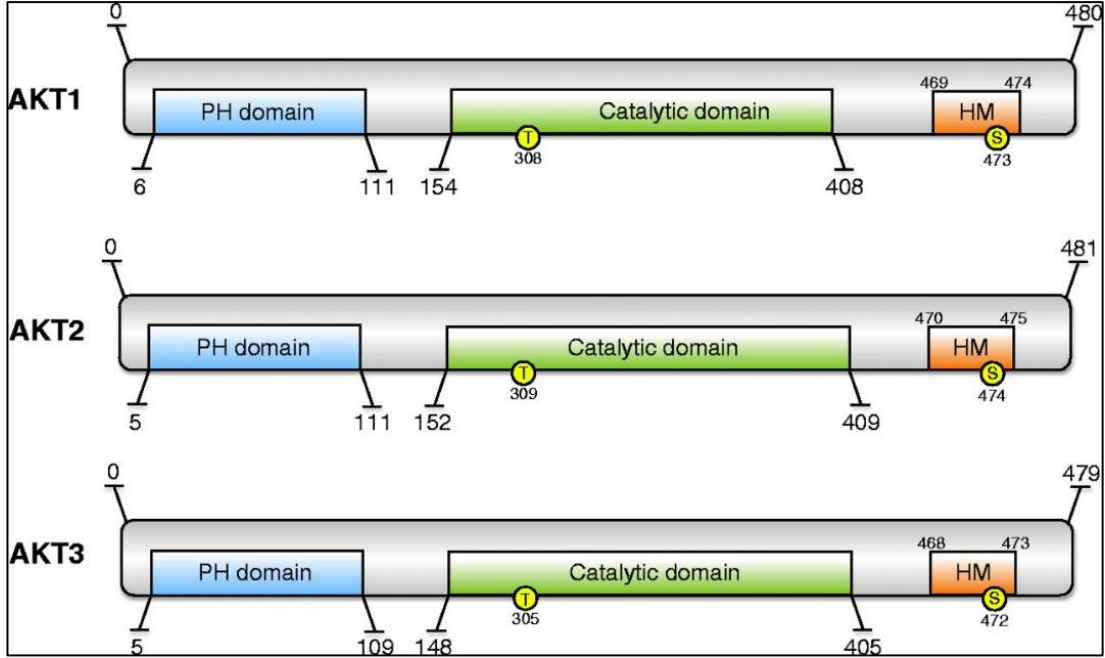
*In vitro* desidualizasyon için eksplant ve primer hücre kültürlerinde uygulanan farklı protokoller tabloda gösterilmiştir olup, tablo ilgili kaynaktan modifiye edilerek kullanılmıştır (19). Kısaltmalar: P4, progesteron; E2, östradiol; 8-Br-cAMP, 8-Bromoadenosin 3',5'-siklik adenosin monofosfat; CRH, kortikotropin salgılatıcı hormon; db-cAMP, N<sup>6</sup>, 2'- O- Dibutiriladenosin- 3', 5'- siklik monofosfat; FSH, follikül stimüle edici hormon; LH, luteinleştirici hormon; hCG, insan koryonik gonadotropin; MPA, medroksiprogesteron asetat; PGE2, prostaglandin E2.

## 2.6 Akt Sinyal Yolağı

AKT, Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinen bir serin/treonin kinazdır. Sırasıyla 14q32, 19q13, 1q44 kromozomları üzerinde lokalize genlerce kodlanan; AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  ve AKT3/PKB $\gamma$  olmak üzere 3 farklı izoformu mevcuttur (91). Her bir AKT izoformu, fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat (PIP3) gibi membran lipitleri ile etkileşen bir PH (plekstrin homolog) domaini, treonin rezidüsü içeren bir katalitik domain ve serin rezidüsü içeren bir hidrofobik domain bulundurmaktadır (92) (**Şekil 2.5.**). AKT1 ve



AKT2 sitozolde lokalize iken, AKT3'ün ağırlıklı olarak çekirdekte bulunduğu saptanmıştır (93,94).

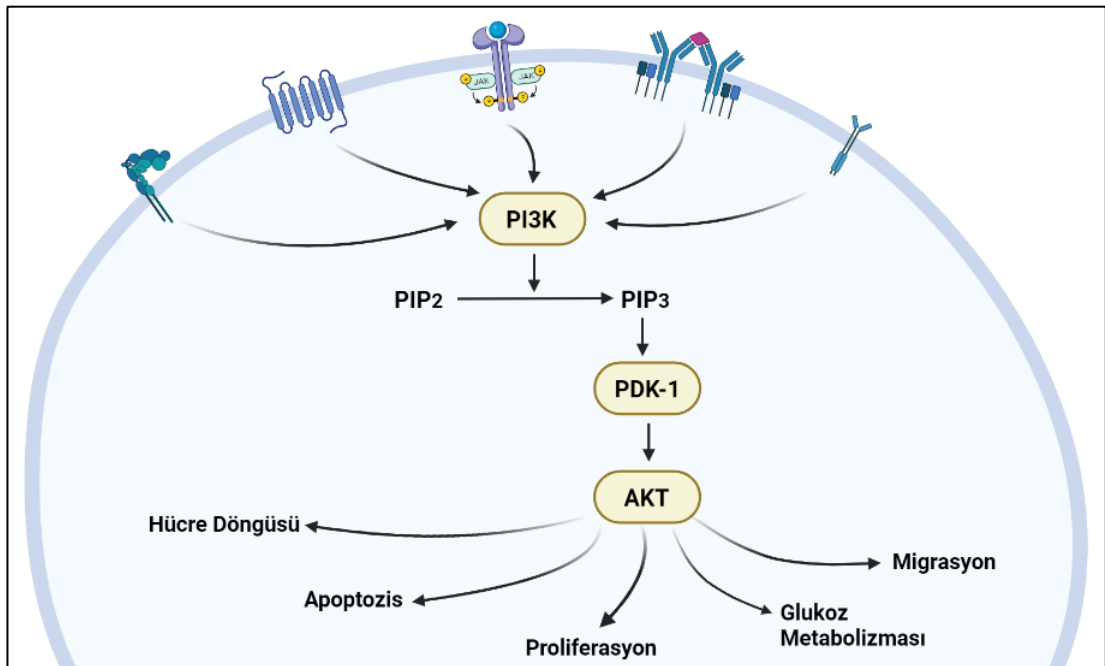


**Şekil 2.5. AKT izoformları.** AKT1/PKB $\alpha$ , AKT2/PKB $\beta$  ve AKT3/PKB $\gamma$  olmak üzere 3 farklı izoformun her biri; bir PH domaini (pleckstrin homology domain), bir katalitik domain ve bir hidrofobik domain içermektedir (95).

Hücre membranında lokalize çeşitli reseptörlerce alınan uyarılar ile PI3K aktifleşerek AKT fosforilasyonu gerçekleştirilir. Ligandı ile birleşerek fosforile olan reseptörler PI3K'nın p85 düzenleyici alt ünitesi ile etkileşir ve PI3K'nın plazma membranına taşınması sağlanır. Sonrasında PI3K'lar GTPazların p110 katalitik alt birimine bağlanmasıyla aktifleşir ve fosfatidilinositol-3,4-difosfat (PIP2) inositol halkasının 3' pozisyonundan fosforillenerek PIP3'e çevrilir. Oluşan ikinci haberci PIP3, PH bölgesinden fosfoinositid bağımlı kinaz 1 (PDK1)'e bağlanır. PDK1 katalitik domainde bulunan treonin rezidüsüyle etkileşir ve AKT fosforilasyonu gerçekleşmiş olur (96–98) (**Şekil 2.6.**).

AKT fosforile olduktan sonra, hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, hücre canlılığının sürdürülmesi, migrasyon, apoptoz ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesi gibi bir çok önemli süreçte görev almaktadır (99–102). Desidualizasyon sürecinde de desidualize ESC'den salınan prolaktin, anti apoptotik etkinliğini bu

hücrelerde AKT yolu aktivasyonu ile göstermektedir (95,103,104). Buna karşın desidualize ESC'lerde her 3 AKT izoformunun da fosforilasyonunun azaldığı ve bu etkinin cAMP bağımlı olduğu da ortaya konmuştur (20,85). Progesteron ise ESC'de AKT fosforillenmesini inhibe ederek FoxO1'in artışına sebep olmakta ve hücre apoptozisten korunabilmektedir. Bu da progesteron çekilmesine sekonder menstrüasyon kanamasında AKT-FOXO1 etkileşiminin ve Akt yolunun önemli olduğunu göstermektedir (105–108). Progesteron bu etkisinin yanı sıra Akt yolu üzerinden, DNA sentezi için deoksiniükleotid üretimini kısıtlayan bir enzim olan Ribonükleosit-difosfat redüktaz alt birimi M2 (Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 (RRM2))'nin ekspresyonunu artırarak ESC proliferasyonunu düzenlemektedir (109).



**Şekil 2.6. Akt sinyal yolunun şematik çizimi.** Hücre membranında lokalize çeşitli reseptörlerce alınan uyarılar sonucu PI3K aktifleşir ve PIP2, PIP3'e çevrilir. Oluşan ikinci haberci PIP3, PDK1'e bağlanır. PDK1, katalitik domainde bulunan treonin rezidüsüyle etkileşir ve AKT fosforilasyonu gerçekleşir. (Bu şekil BioRender programı kullanılarak çizilmiştir.)

Akt sinyal yolunu aktive eden birçok reseptör tanımlanmıştır. ESC'lerde RTK'lar (Reseptör tirozin kinazlar; EGFR, VEGFR, FGFR) (110), GPCR (111), PTGER4 (Prostaglandin E2 reseptör 4) (112), ve CXCR6 (C-X-C Motif Kemokin Reseptör 6)

reseptörleri Akt sinyal yolağı aktivasyonuna aracılık etmektedir. Yeni çalışmalarla CKAP4 de farklı hücre gruplarında Akt sinyal yolağı ilişkili reseptörlerden biri olarak tanımlanmıştır (31,113).

## 2.7 CKAP4

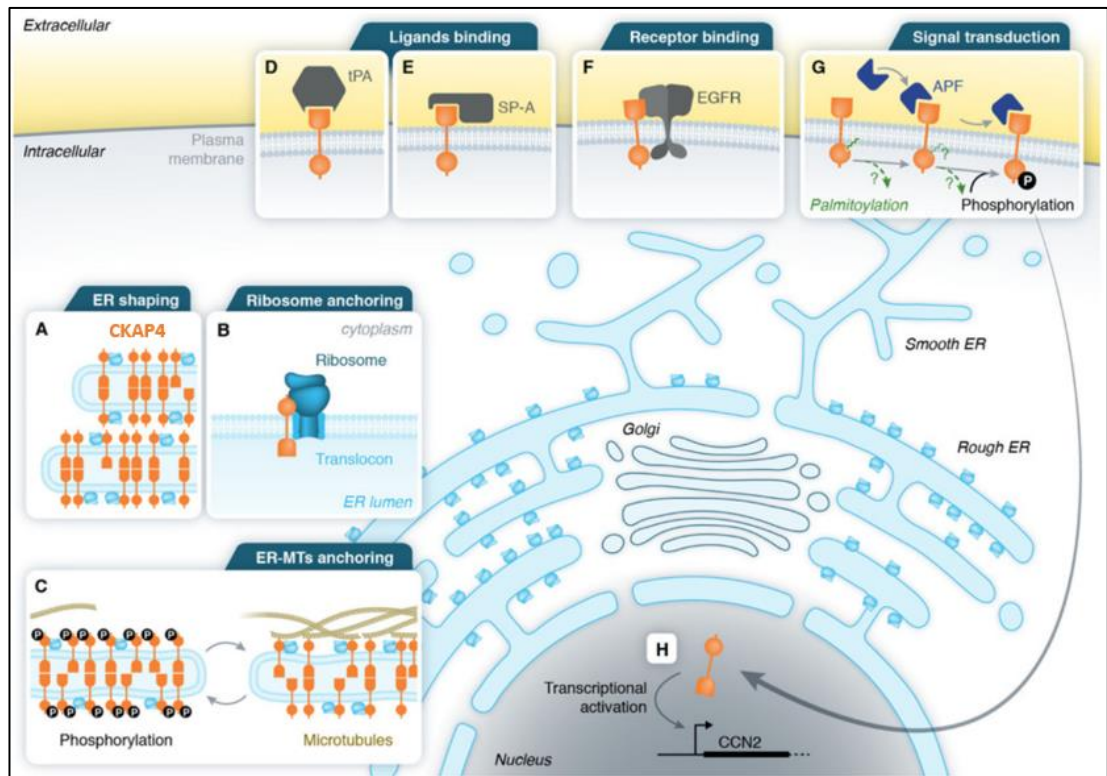
CKAP4, 475 amino asitten oluşan endoplazma retikulumu lümeninde yer alan karboksil terminal bölgesi (C terminali), 106 amino asitten oluşan sitozolde yer alan amino-terminal bölgesi (N-terminali) ve 21 amino asitten oluşan transmembran alanı ile toplam 602 amino asit içeren, bir tip II transmembran proteini olarak sınıflandırılmaktadır (114). N-terminal bölgede 2-21'inci amino asitler endoplazma retikulumu sabitleme alanı olarak işlev görürken, 24-101 arasındaki amino asitler mikrotübül bağlanma alanı olarak işlev görmektedir (115) (**şekil 2.7.**).

CKAP4 12. kromozomun 23.3. bandından transkripsiyonu olduktan sonra translasyonu takiben endoplazma retikulumunda posttranslasyonel modifikasyona uğrayarak GER membranı ve hücre membranına transfer olmaktadır. Reseptör olarak görev aldığında klatrin ile kaplı şekilde sitozole alındıktan sonra ya ligandından ayrılarak tekrar membrana yol almakta ya da ubiquitinlenerek proteazomlarca yıkılmaktadır (116).

CKAP4 endoplazma retikulumunda çeşitli posttranslasyonel modifikasyonlara uğramaktadır. Palmitoilasyonu mikrotübüller ile bağlanma, nükleer lokalizasyon ve hücre membranına transport ile ilişkili iken; fosforillenmesi mikrotübül etkileşimi ile ilişkilidir (**şekil 2.7.**) ve mitoz sırasında arttığı bilinmektedir (24). Bunlara ek olarak, CKAP4 sülfasyona da uğramaktadır. Sülfasyonun gerçekleştiği tirozin bölgesi pozitif yüklü alanlar ile kompleks oluşturma yeteneğine sahiptir ve potansiyel bir ligand-reseptör bağlanma bölgesi olduğu düşünölmektedir (34). N-terminalinde glikozilasyon için bir bölgenin olmaması sebebiyle CKAP4'ün glikozile olmadığı ortaya konmuştur (22).

CKAP4, intraselöler olarak GER membranında yer almaktadır (117). GER'de saptanmadan önce, kararlı Endoplazma retikulumu-Golgi ara bölmesinde (ERGIC-stable ER-Golgi intermediate compartment) bulunan bir protein olarak tanımlanmıştır. Fakat daha sonra yapılan incelemelerde Golgi aparatından ziyade GER

ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur (118). GER'de özellikle sisterna morfolojisinin düzenlenmesinde görev almakta ve luminal kısmı ile sisternalarda karşılıklı bulunan GER membranlarının birbirine bağlanmasına aracılık etmektedir (26) (Şekil 2.7). Sisterna morfolojisinin belirlenmesinin yanı sıra GER'de bulunan nanodomainler ile etkileşerek periferik endoplazma retikulumu tübüllerindeki dinamikleri düzenlediği ortaya konmuştur (27). GER'de lokalize iken sitoplazmik kısmı ile sentrozomal mikrotübülleri bağlayarak hücre içi organel dağılımlarını düzenlemekte ve otofajik bozulmayı baskılamaktadır (28). GER'deki görevlerine ek endoplazma retikulumu - mitokondri temas bölgeleri oluşumunda ve mitokondriye  $Ca^{2+}$  akışında da görev almaktadır (119). GER'deki yerleşimin yanı sıra farklı hücrelerde çekirdekte de lokalizasyonu gösterilmiştir (24,32–34). HeLa hücre hattında yapılan çalışmalarda APF (Anti-proliferatif faktör)'nin CKAP4'ün çekirdeğe translokasyonunu artırdığı ortaya konmuştur (24).



**Şekil 2.7. CKAP4'ün hücresel fonksiyonları ve etkileşimleri.** (A) GER sisterna genişliğini ayarlama, (B) GER'de ribozomların tutulmasında, (C) Mikrotübül bağlanmasında, (D-E-G) sırasıyla tPA, SP-A ve APF için reseptör olarak, (F) EGF yokluğunda EGFR ile etkileşime girerek, (H) çekirdekte transkripsiyon faktörlerini aktive etmede görevlidir (120).

CKAP4'ün endoplazma retikulumu luminal bölgesi ile hücre dışı bölgesi eşdeğerdir ve hücre yüzey membranında lokalize olduğunda ligandları bağlama görevi görmektedir. CKAP4'ün baskın lokalizasyonu GER'de olmasına rağmen başlangıçta vasküler düz kas hücrelerinin, tip II pnömositlerin ve mesane epitel hücrelerinin hücre yüzey membranında da mevcut olduğu ve sırasıyla doku plazminojen aktivatörü (tPA), sürfaktan protein A (SP-A) ve APF için bir reseptör olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (29,30,121) (**Şekil 2.7.**). SP-A'nın cAMP aracılı olarak AKT aktivasyonu yoluyla GER'den hücre yüzey membranına CKAP4 translokasyonunu indüklediği bildirilmektedir (122). İlerleyen çalışmalar ile A549 akciğer, S2-CP8 pankreas, HeLaS3 servikal ve TE-8 özofageal kanser hücreleri ve HepG2 hepatoblastoma hücrelerinin hücre yüzey membranında da bulunduğu tespit edilmiştir. CKAP4'ün hücre yüzey membranında lokalize olup olmadığı hücre tipine bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. MDCK (Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells - Madin-Darby köpek böbrek (MDCK) epitel hücreleri) hücrelerinin apikal membranında da Dkk1 için reseptör olarak işlev görmekte ve PI3K aracılı Akt yolağını etkinleştirerek hücre proliferasyonu desteklemektedir (113). Yeni çalışmalarda Dkk1'in prognozda rol oynadığı kanser tipleri için CKAP4 kansere karşı yeni bir hedef olarak ele alınmaktadır. Pankreas kanserlerinden salgılanan ekzozomlarda CKAP4 bulunması ve serumda ELISA yöntemi ile saptanması bazı kanserler için belirteç olarak kullanılabileceğini ve tedavi hedefi olarak düşünülebileceğini desteklemiştir (123). Bazı kanser türleri için de Dkk1'den bağımsız olarak  $\beta$ 1 integrin ile etkileşime girip ve  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrinin geri dönüşümünü kontrol ederek hücre migrasyonunda artmaya sebep olmaktadır (35).

CKAP4 genel olarak kanser çalışmalarında karşımıza çıkmakla beraber, kadın genital sisteminde de vajina, tuba uterina, serviks, endometriyum, plasenta ve overlerde varlığı bildirilmiştir (36). ESC'ler, menstrüel siklus sürecinde geçirdikleri değişimler ve gebeliğin sürdürülmesindeki görevlerinden ötürü kadın genital sistemi için özel ve önemli hücrelerdir. CKAP4'ün ESC'lerdeki lokalizasyonu ve bu hücrelerin

menstrüel siklustaki hormonal değişimlere ve desidualizasyon sürecine verdiği CKAP4 ekspresyon yanıtı bilinmemektedir.

**Sonuç olarak çalışmanın gerekçesi,** desidualizasyon sürecinde yaşanan aksaklıkların klinikte karşımıza infertilite, implantasyon yetersizlikleri, tekrarlayan gebelik kayıpları ve preeklampsi ile çıkabilmesi ve bu süreçte etkili olan Akt yolağı ve Dkk1 için reseptör görevi gören ve hücre içinde GER sisternalarının morfolojisinin belirlenmesi, mikrotübül organizasyonu gibi önemli görevleri olan CKAP4'ün hESC'lerdeki lokalizasyonunun ve ovaryan hormonlar ile CKAP4 ilişkisinin bilinmiyor olmasıdır.

Bu gerekçe ile menstrüel siklusta ve desidualizasyonda etkili ovaryan hormonların, hESC'lerde, CKAP4 ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. hESC'lerde E2, MPA ve cAMP ile menstrüel siklusun farklı evreleri ve desidualizasyon *in vitro* koşullarda modellenmiş, CKAP4 ekspresyonunun western blot ile kantitatif olarak saptanması ve hücredeki lokalizasyonunun akım sitometri, sito-ELISA ve immünofloresan işaretleme yöntemleri ile belirlenmesi hedeflenmiştir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Deney Tasarımı

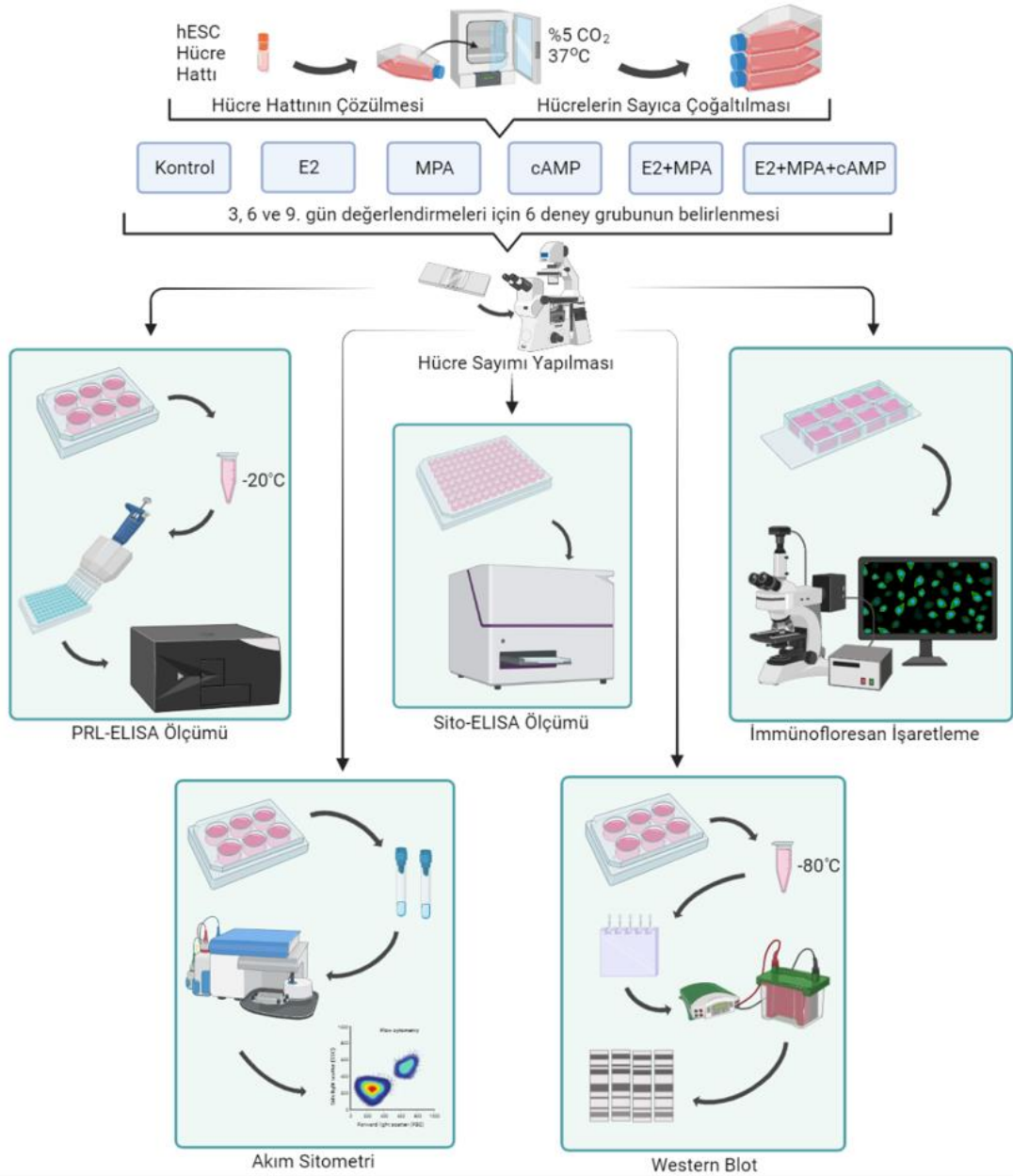
Çalışmada hESC'ler ovaryan hormonlardan olan östrojen ve progesteron ile hücre içi ikincil haberci olan cAMP kullanılarak *in vitro* desidualizasyon oluşturulmuş ve süreçte görev alan östrojen, progesteron, cAMP ile CKAP4 ilişkisi incelenmiştir. "Endometrial Stromal Hücrelerde Ovaryan Hormonlar ile CKAP4 İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması, 3 Aralık 2019 tarihinde GO 19/1150 kayıt numarası ile Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Çalışmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Tez çalışması kontrol grubu içeren ileriye yönelik (prospektif) *in vitro* deneysel araştırma olarak planlanmıştır. Bağımlı değişkenler PRL-ELISA ile elde edilen prolaktin miktarı sonuçları, sito-ELISA ile elde edilen optik dansite sonuçları, immünofloresan işaretleme sonrası çekilen mikrograflardan hesaplanan floresan yoğunluğu sayısal sonuçları, akım sitometri ile belirlenen hücre yüzdeleri ve western blot yöntemi ile ölçülen protein değişimlerinin kantitatif sonuçları olup, bağımsız değişkenler ise uygulanan hormon (kontrol besiyeri, E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP) farklılıklarıdır.

Ticari olarak elde edilen hESC hücre hattına ait hücreler çoğaltıldıktan sonra deney için 6 grup belirlenmiş olup, grupların deney başlangıcından itibaren üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günlerde ölçüm ve değerlendirilmelerinin yapılması planlanmıştır. Deney grupları şu şekildedir:

1. Kontrol (K)
2. Östrojen ile indüklenen hESC (E2)
3. Progesteron ile indüklenen hESC (MPA)
4. cAMP ile indüklenen hESC (cAMP)
5. Östrojen ve Progesteron ile indüklenen hESC (E2+MPA)
6. Östrojen, Progesteron ve cAMP ile indüklenen hESC (E2+MPA+ cAMP)

Tez çalışması hücre kültürü, ELISA, akım sitometri, sito-ELISA, immüno Floresan analiz ve western blot iş paketlerinden oluşmaktadır. Her iş paketi 3 tekrarlı olarak oluşturulmuştur. Çalışmanın tamamı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait iş akışı **Şekil 3.1.'de** şematize edilmiştir.



**Şekil 3.1. Çalışmaya ait iş akışı şeması.** E<sub>2</sub>: Östrojen, MPA: progesteron, E<sub>2</sub>+MPA: östrojen ve progesteron, E<sub>2</sub>+MPA+cAMP: östrojen, progesteron ve cAMP uygulanan grup (Bu şekil BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.)



## 3.2 Hücre Kültürü

### 3.2.1 hESC Hücre Hattı Kültürü

Çalışmada insan kökenli ölümsüzleştirilmiş hESC hücre hattı (T-0533, abm, Kanada) kullanılmıştır. hESC hücre hattı ticari olarak elde edilmiş ve soğuk zincirde tüp içinde donmuş olarak teslim alınmıştır. Teslim alındıktan sonra hücreler 196°C sıvı azot tankına yerleştirilmiştir. hESC hücre hattına ait hücreler teslim alınma sonrası 1 hafta içinde üretici firmanın talimatları doğrultusunda -196°C sıvı azot tankından (Carbide 35HC LN2, Taylor Wharton Union, Amerika Birleşik Devletleri) alınıp 37°C su banyosunda 1 dk süresince bekletilerek çözüldü. Su banyosundan alınan hESC hücre hattına ait hücreleri içeren tüp, kontaminasyonun önlenmesi için %70'lik alkol ile temizlendikten sonra laminar akım kabini içine alındı. Donmuş olarak gelen hESC'leri ilk çözerken üretici firmanın önerisi doğrultusunda Prigrow IV (TM004, abm, Kanada) besiyeri kullanıldı. Laminar akım kabini içinde tüpte bulunan çözülmüş hücreler daha önceden hazırlanıp oda ısısına getirilmiş 15 ml komplet Prigrow IV besiyeri içine alınarak 200 g hızda 3 dakika santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet önceden hazırlanmış %10 FBS (Fetal sığır serumu, HyClone Cat# SH30068.03, GE, ABD), %1 L-glutamin (L-Glutamine, 200 mM, Capricorn Scientific, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Penicillin/Streptomycin Solution 100x, Capricorn Scientific) içeren 4 ml komplet Prigrow IV besiyerinde resüspanse edildi ve PriCoat T25 kültür kabına (G299, abm, Kanada) ekildi. Ardından 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> konsantrasyonu içeren nemli inkübatöre (Heraeus HeraCell 150 CO<sub>2</sub> incubator, Almanya) yerleştirildi. Kültür kaplarına ekilen hESC hücreler 48 saat aralıklarla faz kontrast mikroskopta kontrolleri yapıldıktan sonra besiyeri değiştirilip deneylerde kullanılmak üzere 4. pasaja kadar çoğaltıldı.

