

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**FARELERDE GEBELİK BOYUNCA**  
**FKBP52 İLE PRDX6**  
**ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER**

**Nuray ACAR**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2012**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**FARELERDE GEBELİK BOYUNCA  
FKBP52 İLE PRDX6  
ARASINDAKİ ETKİLEŞİMLER**

**Nuray ACAR**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanları**

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL  
Prof. Dr. Sudhansu K. DEY**

Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir  
(Proje No: 2009.03.0122.003)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2012**

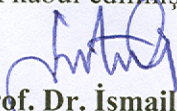
## **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı**

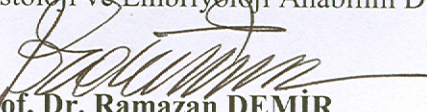
Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı Senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

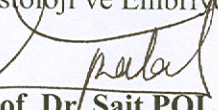
- 1- **Acar N**, Korgun ET, Cayli S, Sahin Z, Demir R, Ustunel I. Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? Acta Histochem. 2008;110(5):408-17.
- 2- **Acar N**, Korgun ET, Ustunel I. Cell cycle inhibitor p57 expression in normal and diabetic rat placentas during some stages of pregnancy. Histol Histopathol. 2012;27(1):59-68.
- 3- Hirota Y, **Acar N**, Tranguch S, Burnum KE, Xie H, Kodama A, Osuga Y, Ustunel I, Friedman DB, CaprioliRM, Daikoku T, Dey SK. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA 2010 107(35):15577-82.

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;**


Bu alışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 12/07//2012

  
**Tez Danışmanı : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

  
**Üye : Prof. Dr. Ramazan DEMİR**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

  
**Üye : Prof. Dr. Sait POLAT**  
ukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

  
**Üye : Prof. Dr. Münire ERMAN AKAR**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

  
**Üye : Doç. Dr. Gökhan AKKOYUNLU**  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi,  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**ONAY:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../2012 tarih ve ..... /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Bir immünofilin olan FK506'ya bağlanan protein 52 (FKBP52), steroid hormon reseptör aktivitesini değiştiren bir Hsp90 koşaperonudur. FKBP52'nin reseptör-şaperon kompleksleri ile işbirliği sonucu reseptörün hormona bağlanması artar. Daha önce yapılan çalışmalarda CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* geni çıkarılmış (*Fkbp52*-/-) dişi farelerde ovulasyon ve fertilizasyonun normal olduğu ancak implantasyonun gerçekleşmediği gözlenmiştir. *Fkbp52*-/- dişi farelere gebeliklerinin 2-4. günleri boyunca Progesteron (P<sub>4</sub>) enjeksiyonu yapıldığında CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşmiş ancak C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda gerçekleşmemiştir.

İmplantasyonun P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapılan CD1 genetik zeminli *Fkbp52*-/- farelerde gerçekleşmesine karşın C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda gerçekleşmemesi, CD1 *Fkbp52*-/- farelerde gebeliğin terme ulaşabilmesi için daha fazla P<sub>4</sub> düzeylerine gereksinim duyulması, plasentada *Fkbp52* eksprese edilmesine karşın *Pgr*'nin eksprese edilmemesi bilgilerinden yola çıkarak FKBP52'nin Progesteron reseptörü (PR) aktivitesini optimize etmekten başka bir fonksiyonu olabileceği hipotezini kurduk.

Yaptığımız 2 boyutlu ayırım jel elektroforezi ve kütle spektrometresi sonucunda *Fkbp52*-/- uterusu P<sub>4</sub>-PR sinyalinden bağımsız olarak sadece antioksidan protein Peroksiredoksin6 (PRDX6)'nın azaldığını bulduk. Bu proteinin spesifik olarak uterusu azaldığını Northern Blot yöntemi ile; oksidatif stresin uterusu spesifik olduğunu ise 8-izoprostan assay ile gösterdik.

Normalde implantasyonun %100 oranında gerçekleştiği P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*-/- farelere oksidatif stres indükleyici ajan parakuat enjeksiyonu bu fareleri oksidatif strese daha hassas hale getirerek implantasyonu büyük ölçüde inhibe etti. Bu farelere parakuatın yanı sıra N-Asetil sistein ve  $\alpha$ -Tokoferol antioksidanlarının uygulanması bu farelerdeki implantasyon başarısını artırdı.

Desiduada FKBP52 ile PRDX6 arasında fiziksel etkileşim olduğunu immüno-presipitasyon yöntemiyle gösterdik.

*Fkbp52*-/- fareler ile in vivoda elde ettiğimiz bulguları in vitroda fare embriyonik fibroblast çalışmaları ile doğruladık.

Elektron mikroskopi incelemeleri ile *Fkbp52*-/- farelerin uterusunda vahşi tip uterusu oranla ultrastrüktürel düzeyde değişiklikler olduğunu gösterdik.

Çalışmamız, FKBP52'nin PR kompleksindeki koşaperon fonksiyonunun yanı sıra uterusu PRDX6 ile etkileşip oksidan/antioksidan düzeylerini etkileyerek gebeliği oksidatif stresten koruduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** FK506'ya bağlanan protein 52 (FKBP52), peroksiredoksin 6 (PRDX6), implantasyon, oksidatif stres.

## ABSTRACT

FK506 binding protein (FKBP52) is an immunophilin which serves as a Hsp90 cochaperone to influence steroid hormone receptor function. Association of FKBP52 with receptor-chaperone complex increases the binding of receptor-hormone binding. Previous studies showed that *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice on CD1 and C57BL6/129 genetic backgrounds have normal ovulation and fertilization but have complete implantation failure. P<sub>4</sub> supplementation rescued implantation in CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females but not in C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females. Hence P<sub>4</sub> supplementation can rescue implantation in CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females but not in C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females, CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females need higher amount of P<sub>4</sub> to maintain pregnancy to full term and expression of *Fkbp52* in the placenta without *Pgr* we hypothesized that FKBP52 should have another function independent of its PR cochaperone activity.

As a result of two dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry, antioxidant protein Peroxiredoxin6 (PRDX6) was found to be the only protein that downregulated in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus independent of P<sub>4</sub>-PR signaling. We confirmed specific downregulation of *Prdx6* in the uterus by Northern Blotting and specificity of oxidative stress to the uterus via 8-isoprostane assay.

Injection of paraquat which is an oxidative stress inducing agent to P<sub>4</sub> treated *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice that normally have %100 implantation inhibited implantation substantially because these mice became more vulnerable to oxidative stress by paraquat injection. Treatment of these mice with N-acetylcysteine and  $\alpha$ -tocopherol antioxidants in addition to paraquat increased implantation success.

We showed physical interaction between FKBP52 and PRDX6 in the decidua via immunoprecipitation.

We confirmed our in vivo findings about *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice also by in vitro studies performed on mouse embryonic fibroblasts.

We showed changes in the uteri of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice compared to wild type mice at ultrastructural level via electron microscopy.

Our study showed that in addition to its cochaperone function in PR complex FKBP52 also interacts with PRDX6 to balance oxidant/antioxidant status in the uterus and protects pregnancy.

**Key words:** FK506 binding protein (FKBP52), peroxiredoxin (PRDX6), implantation, oxidative stress.

## TEŞEKKÜR

Tezimin gerçekleşmesi için göstermiŐ oldukları maddi, manevi ve bilimsel desteklerinden dolayı danıŐman hocam Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL ve ikinci danıŐmanım Prof. Dr. Sudhansu K. DEY'e,

Anabilim Dalımız'daki sayın hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma,

Tez çalıŐmalarımı yurtdıŐında yapmama destek olan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na (BİDEB),

GöstermiŐ oldukları destek ve bilimsel katkılarından dolayı Cincinnati ocuk Hastanesi Üreme Biyolojisi Bölümü'nün çalıŐanlarına,

Teknik destekleri için TEMGA Ünitesinin değerli çalıŐanlarına,

Verdikleri desteklerden dolayı Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli çalıŐanlarına,

Bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tüm imkânlar için sevgili ailemin tüm fertlerine özellikle babacığım Mehmet İsmet ACAR'a sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>TEŞEKKÜR</b>	vii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	viii
<b>EKLER</b>	xii
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	xiii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xvi
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>	xix
<b>GİRİŞ VE AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1.    Uterusun Gelişimi	<b>3</b>
2.2.    Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi	<b>3</b>
2.2.1.    Ovaryum	<b>4</b>
2.2.2.    Ovidakt	<b>4</b>
2.2.3.    Uterus	<b>4</b>
2.2.4.    Vajina ve Klitoris	<b>4</b>
2.3.    Dişi Farede Üreme Fizyolojisi	<b>5</b>
2.4.    Farelerde Uterus Histolojisi	<b>6</b>
2.5.    İmplantasyon	<b>7</b>
2.5.1.    Farelerde İmplantasyon	<b>7</b>
2.5.2.    İmplantasyonun Safhaları	<b>7</b>
2.5.2.1.    Preimplantasyon Evresindeki Embriyonun Gelişimi	<b>7</b>
2.5.2.2.    Uterus Reseptivitesi	<b>8</b>
2.5.2.3.    Desidualizasyon	<b>11</b>
2.5.3.    İmplantasyonun Mekanikleri	<b>11</b>
2.5.4.    İmplantasyonun Tipleri ve Zamanlaması	<b>12</b>
2.5.5.    Gecikmiş İmplantasyon	<b>12</b>
2.6.    Gebeliğin Steroid Hormonlar Tarafından Düzenlenmesi	<b>13</b>
2.7.    Steroid Hormonlar ve Reseptörleri	<b>13</b>
2.7.1    Progesteron (P <sub>4</sub> ): Gebelik Hormonunun Keşfi	<b>13</b>
2.7.2    Progesteron (P <sub>4</sub> ) Sinyalinin Mekanizması	<b>14</b>
2.7.3    Erken Gebelik Boyunca Ekspresyonu Progesteron (P <sub>4</sub> ) Tarafından Düzenlenen Genler	<b>16</b>
2.8.    Geni Silinen/Knock-out (KO) Farelerin Oluşturulması	<b>17</b>
2.8.1    Kondisyonel Knock-out (KO) Fare Modeli	<b>19</b>
2.9.    FKBP52 Molekülünün Yapısı ve Görevleri	<b>19</b>



2.9.1.	FKBP52'nin Fizyolojik Rollerini	22
2.9.2.	Sistemik <i>Fkbp52</i> KO Farelerde Yapılan Çalışmalar ve Dr. Dey'in Laboratuvarı'ndan Elde Edilen Ön Bulgular	23
2.10.	Oksijen ve Canlılar İçin Önemi	27
2.10.1.	Serbest Radikaller	28
2.10.2.	Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları	28
2.10.2.1.	Süperoksit Radikali	29
2.10.2.2.	Hidrojen Peroksit	30
2.10.2.3.	Hidroksil Radikali	30
2.10.2.4.	Singlet Oksijen	30
2.10.3.	Serbest Radikal Kaynakları	30
2.10.4.	Serbest Radikallerin Etkileri	31
2.10.4.1.	Serbest Radikallerin Lipitler Üzerindeki Etkileri	31
2.10.4.2.	Serbest Radikallerin Proteinler Üzerindeki Etkileri	31
2.10.4.3.	Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri	32
2.10.4.4.	Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerindeki Etkileri	32
2.10.5.	Oksidatif Stres ve Oksidatif Strese Karşı Hücrenin Savunma Mekanizmaları ve Antioksidan Moleküller	32
2.10.5.1.	Enzimatik Antioksidanlar	33
2.10.5.2.	Enzimatik Olmayan (Non-enzimatik) Antioksidanlar	34
2.10.6.	Oksidatif Stresin Sebep Olduğu Hastalıklar	36
2.10.7.	Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Rollerini	36
2.10.7.1.	Dişi Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Rollerini	36
2.10.7.2.	Erkek Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Rollerini	38
2.10.8.	Peroksiredoksin (Prdx) Antioksidan Ailesi	38
2.10.8.1.	Peroksiredoksin 6 (Prdx6)	39
2.11.	Hipotez	41
<b>GEREÇ VE YÖNTEM</b>		<b>42</b>
3.1.	Proteomiks Metodu	42
3.1.1.	2 Boyutlu Ayrım Jel Elektrofözezi	42
3.1.2.	2 Boyutlu Ayrım Jel Elektrofözezi Analizi	43
3.1.3.	Kütle Spektrometresi İle Protein Tanımlanması	43
3.2.	<i>Fkbp52</i> Heterozigot Farelerin Çiftleştirilmesiyle Üreme Kafeslerinin Oluşturulması	44
3.2.1.	Üreme Kafeslerinden Elde Edilen Yavru Farelerde <i>Fkbp52</i> Genotiplendirmesi	44
3.3.	Farelerde Çiftleştirme Deneyleri	45
3.4.	Doku Toplanması ve Hazırlanması	46
3.4.1.	Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi	46
3.4.2.	Hızlı Dondurma Yöntemi İle Doku Toplanması	47
3.4.3.	Elektron Mikroskopik İncelemeler İçin Doku Takibi	47
3.5.	İn Vitro Deneyler	48
3.5.1.	İmmünohistokimya Yöntemi	48

3.5.2.	İmmünofloresan Yöntemi	50
3.5.3.	Western Blot Yöntemi	50
3.5.3.1.	Doku Homojenizasyonu ve Protein Elde Edilmesi	51
3.5.3.2.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	52
3.5.4.	İn Situ Hibridizasyon Yöntemi	54
3.5.4.1.	İn Situ Hibridizasyon İçin Prob Hazırlanması	55
3.5.4.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Elde Edilmesi	55
3.5.4.3.	Transformasyonda Kullanılacak Eschericia coli Bakterisi İçin Luria-Bertoni Besiyeri Hazırlanması	56
3.5.4.4.	PCR Ürününün Vektöre Klonlanması	56
3.5.4.5.	PCR Ürününün Vektöre Ligasyonu	57
3.5.4.6.	Vektörün E. coli Bakterisine Transformasyonu	57
3.5.4.7.	Vektör İçeren Bakteri Kolonisinin Belirlenmesi	57
3.5.4.8.	Vektörün Bakteriden Uzaklaştırılması ve Sekans Analizi	57
3.5.4.9.	Sense ve Antisense Proplarının Sentezlenmesi	58
3.5.4.10.	İn Situ Hibridizasyon Protokolü	58
3.5.4.11.	Slaytların Geliştirilmesi	59
3.5.5.	İmmünopresipitasyon Yöntemi	62
3.5.6.	Northern Blot Yöntemi	64
3.5.7.	8-İzoprostan Yöntemi İle Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	67
3.5.8.	Progesteron (P <sub>4</sub> ) ve Östrojen (E <sub>2</sub> ) Uygulaması	68
3.6.	İn Vivo Deneyler	68
3.6.1.	Parakuat Herbisitinin Uygulanması	68
3.6.2.	N-Asetil Sistein ve $\alpha$ -Tokoferol Antioksidanlarının Uygulanması	68
3.6.3.	Blastosist Transferi Deneyleri	69
3.6.4.	Hücre Kültürü	69
3.6.4.1.	Fare Embriyonik Fibroblastlarının İzolasyonu ve Kültürü	70
3.6.4.2.	Fare Embriyonik Fibroblastlarına Hidrojen Peroksit ve N-Asetil Sistein Uygulaması	71
3.6.4.3.	Fare Embriyonik Fibroblastlarında Hücre Canlılığının MTT Assay ile Belirlenmesi	72
3.6.4.4.	Fare Embriyonik Fibroblastlarında RT PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) Yöntemi	72
3.6.4.5.	Fare Embriyonik Fibroblastlarında Western Blot Yöntemi	74
3.7.	İstatistiksel Analiz	75

## BULGULAR

4.1.	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> ve <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> Fare Uteruslarında Vahşi Tip Uterusa Oranla Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler	76
4.1.1.	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> ve <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> Fare Uteruslarında Ekspresyonu	

	Artan Proteinler	76
4.1.2.	<i>Fkbp52</i> -/- ve <i>Pgr</i> -/- Fare Uteruslarında Ekspresyonu Azalan Proteinler	77
4.1.3.	<i>Fkbp52</i> -/- Fare Uterusunda Ekspresyonu Artan Proteinler	77
4.1.4.	<i>Fkbp52</i> -/- Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan Proteinler	78
4.2.	<i>Fkbp52</i> -/- Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan PRDX6'nın Western Blot Yöntemi İle Gösterilmesi	79
4.3.	<i>Fkbp52</i> -/- Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan PRDX6'nın İmmünohistokimya Yöntemi İle Gösterilmesi	80
4.4.	Progesteron (P <sub>4</sub> ) ve Östrojenin (E <sub>2</sub> ) Uterustaki <i>Prdx6</i> Ekspresyonu Üzerine Etkisi	81
4.5.	Gebeliğin 4. Gününde Bulunan CD1 ve C57BL6/129 Genetik Zeminli Vahşi Tip, <i>Fkbp52</i> -/- ve P <sub>4</sub> Uygulanmış <i>Fkbp52</i> -/- Farelerin Uterusunda PRDX6 Ekspresyonunun İmmünohistokimya Yöntemi İle Gösterilmesi	81
4.6.	Gebeliğin Farklı Günlerinde Bulunan CD1 ve C57BL6/129 Genetik Zeminli Vahşi Tip, <i>Fkbp52</i> -/- ve P <sub>4</sub> Uygulanmış <i>Fkbp52</i> -/- Farelerin Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde <i>Prdx6</i> Ekspresyonunun İn Situ Hibridizasyon Yöntemi İle Gösterilmesi	83
4.7.	Gebeliğin Farklı Günlerinde Bulunan CD1 Genetik Zeminli Vahşi Tip, <i>Fkbp52</i> -/- ve P <sub>4</sub> Uygulanmış <i>Fkbp52</i> -/- Farelere Ait Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde PRDX6 Ekspresyonunun İmmünofloresan Yöntemi İle Gösterilmesi	85
4.8.	<i>Fkbp52</i> -/- Farelerde Uterusa Spesifik <i>Fkbp52</i> Eksikliğinin Northern Blot Yöntemi İle Gösterilmesi	88
4.9.	Farklı Gebelik Günlerine Ait Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde PRDX6 Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi İle Gösterilmesi	88
4.10.	Desidual Hücrelerde FKBP52 İle PRDX6 Arasındaki Fiziksel Etkileşimin İmmünopresipitasyon Yöntemiyle Gösterilmesi	89
4.11.	Parakuatın İmplantasyona Etkileri	89
4.12.	Parakuatın Blastosist Transferine Etkileri	92
4.13.	N-Asetil Sistein ve $\alpha$ -Tokoferol Antioksidanlarının Parakuat Uygulanmış Farelerde İmplantasyona Etkileri	93
4.14.	Yalancı Gebeliğin 4. Gününde Bulunan Farelere Ait Uterus, Karaciğer ve Böbreklerde 8-izoprostan İle Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi	94
4.15.	Fare Embriyonik Fibroblastlarında PRDX6 Ekspresyonunun Western Blot İle Belirlenmesi	95
4.16.	Hidrojen Peroksit ve N-Asetil Sistein Uygulanan Fare Embriyonik Fibroblastlarında Hücre Canlılığının MTT	

4.17.	Assay İle Belirlenmesi	95
	Fare Embriyonik Fibroblastlarında Progesteron Reseptörü ( <i>Pgr</i> ) Ekspresyonunun RT-PCR İle Belirlenmesi	97
4.18.	Vahşi Tip ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> Farelerin Uterusunda <i>Indian Hedge Hog (Ihh)</i> ve <i>Hoxa10</i> Ekspresyonlarına Parakuatin Etkisinin Northern Blot Yöntemi İle Belirlenmesi	98
4.19.	Gebeliğin 4. Gününde Bulunan CD1 Genetik Zeminli Vahşi Tip, <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> ve P <sub>4</sub> Uygulanmış <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> Farelerin Uterusunda Elektron Mikroskopik Bulgular	99
<b>TARTIŞMA</b>		<b>102</b>
<b>SONUÇLAR</b>		<b>109</b>
<b>KAYNAKLAR</b>		<b>110</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		<b>131</b>
<b>EKLER</b>		<b>132</b>

- 1- **Acar N**, Korgun ET, Cayli S, Sahin Z, Demir R, Ustunel I. Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? Acta Histochem. 2008;110(5):408-17.
- 2- **Acar N**, Korgun ET, Ustunel I. Cell cycle inhibitor p57 expression in normal and diabetic rat placentas during some stages of pregnancy. Histol Histopathol. 2012;27(1):59-68.
- 3- Hirota Y, **Acar N**, Tranguch S, Burnum KE, Xie H, Kodama A, Osuga Y, Ustunel I, Friedman DB, CaprioliRM, Daikoku T, Dey SK. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. Proc Natl Acad Sci USA 2010 107(35):15577–82.

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AEC</b>	: 3-amino-9-etilkarbazol
<b>AR</b>	: Androjen reseptörü
<b>2-BAJE</b>	: 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi
<b>BSA</b>	: Sığır serum albumin
<b>BPB</b>	: Brom fenol mavisi
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>DAB</b>	: Diamino benzidin
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	: Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu
<b>DMSO</b>	: Dimetil sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribo nükleik asit
<b>DTT</b>	: Ditiyotreitol
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetra asetik asit
<b>EGF</b>	: Epidermal büyüme faktörü
<b>E<sub>2</sub></b>	: Östrojen
<b>ER</b>	: Östrojen reseptörü
<b>FBS</b>	: Fetal sığır serumu
<b>FEF</b>	: Fare Embriyonik Fibroblastları
<b>FKBP 52</b>	: FK506'ya bağlanan protein 4
<b>FSH</b>	: Folikül stimüle edici hormon
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
<b>GSH</b>	: Glutasyon
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH-Rd</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GST</b>	: Glutasyon-S transferaz
<b>G6PD</b>	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz

<b>GR</b>	: Glukokortikoid reseptörü
<b>Hop</b>	: Hsp70-Hsp90 organize edici protein
<b>Hsp70</b>	: Isı şoku proteini 70
<b>Hsp90</b>	: Isı şoku proteini 90
<b>Ihh</b>	: Indian hedgehog
<b>İHK</b>	: İmmünohistokimya
<b>İSH</b>	: İn Situ Hibridizasyon
<b>KO</b>	: Knock out
<b>LBD</b>	: Ligand bağlanma domeyni
<b>LH</b>	: Lüteinize edici hormon
<b>MALDI-TOF MS</b>	:Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kitle Spektrometresi
<b>MOPS</b>	: 3-(N-morfolino) propansülfonik asit
<b>MR</b>	: Mineralokortikoid reseptör
<b>NB</b>	: Northern Blot
<b>NBF</b>	: Nötral tamponlu fiksatif
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OS</b>	: Oksidatif stres
<b>P<sub>4</sub></b>	: Progesteron
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PDB</b>	:Primer desidual bölge
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	: Prostaglandin F2 $\alpha$
<b>PR</b>	: Progesteron reseptörü
<b>PVP</b>	: Polivinil prolidon
<b>RNA</b>	: Ribo nükleik asit
<b>ROT</b>	: Reaktif oksijen türevleri
<b>Rpl7</b>	: Ribozomal protein L7
<b>SDB</b>	:Sekonder desidual bölge
<b>SDS-PAGE</b>	:Sodyum dodesil sülfat poliakrilamit jel elektroforezi

<b>SHR</b>	: Steroid hormon reseptör
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SSC</b>	: Tuz Sodyum Sitrat
<b>TAE</b>	: Tris-Asetat-EDTA
<b>TBS</b>	: Tris tamponlu tuz solüsyonu
<b>TEA</b>	: Trietanolamin
<b>TGF <math>\beta</math>1</b>	: Transforme edici büyüme faktörü $\beta$ 1
<b>TPR</b>	: Tetratrikopeptit tekrarı
<b>tRNA</b>	: transfer RNA
<b>VT</b>	: Vahşi Tip
<b>WB</b>	: Western Blot
<b>XC</b>	: Ksilen siyanol

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa	
2.1.	Dişi farede genital sistem anatomisi.	5
2.2.	Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesi.	9
2.3.	Farede gebelik ve yalancı gebelikte uterus reseptivitesi.	10
2.4.	Chicago mavisi enjeksiyonu sonrası implantasyon bölgeleri	11
2.5.	PR gen yapısı.	14
2.6.	Vektör yapısı.	18
2.7.	FKBP52, Hsp90 ve reseptör arasındaki etkileşimler.	20
2.8.	FKBP52'nin X-ışını kristalografik yapısı.	21
2.9.	Steroid reseptör komplekslerindeki Hsp ve koşaperonlar.	21
2.10.	FKBP52-Hsp90-p23 ilişkisi.	22
2.11.	Redüksiyon ve oksidasyon mekanizmaları	28
2.12.	Paylaşılmamış elektronları gösteren radikal yapıları.	29
3.1.	<i>Fkbp52</i> genotiplendirmesi.	45
3.2.	pCR®II-TOPO® vektörünün haritası.	56
4.1.	Temsili 2 boyutlu ayırım jel elektroforezi fotoğrafı.	76
4.2.	Vahşi tip, <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> , <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare uteruslarında protein profili.	79
4.3.	Vahşi tip, <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> , <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> uteruslarda PRDX6 Western Blotu.	80
4.4.	Vahşi tip ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> uteruslarda PRDX6 immünohistokimyası.	80
4.5.	P <sub>4</sub> ve E <sub>2</sub> uygulanan uteruslarda <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu ve Northern Blotu.	81
4.6.	Gebeliğin 4. günündeki CD1 genetik zeminli Vahşi tip, <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> , <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda PRDX6 İmmünohistokimyası.	82
4.7.	Gebeliğin 4. günündeki C57BL6/129 genetik zeminli Vahşi tip, <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> , <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda PRDX6 İmmünohistokimyası.	82
4.8.	Gebeliğin 4. günündeki C57BL6/129 genetik zeminli Vahşi tip, <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> ,	



<i>Fkbp52-/-</i> farelere ait uteruslarda <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu.	83
4.9. Gebeliğin 4. günündeki CD1 genetik zeminli Vahşi tip, <i>Pgr-/-</i> , <i>Fkbp52-/-</i> farelere ait uteruslarda <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu.	83
4.10. Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli Vahşi tip farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu.	84
4.11. Gebeliğin 5 ve 12. günlerindeki CD1 genetik zeminli Vahşi tip farelere ait implantasyon bölgelerinde <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu.	84
4.12. Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli VT farelerde PRDX6 için uygulanan immünofloresan.	86
4.13. Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli <i>Fkbp52-/-</i> farelerde PRDX6 için uygulanan immünofloresan.	87
4.14. Gebeliğin 4. günündeki C57BL6/129 genetik zeminli Vahşi tip, <i>Pgr-/-</i> , <i>Fkbp52-/-</i> farelere ait uterus ve karaciğerlerde <i>Prdx6</i> İn situ hibridizasyonu.	88
4.15. Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli Vahşi tip farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde PRDX6 Western Blotu .	89
4.16. CD1 genetik zeminli VT farelere ait desidua hücrelerinde FKBP52 ile PRDX6 arasındaki etkileşim için immünopresipitasyon.	89
4.17. Parakuat enjekte edilmiş CD1 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52-/-</i> farelerin 5. gün implantasyon bölgeleri.	91
4.18. Parakuat enjekte edilmiş CD1 genetik zeminli <i>Fkbp52-/-</i> farelere ait blastosistler.	91
4.19. Blastosist transferi sonrası parakuat enjekte edilmiş <i>Fkbp52-/-</i> farelerden elde edilen VT blastosistler.	93
4.20. C57BL6/129 genetik zeminli VT ve <i>Fbp52-/-</i> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerde ölçülen 8-izoprostan düzeyleri.	94
4.21. VT ve <i>Fkbp52-/-</i> fare embriyonik fibroblastlarında PRDX6 Western Blotu	95
4.22. Hidrojen peroksit uygulanan VT ve <i>Fkbp52-/-</i> fare embriyonik fibroblastlarında MTT assay uygulaması.	96
4.23. Hidrojen peroksit ve N-Asetil sistein uygulanan VT ve <i>Fkbp52-/-</i>	

fare embriyonik fibroblastlarında MTT assay uygulaması.	97
4.24. VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare embriyonik fibroblastlarında <i>Pgr</i> mRNA'sının RT-PCR ile belirlenmesi.	98
4.25. Parakuat uygulanan CD1 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerde <i>Hoxa10</i> ve <i>Ihh</i> ekspresyonlarının Northern Blot ile belirlenmesi.	99
4.26. Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelerin uterus elektronmikrografı.	100
4.27. Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerin uterus elektronmikrografı.	100
4.28. Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli P <sub>4</sub> uygulanan <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerin uterus elektronmikrografı.	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1. Preimplantasyon embriyolarında erken gebelik.	8
2.2. <i>Pgr</i> ve <i>Fkbp52</i> KO dişi farelerin üreme fenotipleri	23
2.3. Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri.	29
2.4. Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları.	36
2.5. Peroksiredoksinlerin özellikleri.	40
4.1. PR/FKBP52 sinyali aracılı P <sub>4</sub> tarafından upregüle edilen proteinler.	77
4.2. PR/FKBP52 sinyali aracılı P <sub>4</sub> tarafından downregüle edilen proteinler.	77
4.3. <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare uterusunda PR'den bağımsız upregüle olan proteinler.	78
4.4. <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare uterusunda PR'den bağımsız downregüle olan proteinler.	79
4.5. Parakuat uygulanan CD1 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerde 5. gün implantasyon bölgelerinin incelenmesi.	90
4.6. Blastosist transferi yapılan parakuat enjekte edilmiş CD1 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelere ait sonuçlar.	92
4.7. Parakuat, N-Asetil sistein ve $\alpha$ -Tokoferol antioksidanları uygulanan <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerde 5. gün implantasyon bölgelerinin incelenmesi.	93
4.8. C57BL6/129 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerde ölçülen 8-izoprostan düzeyleri.	94
4.9. Hidrojen peroksit uygulanan VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare embriyonik fibroblastlarında MTT assay uygulaması.	95
4.10. Hidrojen peroksit ve N-Asetil sistein uygulanan VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> fare embriyonik fibroblastlarında MTT assay uygulaması.	97
4.11. Parakuat uygulanan CD1 genetik zeminli VT ve <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> farelerde <i>Hoxa10</i> ve <i>Ihh</i> ekspresyonlarının Northern Blot ile belirlenmesi.	99

## GİRİŞ VE AMAÇ

İmplantasyon en basit tanımıyla, embriyonun uterusu yerleşmesidir. Embriyo ve uterus arasındaki etkileşim hala merak uyandıran ve sırları tam olarak ortaya çıkarılmamış bir konudur. İnsanlarda implantasyon çalışmaları hem zorlukları hem de etik kısıtlamalar nedeniyle mümkün olamamakta bu alandaki bilgilerin çoğu kemirgenlerde özellikle fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmektedir.

İnfertilite, global sosyal ve ekonomik bir problemdir. İnsanda döllenmelerin %30'undan fazlası implantasyon zamanı düşükle sonuçlanır. 2050'ye kadar çiftlerin yaklaşık %15'inin infertilite nedeniyle çocuk sahibi olamayacağı tahmin edilmektedir. Bazı bireylerde İn vitro fertilizasyon (İVF) ve embriyo transferi uygulamaları ile infertilite problemi çözülebilmeye karşın implantasyon başarısızlığı gebelik başarısını etkileyen önemli bir sorundur. İVF hastalarında, embriyonun non-reseptif uterusu transferi implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanır

Fare ve sıçanda uterus reseptivitesi gebelik boyunca sınırlı bir zaman diliminde gerçekleşir. Bu türlerde uterus pre-reseptif, reseptif ve non-reseptif fazlarına ayrılır. Uterustaki heterojen hücre tipleri (lümen ve bez epiteli, stroma ve miyometriyum) östrojen ( $E_2$ ) ve progesterona ( $P_4$ ) farklı yanıtlar vererek uterusu reseptif hale getirirler.  $P_4$ , progesteron reseptörü (PR) aracılığıyla etki göstererek memelilerde ovulasyon, uterus reseptivitesi, implantasyon, desidualizasyon ve gebeliğin devam etmesinde rol alır.