### 3.2.2 Kültür Hücrelerinin Pasajlanması ve Dondurulması

Ekilen hücreler faz kontrast mikroskopu (TMS Inverted Microscope, Nikon, Japonya) ile incelendi. Kültür kabında %80 konfluensiye ulaşan hücreler mevcut besiyeri uzaklaştırılarak 37°C' ye ısıtılmış DPBS (Dulbecco'nun fosfatlı tampon solüsyonu 1x) w/o Ca & Mg, Capricorn Scientific, Almanya) ile yıkandı. DPBS

çekildikten sonra oda ısısına getirilmiş %0,25 Trypsin (Capricorn Scientific, Almanya) eklenerek inkübatörde 4 dk trypsin ile muamele edildi. Trypsin FBS içeren komplet besiyeri ile durdurularak karışım 1200 rpm hızda 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet komplet Prigrow IV besiyerinde çözüldü ve her bir T25 flasktan elde edilen hücreler 1:2 oranında bölünerek iki yeni T25 flaska eşit miktarda ekildi. Pasaj numarası bir artırılarak bilgileri not alındı. İkinci pasajda komplet besiyeri hazırlanırken Prigrow IV ve DMEM/F12 (DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)/Ham's F-12, w/o L-Glutamine, with 15mM HEPES, Capricorn Scientific, Almanya) 1:1 oranında karıştırıldı ve içine %2 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin eklendi. Üçüncü ve dördüncü pasajda ise komplet besiyeri için DMEM/F12 kullanıldı. Bu pasaja ait hücreler için komplet besiyeri DMEM/F12, %2 FBS, %1 L-glutamin, %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek hazırlandı. Östrojen, progesteron hormonları ve cAMP muamelesi bu besiyeri içinde uygulandı.

Faz kontrast mikroskobu ile incelemede %80 konfluensiye ulaştığı saptanan ve pasajlanması planlanmayan hücreler, %0,25'lik trypsin ile 4 dk inkübe edildi. Sonrasında trypsinin etkisi, 1:1 oranında komplet besiyeri ile durdurularak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve hücre peleti 700 µl Prigrow IV besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonu kriyovial içine alındı. Üzerine 200 µl FBS eklendi. Buz aküsü üzerine alınan kriyoviallere 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO, D2650, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi. Daha sonra kriyovialler dondurma kabına (BCS-136 CoolCell, Biocision, Amerika Birleşik Devletleri) alınarak -80°C derin dondurucuya (DF290, Nüve, Türkiye) koyuldu. Ertesi güne kadar derin dondurucuda bekleyen kriyovialler uzun süreli saklama amacıyla sıvı azot tankına (-196°C) alındı.

### **3.2.3. Kültür Hücrelerinin Sayılması**

T25 ve T75 kültür kaplarında çoğaltılan hücreler mevcut besiyeri uzaklaştırılarak %0,25 trypsin ile kaldırıldı. FBS içeren besiyeri ile trypsin etkisi durdurulduktan sonra 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet 1 ml komplet besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 100 µl alınarak 1 ml'ye tamamlandı. Dilüe edilmiş hücre süspansiyonundan 50 µl alınarak 50 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Hemositometre lamına 10 µl süspansiyon konularak faz kontrast

mikroskobunda 5 farklı alanda canlı hücreler sayılarak ortalaması alındı. “Toplam hücre sayısı =  $x \cdot 2 \cdot 10 \cdot 10^4$  (x: Hemositometre lamında 5 farklı alanda sayılan hücrelerin ortalaması)” formülü kullanılarak toplam hücre sayısı belirlendi.

Her iş paketi için deneye başlangıç hücre sayıları belirlendi ve toplam hücreden uygun derişimlerde hesaplanarak üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günler için PRL-ELISA ölçümü iş paketinde kullanılacak süpernatant eldesi için 6 kuyulu plaklara; akım sitometri ve western blot iş paketleri için 6 kuyulu plaklara; sito-ELISA ölçümü için 96 kuyulu plaklara; immünofloresan işaretleme için 8 kuyulu lamlara kuyu başına sırası ile 200.000; 200.000; 1000; 1000 hücre olacak şekilde 3'er tekrarlı ekilerek deneye başlandı.

### **3.3 hESC'lerin Ovaryan Hormonlar ile indüksiyonu**

hESC'lerde ovaryan hormonlar ile CKAP4 ilişkisinin incelenmesi amacıyla kültüre edilen ve sayıca çoğaltılan hESC'ler ovaryan hormonlar ve cAMP'nin etkisinin üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günlerde değerlendirilmek üzere östrojen, progesteron, östrojen+progesteron, cAMP ve östrojen+progesteron+cAMP ile uyarıldı.

#### **3.3.1 Östrojen (E2) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması**

Östrojen ile indüklenen hESC grubunda doz olarak, hücre hattının üretici firmasının önerdiği doz olan  $10^{-8}$  M tercih edildi. Stok solüsyonu, 50ml etanol içinde 5mg  $17\beta$ -Estradiol  $\geq 98\%$  (Sigma, E8875-250MG, ABD) olacak şekilde çözülerek hazırlandı. Stok solüsyonundan alınan 1 ml, 1:10 etanol ile dilüe edilerek ara stok solüsyonu elde edildi ve deneyde kullanılmak üzere ependorflara bölünerek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Ara stoktan alınan 1,6  $\mu\text{l}$  solüsyon total hacim 6000  $\mu\text{l}$  olacak şekilde 1:1 fenol kırmızısı içermeyen DMEM ve Ham's F-12 besiyerine, 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS eklenen besiyeri içinde çözülerek  $10^{-8}$  M östrojen içeren besiyeri elde edildi. hESC'ler kuyu başına 800  $\mu\text{l}$   $10^{-8}$  M östrojen içeren besiyeri ile 36 saatte bir beslenerek 3, 6 ve 9 gün östrojen indüksiyonu yapıldı. Östrojen ile indüklenen kuyulardaki besiyeri 36 saatte bir toplanarak  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.3.2 Progesteron (MPA) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması

Progesteron ile indüklenen hESC grubunda doz olarak, hücre hattının üretici firmasının önerdiği doz olan  $10^{-7}$  M tercih edildi. Ana stok solüsyonu 1.5 ml etanol içinde 1 mg Medroksiprogesterone 17-acetate  $\geq 97\%$  (Sigma, M1629-1G, ABD) olacak şekilde çözülerek hazırlandı. Ana stoktan alınan 1,15  $\mu$ l solüsyon total hacim 6000  $\mu$ l olacak şekilde 1:1 fenol kırmızısı içermeyen DMEM ve Ham's F-12 besiyerine (Sigma Cat# D 2906, ABD), 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS eklenen besiyeri içinde çözülerek  $10^{-7}$  M progesteron içeren besiyeri elde edildi. hESC'ler kuyu başına 800  $\mu$ l  $10^{-7}$  M progesteron içeren besiyeri ile beslenerek 3, 6, ve 9 gün boyunca progesteron indüksiyonu yapıldı. Her kuyudaki eski besiyeri 36 saatte bir toplandı ve kuyulara  $10^{-7}$  M progesteron içeren taze besiyeri eklendi. Toplanan besiyeri  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Progesteron uygulaması için ilaç her uygulamada taze olarak hazırlandı.

### 3.3.3 Östrojen ve Progesteron (E2+MPA) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması

Östrojen ve progesteron ile indüklenen hESC grubunda  $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron kullanıldı. İlaçlar yukarıda anlatıldığı şekilde ara stoklar hazırlandı. Östrojenin ara stoğundan alınan 1,6  $\mu$ l ve progesteronun ana stoğundan alınan 1,15  $\mu$ l solüsyon total hacim 6000  $\mu$ l olacak şekilde 1:1 fenol kırmızısı içermeyen 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS içeren DMEM/F-12 besiyeri içinde çözülerek  $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron içeren besiyeri elde edildi. hESC'ler kuyu başına 800  $\mu$ l besiyeri ( $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron içeren besiyeri) ile 3, 6 ve 9 gün boyunca beslendi. Her kuyunun besiyeri 36 saatte bir toplanarak yenilendi. Toplanan besiyerleri  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.3.4 cAMP İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması

cAMP ile indüklenen hESC grubunda doz olarak 0,5 mM tercih edildi (20,89,90). Ana stok solüsyonu 500  $\mu$ l amonyum hidroksit içinde 25 mg 8-Bromoadenosine 3',5' – cyclic monophosphate (Sigma, B5386, ABD), olacak şekilde

çözülerek hazırlandı. Ana stoktan alınan 24,4 µl solüsyon total hacim 6000 µl olacak şekilde 1:1 fenol kırmızısı içermeyen 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS içeren DMEM/F12 içinde çözülerek 0,5 mM cAMP içeren besiyeri elde edildi. hESC'ler kuyu başına 800 µl besiyeri (0,5 mM cAMP içeren besiyeri) ile 3, 6 ve 9 gün boyunca beslendi. Her kuyunun besiyeri 36 saatte bir toplanarak yerine taze besiyeri eklendi. Toplanan besiyeri -20°C'de muhafaza edildi.

### **3.3.5 Östrojen, Progesteron ve cAMP (E2+MPA+cAMP) İçeren Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması**

Östrojen, progesteron ve cAMP ile indüklenen hESC grubunda  $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron ve 0,5 mM cAMP kullanılmak üzere yukarıda anlatıldığı şekilde ara stoklar hazırlandı. Östrojenin ara stoğundan alınan 1,6 µl, progesteronun ana stoğundan alınan 1,15 µl ve cAMP'nin ana stoğundan alınan 24,4 µl total hacim 6000 µl olacak şekilde 1:1 fenol kırmızısı içermeyen DMEM/F-12 besiyerine, 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS eklenerek hazırlanmış komplet besiyeri içinde çözülerek  $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron ve 0,5 mM cAMP içeren besiyeri elde edildi. hESC'ler kuyu başına 800 µl besiyeri ( $10^{-8}$  M östrojen,  $10^{-7}$  M progesteron ve 0,5 mM cAMP içeren besiyeri) ile 3, 6 ve 9 gün boyunca beslendi. Her kuyunun besiyeri 36 saatte bir toplanarak yerine taze besiyeri eklendi. Toplanan besiyerleri tüplere alınarak -20°C'de saklandı.

### **3.3.6 Kontrol Grubu Solüsyonun Hazırlanması ve Hücrelerin Uyarılması**

Kontrol grubu için 1:1 fenol kırmızısı içermeyen DMEM ve Ham's F-12 besiyerine, 1% L-glutamin, 1% penisilin-streptomisin, 2% FBS eklenen besiyeri kullanıldı.

hESC'ler üç, altı ve dokuz gün boyunca ovaryan hormonlar (E2, MPA, E2+MPA) ve/veya cAMP (cAMP, E2+MPA+cAMP) ile uyarılarak çalışmanın deney grupları oluşturuldu (**Tablo 3.1**).

**Tablo 3.1. Deney grupları örneklem büyüklüğü**

İndüksiyon Gün	Kontrol	10 <sup>-8</sup> M östrojen	10 <sup>-7</sup> M progesteron	10 <sup>-8</sup> M östrojen +10 <sup>-7</sup> M progesteron	0,5mM cAMP	10 <sup>-8</sup> M östrojen +10 <sup>-7</sup> M progesteron +0,5mM cAMP
3. gün	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
6. gün	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3
9. gün	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3	n=3

\*Sito-ELISA ölçümlerinde 3 deney yapıldı. Her deneyde gruplar 3'er tekrarlı hazırlanarak toplam 9 tekrar olarak ölçülmüştür.

### 3.4 Prolaktin ölçümü

Üç, altı ve dokuz gün boyunca ovaryan hormonlar (E2, MPA, E2+MPA) ve/veya cAMP (cAMP, E2+MPA+cAMP) ile uyarılan hESC'lere ait süpernatantlarda Human Prolactin PicoKine™ ELISA Kit 96T (Sciencell-Boster; EK0593) ile prolaktin ölçümü gerçekleştirildi.

#### 3.4.1 Kullanılan Solüsyonların hazırlanması

Kullanımdan önce tüm solüsyonlar oda ısısına getirildi.

##### Yıkama Solüsyonu:

Kit içinde toz formunda mevcut olan 1X PBS (fosfat tampon solüsyonu) üzerine 1000 ml distile su eklenerek yıkama solüsyonu elde edildi.

##### 1X İnsan PRL Antikoru (Human PRL Biotinylated antibody):

Kuyu başına 1 µl 100x Human PRL Biotinylated antibody üzerine 99 µl Antikor seyreltici eklenerek kullanımdan hemen önce 1x Human PRL Biotinylated antibody hazırlandı.

##### 1X Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks:

Her kuyuya 1 µl 100x Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks 99 µl Avidin-Biotin-Peroksidaz seyreltici eklenerek kullanımdan hemen önce 1x Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleks hazırlandı.

##### İnsan PRL Standart:

10 ng liyofilize İnsan PRL standardı 1 ml numune seyreltici kullanarak seyreltildi.

### **3.4.2 Prolaktin Ölçümünde Kullanılan Protokol**

Kullanımdan önce tüm malzemeler ve hazırlanan solüsyonlar oda ısısına getirildi. Her numuneden 100 µl kadarı kit içinden çıkan 96 kuyulu plağın bir kuyusuna eklendi ve 37°C de 90 dk inkübe edildi. Kuyulardaki sıvılar kağıt havlu üzerine ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 1x Biotinylated Anti-Human PRL antikorundan 100 µl eklendi ve 37°C de 60 dk inkübe edildi. Kuyular yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı. Kuyulardaki solüsyon kağıt havlu üzerine ters çevrilerek uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µl 1x Avidin-Biotin-Peroxidase Complex eklendi ve 37°C de 30 dk inkübe edildi. Kuyular yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Kuyu başına 90 µl Color Developing Reagent (Renk Geliştirme Reaktifi) eklendi ve 37°C de 20 dk inkübe edildi. Her kuyucuğa 100 µl Stop Solution (durdurma solüsyonu) eklendi ve kuyularda sarı renge dönüşüm gözlendikten sonra 96 kuyulu plağın absorbans ölçümü 450 nm'de mikropłaka okuyucuda (Versamax microplate reader, Molecular Devices) yapıldı.

### **3.5 Akım sitometri yöntemi ile CKAP4 Pozitif Hücre Yüzdesinin Ölçümü**

Optimal koşullarda kültürde çoğaltılıp, faz kontrast mikroskopi ve PRL ELISA değerlendirmesi sonucu 6. günde cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanarak desidualize edilen hESC'ler ile kontrol grubu hücreleri permeabilize edilmeden ve Triton-X ile permeabilize edildikten sonra immün işaretleme yapılarak akım sitometride CKAP4 immün pozitif hücre yüzdesi açısından değerlendirildi.

#### **3.5.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması**

##### **PBS:**

- Sodyum klorür (NaCl, 58,44 g/mol, Kimetsan, Türkiye)
- Potasyum klorür (KCl, 74,56 g/mol, potassium chloride extra pure, Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 268,03 g/mol diSodium hydrogen phosphate heptahydrate, Merck, Almanya)

- Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 156,01 g/mol Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, Merck, Almanya)

Hassas tartı kullanılarak 80 g sodyum klorür, 2 g potasyum klorür, 107,212 g disodyum hidrojen fosfat heptahidrat, 15,6 g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat hazırlandı. Balon joje içine alınan tozlar, manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 ml distile su ile çözüldü. Elde edilen 10X PBS tampon solüsyonu +4 °C de saklandı. Kullanmadan önce distile su ile 1:10 oranında dilüe edilerek 1X PBS tamponu haline getirilip pH'ı 7,4'e ayarlandı.

#### **PBS-BSA Solüsyonu Hazırlanması:**

PBS-BSA solüsyonu için %3 oranında siğir serum albümini (Bovine Serum Albumi (BSA),  $\geq 96\%$ , Sigma, Almanya) PBS içinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözümlenerek hazırlandı. PBS-BSA solüsyonu hazırlandı.

#### **Primer Antikorun Hazırlanması:**

- CKAP4 poliklonal antikor (Bioss-USA, bs6520R, ABD)

Seçilen primer antikor tavşanda üretilmiş ve insan antijenini işaretleyecek özellikte olup, 1/75 dilüsyonda %3 PBS-BSA içinde çözümlenerek kullanıldı.

#### **Sekonder Antikorun Hazırlanması:**

- FITC- Goat-anti rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, 111-095-003, ABD)

Çalışmada kullanılan primer antikor tavşanda üretildiği için tavşan antijenine karşı keçiye üretilmiş yeşil floresan veren FITC ile konjuge sekonder antikor seçildi. Seçilen sekonder antikor, 1/1000 dilüsyonda %3 PBS-BSA içinde çözümlenerek kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze hazırlandı.

### **3.5.2 Akım Sitometri İşaretleme Protokolü**

Dördüncü pasaja kadar çoğaltılan hESC'ler hazırlanan indüksiyon besiyerleri (cAMP ve E2+MPA+cAMP) ile 6 gün muamele edildikten sonra kuyulardaki besiyerleri alınarak DPBS ile yıkandı ve %0,25 tripsin ile kaldırıldı. Ardından gruplar 1mL PBS ile çözümlenerek sayıldı ve her tüpe 100.000 hücre olacak şekilde hücreler tüplere aktarıldı (**Tablo 3.2.**). Tüpler 4°C'de 1200 rpm devirde PBS ile 5 dk yıkandıktan sonra süpernatant atılıp pelet %4 PFA (paraformaldehit) ile resüspanse edilerek 20 dk



4°C’de tespit edildi. PBS ile iki kere 4°C’de 1200 rpm devirde 5 dk süreyle yıkandı. Permeabilizasyon yapılacak gruplara 1’er ml %0.1 TritonX-100 eklenerek hücreler resüspanse edildi ve 15 dk inkübe edildi. Hücreler 2 kere 4°C’de 1200 rpm devirde 5’er dk yıkandıktan sonra bütün gruplara %3 BSA içeren PBS ile 37°C’de 30 dk serum blokajı yapıldı. Hücreler blokaj sonrası 4°C’de 1200 rpm’de 5 dk 2 kere yıkanarak primer antikor uygulandı. Primer antikor olarak CKAP4 polyclonal antibody (Bioss-USA, bs6520R, ABD) kullanıldı. İmmün işaretleme için %3 PBS+BSA içinde 1:75 oranında dilüe edilen primer antikor ile hücreler ile 37°C’de 1 saat inkübe edildi. Ardından PBS ile 2 kere 5 dk 1200 rpm ile santrifüj edilip resüspanse edilerek yıkandı. Sekonder antikor olarak FITC- Goat-anti rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 111-095-003, ABD) kullanıldı. Kuyulardaki hücreler %3 PBS+BSA içinde 1/1000 oranında dilüe edilen sekonder antikor ile oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletildi. İki kere 5 dk PBS ile yıkandıktan sonra pelet 200 µl PBS ile çözülerek akım sitometri cihazında (NovoCyte Flow Cytometer Systems, Amerika Birleşik Devletleri) değerlendirildi. Akım sitometri analizleri için NovoExpres 1.6.1 analiz programı kullanıldı.

**Tablo 3.2. Akım Sitometri İçin Oluşturulan Gruplar**

1.Tüp	2.Tüp	3. Tüp	4.Tüp	5.Tüp	6.Tüp	7.Tüp	8.Tüp	9.Tüp
	Triton-X uygulanmayan (Yüzey işaretlenmesini gösteren gruplar)				Triton-X uygulanan (Yüzey ve hücre içi işaretlenmeyi gösteren gruplar)			
İzotip	<i>Unstained</i>	Kontrol	cAMP	E2+MPA+cAMP	<i>Unstained</i>	Kontrol	cAMP	E2+MPA+cAMP

Desidualize edilen cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarına ek izotipik kontrol için primer antikorun uygulanmadığı ve yine yöntem kontrolü için Triton-X uygulanan ve uygulanmayan her iki protokol için birer tane primer ve sekonder antikorun uygulanmadığı “*Unstained*” gruplar da ilgili basamaklar atlanarak kalan tüm basamaklar deney grupları ile aynı olacak şekilde hazırlandı. Tüm deney grupları ikiye tekrarlı olarak planlandı.

### 3.6 Sito-ELISA yöntemi ile CKAP4 miktarının ölçümü

Üç, altı ve dokuz gün boyunca ovaryan hormonlar (E2, MPA, E2+MPA) ve/veya cAMP (cAMP, E2+MPA+cAMP) ile uyarılan hESC'lerde sito-ELISA yöntemi ile CKAP4 ölçümü gerçekleştirildi.

#### 3.6.1 Solüsyonların hazırlanması

PBS yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

##### **PBS-BSA Solüsyonu Hazırlanması:**

PBS-BSA solüsyonu için %2 oranında BSA, PBS içinde manyetik karıştırıcı üzerinde çözülerek hazırlandı. PBS-BSA solüsyonu her kullanımdan önce taze hazırlandı.

##### **Primer Antikorum Hazırlanması:**

- CKAP4 poliklonal antikor (Bioss-USA, bs6520R, ABD)

Seçilen primer antikor tavşanda üretilmiş ve insan antijenini işaretleyecek özellikte olup, 1/200 dilüsyonda PBS-BSA içinde çözülerek kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze hazırlandı.

##### **Sekonder Antikorum Hazırlanması:**

- Goat anti-rabbit IgG (H+L) (HRP) (Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunosciences, 111-035-003, ABD)

Çalışmada kullanılan primer antikor tavşanda üretildiği için buna karşı keçide üretilmiş ve tavşan antijenini işaretleyecek özellikte sekonder antikor seçildi. Seçilen sekonder antikor, 1/1000 dilüsyonda PBS-BSA içinde çözülerek kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze hazırlandı.

##### **Diamino benzidin (DAB) Solüsyonu Hazırlanması:**

Kromojen olarak DAB (Lab vision, TA-125-HDX, İngiltere) kullanıldı. 1 damla DAB kromojeni, 1 ml DAB substratı içinde dilüe edilerek kullanıldı. Hazırlanan DAB solüsyonunun ışık ile teması tüpün çevresi alüminyum folyo ile sarılarak kesildi. Solüsyon kullanımdan hemen önce taze hazırlandı.

### 3.6.2 Sito-ELISA Yöntemi İçin Uygulanan Protokol

Üçüncü pasaja kadar çoğaltılan endometrial stromal hücreler %0,25 tripsin ile kaldırıldıktan sonra sito-ELISA ölçümleri için 96 kuyulu plaklara her grup 3 tekrarlı olacak şekilde ve her kuyucuğa 1000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat inkübatörde kültüre edildi. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri; her grup için ayrı ayrı hazırlanan E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP içeren komplet besiyerleri ile değiştirildi. Üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günlerin sonunda kuyucuklardaki besiyerleri boşaltılarak DPBS ile yıkandı. Ardından %0.05 glutaraldehit ile oda ısısında 10 dakika tespit edildi. PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı. Primer antikor olarak CKAP4 polyclonal antibody (Bioss-USA, bs6520R, ABD) 1:200 dilüsyonda PBS+BSA içinde dilüe edilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. PBS+BSA içinde 1/1000 dilüsyonda dilüe edilerek hazırlanan sekonder antikor Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, 111-035-003, ABD) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. PBS ile 5 kez 5 dk yıkandı. Kuyulara DAB (Lab vision, TA-125-HDX, İngiltere) solüsyonu eklendi ve 20 dk süreyle yatay sallayıcı üstünde oda ısısında inkübe edildi. 96 kuyulu plakların optik yoğunlukları 495-600 nm dalga boyunda mikroparka okuyucu (Versamax microplate reader, Molecular Devices) ile yapıldı.

### 3.7 hESC hücre hattında İmmüno Floresan İşaretleme Yöntemi Uygulanması

Üç, altı ve dokuz gün boyunca ovaryan hormonlar (E2, MPA, E2+MPA) ve/veya cAMP (cAMP, E2+MPA+cAMP) ile uyarılan hESC'lerde CKAP4 lokalizasyonu ve intensitesinin belirlenmesi için immüno floresan işaretleme gerçekleştirildi.

#### 3.7.1 Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

PBS, %2 PBS-BSA Solüsyonu yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

#### Serum Blokajı Solüsyonu:

Keçi serumu (Goat serum, Capricorn Scientific, Almanya) PBS-BSA içinde 1:50 dilüsyonda hazırlandı. Serum blokajı solüsyonu kullanımdan hemen önce taze hazırlandı.

### **Primer Antikorun Hazırlanması:**

- CKAP4 poliklonal antikor (Bioss-USA, bs6520R, ABD)

Seçilen primer antikor tavşanda üretilmiş ve insan antijenini işaretleyecek özellikte olup, 1/200 dilüsyonda PBS-BSA içinde çözülerek kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze hazırlandı.

### **Sekonder Antikorun Hazırlanması:**

- FITC- Goat-anti rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, 111-095-003, ABD)

Çalışmada kullanılan primer antikor tavşanda üretildiği için buna karşı keçiye üretilmiş ve tavşan antijenini işaretleyecek özellikte yeşil floresan veren FITC ile konjuge sekonder antikor seçildi. Seçilen sekonder antikor, 1/1000 dilüsyonda PBS-BSA içinde çözülerek kullanıldı. Solüsyon her kullanımdan önce taze hazırlandı. Çekirdek boyaması için DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) içeren kapatma ortamı (Antifade Mounting Medium with DAPI, VECTASHIELD®, cat: H-1200-10, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.

### **3.7.2 İmmünofloresan İşaretleme Protokolü**

Üçüncü pasaja kadar çoğaltılan endometrial stromal hücreler %0,25 tripsin ile kaldırıldıktan sonra immünofloresan işaretleme için 8 kuyulu steril lamlara (Cell Culture Slide 8well, SPL Life Sciences, Güney Kore) her kuyuya 1000 hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde ekildi. Hücrelerin tutunması için 24 saat inkübatörde kültüre edildi. Hücreler tutunduktan sonra DPBS ile yıkandı ve besiyerleri; her grup için hazırlanan indüksiyon besiyerleri ile değiştirildi. Üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günlerin sonunda kuyulardaki besiyerleri boşaltılarak DPBS ile yıkandı. Metanol (Extra pure methanol, Merck, Almanya) ile oda ısısında 5 dk tespit edildi. PBS ile 3 kez yıkandı. BSA içeren PBS içinde 1:200 oranında dilüe edilmiş keçi serumu ile oda sıcaklığında 1 saat serum blokajı yapıldı. Primer antikor olarak CKAP4 polyclonal antibody (Bioss-USA, bs6520R, ABD) kullanıldı. PBS+BSA içinde 1:200 oranında dilüe edilen primer antikor ile hücreler gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ardından PBS ile 3 kez 5 dk yıkandı. Sekonder antikor olarak FITC- Goat-anti rabbit IgG (H+L) (Jackson Immunoresearch, 111-095-003, ABD) kullanıldı. Kuyulardaki hücreler PBS+BSA içinde 1/1000 oranında dilüe edilen

sekonder antikor ile oda sıcaklığında karanlıkta 1 saat bekletildi. 3 kez 5 dk PBS ile yıkandıktan sonra çekirdek işaretlemesi için DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) içeren kapatma ortamı (Antifade Mounting Medium with DAPI, VECTASHIELD®, cat: H-1200-10, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Floresan mikroskopta (Leica DM6B microscope, DFC7000T camera, Almanya) yeşil ve mavi kanalda görüntülendi ve her gruptaki her örnekten X20 büyütmede 7 alan, X40 büyütmede 5 alan ve X63 büyütmede 3 alan fotoğraflandı. İntesite ölçümleri için X20 büyütmede çekilen 7 alan kullanıldı ve her mikrografta minimum 8 ve maksimum 12 hücre mevcuttu. Floresan ışımaya yoğunluğunun sayısallaştırılması için görüntülerin ham verileri Image J (Fiji, 64 bit for Windows NIH, ABD) görüntü analiz yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Ölçümler yalnızca yeşil kanalın ham görüntülerinde, her hücrenin sınırı belirlenerek içinde kalan alanın ortalama ışımaya yoğunluğu ölçülüp, bu ölçümden zemin ışımaya yoğunluğu çıkarılarak analiz gerçekleştirildi. Tüm gruplara ait mikrograflarda ölçümler yapıldıktan sonra ortalamaları alınarak gruplar arası floresan ışımaya yoğunluğu sayısal verileri karşılaştırıldı.

### **3.8 Western Blot yöntemi ile CKAP4 ve PCNA Kantitatif Ölçümü**

Deney gruplarında western blot yöntemi ile CKAP4 ve PCNA kantitatif ölçümü için gruplara ait örneklerden ilk olarak protein izolasyonu, ardından protein ölçümü, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile proteinlerin yürütülmesi, membrana aktarılması, işaretlenmesi ve görüntüleme sistemi ile görüntülendikten sonra bant analizleri yapılmıştır. Bu basamakların detayları aşağıda ilgili bölümlerde açıklanmıştır.

#### **3.8.1 Western Blot Analizi için Protein İzolasyonu**

Protein izolasyonu için 6 kuyulu plaklara kuyu başına 4. pasajdaki 200.000 hücre ekilerek deneye başlandı. Hücreler tutunduktan sonra her grup için ayrı hazırlanan E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP içeren komplet besiyerleri ile hücreler 36 saatte bir beslendi. Üçüncü, altıncı ve dokuzuncu günlerin sonunda besiyerleri toplanarak hücreler PBS ile yıkandı. Ardından buz üzerinde soğuk PBS ve kazıyıcı yardımı ile 6 kuyulu plakların yüzeyinden hücreler kazınarak 15 ml santrifüj

tüplerinde toplandı. Tüpler 1200 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi ve oluşan pelet 1 ml PBS içerisinde çözüldü. Çözülen pelet 2 ml tüplere aktarıldı ve tekrar 1200 rpm'de 5 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre peletinden total protein izolasyonu liziz tampon kullanılarak yapıldı.

Total protein izolasyonu için 6 ml liziz tampon (final konsantrasyonları; 50mM Tris-HCL pH 7.4, 150 µM NaCl, 1 mM EDTA, %0.5 TritonX-100, %0.5 NP-40, %10 Gliserol, 1 mM PMSF, 10 mM β-gliserofosfat, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1x Proteaz inhibitörü (ProteoGuard EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail, Cat#635673, Takara, Japonya) olacak şekilde buz üzerinde karıştırılıp) 4032 µl filtrelenmiş distile su ile seyreltilerek hazırlandı. Elde edilen hücre peletine hazırlanan soğuk 1X liziz tamponu eklendi. Liziz tamponlu hücre peleti 10 dk'da bir vortekslenerek 40 dk kadar buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüpler, 1000 g'de 5 dk santrifüjlendi ve süpernatant kısmı yeni 2 ml'lik tüplere alındı. Örnekler kullanıma kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.8.2 BCA ile Protein Konsantrasyonu Belirleme

Protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması için BCA kit (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, 23225, Thermo Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı. Standartlar, firmanın belirlediği çeşitli konsantrasyonlarda BSA solüsyonu kullanılarak hazırlandı (**Tablo 3.3.**). Hazırlanan standartlar 25 µl miktarda 96 kuyulu plağa sırasıyla alındı. Liziz tampon ile hazırlanan örneklerden 10'ar µl alınarak 96 kuyulu plağa eklendi ve üzerlerine kitte bulunan A ve B solüsyonu 50:1 oranında karıştırılıp hazırlanarak 200'er µl eklendi. 37°C'de 30 dk inkübe edildikten sonra 96 kuyulu plak mikrolaka okuyucuda (Versamax microplate reader, Molecular Devices) 450 nm'de okutuldu.

**Tablo 3.3. BSA protein standartları**

Standartlar	dH <sub>2</sub> O (µl)	BSA (µl)	Final BSA konsantrasyonu (µg/ml)
A	0	300	2000
B	125	375	1500
C	325	325	1000
D	175	175 (B solüsyonundan)	750
E	325	325 (C solüsyonundan)	500
F	325	325 (E solüsyonundan)	250
G	325	325 (F solüsyonundan)	125
H	400	100 (G solüsyonundan)	25
I	400	0	0 (Blank)

### 3.8.3 SDS-PAGE

BCA ile total protein ölçümü sonrası konsantrasyonları belirlenen protein ekstraktları, SDS-PAGE ile ağırlıklarına göre ayrıldı. Protein yürütme işlemi için %10 jel **Tablo 3.4.**'de belirtilen konsantrasyonlarda hazırlandı.

**Tablo 3.4. %10 Ayırıcı Jel ve %5 Toplayıcı Jel hazırlamak için kullanılan solüsyonlar**

Solüsyonlar	Ayırıcı Jel (%10) (20 ml)	Toplayıcı Jel (%5) (5 ml)
%30 akrilamid/Bisakrilamid (BioShop, Kanada)	6.7	0.83
1.5M Tris-HCl pH 8.8	5	-
1.0M Tris-HCl pH6.8	-	0.63
%10 SDS	0.2	0.05
ddH <sub>2</sub> O	7.9	3.4
%10 Amonyum Persülfat (APS)	0.2	0.05
TEMED	0.0008	0.005

Daha önce belirlenen protein konsantrasyonlarıyla 20 µg protein örnekleri 4x Laemmli tampon (4x Laemmli Sample Buffer, #1610747, BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) ile hazırlandı ve 95°C 5 dk inkübe edildi. Örnekler daha sonra jelin her bir kuyusuna, ilk kuyuya protein marker (GeneDirex, PM007-0500, Amerika Birleşik Devletleri) koyularak yüklendi. Jel, yürütme tamponu ile 120V'da yaklaşık 90 dk yürütüldü. Proteinler, önceden metanol ile aktive edilmiş ve transfer tamponu ile ıslatılmış PVDF (polivinilidenflorit) membranına (Transblot- turbo mini size PVDF

membrane- L002045A, BioRad, Amerika Birleşik Devletleri) Trans-blot turbo transfer sistem (Biorad, Amerika Birleşik Devletleri) ile 25V'da 7 dk yürütülerek transfer edildi. Transferden sonra, spesifik olmayan bağlanmaları önlemek amacıyla membranlar %5 süt tozu (BioRad, 170-6404, Amerika Birleşik Devletleri) ile 90 dk çalkalayıcı üzerinde oda ısısında inkübe edilerek blokaj uygulandı. Membranlar TBS-T (Tris tamponlu solüsyon + Triton-X) ile 3 kez 5 dk yıkandıktan sonra primer antikolar ile (CKAP4 (BiossUSA, BS6520R) 1:1000, PCNA (CST,2586) 1:1000,  $\beta$ -aktin (Sigma, A4700) 1:1000 dilüsyonlarda blok solüsyonu seyreltilerek hazırlandı) gece boyu +4°C'de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Membranlar ertesi sabah TBS-T ile 5 kez 5 dk yıkandıktan sonra 1:2500 dilüsyonda hazırlanan anti-rabbit (Cytivia, NA934V) ve anti-mouse (Cytivia, NA931V) HRP konjuge sekonder antikoları ile 70 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. TBS-T ile yıkandıktan sonra kemilüminesans kit (western enhanced chemiluminescence (ECL) kit, Thermo Fisher, 34095) ile 5 dk inkübe edildi. Membranlar Biorad ChemiDoc Touch görüntüleme sistemiyle ile görüntülendi. Elde edilen protein bantlarının yoğunlukları Biorad Image Lab programıyla ölçüldü ve  $\beta$ -aktin ile normalize edildi.

### 3.9 İstatistiksel Analiz

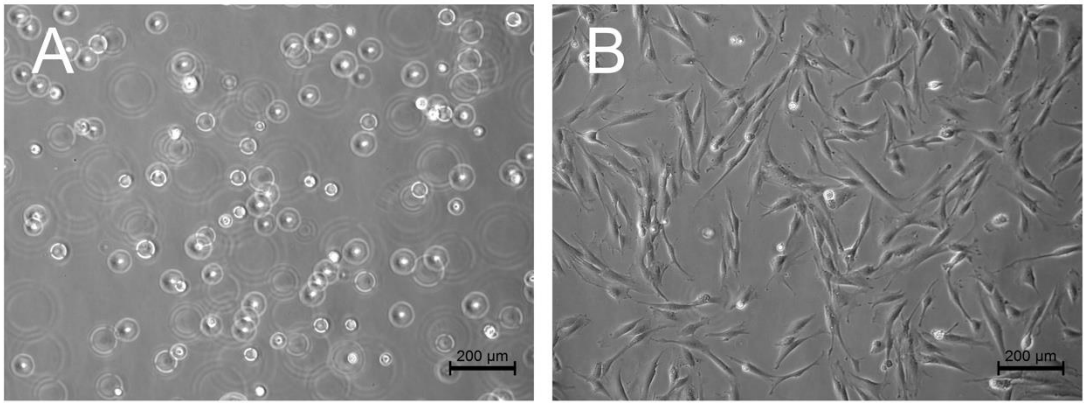
Tüm iş paketlerine ait bağımlı ve bağımsız sayısal değişkenlerin dağılımı normallik testleri ( $n < 50$  ise Shapiro-Wilk,  $n \geq 50$  ise Kolmogorov-Smirnov normallik testi) ve grafikler (histogram, kutu ve çizgi grafiği) ile incelenmiştir. Tanımlayıcı istatistikler normal dağılım göstermeyen değişkenler için ortanca, 25. yüzdeler, 75. Yüzdeler olarak verilmiştir. Parametrik test varsayımları sağlanmadığı için ikiden fazla bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalar Kruskal Wallis testi ile, ikiden fazla bağımlı grup arasındaki karşılaştırmalar Friedman testi kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasında anlamlı fark bulunması durumunda İkili Karşılaştırma Testleri (Pairwise comparison ikili karşılaştırma testi) kullanılarak farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı incelenmiştir. Sito-ELISA ve immünofloresan intensite ölçümlerinde örneklem genişliği %99 güç ile çalışılırken, akım sitometri ve western blot verilerinde %95, PRL-ELISA verilerinde %92 güç ile deneyler yapılmıştır. Analizler için IBM SPSS Statistics V23 programı kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1 Ölümsüzleştirilmiş hESC Hücre Hattı Hücrelerinin Faz Kontrast Mikroskobu ile İncelenmesi

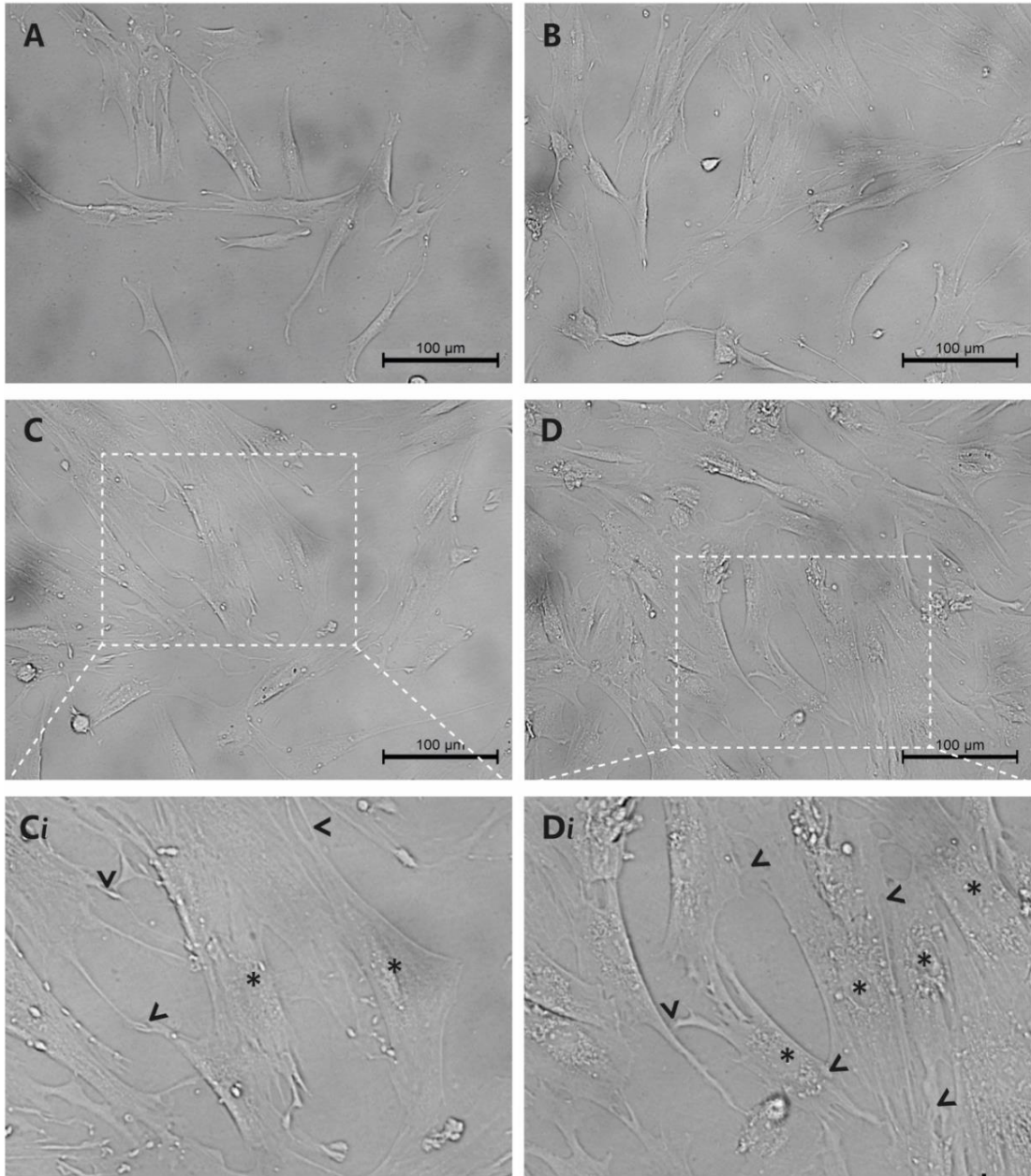
Ticari olarak alınıp soğuk zincirde temin edilen hESC hücre hattı, üretici firmanın önerdiği protokol uygulanarak hücre kültürü laboratuvarında laminar akım kabini içinde çözüldükten sonra flasklara ekildi. Hücrelerin ekim yapıldıktan hemen sonraki değerlendirmelerinde (0. Saat) yuvarlak morfolojide ve farklı seviyelerde tutunmamış hücreler izlendi. İnkübatöre alınan ve hareketsiz şekilde 24 saat inkübe edilen flaskların, ekiminden 24 saat sonra yapılan faz kontrast mikroskopi kontrollerinde ise hESC hücrelerinin flask tabanına tutunarak iğsi morfoloji kazandığı gözlemlendi (**Şekil 4.1.**).



**Şekil 4.1. hESC hücre hattına ait hücrelerinin faz kontrast mikrografları.** hESC hücrelerinin çözülüp ekildikten hemen sonra (0. saatte) yapılan incelemesinde flask tabanına tutunmamış, yuvarlak hücreler izlenirken 24. saatte flask tabanına tutunmuş iğsi hücreler izlenmektedir. hESC hücre hattı hücreleri (A) 0.saat, (B) 24.saat (Faz Kontrast, x200)

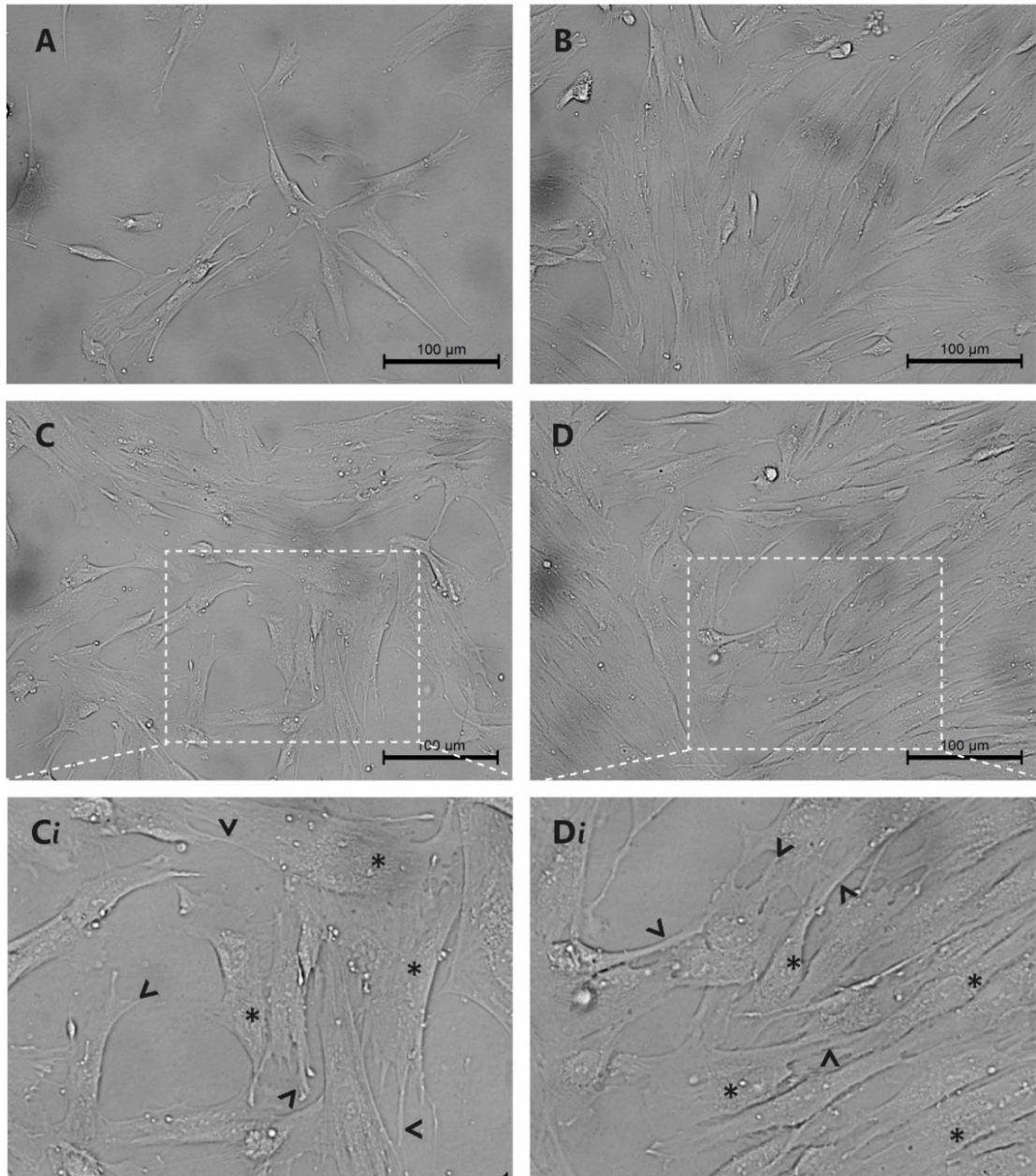
Deney grupları için yeterli sayıda hücre, pasaj 4'e kadar kültürde çoğaltıldıktan sonra hücreler sadece komplet besiyeri veya östrojen ( $10^{-8}$  M E2), progesteron ( $10^{-7}$  MPA), cAMP (0,5 mM), östrojen+progesteron ( $10^{-8}$  M E2 +  $10^{-7}$  M MPA) ve östrojen+progesteron+cAMP ( $10^{-8}$  M E2+  $10^{-7}$  M MPA+ 0.5 mM cAMP) içeren besiyerleri ile 3, 6 ve 9 gün boyunca 36 saatte bir beslenerek sırasıyla kontrol, E2, MPA, E2+MPA, cAMP, E2+MPA+cAMP grupları oluşturuldu.

Kontrol grubundaki hücreler faz kontrast mikroskobunda incelendiğinde iğsi morfolojide, sitoplazmik uzantılar geliştirerek kültür kabına ve birbirine tutunan fibroblast benzeri hücreler gözlendi. Hücreler merkezi yerleşimli iğsi çekirdekleri ve şeffaf sitoplazmaları ile ayırt edildi. Ardışık 1., 3., 6. ve 9. günlerde yapılan incelemelerde hücrelerde sayıca artış saptandı. İzlenen 9 gün boyunca hücrelerin iğsi formunu koruduğu ve sayıca artışa ek birbirleri ile tutunma bölgelerinin arttığı gözlendi (**Şekil 4.2.**).



**Şekil 4.2. Kontrol grubu hESC'lerin faz kontrast mikrografları.** Flask tabanına tutunan iğsi hücrelerin takip edilen günlerde bir önceki değerlendirme gününe oranla sayısı arttığı, hücreler arasındaki boşlukların kapandığı, hücrelerin 9 gün boyunca iğsi morfolojiyi koruduğu izlenmektedir. Yıldızlar endometrial stromal hücrelere ait şeffaf sitoplazmaları, ok başları hücresel sitoplazmik uzantıları ve birbirlerine tutunma noktalarını göstermektedir. Kontrol grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (Ci) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü, (D) 9.gün, (Di) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü (Faz Kontrast, x200)

Östrojen ( $10^{-8}$ M E2) ile muamele edilmiş hESC grubunun faz kontrast mikroskop değerlendirmesinde, kontrol grubuna benzer şekilde, ilerleyen gün sayısı ile hücre sayısında artış olduğu ve hücrelerin başlangıçtaki iğsi formunu korudukları saptandı. Hücre sitoplazmaları saydam ve homojen görünümde izlendi. Hücresel uzantılarda ve hücrelerin birbirine olan tutunma bölgelerinde 3. günden itibaren artış gözlemlendi (**Şekil 4.3.**).

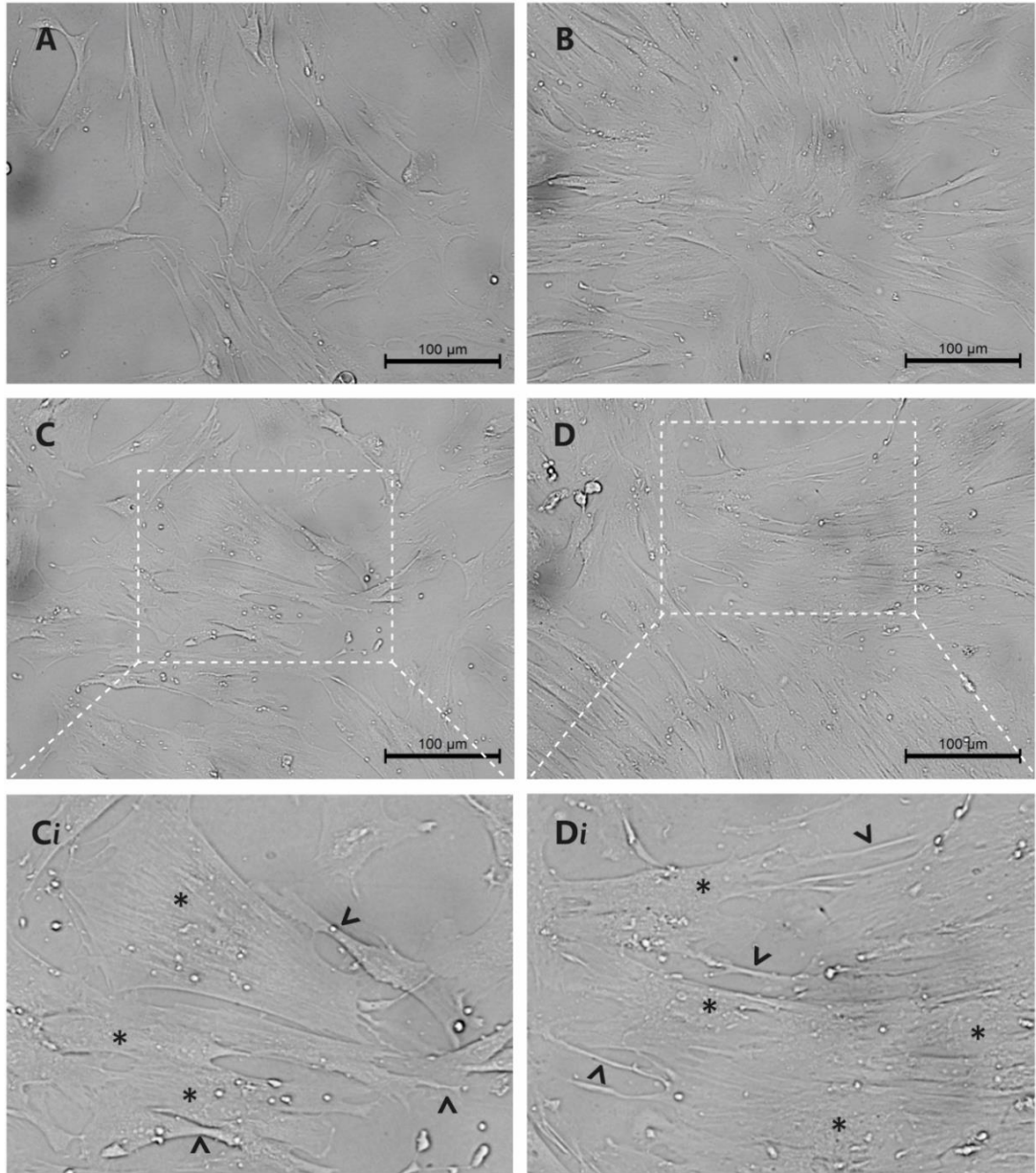


**Şekil 4.3.** Östrojen ile muamele edilmiş hESC (E2) grubunun faz kontrast mikrografları. E2 grubunda hücrelerin iğsi morfolojiyi koruduğu, hücre sayılarında

hücrel uzantılarda ve hücrelerin birbirine olan tutunma bölgelerinde 3. günden itibaren artış izlenmektedir. Yıldızlar endometrial stromal hücrelere ait şeffaf sitoplazmaları, ok başları hücrel sitoplazmik uzantıları ve birbirlerine tutunma noktalarını göstermektedir. E2 grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (C<sub>i</sub>) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü, (D) 9.gün, (D<sub>i</sub>) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü (Faz Kontrast, x200)

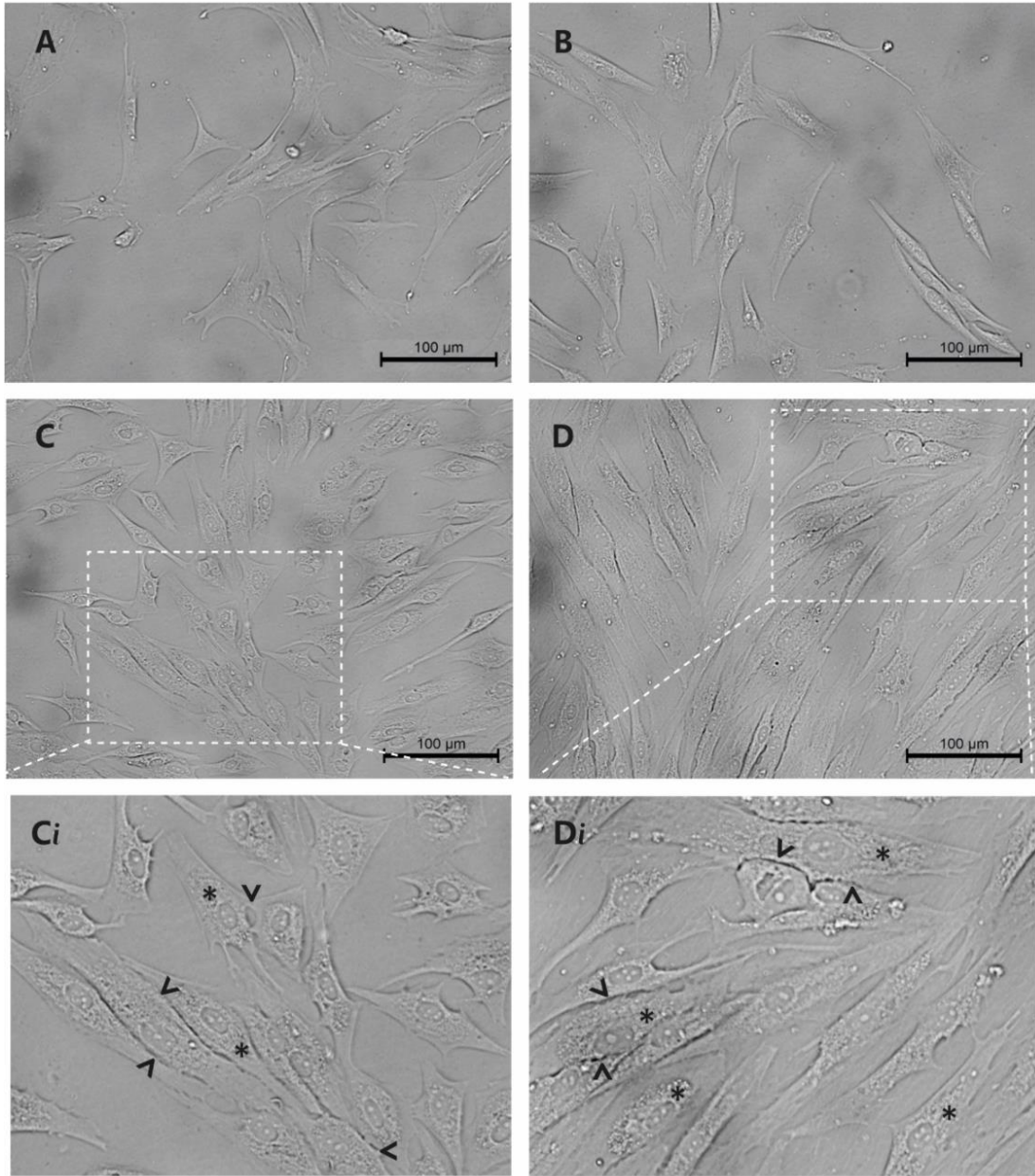
Progesteron ( $10^{-7}$ M MPA) ile muamele edilmiş hESC grubunun faz kontrast değerlendirmesinde, önceki iki gruba benzer şekilde artan gün sayısı ile hücre sayısında artış olduğu gözlemlendi. Hücrelerin deney süresince iğsi formunu korudukları ve hücrel uzantılara sahip olduğu saptandı. Hücre sitoplazmaları berrak ve homojen izlendi (**Şekil 4.4.**).