FK506'ya bağlanan protein 52 (FKBP52) bir immünofilindir. İmmünofilinler immünbaskılayıcı ilaçlara bağlanır ve etkilerine aracılık ederler. İmmünofilinler FK506'ya bağlanan proteinler (FKBPler) ve siklosporin A'ya bağlanan proteinler (Cyp'ler) olmak üzere ikiye ayrılırlar. FKBP ve Cyp ailelerinin bazı üyeleri Hsp 90'a bağlanan tetratrikopeptit tekrarı (TPR) domeyni içerirler. FKBP52, steroid reseptör komplekslerinde rol alan TPR içeren bir koşaperondur. FKBP52, progesteron, androjen ve glukokortikoid reseptörlerine bağlanarak bu reseptörlerin ligandlarına karşı fonksiyonlarını optimize eder. Sadece FKBP52'ye bağlı PR kompleksi yüksek etkinlikte çalışır ancak FKBP52 eksikliğinde de  $P_4$ 'e karşı bazal PR yanıtı söz konusudur.

Daha önce yapılan çalışmalarda C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli *Fkbp52* geni çıkarılmış (*Fkbp52*-/-) farelerde ovulasyon ve fertilizasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ancak implantasyonun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Bu farelerin derialtına  $P_4$  içeren silastik implantlar yerleştirildiğinde yani dışarıdan  $P_4$  desteği sağlandığında CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyon ve desidualizasyon gerçekleşmiş buna karşın C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda gerçekleşmemiştir. CD1 *Fkbp52*-/- farelere verilen normalden yüksek düzeydeki  $P_4$ , implantasyonun

gerçekleşmesini sağlamış ancak gebeliğin ilerleyen günlerinde çok sayıda embriyo rezorbe olmuştur. Bu farelerde gebeliğin terme ulaşabilmesi için daha fazla P<sub>4</sub> düzeylerine gereksinim duyulur.

CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde P<sub>4</sub>'ün azalan PR yanıtının üstesinden nasıl geldiği ve implantasyona izin verdiği bilinmemektedir. FKBP52, PR'yi P<sub>4</sub>'e bağlanması için optimal konfigürasyonda tuttuğu için ortamda bulunan fazla miktardaki P<sub>4</sub>, FKBP52 eksikliğinde P<sub>4</sub>'ün PR kompleksine bağlanma olasılığını artırıyor olabilir. Bir diğer olasılık ise FKBP52'nin PR sinyal yolağındakinden başka bir görevinin daha olmasıdır. Çünkü, dışarıdan sağlanan P<sub>4</sub> desteği C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyonun gerçekleşmesini sağlayamamakta ve CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde gebeliğin terme ulaşabilmesi için daha fazla P<sub>4</sub> düzeylerine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada plasentada *Fkbp52*'nin eksprese edildiği buna karşın *Pgr*'nin eksprese edilmediği gösterilmiştir. Bu da FKBP52'nin PR aktivitesini optimize etmekten başka bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

Hipotezimiz; FKBP52'nin PR sinyal yolağındaki koşaperon fonksiyonundan bağımsız başka bir rolü vardır. Bunu belirleyebilmek için *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterusunda Vahşi tip ve *Pgr*<sup>-/-</sup> farelerin uterusundan farklı olarak eksprese edilen proteinleri proteomiks analiziyle belirlemeyi ve elde edeceğimiz sonuçlara göre FKBP52'nin koşaperon fonksiyonundan bağımsız rollerini araştırmayı amaçladık.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Uterusun Gelişimi

Genital sistem mezoderm kökenlidir. Dişi ve erkek embriyoda mezonefrik ve paramezonefrik kanallar olarak iki çift genital kanal bulunur. Paramezonefrik kanal, ürogenital kabarıklığın ön – yan yüzeyindeki sölom epitelinin uzunlamasına bir girintisi halinde belirir. Kanal kranial uçtan sölom boşluğu içine huni şeklinde bir yapıyla açılır. Önce mezonefrik kanalın lateralinde uzanır ve onu çaprazladıktan sonra kaudomedial yönde ilerler. Orta hatta diğer paramezonefrik kanala aksi yönden yaklaşır. Başlangıçta bir septumla ayrılmış olan bu iki kanal, daha sonra birleşerek uterus kanalını oluştururlar. Birleşmiş olan kanalların kaudal ucu, ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik ya da Müller tüberkülü denilen küçük bir şişkinliği yapar (1).

Mezonefrik kanallar Müller tüberkülü'nün her iki yanından ürogenital sinus'a açılırlar. Dişi embriyolarda, mezonefrik kanallar testosteron yokluğu nedeniyle gerilerken, paramezonefrik kanallar, Anti-müllerian (Müller baskılayıcı) hormon yokluğu nedeniyle dışılığa farklılaşırlar (1).

Paramezonefrik kanallar dışide esas genital kanalları oluştururlar. Başlangıçta her bir kanalda üç bölüm gözlemlenir: 1- Sölom boşluğuna açılan kranial vertikal bölüm 2- Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal bölüm 3- Karşı taraftaki eşiyile birleşen kaudal vertikal bölüm. Ovaryumların inmesiyle paramezonefrik kanalların ilk iki bölümünden tuba uterinalar gelişir. Kaudal bölümler de uterusu oluşturmak üzere kaynaşırlar. Başlangıçta birleşen bu kanallardan oluşan dikey septum daha sonra dejenere olarak ortadan kalkar. Paramezonefrik kanalın ikinci bölümü mediakaudal yönde hareket ettiğinde, ürogenital şişkinlikler giderek daha transvers bir düzleme gelmeye başlar (1, 2).

Kanallar orta hatta birleştikten sonra, geniş bir transvers pelvik katlantı oluşur. Kaynaşmış haldeki paramezonefrik kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu katlantıya ligamentum latum uteri denir. Bu ligamentin üst sınırında tuba uterinalar, arka yüzünde de ovaryumlar yer alır. Uterovaginal taslaktan uterusun fundus, korpus, isthmus ve endometriyum epiteli ile bezleri gelişir. Endometriyum stroması ve miyometriyum komşu splanik mezodermden köken alır (1).

Uterusun farklı yapılarının gelişmesi 3. trimesterde gerçekleşir. Temel yapı 1. trimesterin sonunda oluşur. Bezlerin ve kas tabakasının başlangıç oluşumu gebeliğin ortalarında gözlenir.

### 2.2. Dişi Farede Genital Sistem Anatomisi

Dişi farede genital sistem bir çift ovaryum, oviduktlar, uterus, serviks, vajina, klitoris ve klitoral bezden oluşur (Şekil 2.1).

### **2.2.1. Ovaryum**

Ovaryumlar, böbreklerin posterolateral kutuplarına yerleşmiştir, her biri mezovaryum ile dorsal vücut duvarına tutunur ve ince şeffaf bir elastik kapsül ya da bursa ile çevrelenmiştir. Mezovaryumdaki kan damarları ve sinirler hilus denilen bölgeden ovaryuma girer ve ovaryumu terkeder (Şekil 2.1).

### **2.2.2. Ovidukt**

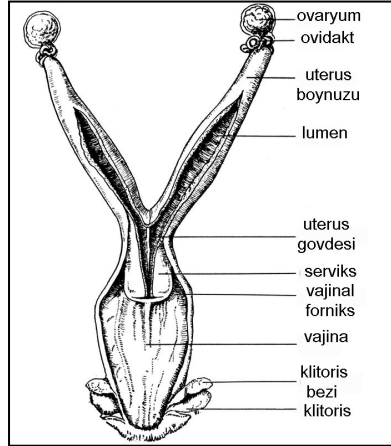
Ovidukt periovaryan boşluğu uterus boynuzuna bağlayan 1.8 cm uzunluğunda dar kıvrımlı bir tüptür. Dorsal vücut duvarından mezotubaryum tarafından ayrılır. Mezotubaryum mezovaryum, ovaryan bursa ve uterus mezometriyumu ile devam eden çift katlı bir membrandır. Oviduktun 3 segmenti vardır: ovaryan bursaya yakın genişlemiş ampulla; uzun, dar ve sıkıca paketlenmiş isthmus ve uterus duvarı içinde kalan internal kısım. Ampulla, infundibulum aracılığıyla periovaryan boşluğa açılır. Fimbriya denilen saçak benzeri uzantılar açılışı çevreler ve periovaryan boşluğa uzanır (Şekil 2.1).

### **2.2.3. Uterus**

Uterus, Y şekilli tübüler yapıda olup 2 lateral boynuz (kornua) ve tek bir medyan gövde kısmından (korpus) oluşur. Uterus boynuzları, oviduktardan posteromediyal olarak mesanenin dorsal pozisyonuna uzanarak korpusu oluşturmak üzere birleşirler. Boynuzlar, dorsal vücut duvarından kan, lenf damarları ve sinirlerin bulunduğu geniş ligamentler ya da mezometriyum ile ayrılır. Uterusun gövde kısmı kranial kısım-bu kısım medyan septum tarafından ayrılan iki boşluk içerir-ve bölünmemiş kaudal kısımdan-vajina boşluğuna çıkan boyun ya da serviks kısmı-oluşur. Serviks ve vajinanın duvarları dorsal ve ventral olarak devamlıdır ancak lateral olarak vajina lümeninin anterior olarak derin fornikslere (tavanlara) uzandığı bölgelerde devamlı değildir (Şekil 2.1).

### **2.2.4. Vajina ve Klitoris**

Kısa, kalın müsküler vajina uterus gövdesi ve serviksten vücudun ventral yüzeyindeki anüsün anterioründeki eksternal açıklığa uzanır. Vajina dorsalde rektum ve ventralde üretraya gevşek şekilde bağlanmıştır. Vajinal açıklığın anterior duvarında küçük ventrale uzanan yükselti klitoristir, anterior ve lateral yüzeyleri deri ve kıl ile kaplıdır. Üretra, klitorisin ucunda bulunan fazla derin olmayan çöküntü klitoral fossaya açılır. Küçük armut şekilli klitoral bezler, anterolateral olarak subkutan bağ doku içerisine gömülmüştür, herbirinden çıkan kanallar klitoral fossanın lateral duvarındaki açıklığa uzanır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Dişi farede genital sistem anatomisini gösteren çizim (3).

### 2.3. Dişi Farede Üreme Fizyolojisi

Memeliler, hipotalamustan salınan gonadotropin salıcı hormon; hipofizden salınan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve lüteinize edici hormon (LH) ve ovaryumdan salınan östrojen ( $E_2$ ) ve progesteron ( $P_4$ ) dahil olmak üzere benzer üreme sistemine sahiptirler. Ancak türlerin fonksiyonlarına detaylı bakıldığında önemli farklılıklar gösterdikleri görülür. Farklardan biri, östrus siklusuna sahip olan hayvanların siklus boyunca gebeliğin gerçekleşmemesi durumunda endometriyumlarını reabsorbe etmeleridir. Menstrüel sıklusa sahip hayvanlar ise menstrüasyon boyunca endometriyumlarını dökerler. Diğer bir fark ise seksüel aktivitedir. Östrus siklusuna sahip türlerde dişiler genelde sikluslarının sadece östrus fazı boyunca aktiflerdir. Zıt olarak menstrüel sıklusa sahip dişiler sikluslarının herhangi bir zamanında ovulasyon yapmadıkları durumda bile seksüel olarak aktif olabilirler. Fareler, puberte başlangıcından yaşlılığa değin döngüsel aktivite gösteren ve mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlardır. Östrus siklusuna sahip farelerde 4 faz görülür ve siklusun süresi genellikle 4-5 gündür (4). Östrus siklusu ayrıca 2 ovaryan faza bölünebilir: foliküler ve luteal faz. Foliküler faz, ovaryan folikül gelişiminin olduğu periyottur ve proöstrus ile östrusu içerir. Luteal faz ise korpus luteumun oluştuğu ve fonksiyon gördüğü periyottur ve metaöstrus ile diöstrusu içerir.

#### 1-Proöstrus

Farede seksüel siklus evrelerinde genital organlarda çeşitli değişiklikler meydana gelmektedir. Proöstrusta; ovaryumda büyük folliküller bulunur. Vajina kırmızı-pembe renkte, nemlidir. Dişi henüz seksüel olarak reseptif değildir (4, 5).

#### 2-Östrus

Östrus, dişinin seksüel olarak reseptif olduğu evredir. Bu faz "kızgınlık" evresi olarak ta adlandırılır. Gonadotropik hormonların düzenlemesiyle foliküller olgunlaşır ve östrojen en büyük etkisini gösterir. Fareler fizyolojik değişiklikler ile belirgin-arka ayaklarını kaldırdığı lordozis refleksi gibi-seksüel olarak reseptif davranış gösterirler. Östrusta; ovulasyon görülür. Vajina, proöstrustakinden daha açık renktedir ve ödem



belirgindir (4, 5). Uterus dolaşımdaki yüksek östrojen nedeniyle biriken sıvı ve vasküler geçirgenlikteki artıştan dolayı proöstrus ve östrus fazları boyunca şiş durumdadır.

### 3-Metöstrus

Bu faz boyunca östrojen stimülasyonu azalır ve korpus luteum oluşmaya başlar. Metöstrusta; ovaryumda korpus luteum görülür. Uterus dokusunda şişlik ve hiperemi azalmıştır, epitelde dejenerasyonlar görülür. Vajinada ödem azalmış, kuru ve solgun bir görünümü vardır. Beyaz hücre döküntüleri görülür (4, 5).

### 4-Diöstrus

Bu faz progesteron üreten korpus luteum aktivitesi ile karakterizedir. Gebelik gerçekleşmediği takdirde diöstrus fazı korpus luteumun gerilemesiyle son bulur. Endometriyum tabakası dökülmez ancak gelecek siklus için yeniden şekillenir. Diöstrusta; ovaryumda folliküller gelişmeye başlamıştır. Uterus dokusunda şişlik kaybolmuş olup solgun görünümlüdür. Vajina da benzer görünümde olup kapalıdır. Yaş ve kuru uterus ağırlıkları diöstrusta en az ve proöstrusta en fazladır (4, 5).

Farelerde çiftleştirme iki şekilde yapılabilir:

1. **Monogami:** Bir dişi fare ile erkeğin birleştirilmesidir.
2. **Poligami:** Bir erkek ile 2-4 dişi farenin bir kafeste birleştirilmesiyle gerçekleştirilen çiftleştirmedir.

Çiftleşme, östrus ve ovulasyon çoğu kez fotoperiyodun gece fazında oluşur. Çiftleşmeden sonra sperm ve yardımcı bezlerin koyulaştırıcı salguları ile vajinal salgının pıhtılaşmasıyla oluşan balmumu gibi bir tıpa görülür. Buna vajinal plak (çiftleşme tıpası) denir. Vajinal plak çiftleşmeden 24-36 saat sonra atılır (5).

### 2.4. Farelerde Uterus Histolojisi

Uterus boynuzlarının mukozası-gebe olmayan farelerde endometriyum olarak adlandırılır-kan damarları ve sinirler tarafından iyi bir şekilde desteklenir. Epiteli basit prizmatik epitel olup endometriyal stromaya çıkıntı yapan dallı tübüler bezlere uzanır. Stroma, birçok küçük polihedral hücre ve lenfosit içeren retiküler dokudan oluşur. Kas tabakası-miyometriyum-içte sirküler ve dışta longitudinal yerleşimli düz kas tabakaları ve bunların arasındaki vasküler gevşek bağ dokusu-stratum vaskulozumdan oluşur. Dıştaki seroza mezometriyum ile devamlıdır. Uterus boynuzları orta hatta bir araya geldikçe mediyal duvarları serozayı, stratum vaskulozum ve bazı kas liflerini kaybederek neredeyse vajinal tavan düzeyine ulaşarak lümeneye uzanırlar. Bazı sirküler kas lifleri bölmenin merkezinde kalırlar. Lateral boşluklar basit prizmatikten çok katlı yassıya doğru değişen epitel ile döşelidir. Gövdenin en ön anterior kısımları boynuzlardakine benzer epitel ile döşelidir ama başka yerlerde özellikle mediyal duvarlarda yer yer çok katlı yassı epitel parçaları bulunur. Gövdenin bölünmemiş boşluğu ve servikal kanal vajinanınki ile devam eden çok katlı yassı epitel ile devamlıdır. Gövdenin lamina propriyası boynuzlara göre daha az hücre içerirken daha fazla lifsel eleman içerir. Sirküler ve longitudinal düz kas fibrilleri ve seroza duvarı tamamlar. Serviksin kraniyal üçte ikisinin duvarı sirküler yerleşimli düz kas içerir; kaudal üçte

birinin duvarı gebelik boyunca gevşek halde her tarafa yerleşim gösteren kollajen lif demetleri içerir (5).

## **2.5. İmplantasyon**

İmplantasyon en basit tanımıyla, embriyonun uterusu yerleşmesidir. Embriyo ve uterus arasındaki karşılıklı etkileşim hala merak uyandıran ve sırları tam olarak ortaya çıkarılmamış bir konudur. Memelilerde embriyonun blastosist safhasına gelişmesi ve implantasyon için uterus ile ilk etkileşimleri türden türe değişir. İnsanlarda embriyo ile uterusun etkileşimlerini moleküler düzeyde incelemek oldukça güçtür. Buna ek olarak, insan implantasyonunun incelenmesindeki etik kısıtlamalar ve deneyim zorlukları, embriyo-uterus etkileşimlerinin direk analizini önlemektedir. Bu nedenle bu alandaki bilgilerimizin çoğu kemirgenlerde özellikle de fare ve sıçanlarda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir (6).

### **2.5.1. Farelerde İmplantasyon**

İmplantasyon sürecinde, embriyo ve uterus hücreleri arasında kompleks etkileşimler gerçekleşir. İmplantasyon sürecinin temel olayları şu şekilde sıralanabilir:

- 1-Preimplantasyon evresindeki embriyonun blastosist aşamasına ve uterusun reseptif faza senkronize bir şekilde gelmesi, (7)
- 2-Semiallogenik embriyonun annenin immünolojik yanıtlarından kaçması, (8)
- 3-Blastosistin uterusu yakınlığı alanda artan kapiler geçirgenlik ve kan akışı, (7)
- 4-Blastosistin uterus lümen epiteline ilk tutunmasını takiben yakındaki endometriyal stromanın lokal desidualizasyonu (7, 9)
- 5-Embriyonik trofoblastlarca kontrollü uterus invazyonu (10)

Bu aşamalarda, hem embriyo hem de uterustaki hücre tiplerinde proliferasyon, farklılaşma, göç ve yeniden şekillenme olayları görülür. Bu kritik olaylar progesteron (P<sub>4</sub>) ve östrojen (E<sub>2</sub>) tarafından aracılık edilen geçici ve hücre tipine spesifik etkileşimlere bağlıdır.

### **2.5.2. İmplantasyonun Safhaları**

#### **2.5.2.1. Preimplantasyon Evresindeki Embriyonun Gelişimi**

Ovulasyondan sonra ovaryumlar tarafından salınan oositler bağlı oldukları ovidukta girer. Fare ovaryumları ince bir membran (bursa) ile kaplıdır ve oositler abdominal boşluğa kaçamaz. Oositlerin fertilizasyonu başarılı bir çiftleşmeden sonra ampullada gerçekleşir. Oosit, ovulasyon gerçekleşirken ilk maturasyon bölünmesini gerçekleştirir. Oosit henüz ilk maturasyon bölünmesini tamamlamamışsa ovulasyondan hemen sonra gerçekleştirir. Dişi fareler her siklusta normalde 8-10 oosit ovule eder. Yeni ovule olan oositler kumulus hücreleri tarafından çevrilidir. Çiftleşmeden sonra sperm her iki uterus boynuzu boyunca hareket ederek fertilizasyon bölgesine ulaşır. Genelde birden fazla sperm perivitellin boşluğa girer. Ancak bir sperm oosite penetre olarak döller. Fertilizasyondan sonra zigot mitotik olarak bölünerek blastosist safhasına ulaşır. Çiftleşmeden sonra çiftleşmenin etkisiyle hipofizden prolaktin salgınır bu da

ovaryumda fonksiyonel bir korpus luteum oluşumuna neden olur ve gebeliğin devamı için başka bir ovulasyon ya da siklusun olmasını bloke eder (11).

Preimplantasyon evresindeki embriyonun gelişimi ve aktivasyonu boyunca görülen iki önemli özellik fertilizasyondan sonra oositin yarıklanması ve embriyonik hücrelerin blastosist safhasında iç hücre kitlesi ve trofoektoderme farklılaşmasıdır (12, 13). Embriyo kaynaklı bazı büyüme faktörleri embriyonik büyüme ve farklılaşmanın otokrin düzenlenmesinde rol almasına karşın preimplantasyon evresindeki embriyonun gelişimi ve farklılaşmasının tamamlanmasında  $P_4$  ve  $E_2$ 'nin etkisi altındaki üreme sistemi kaynaklı parakrin faktörler de rol alır. Preimplantasyon evresindeki embriyo gelişiminde  $P_4$  ve  $E_2$ 'nin direkt etkisiyle ilgili bir kanıt yoktur, çünkü preimplantasyon evresindeki embriyolarda östrojen reseptörü (ER) bulunmamaktadır (14). Embriyonik 3.5. günde fare blastosistinde trofoektoderm ve iç hücre kitlesi farklılaşır. 4.5. günde üç hücre tipi bulunur: primitif endoderm-visseral ve pariyetal endodermi oluşturur; primitif ektoderm-embrioyu oluşturur ve trofoektoderm-tüm trofoblastik dokuyu oluşturur (15, 16). Trofoblast, memeli konseptüsünün yaşaması için gereklidir çünkü implantasyona aracılık eder ve sonrasında fetüs ile anne arasında besin, gaz değişimini sağlayan plasentayı oluşturur (17). Trofoektoderm hücreleri iki farklı bileşenden oluşur: polar ve mural (18). Mural trofoektoderm iç hücre kitlesine en distal olan hücrelerden oluşur. Bu hücreler primer trofoblast dev hücrelere farklılaşacaktır. Dev hücreler endoreduplikasyona giderek büyük poliploid hücreleri oluşturur (19). Mural trofoektoderm ve oluşturduğu primer dev hücreler blastosist implantasyonunun başlaması için önemlidir (17). Farklılaşma iç hücre kitlesinin sınırına doğru lateral olarak devam eder. Polar trofoektoderm iç hücre kitlesi ile direkt etkileşim halindedir (18). Bu hücreler diploid kalır, bölünmeye devam ederek trofoblast soyunu oluşturur. Bu, ektoderm ve ektoplasental kon ve sonrasında olgun koryoallantoyik plasentada görülen spongiyotrofoblast, labirent ve dev hücre tabakasını içerir (17). Preimplantasyon embriyolarında gelişim basamağına bağlı olarak erken gebeliğin tarihlendirilmesi Çizelge 2.1'de görülmektedir.

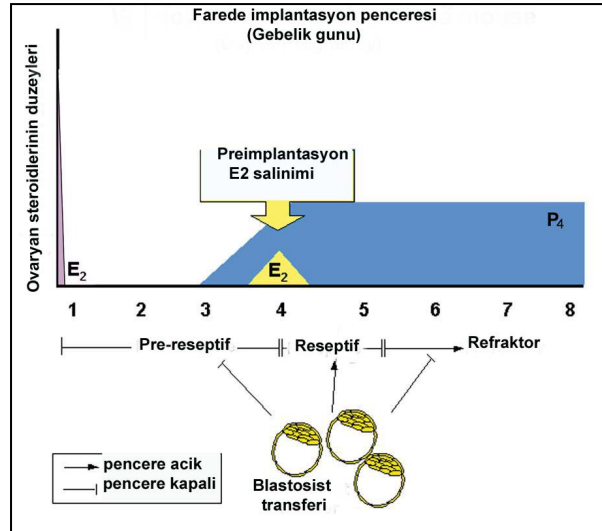
Gebelik günü	Embriyonun gelişim basamağı	Diş üreme sisteminde bulunduğu yer
1	1 hücreli zigot	ovidukt
2	2 hücre	ovidukt
3 (01-04.saat)	4 hücre	ovidukt
3 (05-14.saat)	8 hücre	ovidukt
3 (15-23.saat)	morula	ovidukt
4	blastosist	uterus

**Çizelge 2.1.** Preimplantasyon embriyolarında gelişim basamağına bağlı olarak erken gebeliğin tarihlendirilmesi (11).

### 2.5.2.2. Uterus Reseptivitesi

Uterus, değişen  $E_2$  ve  $P_4$  salgılarına özgün biçimde yanıt veren heterojen hücre popülasyonlarından oluşur. Erişkin ovariectomize fare ya da rat uterusunda  $E_2$  lümen ve bez epitelinin proliferasyonu ve farklılaşmasını uyarırken stromada bu olaylar için hem  $E_2$  hem de  $P_4$ 'e ihtiyaç vardır (7).

Farede preovulatuvar  $E_2$  salgılanması gebeliğin ilk iki günü boyunca lümen ve bez epiteli hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını sağlar. Buna karşın yeni oluşan korpora luteadan salgılanan  $P_4$  preovulatuvar  $E_2$  salgısı ile birleşerek gebeliğin 3. gününde proliferasyonun epitelden stromaya kaymasını sağlar. Stromal hücre proliferasyonu gebeliğin 4. gününde (implantasyon günü) salgılanan preimplantasyon ovaryan östrojen salgısı ile etkili hale getirilir (Şekil 2.2). Preimplantasyon ovaryan östrojenin salgılanması ve blastosistin olduğu bölgede endometriyal kapiler geçirgenliğin artışı daha sonra stromal hücrelerin desidual hücrelere farklılaşmasında gereklidir.



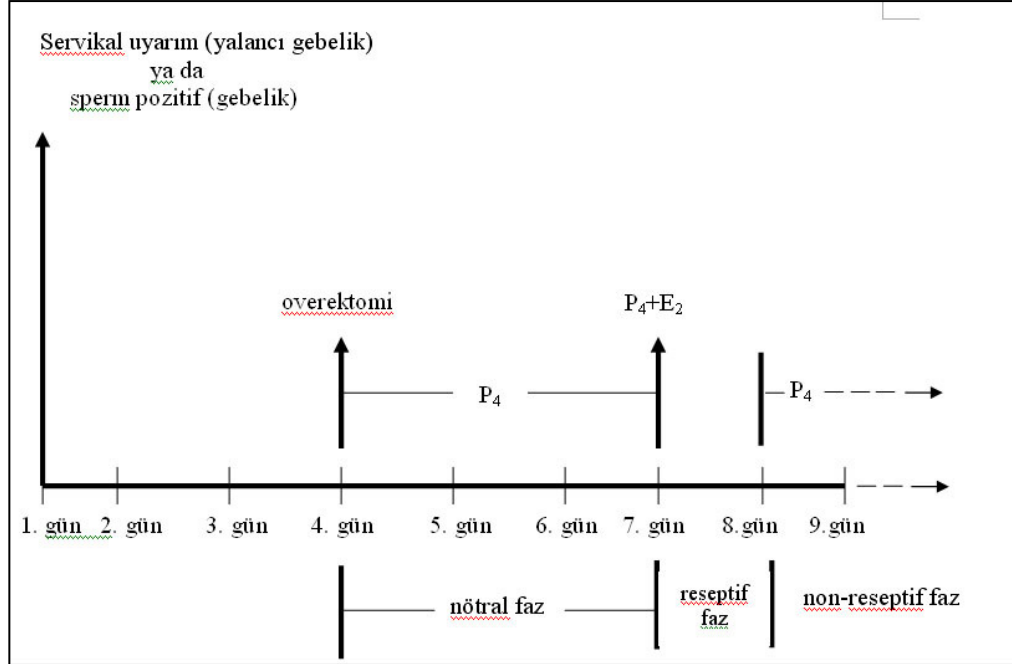
Şekil 2.2. Farelerde gebelik günlerine göre uterus reseptivitesi.

Fare ve sıçanda uterus reseptivitesi gebelik boyunca sınırlı bir zaman diliminde gerçekleşir. Bu türlerde uterus pre-reseptif (nötral), reseptif ve non-reseptif fazlara ayrılabilir (7, 20).

Gebe ya da yalancı gebe farede uterus sadece 4. günde (implantasyon günü) reseptif olur, 5. günde (yalancı gebe farelerde blastosist transferi ile gösterildiği gibi) uterus non-reseptif olur ve blastosistin varlığına yanıt vermez ya da desidual reaksiyon oluşturmak amacıyla yapılan travmatik uyarılara yanıt vermez. Gebe ovariectomize fareler sadece P<sub>4</sub>'e maruz bırakıldıkları sürece uterusları pre-reseptif fazda kalır (Şekil 2.3). Bu koşullarda travma uygulanması sonucu desidual hücre reaksiyonu görülmesine karşın uterus blastosist varlığına yanıt vermez (7, 20). Fare uterusu progesteron tarafından hazır hale getirilmesinden 24-48 saat sonra az miktardaki östrojen tarafından implantasyon için hazır getirilir (7, 20-23). Sıçanda yapılan çalışmalar (24) reseptif uterusda implante olabilmesi için blastosistin de aktive olması gerektiğini göstermiştir. Gecikmiş implantasyon modelinde (Bölüm 2.5.5) P<sub>4</sub> enjeksiyonu devam ettirildiği sürece uterus prereseptif fazda kalır, östrojen enjeksiyonunu takip eden reseptif hale geçen uterus enjeksiyondan sonraki 24-36 saat içerisinde non-reseptif hale geçer. Bu mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır.

Fare ve sıçanda hem progesteron hem de östrojen implantasyonun gerçekleşmesi için gereklidir. P<sub>4</sub>, tavşan, kobay, hamster ve domuzda implantasyon için gereklidir

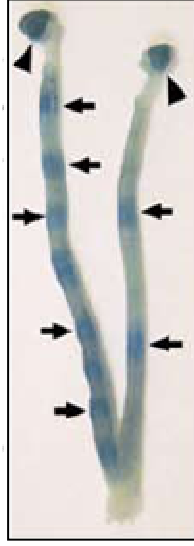
ancak E<sub>2</sub> gerekli değildir. Embriyonik kökenli E<sub>2</sub>'nin bu türlerde implantasyonda rol alabileceği düşünülmektedir. Bu bağlamda, preimplantasyon evresindeki tavşan ve domuz embriyolarının östrojen oluşturma kapasiteleri gösterilmiştir (25). Progesteron, primatlarda implantasyon için gerekli olmasına karşın E<sub>2</sub>'nin rolü tam olarak bilinmemektedir.



Şekil 2.3. Farede gebelik ve yalancı gebelik olaylarında uterus reseptivitesi (6).

### Reseptif Uterusta Vasküler Geçirgenlik Değişiklikleri

İmplantasyonun en erken gözlenebilir işareti, blastosistin uterusu yaklaştığı bölgede (apozisyon) endometriyal vasküler geçirgenlikteki artıştır. Bu vasküler yanıt, evans mavisi ya da Chicago (Şikago) mavisi gibi makromoleküler boyaların hayvanın sakrifiye edilmesinden 5-10 dakika önce intravenöz olarak enjekte edilmesiyle görülebilir. İmplantasyon bölgeleri uterus boyunca mavi bantlar şeklinde görülür (Şekil 2.4). Histamin, prostaglandinler, lökotriyenler, platelet aktive edici faktör gibi birçok vazoaaktif ajanın bu işlemde rolü olduğu öne sürülmüştür (26-30). Fare ve sıçanda implantasyon boyunca uterusu görülen vasküler değişikliklerde östrojen gereklidir.