**Şekil 4.4. Progesteron ile muamele edilmiş hESC (MPA) grubunun faz kontrast mikrografları.** MPA grubunda hücrelerin birbirini takip eden günlerde iğsi formu korudukları, hücreler arası mesafenin kapandığı ve hücresel uzantılarının arttığı izlenmektedir. Yıldızlar endometrial stromal hücelere ait şeffaf sitoplazmaları, ok başları hücresel sitoplazmik uzantıları göstermektedir. MPA grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (Ci) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü, (D) 9.gün, (Di) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü (Faz Kontrast, x200)

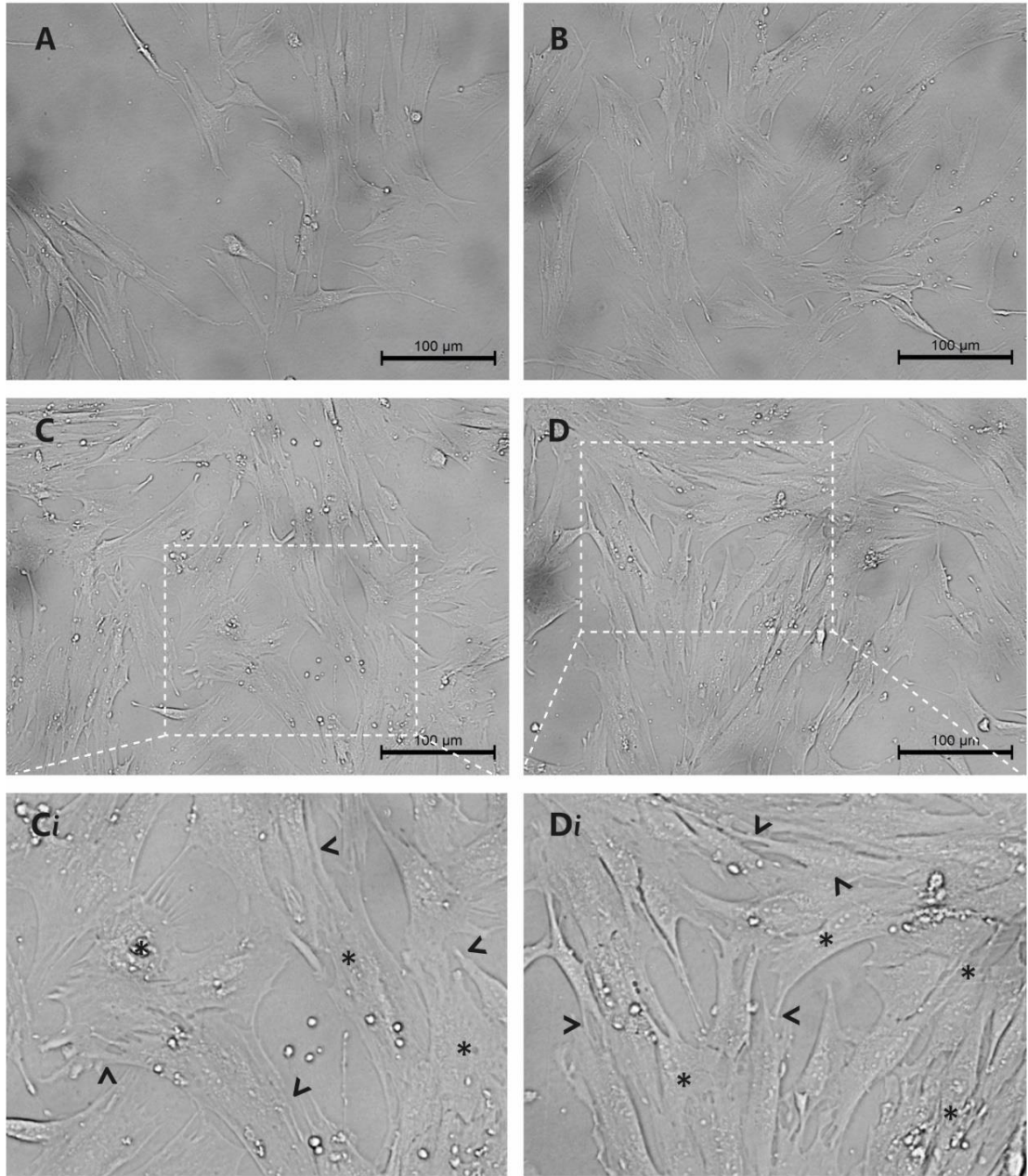
cAMP (0.5 mM cAMP) uygulanmış hESC grubunun faz kontrast mikroskop incelemesinde 3. günde hücrelerin uzantılarının sayıca azaldığı gözlemlendi. Altıncı ve 9. gün değerlendirmelerinde ise hücre morfolojisinin iğsi formdan daha poligonal bir forma değiştiği saptandı. Hücrelerin sitoplazmalarında perinükleer alanda 3. günden itibaren yoğunluk artışı izlendi. Daha dens görülen perinükleer alan desidualizasyonda beklenen protein sentez artışına sekonder endoplazma retikulum, Golgi aparatı, mitokondri gibi organellerin yoğunlaştığı alanlar olarak değerlendirildi. Bu alanlarda görülen daha yüksek dansite gösteren noktalanmalar ise genişlemiş endoplazma retikulumu sisternaları lehine yorumlandı. Altıncı ve 9. günde incelenen poligonal görünümlü hücrelerin birbirlerine temas ettiği yüzeylerin ve bağlantı alanlarının arttığı saptandı (**Şekil 4.5.**). Hücrelerin çekirdeklerinde nükleolus sayısında artış ve bazı hücrelerde çift çekirdek varlığı gözlemlendi.



**Şekil 4.5. cAMP ile muamele edilmiş hESC (cAMP) grubunun faz kontrast mikrografları.** Birinci gün değerlendirmesinde fibroblast formunda iğsi hücreler gözlenirken, 3. günde hücrelerin sitoplazmik uzantılarının sayıca azaldığı ve perinükleer yoğunlaşmanın başladığı izlenmektedir. Altıncı ve 9. günlerde hücrelerin poligonal forma diferansiyasyonu ve perinükleer dansite artışı dikkat çekmektedir. Yıldızlar desidualize endometrial stromal hücre sitoplazmalarında perinükleer dansite artışını, ok başları hücrelerin birbirleri ile olan bağlantı noktalarını göstermektedir. cAMP grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (Ci) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (D) 9.gün, (Di) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Faz Kontrast, x200)



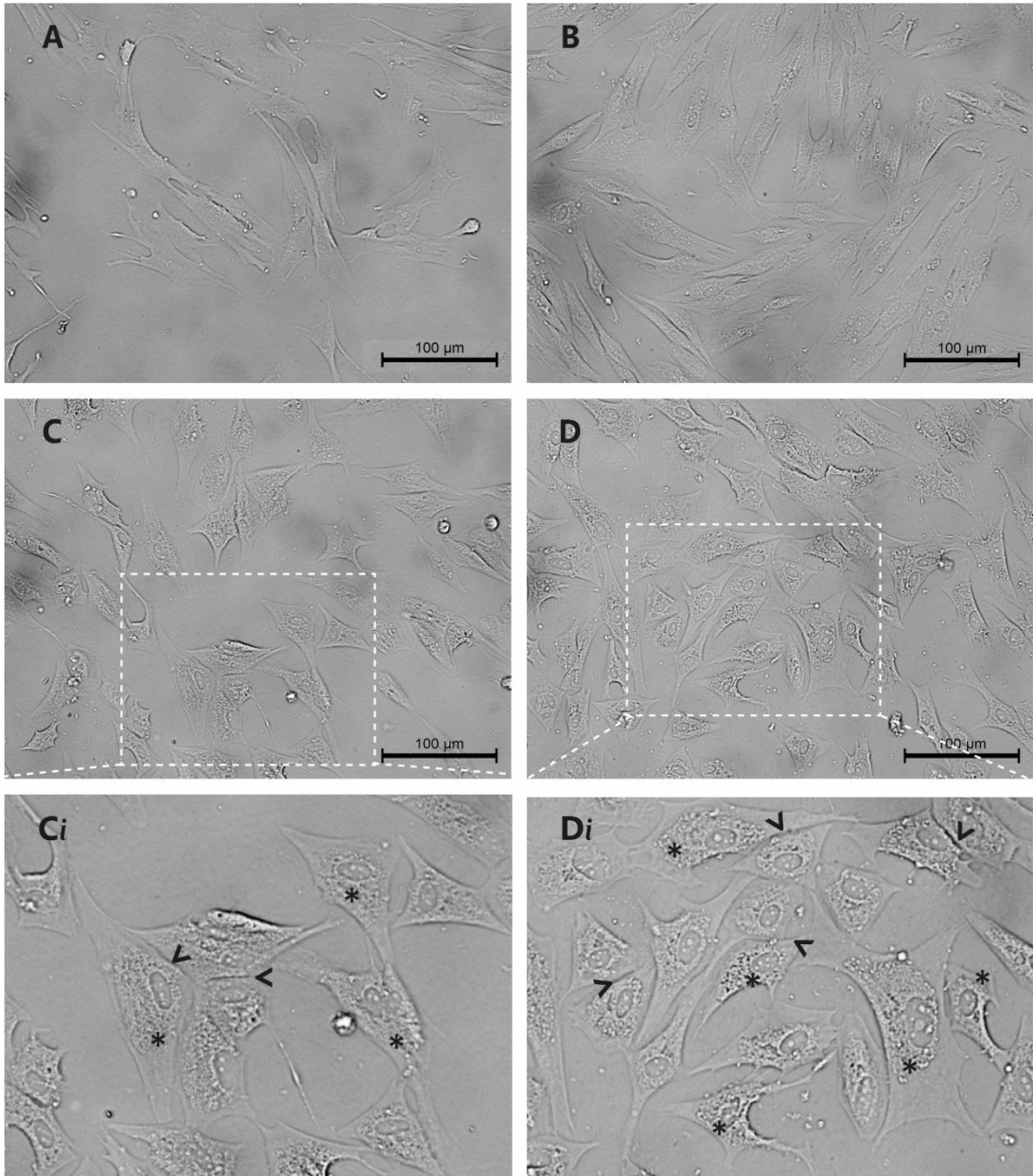
Östrojen ve progesteron ( $10^{-8}$ M E2+  $10^{-7}$ M MPA) uygulanmış hESC grubunun faz kontrast değerlendirmesinde, birbirini takip eden günlerde hücre sayısında artış olduğu ve bu artışa sekonder hücreler arası boşlukların kapandığı gözlemlendi. Hücrelerin içi morfolojiyi ilk değerlendirmeden son değerlendirme gününe kadar korudukları ve ilerleyen günlerde artmış hücrel sitoplazmik uzantılara sahip oldukları saptandı (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6. Östrojen ve progesteron ile muamele edilmiş hESC (E2 + MPA) grubunun faz kontrast mikrografları. Hücrelerin birbirini takip eden günlerde içi formu**

korudukları, hücreler arası mesafenin kapandığı ve hücresel uzantılarının arttığı izlenmektedir. Yıldızlar endometrial stromal hücrelere ait şeffaf sitoplazmaları, ok başları hücresel sitoplazmik uzantıları göstermektedir. E2 + MPA grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (Ci) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (D) 9.gün, (Di) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Faz Kontrast, x200)

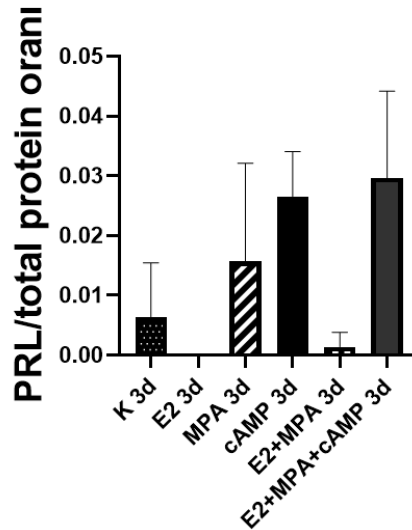
Östrojen, progesteron ve cAMP ( $10^{-8}M$  E2+  $10^{-7}M$  MPA+ 0.5mM cAMP) ile muamele edilmiş hESC grubunun faz kontrast mikroskop incelemesinde 3. günden itibaren hücre uzantılarının sayıca azaldığı gözlenirken; 6. gün ve sonrasında hücrelerin poligonal morfolojiye farklandığı saptandı. Hücrelerin perinükleer sitoplazmalarında 3. günden itibaren yoğunluk artışı belirlendi. Daha yoğun görülen perinükleer alanlar, cAMP grubundakine benzer şekilde desidualize hücrelerdeki protein sentez artışına sekonder organellerin yoğunlaştığı alanlar ve genişlemiş ER sisternaları olarak değerlendirildi. Altıncı ve 9. günde gözlenen poligonal formdaki desidualize hESC'lerin birbirleri ile temas ettiği yüzey ve bağlantı alanlarının arttığı saptandı (**Şekil 4.7.**). Çift çekirdekli hücrelerin varlığı ve hücre çekirdeklerinde nükleolus sayılarında artış gözlemlendi.



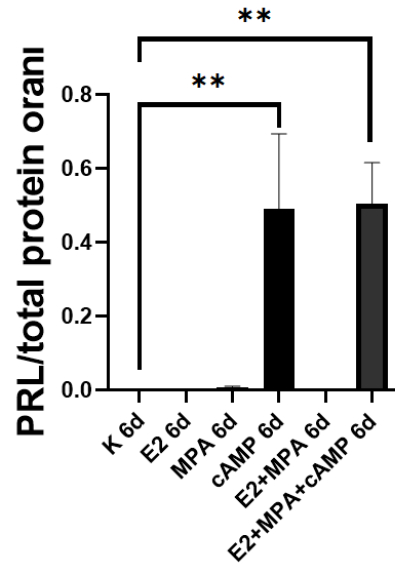
**Şekil 4.7. Östrojen, progesteron ve cAMP ile muamele edilmiş hESC (E2 + MPA + cAMP) grubunun faz kontrast mikrografları.** Hücrelerin 1. gün değerlendirmesinde fibroblast benzeri iğsi form gözlenirken, 3. günde hücrelerin sitoplazmik uzantılarının sayıca azaldığı ve perinükleer yoğunlaşmanın başladığı izlenmektedir. Altıncı ve 9. günlerde hücrelerin poligonal forma diferansiyasyonu ve perinükleer dansite artışı dikkat çekmektedir. Yıldızlar desidualize endometrial stromal hücre sitoplazmalarında perinükleer dansite artışını, ok başları hücrelerin birbirleri ile olan bağlantı yüzeylerini ve noktalarını göstermektedir. E2 + MPA + cAMP grubu (A) 1.gün, (B) 3.gün, (C) 6.gün, (C<sub>i</sub>) 6. güne ait mikrografta (C) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü, (D) 9.gün, (D<sub>i</sub>) 9. güne ait mikrografta (D) dikdörtgen ile işaretli alanın büyütülmüş görüntüsü (Faz Kontrast, x200)

#### 4.2 Hücre Süpernatantında Prolaktin ELISA Ölçümünün Değerlendirilmesi

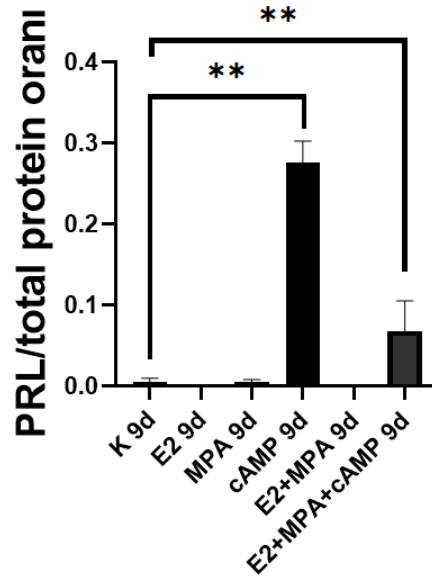
Desidualizasyona özgü hücre morfolojilerindeki değişikliklerin değerlendirilmesinden sonra bu değişimler K, E2, MPA, cAMP, E2 + MPA ve E2+MPA+cAMP gruplarının süpernatantlarındaki PRL miktarları ELISA yöntemi ile ölçülerek biyokimyasal olarak da desteklendi. Standardizasyonun sağlanması açısından her gruba ait süpernatantlardan total protein miktarları da BCA protein ölçüm kiti ile ölçülerek saptanan PRL miktarları total proteinlere oranlandı ve karşılaştırmalar yapıldı. Grupların 3. güne ait PRL/total protein oranları değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (**Şekil 4.8.**). Altıncı güne ait ölçümler değerlendirildiğinde ise desidualize hücrelerin gözlendiği cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrol grubuna oranla PRL/total protein oranının anlamlı şekilde yükseldiği saptandı (sırasıyla  $p=0.0022$ ,  $p=0.0026$ , **Şekil 4.9.**). Dokuzuncu gün değerlendirmesinde ise cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarının her ikisinde de PRL/total protein oranlarının 6. güne göre azaldığı saptanmakla birlikte, kontrol grubu ile olan karşılaştırmalarında iki grupta da anlamlı fark olduğu bulundu (sırasıyla  $p=0.0011$ ,  $p=0.0022$ , **Şekil 4.10.**).



**Şekil 4.8. Deney gruplarında 3. güne ait PRL/total protein oranları.** MPA, cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda 3.günde PRL de hafif artış olmakla birlikte bu gruplardaki PRL/total protein oranları ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır.



**Şekil 4.9. Deney gruplarında 6. güne ait PRL/total protein oranları.** cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan grupların 6. güne ait örneklerinde PRL artmıştır ve bu gruplardaki PRL/total protein oranları, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır. \*\* $p \leq 0.01$ .

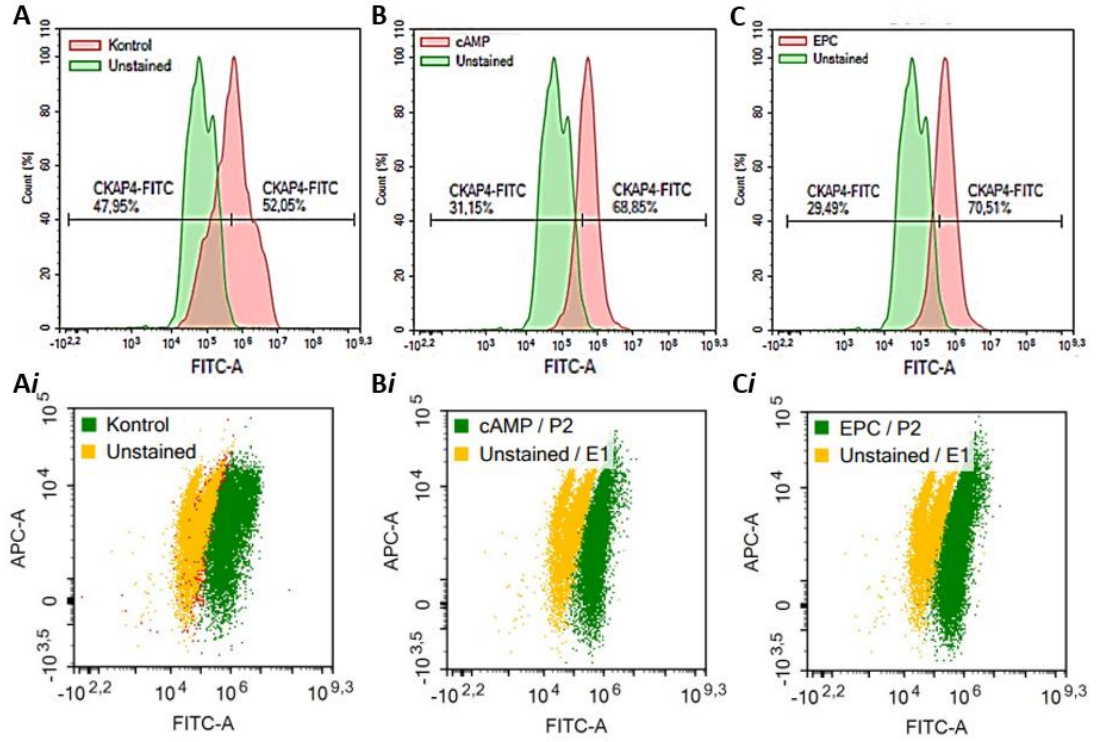


**Şekil 4.10. Deney gruplarında 9. güne ait PRL/total protein oranları.** cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan grupların 9. güne ait örneklerinde PRL artmıştır. Bu gruplardaki PRL/total protein oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış kontrole göre istatistiksel olarak anlamlıdır. \*\* $p \leq 0.01$ .

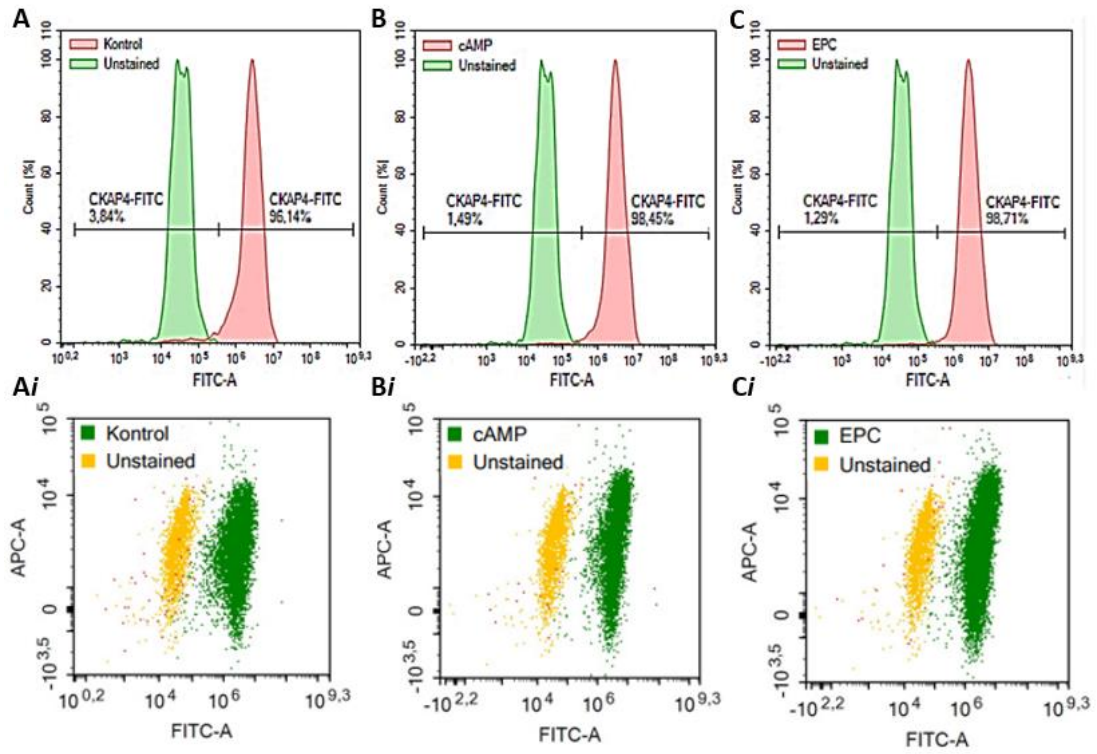
### 4.3. CKAP4 Varlığının Akım Sitometri Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Hücre kültüründe çoğaltıldıktan sonra hücre morfolojik görünüşleri ve PRL ölçümü ile desidualize olduğu kanıtlanan 6. güne ait kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında CKAP4 immün ifadesinin hücre yüzeyi ve hücre içi değerlendirilmesi için akım sitometri yöntemi kullanıldı. Kontrol grubu ile cAMP ve E2+MPA+ cAMP grupları hücre boyutu ve granül yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde akım sitometrisinde cAMP ve E2+MPA+ cAMP gruplarında grafikte sağa kayma ile bu gruplarda hücre boyutunun arttığı saptandı. Hücre yüzeyinde CKAP4 işaretlenmesi gösteren hücre yüzdesi, Triton-X uygulanmayan kontrol grubunda %52,05-54,86, cAMP grubunda %68,27-68,85, E2+MPA+cAMP grubunda ise %69,79-70,51 olarak saptandı (**Şekil 4.11.**). Triton-X uygulaması sonrası ise oranların kontrol grubunda %96,14-96,93, cAMP grubunda %97,94-98,45, ve E2+MPA+cAMP grubunda %98,71-98,75 olduğu belirlendi (**Şekil 4.12.**). Triton-X uygulanmadan yüzey işaretleme yapılan cAMP ve E2+MPA+ cAMP gruplarında CKAP4 pozitif hücre yüzdesi kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (Sırasıyla  $p=0,0022$ ,  $p=0,0022$ , **Şekil 4.13.**). Triton-X uygulanan gruplarda ise istatistiksel açıdan fark gözlenmedi (**Şekil 4.13.**). Triton-X uygulanmayan ve uygulanan gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında (kontrol ile Triton-X uygulaması yapılan kontrol, cAMP ile Triton-X uygulaması yapılan cAMP ve E2+MPA+ cAMP ile Triton-X uygulaması yapılan E2+MPA+ cAMP) Triton-X uygulaması sonrası CKAP4 pozitif hücre yüzdesinin uygulanmayanlara göre daha fazla olduğu belirlendi. Yüzdeler arasındaki fark istatistiksel anlamlı idi (Sırasıyla  $p=0,031$ ,  $p=0,031$ ,  $p=0,031$ , **Şekil 4.13.**).



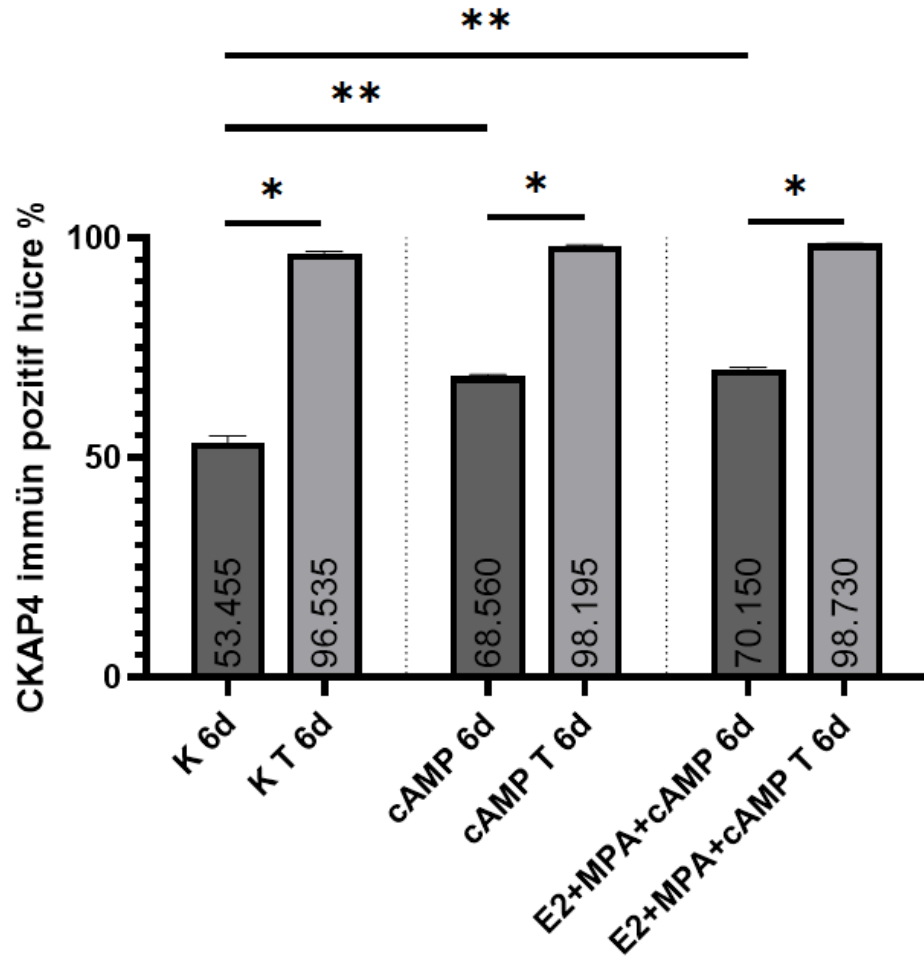


**Şekil 4.11.** Triton-X ile permeabilize edilmeyen hESC'lerde 6. güne ait kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında CKAP4 pozitif hücrelerin değerlendirilmesine ait grafikler. cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole oranla daha fazla hücrede hücre yüzeyinde pozitif CKAP4 işaretlenmesi belirlenmiştir. Kontrol grubu (A) 6. gün histogramı, (Ai) 6. gün nokta grafiği, cAMP grubu (B) 6. gün histogramı, (Bi) 6. gün nokta grafiği, E2+MPA+cAMP grubu (C) 6. gün histogramı, (Ci) 6. gün nokta grafiği.



**Şekil 4.12.** Triton-X ile permeabilize edilen hESC'lerde 6. güne ait kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında hücre içi ve hücre membranında CKAP4 pozitif hücrelerin değerlendirilmesine ait grafikler. Permeabilizasyon sonrası tüm gruplarda CKAP4 pozitif hücre yüzdesi benzer olarak saptanmıştır. Kontrol grubu (A) 6. gün histogramı, (Ai) 6. gün nokta grafiği, cAMP grubu (B) 6. gün histogramı, (Bi) 6. gün nokta grafiği, E2+MPA+cAMP grubu (C) 6. gün histogramı, (Ci) 6. gün nokta grafiği.





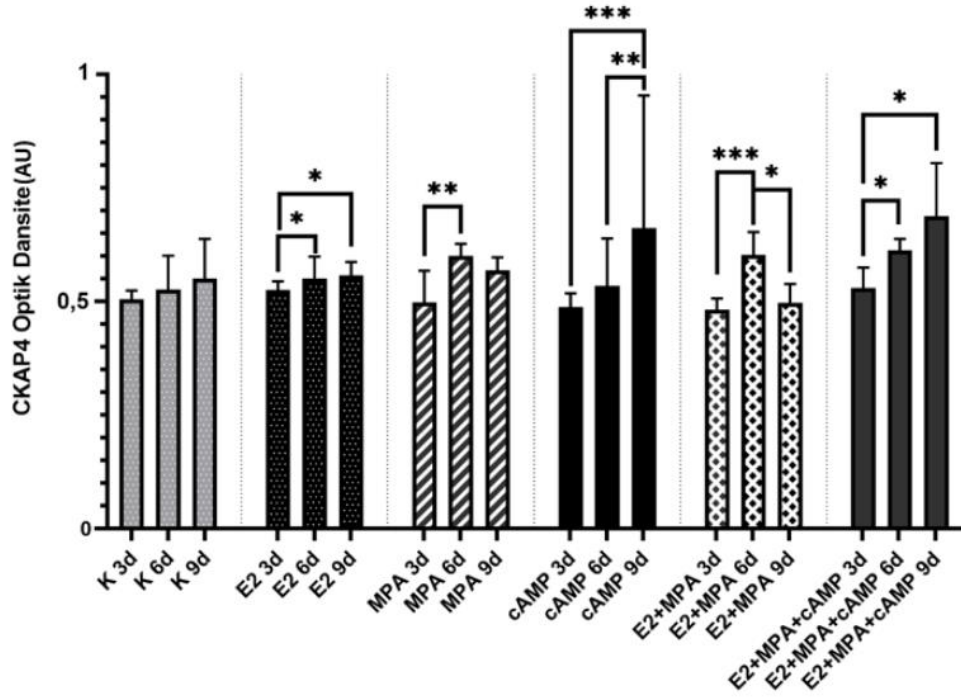
**Şekil 4.13.** Kontrol, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarının 6.güne ait örneklerinde Triton-X uygulanmadan ve uygulanarak CKAP4 immün reaktivitesinin değerlendirilmesi. Gruplar yüzey işaretlenmesi açısından değerlendirildiğinde cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole göre anlamlı fark saptanırken, hücre içi işaretlenme oranları karşılaştırıldığında ise gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Gruplarda Triton-X uygulaması yapılan ve yapılmayan ölçümlerdeki farklar ise istatistiksel anlamlı bulunmuştur. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

#### 4.4 CKAP4 Miktarının Sito-ELISA Yöntemi ile Değerlendirilmesi

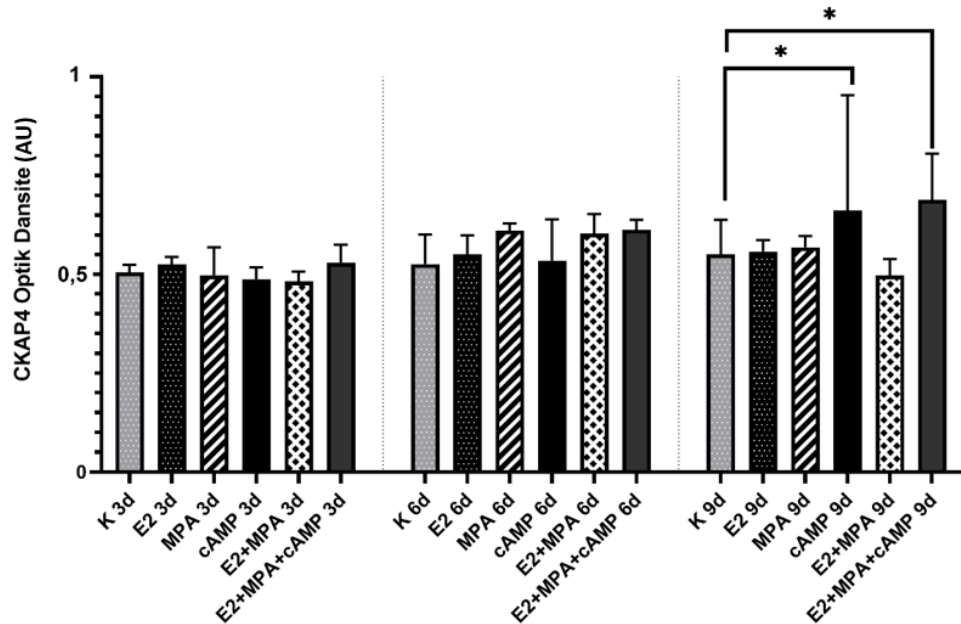
Hücre kültüründe çoğaltılmış ve planlandığı gibi 6 gruba ayrılmış hücrelerde 3., 6. ve 9. günlerde CKAP4 immün reaktivitesi sito-ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Kontrol grubunda birbirini takip eden günlerde optik dansite artışı gözlenmiş ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ( $p=0,173$ , **Şekil 4.14.**). Bu durumun artan hücre sayısı ile ilintili olduğu düşünülmüştür. Östrojen ile muamele

edilen ESC (E2) grubunda da benzer şekilde birbirini takip eden ölçümlerde yükselme saptanmıştır. Altı ve 9 gün E2 uygulanan her iki grup da 3 gün E2 uygulaması yapılan grup ile anlamlı fark göstermiştir (sırasıyla  $p=0.004$ ,  $p=0.016$ , **Şekil 4.14.**). Progesteron uygulanan ESC (MPA) grubunda ise progesteron uygulamasının 3. gününden 6. gününe kadar CKAP4 immün reaktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmıştır ( $p=0,006$ , **Şekil 4.14.**). Bu artışı 9. günde CKAP4 immün reaktivitesinde azalma izlemiştir. MPA grubunda 6. günden 9. güne gözlenen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde saptanmamıştır ( $p=0,368$ ). Östrojen ve progesteron ile muamele edilen ESC (E2+MPA) grubunda da MPA grubuna benzer şekilde optik dansite ölçümünde 6. günde pik saptanmış ve bunu takip eden 9.gün ölçümünde CKAP4 immün reaktivitesinde azalma göze çarpmıştır. E2+MPA grubunda 3. güne kıyasla 6. gün ölçümlerindeki yükselme ve 9. gün ölçümlerinde 6. güne göre saptanan düşüşün her ikisinin de istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,018$ , **Şekil 4.14.**). cAMP uygulanan ESC (cAMP) grubunda ise yapılan sıralı ölçümlerde CKAP4 immün reaktivitesinin ilerleyen gün sayısı ile peyderpey arttığı saptanmış olup; özellikle 9.gün ölçümlerinde artışın fazlalığı göze çarpmıştır. cAMP grubunun 9. gün ölçümlerindeki artışın hem 3. güne hem de 6. güne göre anlamlı olduğu saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,010$ , **Şekil 4.14.**). Östrojen, progesteron ve cAMP verilen ESC (E2+MPA+cAMP) grubunun CKAP4 optik dansite ölçümü de cAMP grubunun ölçümlerine benzer şekilde 3., 6. ve 9. günlerde artarak devam etmiş ve hem 6 hem de 9. gün ölçümlerindeki artışın 3. gün ölçümüne göre anlamlı düzeyde olduğu bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,041$ ,  $p=0,026$ , **Şekil 4.14.**).

Üçüncü ve altıncı günlere ait deney gruplarının CKAP4 optik dansite ölçümleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark gözlenmemiştir. Dokuzuncu gün verileri değerlendirildiğinde; cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan grupların her ikisinin de CKAP4 optik dansitesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde yüksek saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,015$ ,  $p=0,030$ , **Şekil 4.15.**).



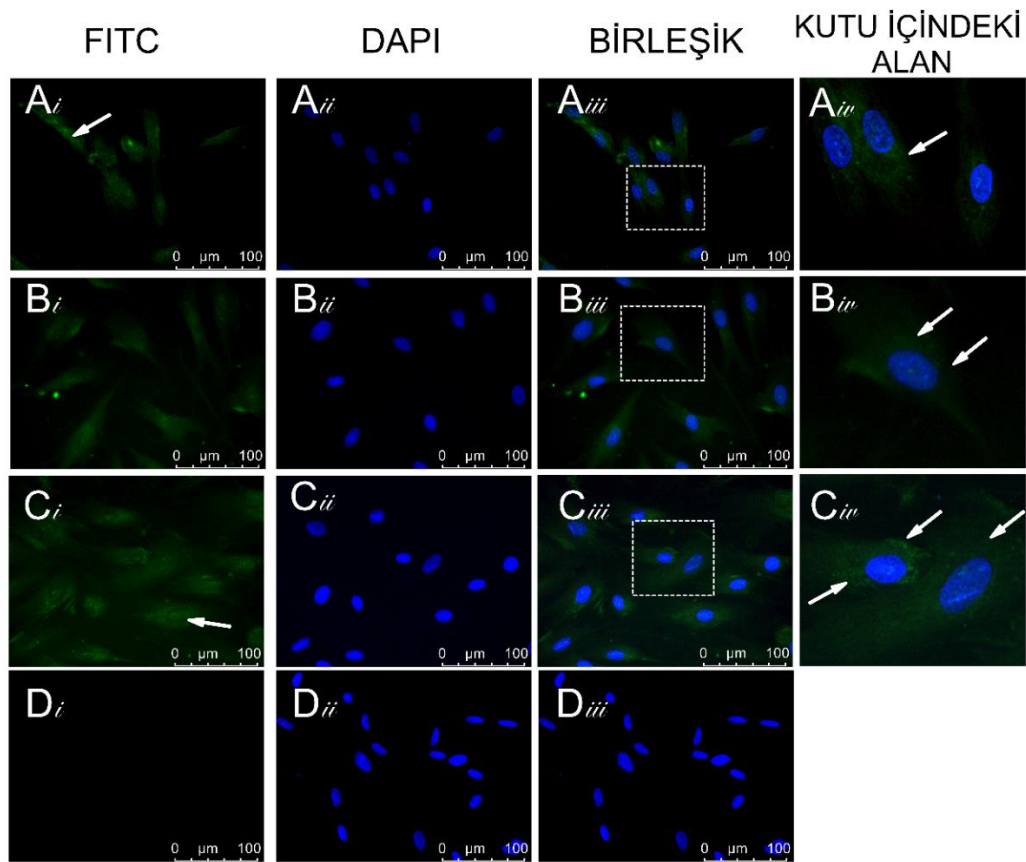
**Şekil 4.14.** Deney grupların 3, 6 ve 9. günlerinde CKAP4 immün reaktivitesinin sito-ELISA yöntemi kullanılarak optik dansite ölçümü ile değerlendirilmesi. K, E2, MPA, cAMP, E2+MPA ve E2+MPA+cAMP gruplarında grup içinde zaman ile değişen CKAP4 immün reaktivitesinin karşılaştırılması. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .



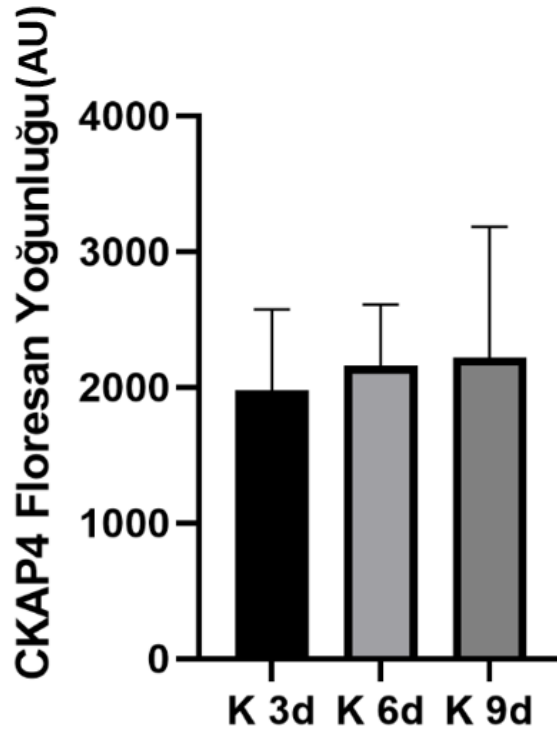
**Şekil 4.15.** Üç, 6 ve 9. günlerde deney gruplarında CKAP4 immün reaktivitesinin sito-ELISA yöntemi kullanılarak optik dansite ölçümü ile değerlendirilmesi. Üç ve altıncı günde gruplar arasında fark izlenmezken, dokuzuncu günde K ile cAMP ve K ile E2+MPA+cAMP grupları arasında CKAP4 immün reaktivitesi açısından istatistiksel anlamlı fark izlenmiştir. \* $p \leq 0.05$ .

#### 4.5 CKAP4 immünofloresan işaretlenmesinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait CKAP4 immünofloresan işaretlemelerde 3, 6 ve 9. günlerde birbirine benzer şekilde sitoplazmada ve çekirdekte düşük floresans veren granüler işaretlenmeler gözlemlendi. İşaretlenme yoğunluğu sitoplazmada daha belirgin olmakla beraber perinükleer bölgeden hücre zarına doğru dağılım göstermekteydi (**Şekil 4.16.**). Kontrol grubunda CKAP4 floresan yoğunluğu analiz edildiğinde ise birbirini takip eden günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır ( $p=0,345$ , **Şekil 4.17.**).

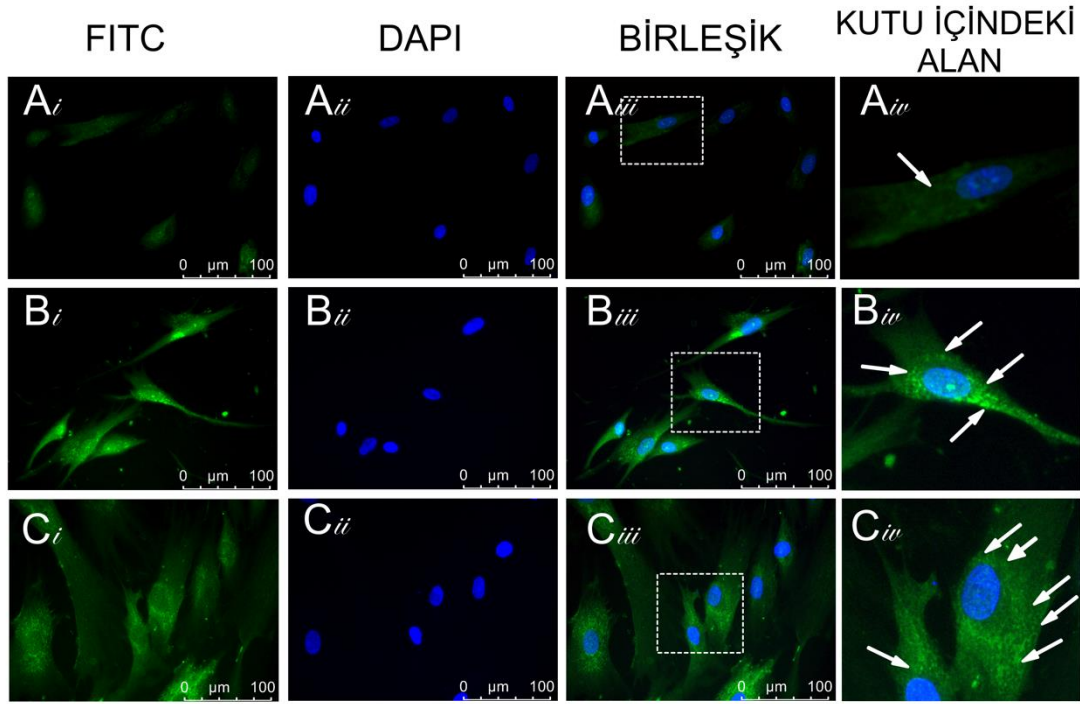


**Şekil 4.16. Kontrol grubu hESC'lerin immünofloresan işaretlemesi.** hESC'lerde hücre membranı, sitoplazma ve çekirdekte CKAP4 ile immün floresan işaretlenme gözlenmektedir. Hücrelerde birbirini takip eden günlerde birbirine benzer granüler tarzda (beyaz ok) işaretlenme izlenmektedir. Kontrol grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, Negatif kontrol (D*i*) 3. gün FITC, (D*ii*) 3. gün DAPI, (D*iii*) 3. gün birleşik (Floresan mikroskop, x400)

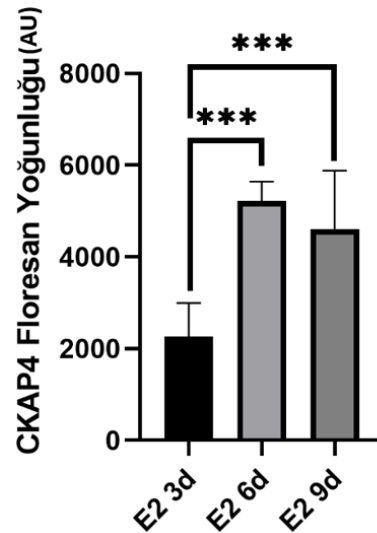


**Şekil 4.17. Kontrol grubu hESC'lerin CKAP4 immün floresan yoğunluğu.** Image J kullanılarak yapılan immüno Floresan yoğunluğu analizinde kontrol grubunun 3, 6 ve 9. günlere ait örnekleri arasında CKAP4 immün floresan yoğunluğu açısından istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir.

Östrojen uygulanmış hESC (E2) grubunun immüno Floresan işaretlemesinde 3. günde kontrol grubuna benzer işaretlenme ve ışımaya gözlenirken; 6. ve 9. gün değerlendirmelerinde perinükleer sitoplazmada daha belirgin olmak üzere sitoplazmanın geneline yayılan artmış granüler işaretlenme gözlemlendi (**Şekil 4.18.**). CKAP4 floresan yoğunluğu değerlendirildiğinde de 6. ve 9. güne ait ışımaların 3. güne göre anlamlı şekilde arttığı ortaya konmuştur ( $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.19.**). 6. ve 9. günler arasında ise ışımaya yoğunluğu açısından anlamlı fark saptanmamıştır ( $p=0,921$ , **Şekil 4.19.**)

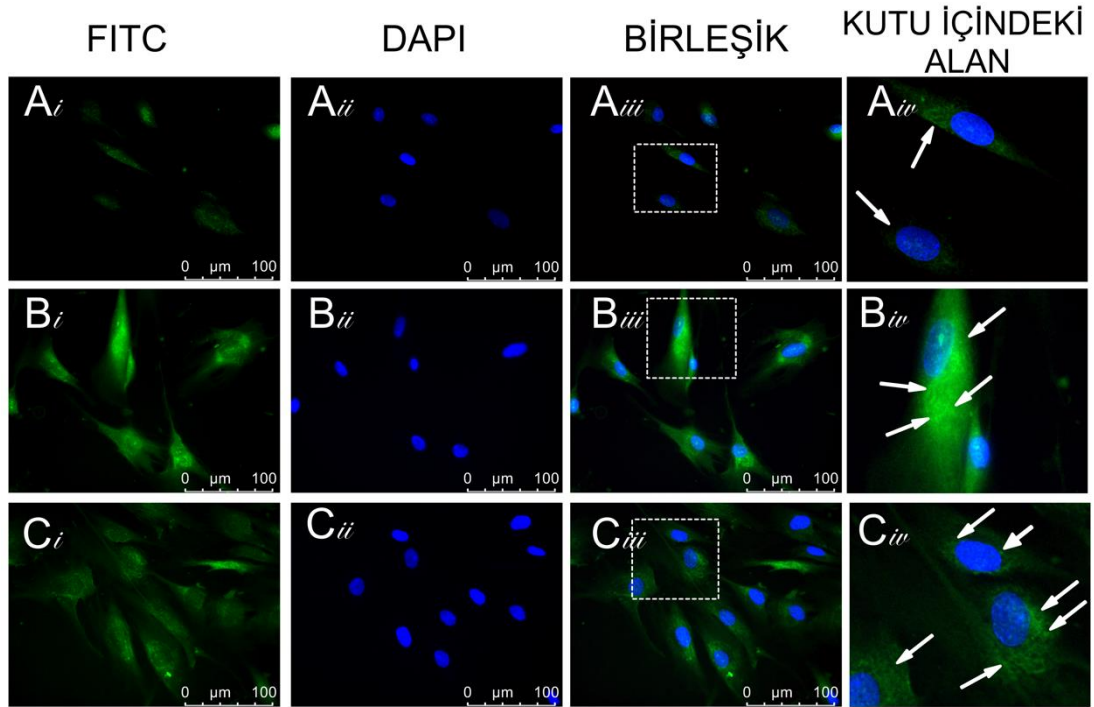


**Şekil 4.18. E2 grubunun immüno Floresan işaretlemesi.** Hücrelerde 6. ve 9. günlerde 3. güne göre artmış granüler tarzda perinükleer işaretlenme gözlenmektedir. E2 grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Floresan mikroskop, x400)

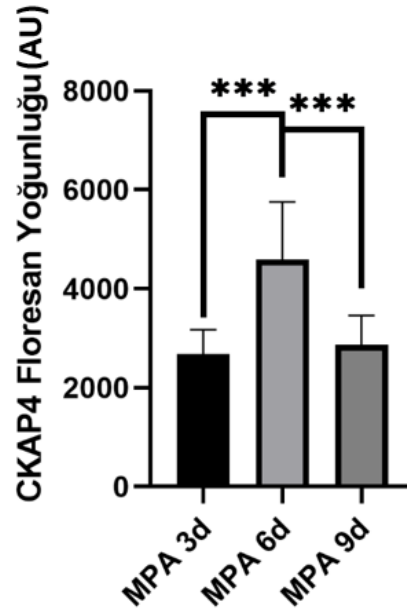


**Şekil 4.19. E2 grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.** E2 grubuna ait örneklerde Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immüno Floresan yoğunluğu analizinde 6 ve 9. gün ölçümlerinin her ikisinde de 3. güne göre istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Progesteron ile muamele edilmiş hESC (MPA) grubunun immüno Floresan işaretlemesi değerlendirildiğinde önceki iki gruptan farklı olarak; 6. günde, 3. güne göre perinükleer alanda ve çekirdekte artmış granüler işaretlenme saptandı. 9. günde yapılan immüno Floresan işaretlemede ise benzer şekilde perinükleer işaretlenme mevcutken 6. güne göre işaretlenmenin daha az olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.20.**). MPA grubuna ait CKAP4 floresan yoğunluğu analizinde 3. günden 6. güne doğru olan ışımaya yoğunluğu artışının anlamlı düzeyde olduğu saptandı ( $p=0,000$ , **Şekil 4.21.**). 6. günden 9. güne olan floresan yoğunluğu düşüşü de istatistiksel olarak anlamlı idi ( $p=0,000$ , **Şekil 4.21.**).



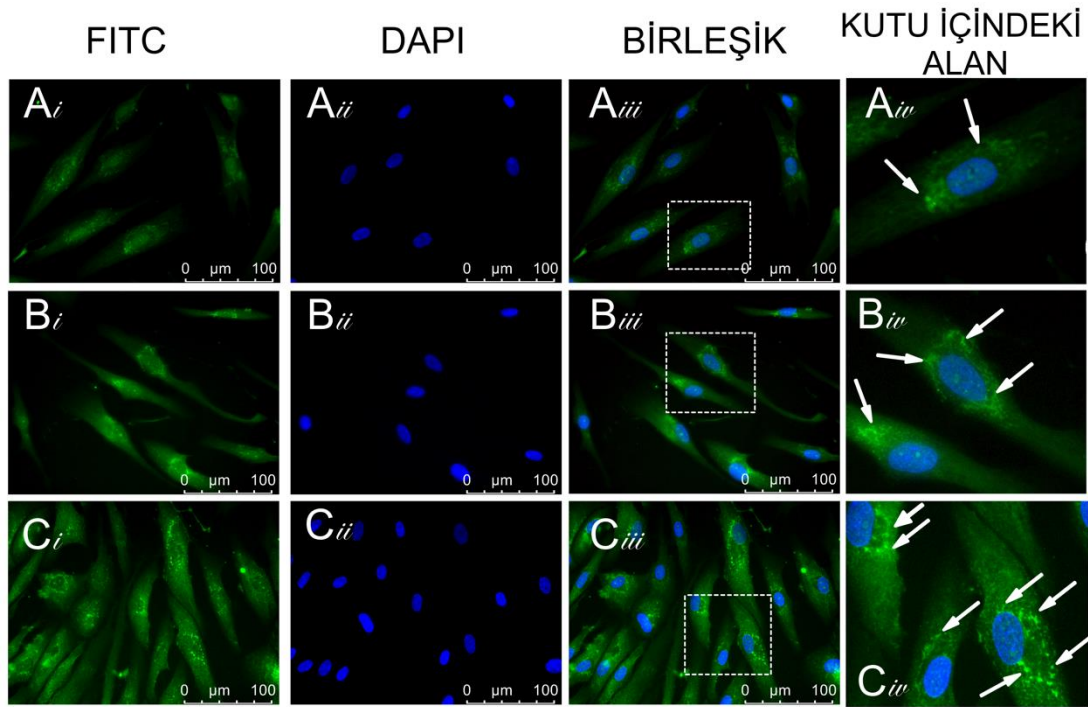
**Şekil 4.20. MPA grubunun immüno Floresan işaretlemesi.** Hücrelerde 6. günde şiddetli, 9. günde ise 6. güne kıyasla azalan perinükleer alanda immüno Floresan işaretlenme gözlenmektedir. MPA grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Floresan mikroskop, x400)



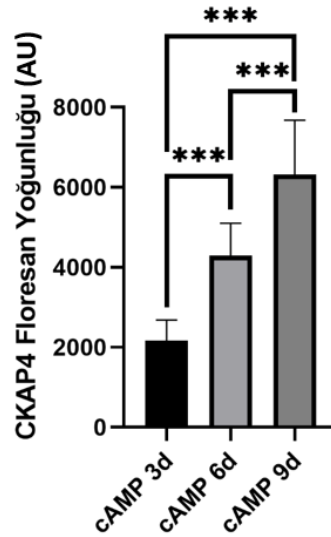
**Şekil 4.21. MPA grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.** Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immünofloresan yoğunluğu analizinde MPA grubunun 6. gün intensite artışının ve 9. günde saptanan azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. \*\*\* $p \leq 0.001$ .

cAMP ile muamele edilmiş ESC (cAMP) grubunun 3., 6. ve 9. gün immünofloresan değerlendirmesinde her üç günde de sitoplazmada ve çekirdekte granüler işaretlenmeler mevcuttu. Birbirini takip eden günlerde yapılan işaretlemelerin perinükleer alanda daha belirgin olduğu ve işaretlenme miktarının gün sayısı arttıkça arttığı gözlemlendi (**Şekil 4.22.**). CKAP4 floresan yoğunluğu zamanlar arası karşılaştırıldığında da 6. gün ve 9. gün intensite ölçümlerinin 3. güne göre anlamlı şekilde attığı saptandı ( $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.23.**). 6. günden 9. güne olan artışında anlamlı olduğu ortaya kondu ( $p=0,000$ , **Şekil 4.23.**) Desidualizasyonun gözlemlendiği bu grupta hücre membranlarında lineer tarzda CKAP4 işaretlemesi de dikkat çekici idi.



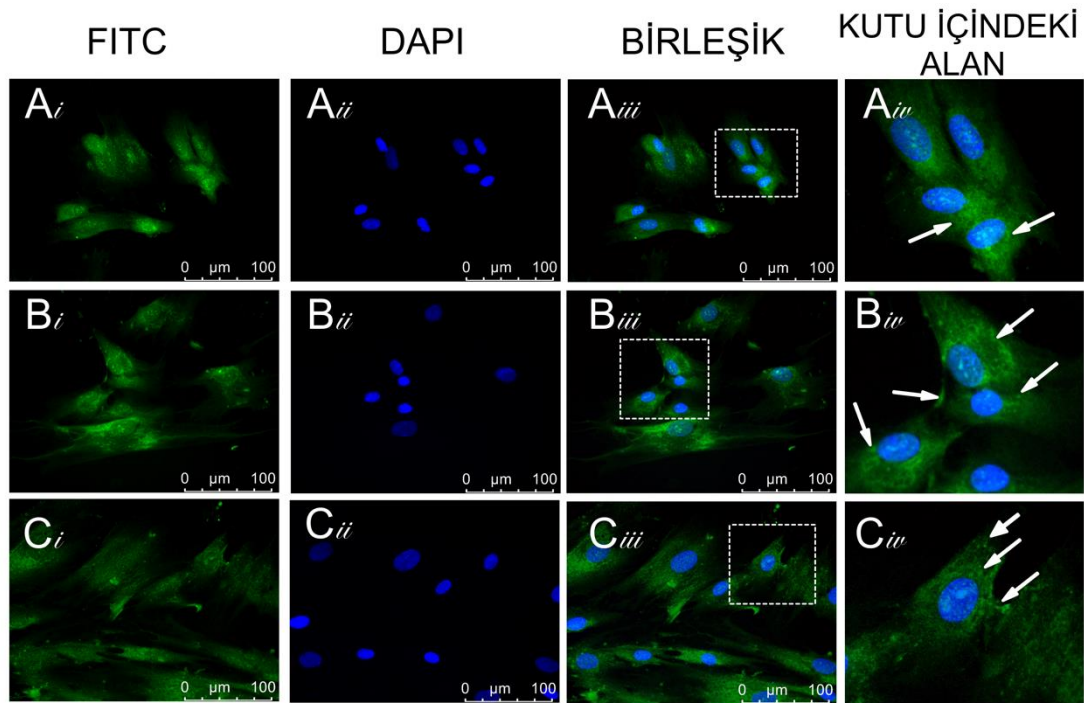


**Şekil 4.22. cAMP grubunun immünofloresan işaretlemesi.** Hücrelerde birbirini takip eden günlerde giderek artan granüler tarzda perinükleer işaretlenmeler izlenmektedir. cAMP grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Floresan mikroskop, x400)

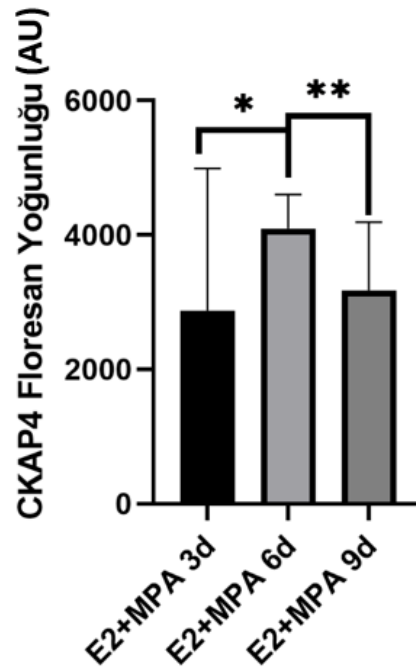


**Şekil 4.23. cAMP grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.** cAMP grubuna ait örneklerde Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immünofloresan yoğunluğu analizinde 3 ve 6; 3 ve 9; 6 ve 9. günler arasındaki ölçümlerin her birinde istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. \*\*\* $p < 0.001$ .

Östrojen ve progesteron ile muamele edilmiş ESC (E2+MPA) grubunun immünofloresan işaretlemesinin, progesteron ile muamele edilen grup ile benzer olduğu gözlemlendi. Perinükleer alanda ve çekirdekte mevcut granüler işaretlenmenin 6. günde belirgin olduğu, 9.gün değerlendirmesinde ise 6. güne göre azaldığı saptandı (**Şekil 4.24.**). CKAP4 floresan yoğunlukları karşılaştırıldığında da 6. gündeki artışın 3. güne göre anlamlı olduğu ( $p=0,030$ , **Şekil 4.25.**), 9. güne ait floresan yoğunluğu azalışının ise 6. güne göre anlamlı olduğu bulundu ( $p=0,004$ , **Şekil 4.25.**).