**Şekil 2.4.** Chicago mavisi enjeksiyonu sonrası uterusu gösteren mavi bantlar şeklinde görülen implantasyon bölgeleri. Ok başları ovaryumları, oklar implantasyon bölgelerini göstermektedir (31).

### 2.5.2.3. Desidualizasyon

Desidual hücre reaksiyonu ilk olarak blastosistin implante olduğu anti-mezometriyal bölgede gerçekleşir. Farede blastosisti çevreleyen farklılaşan stromal hücreler gebeliğin 5. gününde önce primer desidual bölgeyi (PDB) oluştururlar. Bu bölge avaskülerdir ve desidual hücrelerle sıkı bir şekilde paketlenmiştir. Altıncı günde, PDB'nin çevresinde sekonder desidual bölge (SDB) oluşur. Bu sürede, Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) sentezi SDB'de yüksek olmasına karşın PDB'de düşüktür. PDB sekizinci güne kadar ilerleyen şekilde dejenere olur. Sekizinci günde SDB desidual kapsülaris adı verilen ince bir hücre tabakasına dönüşür. Mezometriyal desidual hücreler sonunda desidual bazalisi oluştururlar. Desidualın fonksiyonları, gelişen embriyoya besin sağlamak, embriyoyu annenin immünolojik yanıtlarından korumak ve uterus stromasına trofoblast invazyonunu düzenlemektir (32, 33).

### 2.5.3. İmplantasyonun Safhaları

Enders ve Schlafke'ye göre implantasyon 3 safhaya ayrılabilir: apozisyon (yakınlaşma), adezyon (tutunma) ve penetrasyon (içine girme) (34, 35). Apozisyon, embriyonik trofoektoderm hücreleri ile lümen epitelinin birbirlerine yakınlaştıkları safhadır. Adezyon safhasında trofoektoderm ile lümen epiteli arasındaki ilişki blastosistin yıkama ile uzaklaştırılmasına izin vermeyecek kadar ilerlemiştir. Penetrasyon safhasında trofoektoderm lümen epiteline invaze olur.

Memelilerde özellikle kemirgenlerde apozisyon başlamadan önce stromal ödem gözlenir. Bu, uterus lümeninin daralmasına neden olur bu da trofoektoderm mikrovillisi ile lümen epitelinin parmaklı çıkıntılar oluşturması (apozisyon) ve birbirlerine yakınlaşmaları (adezyon) ile sonuçlanır. Tutunma reaksiyonu blastosistin olduğu bölgede stromal vasküler geçirgenliğin lokal olarak artışı ile sonuçlanır ki bu da makromoleküler boyaların intravenöz enjeksiyonu ile gözlenebilir. Lümenin kapanması olayı blastosist varlığından bağımsız olup P<sub>4</sub> bağımlıdır çünkü bu olay blastosist olmasa

da gerçekleşmesine rağmen P<sub>4</sub> olmadığında gerçekleşmez. Adezyon olayı için ise E<sub>2</sub> gereklidir.

Blastosistin implantasyon zamanı antimezometriyal lümen epiteline hangi mekanizmayla ve nasıl yönlendirildiği tam olarak anlaşılamamıştır. Farede lümen kapanmasının başlamasıyla blastosistler uterus eksenine boyunca lümenin antimezometriyal tarafı boyunca yerleşirler. Lümen daralması sona erdikten kısa bir süre sonra zona ile kaplı blastosistler iç hücre kitleleri rastgele olacak şekilde implantasyon bölgesinde bulunurlar. Ancak tutunma reaksiyonunun başlamasıyla birlikte blastosistler iç hücre kitleleri mezometriyal kutba bakacak şekilde yerleşirler. İnsanda ise blastosistler iç hücre kitlesi antimezometriyuma bakacak şekilde yerleşirler. Bu gözlemlerden yola çıkılarak tüm blastosist yüzeyindeki trofoektodermin lümen epiteline tutunma potansiyeli olduğu ve tutunmanın zona pellusida kaybindan hemen sonra gelişigüzel bir şekilde gerçekleştiği yorumu yapılmaktadır. Birçok kanıt blastosistin doğru yönlendirmesinin iç hücre kitlesinin serbest hareketiyle gerçekleştiğini önermektedir (36, 37).

Farelerde tutunma reaksiyonunun ilk belirtisi gebeliğin 4. gününün (vajinal plak=1.gün) gece saatlerinde (20<sup>00</sup>-24<sup>00</sup>) görülür (7). Fare ve insanlarda lümen epiteli hücreleri tutunmadan sonra apoptoza gider (38), blastosistin etrafındaki stroma hücreleri desidualizasyona gider ve sonuçta embriyo antimezometriyal stroma içine gömülmüş olur.

#### **2.5.4. İmplantasyonun Tipleri ve Zamanlaması**

Bonnet (39) farklı blastosist-uterus etkileşimlerini baz alarak implantasyonu 3 kategoriye ayırmıştır: merkezi, ekzentrik ve intersisyal. Merkezi implantasyon yüzeysel implantasyon olarak da bilinir tavşan, yaban gelinciği ve bazı keselilerde görülür. Bu canlılarda blastosist implantasyondan önce yoğun şekilde genişler. Fare, sıçan ve hamsterlarda ekzentrik implantasyon görülür. Bu canlıların blastosistleri küçüktür ve sadece az bir genişleme gösterirler. Bu türlerde uterus epitelinin invaginasyonu ile implantasyon bölmesi oluşur. Kobay, şempanze ve insanda intersisyal tipte implantasyon görülür, blastosist subepitel stromal dokuya gömülür.

Schlafke ve Enders (40) elektron mikroskopik çalışmalara dayanarak implantasyonu araya girme, yer değiştirme ve kaynaşma (füzyon) olmak üzere 3'e ayırmışlardır. İnsan ve kobaylarda görülen araya girme modelinde trofoblast hücreleri lümen epiteli boyunca penetre olur, bazal laminaya ulaşır ve geçer. Kemirgenlerde görülen yer değiştirme modelinde lümen epiteli, altındaki bazal laminadan ayrılarak trofoblastların epitel boyunca yayılması kolaylaştırılır. Tavşanda görülen kaynaşma modelinde trofoblast hücreleri lümen epiteli ile bağlantı kurarak simplazma oluştururlar.

#### **2.5.5. Gecikmiş İmplantasyon**

Fare ve sıçanda gebeliğin 4. gününün sabahında beklenen östrojen artışından önce ovariectomy (ovaryumların çıkarılması) yapılırsa implantasyon gerçekleşmez ve blastosist uterus lümeninde uyku haline geçer, bu durum "gecikmiş implantasyon" olarak adlandırılır (7, 21). Bu durum sürekli P<sub>4</sub> uygulamasıyla uzun süre devam ettirebilir. Tek doz E<sub>2</sub> enjeksiyonuyla blastosist aktivasyonu ve implantasyon hemen başlatılabilir (Şekil 2.3). Ayrıca laktasyon boyunca oositin postpartum ovulasyon ve

fertilizasyonundan sonra gecikmiş implantasyon doğal olarak gerçekleşir (41-43). İmplantasyon emme uyarımı bittikten sonra gerçekleşir. Bu türlerdeki laktasyonel (emzirmeye bağlı) gecikme ovaryan östrojenin yetersizliği nedeniyledir. Ayrıca keseli hayvanlarda zorunlu mevsimsel gecikmiş implantasyon görülür (44). Diğer taraftan hamster, kobay, tavşan ve domuzlarda gecikmiş implantasyon görülmez. Primatlar ve insanlarda bu özelliğin olup olmadığı bilinmemektedir.

## **2.6. Gebeliğin Steroid Hormonlar Tarafından Düzenlenmesi**

Uterus, her biri  $E_2$  ve  $P_4$ 'e farklı yanıtlar veren heterojen hücre tiplerinden (lümen ve bez epiteli, stroma ve miyometriyum) oluşur. Farede  $E_2$  ve  $P_4$ 'ün koordineli etkileri erken gebelik olaylarını kontrol etmek için uterus hücrelerinin proliferasyonu ve/ya farklılaşmasını düzenler. Örneğin, farelerde gebeliğin 1. gününde uterus epitel hücreleri preovulatuvar  $E_2$ 'nin etkisi altında proliferasyona gider. Yeni oluşan korpora luteadan salınan artan düzeydeki  $P_4$ , 3. günden itibaren stromal hücre proliferasyonunu başlatır. Bu stromal proliferasyon gebeliğin 4. günü sabahı az miktarda salgılanan ovaryan  $E_2$  ile daha fazla stimüle edilir.  $P_4$  ve  $E_2$ 'nin koordineli etkileri sonucu uterus epitel hücrelerinin proliferasyonu durur ve farklılaşma başlar (33). Normal bir gebelik boyunca uterusu aktif bir blastosistin varlığı implantasyon reaksiyonu için uyarandır. Dördüncü günde ( $20^{00}$ - $24^{00}$ ) tutunma reaksiyonu başladıktan sonra implante olan blastosistin çevresindeki stroma hücreleri yoğun şekilde proliferasyon olarak desidual hücrelere farklılaşırlar (45). Yalancı gebe farelerde (vazektomize erkeklerle çiftleştirilen dişiler) korpora luteanın varlığından dolayı uterusdaki steroid hormonal ortam benzer şekilde devam ettirilir. Bu nedenle yalancı gebe uterusun 1 ve 4. günler arasındaki implantasyona hassasiyeti normal gebeliktekine benzerdir ve yalancı gebeliğin 4. gününde uterus lümenine blastosist transferi normal implantasyon reaksiyonu ve sonrasında desidualizasyonu tetikler. Blastosistler, implantasyonun normal indükleyicileri olmalarına karşın intraluminal yağ infüzyonu ve mekanik uyarım gibi çeşitli non-spesifik uyarılar yalancı gebe ya da steroid hormonca hazırlanmış uterusu desidual hücre reaksiyonu (desiduoma) başlatabilir (45). Bununla birlikte uterusu nonspesifik uyarılar tarafından indüklenen reaksiyonlar blastosistler tarafından indüklenenlerden farklıdır (46-48).

## **2.7. Steroid Hormonlar ve Reseptörleri**

### **2.7.1. Progesteron ( $P_4$ ): Gebelik Hormonunun Keşfi**

Ovaryan  $E_2$ , fare ve ratlarda  $P_4$  tarafından hazırlanan uterusu blastosistin implantasyonu için gerekli olmasına karşın domuz, kobay, tavşan ya da hamsterlar için gerekli değildir (49). Bunun nedeni domuz ve tavşan blastosistlerinin kendi  $E_2$ 'lerini sentezlemeleri buna karşın farelerde bu mekanizmanın olmaması olabilir. Ovaryan  $E_2$  sadece bazı türlerde önemli olmasına karşın ovaryan  $P_4$  çalışılan çoğu plasentalı memelide gebeliğin devamı için gereklidir.  $P_4$ 'ün,  $E_2$ 'nin etkilerini dengelemek, doğuma kadar uterusu düz kas kasılmasını düzenlemek ve embriyoya karşı maternal immünolojik düzenlemenin değiştirilmesi gibi etkileri vardır (50).

Korpus luteumun 1672'de Hollandalı bilim adamı Regnier DeGraaf tarafından keşfinden beri bu yapının gebelik boyunca rolünü anlamak için birçok çalışma



yapılmıştır. Bir grup araştırmacı (August Prenant, Fransa), fonksiyonunun gebelik boyunca ovulasyonu engellemek olduğunu diğer bir grup (Gustav Born, Almanya) ise endometriyumu implantasyon için hazırlamada rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir (51).

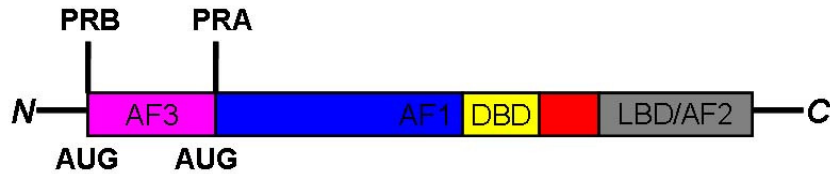
Gustav Born korpus luteumun embriyoyu korumak ve implantasyonu desteklemek için bazı maddeler salgılamak zorunda olduğu yorumunu yapmıştır (52). 1900’de henüz hormon ya da endokrinoloji terimleri bulunmamışken Born’un öğrencisi Ludwig Fraenkel bu hipotezi araştırarak korpus luteumun endokrin fonksiyonu ile ilgili kanıt bulmuştur. Bu deneylerde Fraenkel hayvan modeli olarak tavşan kullanmıştır çünkü, tavşanlar çiftleşme sonrası ovüle olur, embriyolar implantasyon öncesi yaklaşık 7 gün ovidukta kalır. Fraenkel, çiftleşme sonrası 7 gün içinde korpora luteanın uzaklaştırılması durumunda gebelik kaybı olduğunu bulmuştur (53). Ayrıca Paul Ancel ve Paul Bouin hem gebe hem de yalancı gebe tavşanlarda endometriyumda oluşan değişikliklerden korpus luteumun sorumlu olduğunu bulmuşlardır (54). Bu deneylerden korpus luteumun salgıladığı bir maddeyle hem embriyonun kaderini hem de uterus bütünlüğünü etkilediği kesinleşmiştir. 1934’te bu maddenin-progesteron-kristal formunda saflaştırılması bağımsız olarak farklı gruplar tarafından rapor edilmiştir (Breslau’dan Karl Slotta, Hans Ruschig, Eric Fels; A.B.D’den George W. Corner Sr. ve Willard Allen; Almanya’dan Karl Butenandt ve Oskar Wintersteiner) (51).

Progesteronun keşfi ve izolasyonu hipofiz ya da ovaryum ekstraktlarının kurbağalarda ovulasyonu stimüle ettiğini gösteren deneylerle aynı zamana rastlamıştır (55-58). 1950’lerin sonu ve 1960’larda araştırmacılar P<sub>4</sub> ligandının çeşitli rolleri üzerinde çalışırlarken Gerald Mueller ve Elwood Jensen E<sub>2</sub> reseptörünü (ER) bulmuşlardır (59). Hemen sonrasında nükleer progesteron reseptör (PR) saflaştırılan ilk steroid hormon reseptörüdür, ilk olarak tavuk oviduktundan (60) daha sonra insanlardan (61) izole edilmiştir. PR, ER ve androjen reseptörünün (AR) saflaştırılmasından sonra steroid hormon reseptörlerinin primer olarak gen transkripsiyonunu etkilediği anlaşılmıştır (62).

### 2.7.2. Progesteron (P<sub>4</sub>) Sinyalinin Mekanizması

Progesteronun uterus içinde ve dışında anti-inflamatuvar etkilerinin olduğu gösterilmiştir (63). Koyunda erken gebelik boyunca korpora lutea uzaklaştırılırsa yoğun lökosit invazyonu gerçekleşir, bu da P<sub>4</sub>’ün invazyonu baskılamadaki rolünü gösterir (64).

P<sub>4</sub>, uterus biyolojisi ve gebelikte rol alan genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için yanıtlarını öncelikle nükleer progesteron reseptörü (PR) aracılığıyla gerçekleştirir. PR’nin iki izoformu tek bir genden eksprese edilir: PRA ve PRB. Bu iki gen ürünü aynı gen üzerindeki ayrı promotorlardan transkribe edilir, PRB 120 kDa iken PRA 97kDa’dur (şekil 2.5).



şekil 2.5. PRA ve PRB izoformlarının sentezlendiği PR gen yapısı (50).

Her iki izoformun da amino (N) ucu en değişken kısımdır ve transaktivasyon domeynleri içerir, AF3 (sadece PRB) ve AF1 (PRA ve PRB) transkripsiyonel düzenleme boyunca koaktivatör ve korepresörlerin toplanmasından sorumludur. DNA bağlanma domeyni (DBD) en çok korunan kısımdır, spesifik DNA sekanslarına bağlanılmasından sorumlu olan tip II çinko parmağı yapılarından oluşur (65, 66). Karboksi (C) terminal ucu, transkripsiyonel koregülatörlerle etkileşimde rolü olan AF2 bölgesi içeren ligand bağlanma domeyni (LBD) içerir. PR, ısı şok (heat shock) proteinleri ve diğer şaperonlar ile etkileşerek LBD/AF2'ye lokalize olur (67). B yukarı sekansı olarak adlandırılan PRB'nin daha büyük segmenti AF3 domeyni içerir ki bunun PRB aktivitesini azalttığı düşünülmektedir. Bu nedenle, PRB PRA izoformundan transkripsiyonel olarak daha az aktif olma eğilimindedir. Kültüre edilmiş hücrelerde yapılan koekspresyon çalışmalarında gösterildiği gibi PRA'nın PRB'nin dominant baskılayıcısı olarak etki gösterdiği düşünülmektedir (68, 69). PRA ve PRB proteinleri ayrıca P<sub>4</sub> antagonistlerine de örneğin, RU-486 (mifepriston) farklı yanıt verirler; antagonist bağlı PRA inaktif iken antagonist bağlı PRB transkripsiyonel aktiviteyi artırır (70). Hücrelerde eşit molar konsantrasyonda eksprese edildiklerinde PRA ve PRB homodimerize ya da heterodimerize olabilirler, özellikle 3 formda bulunurlar: A:A, B:B, A:B. Her formun alt sinyal yolağındaki hedef genleri düzenlemede farklı aktivite gösterdiği düşünülmektedir.

Her iki PR izoformunu kodlayan *Pgr* geni çıkarılmış farelerde yapılan çalışmalar, üreme olayları boyunca nükleer steroid hormon reseptörleri aracılığıyla fonksiyon gören P<sub>4</sub>'ün önemli rollerini ortaya koymuştur. Her iki PR izoformu da eksik olan dişi farelerde ovulasyon, fertilizasyon ve implantasyon başarısızlıklarının yanısıra bozulmuş seksüel davranış, gonadotropinlere yetersiz yanıt ve meme bezinde defektif kanal dallanması ve lobuloalveolar farklılaşma görülür (71, 72). PR aracılı P<sub>4</sub> sinyali desidualizasyonda ve doğuma kadar uterusun hareketsiz tutulmasında rol alır (49).

Cre-loxP sistemiyle iki ATG translasyon başlangıç kodonundan birinde nokta mutasyonu oluşturularak PRA ya da PRB'si olmayan fareler üretilmiştir (73, 74). *PgrA* geni silinmiş fareler ovaryum ve uterus fonksiyonlarındaki anormalliklere bağlı olarak infertildirler. *PgrB* geni silinmiş fareler ovaryum ve uterus fonksiyonlarında bir anormallik göstermemelerine rağmen bu farelerde gebelik boyunca meme kanalı yan dallanması ve alveologenezinde azalma görülür. Bu bulgulara göre PRA ve PRB spesifik etkilerini düzenleyebilmek için doku-seçici bir tarzda etki gösterirler ve uterustaki üreme olayları için PRA:PRB heterodimerlerine gerek yoktur.

Progesteronun bir membran reseptör aracılığıyla etki gösterebileceği düşünülmektedir ancak bu sinyal yolağının spesifik fizyolojik olaylara katılımı kesin olarak gösterilememiştir. Bu sinyal için ilk kanıt *Xenopus* oositlerinde gösterilmiştir. Sessiz *Xenopus* oositleri P<sub>4</sub> uygulanana kadar mayoz I'de beklerler, P<sub>4</sub> uygulaması, nükleer steroid hormon reseptör sinyalinin özelliği olan klasik transkripsiyonel aktivasyondan çok hızlı non-transkripsiyonel yanıtları tetikler. *Xenopus* modeli kullanılan bir çalışmada XPR1 *Xenopus* oosit aktivasyonu için gerekli bir membran PR'si olarak tanımlanmıştır (75). Zhu ve arkadaşları benekli deniz alabalığı ovaryumlarından bir membran progestin reseptörü klonlamışlar, bunu G-proteine bağlı reseptör olarak tanımlamışlar ve sadece beyin ve üreme organlarında progestin bağlanması üzerine mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) sinyal yollarını aktive ettiğini göstermişlerdir (76). Daha sonra kedi balığına varsayımsal membran-bağlı

progesterin reseptörünün 3 formu tanımlanmıştır (mPR $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) (77) ve diğer bir grup ta bir adrenal korteks proteini-iç zon antijenini (IZAg) varsayımsal membran PR olarak tanımlamışlardır (78). Farede iki potansiyel membran PR'sinin özellikle ovaryum hücrelerinde rol oynadığı düşünülmektedir: membran progesteron reseptör (MPR) ve PGR membran bileşeni I (PGRMC1) (76, 79). MPR ve PGRMC1, ovaryumda çeşitli hücre tiplerinde eksprese edilmesine karşın ovaryum biyolojisindeki rolleri belirlenememiştir (79). Uterus biyolojisinde bu membran PR'lerinin bir rolü olup olmadığı bilinmemektedir.

### 2.7.3. Erken Gebelik Boyunca Ekspresyonu Progesteron (P<sub>4</sub>) Tarafından

#### Düzenlenen Genler

Farelerde gebeliğin 4. gününde uterus başlıca P<sub>4</sub>'ün etkisi altındadır ve PR aracılığıyla aktive olan P<sub>4</sub>'ün hedefindeki genler arasında homeobox transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve sitokinler yer alır (49). Bu genler gebeliğin bu gününde kuvvetli ekspresyon gösterirler. Ekspresyonu P<sub>4</sub> tarafından düzenlenen ya da P<sub>4</sub>'e yanıt veren genlere örnek olarak amfiregülin (*Areg*), histidin dekarboksilaz (*Hdc*), Indian hedgehog (*Ihh*) ve *Hoxa-10* verilebilir.

Amfiregülin, glikozillenmiş heparin-bağlayıcı protein olup epidermal growth factor-epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir üyesidir. PRA izoformu aracılığıyla P<sub>4</sub>'ün etkisi altında *Areg* lümen ve bez epitelinde eksprese edilir (80). Amfiregülin uterus hücre-spesifik farklılaşma ve proliferasyonla ilişkili olmasına karşın *Areg* geni çıkarılmış fareler fertildirler (81). Bunun nedeni diğer EGF aile üyeleri tarafından kompanse edilme durumu olabilir. P<sub>4</sub> tarafından upregüle olan histidin dekarboksilaz (*Hdc*) da P<sub>4</sub> tarafından regüle edilen bir diğer genidir. Bu genin gebeliğin 4. gününde primer olarak epitelde ekspresyonu görülür (82) ancak implantasyon biyolojisindeki rolü tam olarak açığa çıkarılamamıştır.

Hedgehog sinyal yolağı bileşenleri P<sub>4</sub> tarafından etkilenir özellikle Indian hedgehog (IHH)- hedgehoga bağlanan reseptör Patched ve alt sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörü Gli1-3 (83). *Ihh* ekspresyonu gebeliğin 3.gününden itibaren lümen ve bez epitelinde artar. Aynı zamanda reseptörünün ve alt sinyal yolağındaki transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu stromada upregüle olur. Bu da IHH'nin erken gebelik boyunca stromal hücre proliferasyonu için parakrin bir büyüme faktörü olarak fonksiyon görebileceğini düşündürmektedir (84).

*Hoxa10* multigen ailesine ait bir transkripsiyon faktörü kodlar. *Hox* genleri gelişimsel olarak düzenlenir ve homeobox olarak adlandırılan DNA bağlanma domenyi kodlayan oldukça korunmuş sekans elementi paylaşırlar (85). *Hox* genleri fare ve insanlarda 4 farklı kromozom üzerinde bulunan genler tarafından eksprese edilir ve 4 gruba ayrılırlar (A, B, C ve D). Embriyogenez boyunca uzaysal ve zamansal olarak sıkı bir kolinearite gösterirler (85). Kolinearite şu şekildedir: her grubun 3' ucundaki genler gelişen embriyonun anteriyör bölgesindeki erken embriyogenez boyunca aktive olurken 5' ucuna lokalize genler embriyonun posteriyör bölgelerine sınırlanmıştır ve embriyogenezin sonraki safhalarında eksprese edilir (85). *Hoxa10* A grubunun 5' ucunda lokalizedir ve *Drosophila*'daki *AbdB* geni ile gösterdiği homoloji nedeniyle *Abd*-benzeri *Hox* geni olarak sınıflandırılır. *Abd* genleri, *Drosophila*'da genital imajinal diski

ve memelilerde gelişen genitoüriner sistemi içeren posteriyör ekspresyon domeyni gösteren homeobox genlerinin ayrı bir alt ailesini oluşturur (86, 87).

*Hoxa10* gelişen genitoüriner bölgede ve erişkin dişi üreme kanalında kuvvetli birşekilde eksprese edilir, bu da üreme olaylarında rolü olabileceğini göstermektedir (88-90).

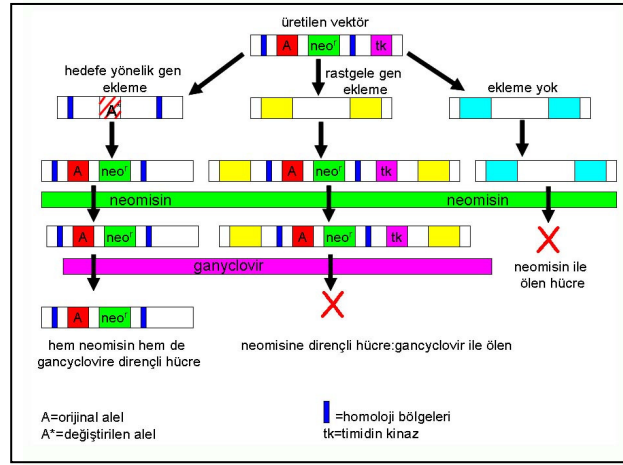
## **2.8. Geni Silinen/Knock-out (KO) Farelerin Oluşturulması**

Araştırmacılar uzun yıllar boyunca belli bir genin fonksiyonunu çalışabilmek amacıyla o geni kontrol edebilme yollarını araştırmışlardır. 1980’li yılların başlarında gen transferi teknolojisi geliştirilmiştir. Bu teknolojide pronükleer enjeksiyon tekniği yani genetik materyalin fertilize oosit nükleusuna enjeksiyonu kullanılmıştır. Enjeksiyonu takiben DNA, hücrenin genomuna katılır. Transform olmuş yani değişmiş fertilize oositler gebe dişilere transfer edilir ve bu farelerin doğum yapması beklenir. Bu tekniğin en büyük dezavantajı araştırmacıların yabancı genetik materyalin genomda girdiği yeri tahmin ve kontrol edememeleridir. Genin genomdaki yerleşimi ekspresyon paterni için önemli olduğundan aynı transgeni tanıyan fare soyları çok farklı fenotipler gösterebilir.

Bu sorunu ortadan kaldıran çözüm Martin Evans, Oliver Smithies ve Mario Capecchi’nin önderlik ettiği bilim adamları tarafından geliştirilmiştir ve genetik “knockout” olarak adlandırılmıştır. Knockout oluşturulmasıyla eklenen genin, fare genomunda belli bir lokasyonda hedeflenmesi mümkün olmuştur. Bu da araştırmacılara belli bir geni inaktif ya da mutant alel ile değiştirmeye ya da silmeye (knockout) olanak sağlamıştır. Bu nedenle knockout tekniği, ilgilenilen genin organizmanın hayatında hangi etkiye sahip olduğunu belirlemek için o genin silinmesine olanak sağlar. Gen knockout embriyonik kök hücreler denilen özel hücre tiplerinde hedef genin seçici olarak etkisiz hale getirilmesiyle oluşturulur. Knockout fareler insan genomu ve hastalıklarını anlamaya yönelik en yararlı tekniklerden biri olmuştur.

Bir aleli genomdaki diğer lokusları etkilemeden tasarlanmış kontrakt/vektör ile değiştirmede kullanılacak metot homolog rekombinasyondur. Bunun için öncelikle hedeflenen/değiştirilecek genin DNA sekansı bilinmelidir. Hedeflenen gen vektör ile değiştirilir. Vahşi tip alelin yerine kromozoma dahil edilecek olan DNA kontraktı dizayn edilir ve üretilir. Bu vektör herhangi bir DNA sekansı içerebilir böylece farklı aleller (hem fonksiyonel hem non-fonksiyonel), farklı genler ya da raportör gen (antibiyotik direnç ya da yeşil floresan proteini) eklenmiş olur. Vektör, her iki uçta bozulmuş hedef gen ve kalite kontrolünü sağlamak amaçlı iki ek geni içeren iki homolog bölgeye sahiptir. Homoloji bölgeleri vektörün her iki ucuna yerleşiktir ve hedef geni çevreleyen genomdaki spesifik bölgelere komplementerdir. Vektör, genoma bu iki homoloji bölgesinden bağlanır. Bu teknoloji hedef genin bozulan genle yer değiştirmesi olan rekombinasyonun avantajını kullanır. Tasarlanmış kontraktın hücrelere eklenmesi sonucu mitoz ve mayozdakine benzer şekilde homolog kromozomlar metafaz düzlemi boyunca uzanır ve aynı olan sekanslar arasında rekombinasyon gerçekleşir. Bu rekombinasyon yanda yer alan DNA dizilerinin herhangi bir bölgesinde gerçekleşebilir. Tasarlanan kontrakt ve yandaki DNA dizisinin bir kısmı hedef lokus ile yer değiştirir. Orjinal tasarlanan kontrakt hedef genin yerini almasına karşın nükleusta replike olamayacağından bölünen hücrelerde hızla kaybolur buna karşın modifiye kromozom

yeni eklenmiş parçasıyla birlikte doğru şekilde replike olur. Ek olarak kullanılan genlerden biri vektörün genoma girdiğinden emin olmak için kullanılan neomisin direnç genidir. Homolog rekombinasyona giden hücreler büyüme medyumuna antibiyotik eklenmesiyle seçilebilir (pozitif seçim). Eğer vektör girememişse neomisin üzerinde kültüre edilen hücreler ölecektir. Vektörün genomda yanlış bölgeye girmesi ihtimali de vardır. Bunun olmadığından emin olmak için homoloji bölgesinin dışındaki yapıya (konstrakt) timidin kinaz (*tk*) geni eklenir. Eğer rekombinasyon gerçekleşmişse *tk* geni genomda olmayacak böylece hücreler gancyclovir'e duyarız olacaktır. Ancak vektör genoma tamamen girmişse hücreler gancyclovir'de kültüre edilince ölecektir, gancyclovir'de kültür sonucunda non-homolog rekombinasyon geçiren hücreler seçilir. Böylece pozitif ve negatif seçim aracılığıyla doğru eklenen insert izole edilebilecektir (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6.** Vektör yapısı: Hedef genin her iki ucuna komplementer olan iki homolog bölge, neomisin direnç geni ve timidin kinaz geni içeren vektör yapısı (91).

Embriyonik kök hücreler vektörlerin eklenmesi için hedef hücreler olarak kullanılırlar çünkü tüm farklı hücre tiplerini oluşturabilecek pluripotensiye sahiptirler. Spesifik bir geni silinen yani knockout edilen embriyonik kök hücreler fertilize embriyoya konulur. Manipüle edilmiş hücre bölünür ve farklı hücre tiplerine gelişir. Sonuçta, bazı hücreleri knockout embriyonik kök hücrelerden gelişen fareler gelişir. Genellikle kahverengi tüylü fareleri oluşturan embriyonik kök hücreler beyaz tüylü fareleri oluşturacak blastosistlere enjekte edilirler. Bu araştırmacıya hangi fareye hem enjekte edilen hücreden hem de blastosistten katılım olduğunu gösterir: eğer fare tamamen beyazsa bu enjekte edilen hiçbir hücrenin blastosiste grafte/nakil olmadığını gösterir. Diğer taraftan fare hem kahverengi hem de beyaz tüylere sahipse knockout embriyonik kök hücrelerin enjeksiyonu başarılıdır. Her iki hücre tipinden katılıma sahip fareler bulunduktan sonra germ-hattı aktarımı olarak bilinen olay için fareler çiftleştirilerek knockout genin soyda belli bir yüzdeye gelmesi sağlanır. Bir germ-hattı aktarımı başarılıdıktan sonra knockout geni taşıyan ve taşımayan fareleri çiftleştirmek mümkündür (91).

### 2.8.1. Kondisyonel Knock-out (KO) Fare Modeli

Geliştirilen yeni teknolojiler sayesinde kondisyonel knock-out ya da dokuya spesifik gen hedeflemesi mümkün olmuştur. Klasik knock-out teknolojisinin hedefi her iki aleli de silmek böylece geni tüm hücrelerde tamamen ortadan kaldırmaktır. Buna karşın kondisyonel knock-out teknolojisinde amaç geni belli bir organ, hücre tipi ya da gelişim safhasında silmektir. Kondisyonel knock-out fareler klasik knock-out farelere göre hem daha uzun yaşarlar hem de kondisyonel knockout metotları daha hassastır. Farklı kondisyonel knockout model yapma teknikleri olmasına karşın en çok kullanılan yöntem Cre-loxP rekombinaz sistemidir. Cre-rekombinaz, loxP olarak adlandırılan iki hedef sekans arasındaki geni makas gibi kesen bir enzimdir. Bu enzim sadece belli hücre tiplerinde eksprese edildiğinden hedef gen sadece bu hücrelerden silinecektir (91).

### 2.9. FKBP52 Molekülünün Yapısı ve Görevleri

Ovaryan steroid hormonlar olan E<sub>2</sub> ve P<sub>4</sub> embriyo implantasyonu öncesi uterusun reseptif hale gelmesinde önemli rollere sahiptirler. FKBP52, steroid hormonların hedef dokularda etkilerini gösterebilmeleri için nükleer reseptörlerin koşaperonu olarak görev yapar.

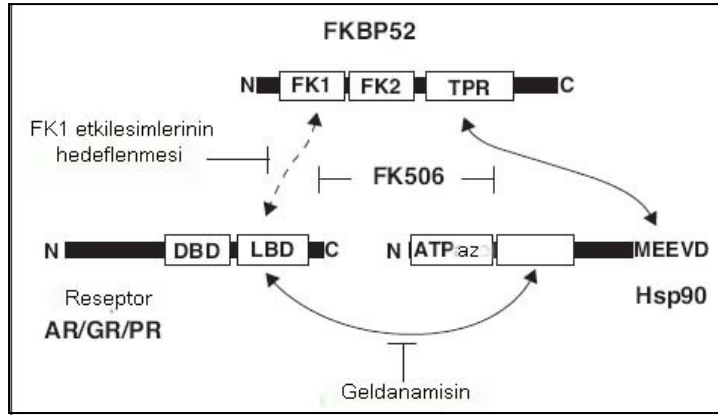
FKBP12 ile kompleks oluşturup kalsinörün fosfataz aktivitesini inhibe ederek T hücresi sinyal transdüksiyon kaskadını ve interlökin-2 transkripsiyonunu bloke eden makrolid ilaç FK506'ya bağlanan 52 kDaluk protein FKBP52 (FKBP4 olarak da adlandırılır) ilk kez Faber ve arkadaşları tarafından değişmemiş PR kompleksinin bir parçası olarak keşfedilmiştir (92). Ligand olmadığında steroid reseptörler sitoplazma ve/ya nükleusta şaperon ve koşaperon proteinleri ile birlikte bulunur. Bu proteinlere heat-shock protein 90/ısı şoku proteini 90 (Hsp90), Hsp70, 23-kDaluk koşaperon (p23) ve immünofilinler olarak adlandırılan Hsp90'a bağlanan tetratrikoptit tekrar (TPR) domeyni içeren protein ailesi örnek olarak verilebilir (93). FKBP52, steroid hormon reseptör (SHR) aktivitesini değiştiren bir Hsp90 koşaperonudur. Hsp90 protein katlanması, tümör baskılanması ve hücre sinyalinde rol alan moleküler şaperondur. Steroid hormon reseptörleri liganda bağlanabilmek için gerekli konformasyona ulaşabilmek için Hsp90 ile ilişki kurmak zorundadırlar.

FKBP52, glukokortikoid reseptör (GR) (94), progesteron reseptör (PR) (95) ve androjen reseptör (AR) (96) için pozitif düzenleyici olarak rol almasına karşın östrojen reseptör (ER) ya da mineralokortikoid reseptör (MR) için böyle bir rolü yoktur (94). FKBP52'nin reseptör-şaperon kompleksleri ile işbirliği reseptör-hormon bağlanmasının artmasını sağlar (94), (97), (98) ayrıca hücre içinde reseptör lokalizasyonunu etkiler (99).

FKBP52 bir immünofilindir. İmmünofilinler, belli immün baskılayıcı ilaçların etkilerine aracılık ettikleri için bu şekilde isimlendirilmişlerdir. İmmünofilinler 2 aileye ayrılırlar: FK506ya bağlanan proteinler olan FKBPler ve siklosporin A'ya bağlanan proteinler olan siklofilinler (CyP). FKBP ve CyP tipik olarak peptidil prolil izomeraz (PPIaz) aktivitesi gösterirler ve bu PPIaz domeyni ayrıca ilaç bağlanma bölgesini oluşturur (100). Peptidil prolil izomeraz aktivitesi prolin aminoasitini içeren peptit bağlarının cis-trans izomerizasyonunu katalize eder. Tüm proteinlerin değil ancak birçok proteinin düzgün katlanması için gereklidir. FKBP ve CyP ailelerinin bazı üyeleri tetratrikoptit tekrarı (TPR) domeyni içerirler bu da oldukça korunmuş olan Hsp 90'ın

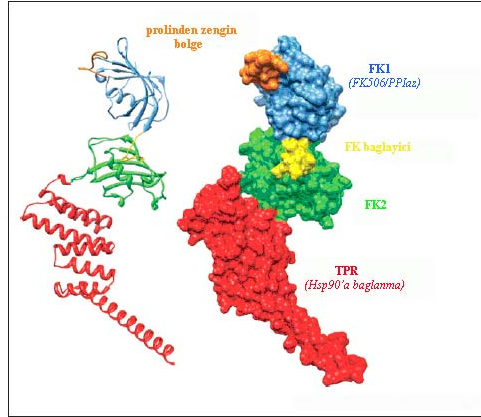
C terminal ucuna bağlanır ve Hsp90 ile birlikte koşaperon olarak davranırlar. FKBP52 ve ilişkili immünofilinler olan FKBP51 ve Cyp40 korunmuş TPR domeynleri nedeniyle başlangıçta Hsp90'a bağlanan proteinler olarak tanımlanmışlardır (101).

Başlıca FKBP fonksiyonel domeynleri FKBP12-benzeri domeynler 1 ve 2 (FK1 ve FK2) ve tetratrikopeptid tekrar (TPR)'dır. FK1 domeyni, immün baskılayıcı ilaç FK506'ya bağlanmayı kolaylaştırır, PPIaz aktivitesine sahiptir (102) ve SHR'nin primer düzenleyici domeynidir (94). Protein katlanmasında hız sınırlayıcı basamak PPIaz aktivitesi FK506'nın bağlanmasıyla inhibe edilir (103). PPIaz domeyni Hsp90'a C-terminal tetratrikopeptid tekrar (TPR) domeyni ile bağlanır (102). FK1 domeyni ayrıca prolinden zengin bölge içerir; bu bölgenin de etkileşim yüzeyi olarak rol aldığı düşünülmektedir. Bu domeyn reseptör düzenlenmesi için önemlidir ve FKBP52'nin farklı fonksiyonlarından büyük ölçüde sorumludur. Şekil 2.7'de reseptör, Hsp90 ve FKBP52 arasındaki tahmin edilen etkileşimler görülmektedir. FKBP52'nin Hsp90 üzerindeki C-terminal EEVD motifi ile TPR domeyni aracılığıyla etkileştiği bilinmektedir. Reseptörün FKBP52 tarafından düzenlenmesi reseptörün LBD'sine lokalizedir. Bu, Hsp90'ın FKBP52 FK1 domeynini LBD'ye yakınlaştırdığı ve prolinden zengin bölgenin reseptör ile etkileştiğini ya da en azından geçici olarak temas ettiğini düşündürmektedir.



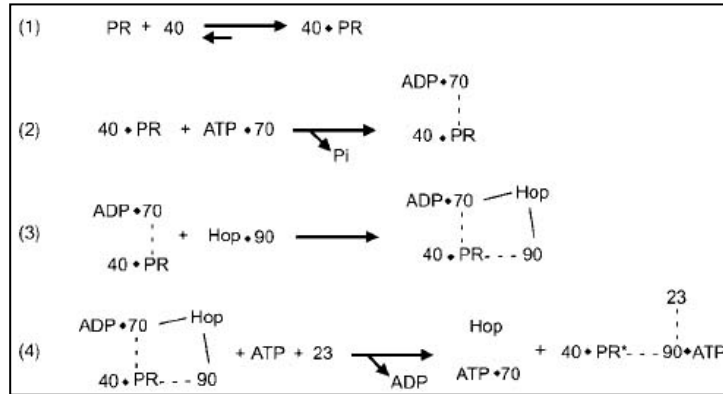
**Şekil 2.7.** FKBP52, Hsp90 ve reseptör arasındaki bilinen (düz ok) ve tahmin edilen (çizgili ok) etkileşimler görülmektedir. Geldanamisin: Hsp90'a bağlanarak fonksiyonunu inhibe eden antibiyotik (104).

FK1, FK2 domeynine FK bağlayıcı aracılığıyla bağlıdır. FK2, FK1'e benzemesine karşın PPIaz aktivitesi yoktur ve FK506'ya bağlanmaz. FK bağlayıcı, kazein kinaz 2 fosforilasyon bölgesi içerir ve fosforillendiğinde FKBP52 fonksiyonunu ortadan kaldırır (104) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. FKBP52'nin X-ışını kristalografik yapısı (104).

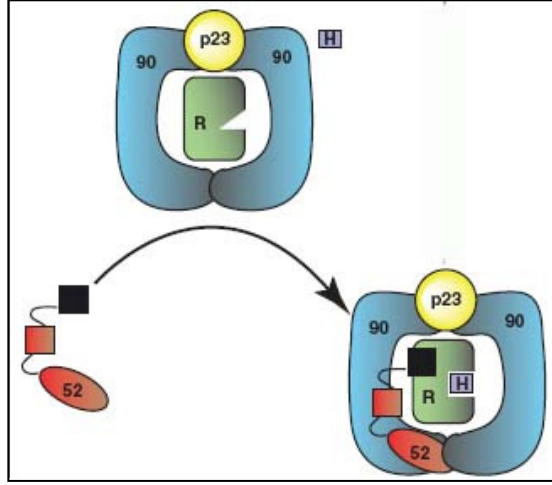
Steroid reseptör/şaperon komplekslerinin bir araya gelmesinde çeşitli Hspler ve koşaperonlar rol alır. Özellikle PR için; bu reseptör sitoplazmada öncelikle Hsp40 ve Hsp70'e bağlanır. Daha sonra Hsp70-Hsp90 organizing protein (Hop)-Hsp90 Hsp70'e bağlanır (105). Hsp70 ve Hop daha sonra bu aracı PR kompleksinden ayrılır, p23 reseptöre bağlı Hsp90'a bağlanır. Hsp90 ve p23'lü PR kompleksi koşaperonlardan birini [FKBP51, FKBP52, CyP40, ya da protein fosfataz 5 (PP5)] Hsp90 bağlanma bölgesine toplar (105) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Steroid reseptör/şaperon komplekslerinin bir araya gelmesinde rol alan Hsp ve koşaperonlar. 40: Hsp40, 70: Hsp70, 90: Hsp90, 23: p23, ATP: adenzin trifosfat, ADP: adenzin difosfat (105).

Reseptörün P<sub>4</sub>'e yüksek afinite ve etkinlikle bağlanabilmesi için Hsp90'ı içeren olgun kompleks korunmalıdır. Yapılan çalışmalarda her steroid hormon nükleer reseptör (GR, ER ve PR)-Hsp 90 kompleksinin spesifik immünofilinler ile tercihe bağlı bağlanma gösterdiği gösterilmiştir (106). PR için; eğer bu kompleks FKBP52'ye bağlanırsa P<sub>4</sub> ligandına optimum bağlanabilir. Ancak FKBP52'nin reseptör-hormon bağlanmasını nasıl gerçekleştirdiği tam olarak bilinmemektedir (107) (Şekil 2.10).





**Şekil 2.10.** Reseptör olgunlaşması ve hormon bağlanmasında FKBP52'nin rolü. FKBP52'nin Hsp90 dimeri ile ilişkisi p23 koşaperonu tarafından stabilize edilir. FK1 domeyni reseptörün ligand bağlanma domeyni ile etkileşime geçer (107).

FKBP52, PR aktivitesini etkin hale getirmesine karşın verimli olmayan bazal PR aktivitesi FKBP52 olmadan da gerçekleşir. Hormon bağlanması reseptör-şaperon heterokompleksinin bozulmasına neden olur ve reseptör aktif hale gelerek transkripsiyon faktörü olarak davranır. Hormon bağlanmasından sonra heterokompleks ayrılmasının gerçekleştiği bilinmesine rağmen kompleksin nükleer taşınım sırasında mı yoksa nükleusta mı ayrıldığı bilinmemektedir. Nükleusta PR homodimerler oluşturup transkripsiyon faktörü gibi davranır ve DNA elementlerine bağlanarak gen transkripsiyonunu aktive eder ya da diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonu inhibe eder.

### 2.9.1. FKBP52'nin Fizyolojik Rollerini

Smith (96) ve Shou (108) laboratuvarları *Fkbp52* knockout (KO) erkek farelerin in vivoda azalmış androjen yanıtına sahip olduklarını göstermişlerdir. Smith ve arkadaşlarının kullandıkları C57BL/6J ırkı *Fkbp52* KO erkekler belirsiz eksternal genital ve yetersiz gelişmiş (disgenik) prostat kitlesi göstermişlerdir (96). Shou ve arkadaşlarının kullandıkları 129SvEv ırkı *Fkbp52* KO erkeklerde de disgenik prostat ve hipospadiyas olarak bilinen penisin ventral yüzeyinde yarı gözlenmiştir (109). Primer ve sekonder seks organlarındaki değişikliklere ek olarak *Fkbp52* KO farelerin epididimisindeki sperm miktarı önemli miktarda azalmış ve sperm anormal morfoloji göstermiştir (110).

Hem C57BL6/129 hem de CD1 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişi fareler infertilidir (48, 95). Bu fareler morfolojik olarak normaldir, ovulasyon ve fertilizasyonda belirgin bir anormallik yoktur. *Pgr* KO fareler hem ovulasyon hem fertilizasyon hem de implantasyon başarısızlığı nedeniyle infertil olmalarına karşın *Fkbp52* KO farelerin infertiliteyi uterus kaynaklıdır. P<sub>4</sub> direnci ve uterus defektleri sonucu implantasyon ve desidualizasyon başarısızlıkla sonuçlanır (48, 108) (Çizelge 2.2).

FKBP52'nin kaybı endometriyozun başlamasına neden olur, *Fkbp52* KO farelerde P<sub>4</sub> direnci artan hücre proliferasyonu, inflamasyon ve endometriyotik lezyon oluşumuna neden olan anjiyogenez ile sonuçlanır (111). Ayrıca endometriyozlu kadınlarda endometriyozu olmayan kadınlara oranla FKBP52 ekspresyonu azalmıştır.

Fenotip	Genotip			
	PgrA ve PgrB genleri çıkarılmış	PgrA geni çıkarılmış	PgrB geni çıkarılmış	Fkbp52 geni çıkarılmış
Fertilite	İnfertil	İnfertil	Fertil	İnfertil
Ovulasyon	Başarısız	Ağır zarar görmüş	Normal	Normal
Fertilizasyon	Başarısız	Başarısız	Normal	Suboptimal
İmplantasyon	Başarısız	Başarısız	Normal	Başarısız
Desidualizasyon	Başarısız	Başarısız	Normal	Başarısız
Meme bezi gelişimi	Başarısız	Normal	Başarısız	X
Gonadotropinlere yanıt	Başarısız	Ağır zarar görmüş	Normal	Normal
Çiftleşme davranışı	Anormal	Zarar görmüş	Normal	X

**Çizelge 2.2.** *Pgr*, *PgrA*, *PgrB* ve *Fkbp52* genleri çıkarılmış dişi farelerin üreme fenotipleri.  
X: incelenmemiş (50).

### 2.9.2.Sistemik *Fkbp52* KO Farelerde Yapılan Çalışmalar ve Dr. Dey'in Laboratuvarı'ndan Elde Edilen Ön Bulgular

FKBP koşaperonlarının steroid-bağımlı dokulardaki fizyolojik rolü fare gen knockout çalışmaları ile ortaya konmuştur. Dr. Dey ve ekibi 2005 yılında Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) dergisinde yayınladıkları çalışmalarında C57BL6/129 karışık genetik zeminli *Fkbp52* KO farelerin infertil fenotipini göstererek bu molekülün üreme fonksiyonlarındaki önemini vurgulamışlardır. *Fkbp51* KO fareler ise belirgin üreme defekti göstermemişlerdir. C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO farelerin üreme kanalları morfolojik olarak normaldir ancak P<sub>4</sub> direnci nedeniyle gebeliği sürdüremezler (95). Daikoku ve arkadaşları *Hoxa-10* KO farelerin uterusunda yaptıkları proteomiks çalışmaları ile (112) FKBP52'nin bu farelerin uterusunda downregüle olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgu FKBP52'nin stromal hücre fonksiyonunun düzenlenmesindeki önemini göstermiştir. *Hoxa-10*, abdominal B-benzeri bir homeobox proteindir (113, 114). *Hoxa-10* KO dişi fareler infertildir, uterusun proksimal kısmı ovidukt benzeri bir yapıya kısmi değişim gösterir. Bu dişilerdeki infertilite sebebi ise kısmi değişim değil stromal hücre proliferasyonu ve desidualizasyonun bozulmasıdır (88). Embriyo transfer deneyleri maternal *Hoxa-10*'un hem implantasyon hem de desidualizasyonda önemli olduğunu göstermiştir (114, 115). *Hoxa-10* KO farelerde ovaryan P<sub>4</sub> ve E<sub>2</sub>'ye yanıt olarak stromal hücre proliferasyonu ciddi oranda azalmış buna karşın E<sub>2</sub>'ye yanıt olarak epitel hücre proliferasyonu normal olarak devam etmiştir (115). Bu fare modelinde P<sub>4</sub>'e yanıt olarak stromal hücre yanıtındaki defektin spesifikliği *Hoxa-10*'un implantasyon ve özellikle desidualizasyon boyunca P<sub>4</sub>'ün etkilerine aracılık etmedeki kritik rolünü göstermektedir. *Hoxa10*'un alt sinyal yolağında olan *FKBP52*'nin peri-implantasyon periyodu boyunca fare uterusunda geçici ve hücreye özgü ekspresyon gösterdiği bulunmuştur bu da bu immünofilinin implantasyon boyunca dinamik değişiklikler gösterdiğini ortaya koymaktadır (112). Gebeliğin 1. gününde uterus başlıca pre-ovulatuvar E<sub>2</sub>'nin etkisi altındayken *Fkbp52*

lümen epiteline lokalizedir, gebeliğin 4. gününde ise lümen ve bez epitelinde devamlılık gösterirken stromaya da yayılım gösterir. Dördüncü günde *Fkbp52* ekspresyonu lümen epitelinin altındaki stromada Progesteron Reseptörü (PR) geni olan *Pgr* ile çakışır. Beşinci günde *Fkbp52* ve *Pgr* başlıca implante olan blastosistin etrafındaki stromada eksprese olurlar (95). Sekizinci günde *Fkbp52* başlıca sekonder desidua zonda ekspresedir ve desidua ile miyometriyum arasında farklılaşmamış stroma yer alır (112).

FKBP52, PR fonksiyonunu etkin hale getiren bir molekül olmasına karşın C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişilerin fenotipinin *Pgr* KO dişilerden önemli ölçüde farklı olması ilginçtir (95). *Pgr* KO dişilerde infertilite ile sonuçlanan ovaryum ve uterus fonksiyonlarındaki ciddi bozulmalara karşın *Fkbp52* KO dişilerin infertil fenotipi bozulan uterus fonksiyonları nedeniyledir. İmplantasyon başarısızlığı gösteren C57BL6/129 genetik zeminindeki *Fkbp52* KO dişilerde ovulasyon normal ve fertilizasyon suboptimaldir (Çizelge 2.2). C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişilerde bazal PR aktivitesi olmasına karşın *Pgr* KO dişilerde hiç PR aktivitesi yoktur. C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişilerin infertil fenotipinin ovulasyon ve/ya fertilizasyondaki defektler nedeniyle değil de implantasyondaki başarısızlık nedeniyle olması ovaryum ve uterusun FKBP52-aracılı  $P_4$  etkisine farklı hassasiyetini göstermektedir. Normal ovulasyon, suboptimal fertilizasyon ve implantasyon başarısızlığı gösteren C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişilerin bu fenotipi Yang ve arkadaşlarının aynı genetik zeminli farelerle bağımsız olarak yaptıkları çalışmada doğrulanmıştır (108).

C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO dişilerde gebeliğin 4. gününde uterus başlıca  $P_4$  etkisi altındayken  $P_4$  tarafından düzenlenen birçok gen saptanamamıştır (95). Bu genlerden bazıları: amfiregülün (*Areg*), *Hoxa-10*, Indian hedgehog (*Ihh*) ve histidin dekarboksilaz (*Hdc*)'dır. Amfiregülün, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir üyesi olan glikozillenmiş heparin-bağlayıcı proteindir.  $P_4$ 'ün etkisi altında *Areg* lümen ve bez epitelinde eksprese edilir (80) ve PRA izoformu aracılığıyla çalışan  $P_4$  tarafından düzenlenir (74). Amfiregülün uterus hücrelerine spesifik farklılaşma ve proliferasyon için gerekli olmasına karşın *Areg* geni olmayan fareler fertildirler (81). Bunun sebebi, diğer EGF ailesi üyeleri tarafından yapılan kompensasyon olabilir. Hedgehog sinyal yolağı bileşenlerinin de özellikle hedgehog-bağlanma reseptörünü içeren Indian hedgehog (*Ihh*) sinyal yolağı, Patched ve downstream faktörleri ve Gli-3'ün  $P_4$  tarafından etkilendiği gösterilmiştir (83). *Ihh*'nin ekspresyonu lümen ve bez epitelinde gebeliğin 3. gününden itibaren artar. Bu süre boyunca reseptörü ve downstream transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu alttaki stromada upregüle olur. Bu da *Ihh*'nin erken gebelik boyunca stromal hücre proliferasyonu için parakrin bir faktör olarak fonksiyon gördüğünü göstermektedir.  $P_4$  tarafından düzenlenen diğer bir gen ise histidin dekarboksilazdır. Bu gen özellikle PRB izoformu aracılığıyla etki gösteren  $P_4$  tarafından düzenlenir (73) ve gebeliğin 4. gününde primer olarak epitelde eksprese edilir (82). Gebeliğin 4.gününde C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO farelerin uterusunda *Hoxa-10*, *Ihh*, *Areg*, *Hdc* genlerinin ekspresyonlarının olmaması buna karşın uterustaki PR ekspresyonu ve serum  $P_4$  konsantrasyonlarının vahşi tip (VT) farelerdekine benzer olması FKBP52'nin PR aktivitesinin etkin hale getirilmesindeki rolünü gösterir (95). C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* KO farelerde  $E_2$ 'nin artan etkisi gözlenir. Gebeliğin 4. gününde azalan  $P_4$  etkisine bağlı olarak  $E_2$ 'ye yanıt veren gen olan

laktoferin (*Ltf*)'in ekspresyonu artmıştır. Bir genin mutasyonu, farenin genetik zeminine bağlı olarak oldukça farklı fenotipler vermektedir. Örneğin, *Cox-2* KO fareler genetik zemine bağlı olarak fenotiplerinde farklılık gösterirler (116). Ayrıca CF1 genetik zeminli farelerdeki EGF eksikliği iç hücre kitlesinin dejenerasyonuna bağlı olarak perimplantasyon ölümüne neden olurken 129/Sv genetik zeminli farelerdeki EGF eksikliği, gebeliğin ortasında plasental defektlere bağlı embriyonik ölümüne neden olur. Buna karşın CD1 genetik zeminli farelerdeki EGF eksikliği anormal deri, böbrek, karaciğer ve gastrointestinal kanal fonksiyonlarına bağlı erken postnatal ölümüne neden olur (117). Diğer araştırmacılar da transforme edici büyüme faktörü  $\beta 1$ 'in (transforming growth factor  $\beta 1$ /TGF  $\beta 1$ ) (118) leptinin (119) ve sentromer protein B'nin (120) farklı genetik zeminlerdeki eksikliklerinin çeşitli fenotiplere yol açtığını göstermişlerdir. Bu farklı etkilere, modifier (değiştirici) genler olarak tanımlanan genlerin neden olduğu düşünülmektedir (118, 121) ancak bu genlerin tanımlanmasına yönelik fazla çalışma bulunmamaktadır.

Dr. Dey ve ekibi 2005 yılında PNAS dergisinde yayınlanan makalelerinin (95) devamı niteliğindeki çalışmalarını 2007 yılında Journal of Clinical Investigation dergisinde yayınlamışlardır (48). Bu çalışmada, C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* heterozigot KO (+/-) erkek fareler CD1 genetik zeminli fareler VT dişilerle çiftleştirilmiş ve bu çiftleştirmeler sonucu oluşan CD1 genetik zeminli heterozigot dişi ve erkeklerin kendi aralarında on nesil boyunca çiftleştirilmeleri sonucu CD1 genetik zeminli *Fkbp52* KO fareler elde edilmiştir. Hem C57BL6/129 genetik zeminli hem de CD1 genetik zeminli *Fkbp52* KO erkeklerin infertil olmaları nedeniyle deneylerde çiftleştirme amacıyla VT erkek fareler kullanılmıştır.

Dr. Dey ve arkadaşları CD1 *Fkbp52*-/- dişilerde gebeliğin 5. günündeki serum  $P_4$  düzeylerinin VT farelerdekine yakın olduğu gözleminde yola çıkarak *Fkbp52*-/- dişilerde PR ya da  $P_4$  düzeylerinin değil PR aktivitesinin bozulduğunu bu nedenle *Fkbp52*-/- dişilere normalden daha yüksek düzeyde  $P_4$  uygulamasının PR aktivitesini artırarak FKBP52 yokluğunda gebelik kaybını önleyebileceğini düşünmüşlerdir. Her iki genetik zemindeki *Fkbp52*-/- dişilere gebeliklerinin 2. gününden itibaren içi  $P_4$  dolu silastik implantlar subkutan olarak yerleştirilmiş ve gebeliklerinin 5. gününde implantasyon bölgeleri kontrol edilmiştir. CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşirken C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşmemiştir.

*Fkbp52*-/- farelerdeki implantasyon başarısızlığı uterus kaynaklıdır. Çünkü, bu farelerde ovulasyon normaldir bu da PR sinyaline uterusun yanıtının ovaryumun yanıtından farklı olduğunu göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri,  $P_4$ 'ün sentezlendiği ovaryumdaki lokal  $P_4$  düzeylerinin yüksek olması olabilir (122), yüksek düzey  $P_4$  ovulasyon ve fertilizasyon olaylarında bazal PR aktivitesini artırır. İkinci neden  $P_4$ 'ün hedefindeki diğer organlara kıyasla uterusun gebelik boyunca daha güçlü  $P_4$ /PR sinyaline ihtiyaç duyması olabilir. Üçüncü neden ise FKBP52'nin PR sinyalini etkilemenin yanısıra diğer organlarda gözlenmeyen ancak uterusu gözlenen PR'den bağımsız bir rolünün olması olabilir.

İmplantasyon başarısı gösteren CD1 *Fkbp52*-/- dişilere  $P_4$  uygulamasının devam etmesi halinde gebeliğin terme kadar sürüp sürmeyeceğini araştırmak için gebeliğin 2. gününde yerleştirilen silastik  $P_4$  implantlar gebeliğin 17. gününde çıkarılmıştır. Çünkü, doğum olayının başlayabilmesi için  $P_4$  düzeyinin düşmesi gerekmektedir (123). Silastik

implant aracılı P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerin yavruları normal ağırlıkta olmasına karşın yavru sayısı VT farelere oranla çok daha düşük bulunmuştur. Bu farelerin implantasyon bölgeleri gebeliğin 14. gününde incelendiğinde rezorpsiyon bölgelerinin olduğu gözlenmiştir. Koyu mavi alanlar şeklinde gözlenen rezorbe olan implantasyon bölgeleri histolojik olarak incelendiğinde kan hücreleri tarafından yoğun bir infiltrasyonun olduğu bulunmuştur.

Silastik implantlar CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde uterus reseptivitesini indüklemek ve implantasyon başarısı sağlamak için serumda yeterli P<sub>4</sub> artışı sağlamışlar ancak gebeliğin terme kadar ilerlemesini sağlayamamışlardır. Bu başarısızlığın P<sub>4</sub> düzeylerinin daha da artırılmasıyla önlenip önlenemeyeceğini araştırmak için silastik implant yerine gebeliğin 2. gününden başlayarak günlük 2mg/ml olacak şekilde subkutan P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapılmıştır. Gebeliğin 14. günündeki serum P<sub>4</sub> düzeyleri VT farelerde yaklaşık 47 ng/ml, silastik implant yerleştirilen CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde yaklaşık 100 ng/ml, P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapılan CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde ise yaklaşık 156 ng/ml bulunmuştur. Vahşi tip farelerde gebelik boyunca serum P<sub>4</sub> düzeyi ortalama 45 ng/ml'dir. CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde P<sub>4</sub> düzeylerinin günlük enjeksiyon aracılığıyla daha da artırılması gebeliğin sürdürülmesine pozitif etkide bulunmuştur, gebeliğin 14. gününde implantasyon bölgeleri incelendiğinde rezorpsiyon bölgelerinin azaldığı ve vahşi tiptekine benzediği gözlenmiştir. CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler doğum yaptığında yavru sayısının ve süten kesilme dönemi ile gelişimin erken dönemlerindeki yavru ağırlıklarının VT farelerdekine benzer olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlardan P<sub>4</sub> sinyalinin sıkıca kontrol edildiği anlaşılmaktadır çünkü FKBP52 eksikliğinde serumdaki yaklaşık 100 ng/ml P<sub>4</sub> uterus reseptivitesi ve implantasyon için yeterli iken gebeliğin başarıyla tamamlanması için yaklaşık 150 ng/ml P<sub>4</sub> gereklidir.