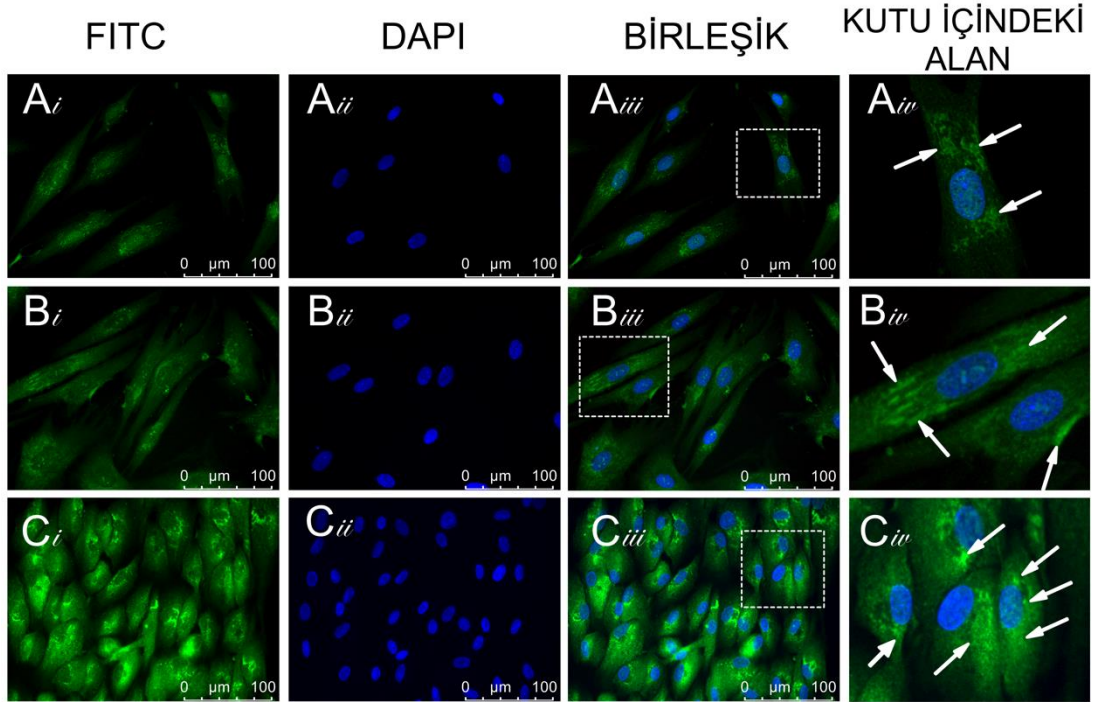


**Şekil 4.24. E2+MPA grubunun immünofloresan işaretlemesi.** Hücrelerde 6. günde artan, 9. günde ise 6. güne kıyasla azalan perinükleer işaretlenme gözlenmektedir. E2+MPA grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Floresan mikroskop, x400)

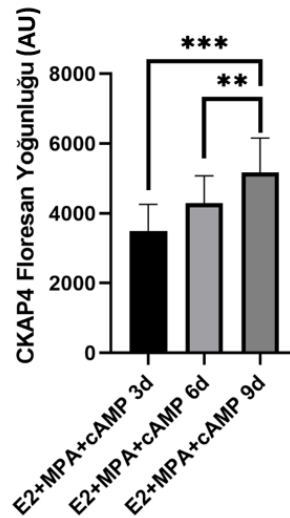


**Şekil 4.25. E2+MPA grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.** Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immünofloresan yoğunluğu analizinde E2+MPA grubunun 6. gün intensite artışının ve 9. günde saptanan azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır. \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ .

Östrojen, progesteron ve cAMP uygulanan ESC (E2+MPA+cAMP) grubun CKAP4 immünofloresan işaretlemesine bakıldığında, cAMP ile muamele edilen gruba benzer bulgular saptandı. Granüler tarzda işaretlenmeler perinükleer alanda daha belirgin olmak üzere, özellikle 6. gün ve 9. gün değerlendirmelerinde hücre membranında da lineer tarzda CKAP4 immünofloresan işaretlenmesi gözlemlendi. Gün sayısı arttıkça işaretlenme miktarının arttığı saptandı. Özellikle 9. güne ait mikrograflarda hücrelerdeki morfoloji değişimi ve perinükleer işaretlenme belirgindi (**Şekil 4.26.**). CKAP4 floresan yoğunluğu zamanlar arası karşılaştırıldığında 9. gündeki intensite değerlerinin 3. ve 6. gün ölçümlerine göre anlamlı yüksek olduğu ortaya kondu (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,003$ , **Şekil 4.27.**).

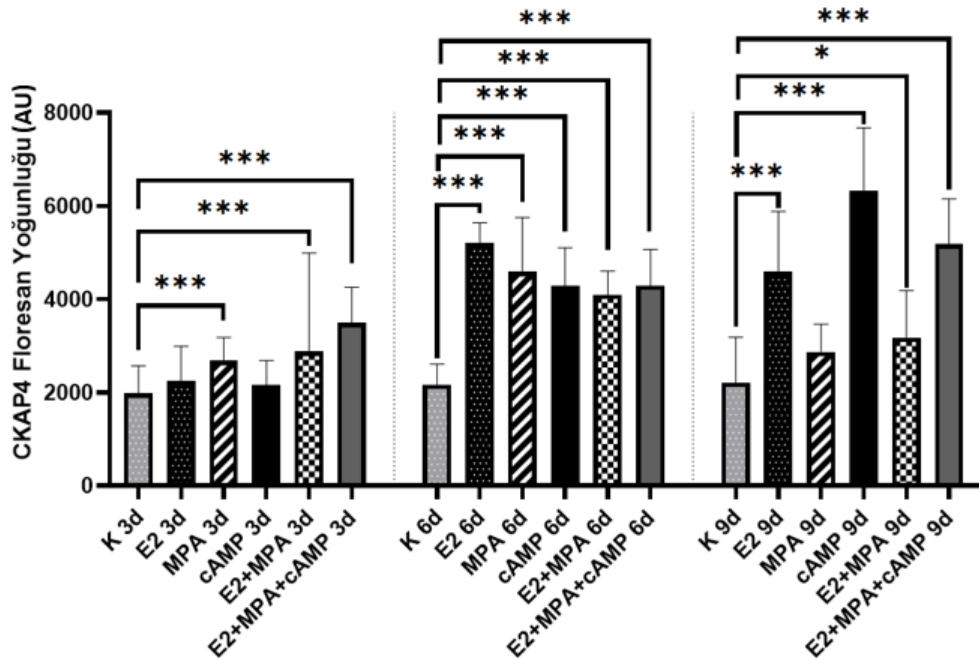


**Şekil 4.26. E2+MPA+cAMP grubunun immünofloresan işaretlemesi.** Hücrelerde 3., 6. ve 9. günlerde giderek artan granüler tarzda perinükleer işaretlenmeler izlenmektedir. E2+MPA+cAMP grubu (A*i*) 3. gün FITC, (A*ii*) 3. gün DAPI, (A*iii*) 3. gün birleşik, (A*iv*) 3. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (B*i*) 6. gün FITC, (B*ii*) 6. gün DAPI, (B*iii*) 6. gün birleşik, (B*iv*) 6. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli, (C*i*) 9. gün FITC, (C*ii*) 9. gün DAPI, (C*iii*) 9. gün birleşik, (C*iv*) 9. güne ait birleşik mikrografta beyaz kesikli kutu ile işaretli alanın büyütülmüş görseli (Floresan mikroskop, x400)



**Şekil 4.27. E2+MPA+cAMP grubu hESC'lerin CKAP4 floresan yoğunluğu.** E2+MPA+cAMP grubuna ait örneklerde Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immünofloresan yoğunluğu analizinde 9. gün ölçümleri 3. ve 6. güne kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

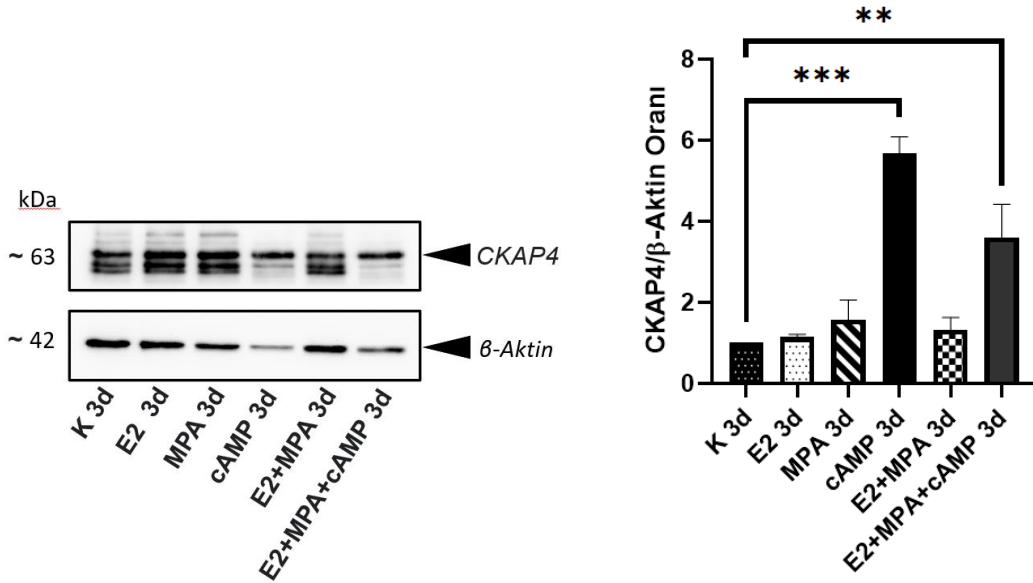
CKAP4 floresan yoğunlukları aynı zaman dilimlerinde gruplar arası karşılaştırıldığında ise; 3. gün ölçümlerinde MPA, E2+MPA ve E2+MPA+cAMP gruplarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artışta olduğu ortaya kondu (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.28.**). Altıncı gün CKAP4 floresan yoğunluğu ölçümlerinde ise her grupta (E2, MPA, cAMP, E2+MPA, E2+MPA+cAMP) kontrol grubuna oranla istatistiksel anlamlı intensite artışı saptandı (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.28.**). Dokuzuncu gün ölçümleri değerlendirildiğinde ise E2, cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole göre yüksek düzeyde anlamlı fark saptanırken (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.28.**), MPA grubu ölçümlerinde kontrol grubu ile fark olmadığı görülmüştür ( $p=1$ , **Şekil 4.28.**). E2+MPA grubuna ait ölçümlerde de kontrol grubu ile daha düşük düzeyde anlamlı fark olduğu ortaya konmuştur ( $p=0,032$ , **Şekil 4.28.**).



**Şekil 4.28. Gruplar arası CKAP4 floresan yoğunluğu karşılaştırılması.** Image J kullanılarak yapılan CKAP4 immünofloresan yoğunluğu analizleri aynı zamanlara ait gruplar karşılaştırılarak değerlendirildiğinde; 3. gün ölçümlerinde MPA, E2+MPA ve E2+MPA+cAMP gruplarının kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Altıncı gün ölçümlerinde her grup kontrole kıyasla istatistiksel anlamlı intensite artışı göstermiştir. Dokuzuncu gün ölçümlerinde ise E2, cAMP, E2+MPA ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole göre anlamlı düzeyde farklılık saptanmıştır. \* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$ .

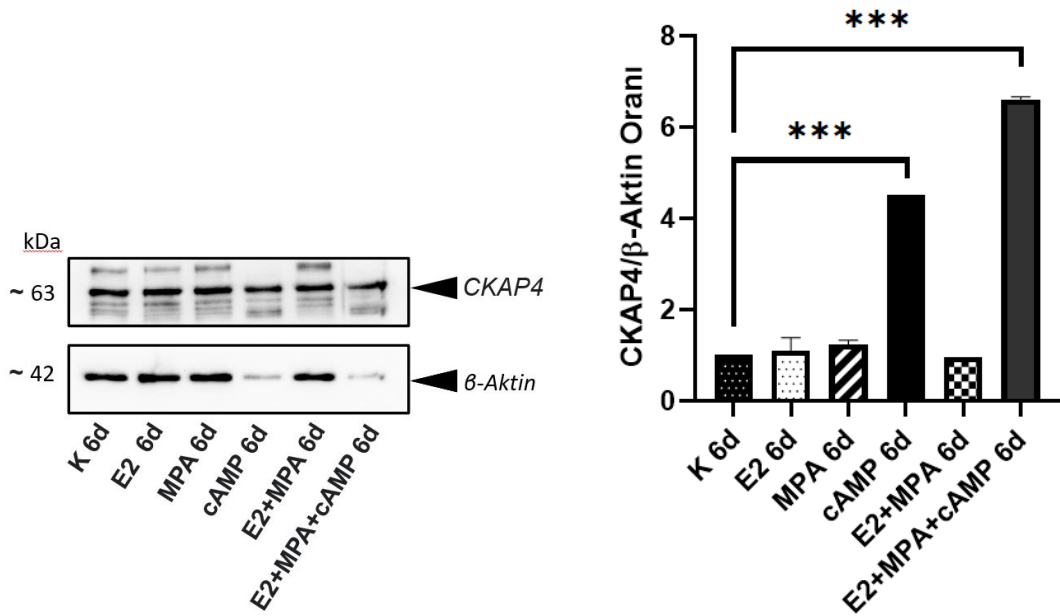
#### 4.6 CKAP4- PCNA Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Hücre kültüründe çoğaltılarak 6 gruba ayrılmış hücrelerde 3, 6 ve 9. günlerde CKAP4 ve PCNA protein ekspresyonu western blot yöntemi ile değerlendirildi. Üçüncü güne ait örnekler değerlendirildiğinde; cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplardaki CKAP4 protein miktarının kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek oldu saptandı (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,008$ , **Şekil 4.29.**). Altıncı gün CKAP4 miktarı ölçümlerinde 3. Güne benzer şekilde cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlemlendi (sırasıyla  $p=0,000$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.30.**). Dokuzuncu güne ait örneklerde, cAMP grubunda daha az olmakla beraber, desidualizasyon oluşturulan her iki grupta da CKAP4 miktarı kontrole göre istatistiksel anlamlı yüksek bulunmuştur (sırasıyla  $p=0,006$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.31.**).

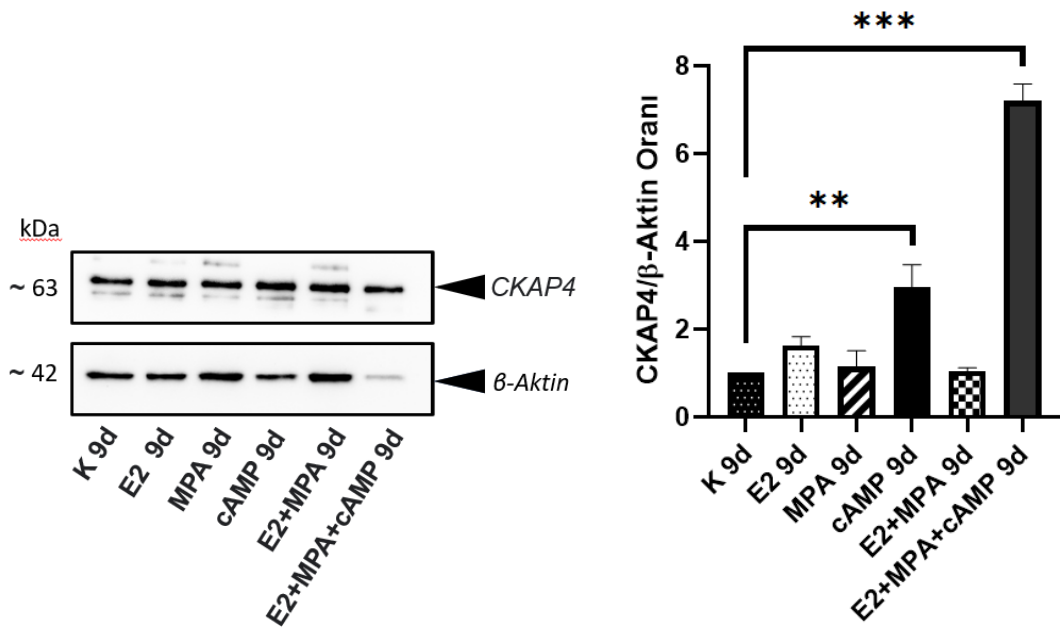


**Şekil 4.29. Üçüncü güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.** cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda ölçülen CKAP4 miktarı açısından kontrol grubu ile istatistiksel anlamlı fark saptanmıştır.  $**p \leq 0.01$ ,  $***p \leq 0.001$ .



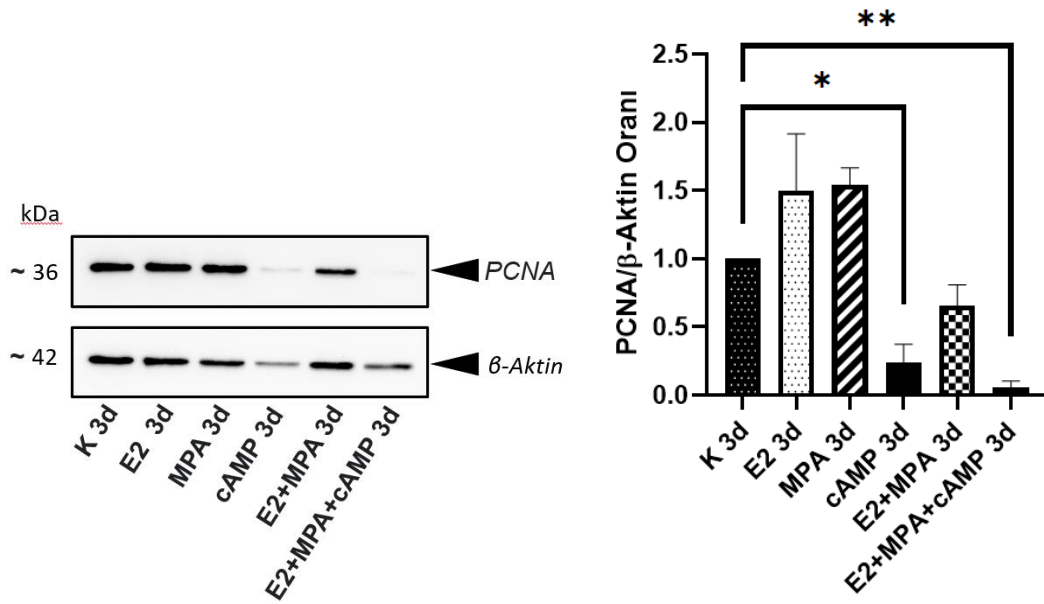


**Şekil 4.30. Altıncı güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.** CKAP4 miktarı, cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda kontrol grubuna oranla ile istatistiksel anlamlı yüksek saptanmıştır. \*\*\* $p \leq 0.001$ .



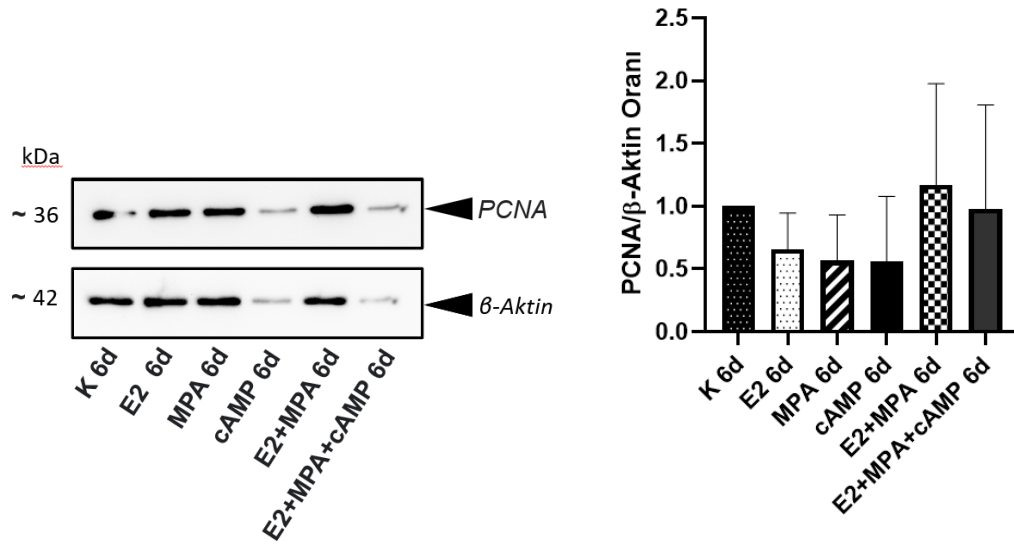
**Şekil 4.31. Dokuzuncu güne ait deney gruplarında CKAP4 miktarının western blot ölçümü sonuçları.** cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda CKAP4 miktarı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

Üç, altı ve dokuz gün takip edilen deney grupları PCNA protein ekspresyonunu değerlendirmek için western blot yöntemi kullanıldı. Üçüncü güne ait örneklerde; E2 ve MPA uygulanan gruplarda PCNA ekspresyonunda kontrole göre gözlenen artış istatistiksel anlamlı değildi (sırasıyla  $p=0,241$ ,  $p=0,190$ , **Şekil 4.32.**); cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda ise kontrol grubuna kıyasla PCNA anlamlı düzeyde düşük saptandı (sırasıyla  $p=0,05$ ,  $p=0,002$ , **Şekil 4.32.**). Altıncı gün PCNA protein miktarları kontrole göre kıyaslandığında E2+MPA grubunda hafif artış; E2, MPA ve cAMP gruplarında ise düşme olduğu gözlemlendi. Bu değişimler istatistiksel anlamlı değildi (**Şekil 4.33.**). Dokuzuncu güne ait örneklerde PCNA miktarı değerlendirildiğinde E2 grubunda kontrole göre anlamlı fark gözlenirken ( $p=0,000$ ), cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında önceki değerlendirmelere benzer şekilde kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı düşüş saptanmıştır (sırasıyla  $p=0,014$ ,  $p=0,000$ , **Şekil 4.34.**).

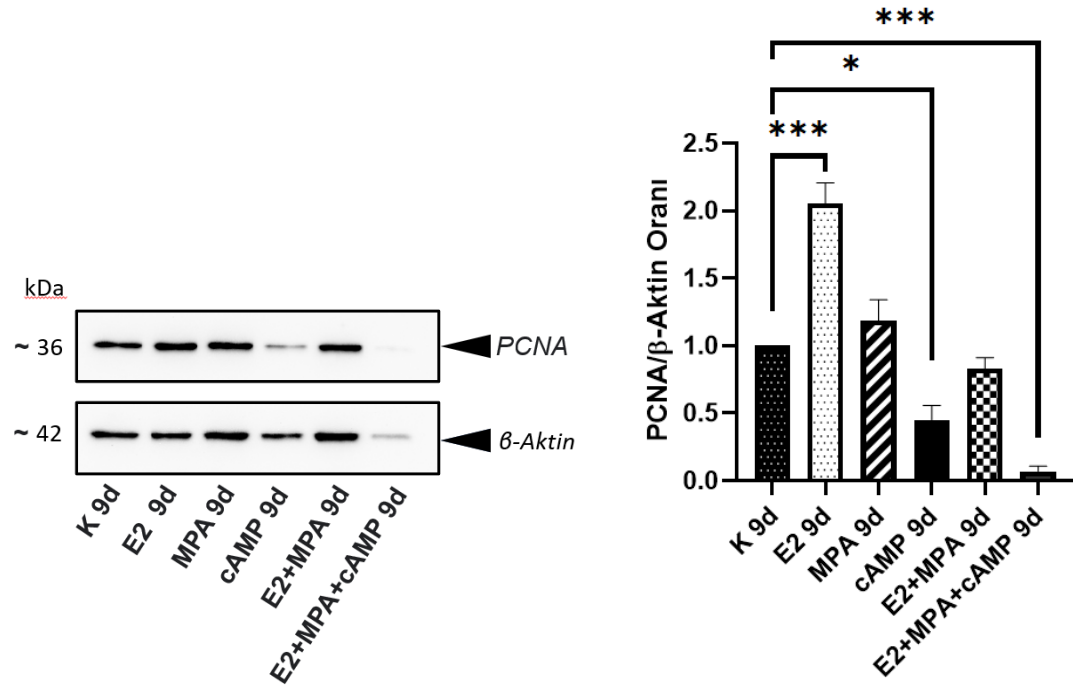


**Şekil 4.32. Üçüncü güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları.** E2 ve MPA gruplarındaki PCNA ekspresyonun kontrole göre artışı istatistiksel anlamlı değilken; cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole kıyasla PCNA düzeyleri anlamlı düşük saptandı. \* $p\leq 0.05$ , \*\* $p\leq 0.01$ .





**Şekil 4.33. Altıncı güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları.** E2 ve MPA gruplarında kontrole göre gözlenen PCNA ekspresyonu artışı ve cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında saptanan düşüş istatistiksel anlamlı değildi.



**Şekil 4.34. Dokuzuncu güne ait deney gruplarında PCNA miktarının western blot ölçümü sonuçları.** E2 grubunda PCNA ekspresyonu kontrole göre artarken; cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında kontrole kıyasla PCNA düzeyleri anlamlı düşük saptandı. \* $p \leq 0.05$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ .

## 5. TARTIŞMA

Endometriyum oluşturan luminal ve bez epitel hücreleri gibi bağ dokusunda yerleşen hESC'ler de menstrüel siklus ve hamilelikte kritik bir rol oynar. Menstrüel siklus sırasında hESC'ler östrojen, progesteron ve parakrin faktörlerin etkisi altında bir dizi değişikliğe uğrar(49). Bu değişiklikler endometriyum rejenerasyonu, blastosist varlığında embriyo implantasyonu ve plasenta gelişimi için gereklidir(9). Endometrial stromal hücrelerin değişiminde hormonların yanı sıra, çeşitli interlökinler, büyüme faktörleri ve sinyal yolları görev alır (19). Bu sinyal yollarından biri, PI3K/Akt sinyal yolağıdır ve çeşitli reseptörlerce alınan uyarılar, bu yolak üzerinden hESC'lerin proliferasyonunu, desidualizasyonunu ve apoptozis sürecini düzenler (20,21,95,103,104,107). PI3K/Akt yolağını aktive eden reseptörlerden birinin CKAP4 olduğu bildirilmiştir (121,124). CKAP4 ekspresyonunun kadın genital sisteminde vajina, tuba uterina, serviks, endometriyum, plasenta ve overlerde mevcut olduğu bilinmektedir. Endometriyumda, bez epitel hücrelerinde yüksek, stromal hücrelerde orta düzeyde varlığı bildirilmiştir (36). Ancak hESC'lerin ovaryan hormon değişikliklerine verdiği CKAP4 ekspresyon yanıtı ve desidualizasyon süreci ile ilişkisi bilinmemektedir. Ayrıca bu süreçlerde CKAP4'ün hücrenin farklı bölümlerindeki (hücre membranı, sitozol, nükleus) lokalizasyonu hESC'lerde gösterilmemiştir. Çalışmamızda steroid hormonlar ve/veya cAMP ile uyarılan ve uyarılmayan hESH'lerde CKAP4 immün reaktivitesi akım sitometri, sito-ELISA ve immünofloresan ile gösterilmiş; CKAP4 ve PCNA ekspresyonu western blot yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmiştir.

CKAP4, intraselüler olarak GER membranında yer alarak sisterna morfolojisinin düzenlenmesinde görev almakta ve luminal kısmı ile sisternalarda karşılıklı bulunan GER membranlarının birbirine bağlanmasına aracılık etmektedir (26,117). CKAP4'ün baskın lokalizasyonu GER'de olmasına rağmen hücre membranında yer alarak reseptör olarak işlev gördüğü ve çekirdekte de lokalize olabildiği bilinmektedir (24,29,32–34,121,125). Çalışmamızda kontrol grubuna ait hESH'lerin, Triton-X uygulanmayan ve uygulanan örneklerinin her ikisinde de akım sitometri ile CKAP4 ekspresyonu saptanmıştır. Triton-X uygulanmayan hESH'lerde

CKAP4 pozitif immün reaktivitesi CKAP4'ün membranda lokalizasyonunu gösterirken; Triton-X uygulanan örnekler permeabilizasyon sonrası saptanan CKAP4 immün reaktivitesinin hücre içi ve membranda lokalizasyonunu göstermektedir. Sito-ELISA yönteminde fiksatif olarak glutaraldehit kullanmamız ve permeabilizasyon uygulamamamız nedeniyle sonuçlarımız hücre yüzeyi immün işaretleme yoğunluklarını gösterirken; immünofloresan işaretlemelerde permeabilizasyon yapan metanol kullanımı sebebiyle sonuçlarımız hücre membranı ve hücre içi işaretlenme yoğunluklarını göstermektedir. Gerek sito-ELISA gerekse immünofloresan işaretleme sonuçlarımız akım sitometri sonuçlarımızı desteklemektedir. İmmünofloresan incelemede kontrol grubu hESH'lerde hücre membranında, sitoplazmada ve çekirdekte granüler CKAP4 pozitif immün işaretlenmeler gösterilmiştir. CKAP4 işaretlenme yoğunluğunun sitoplazmada daha belirgin olmakla beraber perinükleer bölgeden hücre zarına doğru giderek azalan bir dağılım göstermesi, CKAP4'ün intraselüler olarak GER membranında lokalizasyonu ile uyumludur. Kontrol grubunda sito-ELISA, immünofloresan yöntemleri ile belirlenen CKAP4 immün reaktivite yoğunluğu ve western blot ile kantitatif CKAP4 protein ölçümünde 3, 6 ve 9. günlere ait örnekler arasında fark izlenmemiştir. Önceki çalışmalarda CKAP4'ün pnömositler, vasküler düz kas hücreleri, mesane epitel hücreleri, çeşitli kanser hücre hatlarında hücre membranında, HeLaS3 ve böbrek epitel hücrelerinde sitoplazmada ve bazı kanser hücre hatlarında çekirdekte lokalizasyonu bildirilmiştir (24,30–34,126). CKAP4'ün membran, perinükleer ve çekirdekteki lokalizasyonu hESC'lerde ilk kez çalışmamızda gösterilmiştir.