Ekzojen P<sub>4</sub> uygulaması ile CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde implantasyon başarısı sağlanmasına karşın C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde başarılı olunamaması nedeniyle CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde *Hoxa10*, *Ihh* ve *Areg* gibi P<sub>4</sub> tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonu gebeliğin 4. gününde in situ hibridizasyon ile incelemiştir. CD1 ve C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde bu genlerin ekspresyonları VT farelere oranla azalmış neredeyse ortadan kalkmıştır. Ancak CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilere P<sub>4</sub> uygulaması hem P<sub>4</sub> hem de E<sub>2</sub> tarafından düzenlenen genlerin ekspresyonunu vahşi tiptekine benzer hale getirmiştir. P<sub>4</sub> uygulaması, P<sub>4</sub>'ün hedefindeki genlerin ekspresyonunu pozitif yönde etkilerken Laktoferin gibi E<sub>2</sub>'nin hedefindeki genlerin ekspresyonunu negatif yönde etkilemiştir. Böylece uterus, reseptiviteye zararlı östrojenik dominansiden kurtularak P<sub>4</sub> dominansisine girmiştir. P<sub>4</sub> uygulanan C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde ise *Hoxa10* ve *Ihh* ekspresyonu VT uterustakine benzemesine karşın *Areg* ekspresyonu saptanamamıştır. Ayrıca P<sub>4</sub> uygulaması C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu Laktoferin ekspresyonunun azalmasında etkili olamamıştır. Yani C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus P<sub>4</sub> hedefindeki genlerin P<sub>4</sub> tarafından indüklenebilmesine hassas iken P<sub>4</sub>'ün E<sub>2</sub>'nin hedefindeki genleri antagonize etmesine karşı daha az hassastır.

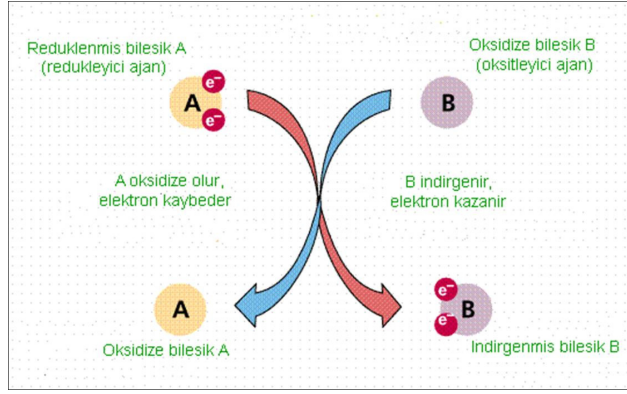
Dr. Dey ve ekibinin bulgularına göre FKBP52 eksikliği gebelik boyunca P<sub>4</sub> direncine neden olur çünkü bu dişilerdeki PR ve P<sub>4</sub> düzeyleri normal olmasına karşın PR aktivitesi azalmıştır. Başarılı gebelik için gereken P<sub>4</sub>-PR sinyalinin düzeyi gebeliğin

evresine bağlıdır. CD1 ve C57BL6/129 fare soylarında FKBP52 yokluğunda modifier (değiştirici) genler, uterusun P<sub>4</sub>-PR sinyaline farklı yanıt vermesine neden olabilirler.

## 2.10. Oksijen ve Canlılar İçin Önemi

Oksijen (O<sub>2</sub>) bütün canlılar için vazgeçilmez bir element olup, hidrojen, karbon, azot ve kükürt ile birlikte organik moleküllerin temel yapısına katılır. Atmosferde en bol bulunan elementlerden biri olan O<sub>2</sub>, yaklaşık iki milyar yıl kadar önce fotosentetik canlıların faaliyeti sonucu oluşmaya başlamıştır. Atmosferdeki O<sub>2</sub> birikimini takiben oluşan ozon tabakası, özellikle karasal ortamda, daha yüksek yapılı canlıların oluşumu ve evrimine de olanak sağlamıştır. Organik moleküllerdeki yapısal görevinin yanısıra, aerobik canlıların enerji metabolizmasındaki rolü nedeniyle O<sub>2</sub> hayati bir role sahiptir. Çok sayıdaki hidroksilaz ve oksidaz enzimleri O<sub>2</sub>'yi substrat olarak kullanıp organik moleküllerin yapılarına katılımını katalizlemektedir. Bilinen bütün canlı türleri, organik moleküllerin içindeki şekli ile O<sub>2</sub>'ye gereksinim duysalar da, serbest formdaki moleküler O<sub>2</sub> her canlı türü için aynı anlamı ifade etmez. Örneğin aerobik canlılar yaşamları için mutlaka moleküler O<sub>2</sub>'ye gereksinim duyarlar. Anaerobik canlılar ise büyüme ve çoğalmaları için O<sub>2</sub>'ye bağımlı değildirler. Fakültatif anaeroblar O<sub>2</sub>'nin varlığını tolere edebilirler, oysa zorunlu anaerobik canlılar sadece O<sub>2</sub>'siz ortamda yaşayabilirler. Anaerobik canlılardaki O<sub>2</sub>'nin toksik etkisinin sebebi, O<sub>2</sub>'den kaynaklanan bazı reaktif türlerin biyolojik molekülleri oksitlemeleri ve bu reaktif türlere karşı anaerobik türlerde savunma sisteminin bulunmamasıdır (124).

Oksijen de dahil olmak üzere kimyasal olarak elektron kabul eden her bileşik oksidan ya da okside edici (yükseltgeyici) ajandır. Buna karşın elektron veren bir madde ise redüktan ya da redükte edici (indirgeyici) bir ajandır. Maddenin elektron kazandığı kimyasal reaksiyon redüksiyon olarak tanımlanır. Oksidasyon elektron kaybının gerçekleştiği durumdur. Redüktan elektronlarını verdiği zaman diğer bir maddenin redükte olmasına (indirgenmesine) neden olur ve bir oksidan elektron aldığı zaman diğer bir maddenin okside olmasına neden olur (Şekil 2.11). Biyolojide redükte edici (indirgeyici) bir ajan elektronlarını vererek-genelde hidrojen verilmesi ya da O<sub>2</sub>'nin uzaklaştırılması ile etki gösterir. Oksijen kazanımının olduğu oksidasyon olayına daima O<sub>2</sub> kaybının olduğu redüksiyon olayı eşlik eder (125-127). Bu tür reaksiyonlar redoks reaksiyonları olarak adlandırılır ve birçok biyokimyasal yolak, hücresel kimya, biyosentez ve düzenlenmenin temelini oluşturur (128). Redüktan ve oksidan kelimeleri kimyasal terimler olmasına karşın biyolojik olaylarda redüktanlar (indirgeyici) için antioksidan, oksidanlar (yükseltgeyici) için pro-oksidan terimleri kullanılmaktadır (125, 126).



Şekil 2.11. Redüksiyon ve oksidasyon mekanizmaları (129).

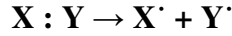
### 2.10.1. Serbest Radikaller

Radikaller (genelde yanlış olarak serbest-radikal olarak tanımlanır çünkü radikal her zaman serbesttir), dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kısa ömürlü reaktif atom ve moleküllerdir. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Radikaller literatürde üst nokta (R<sup>•</sup>) ile gösterilir böylece diğer reaktif O<sub>2</sub> metabolitlerinden ayrılır. Serbest radikaller, zigot döneminden itibaren organizmanın canlılığı devam ettiği sürece normal biyolojik işlevler sonucunda üretilirler (124).

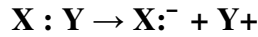
### 2.10.2. Serbest Radikallerin Oluşum Mekanizmaları

Serbest radikaller 3 farklı şekilde oluşabilir.

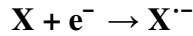
**1.Kovalent bağların homolitik bölünmesi:** Kovalent bağlı (: elektron çiftini ifade eder) molekülün bölünme sonrasında her bir parçasında ortak elektronlardan birisi kalır.



**2.Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi:** Kovalent bağın açılması esnasında moleküldeki atomlardan birisi iki elektronu da alır.



**3.Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi:**



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Birçok farklı radikal olmakla birlikte biyolojik sistemlerde en çok ilgi çekenler O<sub>2</sub>'den köken alan ve reaktif oksijen türevleri (ROT-reactive oxygen species (ROS) veya serbest oksijen radikalleri olarak tanımlananlardır. Oksijenden kaynaklanan pro-oksidanlar (reaktif oksijen türevleri/ROT) radikaller ve non-radikaller olmak üzere 2 gruba ayrılır (130) (Çizelge 2.3).

Radikaller	Non-radikaller
Süperoksit, $O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil, $OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, $RO_2^{\cdot}$	Ozon, $O_3$
Alkoksil, $RO^{\cdot}$	Singlet oksijen, $O^{\cdot}$
Hidroperoksil, $HO_2^{\cdot}$	Peroksinitrit, $ONOO^{\cdot}$
Nitrik oksit, $NO^{\cdot}$	Hidroperoksit, $L(R)OOH$

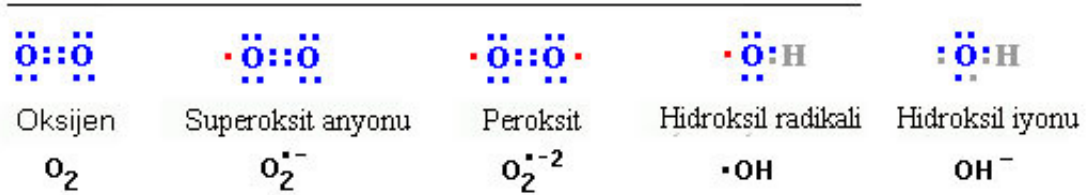
**Çizelge 2.3.** Biyolojik önemi olan reaktif oksijen türleri (131).

Serbest radikaller, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücre kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli doku ve hücre hasarlarına neden olabilirler. Radikaller, bazı biyolojik molekülleri hasara uğratabilirler. Etraflarındaki moleküller ile reaksiyona girerek onlardan elektron alıp kararlı hale gelirler (132). Serbest oksijen radikalleri,  $O_2$ 'nin belirli koşullarda kısmen indirgenmesi sonucu oluşan çok kısa ömürlü ve güçlü oksidan nitelikli  $O_2$  metabolitleridir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir:

1. Süperoksit anyonu
2. Hidroksil radikali
3. Peroksit (hidrojen peroksit).

Bu radikallerin yapıları Şekil 2.12'de gösterilmektedir.

Reaktif oksijen türleri (• paylaşılmamış elektronlar)



**Şekil 2.12.** Paylaşılmamış elektronları gösteren radikal yapıları (133).

### 2.10.2.1. Süperoksit Radikali

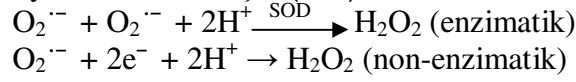
Canlılarda olduğu bilinen ilk radikaldır ve farklı mekanizmalarla oluşur (134-136).  $O_2^{\cdot-}$  radikali, direkt olarak fazla zararlı değildir. Asıl önemi,  $H_2O_2$  kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarını indirgemesidir.  $O_2^{\cdot-}$  radikali, hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. Diğer radikallere göre daha az reaktif olsa da indirgenmiş nükleotidleri, bazı aminoasitleri ve antioksidan bileşikleri oksitler.

Zar fosfolipidleri nedeniyle hücre zarı yüzeyleri daha asidik olduğundan  $O_2^{\cdot-}$  radikali burada kolayca bir proton alarak hidroperoksit radikalini ( $HO_2^{\cdot}$ ) oluşturabilir. Bu radikal çok reaktif olup hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu başlatabilir ve antioksidanları yükseltgeyebilir (137, 138).



### 2.10.2.2. Hidrojen Peroksit

Biyolojik sistemlerde  $O_2^{\cdot-}$  radikallerinin enzimatik ve non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur (134).



$H_2O_2$  serbest bir radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü  $O_2^{\cdot-}$  radikali ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici serbest radikal olan  $OH^{\cdot}$  radikalini oluşturur (139-141).  $H_2O_2$  oksitleyici ve indirgeyici özelliğinin zayıf olmasına karşılık moleküler yapısında su ( $H_2O$ ) bulundurmasından dolayı biyolojik membranları kolaylıkla geçebilir.  $O_2^{\cdot-}$  radikalinde ise bu özellik yoktur.  $H_2O_2$ , bu sayede oluştuğu yerden çok uzaklara gidip hücre kompartmanları boyunca ve hücreler arasında serbest radikal indüklü hasarı iletmektedir. Proteinleri, tiyol grubu içeren enzimleri, fosfolipidleri, karbohidratları ve DNA'yı hedef alıp hasara yol açabilir (142, 143).

### 2.10.2.3. Hidroksil Radikali

$OH^{\cdot}$  radikali, hücrelerde hemen hemen her tip molekülle reaksiyona girebilen bilinen en reaktif  $O_2$  radikalidir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Karbohidratlar, aminoasitler, fosfolipidler, DNA bazları ve organik asitler gibi elektronca zengin birçok biyolojik molekül ile reaksiyona girer. Çok yönlü reaksiyonlar sonucu oluşabilir (134).

### 2.10.2.4. Singlet Oksijen

Singlet Oksijen ( $^1O_2$ ) ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan (non-radikal) bir reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale geçmesiyle oluşur (144).

ROT'lerin zararlı etkilerinin yanısıra yararlı etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Çok düşük konsantrasyonlarda intraselüler ya da interselüler bazı sinyal transdüksiyon yollarında ikincil mesajcı olarak rol alabilirler (145). Örneğin, çeşitli hücre kültürlerine süperoksit ya da hidrojen peroksitin ilave edilmesi DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunun artmasına neden olmuştur, diğer bir deyişle mitojen olarak davranmışlardır.

### 2.10.3. Serbest Radikal Kaynakları

Serbest radikal oluşumunu sağlayan mekanizmalar endojen ve ekzojen kaynaklar olarak ikiye ayrılmaktadır (146). Endojen kaynaklara örnek olarak mitokondriyel elektron taşıma zinciri ve beyaz kan hücreleri verilebilir. Aerobik yaşamın bir parçası olarak  $O_2$  mitokondride elektron taşıma zinciri boyunca indirgenirken sürekli olarak radikaller üretilirler. Hücre yaşlandıkça mitokondrinin hasar görmesi ve membran bütünlüğünün bozulması nedeniyle mitokondriyel ROT üretimi artar (147). Nötrofil gibi beyaz kan hücreleri patojenleri öldürmek için savunma mekanizması olarak kullanmak amacıyla  $O_2$  radikallerini üretmede özelleşmişlerdir. ROT'nin bir diğer endojen kaynağı

da enzimlerdir. Örneğin, süperoksit radikallerini oluşturan ksantin oksidaz ve nitrik oksit (NO) radikallerini üreten nitrik oksit sentaz gibi (148-150).

Ekzojen serbest radikal kaynakları şu şekilde sıralanabilir (131): antineoplastik ajanlar, radyasyon, güneş ışığı, alkol ve uyuşturucular gibi alışkanlık yapan maddeler, ksenobiyotikler, egsoz gazları, pestisitler, sigara dumanı gibi çevresel ajanlar ve stres olarak sınıflandırılabilir.

#### **2.10.4. Serbest Radikallerin Etkileri**

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Karbohidrat, lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküller ve tüm hücre bileşenleri ile etkileşme özelliği göstererek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olarak yapılarının bozulmasına neden olurlar (146, 151).

##### **2.10.4.1. Serbest Radikallerin Lipidler Üzerindeki Etkileri**

Yüksek oranda doymamış yağ asitleri içerdikleri için tüm hücrel membranlar oksidasyona hassastır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturabilirler. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlayan ve otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde uzayan, lipid peroksitlerinin aldehit türevleri, hidrokarbon radikalleri ve uçucu bazı ürünlere çevrilmesi şeklinde sonlanan süreçtir (152). Lipid peroksidasyonu, membranlara yakın bölgelerde ortaya çıkan OH<sup>•</sup> radikalının membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine saldırmasıyla oluşur (146). Lipid peroksidasyonu ile oluşan membran zararı geri dönüşümsüzdür. Biyomoleküllerin tüm büyük sınıfları serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler en hassas olanlarıdır.

##### **2.10.4.2. Serbest Radikallerin Proteinler Üzerindeki Etkileri**

Membranların diğer bir temel bileşeni olan proteinler de ROT saldırılarının hedefinde yer alır. Ancak doymamış yağ asitlerine kıyasla radikallerin meydana getireceği zarara karşı daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal zararından etkilenme dereceleri içerdikleri aminoasit kompozisyonuna bağlıdır. Doymamış yağ ve sülfür içeren aminoasitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Farklı ROT'ler arasında OH<sup>•</sup>, RO<sup>•</sup> ve nitrojen-reaktif radikaller genellikle protein hasarına yol açanlardır. Hidrojen peroksit ve O<sub>2</sub><sup>•-</sup> radikalleri fizyolojik konsantrasyonlarda proteinler üzerinde zayıf etki gösterirler ancak sülfidril (-SH) grubu içerenler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşimi takiben okside olurlar. Proteinler ROT'ler ile etkileştikten sonra belli aminoasit dizilerinde hasar, tersiyer yapılarında değişiklik, degradasyon ve fragmantasyon gibi direkt ya da indirekt hasarlar oluşabilir. Protein hasarı sonucunda enzimatik aktivitede kayıp, enerji üretimi gibi hücrel fonksiyonlarda değişiklik, membran potansiyeli oluşumunda engellenme ve hücrel proteinlerin tip ve düzeyinde değişiklikler gözlenir.

Protein oksidasyon ürünleri genellikle aldehitler, keto bileşikleri ve karbonillerdir (153, 154).

#### **2.10.4.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerindeki Etkileri**

DNA iyi korunması ve kararlı olmasına karşın serbest radikaller için önemli bir hedeftir. Radikaller, DNA bazlarının modifikasyonu, tekli ve çiftli DNA kırıkları, pürinlerin kaybı (apürinik bölgeler), deoksiriboz şekeri, DNA-protein çapraz bağlantısı ve DNA tamir sisteminde hasara neden olabilir. Tüm ROT'ler hasara neden olmaz, çoğunlukla OH<sup>·</sup> radikalleri hasara neden olur. DNA'nın O<sub>2</sub><sup>·-</sup> ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi daha az reaktif olan diğer ROT'ler ile fizyolojik konsantrasyonlarında direkt etkileşimi hasara neden olmaz ancak bu türler kolayca hasara neden olan diğer reaktiflerin oluşmasına neden olabilir. Örneğin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, OH<sup>·</sup> oluşmasına ayrıca NO ve O<sub>2</sub><sup>·-</sup>, peroksinitrit (ONOO<sup>-</sup>) oluşmasına neden olabilir ve bu türler de OH<sup>·</sup> radikalinin oluşturduğuna benzer bir DNA hasarı oluşturabilirler (155, 156). İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona, kanserleşmeye ve ölüme yol açabilir.

#### **2.10.4.4. Serbest Radikallerin Karbohidratlar Üzerindeki Etkileri**

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler, DNA, Ribo Nükleik Asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Çoklu doymamış yağ asitleri ve karbohidrat oksidasyonunun bir ürünü olan glioksal'ın hücre bölünmesini inhibe ettiği kaydedilmiştir (146).

#### **2.10.5. Oksidatif Stres ve Oksidatif Strese Karşı Hücrenin Savunma Mekanizmaları ve Antioksidan Moleküller**

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Canlı hücrelerde bulunan lipid, protein, nükleik asit ve karbohidratlar gibi hedef moleküllerdeki oksidan hasarı, serbest radikalleri nötralize ederek engelleyen veya geciktiren maddelere antioksidan ve bu olaya da antioksidan savunma adı verilir. Bu sistemin evrim boyunca atmosferde değişen O<sub>2</sub> konsantrasyonuna yanıt olarak gelişmiş olma ihtimali yüksektir. Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. Oksidatif stres (OS) olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.

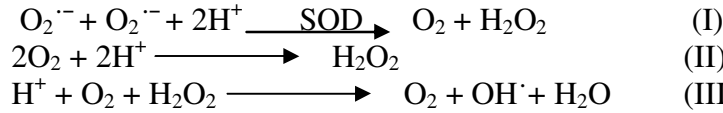
Serbest radikaller ve antioksidanlar arasında çok hassas bir denge vardır. Bu dengedeki düzensizlikler veya hücreye zarar veren ROT'lerin birikimi yukarıda da belirtildiği gibi oksidatif stres olarak tanımlanır. Hücre içinde ROT üreten çok sayıda bileşik ve çevresel ajanlar, aktif O<sub>2</sub> konsantrasyonunun hücrenin savunma kapasitesini aşan bir seviyeye ulaşması, hücrelerin ROT'nin yüksek seviyelerine maruz kalması OS'ye neden olan durumlardır. Antioksidanların bir kısmı serbest radikal oluşumunu, bir kısmı ise oluşmuş serbest radikallerin zararlı etkilerini önler (131).

Çeşitli özellikteki serbest radikaller için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç vardır. Hidrofilik özellikteki antioksidanlar sitozol ve ekstraselüler sıvılarda, lipofilik özelliktekiler ise membranlarda ve lipoproteinlerde bulunurlar. Antioksidanlar başlıca endojen (doğal) ve ekzojen (farmakolojik) olmak üzere 2'ye ayrılırlar. Endojen kaynaklı olanlar ise enzimatik ve enzimatik olmayanlar (non-enzimatik) olarak sınıflandırılır. Hüresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon-S transferaz (GST) bulunur. Bu birincil enzimlerden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutatyon redüktaz (GSH-Rd) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimleri de vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Non-enzimatik antioksidanlar ise, indirgenmiş glutatyon (GSH), N-asetilsistein ve tiyoller gibi protein olmayan sülfidril, A, C ve E vitaminleri ve başka moleküllerdir (157).

### 2.10.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

#### Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD),  $O_2^{\cdot-}$ 'nin  $H_2O_2$ 'ye dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. İnsanda SOD'nin iki tipi mevcuttur. Sitozolda dimerik,  $Cu^{+2}$  ve  $Zn^{+2}$  içeren izomeri (Cu-Zn SOD) ile mitokondride tetramerik,  $Mn^{+2}$  içeren izomeri mevcuttur (Mn-SOD). Prokaryotlarda  $Fe^{+3}$  içeren bir izomeri daha vardır (Fe-SOD). Ayrıca 1982 yılında glikoprotein yapısında olan ekstraselüler SOD (EC-SOD) tanımlanmıştır.



SOD, II. reaksiyonun hızını artırırken, III. reaksiyonun oluşumunu engeller. Enzimin fizyolojik fonksiyonu;  $O_2$ 'yi metabolize eden hücreleri  $O_2^{\cdot-}$ 'nin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. SOD, aerobik canlılarda  $O_2^{\cdot-}$ 'lerin  $H_2O_2$ 'ye çevrilmesinde katalitik aktivitesi yüksek olan enzimdir (146).

#### Katalaz (CAT)

Katalaz, peroksizomlarda lokalize olan ve yapısında 4 adet "hem" grubu bulunduran bir hemoproteindir. Karaciğer, böbrek, miyokard, çizgili kas ve eritrositlerde aktivitesi yüksektir.  $H_2O_2$ 'yi,  $O_2$  ve  $H_2O$ 'ya parçalar. Dolayısıyla SOD tarafından başlatılan detoksifikasyon reaksiyonunu tamamlar.

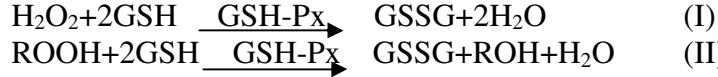


Katalazın indirgeyici etkisi  $H_2O_2$ 'nin yanısıra metil-, etil- hidroksiperoksitler gibi küçük moleküllü lipid peroksidasyonlarını da içine alır (146).

#### Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz,  $H_2O_2$ 'lerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. Enzimin %60-75'i ökaryot hücrelerin sitoplazmasında bulunur. %25-40'ı ise

mitokondridedir. Enzim aktivitesi eritrositler ve karaciğerde fazladır. GSH-Px, intraselüler mesafede lipidleri peroksidasyondan koruyan en önemli enzimdir. Bu nedenle hücrenin sitozolik kompartmanında yer alan bu enzim hücrenin yapısını ve fonksiyonunu korur [64,85]. GSH-Px, aşağıdaki reaksiyonları katalizler (146).



Glutasyon peroksidaz enziminin Selenyum (Se) bağımlı ve bağımsız iki formu vardır.

### Glutasyon S-Transferaz (GST)

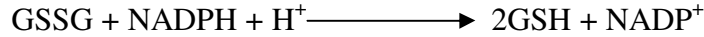
Selenyuma bağılı olmayan GSH-Px olarak ta adlandırılır. Glutasyon transferazlar, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından reaktif ara ürünlere dönüştürülen yabancı maddelerin daha az reaktif konjugatlara dönüşümünü katalizler. Bu işlemi yaparken glutasyon (GSH)'daki sisteine ait -SH grubunu yabancı maddelere bağlayarak elektrofilik bölgelerini nötralize eder ve ürünü daha fazla suda çözünür hale getirerek organizmadan atılımını sağlar.



Başta araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri olmak üzere lipid peroksitlerine karşı Se bağımsız GSH peroksidaz gibi aktivite gösterir (151).

### Glutasyon Redüktaz (GSSG-R)

Hidroperoksitlerin redükte olmasıyla oluşan okside glutasyonun (GSSG), redükte hale (GSH) dönüşmesini katalizler. Reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH'ye ihtiyaç vardır (146).



### 2.10.5.2. Enzimatik Olmayan (Non-enzimatik) Antioksidanlar

ROT'lerin ortadan kaldırılmasına enzimatik antioksidanların yanı sıra enzimatik olmayan (non-enzimatik) antioksidanlar da katılır.

### Glutasyon (GSH)

Glutasyon ( $\gamma$ -Glutamil Sisteinil Glisin), düşük molekül ağırlıklı önemli bir tripeptiddir. GSH intrasellüler bir antioksidan olup ekstrasellüler mesafede düşük konsantasyonlarda bulunur. Hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam oluşturarak hücreyi oksidatif hasara karşı korur. Glutasyon, eritrosit hariç tüm memeli hücrelerinde bol miktarda salınır. Glutasyon,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , alkoksil ( $\text{RO}^\cdot$ ) radikalleri ile direkt etkileşime girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur ve diğer taraftan proteinlerin sülfidril gruplarının redükte halde kalmasını sağlayarak protein ve enzimlerin inaktivasyonunu önler. Ayrıca GSH, membran geçirgenliğinin sağlanması, DNA sentezi, protein konformasyonu ve enzim aktivitesinin ayarlanması gibi görevlerde de yer alır (146).

### Askorbik Asit

L-Askorbik asit (C Vitamini) insan beslenmesinde önemli bir vitamin olup bitki dokularında bol miktarda bulunur. Süperoksit, singlet oksijen ve  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi temizleme özelliği vardır. Suda çözünebilir bir bileşik olduğu için, aktifleşmiş oksijenle sulu fazda

bulunan diğer bileşenlerden daha kolayca reaksiyona girer ve oksidatif hasardan makromolekülleri korur.

Askorbatın antioksidan olarak indirekt rolü,  $\alpha$ -tokoferol ve karotenoid gibi membrana bağlı antioksidanları indirgenmiş formuna dönüştürüp yenilemesidir.  $\alpha$ -tokoferol, peroksil radikalleri ve singlet oksijeni temizleme özelliğine sahiptir, ancak bu sırada tokoferoksil radikaline dönüşür. Oluşan tokoferoksil radikal, askorbat tarafından tokoferole indirgenir (158).

### **E Vitamini**

E Vitamini,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokoferol ve  $\alpha$ -, $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokotrienol olarak adlandırılan bileşiklere verilen genel bir isimdir. Mitokondri ve mikrozoimler gibi membranca zengin hücre kısımlarında yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar. Bitkisel yağlar ve tohumlar zengin E vitamini kaynaklarıdır. Doğal olarak bulunan 8 adet tokoferolden  $\alpha$ -tokoferol, antioksidan olarak en aktif olanı ve doğada en yaygın olarak bulunanıdır.  $\alpha$ -Tokoferol,  $O_2^-$ ,  $OH^{\cdot}$ , singlet  $O_2$ , lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri temizler. Hidrofobik doğasından dolayı  $\alpha$ -Tokoferol yalnızca hücre membranlarının fosfolipid tabakasında ve plazma lipoproteinlerinde (LDL) yer alır. Tokoferoller hücre membranında eşit olarak dağılmazlar. Daha çok doymamış yağ asitlerinin yoğun olduğu kısımlarda bulunurlar ve böylece lipid peroksidasyonuna karşı yağ asitlerini korurlar.  $\alpha$ -Tokoferol, hücre membranlarının lipid peroksidasyonuna karşı korunmasında, membran akışkanlığının sağlanmasında ve membran enzimlerinin modülasyonunda önemli bir rol alır (159).

### **Diğer Non-enzimatik Antioksidanlar:**

#### **Karotenoidler**

A vitaminin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karoten, bitkilerde kloroplast membranının bir bileşenidir. Son derece güçlü singlet  $O_2$  temizleyicisi olup ayrıca  $OH^{\cdot}$ , peroksi ve alkoksi radikalleriyle doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyonunu önleyebilir. Singlet  $O_2$  uzaklaştırıcı olarak bilinen en etkili karotenoid likopendir (160).

#### **Melatonin**

$OH^{\cdot}$  radikalini ortadan kaldıran lipofilik özellikte çok güçlü bir antioksidandır (161).

#### **Ürik asid**

Ürik asid, singlet  $O_2$ , peroksil radikalleri,  $OH^{\cdot}$ , ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve in vivo antioksidan olarak kabul edilmektedir (162).

Yukarıda bahsedilen antioksidanlar haricinde deferoksamin, ubiquinol (koenzim Q), lipoik asid, metallotioneinler, melanin, albumin, sistein, bilirubin ve flavonoidlerin de antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır. Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları Çizelge 2.4'te görülmektedir.

Enzimatik	Nonenzimatik	
Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (KAT) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Fosfolipid hidroperoksit glutasyon Peroksidaz (PLGSH-Px) Glutasyon S-transferanz (GST) Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Glutasyon (GSH) A-Tokoferol (vit E) Askorbat (vit C) B-Karoten Flavonoidler Ürat Bilirubin	Albumin Seruloplazmin Transferin Ferritin Laktoferrin Melatonin Sistein

**Çizelge 2.4.** Biyolojik sistemlerdeki antioksidan savunma sistemi elemanları.

### 2.10.6. Oksidatif Stresin Sebep Olduğu Hastalıklar

Literatürde 200'den fazla hastalık veya bozukluğun başlamasında ve devamı boyunca ROT'nin rol aldığı gösterilmiştir. Birçok kanser tipi, kalp hastalıkları, endotelial disfonksiyon, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler bozukluklar, inflamasyon, yanıklar, sindirim kanalı hastalıkları, beynin dejeneratif bozuklukları-Parkinson ve Alzheimer hastalığı, diyabet, göz hastalıkları, iskemik ve post-iskemik patolojilerde ROT'nin öncü ya da aracı olarak önemli rolleri olabilir. Yaşlanma sürecinde mitokondriyel fonksiyonun bozulması sonucu ROT üretimi artar (163).

### 2.10.7. Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Roller

Düşük miktarlardaki ROT normal üreme fonksiyonunda önemli bir role sahiptir ancak yüksek miktarları fertilitiyi etkileyen patolojik koşullara neden olur.

#### 2.10.7.1. Dişi Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Roller

ROT, oosit olgunlaşması, fertilizasyon, embriyo gelişimi, gebelik ve doğumun başlaması gibi birçok olayda rol alır. ROT'nin pre-eklampsi, uterus içi büyüme geriliği, hidatiform mol, serbest-radikal indüklü doğum defekteri, düşükler, endometriyoz ve açıklanamayan infertilite olaylarında rol aldığı gösterilmiştir.

#### Reaktif Oksijen Türleri ve Ovaryum Folikülleri

ROT, folikülogenez, steroidogenez, folikül olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum fonksiyonlarında rol alır (164). İnsan ovaryumlarında Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD tespit edilmiştir (165). Foliküler sıvının mikroçevresi foliküler olgunlaşma ve granuloza hücre fonksiyonları için önemlidir. Foliküler sıvıdaki GSH-Px azalması ile düşük fertilizasyon oranları arasında önemli bir ilişki bulunmuştur (166). Sigara içmek de folikül sıvısındaki GSH-Px konsantrasyonlarını azaltmaktadır. Cu, Zn-SOD özellikle metafaz II oositlerinde kuvvetli eksprese olur. Mn-SOD ve GSH-Px transkriptleri germinal vezikül ve metafaz II safhasında eksprese edilir bu da bu enzimlerin oosit olgunlaşma markırları olabileceğini düşündürmüştür (167). Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD ekspresyonu insan ovaryumunda steroidogenez ile yakından ilişkilidir (168). ROT'ler oositte fazla üretilmeleri durumunda oosit gelişimini inhibe edebilir ve oositlerin dejenerasyonuna neden olabilirler (169).

### **Reaktif Oksijen Türleri ve Endometriyum**

Endometriyumda stromal hücreler normal metabolizmaları sonucu ROT üretirler. Bu ROT'lerin intraselüler kaynakları mitokondriyel elektron taşıma sistemi, endoplazmik retikulum, nükleer membran elektron taşıma sistemleri ve plazma membranlarıdır. Endometriyumda Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD vardır. SOD, bez epiteli hücreleri ve stromal hücrelerde yüksek derecede eksprese edilir bu da SOD'nin endometriyal fonksiyonun düzenlenmesinde rolü olduğunu düşündürür (170).

Gebelik gerçekleştiğinde P<sub>4</sub>, artan Cu, Zn-SOD ve Mn-SOD ekspresyonları ile birlikte endometriyal stromal hücrelerin desidualizasyonunu indükler. Cu, Zn-SOD sitosolde O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerini temizleyerek Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) üretimini baskılar böylece uterus hareketsiz kalır. Mn-SOD mitokondride üretilen O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikallerini temizleyerek stromal hücreleri OS'den korur. Ancak gebelik gerçekleşmezse ovarian steroid düzeylerinin azalması (P<sub>4</sub> düşüşü) stromal hücrelerde Cu, Zn-SOD ekspresyonunun azalmasını indükler bu da ROT aracılığıyla PGF<sub>2</sub>α üretimini stimüle eder. Stromal hücrelerce üretilen PGF<sub>2</sub>α kasılmaya yol açarak endometriyal dökülmeye, kanamaya neden olur (171).

### **Reaktif Oksijen Türleri ve Gebelik**

Gebelik boyunca fetal gelişim plasental ve maternal metabolizmadaki artış ile ilişkilidir bu da anneyi OS gelişimine hassas hale getirir. ROT artışı ve lipid peroksidasyonunda artış gerçekleşir. Plasenta, O<sub>2</sub>'yi maternal dolaşımdan alır ve maternal-fetal O<sub>2</sub> gradiyentinin ortasında yer alır. Bunun sonucunda özellikle O<sub>2</sub><sup>-</sup> olmak üzere ROT üretimi artar ve OS'nin gelişme olasılığı artar (172). Plasenta ayrıca NO, karbon monoksit (CO) ve ONOO<sup>-</sup> üretir, bunların plasental fonksiyon, trofoblast proliferasyonu-farklılaşması ve vasküler reaktivite üzerinde etkileri vardır. Ayrıca, Mn ve Cu, Zn-SOD, CAT, GSH, GPx, GST, tiyol/disülfid oksidoredüktaz ile C ve E vitaminlerini içeren temel antioksidan sistemleri plasentada mevcuttur (173).

### **Reaktif Oksijen Türleri ve Endometriyoz**

Yapılan çalışmalarda endometriyoz hastalarının periton boşluğunda makrofaj sayısı ve aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (174). Makrofajlar, artan ROT üretiminin kaynağı olabilir. Ayrıca endometriyozlu hastaların periton sıvısında lipid peroksidasyonunun arttığı rapor edilmiştir (175). Endometriyozlu hastaların periton sıvısında toplam antioksidan kapasitesinde herhangi bir farklılık bulunamamıştır (176). Endometriyozlu kadınlara ait peritonal makrofajlar ile endometriyal dokuda NO sentaz aktivitesi daha yüksektir (177). Endometriyozlu hastaların endometriyumunda SOD ekspresyonunun arttığı rapor edilmiştir (178).

### **Reaktif Oksijen Türleri ve Pre-eklampsi**

Yapılan son çalışmalar, oksidatif stresin pre-eklampsi etiyolojisinde rolü olabileceğini göstermektedir. Pre-eklampsi hastalarında antioksidanların azaldığı (179) ve lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir (180).



## **Reaktif Oksijen Türleri ve Açıklanamayan İnfertilite**

Açıklanamayan infertiliteye periton boşluğunda artan ROT üretimini neden olabilir. İnfertilite değerlendirmesi için laparoskopiyeye giren kadınlardaki ROT miktarı ovidukt ligasyonu için laparoskopiyeye giren kadınlarınkinden yüksek çıkmıştır (181). Polak ve arkadaşları açıklanamayan infertiliteye sahip kadınlardaki antioksidan konsantrasyonlarının fertil hastalara oranla daha az olduğunu göstermişlerdir (182). Ayrıca lipid peroksidasyon son ürünü olan malondialdehit konsantrasyonlarının açıklanamayan infertiliteye sahip kadınların periton sıvısında fertil kadınlara oranla daha fazla olduğu bulunmuştur.

### **2.10.7.2. Erkek Üreme Sisteminde Reaktif Oksijen Türleri ve Roller**

İnfertil erkeklerin %25-40'ının semen örneklerinde yüksek düzeyde ROT tespit edilmiştir (183). Spermatozoa OS-indüklü hasara hassastır çünkü plazma membranları bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerir ve sitoplazmaları düşük miktarda temizleyici enzim içerir (184). Oksidatif stresin sperm plazma membranına verdiği hasar, infertil hastaların çoğunda görülen bozuk sperm fonksiyonunun sorumlusu olabilir (185). Oksidatif stres yalnızca sperm plazma membranının akışkanlığını bozmakla kalmaz ayrıca nükleusta DNA bütünlüğüne de zarar verir (186). Son yıllara kadar ROT'nin insan spermatozoasına sadece zararlı olduğu düşünülmüştür. Ancak, ROT'nin az miktarlarının spermatozoanın fertilizasyon kapasitesi kazanabilmesi için gerekli olduğu anlaşılmıştır (187). Aitken et al. (188) düşük ROT düzeylerinin insan spermatozoasının zona pellusidaya bağlanma yeteneğini artırdığını göstermişlerdir. Spermatozoanın düşük konsantrasyonda  $H_2O_2$  ile inkübe edilmesi sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunu stimüle eder (189).  $H_2O_2$  dışındaki  $NO$  ve  $O_2^{\cdot-}$  gibi diğer ROT'ler de sperm kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunu stimüle eder (190). İnfertil erkeklerin seminal plazmalarındaki antioksidan düzeyleri kontrol grubundakilere oranla önemli ölçüde daha düşüktür (191). Ancak infertil erkeklerin semeninde tespit edilen patolojik düzeylerdeki ROT, seminal plazmanın azalan antioksidan kapasitesi nedeniyle değil artan ROT düzeyi nedeniyledir (192). Bazı durumlarda oksidanların sebep olduğu hasar tamir edilebilmesine karşın spermatozoa aşırı ROT'nin sebep olduğu hasarı tamir edemez çünkü tamiri yapabilecek sitoplazmik enzim sistemleri yoktur. Bu da spermatozoayı oksidatif hasara karşı hassas hale getirir (188). Ollero ve arkadaşları (193) ve Gil-Guzman ve arkadaşlarının (194) yaptıkları çalışmalara göre semendeki ROT üretim düzeyleri ile Dünya Sağlık Örgütü ve Kruger tarafından belirlenen sınıflandırmaya göre normal sperm yüzdesi arasında negatif bir ilişki vardır. Artan ROT düzeyleri sperm hareketliliğinde azalmaya neden olur (195). Sperm DNA'sını iki faktör OS'den korur: DNA'nın sıkı paketlenmesi ve seminal plazmada var olan antioksidanlar (196). Yüksek düzeydeki ROT infertil erkeklerin spermatozoasında sıklıkla görülen DNA fragmantasyonuna neden olur (197).

### **2.10.8. Peroksiredoksin (Prdx) Antioksidan Ailesi**

Peroksiredoksinler (Prdx), selenyum-bağımsız peroksidazlar süperailisine üyedirler, ilk defa mayada keşfedilmişler daha sonra birçok organizmada varlıkları gösterilmiştir. Tüm perokksiredoksinler, amino (N) terminal bölgelerinde korunmuş bir sistein (Cys) residüsü/bölgesi içerirler. Burası  $H_2O_2$ 'nin öncelikli oksidasyon

oluşturduğu bölgedir. Memeli hücreleri üç altgruba ayrılan altı peroksiredoksin izoformu eksprese ederler: 2-Cys (2 sistein), atipik 2-Cys (2 sistein) ve 1-Cys (1 sistein). 2-Cys alt grubunun üyeleri Prdx1, 2, 3 ve 4'tür ve C terminal uçlarında korunmuş ikinci bir sistein grubu içerirler. Ancak atipik 2-Cys üyesi olan Prdx5 ve 1-Cys üyesi olan Prdx6 korunmuş ikinci sistein grubuna sahip değildirler. Prdx izoformları hücre içinde farklı yerlerde yerleşim gösterirler: Prdx1 ve Prdx2 sitozole, Prdx3 mitokondriye, Prdx4 ekstraselüler boşluğa, Prdx5 mitokondri ve peroksizoma ve Prdx6 sitozole lokalizedir (198).

Peroksiredoksinler, antioksidan savunma ve alkil ve hidrojen peroksit redüktaz aktiviteleri aracılığıyla intraselüler sinyalde rolleri olan peroksidazlardır. Peroksit redüksiyonundan sonra oksidize Prdx'ler, tiyol içeren verici moleküllerden-Prdx1-Prdx5 için tiyoredoksin ve Prdx6 için GSH-elektron transferi aracılığıyla indirgenir (199). Siklofilin A da sitozolik Prdx'ler için potansiyel bir elektron verici olarak tanımlanmıştır (200).

#### **2.10.8.1. Peroksiredoksin 6 (Prdx6)**

Peroksiredoksin 6, 1-Cys peroksiredoksin olarak adlandırılmanın yanısıra LTW4, antioksidan protein 2, Clara hücresi proteini 26, aiPLA2 ve ORF6 olarak da adlandırılır (201).

*Prdx6*'yı kodlayan fare geni beş ekzon ve dört introndan oluşur. Birçok psödo (yalancı) gen tanımlanmıştır ancak bunlar proteine transle olmazlar. PRDX6 proteini 224 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı 25.1 kDa'dur. Hem GSH peroksidaz hem de  $Ca^{+2}$ -bağımsız fosfolipaz A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) aktivitelerine sahip iki fonksiyonlu bir proteindir (202).

PRDX6, genellikle peroksidize fosfolipidlerin indirgenmesi aracılığıyla hasarlı hücre membranlarının tamirini kolaylaştırarak antioksidan savunmada fonksiyon görür. PRDX6, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, yağ asitleri, hidroperoksitler ve fosfolipid hidroperoksitleri indirgemek için GSH'yi elektron verici olarak kullanır. PRDX6'nın ayrıca peroksinitrit ve fosfolipid hidroperoksit redüktaz aktiviteleri gösterdiği rapor edilmiştir. Asidik  $Ca^{+2}$ -bağımsız fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivitesine sahip tek PRDX'tir. Bu aktivite akciğerlerde çalışılmış ve sürfektan fosfolipidinin turnoverı ile ilişkilendirilmiştir (203).

PRDX6 yapısının homolojisi açısından bir peroksiredoksin olmasına rağmen enzim özellikleri PRDX6'yı bu süperailenin diğer üyelerinden ayırır (Çizelge 2.5). 2-Cys enzimler ya internal olarak (PRDX5) ya da homodimerizasyon aracılığıyla (PRDX1-4) disülfid bağları kurarken Prdx6,  $\pi$ GST (glutatyon S-transferaz  $\pi$ ) aracılığıyla GSH ile disülfid oluşturur. PRDX1-5, indirgeyici olarak tiyoredoksin kullanmalarına rağmen PRDX6 GSH kullanır. PRDX6 fosfolipid hidroperoksitleri indirgeyebilmesine karşın bu özellik diğer peroksiredoksinler için gösterilememiştir. PRDX6 ayrıca PLA<sub>2</sub> aktivitesine sahiptir, bu aktivite ile ilişkili sekans diğer peroksiredoksinlerde bulunmamaktadır.

*Prdx6* mRNA ve proteini birçok memeli organında saptanmıştır, en yüksek ekspresyon ise akciğerlerde bulunmuştur (201). Akciğerin subselüler/hücre altı düzeyde fraksiyonlanması sonucunda PRDX6 sitozolik ve lizozomal fraksiyonlarda, sürfektanın depolandığı lamellar yapılarda ve lavaj ile elde edilen ekstraselüler sıvıda saptanmıştır.

Manevich ve arkadaşları optimum pH koşullarına dayanarak sitozolik proteinin peroksidaz aktiviteden, lizozomal/lamellar yapılarıdaki proteinin ise PLA<sub>2</sub> aktivitesinden sorumlu olduğu yorumunu yapmışlardır (201).

*Prdx6* genindeki ekzon 1 ve 2 (204) ya da ekzon 3 (205)'ün hedeflenmesiyle *Prdx6* geni çıkarılmış iki farklı fare modeli üretilmiştir. Her iki fare türünün de gelişimi ve üremeleri normaldir. Ancak her iki tür de OS'ye artan bir hassasiyet gösterirler.

*Prdx6*'yı overeksprese eden hücreler OS'ye karşı korunur. Antisense uygulaması ile *Prdx6*'nın ortadan kaldırılması ise OS ve apoptoza neden olur. Farelerde *Prdx6*'nın adenovirus aracılığıyla akciğerlerde overekspresyonu hiperoksinin neden olduğu toksisiteye karşı korur. *Prdx6*'yı overeksprese eden fareler VT farelere göre daha az lipid peroksidasyonu, daha az protein oksidasyonu, daha az akciğer ödemi ve daha az akciğer inflamasyonu gösterirler (206).

Leyens ve arkadaşları yaptıkları çalışmada peroksiredoksinlerin oosit ve erken dönem embriyolarda ekspresyonlarını RT-PCR tekniği ile incelemişlerdir. Peroksiredoksin 6, matürasyon öncesi ve sonrası oositlerde, 2 hücreli ve 8 hücreli embriyo aşamalarında tespit edilmiş ancak morula evresinde tespit edilememiştir. Blastosist aşamasında ise *Prdx6* tekrar eksprese edilmeye başlamıştır (207). Leyens ve arkadaşları yaptıkları bir diğer çalışmada ise PRDX6'nın matürasyon sonrası hem oosit hem de kumulus hücrelerinde upregüle olduğunu bulmuşlardır (208).

Peroksiredoksinlerin özellikleri

	Prdx6	Prdx1-5
Aktif bölge	1-Cys	2-Cys
İndirgeyici	GSH	Tiyoredoksin
Substrat olarak H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> kullanımı	+	+
Substrat olarak PLOOH kullanımı	+	?
PLA <sub>2</sub> aktivitesi	+	-

PLOOH: fosfolipit hidroperoksit

**Çizelge 2.5.** Peroksiredoksinlerin özelliklerini gösteren çizelge (201).

### **Peroksiredoksin 6'nın Hastalıklardaki Rolü**

Prdx6 protein ya da mRNA'sının bazı hastalıklarda miktarının azaldığı ya da arttığı belirlenmiştir. Örneğin, deneysel aterosklerozaya yatkın farelerde Prdx6 mRNA ve proteininin azaldığı, mutant SOD eksprese eden farelerin spinal kordunda, Parkinson hastalarının beyinlerinde, Creutzfeldt–Jacob ve Pick hastalığında, malignan mezotelyomada, skuamöz kanserde, iyileşen deri yaralarında, deneysel hücresel prematür yaşlılıkta ve metastaz yapan meme kanseri hücrelerinde artış gösterdiği gösterilmiştir (201).

Ayrıca, Prdx6 nötrofil NADPH oksidaz aktivasyonunda rol alabilir, eritrosit hemolizatlarında metemoglobin oluşumunu önler. Ve bitkilerde tohum çimlenmesinde rolü olduğu gösterilmiştir (201).

## 2.11. Hipotez

C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli *Fkbp52* geni çıkarılmış (*Fkbp52*<sup>-/-</sup>) farelerde ovulasyon ve fertilizasyon başarılı bir şekilde gerçekleşir ancak implantasyon gerçekleşmez. Bu farelere dışarıdan P<sub>4</sub> verildiğinde CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyonun gerçekleşirken C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşmez.

CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde P<sub>4</sub>'ün azalan PR yanıtının üstesinden nasıl gelerek implantasyona izin verdiği bilinmemektedir. FKBP52, PR'yi P<sub>4</sub>'e bağlanması için optimal konfigürasyonda tuttuğu için ortamda bulunan fazla miktardaki P<sub>4</sub>, FKBP52 eksikliğinde P<sub>4</sub>'ün PR kompleksine bağlanma olasılığını artırıyor olabilir. Diğer bir olasılık ise FKBP52'nin PR sinyal yolağındaki fonksiyonundan başka bir görevi olmasıdır. Çünkü, dışarıdan sağlanan P<sub>4</sub> desteği C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyonu kurtaramamıştır ve CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde gebeliğin terme ulaşabilmesi için daha fazla P<sub>4</sub> düzeylerine gereksinim duyulmaktadır. Ayrıca daha önce yapılan bir çalışmada plasentada *Fkbp52*'nin eksprese edildiği buna karşın *Pgr*'nin eksprese edilmediği gösterilmiştir. Bu da FKBP52'nin PR aktivitesini optimize etmekten başka bir fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir.

Hipotezimiz; FKBP52'nin PR sinyal yolağındaki koşaperon fonksiyonundan bağımsız başka bir rolü vardır. Bunu belirleyebilmek için *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterusunda Vahşi tip ve *Pgr*<sup>-/-</sup> farelerin uterusundan farklı olarak eksprese edilen proteinleri proteomiks analiziyle belirlemeyi ve elde edeceğimiz sonuçlara göre FKBP52'nin koşaperon fonksiyonundan bağımsız rollerini araştırmayı amaçladık.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda kullanılan C57BL/6/129 ve CD1 genetik zeminli *Fkbp52*-/- (*Fkbp52* geni çıkarılmış) fareler ile C57BL/6/129 *Pgr*-/- (progesteron geni çıkarılmış) fareler sırasıyla David Smith (Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA) ve Bert O'Malley (Baylor College of Medicine, Houston, Teksas, USA) tarafından temin edildi. Çalışmamızda kullanılan tüm protokoller Cincinnati Çocuk Hastahanesi Araştırma Vakfı Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi (Children's Research Foundation Institutional Animal Care and Use Committee) tarafından onaylandı. Kontrol amaçlı kullanılan vahşi tip (VT) fareler ise orjinal olarak The Jackson Laboratory (Maine, USA)' den satın alındı.

C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52* heterozigot KO (+/-) erkek fareler ile CD1 genetik zeminli VT dişi farelerin çiftleştirilmesi sonucu oluşan CD1 genetik zeminli heterozigot dişi ve erkekler fareler kendi aralarında on nesil boyunca çiftleştirildi ve sonuçta CD1 genetik zeminli *Fkbp52* KO fareler elde edildi. Hem C57BL6/129 hem de CD1 genetik zeminli *Fkbp52* KO erkekler infertil oldukları için deneylerde VT erkek fareler kullanıldı.

### 3.1. Proteomiks Metodu

#### 3.1.1. 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi

C57BL6/129 genetik zeminli vahşi tip (VT), *Fkbp52*-/- ve *Pgr*-/- fareler overektomize edildi yani ovaryumları çıkarıldı, iki hafta boyunca dinlenmelerine izin verildi, sonrasında iki gün boyunca subkutan olarak P<sub>4</sub> (2 mg/0.1ml) enjekte edildi. Overektomi işlemi endojen kaynaklı P<sub>4</sub>'ü baskılama amacıyla yapıldı. Ekzojen olarak uygulanan P<sub>4</sub> ile tüm gruplardaki P<sub>4</sub> miktarının eşit olması sağlandı. İkinci P<sub>4</sub> enjeksiyonundan 24 saat sonra fareler sakrifiye edildi, uterusları toplandı. Ardından 2 Boyutlu Jel Elektroforezi (2-BAJE) (2D-DIGE, 2 Dimensional Difference Gel Electrophoresis) ve protein tanımlanması yapıldı. Deneyler Vanderbilt Üniversitesi Kütle Spektrometresi Araştırma Laboratuvarı'nın Proteomiks Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

VT ve *Pgr*-/- farelere ait üçer, *Fkbp52*-/- farelere ait dört adet uterus örneğinden 3.5.3.1. Doku Homojenizasyonu ve Protein Elde Edilmesi Bölümü'nde anlatıldığı gibi protein izolasyonu yapıldı ve konsantrasyonları ölçüldü. VT, *Pgr*-/- ve *Fkbp52*-/- gruplarına ait örnekler ayrı ayrı Cy3 ya da Cy5 florları (GE Healthcare) ile işaretlendi. Farklı gruplara ait örneklerin az miktarlarının karışımıyla internal kontrol oluşturuldu ve Cy2 ile işaretlendi.

Örneklerin hacmi rehidrasyon tamponu (7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyo]-2-hidroksi-1-propansülfonat; 2 mg/ml ditiyotritol (DTT), %0.5 immobilize pH gradiyent (IPG) tamponu 4-7, iz miktarda bromfenol

mavisi (BPB) ile 450 µl'ye getirildi ve 24 cm.lik pH 4-7 IGP striplerine (Amersham Biosciences) oda ısısında karanlıkta 28 saat boyunca rehidrate edildi. Birinci boyut izoelektrik fokuslama 91 kVh'da gerçekleştirildi daha sonra ikinci boyut %12 SDS-PAGE sırasıyla IPGphor ve Ettan DALT 12 birim (GE Healthcare) kullanılarak gerçekleştirildi. İzoelektrik olarak fokuslanmış örnekler DTT ve iyodoasetamid ile redüklendi, alkilendi ve üretici firmanın protokolüne göre ikinci boyut-yükleme tamponuna (gliserol, SDS, üre, iz miktarda BPB) dengelendi. İkinci boyut SDS-PAGE jelleri düşük floresan cam tabaklar ile prefabrik şekilde oluşturuldu, polimerize jelin sadece bir cam tabağa bağlanmasını sağlamak için bir cam tabak presilanize edildi.

Her jelin Cy2, Cy3 ve Cy5 bileşenleri, kendilerine özgü ekzitasyon/emisyon dalga boyları olan Cy2 için 488/520 nm, Cy3 için 532/580 nm ve Cy5 için 633/670 nm olacak şekilde Typhoon 9410 Variable Mode Imager kullanılarak (GE Healthcare) görüntülendi. Cy-boya bileşenleri görüntüledikten sonra silanize edilmeyen cam tabaka çıkarıldı, jeller %50 metanol, %7 asetik asit içinde 2 saat boyunca fikse edildi ve sonra Sypro Ruby içinde gece boyu karanlıkta inkübe edildi. Sypro Ruby görüntüleri aynı görüntüleyicide 457/610 nm dalga boyu kullanılarak elde edildi. Her jelde ikişer örnek (VT ve *Pgr*-/-; VT ve *Fkbp52*-/-; *Pgr*-/- ve *Fkbp52*-/-) ve internal kontrol olarak kullanılan Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) yer aldı.

### 3.1.2. 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi Analizi

Jellerin incelenmesi sonucu 1000'den fazla protein formu karşılaştırıldı. Yaklaşık 40 tanesi ekspresyon ve/ya post-translasyonel modifikasyonda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermesi nedeniyle ( $0.05 > p > 0.000005$ ) (1.5 kat-10 kat) protein tanımlanması için seçildi. On örnek arasındaki protein miktarlarındaki değişiklikleri karşılaştırmak için DeCyder versiyon 6.5 yazılımı (Amersham Biosciences) kullanıldı.

### 3.1.3. Kütle Spektrometresi İle Protein Tanımlanması

İlgilenilen proteinler robotik olarak çıkarılıp Ettan Spot Handling Workstation (GE Healthcare) kullanılarak kütle spektrometresi analizi için işleminden geçirildi. Kısaca, jel çıkarıldı, 96 kuyucuklu kaptaki 50 mM amonyum bikarbonat ile dengelendi ve asetonitril ile dehidrate edildi. Dehidrate jeldeki proteinler, 20 mM amonyum bikarbonat içinde hazırlanan 10 µl proteaz (Promega Corp., Madison, WI) ile 37°C'de 3 saat boyunca sindirildi ve ortaya çıkan proteolitik peptitler %60 asetonitril-%0.1 trifloroasetik asit ile ekstrakte edilip kurutuldu. Peptitler, %60 asetonitril-%0.1 trifloroasetik asitin 5 µl'sinde yeniden yapılandırıldı. Bu karışımın 0.5 µl'si MALDI hedefine uygulandı ve hedef üzerinde 0.5 µl α-siyano 4-hidroksisinnamik asit matriksi (1 mg/ml amonyum sitrat eklenmiş, 5 mg/ml % 60 asetonitril-%0.1 trifloroasetik asit) ile karıştırıldı. Proteinler Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry/Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ve TOF/TOF ikili MS ile Voyager 4700 (Applied Biosystems)' de tanımlandı. Daha sonra ortaya çıkan peptit kütle haritaları ve fragmantasyon spektrası ile Swiss-Prot veritabanı kullanılarak aday proteinler tanımlandı. Araştırmalar protein moleküler ağırlığı ya da izoelektrik noktasını sınırlamadan gerçekleştirildi ve sisteinin karbamidometilasyonu, metionin residülerinin kısmi oksidasyonu ve bir kayıp tripsinin ayrılmasına izin verildi.

### 3.2. *Fkbp52* Heterozigot Farelerin Çiftleştirilmesiyle Üreme Kafeslerinin Oluşturulması

En az 6 haftalık CD1 genetik zeminli bir adet *Fkbp52* heterozigot (*Fkbp52 +/-*) dişi fare ile *Fkbp52* heterozigot (*Fkbp52 +/-*) erkek fare bir araya konarak üreme kafesleri oluşturuldu. Üreme kafeslerindeki dişiler kopulasyondan yaklaşık 20 gün sonra yavruladılar. Yavrular en az 21 en fazla 28 günlük olana kadar üreme kafeslerinde bırakılarak anneleri tarafından emzirilmelerine izin verildi.

#### 3.2.1. Üreme Kafeslerinden Elde Edilen Yavru Farelerde *Fkbp52* Genotiplendirmesi

Üreme kafeslerindeki CD1 genetik zeminli *Fkbp52* heterozigot anne ve babaların çiftleştirilmeleri sonucu doğan yavruların genotiplendirilmeleri sırasında yavruları birbirinden ayırtabilmek amacıyla kulaklarına üzeri numaralı metal etiketler (National Band and Tag Co., Kentucky, USA) takıldı. Yavru farelerin kuyruklarının ucundan ~0.5 cm kesildi ve içerisinde final konsantrasyonu 0.2-0.4 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (Proteinase K, Genomic PCR Grade, cat#501-PK) içeren 200 µl liziz solüsyonu (Lysis reagent for genotyping lysing crude lysates, Direct PCR, cat#102-T) içeren 1.5 ml'lik tüplere kondu. Tüpler 55°C' lik su banyosunda gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün tüpler 85°C'de 1-1.5 saat inkübe edildi. Böylece kuyruklardan DNA ekstrakte edilmiş oldu. Elde edilen DNA örneklerinde *Fkbp52* geni için vahşi tip ya da mutant alellerden hangisinin olduğunu belirlemek için polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction/PCR) yapıldı. PCR karışımı şu şekilde hazırlandı:

Distile su (dH<sub>2</sub>O): 18.5 µl  
10X PCR tamponu (Mg<sup>+2</sup> içeren): 2.5 µl  
10mM dNTP karışımı: 2 µl  
10 µm primer karışımı: 1 µl  
Enzim (Taq polimeraz): 0.1 µl

#### Primerler

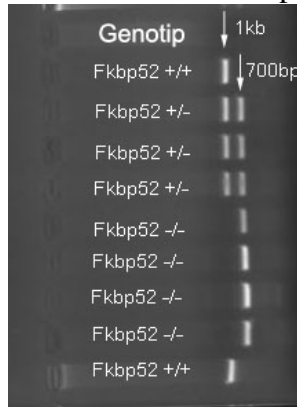
ex2F: 5'-AGAGAGGGTACAGGC-3'  
ex3R: 5'-TACAAGTGTGGCGTTGGG-3'  
ex10R: 5'-ATGCAACAGCGGTGTACCC-3'  
neoF2: 5'-TCTATCGCCTTCTTGACG-3'

Her bir örnek için PCR tüpüne bu karışımdan 24 µl konarak üzerine 1 µl DNA örneği eklendi. PCR makinesinde aşağıdaki şekilde programlanmış sikluslar ile DNA örnekleri çoğaltıldı.

95°C'de 5 dakika  
95 °C'de 30 saniye  
55 °C'de 30 saniye  
68 °C'de 2.5 saniye  
68 °C'de 10 dakika  
4 °C'de ∞

40 siklus

PCR sonrası amplifiye fragmanlar agaroz jelde yürütüldüler. 0.45 gr agaroz jel (Bio-Rad, cat#162-0102) 30 ml 1X Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponu içinde çözünerek (%1.5'lik jel) mikrodalga fırında kaynatıldı. İçine 2 µl etidyum bromid eklenerek (10mg/ml, Invitrogen, cat#15585-011) PCR tankına döküldü, kuyucuk oluşması için taraklar yerleştirildi ve jelin donması için 20 dakika beklendi. Süre bitiminde taraklar çıkarılarak PCR tankı 1X TAE ile dolduruldu. İlk kuyucuğa 5 µl DNA markırı yüklendi. 25 µl örnek içeren PCR tüplerine 5 µl 6X agaroz jel yükleme boyası eklendikten sonra karışımlardan 5'er µl alınarak kuyucuklara yüklendi. 120 voltta 15-20 dakika boyunca elektroforez gerçekleştirildi. Elektroforez bitiminde jel Ultra Viyole (UV) ışık altında görüntüldü. Vahşi tip alel 1 kilobaz (kb), mutant alel ise 700 baz çifti (base pair/bp) idi, heterozigot farelerde ise hem 1 kb'lık hem de 700 bp'lik aleller vardı (Şekil 3.1).



**Şekil 3.1.** Genotiplendirme sonucu vahşi tip farelerde 1kb'lık alel, *Fkbp52*-/- farelerde 700 bp'lik alel, *Fkbp52*+/- farelerde ise hem 1kb'lık hem de 700 bp'lik alel görülmektedir.

## Kullanılan Solüsyonlar

### 50 X Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu

242 gr Tris 750 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözülür. 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) eklendikten sonra 57.1 ml glasiyel asetik eklenir ve son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlanır.