Menstrüel siklus ve desidualizasyonda gözlenen aksaklıklar infertilite, implantasyon yetersizlikleri, tekrarlayan gebelik kayıpları ve preeklampsi gibi klinik sonuçlar ile karşımıza çıkabilmektedir. Bu nedenle endometriyumdan elde edilen hESC'lerle kurulan primer kültürler (84,85) ve hücre bankalarınca geliştirilen ölümsüzleştirilmiş hücre hatları (86–88) ile proliferatif, sekretuar evre ve desidualizasyonu yansıtan *in vitro* modeller sıklıkla kullanılmaktadır (19,21,88). Bu modellerde 17 $\beta$ -östradiol uygulamaları ile proliferatif evredeki değişiklikler araştırılmaktadır (127,128). Yapılan çalışmalar ile 17 $\beta$ -östradiolün, hESC'leri de içine

alan farklı hücrelerde proliferasyona neden olduğu gösterilmiştir (129–131). Çalışmamızda da E2 grubunda proliferasyon, faz kontrast mikroskopi değerlendirmelerinde incelenen alana düşen hESC hücre sayısında artış ve PCNA ekspresyonunda kontrole göre artış saptanmasıyla kantitatif olarak western blot analizi ile belirlenmiştir. Bulgumuz literatür ile uyumludur. E2 grubunda PCNA ekspresyonu 9. günde daha belirgin olmak üzere 3 ve 9. günlerde kontrole göre artmıştır, 6. günde belirlenmeyen PCNA artışının hücrelerin bölünme zamanı ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. 17 $\beta$ -östradiolün hESC'ler üzerindeki proliferatif etkisini Akt ekspresyonu ve fosforilasyonunu arttırarak gösterdiği bilinmektedir (131). Ağırlıklı olarak farklı kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalar ile CKAP4'ün de hücre proliferasyonunda rol aldığı gösterilmiştir (124,132–134). Kimura ve ark.'ları tarafından CKAP4'ün hücre proliferasyonunu PI3K aracılı Akt sinyal yolağını etkinleştirerek desteklediği bildirilmiştir (113). Fakat 17 $\beta$ -östradiol ve CKAP4 ilişkisi gösterilmemiştir. Çalışmamızda E2 grubunun CKAP4 sito-ELISA ölçümlerinin kontrol grubuna göre fark göstermemesi, E2 uygulamasının hESC'lerde hücre membranında CKAP4 artışına sebep olmadığı şeklinde yorumlanmıştır. Hücre membranı ve intraselüler işaretlenmeleri ayırt edebildiğimiz immünofloresan analizinde CKAP4 immün reaktivitesi hücre membranından ziyade hücre sitoplazmasında gözlenmiştir. E2 grubu hESC'lerin sitoplazmasında CKAP4 floresan yoğunluğunda 6 ve 9. günlerde kontrol grubuna kıyasla artış saptanmıştır. Tüm hücre ekstraktını içeren western analizinde ise E2 grubu hESC'lerde belirlenen CKAP4 ekspresyon artışı istatistiksel anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgular ışığında, E2 uygulaması ile hESC'lerde total CKAP4 ekspresyon miktarının çok değiştirmedeği; 17 $\beta$ -östradiolün asıl etkisini CKAP4'ün hücresel kompartmanlardaki (membran, sitozol, nükleus) dağılımını sitozol lehine artırarak gösterdiği düşünülmüştür. hESC'lerde E2 maruziyet süresinin etkisi değerlendirildiğinde sito-ELISA optik dansite ve immünofloresan işaretleme CKAP4 intensite ölçümlerinde 6. ve 9. günlerde 3. güne kıyasla istatistiksel anlamlı artış saptanmıştır. Çalışmamızda hESC'lerde artan E2 maruziyeti süresi ile sitoplazmada CKAP4 artışının belirginleştiği gösterilmiştir. Literatürden hareketle E2 grubu için bulgularımız toplu ele alındığında; 17 $\beta$ -östradiolün hESC'lerde proliferasyonunu

zaman bağımlı olarak, sitoplazmada artan CKAP4 aracılığıyla Akt sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirmesi olasıdır.  $17\beta$ -östradiolün hESC'lerde CKAP4'ü hücre sitoplazmasında artırdığı ilk olarak çalışmamızda gösterilmiş olup, proliferasyon sürecinde etkili Akt ve diğer sinyal yolları ile CKAP4 ilişkisinin aydınlatılması için ileri çalışmalar gereklidir.

Progesteron, menstrual siklusun sekretuar fazının esas hormonudur. Sekretuar faz; erken, orta ve geç olmak üzere 3 evrede incelenmektedir. Progesteron seviyesi erken sekretuar evrede yükselmeye başlarken, orta sekretuar evrede pik yapmakta ve geç sekretuar evrede düşmektedir (46,47). Yükselen progesteron hESC'lerin erken sekretuar evrede proliferasyon olmasını (3); orta sekretuar evrede ise desidual hücrelere diferansiyasyon olmasını sağlamaktadır (4). Çalışmamızda MPA grubunda erken sekretuar evreyi temsil eden 3. gün western blot PCNA analizinde kontrol grubuna göre artış gözlenmesi, progesteronun erken sekretuar evrede hESC'lerde proliferatif etki göstermesi ile uyumludur. Progesteron desidualizasyon sürecinde etkili esas hormondur. Önceki yıllara ait çalışmalarda progesteron ve MPA'nın 20-28 gün gibi uzun süreli uygulamaları ile *in vitro* desidualizasyon oluşturulduğu bildirilmiştir. Desidualizasyon için hücre içi cAMP konsantrasyonunun yüksek seviyelerde tutulması önemlidir ve sürekli artan kinaz aktivitesi ile desidualizasyon sürecinin devamlılığı sağlanır (19). Çalışmamızda orta sekretuar evreyi temsil eden 6 gün ve geç sekretuar evrenin başına denk gelen 9 gün MPA uygulanan gruplarda, faz kontrast mikroskopi değerlendirmelerinde hESC'lerde morfolojik değişim gözlenmemesi ve PRL değerinde artış olmaması ile 6 ve 9. gün MPA uygulamasının desidualizasyon için yeterli olmadığı saptanmıştır. Bu gruplarda *in vitro* desidualizasyonun gözlenmemesi, altı/dokuz günlük MPA inkübasyon süresinin hESC hücre hattı hücrelerinde diferansiyasyon için gereken intraselüler cAMP düzeylerini yeterince yükseltememesine bağlanmıştır. Ek olarak cAMP uygulanan gruplarda desidualizasyonun gözlenmesi bunu desteklemektedir. Graham ve ark.'larının meme kanseri hücrelerinde yaptığı çalışmada progestin tedavisi ile CKAP4 ekspresyonunun arttığı bildirilmiş ve bu etkinin sürekliliğinin PGR-A/PGR-B oranı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (135). Çalışmamızda 6. gün MPA grubunun immünofloresan

değerlendirmelerinde CKAP4'ün sitoplazmada belirgin artışı, MPA'nın literatürdeki progesterin uygulamasına benzer şekilde CKAP4 ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir. Tip II pnömositlerde, cAMP'nin Akt yolağı aktivasyonu ile CKAP4'ün hücre membranına transferini arttırdığı bildirilmiştir (122). Çalışmamızda MPA uygulaması sonrası yetersiz intraselüler cAMP seviyeleri sebebi ile CKAP4'ün hücre membranına transferinin olmaması, MPA grubunun 3, 6 ve 9. gün CKAP4 sito-ELISA ölçümlerinde kontrol grubuna göre fark saptanmaması ile gösterilmiştir. Ek olarak immünofloresan işaretlemelerde de hücre membranlarında belirgin immün işaretlenme artışı saptanmaması bu bulgumuzu desteklemektedir. hESC'lerde gen ekspresyon paternleri sekretuar evre boyunca farklılık göstermektedir; erken sekretuar fazda sekresyon, iyon transportu ve metabolizmayla ilgili; orta sekretuar fazda hücre adezyonu ve diferansiasyona ilişkin; geç sekretuar fazda da menstrüasyon ile ilişkili gen ifadeleri artmakta ve PGR ekspresyonu azalmaktadır (136,137). Yeni yapılan çalışmalar ile CKAP4'ün integrinler ile etkileşime girerek hücrelerin adezyon ve migrasyon süreçlerini yönettiği bildirilmiştir (35). Aynı zamanda CKAP4 Akt sinyal yolağı ile ilişkili olarak hücre diferansiasyonunda rol oynamaktadır (138,139). MPA maruziyet süresinin hESC'lere etkisi değerlendirildiğinde; immünofloresan işaretlemelerde 6. günde nükleer alanda artan granüler işaretlenme, sito-ELISA optik dansite ve CKAP4 intensite ölçümlerinde CKAP4 immün reaktivitesinin 6. günde pik yapıp 9. günde gerilemesi, literatürle uyumlu şekilde CKAP4'ün 6. günde hESC diferansiasyonu ve adezyonu ile ilişkili gen ekspresyonlarına nukleusta ve integrin geri dönüşümüne sitozolde eşlik ederek MPA etkisinde aracı rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Progesteron hESC'lerde etkisini ağırlıklı olarak PGR'e bağlanarak göstermektedir (13). PGR ekspresyonu sekretuar evrenin sonunda azalmakta ve PGR yokluğunda desidualizasyon gelişmemektedir (4). Cloke ve ark.'larının ESC'lerde yapmış olduğu çalışmada PGR susturulması ile CKAP4'ün gen ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (140). Çalışmamızda MPA grubunda dokuzuncu gün ölçümlerinde saptanan CKAP4 düşüşü, literatürde belirtilen geç sekretuar evrede PGR ekspresyonunda azalma sonucu hESC'lerde MPA etkisinin zayıflamasına ve gen ekspresyon paterninin menstrüasyon ile ilişkili genler lehine

dönmeğe başlamasına bağlanabilir. Literatürden hareketle MPA grubu için bulgularımız toplu ele alındığında; hESC'lerde MPA uygulaması erken dönemde proliferasyonu desteklemekte, orta sekretuar dönemde CKAP4'ü hücre sitoplazmasında belirgin artırmakta ve bu artış muhtemelen hücre adezyonu-diferansiasyonu ile ilişkili olmakta, geç dönemde ise PGR ekspresyonunda azalmaya sekonder CKAP4 miktarı düşebilmektedir. Çalışmamız hESC'lerin progesterona verdiği erken, orta ve geç dönem yanıtlarında MPA-CKAP4 ilişkisinin ayrıntılı araştırılması için yeni bir kapı aralamıştır.

Desidualizasyon, sekretuar evrenin ortalarında progesteron, östrojen, cAMP ve lokal parakrin faktörlerin etkisiyle endometriyumun stromal kompartmanında meydana gelen değişiklikleri tanımlar (49). Desidualizasyonun esas hücreleri hESC'lerdir. Bu süreçte hESC'ler fibroblast benzeri görünümünden polihedral fenotipe geçiş yapar (5,6), organel dağılımları değişiklik gösterir (52) ve PRL - IGFBP-1 ekspres eder (14). Desidua, gelişen embriyo için besin sağlama, kontrolsüz trofoblast invazyonunu engelleme ve embriyoyu maternal rejeksiyondan koruma gibi görevler üstlenmektedir (50,51). Önemli görevlerinden dolayı uzun yıllardır çok çeşitli *in vitro* desidualizasyon modelleri kullanılarak desidualizasyonun mekanizması araştırılmaktadır (19,21,88). Progesteron ve östrojenin birlikte uygulanması desidualizasyon modelleri arasında yer alır (19). Krikun ve ark.ları  $10^{-8}$  M E2 ve  $10^{-7}$  M MPA kullanarak 8 günde morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerle desidualizasyonun oluşturulduğunu bildirmişlerdir (141). Yaptıkları çalışmada immortalize hücre ve primer hücre kültürüne ait hücrelerin PRL düzeyleri karşılaştırıldığında immortalize hücrede desidualizasyonun aynı konsantrasyonlarda steroid hormon uygulanmasıyla oluşturulduğu, ancak PRL düzeyinin primer hücre kültürlerine göre daha düşük olduğu saptanmıştır (141). Çalışmamızda aynı konsantrasyonda E2 ve MPA'nın birlikte kullanıldığı ve 9. güne kadar izlenen örneklerde morfolojik değişimin, PRL artışının görülmemesi ve desidualizasyonun saptanmaması kullanılan hücrelerin ticari olarak elde edilen immortalize hücreler olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Sekretuar evrede östrojen PGR ekspresyonunu artırmakta; böylece progesteron etkisinin daha belirgin görülmesini sağlamaktadır

(142). Çalışmamızda da E2+MPA grubu sito-ELISA ve western blot sonuçlarımız MPA grubuna paralellik göstermekle birlikte immüno Floresan işaretlemeye 9. günde kontrol grubuna kıyasla CKAP4 floresan yoğunluğunda anlamlı artışın saptanması E2 etkisi ile hESC'lerde PGR ekspresyon artışına bağlanmıştır. Meme kanseri hücrelerinde de benzer şekilde PGR oranındaki değişimler ile birlikte CKAP4 ekspresyonunda artış bildirilmiştir (135). E2+MPA maruziyet süresi değerlendirildiğinde de yine MPA grubuna benzer şekilde sitoELISA ve immüno Floresan değerlendirmelerde 3. güne oranla, 6. günde CKAP4 immün reaktivitesinde pik ve 9. günde gerileme gözlenmiştir. hESC'lerde immüno Floresan yöntemde 6. günde gözlenen artış ve 9. gündeki azalışın MPA grubuna göre daha az olması yine E2'ye bağlı PGR miktarında artışa sekonder MPA'nın etkisini daha dengeli göstermesi ile ilişkilendirilmiştir. Desidualizasyonun devamlılığı için sürekli artan kinaz aktivitesi ile hücre içi cAMP konsantrasyonunun yüksek seviyelerde tutulması gerekir (19) ve cAMP'nin CKAP4'ün hücre membranına transferinde önemli olduğu bilinmektedir (122). Çalışmamızda E2+MPA grubunda hücre membranını ifade eden sito-ELISA sonuçlarında kontrol grubuna göre fark gözlenmemesi sonraki bölümde tartışacağımız cAMP uygulanan gruplarda sonuçlarımızın farklı olmasından destekle hücre içi yetersiz cAMP seviyelerinden dolayı CKAP4'ün membrana transferinin gerçekleşmediğini göstermiştir. E2+MPA grubu için sonuçlarımız toplu değerlendirildiğinde; E2+MPA uygulamasının immortalize hESC desidualizasyonu için ilk tercih olmayacağı, CKAP4 lokalizasyonu ve ekspresyonu açısından MPA grubu ile benzer olduğu fakat E2 etkisi ile PGR ekspresyonunda muhtemel artışın CKAP4'ün 9. gün değerlendirmelerinde yükselmesine sebep olduğu ve hücre içi yetersiz cAMP sebebi ile CKAP4'ün membrana transferinin olmadığını söylemek mümkündür.

Primer hücre kültürü veya ticari olarak elde edilmiş hESC'lerde cAMP, E2+MPA+cAMP, cAMP+MPA uygulamaları E2+MPA uygulaması yanı sıra desidualizasyonun *in vitro* modelinin oluşturulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (19,85,89,90). Çalışmamızda işçi hESC'ler 6 ve 9 gün cAMP veya E2+MPA+cAMP uygulaması sonucu epiteloid benzeri poligonal görünüm kazandığı faz kontrast mikroskop incelemesi ile gösterilmiştir. hESC'lerin bu morfolojik değişimine 6. günde



PRL artışının eşlik etmesi desidualizasyonun gerçekleştiğini biyokimyasal açıdan desteklemiştir. Yu ve ark.ları endometrium biyopsilerinden kurulan primer kültürlerle 10 nM 17 $\beta$ -estradiol, 100 nM progesterone and 0.5 mM dibutyryl cAMP ile inkübasyon sonrası 4. ve 8. günlerde PRL düzeyinde kontrole göre anlamlı artış saptamışlardır (143). Aynı araştırmacılar başka bir çalışmalarında aynı protokol ile 7. günde kontrole göre hormon uygulanan grupta PRL artışı ile desidualizasyonun sağlandığını bildirmişlerdir (144). Çalışmamızda cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan gruplarda 3. günde morfolojik ve biyokimyasal olarak desidualizasyon gözlenmezken, 6 gün inkübasyon ile desidualizasyon başarılı şekilde oluşturulmuştur. E2+MPA grubunda morfolojik ve biyokimyasal olarak desidualizasyon saptanmazken, E2+MPA+cAMP ve cAMP gruplarında desidualizasyonun görülmesi, hESC *in vitro* desidualizasyon modellemesinde cAMP'nin tek ya da kombinasyonlarının kullanımının daha uygun modeller olduğunu ortaya koymaktadır. Western blot analizlerinde 3 ve 9. gün PCNA verilerinde kontrol grubuna göre anlamlı azalmanın olması hESC'lerin proliferasyondan ziyade diferansiasyona gidişini desteklemektedir. hESC'lerin desidual hücrelere diferansiasyonunda morfolojik değişiklikler içinde endoplazma retikulum sisternalarında dilatasyon (52), mikrotübül organizasyonunda değişiklikler, hücre iskeletinin düzenlenmesi yer almaktadır (5,6). CKAP4'ün GER'de sisterna morfolojisinin düzenlenmesinde (26), ER-mikrotübül ilişkisi ile hücre içi organel dağılımlarının düzenlenmesinde (28), ER-mitokondri temas bölgelerinin oluşumunda (119) görev aldığı bilinmektedir. Çalışmamızda desidualizasyon gözlenen bu gruplarda western blot analizleri ile CKAP4 artışı ortaya konmuş olup, immünofloresan incelemeler ile 6 ve 9. günlerde, perinükleer alanda belirgin artış gösteren granüler tarzda CKAP4 işaretlenmeleri GER lokalizasyonu ile uyumlu bulunmuş ve bu alanda gözlenen intensitesi düşük yuvarlak alanlar genişlemiş GER sisternaları lehine yorumlanmıştır. Hücre iskeleti ilişkili protein 4 olarak bilinen CKAP4'ün, vasküler düz kas hücreleri, tip II pnömositler, mesane epitel hücreleri ve çeşitli kanser hücre hatlarında hücre yüzeyinde reseptör olarak görev aldığı gösterilmiştir (29,30,121). Posttranslasyonel modifikasyon sonrası (palmitoilasyon) hücre membranında lipid raft (sinyalazom)larda yer alarak hücre sinyallerinin hızla

iletilmesinde görev yaptığı bilinmektedir (145). Ayrıca palmitoilasyon gerçekleşmediğinde hücre membranı üzerinde sinyalizom dışı alanlarda da bulunduğu gösterilmiştir (145). Çalışmamızda cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulanan hESC'lerde hücre yüzeyinde CKAP4 pozitif immün reaktivitesi immünofloresan işaretleme ile gösterilmiş olup, bu bulgumuz sito-ELISA ve akım sitometri yöntemi ile desteklenmiştir. CKAP4'ün farklı hücre tiplerinde hücre membranında lokalize olarak Dkk1 için reseptör görevi gördüğü bildirilmiştir (113) ve progesteron etkisi ile sekretuar fazda hESC'de Dkk1 ekspresyonunun arttığı bilinmektedir (69,70). Çalışmamızda hücre membranında saptanan kontrol grubuna göre artmış CKAP4 miktarı desidualize hücrelerde de Dkk1 için reseptör görevi olabileceğini düşündürmektedir. Dkk1 multiple miyelom hücrelerinde CKAP4 üzerinden NF- $\kappa$ B sinyalini uyararak IL-6 artışına sebep olmaktadır (146). İlerleyen desidualizasyon ile hESC'lerde NF- $\kappa$ B'nin arttığı bilinmektedir (147,148). cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulaması ile desidualize olan 6. güne ait örneklerde hücre membranında CKAP4 immün reaktivitesinin kontrol grubuna göre artması CKAP4'ün desidualizasyon sonrası arttığını ve desidualizasyonla ilişkili çeşitli sinyal yollarında ve immün cevabın düzenlenmesinde rolünün olabileceğini göstermektedir. cAMP ve E2+MPA+cAMP grubu bulgularımız toplu değerlendirildiğinde; immortalize hESC'lerde desidualizasyon modellemesi için cAMP içeren uygulamaların daha uygun seçenekler olduğu, desidualize hESC'lerde CKAP4'ün sitozolde artışının GER sisterna genişliklerinin ayarlanmasında, mikrotübüllerin organize edilmesinde ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde görev aldığı ve hücre membranına transferi artarak desidualizasyonda çeşitli sinyal yolları için reseptör görevi görebileceği sonuçlarına varılmıştır. Desidualize hESC'lerde CKAP4 ekspresyonunda artış ilk defa çalışmamızda gösterilmiş olup, desidualizasyon ile hESC hücre yüzeyinde CKAP4 artışı da aynı şekilde literatüre katkımızdır.

Ayrıntılı şekilde tartışıldığı üzere tez çalışmamız belirlenen amaca ve hedeflere ulaşılmış olmasına rağmen bazı sınırlılıklar içermektedir. Çalışmamızda ovarian hormonların hESC'lerde CKAP4 ekspresyonu üzerine etkisi *in vitro* koşullarda ortaya konmuştur. Kültür ortamında optimum şartlar sağlanarak hormon uygulamaları ile

menstrüel siklus evreleri ve desidualizasyon modelleri oluşturulmuş olmasına rağmen bez epitel hücreleri ve ECM etkileşimleri ile lokal parakrin faktörlerin etkisi gözlenemediği için bulgular, *in vivo* işleyişi birebir yansıtmayabilir. Desidualize hESC'lerde CKAP4 ekspresyon artışı western blot yöntemi ile ortaya konmuştur; fakat CKAP4'ün desidualizasyon sürecindeki etkisinin net şekilde gösterilebilmesi için CKAP4'ün gen düzeyinde susturulması mümkün olmamıştır. Bu da çalışmamızdaki başka bir kısıtlılıktır.

CKAP4'ün hESC'lerde hücrenin farklı bölümlerdeki lokalizasyonu, ovarian hormonlar (E2, MPA) ile ilişkisi, desidualizasyondaki ekspresyon artışı ve hücre membranına transferi ilk defa çalışmamızda ortaya konmuştur. Endometriyumdaki mikro çevrenin etkilerinin gözlenebilmesi için *in vitro* modeller kullandığımız çalışma bulgularının, *in vitro* ko-kültür ve *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi önerilmektedir. Sağlıklı bir gebelik oluşumu için embriyo ile maternal endometriyum ilişkisinde aksama olmaması ön koşuldur. Desidualizasyonda yaşanan aksaklıklar infertilite, subfertilite, tekrarlayan gebelik kayıpları ve preeklampsi gibi klinik sonuçlarla karşımıza çıkabilmektedir. Giderek artan bu sağlık problemleri, uzun soluklu takip ve tedavi gerektiren intra uterin inseminasyon (IUI), *in vitro* fertilizasyon (IVF) ve intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi uygulamalar ile çözüme kavuşturulmaktadır. hESC'lerde CKAP4 ekspresyonu steroid hormonlardan etkilenir ve desidualizasyonda CKAP4 ekspresyon artışı olur ve bu durum hücre membranına transferde artış ile sonuçlanır. Çalışma sonuçlarımız literatüre katkıda bulunarak, üreme biyolojisinde ileri çalışmalar için temel oluşturacaktır.

## 6. SONUÇLAR

Steroid hormonlar ile menstrüel siklusun proliferatif, sekretuar evresinin ve orta sekretuar evrede gözlenen desidualizasyonun *in vitro* modelinde hESC'lerde CKAP4 ekspresyonunun lokalizasyonu ve steroid hormonların ekspresyona etkisinin araştırıldığı bu çalışmada aşağıda sunulan sonuçlar elde edildi:

1. hESC'lerde CKAP4 ekspresyonu hücre membranı, sitoplazma ve çekirdekte mevcuttur. CKAP4'ün intraselüler lokalizasyonu GER'in yeri ile uyumludur.
2. Menstrüel siklusun proliferatif evre modellemesi için kullanılan 17 $\beta$ -östradiol uygulaması ile hESC'lerde 3. ve 9. günlerde saptanan PCNA artışı proliferatif evrede gözlenen hESC proliferasyonunu destekledi.
3. Altı ve 9 gün 17 $\beta$ -östradiol uygulanmalarıyla hESC'lerde sitoplazmada saptanan CKAP4 artışı bu molekülün proliferatif evrenin ortasında arttığını ve sürecin sonuna kadar etkili olduğu gösterdi.
4. MPA uygulaması ile oluşturulan sekretuar evre modelinde 3 gün MPA uygulaması sonrası belirlenen PCNA artışı ile hESC'lerin erken sekretuar dönemde proliferasyonu saptandı.
5. MPA'nın 6 ve 9 gün uygulanmalarında hESC'lerde sitoplazmada saptanan CKAP4'te 6. günde artış ve 9. günde ise azalma, CKAP4'ün sekretuar evrenin ortasında artıp geç sekretuar evrede de azaldığını gösterdi.
6. MPA ve E2+MPA uygulamaları ile immortalize hESC hücrelerinde *in vitro* desidualizasyon oluşturulamayıp cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulamaları ile desidualizasyon oluşturulabilmesi bu hücre hattında 9 gün süreyle izlenen modellerde desidualizasyon için cAMP gerekliliğini gösterdi.
7. E2+MPA uygulaması ile de MPA grubuna benzer şekilde hESC'lerde CKAP4'ün hücre sitoplazmasında 6. günde arttığı 9. günde ise azaldığı saptandı.
8. cAMP ve E2+MPA+cAMP uygulamaları ile hESC'lerde *in vitro* desidualizasyon modeli başarılı şekilde oluşturuldu. Hücrelerin 6. günde poligonal hücrelere dönüştüğü ve bu görünümün 9. güne kadar korunduğu faz kontrast mikroskop ile saptandı. ELISA ölçümleri ile hücrelerin 6 ve 9. günlerde PRL düzeylerinin

kontrole göre anlamlı yüksek bulunması ile desidualizasyon biyokimyasal olarak da desteklendi.

9. cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında CKAP4 ekspresyonunun istatistiksel anlamlı düzeyde artışı ile desidualizasyonda CKAP4 varlığı saptandı.
10. Desidualize hESC'lerde (cAMP ve E2+MPA+cAMP gruplarında) CKAP4'ün hücre sitoplazmasında arttığı ve hücre membranına transferinde de artış olduğu gösterildi.

## 7. KAYNAKLAR

1. Ross WPMH. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. Eighth Edition. Morphologia. 2019.
2. Abraham L. Kierszenbaum, M.D. P., Laura L. Tres, M.D. PD. HISTOLOGY AND CELL BIOLOGY An Introduction to Pathology. 4.th. Elsevier; 2016.
3. Das SK. Cell cycle regulatory control for uterine stromal cell decidualization in implantation. *Reproduction* [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 6];137(6):889–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19307426/>
4. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, et al. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* [Internet]. 1995 Sep 15 [cited 2023 Feb 2];9(18):2266–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7557380/>
5. Gellersen B, Brosens J. Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J Endocrinol* [Internet]. 2003 Sep 1 [cited 2022 Aug 24];178(3):357–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12967329/>
6. Gellersen B, Brosens IA, Brosens JJ. Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives. *Semin Reprod Med* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 Feb 26];25(6):445–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17960529/>
7. Gellersen B, Reimann K, Samalecos A, Aupers S, Bamberger AM. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum Reprod* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 5];25(4):862–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20118488/>
8. Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, et al. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci* [Internet]. 2014 Mar [cited 2023 Jan 31];21(3):372–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23885104/>
9. Brosens JJ, Gellersen B. Death or survival--progesterone-dependent cell fate decisions in the human endometrial stroma. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Aug 24];36(3):389–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16720711/>
10. Brar AK, Kessler CA, Meyer AJ, Cedars MI, Jikihara H. Retinoic acid suppresses in-vitro decidualization of human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 1996 [cited 2022 Aug 31];2(3):185–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9238678/>
11. Grewal S, Carver JG, Ridley AJ, Mardon HJ. Implantation of the human embryo requires Rac1-dependent endometrial stromal cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Oct 21 [cited 2021 Mar 15];105(42):16189–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18838676/>
12. Weimar CHE, Macklon NS, Post Uiterweer ED, Brosens JJ, Gellersen B. The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Aug 5];19(5):542–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23827985/>
13. Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: An update. Vol. 6, Human Reproduction

Update. 2000. p. 225–36.