### 6X agaroz jel yükleme boyası

Gliserol	3 ml
Bromfenol mavisi	25 mg
Ksilen siyanol	25 mg
dH <sub>2</sub> O	7 ml

### 3.3. Farelerde Çiftleştirme Deneyleri

Gebeliğin farklı günlerindeki dişilere ait uterus ve implantasyon bölgelerini elde edebilmek amacıyla fareler poligami yöntemiyle çiftleştirildi. Bunun için, kendine ait kafeste yaşayan CD1 genetik zeminli VT erkek farenin yanına akşam üzeri CD1 genetik zeminli VT ya da *Fkbp52*-/- 2-3 diş fare; C57BL6/129 genetik zeminli VT erkek farenin yanına akşam üzeri C57BL6/129 genetik zeminli VT ya da *Fkbp52*-/- 2-3 diş konuldu, ertesi sabah diş farelere vajinal plak kontrolü yapıldı. Vajinal plak görülen dişiler



gebeliğin 1. gününde kabul edildi ve bu dişiler ayrı kafeslere konuldu. *Fkbp52*-/- dişî farelerin bir kısmına gebeliğin 2. gününden itibaren sakrifiye edilecekleri güne kadar P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml) enjeksiyonu yapılırken bir kısmına ise kontrol amaçlı P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapılmadı.

C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*-/- dişî farelerin aynı genetik zeminli vazektomize VT erkek fareler ile çiftleştirilmesi sonucu yalancı gebe fareler elde edildi.

### **3.4. Doku Toplanması ve Hazırlanması**

Gebeliklerinin 1, 4, 5, 8 ve 12. günlerinde bulunan VT ve *Fkbp52*-/- fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edilerek uterus ve implantasyon bölgeleri toplandı. Gebeliğin 1 ve 4. gününde olduğu varsayılan farelerin gebe olduklarını kesinleştirmek için farelere servikal dislokasyon yapıldıktan sonra oviduktlar uzaklaştırılarak uterus boynuzları çıkarıldı. Boynuzlardan bir tanesi blastosist olup olmadığını belirlemek için fosfat tamponlu tuz solüsyonu (phosphate buffered saline/ fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Bu amaçla petri içinde bulunan uterusun ovidukt-uterus bağlantısından içinde PBS bulunan enjektör iğnesi sokularak uterus boynuzu PBS ile yıkandı. Yıkama sonucu elde edilen sıvı mikroskop altında incelendi. Blastosist görülen dişilerin gebe oldukları doğrulanarak yıkama yapılmayan diğeri uterusları alınırken blastosist görülmeyen dişiler deneye dahil edilmedi. Gebeliğin 5. günündeki dişî farelerin gebeliklerini kesinleştirmek için fareler eter ile bayıldıktan sonra kuyruk veni aracılığıyla Chicago mavisi boyası enjekte edildi, 4 dakika sonra fareler sakrifiye edilerek uterusları incelendi. Uterusta mavi boncuklar şeklinde implantasyon bölgelerinin görüldüğü farelerin gebe olduğu kabul edildi ve implantasyon bölgeleri toplandı, implantasyon bölgelerinin görülmediği dişilerden uterus alınmadı. Gebeliğin 8 ve 12. günlerine ait implantasyon bölgeleri çıplak gözle görülebildiği için bu günlerdeki gebelikler görsel olarak doğrulandı.

#### **3.4.1. Parafine Gömme İşlemi İçin Doku Takibi**

Gebeliğin 1 ve 4. günlerine ait uterus dokuları küçük parçalar halinde kesilerek, 5, 8 ve 12. günlerde ise implantasyon bölgeleri çıkarılarak %10'luk neutral buffered fixative/nötral tamponlu fiksative (NBF) [%40 formaldehit 100 ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 gr Sigma-Aldrich P5379, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 gr (Sigma-Aldrich S9763), ddH<sub>2</sub>O/bidistile su 900 ml] alındı. Gebeliğin 1, 4, 5 ve 8. günlerinde toplanan dokular 24 saat süreyle, 12. günde toplanan dokular ise 24-48 saat süreyle fikse edildi. Fiksasyonu takiben dokular birkaç saat süreyle %30, 50 ve 70 lik etanol serilerinde tutuldu. Daha sonra parafin gömme makinesine (Leica, EG1160, Germany) konulan dokular makinede aşağıda belirtilen kimyasallarda belirtilen sürelerde tutulduktan sonra parafine gömüldü.

- %70 etanol-20 dakika
- %80 etanol-45 dakika
- %90 etanol-45 dakika
- %95 etanol-45 dakika
- %100 etanol-45 dakika
- %100 etanol-1 saat
- %100 etanol-1 saat

Ksilen-1 saat  
Ksilen-1 saat  
Ksilen-parafin-1 saat  
Sıcak parafin-1.5 saat  
Sıcak parafin-1.5 saat

### 3.4.2. Hızlı Dondurma Yöntemi İle Doku Toplanması

Gebeliklerinin 1, 4, 5, 8, ve 12. günlerinde bulunan VT ve *Fkbp52*-/- farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinin bir kısmı rutin parafin takip için %10'luk NBF içine alınırken bir kısmı ise Western Blot, İn Situ Hibridizasyon, Northern Blot, 8-izoprostan assay ve RT-PCR metotları için dondurma medyumunu (Fisher Health Care, cat#23-022524) içerisinde hızla dondurularak -80 °C'lik dondurucuya kaldırıldı.

### 3.4.3. Elektron Mikroskopik İncelemeler İçin Doku Takibi

Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*-/- fareler ile gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*-/- farelerin sakrifikasyonu sonucu elde edilen uterus boynuzlarından biri PBS ile yıkanarak blastosist olup olmadığı kontrol edildi. Blastosist gözlenmeyen fareler deneye dahil edilmezken blastosist gözlenen uterusun yıkanmayan diğer boynuzu küçük parçalara bölünerek glutaraldehit fiksatifine alındı. Örnekler 0.1 M Sörensen fosfat tamponunda hazırlanan %4'lük glutaraldehit içinde +4°C de 1 saat boyunca fikse edildi. 1 saat sonra daha küçük parçalara trimlendi ve 1 saat daha fiksatifte tutuldu. 0.1 M Sörensen fosfat tamponuna alınan örnekler 20 gün boyunca bu tamponda bekletildi. Sonrasında %1'lik ozmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) fiksatifini ile 2 saat muamele edildi. 0.1 M Sörensen fosfat tamponu ile 3 defa 10 dakika oda ısısında yıkandı. +4°C'de bulunan %30, %50 ve %70'lik alkol serilerinden 3 kere onar dakika geçirilerek dehidrate edildi. %75'lik etanol ile hazırlanmış %1'lik uranilasetat solüsyonunda +4°C'de 1 saat tutuldu. Daha sonra sırasıyla %80, %90, %96 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı. Dehidratasyondan sonra, önce propilen oksitte 2 kere onar dakika, ardından Araldit-Propilen Oksit karışımında (1:1) oda ısısında 1 gece bırakıldı. Ertesi gün 4 saat boyunca I. Araldit içerisinde rotatorda döndürülen dokular I. Araldit içine gömüldü. Gömmenin yapıldığı kapsüller rezinin polimerizasyonu için 60°C'de 48 saat bırakıldı. 48 saat sonunda elde edilen bloklardan ultramikrotomda kalın kesitler alınıp toluidin mavisi ile boyandı. Kalın kesitlerde lümen epiteli ile altındaki stromayı içeren bölge belirlendikten sonra ince kesitler alındı. Alınan ince kesitlere kontrastlama yapıldıktan sonra Zeiss Leo-906E transmisyon elektron mikroskopunda değerlendirildi.

### Kullanılan Solüsyonlar

**%4'lük glutaraldehit**  
16 ml %25'lik glutaraldehit  
84 ml 0.1 M Sörensen Fosfat Tamponu

## **0.2 M Sörensön Fosfat Tamponu**

### **Solüsyön A**

35.8 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O

500 ml ddH<sub>2</sub>O

### **Solüsyön B**

13.6 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

500 ml ddH<sub>2</sub>O

Solüsyön A ile B eşit miktarda karıştırılır ve pH 7.3'e ayarlanır.

### **%1'lik Ozmiyum Tetroksit**

0.1 gr ozmiyum teroksit

10 ml 0.1 M Sörensön Fosfat Tamponu

### **%1'lik Uranil Asetat**

100 ml %75'lik etanol

1 gr uranil asetat

### **Araldit Ana Karışımı**

91 ml araldit

84 ml DDSA

### **Araldit-Propilen Oksit Karışımı**

Propilen oksit+I. Araldit (1:1)

### **I. Araldit**

50 ml Araldit ana karışımı

1 ml BDMA

## **3.5. İn Vitro Deneyler**

### **3.5.1. İmmünohistokimya Yöntemi**

2-BAJE ve ardından uyguladığımız protein analizi ile *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda azaldığını gösterdiğimiz PRDX6'nın ekspresyonunu belirlemek için immünohistokimya yöntemini kullandık. Bunun için 2-BAJE için kullanılan fare modelleri ve deney dizaynı tekrar oluşturuldu. C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve *Pgr*<sup>-/-</sup> fareler ovariectomize edildi, 2 hafta sonra 2 gün boyunca 2mg/0.1ml P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapıldıktan sonra sakrifiye edilerek uterusları toplandı, parafin takibi yapıldı. İmmünohistokimya (İHK) yöntemi ayrıca gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda PRDX6 proteininin ekspresyonunu göstermek için uygulandı.

İHK şu şekilde gerçekleştirildi: uterus ve implantasyon bölgelerine ait parafin bloklardan pozitif yükle yüklenmiş süperfrost lamalar üzerine 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler oda ısısında kurutuldu ve İHK öncesi 60°C'lik etüvde 1 saat tutuldu. Kesitler iki defa 5'er dakika ksilolde tutularak deparafinize olmaları sağlandı. Daha

sonra üçer dakika azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirilerek rehidrate edildi ve 5 dakika boyunca çeşme suyu içinde tutuldu. Daha sonra taze hazırlanan sitrik asit (pH 6) solüsyonuna konulan kesitler 2 defa 5'er dakika sitrik asit içerisinde kaynatılarak antijenik epitoplara açığa çıkması sağlandı. Sitrik asitin yaklaşık 30 dakika soğuması beklendikten sonra fosfat tamponlu tuz solüsyonu (phosphate buffered saline/PBS) ile üç kere beş dakika oda ısısında yıkandı. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için kesitler %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonu içinde oda ısısında 10 dakika tutuldu. Üç kere beş dakika PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı damlatılacak antikörlerin birbirine karışmaması amacıyla hidrofobik kalem (Super PAP Pen, IM 3580; Beckman Coulter) ile çizildi. Kesitler Tris tamponlu tuz solüsyonu (Tris buffered saline/TBS) içinde hazırlanan kazein (Sigma Aldrich, cat#C3400) solüsyonu içinde 1 saat boyunca inkübe edilerek özgül olmayan bağlanmalar engellemiş oldu. Süre bitiminde kesitlerin üzerine bloklama solüsyonu (kazein) içerisinde 1:200 dilüsyonda hazırlanan PRDX6 primer antikoru (tavşan poliklonal LF-PA0011; Ab Frontier) eklendi ve gece boyu +4°C'de nemli ortamda inkübe edildi. Negatif kontrol olarak normal tavşan serumu (S-5000; Vector Laboratories) 1:200 dilüsyonlu PRDX6 antikoruyla aynı konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Kesitler ertesi sabah 3 defa beşer dakikalık TBS-T ile yıkama işlemi takiben TBS-T içerisinde hazırlanan 1:500 dilüsyonlu primer antikora özgül biyotin ile işaretlenmiş sekonder antikor (eşek anti-tavşan; Jackson Immunoresearch, cat#711-065-152) ile oda ısısında 20 dakika boyunca inkübe edildi. Üç defa beş dakika TBS-T ile yıkanan kesitlere peroksidaz konjüge streptavidin (Jackson Immunoresearch, cat#016-030-084) damlatıldı ve 20 dakika oda ısısında inkübe edildi. TBS-T ile 3 defa beş dakika yıkamayı takiben kesitlere Diamino benidzin (DAB) (Zymed, cat#00-2014) ya da 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Invitrogen, #cat00-2007) solüsyonu damlatıldı ve mikroskop altında antijen-antikor kompleksleri kahverengi veya kırmızı reaksiyon verene kadar beklendi. Kesitler suya alınarak reaksiyon sonlandırıldı. Sonrasında Mayer'in hematoksileni (Dako, cat#S3309) ile boyanan kesitler çeşme suyunda yıkandı, ikişer defa %30-50-70-85-95-100'lük alkol ve ksilollerden geçirildi, kapatma solüsyonu (Permount Histological Mounting Medium, Fisher Scientific, cat#SP15-500) ile kapatıldı. Ortaya çıkan kromojenik reaksiyon ışık mikroskobu altında incelenerek değerlendirildi (Zeiss Axioplan), fotoğraf çekildi.

## **Kullanılan Solüsyonlar**

### **1X PBS Solüsyonu**

8 gr NaCl

0.2 gr KCl

1.44 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0.24 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

800 ml dH<sub>2</sub>O içinde çözüldükten sonra final hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlanıp pH 7.4'e ayarlanır.

### **Sitrik Asit Solüsyonu**

2.1 gr sitrik asit (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 900 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldükten sonra 2N NaOH ile pH'sı 6'ya ayarlanır.

### **%3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Solüsyonu**

63 ml metanol içerisine 7 ml %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilave edilir.

### **10X TBS Solüsyonu**

24.2 gr Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

80 gr NaCl

dH<sub>2</sub>O ile son hacim 1 lt'ye tamamlanır, pH HCl ile 7.6'ya ayarlanır. 1X yapmak için dH<sub>2</sub>O ile dilüye edilir.

### **TBS-T Solüsyonu**

1 lt 1X TBS

1 ml Tween-20

## **3.5.2. İmmünofloresan Yöntemi**

Gebeliğin 1, 4, 5, 8 ve 12. günlerinde bulunan CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde PRDX6 proteininin ekspresyonunu göstermek amacıyla immünofloresan (İF) yöntemini kullandık. Lam üzerine alınan kesitler immünohistokimya yönteminde olduğu gibi ksilol, azalan alkol serileri ve su aşamalarından geçirildi. Sonrasında 2 defa 5'er dakika sitrik asit içerisinde kaynatıldı. Kaynatılan kesitler oda ısısında yaklaşık 30 dakika soğutulduktan sonra 3 kere 5'er dakika PBS içinde yıkandı ve etrafları hidrofobik kalem ile çizildi. Kesitler 7 dakika boyunca bloklama solüsyonuna-Ultra V Block (LabVision, TA-125-UB) maruz bırakıldı. Ardından antibadi dilüye edici solüsyon (LabVision TA-125-UD) içerisinde 1:200 dilüsyonda hazırlanan PRDX6 (Tavşan poliklonal LF-PA0011; Ab Frontier) antikoru kesitlerin üzerinde damlatıldı ve gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi sabah kesitler PBS ile 3 kere 5 dakika yıkandıktan sonra PBS içerisinde 1:400 dilüsyonda hazırlanan floresan izotiyosiyanat (Fluorescein isothiocyanate/FITC) ile işaretli anti-tavşan (A-1000; Invitrogen) antikoru damlatıldı, 1 saat oda ısısında karanlıkta inkübe edildi. PBS ile yıkama aşamasından sonra kesitler oda ısısında 1 dakika 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma, cat#D8417) ile inkübe edildi. Kesitlerin üstü floresan ışımının solmasını engelleyen kapatma solüsyonu (Vectashield Mounting Medium For Fluorescence, Vector Labs, cat#H-1000) ile kapatıldıktan sonra floresan mikroskopta (Olympus BX61) değerlendirildi, fotoğraf çekildi.

## **3.5.3. Western Blot Yöntemi**

2-BAJE ve ardından uyguladığımız protein analizi ile *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda azaldığını gösterdiğimiz PRDX6'nın ekspresyon düzeyini belirlemek için Western Blot yöntemini kullandık. Bu amaçla 2-BAJE için kullanılan fare modelleri ve deney dizaynı tekrar oluşturuldu. C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve *Pgr*<sup>-/-</sup> fareler overektomize edildi, 2 hafta sonra 2 gün boyunca 2mg/0.1ml P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapıldıktan sonra sakrifiye edilerek uterusları toplandı.

Western Blot (WB) yöntemi ayrıca CD1 genetik zeminli farelerden gebeliğin 1 ve 4. günlerinde toplanan uteruslar ile gebeliğin 5, 8 ve 12. günlerinde toplanan implantasyon bölgelerinde PRDX6 proteininin miktarını belirlemek için uygulandı. 3.5.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi bölümünde anlatılan çökeltilerdeki PRDX6 ve FKBP52 proteinlerinin varlığını saptamak amacıyla WB uygulandı. Kültüre edilen fare embriyonik fibroblastlarındaki (FEF) PRDX6 ve FKBP52 proteinleri de WB ile belirlendi. Western Blot yöntemi uygulanmadan önce uterus, implantasyon bölgesi ya da fibroblastlar homojenize edilerek protein izolasyonu gerçekleştirildi.

### 3.5.3.1. Doku Homojenizasyonu ve Protein Elde Edilmesi

İçerisinde uterus ve implantasyon bölgelerinin bulunduğu ependorf tüpleri -80°C'den çıkarılarak buz üzerine kondu. Dokular tartılarak cam tüpler içerisine alındı. Tüplere 1:100 oranında fosfataz inhibitör kokteyli 1 (Sigma-Aldrich P2850), fosfataz inhibitör kokteyli 2 (Sigma-Aldrich P5726) ve proteaz inhibitör kokteyli (Sigma-Aldrich P8340) içeren Ripa tamponu 0.1 gr dokuya 1 ml olacak şekilde eklendi. Sonikatör ile örnekler homojenize edildi, 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre bitiminde lizatlar cam tüplerden 1.7 ml'lik plastik tüplere transfer edildi. Yirmi dakika boyunca 14X1000 rpm hızda santrifüj edildi. Süre bitiminde süpernatantlar yeni plastik tüplere alındı. Süpernatantlardaki protein konsantrasyonu BioRad Dc Protein assay (Reagent A-250 ml-cat# 500-0113; Reagent B-1 lt-cat#500-0114; Reagent S-5 ml-cat#500-0115) ile ölçüldü. Öncelikle konsantrasyonu 1.35 µg/µl olan bovine serum albumin/sığır serum albumin (BSA) kullanılarak altı farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.

<u>BSA (µl) (1.35 µg/µl konsantrasyon)</u>	<u>H<sub>2</sub>O (µl)</u>
0	25
1	24
3	22
6	19
12.5	12.5
25	0

Tüplere 5'er µl standart ve örnek eklendikten sonra 125 mikrolitre (µl) reaktif A ve 2.5 µl reaktif S'nin karıştırılmasıyla oluşturulan karışımdan 125'er µl eklendi. Daha sonra üzerine 1'er ml reaktif B eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde sırasıyla BSA standartları, örneklerin içinde liziz edildiği Ripa tamponu ve örnekler spektrofotometrede 750 nanometre (nm) dalga boyunda okutuldu. Protein miktarları matematiksel olarak hesaplandıktan sonra örnekler hazırlandı. Bunun için %10 oranında beta-merkaptoethanol eklenen 5X örnek tamponu lizatlar ile karıştırılarak 1X'e indirildi. Örnekler kaynar suda kaynatılarak proteinler denatüre edildi, daha sonra kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sırasında yüklenmek istenen protein konsantrasyonuna bağlı olarak farklı miktarda örnekler bu karışımdan alınarak jele yüklendi.

### 3.5.3.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

PRDX6 proteini 25 kDa, FKBP52 proteini ise 52 kDa olduğu için her iki proteinin de tespitini sağlayacak olan %12'lik ayırıcı poliakrilamid jel hazırlandı. Ayırıcı jel için kullanılan solüsyonlar ve oranları aşağıdaki gibiydi:

H <sub>2</sub> O	4.3 ml
1.5M Tris-HCl (pH 8.8)	2.5 ml
%40 Akrlamit/Bis-Akrlamit	3 ml
%10 SDS	100 µl
%25 APS	40 µl
TEMED	4 µl

Hazırlanan jel 1 mm aralıklı iki cam plaka arasına döküldükten sonra 20 dakika boyunca donması beklendi ve toplayıcı poliakrilamid jel hazırlandı. Bunun için kullanılan solüsyonlar ve oranları aşağıdaki gibiydi:

H <sub>2</sub> O	2.86 ml
1.5M Tris-HCl (pH 6.8)	0.5 ml
%40 Akrlamit/Bis-Akrlamit	0.5 ml
%10 SDS	40 µl
%25 APS	16 µl
TEMED	4 µl

Hazırlanan toplayıcı jel, ayırıcı jel üzerine konan taraklar üzerine döküldü. Jelin donması için 20 dakika beklendikten sonra taraklar çıkarılarak jeller tanka yerleştirildi ve üzeri elektrofrez/yürütme solüsyonu ile dolduruldu. Markır (Precision Plus Protein Dual Color Standarts, BioRad cat#161-0374) ve mikrolitresinde 20 mikrogram (µg) protein olacak şekilde örnekler jellere yüklendi. 20 dakika boyunca 70 volt sonraki 90 dakika boyunca 100 volt gücünde elektrofrez tabi tutuldu. Elektrofrez sonrası jeller, camların arasından ayrılarak transfer/blotlama solüsyonuna alındı. Bu tampona ayrıca filtre kağıtları ve nitroselüloz membranlar da kondu. Yarı kuru (semi-dry) blotlama tankı (Trans Blot SD Cell, Biorad) üzerine 7x10cm boyutlarında kesilmiş 3 adet filtre kağıdı (Hybond blotting paper, Amersham Biosciences, cat#RPN6101M), 6x9 cm boyutlarında kesilmiş 1 adet nitroselüloz membran (Hybond ECL, Amersham Biosciences, cat#RPN203D), jel ve 3 adet filtre kağıdı sırayla dizildi. Konulan membran sayısına bağlı olarak uygulanacak amper gücü hesaplandı ve jeldeki proteinlerin membrana transferi sağlandı. Hesaplama, her membranın altındaki ve üstündeki filtre kağıdı sayısı ve filtre kağıdı alanının çarpılması sonucu elde edilen değerdeki amper gücünün 30 dakika boyunca uygulanması baz alındı. Transfer sonrasında membranlar çıkartılıp TBS-T içerisinde yıkandı, ardından %5'lik süt tozu (BioRad, cat#170-6404) içerisinde oda ısısında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra süt tozu içerisinde 1:1500 dilüsyonda hazırlanan tavşan poliklonal anti-PRDX6 (LF-PA0011; Ab Frontier) antikoru veya 1:1000 dilüsyonda hazırlanan fare monoklonal anti-FKBP52 (Dr. David F.Smith'in

laboratuvarından alınmıştır) antikoru ile gece boyu +4°C'de soğuk odada sallayıcı cihaz üzerinde inkübe edildi. Ertesi sabah membranlar TBS-T içerisinde 3 kere 10'ar dakika yıkandı ve sonrasında membranlar PRDX6 için %5'lik süt tozu içerisinde 1:5000 oranında hazırlanan peroksidaz konjüge eşşek anti-tavşan sekonder antikoru (Jackson Immunoresearch, cat#711-035-152) veya FKBP52 için %5'lik süt tozu içerisinde 1:5000 oranında hazırlanan peroksidaz konjüge keçi anti-fare sekonder antikoru (Jackson Immunoresearch, cat#115-035-174 ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Membranlar TBS-T ile 3 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra ECL (Enhanced Chemiluminiscent/Kemiluminisans) (GE Health Care, Amersham, RPN 2106) ile 5 dakika muamele edildi. Sonrasında membranlar karanlık odada fotoğraf filmine (Scientific Imaging Film, Kodak, cat#1788207) ekspozite edildikten sonra film geliştirme makinesinde geliştirildi. Membranlar, TBS-T içerisinde yıkandıktan sonra membrana proteinlerin eşit yüklenip yüklenmediğini belirlemek amacıyla aktin uygulaması için membranlara stripping (soyma) işlemi yapıldı. Bunun için membranlar hazırlanan stripping solüsyonu ile 50°C'lik su banyosunda 30 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından membranlar 3 kere 10 dakika TBS-T ile yıkandıktan sonra 1 saat boyunca %5'lik süt tozu ile bloklandı ve %5'lik süt tozu içerisinde 1:500 oranında hazırlanan aktin (keçi poliklonal anti-aktin (sc-1615; Santa Cruz Biotechnology) ile +4°C'de soğuk odada sallayıcı cihaz üzerinde gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah TBS-T ile yıkanan membranlar %5'lik süt tozu içerisinde 1:5000 oranında hazırlanan peroksidaz konjüge eşşek anti-keçi sekonder antikoru (Jackson Immunoresearch, 705-035-147) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra TBS-T ile yıkama, ECL ile muamele ve film geliştirme aşamaları gerçekleştirildi. Membranlar tarayıcıda tarandıktan sonra Image J analiz programı (NIH) ile bantlardaki protein miktarı analiz edildi ve elde edilen değerler aktin bantlarından elde edilen değerlere oranlandı.

### **Western Blot İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **Ripa (Radio-ImmunoPrecipitation Assay) Tamponu**

150 mM NaCl  
%1 NP<sub>4</sub>O  
%0.5 Sodyum deoksikolat (C<sub>24</sub>H<sub>39</sub>NaO<sub>4</sub>)  
%0.1 Sodyum dodesil sülfat (SDS)  
50 mM Tris (pH 8)

#### **5X Örnek Tamponu**

12.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)  
20 ml %10 SDS  
10 ml Gliserol  
2.5 ml ddH<sub>2</sub>O  
20 mg brom fenol mavisi (brom phenol blue-BPB)  
+4°C'de saklanır. Kullanılacağında 1:10 beta-merkaptolanol eklenir.



**1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)**

90,85 gr Tris  
500 ml dH<sub>2</sub>O  
pH 8.8'e ayarlanır

**1.5 M Tris-HCl (pH 6.8)**

30,28 gr Tris  
500 ml dH<sub>2</sub>O  
pH 6.8'e ayarlanır

**%10 SDS**

1 gr SDS  
10 ml dH<sub>2</sub>O

**%25 APS**

0.25 gr APS  
1 ml dH<sub>2</sub>O

**10X Elektroforez/Yürütme Solüsyonu**

30.3 gr Tris  
144.2 gr Glisin  
10 gr SDS  
1 lt dH<sub>2</sub>O içerisinde çözülür ve pH 8.3'e ayarlanır. 1X yapmak için dH<sub>2</sub>O ile dilüye edilir.

**Transfer/Blotlama Solüsyonu**

14.4 gr Glisin  
3.05 gr Tris  
700 ml dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Bu solüsyona 200 ml metanol eklendikten sonra son hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 lt'ye tamamlanır.

**Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu)**

5 gr süt tozu  
100 ml TBS-T

**Stripping (Soyma) Solüsyonu**

100 (mM) 2-merkaptoetanol  
%2 SDS  
62.5 mM Tris-HCl (pH 6.7)

**3.5.4. İn Situ Hibridizasyon Yöntemi**

Gebeliğin farklı günlerindeki uterus ve implantasyon bölgelerinde *Prdx6* ve *Fkbp52* mRNA'larının ekspresyon ve lokalizasyonunu gösterebilmek amacıyla İn Situ Hibridizasyon (İSH) yöntemi kullanıldı.

Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda *Prdx6* mRNA'sını belirlemek için; CD1 genetik

zeminli VT gebe farelere ait 1 ve 4 günlük uteruslar ile 5, 8 ve 12 günlük implantasyon bölgelerinde *Prdx6* mRNA'sını belirlemek için; gebeliğin 5 ve 12. günlerinde *Prdx6* ile *Fkbp52* ekspresyonlarının çakışıp çakışmadığını belirlemek için CD1 genetik zeminli VT gebe farelere ait 5 günlük uteruslar ile 12 günlük implantasyon bölgelerinde hem *Prdx6* hem de *Fkbp52* mRNA'sını belirlemek için İSH yapıldı.

#### 3.5.4.1. İn Situ Hibridizasyon İçin Prob Hazırlanması

ISH'da kullanılan *Prdx6* probu şu şekilde hazırlandı;

#### 3.5.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile cDNA Elde Edilmesi

Öncelikle <http://www.ensembl.org/index.html> web sitesinden yararlanılarak *Prdx6* transkriptine ait nükleotit dizisi bulundu. Sonra komplementer DNA (cDNA)'ya ait nükleotit dizisi bulundu ve [http://primer3plus.com/web\\_0.4.0/input.htm](http://primer3plus.com/web_0.4.0/input.htm) sitesinde cDNA'nın baz dizileri kopyalanarak *Prdx6* için uygun primerler bulundu. Bulunan primerlerin spesifik olup olmadığı <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> sitesinin BLAST menüsünden öğrenildi.

Üretici firmadan liyofilize şekilde gelen primerler miktarlarının 10 katı dH<sub>2</sub>O ilave edilerek final konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde ayarlandı. Annealing ısısını bulmak amacıyla gradient PCR yapıldı. Bu amaçla aşağıdaki formüle göre hazırlanan karışım 12 PCR tüpüne 10'ar µl olacak şekilde eklendi. Kalıp DNA olarak *Prdx6* sentezinin yüksek olduğu akciğerden izole edilen mRNA'dan revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA kullanıldı.

kalıp cDNA	1.25 µl
10X PCR tamponu	12.5 µl
2.5mM dNTP	10 µl
100 µM primer	2.5 µl (her biri)
ddH <sub>2</sub> O	95 µl
Taq polimeraz	1.25 µl
Toplam	125 µl

#### *Prdx6* için primer sekansı

F: 5'CCCAATTTCCGCAAAGACT3'

R: 5'CTTGTTCTCAGCGTCACAC3'

PCR cihazının sol tarafında 50°C'den başlayıp sağ tarafında 70°C'ye yükselecek şekilde siklus ayarlandı.

Elde edilen gen ürünleri Xylene cyanol/ksilen siyanol (XC) boyası ile karıştırılarak %2'lik agaroz jele yüklendi. Ayrıca 123 DNA markırı (Invitrogen cat#15613-011) kullanıldı. Yüz voltta 15 dakika boyunca yürütülen jel görüntüleme cihazının altında görüntülendikten sonra *Prdx6* için en uygun annealing ısısına karar verildi.

Daha sonra akciğerden elde edilen mRNA'dan revers transkripsiyon yöntemi ile elde edilen cDNA'nın amplifiye edilmesi amacıyla aşağıdaki PCR düzeneği kuruldu:

94°C	1 dakika	}	30 siklus
94°C	30 saniye		
55°C	30 saniye		
72°C	30 saniye		
72°C	1 dakika		
4°C	∞		

PCR sonrası PCR ürünleri ve DNA markırı %2'lik agaroz jele yüklenerek 100 voltta 15 dakika boyunca yürütüldü. Süre sonunda jel UV ışık altında görüntülenerek bant şeklinde görülen PCR ürünü jelden kesilerek çıkarıldı ve 1.7 ml'lik plastik tüp içerisine konuldu. Jelden DNA izolasyonu kit aracılığıyla üretici firmanın direktifleri doğrultusunda yapıldı (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, cat# 28706).

#### %2'lik agaroz jel hazırlanışı

0.6 gr agaroz jel

30 ml 1XTAE içinde çözülüp kaynatılır

2µl etidyum bromid (10 mg/ml) eklenir

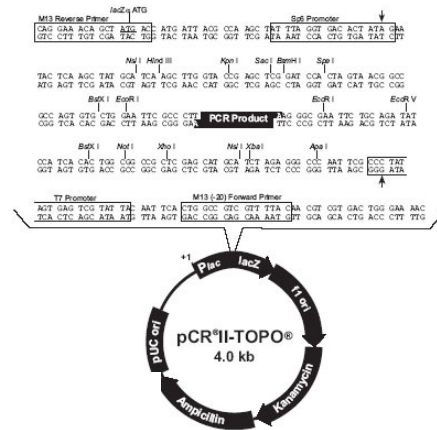
Elektroforez tankına yüklenir, taraklar yerleştirilir, 20 dakika boyunca donması beklenir, tankın içi 1XTAE ile doldurularak örnekler yüklenir.