14. Gao J, Mazella J, Tang M, Tseng L. Ligand-activated progesterone receptor isoform hPR-A is a stronger transactivator than hPR-B for the expression of IGFBP-1 (insulin-like growth factor binding protein-1) in human endometrial stromal cells. *Mol Endocrinol*. 2000;14(12):1954–61.
15. Tang B, Guller S, Gurside E. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate induces prolactin expression in stromal cells isolated from human proliferative endometrium. *Endocrinology* [Internet]. 1993 Nov [cited 2019 Nov 1];133(5):2197–203. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8404671>
16. Yang S, Fang Z, Gurates B, Tamura M, Miller J, Ferrer K, et al. Stromal PRs Mediate Induction of 17 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 Expression in Human Endometrial Epithelium: A Paracrine Mechanism for Inactivation Of E2. *Mol Endocrinol*. 2001 Dec;15(12):2093–105.
17. Telgmann R, Maronde E, Taskén K, Gellersen B. Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* [Internet]. 1997 [cited 2022 Aug 7];138(3):929–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9048592/>
18. Fansini F, Bergamini CM, Bettocchi S, Malfaccini M, Santoiemma M, Scoppetta V, et al. Sex steroid hormones influence the cAMP content in human endometrium during the menstrual cycle. *Gynecol Obstet Invest* [Internet]. 1984 [cited 2022 Aug 7];18(4):174–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6096230/>
19. Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. *Endocr Rev*. 2014;35(6):851–905.
20. Fabi F, Grenier K, Parent S, Adam P, Tardif L, Leblanc V, et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. *PLoS One*. 2017 May 1;12(5).
21. Yoshino O, Osuga Y, Hirota Y, Koga K, Yano T, Tsutsumi O, et al. Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2003 [cited 2022 Oct 3];9(5):265–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12728019/>
22. Schweizer A, Ericsson M, Bachi T, Griffiths G, Hauri HP. Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J Cell Sci*. 1993;104(3).
23. Armstrong SR, Wu H, Wang B, Abuetaab Y, Sergi C, Leng RP. The regulation of tumor suppressor p63 by the ubiquitin-proteasome system [Internet]. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016 [cited 2020 Oct 17]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27929429/>
24. Zacharias DA, Mullen M, Planey SL. Antiproliferative factor-induced changes in phosphorylation and palmitoylation of cytoskeleton-associated protein-4 regulate its nuclear translocation and DNA binding. *Int J Cell Biol*. 2012;
25. Tuffy KM, Planey SL. Cytoskeleton-Associated Protein 4: Functions Beyond the Endoplasmic Reticulum in Physiology and Disease. *ISRN Cell Biol*. 2012 Oct 31;2012:1–11.
26. Klopfenstein DR, Klumperman J, Lustig A, Kammerer RA, Oorschot V, Hauri HP.

- Subdomain-specific localization of CLIMP-63 (p63) in the endoplasmic reticulum is mediated by its luminal  $\alpha$ -helical segment. *J Cell Biol* [Internet]. 2001 Jun 11 [cited 2020 Oct 14];153(6):1287–99. Available from: <http://www.jcb.org/cgi/content/full/153/6/1287>
27. Gao G, Zhu C, Liu E, Nabi IR. Reticulon and CLIMP-63 regulate nanodomain organization of peripheral ER tubules. *PLoS Biol* [Internet]. 2019 Aug 30 [cited 2020 Oct 19];17(8). Available from: [/pmc/articles/PMC6742417/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444417/)
  28. Zheng P, Obara CJ, Szczesna E, Nixon-Abell J, Mahalingan KK, Roll-Mecak A, et al. ER proteins decipher the tubulin code to regulate organelle distribution. *Nature*. 2022 Jan 6;601(7891):132–8.
  29. Razzaq TM, Bass R, Vines DJ, Werner F, Whawell SA, Ellis V. Functional Regulation of Tissue Plasminogen Activator on the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by the Type-II Transmembrane Protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):42679–85.
  30. Gupta N, Manevich Y, Kazi AS, Tao JQ, Fisher AB, Bates SR. Identification and characterization of p63 (CKAP4/ERGIC-63/CLIMP-63), a surfactant protein A binding protein, on type II pneumocytes. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291(3).
  31. Conrads TP, Tocci GM, Hood BL, Zhang CO, Guo L, Koch KR, et al. CKAP4/p63 is a receptor for the frizzled-8 protein-related antiproliferative factor from interstitial cystitis patients. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Dec 8 [cited 2022 Oct 4];281(49):37836–43. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820719587/fulltext>
  32. Planey SL, Keay SK, Zhang CO, Zacharias DA. Palmitoylation of cytoskeleton associated protein 4 by DHHC2 regulates antiproliferative factor-mediated signaling. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2009 Mar 1 [cited 2023 Feb 28];20(5):1454–63. Available from: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e08-08-0849>
  33. Chen L, You C, Jin X, Zhou L, Huang L, Wang Y. Cytoskeleton-associated protein 4 is a novel serodiagnostic marker for esophageal squamous-cell carcinoma. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2018 [cited 2023 Feb 28];11:8221–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30538491/>
  34. Tuffy KM, Planey SL. Cytoskeleton-Associated Protein 4: Functions Beyond the Endoplasmic Reticulum in Physiology and Disease. *ISRN Cell Biol*. 2012;2012:1–11.
  35. Osugi Y, Fumoto K, Kikuchi A. CKAP4 Regulates Cell Migration via the Interaction with and Recycling of Integrin. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2019 Jun 3 [cited 2020 Oct 19];39(16). Available from: [/pmc/articles/PMC6664606/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444417/)
  36. Tissue expression of CKAP4 - Summary - The Human Protein Atlas [Internet]. [cited 2023 Feb 26]. Available from: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000136026-CKAP4/tissue>
  37. Makrigiannakis A, Minas V. Mechanisms of implantation. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2007 [cited 2022 Oct 3];14(1):102–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17207342/>
  38. Murphy CR, Shaw TJ. Plasma membrane transformation: a common response of uterine epithelial cells during the peri-implantation period. *Cell Biol Int* [Internet]. 1994 Dec [cited 2022 Oct 3];18(12):1115–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7703952/>



39. Jiménez-Ayala M, Portillo BJ-A. Cytology of the Normal Endometrium – Cycling and Postmenopausal. Endometrial Adenocarcinoma Prev Early Diagnosis [Internet]. 2008 Feb 15 [cited 2022 Oct 3];17:32–9. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/117494>
40. Salmani M, Ahmad H, Valoujerdi MR. ENDOMETRIAL RECEPTIVITY TO IMPLANTATION IN HUMANS: BIOCHEMICAL AND MOLECULAR ASPECTS. undefined. 2008;
41. Pawlina, Wojciech, MD F, Ross, Michael H. P. Histology, A text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Seventh. Taylor C, editor. Lippincott Williams & Wilkins; 2016.
42. LI TC, WARREN MA, HILL CJ, SARAVELOS H. Morphology of the human endometrium in the peri-implantation period. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 1994 [cited 2022 Oct 3];734(1):169–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7978914/>
43. Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol [Internet]. 2000 [cited 2022 Oct 3];14(5):757–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11023797/>
44. Buchwalow IB, Belyaeva LA, Zavalishina LE. Localization of nucleoside phosphatases (ATPase and 5'-nucleotidase) and nuclear ribonucleoproteins in the human endometrial glandular cells during the secretory phase. Acta Histochem. 1985;77(2):205–8.
45. Aplin JD. Embryo implantation: the molecular mechanism remains elusive. Reprod Biomed Online [Internet]. 2006 [cited 2022 Oct 3];13(6):833–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17169205/>
46. McNulty KL, Elliott-Sale KJ, Dolan E, Swinton PA, Ansdell P, Goodall S, et al. The Effects of Menstrual Cycle Phase on Exercise Performance in Eumenorrhic Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. Sports Med [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2023 Feb 2];50(10):1813–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32661839/>
47. Carmichael MA, Thomson RL, Moran LJ, Wycherley TP. The Impact of Menstrual Cycle Phase on Athletes' Performance: A Narrative Review. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2021 Feb 2 [cited 2023 Feb 2];18(4):1–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33572406/>
48. ÖKTEM Ö, URMAN B. Reprodüktif yaşam siklusu: Folikülogenez ve menstruasyon. Türk Jinekoloji ve Obstet Derneği Derg [Internet]. 2012 [cited 2022 Oct 3];9(1):1–24. Available from: <http://search.yayin/detay/134217>
49. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. Reprod Med Biol. 2018;17(3):220–7.
50. Li Q, Kannan A, Das A, DeMayo FJFJ, Hornsby PJ, Young SL, et al. The Developing Human [Internet]. 10th ed. Vol. 124, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Elsevier B.V.; 2016 [cited 2019 Oct 22]. 24 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2016.02.012>
51. Parr MB, Parr EL. The Implantation Reaction. Biol Uterus [Internet]. 1989 [cited 2022 Aug 24];233–77. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-5589-2\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-5589-2_9)
52. Favaro R, Abrahamsohn PA, Zorn MT. Decidualization and Endometrial Extracellular Matrix Remodeling. Guid to Investig Mouse Pregnancy. 2014 Jan 1;125–42.

53. Kajihara T, Tanaka K, Oguro T, Tochigi H, Prechapanich J, Uchino S, et al. Androgens modulate the morphological characteristics of human endometrial stromal cells decidualized in vitro. *Reprod Sci*. 2014 Mar;21(3):372–80.
54. Chen GTC, Getsios S, MacCalman CD. Cadherin-11 is a hormonally regulated cellular marker of decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Reprod Dev* [Internet]. 1999 [cited 2022 Aug 5];52(2):158–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9890746/>
55. Iwahashi M, Muragaki Y, Ooshima A, Yamoto M, Nakano R. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. *J Reprod Fertil*. 1996;108(1):147–55.
56. Can A, Tekelioğlu M, Baltaci A. Expression of desmin and dimitin intermediate filaments in human decidual cells during first trimester pregnancy. *Placenta*. 1995 Apr 1;16(3):261–75.
57. Brar AK, Frank GR, Kessler CA, Cedars MI, Handwerger S. Progesterone-dependent decidualization of the human endometrium is mediated by cAMP. *Endocrine*. 1997;6(3):301–7.
58. Yoshie M, Kusama K, Tamura K. Molecular mechanisms of human endometrial decidualization activated by cyclic adenosine monophosphate signaling pathways. *J Mamm Ova Res*. 2015;32(3):95–102.
59. Rękawiecki R, Kowalik MK, Kotwica J. Nuclear progesterone receptor isoforms and their functions in the female reproductive tract. *Pol J Vet Sci*. 2011;14(1):149–58.
60. Zelent A, Mendelsohn C, Kastner P, Krust A, Garnier JM, Ruffenach F, et al. Differentially expressed isoforms of the mouse retinoic acid receptor beta generated by usage of two promoters and alternative splicing. *EMBO J* [Internet]. 1991 [cited 2022 Aug 3];10(1):71–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1846599/>
61. Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* [Internet]. 1990 [cited 2023 Feb 23];9(5):1603–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2328727/>
62. Brosens JJ, Hayashi N, White JO. Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* [Internet]. 1999 Oct [cited 2019 Nov 1];140(10):4809–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10499541>
63. Mote PA, Balleine RL, McGowan EM, Clarke CL. Heterogeneity of progesterone receptors A and B expression in human endometrial glands and stroma. *Hum Reprod* [Internet]. 2000 [cited 2022 Oct 13];15 Suppl 3(SUPPL. 3):48–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11041221/>
64. Kaya HS, Hantak AM, Stubbs LJ, Taylor RN, Bagchi IC, Bagchi MK. Roles of progesterone receptor A and B isoforms during human endometrial decidualization. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2022 Aug 3];29(6):882–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25875046/>
65. Yoshie M, Kusama K, Tamura K. Molecular Mechanisms of Human Endometrial

- Decidualization Activated by Cyclic Adenosine Monophosphate Signaling Pathways. <https://doi.org/10.1274/jmor3295> [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2023 Feb 23];32(3):95–102. Available from: <https://bioone.org/journals/journal-of-mammalian-ova-research/volume-32/issue-3/jmor.32.95/Molecular-Mechanisms-of-Human-Endometrial-Decidualization-Activated-by-Cyclic-Adenosine/10.1274/jmor.32.95.full>
66. Lösel RM, Besong D, Peluso JJ, Wehling M. Progesterone receptor membrane component 1--many tasks for a versatile protein. *Steroids* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Aug 5];73(9–10):929–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18249431/>
  67. Zhu Y, Hanna RN, Schaaf MJM, Spaink HP, Thomas P. Candidates for membrane progestin receptors--past approaches and future challenges. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 5];148(4):381–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18602498/>
  68. Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Aug 5];25(3):139–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17447204/>
  69. Tulac S, Nayak NR, Kao LC, Van Waes M, Huang J, Lobo S, et al. Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Aug 1;88(8):3860–6.
  70. Kane N, Jones M, Brosens JJ, Saunders PTK, Kelly RW, Critchley HOD. Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 Attenuates Expression of Both the Progesterone Receptor and Dickkopf in Differentiated Human Endometrial Stromal Cells. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2022 Oct 11];22(3):716. Available from: </pmc/articles/PMC5419609/>
  71. Guzeloglu Kayisli O, Kayisli UA, Luleci G, Arici A. In Vivo and In Vitro Regulation of Akt Activation in Human Endometrial Cells Is Estrogen Dependent. *Biol Reprod*. 2004 Sep 1;71(3):714–21.
  72. Enmark E, Gustafsson JÅ. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med* [Internet]. 1999 [cited 2023 Feb 26];246(2):133–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10447781/>
  73. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JÅ, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* [Internet]. 1997 [cited 2022 Oct 3];138(11):4613–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9348186/>
  74. Sanchez R, Nguyen D, Rocha W, White JH, Mader S. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* [Internet]. 2002 [cited 2023 Feb 26];24(3):244–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11891761/>
  75. Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 26];52(4):513–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121509/>
  76. Levin ER. Invited review: Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* [Internet]. 2001 [cited 2023 Feb 26];91(4):1860–7.

Available from: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/jappl.2001.91.4.1860>

77. Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase Mediates Neuroprotection by Estrogen in Cultured Cortical Neurons. *J Neurosci Res* [Internet]. 2000 [cited 2023 Feb 26];60:321–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/>
78. Qi QR, Lechuga TJ, Patel B, Nguyen NA, Yang YH, Li Y, et al. Enhanced Stromal Cell CBS-H2S Production Promotes Estrogen-Stimulated Human Endometrial Angiogenesis. *Endocrinology* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Feb 26];161(11). Available from: </pmc/articles/PMC7575054/>
79. Wang Y yi, Duan H, Wang S, Quan Y jun, Huang J hua, Guo Z chen. Upregulated Talin1 synergistically boosts  $\beta$ -estradiol-induced proliferation and pro-angiogenesis of eutopic and ectopic endometrial stromal cells in adenomyosis. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2023 Feb 26];19(1):70. Available from: </pmc/articles/PMC8120781/>
80. Flamini MI, Sanchez AM, Genazzani AR, Simoncini T. Estrogen regulates endometrial cell cytoskeletal remodeling and motility via focal adhesion kinase. *Fertil Steril* [Internet]. 2011 Feb [cited 2023 Feb 26];95(2):722–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20869705/>
81. Matsuoka A, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Taniguchi K, Asada H, et al. Progesterone increases manganese superoxide dismutase expression via a cAMP-dependent signaling mediated by noncanonical Wnt5a pathway in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 23];95(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685861/>
82. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 7];13(4):290–314. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24687066/>
83. Kusama K, Yoshie M, Tamura K, Kodaka Y, Hirata A, Sakurai T, et al. Regulation of decidualization in human endometrial stromal cells through exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac). *Placenta* [Internet]. 2013 Mar [cited 2023 Feb 23];34(3):212–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23352189/>
84. Chatterjee A, Jana NR, Bhattacharya S. Stimulation of cyclic AMP, 17 $\beta$ -oestradiol and protein synthesis by human chorionic gonadotrophin in human endometrial cells. *Hum Reprod* [Internet]. 1997 [cited 2022 Oct 3];12(9):1903–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9363703/>
85. Yoshino O. Akt as a possible intracellular mediator for decidualization in human endometrial stromal cells. *Mol Hum Reprod*. 2003 May 1;9(5):265–9.
86. Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, et al. A novel immortalized human endometrial stromal cell line with normal progestational response. *Endocrinology*. 2004 May;145(5):2291–6.
87. Holmberg JC, Haddad S, Wünsche V, Yang Y, Aldo PB, Gnainsky Y, et al. An in vitro model for the study of human implantation. *Am J Reprod Immunol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Nov 17];67(2):169–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22151560/>

88. Schutte SC, Taylor RN. A tissue-engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization, and menstruation. *Fertil Steril* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Nov 17];97(4):997–1003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22306710/>
89. Zhao Y, Park S, Bagchi MK, Taylor RN, Katzenellenbogen BS. The coregulator, repressor of estrogen receptor activity (REA), is a crucial regulator of the timing and magnitude of uterine decidualization. *Endocrinology* [Internet]. 2013 Mar 1 [cited 2022 Oct 13];154(3):1349–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23392257/>
90. Zhang X, Fu LJ, Liu XQ, Hu ZY, Jiang Y, Gao RF, et al. nm23 regulates decidualization through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathways in mice and humans. *Hum Reprod* [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2022 Oct 11];31(10):2339–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27604954/>
91. Liao Y, Hung MC. Physiological regulation of Akt activity and stability. *Am J Transl Res* [Internet]. 2010 [cited 2022 Oct 11];2(1):19. Available from: </pmc/articles/PMC2826820/>
92. Song G, Ouyang G, Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2005 [cited 2022 Oct 11];9(1):59. Available from: </pmc/articles/PMC6741304/>
93. Santi SA, Lee H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2010 Mar;298(3).
94. Gonzalez E, McGraw TE. Insulin-modulated Akt subcellular localization determines Akt isoform-specific signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 28;106(17):7004–9.
95. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. *Reproduction* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Oct 11];148(5):R85–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25118299/>
96. Sen P, Mukherjee S, Ray D, Raha S. Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Mol Cell Biochem*. 2003 Nov;253(1–2):241–6.
97. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* (80- ). 2005 Feb 18;307(5712):1098–101.
98. Mora A, Komander D, ... D van A-S in cell &, 2004 undefined. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. Elsevier [Internet]. [cited 2022 Oct 11]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1084952103001277>
99. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: A play in three acts. Vol. 13, *Genes and Development*. 1999. p. 2905–27.
100. Manchikanti L, Boswell M V., Datta S, Fellows B, Abdi S, Singh V, et al. Comprehensive review of therapeutic interventions in managing chronic spinal pain. Vol. 12, *Pain Physician*. 2009.
101. Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal* [Internet]. 2009 Apr [cited 2019 Nov 1];21(4):470–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110052>
102. Hajduch E, Litherland GJ, Hundal HS. Protein kinase B (PKB/Akt)--a key regulator of

- glucose transport? FEBS Lett [Internet]. 2001 Mar 16 [cited 2022 Oct 11];492(3):199–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11257494/>
103. Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, ... YT-J of B, 1998 undefined. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1,-2, and-3, their association with p85 phosphatidylinositol 3. ASBMB [Internet]. [cited 2022 Oct 11]; Available from: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)80853-5/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)80853-5/abstract)
  104. Al-Sakkaf K, Mooney L, ... PD-J of, 2000 undefined. Possible role for protein kinase B in the anti-apoptotic effect of prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. Citeseer [Internet]. 2000 [cited 2022 Oct 11];167:85–92. Available from: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.533.2139&rep=rep1&type=pdf>
  105. Labied S, Kajihara T, Madureira P, ... LF-M, 2006 undefined. Progestins regulate the expression and activity of the forkhead transcription factor FOXO1 in differentiating human endometrium. academic.oup.com [Internet]. [cited 2022 Oct 12]; Available from: <https://academic.oup.com/mend/article-abstract/20/1/35/2741321>
  106. Zhang X, Tang N, Hadden TJ, Rishi AK. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. Vol. 1813, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research. 2011. p. 1978–86.
  107. Chen S, Gai J, Wang Y, letters HL-F, 2011 undefined. FoxO regulates expression of decidual protein induced by progesterone (DEPP) in human endothelial cells. Elsevier [Internet]. [cited 2022 Oct 12]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579311002717>
  108. Kajihara T, Brosens JJ, Ishihara O. The role of FOXO1 in the decidual transformation of the endometrium and early pregnancy. Vol. 46, Medical Molecular Morphology. Springer Tokyo; 2013. p. 61–8.
  109. Lei W, Feng XH, Deng WB, Ni H, Zhang ZR, Jia B, et al. Progesterone and DNA damage encourage uterine cell proliferation and decidualization through up-regulating ribonucleotide reductase 2 expression during early pregnancy in mice. J Biol Chem [Internet]. 2012 May 4 [cited 2022 Oct 12];287(19):15174–92. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820461708/fulltext>
  110. Fabi F, Asselin E. Expression, activation, and role of AKT isoforms in the uterus. Reproduction [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2023 Feb 23];148(5):R85–95. Available from: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/148/5/R85.xml>
  111. Bai J, Qi QR, Li Y, Day R, Makhoul J, Magness RR, et al. Estrogen Receptors and Estrogen-Induced Uterine Vasodilation in Pregnancy. Int J Mol Sci 2020, Vol 21, Page 4349 [Internet]. 2020 Jun 18 [cited 2023 Feb 26];21(12):4349. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/12/4349/htm>
  112. Stadtmauer DJ, Wagner GP. Single-cell analysis of prostaglandin E2-induced human decidual cell in vitro differentiation: a minimal ancestral decidualogenic signal†. Biol Reprod [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2023 Feb 26];106(1):155–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34591094/>
  113. Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, et al. CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. J Clin Invest. 2016 Jul 1;126(7):2689–705.

114. Schweizer A, Ericsson M, Bächli T, Griffiths G, Hauri HP. Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J Cell Sci* [Internet]. 1993 Mar [cited 2019 Oct 29];104 ( Pt 3:671–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8314869>
115. Schweizer A, Rohrer J, Hauri HP, Kornfeld S. Retention of p63 in an ER-Golgi intermediate compartment depends on the presence of all three of its domains and on its ability to form oligomers. *J Cell Biol* [Internet]. 1994 Jul 1 [cited 2020 Oct 14];126(1):25–39. Available from: <http://rupress.org/jcb/article-pdf/126/1/25/1258581/25.pdf>
116. Armstrong SR, Wu H, Wang B, Abuetabh Y, Sergi C, Leng RP. The regulation of tumor suppressor p63 by the ubiquitin-proteasome system. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
117. Klopfenstein DRC, Kappeler F, Hauri HP. A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J* [Internet]. 1998 Nov 2 [cited 2020 Oct 16];17(21):6168–77. Available from: <https://www.embopress.org/doi/full/10.1093/emboj/17.21.6168>
118. Schweizer A, Rohrer J, Slot JW, Geuze HJ, Kornfeld S. Reassessment of the subcellular localization of p63. *J Cell Sci*. 1995;108(6).
119. Harada T, Sada R, Osugi Y, Matsumoto S, Matsuda T, Hayashi-Nishino M, et al. Palmitoylated CKAP4 regulates mitochondrial functions through an interaction with VDAC2 at ER-mitochondria contact sites. *J Cell Sci* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Nov 9];133(21). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33067255/>
120. Sandoz PA, Van Der Goot FG. How many lives does CLIMP-63 have? *Biochem Soc Trans*. 2015 Apr 1;43:222–8.
121. Conrads TP, Tocci GM, Hood BL, Zhang CO, Guo L, Koch KR, et al. CKAP4/p63 is a receptor for the frizzled-8 protein-related antiproliferative factor from interstitial cystitis patients. *J Biol Chem*. 2006 Dec 8;281(49):37836–43.
122. Kazi AS, Tao J-Q, Feinstein SI, Zhang L, Fisher AB, Bates SR. Role of the PI3-kinase signaling pathway in trafficking of the surfactant protein A receptor P63 (CKAP4) on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2019 Nov 7];299(6):L794-807. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20870746>
123. Kimura H, Yamamoto H, Harada T, Fumoto K, Osugi Y, Sada R, et al. CKAP4, a DKK1 receptor, is a biomarker in exosomes derived from pancreatic cancer and a molecular target for therapy. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2020 Oct 19];25(6):1936–47. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/>
124. Bhavanasi D, Speer KF, Klein PS. CKAP4 is identified as a receptor for Dickkopf in cancer cells. *J Clin Invest* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2023 Feb 1];126(7):2419–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27322056/>
125. Gupta N, Manevich Y, Kazi AS, Tao JQ, Fisher AB, Bates SR. Identification and characterization of p63 (CKAP4/ERGIC-63/CLIMP-63), a surfactant protein A binding protein, on type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* [Internet]. 2006 [cited 2022 Oct 4];291(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16556726/>

126. Razzaq TM, Bass R, Vines DJ, Werner F, Whawell SA, Ellis V. Functional Regulation of Tissue Plasminogen Activator on the Surface of Vascular Smooth Muscle Cells by the Type-II Transmembrane Protein p63 (CKAP4). *J Biol Chem* [Internet]. 2003 Oct 24 [cited 2022 Oct 4];278(43):42679–85. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820828130/fulltext>
127. Arslan SY, Yu Y, Burdette JE, Pavone ME, Hope TJ, Woodruff TK, et al. Novel three dimensional human endocervix cultures respond to 28-day hormone treatment. *Endocrinology* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2023 Mar 1];156(4):1602–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25635622/>
128. Schutte SC, James CO, Sidell N, Taylor RN. Tissue-engineered endometrial model for the study of cell-cell interactions. *Reprod Sci* [Internet]. 2015 Mar 16 [cited 2023 Mar 1];22(3):308–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25031317/>
129. Duan R, Xie W, Li X, McDougal A, Safe S. Estrogen regulation of c-fos gene expression through phosphatidylinositol-3-kinase-dependent activation of serum response factor in MCF-7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2002 [cited 2023 Feb 1];294(2):384–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12051724/>
130. Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, De Falco A, Lombardi M, et al. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* [Internet]. 2001 Nov 1 [cited 2023 Feb 1];20(21):6050–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11689445/>
131. Dery MC, Léblanc V, Shooner C, Asselin E. Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2003 Jun 12 [cited 2023 Feb 1];1. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12816542/>
132. Kimura H, Fumoto K, Shojima K, Nojima S, Osugi Y, Tomihara H, et al. CKAP4 is a Dickkopf1 receptor and is involved in tumor progression. *J Clin Invest*. 2016 Jul 1;126(7):2689–705.
133. Li SX, Li J, Dong LW, Guo ZY. Cytoskeleton-Associated Protein 4, a Promising Biomarker for Tumor Diagnosis and Therapy. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021 Feb 5 [cited 2023 Feb 2];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33614703/>
134. Sun CM, Geng J, Yan Y, Yao X, Liu M. Overexpression of CKAP4 is Associated with Poor Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Functions via Cyclin B Signaling. *J Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2023 Feb 2];8(19):4018–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29187877/>
135. Graham JD, Yager ML, Hill HD, Byth K, O'Neill GM, Clarke CL. Altered Progesterone Receptor Isoform Expression Remodels Progestin Responsiveness of Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2023 Mar 2];19(11):2713–35. Available from: <https://academic.oup.com/mend/article/19/11/2713/2741284>
136. Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, et al. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. *Endocrinology* [Internet]. 2006 Mar [cited 2023 Feb 3];147(3):1097–121. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16306079/>
137. Horne FM, Blithe DI. Progesterone receptor modulators and the endometrium:



- changes and consequences. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2007 Nov [cited 2023 Feb 3];13(6):567–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630398/>
138. Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q, et al. Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* [Internet]. 2010 Jan 4 [cited 2023 Mar 1];120(1):103–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20038814/>
  139. Amelio I, Melino G, Candi E. p63 Adjusts Sugar Taste of Epidermal Layers. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2023 Feb 6];137(6):1204–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28395898/>
  140. Cloke B, Huhtinen K, Fusi L, Kajihara T, Yliheikkilä M, Ho KK, et al. The Androgen and Progesterone Receptors Regulate Distinct Gene Networks and Cellular Functions in Decidualizing Endometrium. *Endocrinology* [Internet]. 2008 Sep [cited 2023 Mar 2];149(9):4462. Available from: [/pmc/articles/PMC5393297/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17630398/)
  141. Krikun G, Mor G, Alvero A, Guller S, Schatz F, Sapi E, et al. A Novel Immortalized Human Endometrial Stromal Cell Line with Normal Progestational Response. *Endocrinology* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Nov 17];145(5):2291–6. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article/145/5/2291/2878138>
  142. Wetendorf M, DeMayo FJ. The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. Vol. 357, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. p. 108–18.
  143. Yu J, Wu J, Bagchi IC, Bagchi MK, Sidell N, Taylor RN. Disruption of gap junctions reduces biomarkers of decidualization and angiogenesis and increases inflammatory mediators in human endometrial stromal cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2011 Sep 15 [cited 2022 Nov 28];344(1–2):25–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21767601/>
  144. Yu J, Berga SL, Zou W, Taylor RN. Interleukin-1 $\beta$  inhibits estrogen receptor- $\alpha$ , progesterone receptors A and B and biomarkers of human endometrial stromal cell differentiation: implications for endometriosis. *Mol Hum Reprod* [Internet]. 2019 Aug 8 [cited 2022 Nov 28];25(10):625–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31408162/>
  145. Kikuchi A, Matsumoto S, Sada R. Dickkopf signaling, beyond Wnt-mediated biology. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 Feb 3];125:55–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34801396/>
  146. Li X, Wang J, Zhu S, Zheng J, Xie Y, Jiang H, et al. DKK1 activates noncanonical NF- $\kappa$ B signaling via IL-6-induced CKAP4 receptor in multiple myeloma. *Blood Adv* [Internet]. 2021 Sep 28 [cited 2023 Mar 3];5(18):3656–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34470047/>
  147. Rytönen KT, Erkenbrack EM, Poutanen M, Elo LL, Pavlicev M, Wagner GP. Decidualization of Human Endometrial Stromal Fibroblasts is a Multiphasic Process Involving Distinct Transcriptional Programs. *Reprod Sci* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2023 Mar 3];26(3):323–36. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30309298/>
  148. Fabi F, Grenier K, Parent S, Adam P, Tardif L, Leblanc V, et al. Regulation of the PI3K/Akt pathway during decidualization of endometrial stromal cells. Yang Z-M, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 May 5 [cited 2019 Nov 1];12(5):e0177387. Available

from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0177387>