#### 3.5.4.3. Transformasyonda Kullanılacak Eschericia coli Bakterisi İçin Luria-Bertoni Besiyeri Hazırlanması

20 gr Luria-Bertoni (LB) Agar (Becton Dickinson, cat#244510) 500 ml ddH<sub>2</sub>O içerisine eklendi ve manyetik karıştırıcı yardımıyla 10 dakika boyunca karıştırıldı. Daha sonra otoklavlandı, biraz soğuması beklendikten sonra 2 ml amfisilin (25 mg/ml) eklendi ve 100x15 mm boyutlarındaki petri kaplarına yaklaşık 20 ml dökülerek donması beklendi ve +4°C'ye kaldırıldı.

#### 3.5.4.4. PCR Ürününün Vektöre Klonlanması

PCR Ürününün Vektöre Klonlanması için pCR® II-TOPO® vektörü (Şekil 3.2) içeren TOPO TA Cloning (Invitrogen, cat#K4600-01) kiti kullanıldı. Kite yer alan direktifler doğrultusunda aşağıdaki işlemler uygulandı.



Şekil 3.2. pCR® II-TOPO® vektörünün haritası (www.invitrogen.com).

#### **3.5.4.5. PCR Ürününün Vektöre Ligasyonu**

Plastik tüpün dibine 1 µl tuz solüsyonu, 4 µl PCR ürünü (jel ekstraksiyonu ile elde edilen) ve 1 µl vektör ilave edildi. Pipetle hafifçe karıştırılarak 5 dakika beklendi.

#### **3.5.4.6. Vektörün E. coli Bakterisine Transformasyonu**

Hazırlanan karışımdan 2 µl alınarak E.coli (TOP10F' suşu) tüpüne eklendi, buz üzerinde 5 dakika beklendi ve 42°C'lik ısıtıcıda 2 dakika tutuldu. Bu süre boyunca dış membranları çıkarılmış olan E. coli'nin iç membranında oluşan porlardan vektörler içeri girecektir. Bu karışıma beslenme medyumunu olan 250 µl S.O.C medyumunu (Invitrogen, cat#15544-034) ya da LB medyumunu eklendi. Tüp 37°C'lik çalkalayıcıya konarak 1 saat boyunca hızı 225 olacak şekilde çalkalandı. Bu arada LB petrileri soğuktan oda ısısına çıkarıldı. Ateşin yanında medyumlara 10 µl izopropiltiyo-β-D-galaktozid (IPTG, Invitrogen, cat#15529-019) ve 10 µl of 5-bromo-4kloro-3indolil-β-D-galaktozid (x-gal, Invitrogen, cat#15520-018) eklenerek yayıldı. IPTG, lac baskılayıcıya bağlanarak lac operon bölgesinden β-galaktozidlerin monosakkaritlere hidrolizini sağlayan β-galaktozidaz gibi genlerin transkripsiyonuna izin verir. X-gal, laktoz analogu bir galaktozidaz substratıdır. Medyumun bir kısmına 50 µl bir kısmına da 20 µl E. coli karışımı eklendi ve yayıldı. Petriler 37°C'lik inkübatörde gece boyu ve 20 saati aşmayacak şekilde inkübe edildi.

#### **3.5.4.7. Vektör İçeren Bakteri Kolonisinin Belirlenmesi**

Ertesi gün petriler inkübatörden çıkarıldı ve beyaz koloniler seçilerek cam kalemi ile etrafı çizildi. PCR ürünüümüze galaktozidaz gen bölgesi içine sokmayı hedeflediğimiz için eğer PCR ürünüümüze galaktozidaz gen bölgesine girmişse vektör, X-gal'i sindiremeyecek ve son ürün beyaz olacaktır. Eğer PCR ürünü vektöre girmemiş ve galaktozidaz bölgesi iyi çalışıyorsa son ürün mavi olacaktır. Beyaz koloniler pipet ucu yardımıyla alınarak 1:1000 oranında amfisilin eklenmiş 2 ml LB solüsyonu ile dolu cam tüplere eklendi. Tüp 37°C'lik çalkalayıcıya konarak gece boyu hızı 225 olacak şekilde çalkalandı.

#### **3.5.4.8. Vektörün Bakteriden Uzaklaştırılması ve Sekans Analizi**

Ertesi gün tüplerden alınan 1 ml E.coli karışımı 1.7 ml'lik plastik tüplere kondu. 14000 rpm'de 1 dakika boyunca döndürüldü. Süre bitiminde süpernatant atılarak pelet alıkondu. Miniprep isimli kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen, cat#27106) kullanılarak bakteriden uzaklaştırılan istenilen PCR ürününe sahip vektörler elde edilmiş oldu.

Bundan sonraki aşama hangi vektörün hangi restriksiyon enzimi ile kesilerek lineer hale getirileceğiydi. Bunun için [www.biologyworkbench.sdsc.edu](http://www.biologyworkbench.sdsc.edu) web sayfasından yararlanılarak PCR ürünü için enzim kesme bölgeleri belirlendi. Bulunan restriksiyon enzimlerinden hangisinin kullanılacağına karar verilirken vektörün o enzim için sadece bir kesme bölgesi içermesi gerektiğine dikkat edildi. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda enzim için PCR karışımı hazırlandı. Bu karışıma restriksiyon enzimi ve plazmid de eklenerek 37°C'lik sıcak su banyosunda 30 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda örnekler %2'lik agaroz jele 6X XC boyası ile karıştırılarak ve 123

DNA markırı kullanılarak yüklendi. Elde edilen bantlar yorumlandı. Tek bant PCR ürününün vektöre giremediğini gösterirken 2 bant hem PCR ürününün vektöre girdiğini hem de restriksiyon enziminin gerekli bölgelerden kesim yaptığını göstermekteydi. Analiz sonrası kesme işlemi gerçekleştirilmiş vektörler, 100 ml steril Terrific Broth medyumuna, 100 µl amfisilin ve 50 µL E. coli içeren medyuma ilave edilerek geceboyu 37°C'lik çalkalayıcıda inkübe edildi. Ertesi gün MaxiPrep (Plasmid Maxi Kit, Qiagen, cat#12163) ile kitte yer alan direktifler uygulanarak bu karışımdan vektör DNA'sı izole edildi. Sonrasında izole edilen DNA'nın konsantrasyonu ölçüldü. Bunun için bidistile su ile 1:200 oranında dilüye edilen DNA spektrofotometrede 260 absorbansta okutuldu.

#### 3.5.4.9. Sense ve Antisense Problarının Sentezlenmesi

Bir sonraki basamak uygun primerin seçilerek sekanslama yapılmasıydı. Elde edilen sekans sonuçları www.pubmed.com adresindeki nükleotit blast kısmından kontrol edildi. Problar sentezlenmeden önce hangi restriksiyon enzimi ve RNA polimerazın kullanılacağına karar verildi. Seçilen polimeraza göre sense ve antisense problar sentezlendi ve radyoaktif sülfür (<sup>35</sup>S) ile işaretlendi. Böylece <sup>35</sup>S ile işaretli cRNA probları hazırlanmış oldu. Bundan sonraki aşama bu probları kullanarak doku üzerindeki *Prdx6* mRNA ekspresyonunu ve lokalizasyonunu belirlemektir.

*Prdx6* probunun yanı sıra *Fkbp52* için de yukarıda anlatıldığı şekilde prob sentezi gerçekleştirildi.

#### 3.5.4.10. İn Situ Hibridizasyon Protokolü

ISH için kullanılmak üzere -80°C'de saklanan dokular kırıyojel içerisine gömüldü ve kırıyomikrotom aracılığıyla poli-L-lizin ile kaplanmış slaytlar üzerine kesitler alındı.

ISH yönteminde yapılan işlemler şu şekildeydi:

Bir gün önce sterilize edilmiş ddH<sub>2</sub>O ile 4X PBS'ten 1X PBS hazırlandı. 100 ml 1X PBS içine 4 gr paraformaldehit kondu, mikrodalga fırında kaynatıldı, süzüldü ve buz üzerinde soğutuldu. -80°C'ye kaldırılan kesitler 1 dakika boyunca slayt ısıtıcı üzerinde ısıtıldıktan sonra 15 dakika boyunca %4'lük paraformaldehitte fikse edildi. Süre bitiminde kesitler 5 dakika boyunca buz üzerindeki 1X PBS'te, devamında da oda ısısındaki 1X PBS'te yıkandı. Kesitler 0.1 M Trietanolamin (TEA) içinde çalkalandıktan sonra %0.25 asetik anhidrit/0.1 M TEA içerisinde oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. ddH<sub>2</sub>O ile 20XSaline Sodyum Citrate (Tuz Sodyum Sitrat/SSC)'den dilüye edilen 2XSSC içerisinde 15-20 saniye boyunca çalkalandı. Kesitler iki defa steril ddH<sub>2</sub>O, %30, 50, 70, 85, 95 ve iki defa %100'lük alkol içeren şalelerde 15'er saniye boyunca çalkalandı. Sonrasında havada kurutuldu. Pre-hibridizasyon basamağında kesitler 10 dakika boyunca 5 mM MgCl<sub>2</sub>-PBS, 10 dakika 0.25M Tris-0.1M Glisin, 10 dakika %50 formamid-2XSET (16 ml ddH<sub>2</sub>O, 4 ml 20X SET ve 20 ml formamid karıştırılır, 37°C'lik su banyosunda tutulur) içinde oda ısısında tutuldu. Hibridizasyon solüsyonu için RNAaz ve DNAaz içermeyen plastik tüplere 1.45 ml ddH<sub>2</sub>O, 0.5 ml 20X SET, 0.01 gr polivinil prolidon (PVP), 0.01 gr Fikol, 0.01 gr BSA karıştırıldı ve 67°C'lik su banyosunda tutuldu. Ayrıca 2.5 ml formamid, 0.4 gr dextran sülfat, 500 µl ditiyotreitil (DTT) ve 50 µl alkalın tampon içindeki 50 mg/ml transfer RNA (tRNA) eklendi. 1 ml'lik hibridizasyon solüsyonunda konsantrasyonu 2x10<sup>7</sup> count per minute (cpm) olacak şekilde *Prdx6* veya *Fkbp52* için hazırlanan ve -20°C'de saklanan radyoaktif <sup>35</sup>S işaretli

cRNA probu eklendi. Kesitlerin üzerine hibridizasyon solüsyonu radyoizotop içerdiği için dikkatli bir şekilde eklendi, üzeri silikon solüsyonuyla (Sigmacote solution, Sigma Aldrich, SL-2) kaplanmış özel lameller ile baloncuk bırakmadan kapatıldı. 4 saat süreyle 45°C'lik inkübatörde nemli ortamda inkübe edildi. Bu süre zarfında tek zincirli RNA eklenen prop ile çift zincirli hale gelir.

İnkübasyon süresi dolunca slaytların üzerindeki lameller ve hibridizasyon solüsyonu çok dikkatli bir şekilde radyoaktif atığa atıldı. Kesitler 4XSSC (400 ml ddH<sub>2</sub>O +100 ml 20XSSC) içerisinde çalkalandı. Bu işlem 3 kere tekrar edildi. Kesitler içine 40 µl betamerkapto-etanol eklenmiş %50 formamid-2XSET solüsyonuna konarak 15 dakika boyunca 60°C'lik su banyosunda inkübe edildi. Kesitler tekrar 4XSSC içerisinde çalkalandı. 50 ml ddH<sub>2</sub>O, 7.5 ml 20XSET içine RNAaz içermeyen pipet ve pipet uçları kullanılarak 100µl 10mg/ml RNaz A ve 500µl 10mg/ml BSA eklendi, 37°C'de inkübe edilerek RNaz A solüsyonu hazırlandı. Kesitler 20 dakika boyunca 37°C'lik su banyosunda RNaz A solüsyonu içinde inkübe edildi. 20XSSC'nin ddH<sub>2</sub>O ile dilüye edilmesiyle elde edilen 1XSSC içerisinde kesitler 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcı yardımıyla yıkandı. 20XSET'in ddH<sub>2</sub>O ile dilüye edilmesiyle 0.2XSET elde edildi. Kesitler 50 ml 0.2XSET ve 50 µl betamerkapto-etanolün karıştırılmasıyla elde edilen 0.1% betamerkaptoetanol/0.2%SET solüsyonunda 50°C'lik su banyosunda 30 dakika boyunca inkübe edildiler. Bu sırada 37'şer ml %30, 50 ve 70'lik etanol içeren şişelere 3 ml 4 M amonyum asetat (NH<sub>4</sub>Ac) eklendi, soğumaları sağlandıktan sonra kesitler bu solüsyonlarda çalkalandı. Oda ısısında bulunan %85, 95 ve 100'lük etanol serilerinden geçirilen kesitler oda ısısında 5 dakika süreyle kurutulduktan sonra kapalı bir kutu içerisine yerleştirilerek gece boyu oda ısısında bırakıldı.

Ertesi gün 6 ml 0.6 M.lik amonyum asetat (NH<sub>4</sub>AC) 50 ml'lik tüp içerisine kondu. Karanlıkta 6 gr otoradyografi emülsiyonu tartılarak amonyum asetat içerisine kondu. 45°C'lik su banyosunda arada bir çalkalayarak 40 dakika boyunca erimesi beklendi. Süre bitiminde kesitler emülsiyon içerisine daldırılarak 5 saniye beklendi ve 40 dakika boyunca kurutuldular. Daha sonra slaytlar kapalı kutuya konuldu, etrafları bant ile sarıldıktan sonra kutu alüminyum folyo ile kaplandı ve soğuk odada geliştirilecekleri güne kadar saklandı. İlk geliştirme 3 ya da 5 gün sonra yapıldı.

#### **3.5.4.11. Slaytların Geliştirilmesi**

Slaytları geliştirmek için %2'lik asetik asit (49 ml ddH<sub>2</sub>O+1 ml asetik asit) hazırlandı. Developer (geliştirici) ve fiksatif (sabitleyici) soğuk odada yaklaşık 25 dakika tutularak ısıları 12-15°C'ye ayarlandı. Geliştirme işlemi karanlık odada yapıldı. Önce slayt geliştiricide 2.5 dakika süreyle tutuldu, ardından %2'lik asetik asitte 30 saniye tutuldu, ddH<sub>2</sub>O'da çalkalandıktan sonra 5 dakika süreyle sabitleyicide bekletildi, dH<sub>2</sub>O'da çalkalandıktan sonra karanlık odadan çıkıldı ve slaytlar akar su altında 5 dakika boyunca yıkandı. Sonra Mayer'in hematoksileni ile 2 dakika boyandı, dH<sub>2</sub>O'ya ve asetik asite 5'er kere batırılıp çıkarıldı ve dH<sub>2</sub>O'da 2 dakika boyunca bekletildi. Slaytlar %30, 50, 70 ve 85'lik etanol serilerine 5 kere batırılıp çıkarıldıktan sonra 5 saniye eozinde boyandı. %95 ve %100'lük etanollere ve ardından ksilole 5 kere batırılıp çıkarılan kesitler kapatma solüsyonu (Permount Histological Mounting Medium, Fisher Scientific, cat#SP15-500) ile kapatıldı. Slaytların etrafı emülsiyonun fazlasını almak amacıyla cam temizleyici ve ardından %1'lik asit-alkol solüsyonu ile temizlendi.

Slaytlar mikroskobun karanlık alan modunda incelendi. Eğer sinyal yeterince güçlü değilse 1 hafta beklenerek sinyalin güçlenmesi beklendi.

### **İn Situ Hibridizasyonda Kullanılan Solüsyonlar**

#### **Kimyasal listesi**

Fikol	Pharmacia cat#17-0400-01
PVP	Sigma PVP cat#360
Dekstran Sülfat	Sigma cat#D8906
tRNA	Sigma cat#83853
Paraformaldehit	Polysciences, INC cat#00380
Poli-L-lizin	Sigma cat#P-9404
BSA	Sigma cat#A-9647
DTT	Sigma cat#D-9779
Tris-Baz	ICN cat#152176
Formamid	Fluka cat#47670
Rezin	BioRad cat#1426425
Geliştirici (developer)	Kodak cat#1464726
Sabitleyici (fiksatif)	Kodak cat#1971746
Emülsiyon	Kodak cat#8895666

#### **4XPBS**

0.8 gr KCl  
0.8 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
32 gr NaCl  
4.56 gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (anhidrozo)  
950 ml steril ddH<sub>2</sub>O  
pH 7.4'e ayarlanır. Son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 1000ml'ye tamamlanır, filtre edilir.

#### **20X SET**

175.3 gr NaCl  
72.7 gr Tris  
14.4 gr EDTA ya da 50 ml 0.5M EDTA  
950 ml steril ddH<sub>2</sub>O  
pH 8'e ayarlanır. Son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 1000ml'ye tamamlanır, filtre edilir.

#### **Trietanolamin (TEA)**

29.84 gr TEA  
1900 ml steril ddH<sub>2</sub>O  
pH 8'e ayarlanır. Son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 2000ml'ye tamamlanır, filtre edilir.

### **20XSSC**

175.4 gr NaCl

88.26 gr Na-sitrat

steril ddH<sub>2</sub>O ile 1000ml'ye tamamlanır, pH 7.0-7.4'e ayarlanır, filtre edilir.

### **Formamid**

2.5 l Formamid

500 gr Resin

3 saat karıştırılır

Filtre edilir. Alikuat yapılarak (45 ml) -80°C'de saklanır.

### **5mM MgCl<sub>2</sub> PBS**

0.2 gr KCl

0.2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8.0 gr NaCl

1.14 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.02 gr MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

950 ml steril ddH<sub>2</sub>O

pH 7'ye ayarlanır. Son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanır, filtre edilir.

### **Tris-Glisin**

24.22 gr Tris

7.5 gr Glisin

950 ml steril ddH<sub>2</sub>O

pH 7.4'e ayarlanır. Son hacim ddH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanır, filtre edilir.

### **Alkalin Tamponu**

4.4 gr NaCl

9.3 gr EDTA

pH 8'e ayarlanır. 5 gr SDS eklenir, filtre edilir.

### **Alkalin Tamponda 50mg/ml tRNA**

1 gr tRNA

10 ml RNA Alkalin Tamponu

İnversiyon tekniği ile karıştırılır. 20 ml'ye kadar alkalin tamponu eklenir.

5 ml'lik alikuatlar yapılarak -20°C'de saklanır.

### **1M Ditiyotreitol (DTT)**

4.626 gr DTT

30 ml steril ddH<sub>2</sub>O eklenir

Filtre edildikten sonra 0.5 ml'lik alikuatlar hazırlanır. -20°C'de saklanır.



**BSA (10mg/ml)**

0.2 gr BSA

20 ml steril ddH<sub>2</sub>O

Karıştırılıp filtre edilir. 0.5 ml'lik alikuatlar -20°C'de saklanır.

**10 mg/ml RNaz A**

1. 50 ml 10mM Tris-15mM NaCl (pH 7.5)

1M Tris (pH 7.5) 500 µl

5M NaCl 150 µl

ddH<sub>2</sub>O 49.35 ml

2. 1 şişe RNAaz (~300 mg) 50ml.'lik tüp içerisinde tartılır

3. Tris-NaCl tamponu (~300 ml) eklenerek final konsantrasyonu 10 mg/ml yapılır

4. Hafifçe tüpe vurularak ya da inversiyon tekniği ile karıştırılır, vortekslenmez

5. 100 µl'lik alikuatlar hazırlanır

6. -80°C'de saklanır

**4M Amonyum Asetat**

308.32 gr NH<sub>4</sub>AC

1000 ml'ye kadar steril ddH<sub>2</sub>O

Karıştırılıp filtre edilir.

**Mayer'in hematoksileni**

1 gr hematoksilen kristali

1000 ml ddH<sub>2</sub>O

Isıtılarak çözülür

0.2 gr sodyum iyodat

50 gr Alüminyum amonyum sülfat

50 gr kloral hidrat

1 gr sitrik asit ilave edilir. Kullanmadan önce filtre edilir.

**%1 Asit Alkol**

2 ml HCl

198 ml %70 etanol

**3.5.5. İmmünopresipitasyon Yöntemi**

FKBP52 ile PRDX6 proteinleri arasında fiziksel bir etkileşim olup olmadığını yani bir temas olup olmadığını belirlemek amacıyla immünopresipitasyon gerçekleştirildi. Bu amaçla, gebeliğin 8. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelerin implantasyon bölgeleri çıkarıldıktan sonra desiduaları izole edildi. Tüp içerisine konulan desiduaların üzerine 600 µl İP liziz tamponu eklenerek sonikatörde homojenize edildi. Homojenatlar 1.7 ml'lik plastik tüplere aktarıldı, 10.000 g'de 10 dakika boyunca döndürüldü. Süpernatant alındı ve 3.5.3.1.Doku Homojenizasyonu ve

Protein Elde Edilmesi bölümünde anlatıldığı gibi BioRad Dc Protein assay (Reagent A-250 ml-cat# 500-0113; Reagent B-1 lt-cat# 500-0114; Reagent S-5 ml-cat# 500-0115) ile protein konsantrasyonu ölçüldü. Her örnek için biri kontrol diğeri antikor için olacak şekilde 2'şer tüp hazırlandı. Tüplere İP liziz tamponu içinde 200 µl'inde 1 mg protein olacak şekilde hazırlanan örnekler kondu. Her tüpe 10 µl normal tavşan IgG'si eklendi (Santa Cruz, cat#sc-2027), +4°C'de 30 dakika boyunca rotatorda çevrildi. Tüpler kısa süreli döndürüldükten sonra tüpün dibinde kalan örnekler toplandı. Bu örnekler 20 µl protein A/G boncukları (Immobilized protein A, Pierce, cat#20338) eklendi, 30 dakika boyunca soğuk odada rotatorda çevrildi. 10.000 g'de 10 dakika boyunca döndürüldükten sonra süpernatantlar yeni bir plastik tüpe aktarıldı ve antikor yazan tüplerin üzerine 1 µl poliklonal FKBP52 antikoru eklendi (Dr. David F. Smith'in laboratuvarından alınmıştır). Tüpler gece boyu rotatorda çevrildi. Ertesi gün tüm tüplere 35 µl protein A/G boncukları (Immobilized protein A, Pierce, cat #20338) eklendi, soğuk odada 30 dakika boyunca rotatorda çevrildi. Süre sonunda maksimum hızda 2 dakika boyunca çevrildi. Peletin üzerine 1:100 oranında fosfataz inhibitör kokteyl I, fosfataz inhibitör kokteyl II ve proteaz inhibitör kokteyli içeren 500 µl soğuk PBS eklenerek boncuklar yıkandı, tüpler 14.000 g'de 2 dakika boyunca çevrildi, süpernatant atıldı. Bu yıkama işlemi 6 kere tekrarlandı. Yıkama bittikten sonra her tüpe 75 µl 1X örnek tamponu (5X örnek tamponundan dH<sub>2</sub>O ile dilüye edilir) eklendi, 3 dakika kaynatıldı. 14.000 g'de 2.5 dakika oda ısısında döndürülen örneklerin süpernatantları alınarak yeni tüplere kondu ve daha sonra Western Blot yapmak üzere -80°C'ye kaldırıldı. Orjinal homojenatlar da örnek tamponu ile karıştırıldı, kaynatıldı ve -80°C'ye kaldırıldı. İmmüno-presipitasyon yönteminde FKBP52 antikoru kullanıldığı için FKBP52 ve ona bağlı proteinler çöktürülmüş oldu. Bir sonraki basamakta PRDX6'nın FKBP52 ile etkileşen proteinlerden biri olup olmadığını belirlemek için elde edilen çökeltilerde PRDX6 için Western Blot yapıldı. Ayrıca elde edilen çökeltilerde kontrol amacıyla FKBP52 için Western Blot uygulandı.

### **İP İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **İP Liziz tamponu**

0.9 ml 5M NaCl

0.3 ml %100 NP<sub>4</sub>O

1.5 ml 1M Tris (pH 8)

27.3 ml H<sub>2</sub>O

Bu karışıma, oranları 1:100 olacak şekilde fosfataz inhibitör kokteyl I, fosfataz inhibitör kokteyl II ve proteaz inhibitör kokteyli eklenir.

#### **5X Örnek Tamponu**

12.5 ml 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)

20 ml %10 SDS

10 ml Gliserol

2.5 ml ddH<sub>2</sub>O

20 mg brom fenol mavisi (BPB)

+4°C'de saklanır. Kullanılacağı zaman 1:10 oranında beta-merkaptotanol eklenir.

### 3.5.6. Northern Blot Yöntemi

Northern Blot (NB) yönteminde de İn Situ Hibridizasyon (İSH) yönteminde olduğu gibi öncelikle kullanılacak prob lar sentezlendi. Prob sentezlenmesi 3.5.4.1. İn Situ Hibridizasyon İçin Prob Hazırlanması bölümünde anlatıldığı gibi olup sadece son basamağı farklıydı. İSH yöntemi için <sup>35</sup>S ile işaretlenen prob lar NB yöntemi için <sup>32</sup>P ile işaretlendi. *Prdx6*, *Indian hedge hog (Ihh)* ve *Hoxa10* için <sup>32</sup>P ile işaretli cRNA prob ları hazırlandı.

Northern Blot yöntemi, dokudan izole edilen mRNA miktarını ölçmeye yarayan bir yöntemdir. Bu yöntem, parakuat enjekte edilen CD1 VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusundaki *Indian hedge hog (Ihh)* ve *Hoxa10* mRNA miktarını ölçmek için kullanıldı. Bunun için gebeliklerinin 3. gününde olan CD1 genetik zeminli VT fareler ile gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjeksiyonu yapılan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere saat 18<sup>00</sup>, da 2mg/kg parakuat enjekte edildi. Kontrol grubunda yer alan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ise herhangi bir enjeksiyon yapılmadı. Ertesi gün yani gebeliğin 4. gününde fareler sakrifiye edilip uterusları toplandı. Farklı farelerden elde edilen 2 ya da 3'er uterus örneğine *Ihh* ve *Hoxa10* için NB uygulandı. Ayrıca gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> üçer farklı fareye ait karaciğer ve uteruslar ile CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda *Prdx6* mRNA düzeyini belirlemek için de bu yöntem kullanıldı. Northern Blot ayrıca 3.5.8. Progesteron (P<sub>4</sub>) ve Östrojen (E<sub>2</sub>) Uygulaması bölümünde anlatılan fare modellerinde *Prdx6* mRNA düzeyini belirlemek için kullanıldı.

Northern Blot yöntemi şu şekilde gerçekleştirildi: öncelikle dokulardan mRNA izolasyonu yapıldı. Bunun için cam tüpler içerisine konan dokuların üzerine yaklaşık 1 ml trizol (Invitrogen, cat#15596-018) eklendi. Dokular sonikatörde homojenize edildi, tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak oda ısısında 5 dakika beklendi. Sıvı kısım 1.7 ml'lik plastik tüplere aktarılarak üzerine 200 µl kloroform (Sigma Aldrich, cat#319988) eklendi, örnekler vortekslendi ve 15 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüjde döndürüldü. Süpernatant kısmı (şeffaf katman, beyaz ve pembe katmanlar alınmaz) yeni plastik tüplere aktarıldı. Üstlerine 500 µl izopropanol (2-izopropanol) eklendi, vortekslendi, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. 10 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüjde döndürüldü. Süpernatant atılarak peletlerin üzerine 750 µl %75 etanol ilave edildi, vortekslendi. 5 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüjde döndürüldü, süpernatant atıldı. Tüplerin ağzı açık bırakılarak peletin 5 dakika boyunca kuruması sağlandı. 30 ya da 50 µl steril ddH<sub>2</sub>O tüplere eklendi, vortekslendi. Örnekleri resüspanse etmek zor olduğundan 65°C'lik ısıtıcıda 10 dakika boyunca tutuldular. mRNA konsantrasyonunu ölçmek için örnekler steril ddH<sub>2</sub>O ile 1:200 oranında dilüye edildi. Örnekler spektrofotometrede okutularak konsantrasyonları mg/ml cinsinden belirlendi.

Northern Blot yönteminde Western Blot yönteminde olduğu gibi öncelikle jel hazırlandı. Western Blot yönteminden farklı olarak jeller dikey olarak değil yatay olarak hazırlandı ve yüklendi. Yürütme solüsyonu için 165ml formaldehit ile 50 ml 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (MOPS) karıştırıldı ve son hacim 500 ml olana dek ddH<sub>2</sub>O eklendi. Bu karışımın 60 ml'si sonraki basamaklar için saklanırken kalan 440 ml'ye 440 ml ddH<sub>2</sub>O eklenerek toplam hacim 880 ml'ye tamamlandı. 60 ml ddH<sub>2</sub>O ile 0.84 gr agaroz karıştırılıp mikrodalga fırında kaynatıldıktan sonra saklanan 60 ml

karışım ilave edildi (%0.7 agaroz jel) ve elde edilen karışım yatay düzlemdeki 4 ayrı cam set üzerine döküldü, taraklar yerleştirildi ve donması için 20 dakika boyunca beklendi. 11 µl ddH<sub>2</sub>O içerisinde 20 µg mRNA olacak şekilde örnekler hazırlandı. İçinde 11 µl örnek bulunan tüplere 29 µl örnek tamponu eklendi ve tüpler 65°C'lik ısıtıcıda 5 dakika boyunca tutuldu. Tüplere 5 µl mRNA yükleme boyası eklendi.

Örnekler, jele yüklenmeden önce taraklar çıkarıldı ve metal çubuk yardımıyla Northern Blot setinin içine kondu, üzerine yürütme solüsyonu kondu. Üç jele 13'er µl, kalan jele de 3'er µl olacak şekilde örnekler yüklendi ve 70 voltta 15 dakika boyunca yürütülerek örneklerin jele girmesi sağlandı. Süre sonunda karıştırıcının hızı 5'e ayarlandı böylece tamponun eşit dağılması ve pH'nın aynı kalması sağlandı. Bu şekilde örnekler yaklaşık 2 saat daha yürütüldü. Jel yürürken mRNA kalitesini görebilmek amacıyla artan örnek %1'lik agaroz jelle yürütüldü. Yürütme sonunda 4.8 kb'lik 28sRNA ve 1.9 kb'lik 18sRNA'ya ait 2 bantın görülmesi mRNA'nın iyi kalitede olduğunu gösterdi. Uygulanabilecek bir diğer yöntem de fosfat tamponu içinde konsantrasyonu 30 µg/ml olacak şekilde hazırlanan akrinin orange boyasında jellerden birinin 3-5 dakika boyanmasıdır. Jel, ddH<sub>2</sub>O ile 2 saat ve gece boyunca yıkandıktan sonra UV ışığı altında incelenerek mRNA kalitesi saptanır.

Elektroforez bitiminde sodyum fosfat tamponu hazırlandı. Jeller bu tampon ile dolu kaplara konarak orbital çalkalayıcı üzerinde 20 dakika boyunca yıkandı. Süre bitiminde tampon değiştirilerek 20 dakika daha yıkandı. 8.5X5.5 cm boyutlarında kalın ve ince filtre kağıtları ile 7.8X5cm boyutlarında por boyutu 0.2 µl olan nitroselüloz membranlar (Whatman Inc, cat#10416096) kesildi. Membranlar 20 dakika boyunca ddH<sub>2</sub>O içinde tutuldu, süre bitiminde 20 dakika boyunca 20XSSC içinde tutuldu. Jellerin üzerine konulacağı sandviç hazırlandı. Bunun için, 3 filtre kağıdı 20XSSC içinde ıslatıldı, bunlar plastik bir kap içinde üst üste konurken cam bageet ile üstlerinden geçilerek hava kabarcıklarının çıkması sağlandı. Kalın kağıtların üzerine 20XSSC içinde ıslatılmış 1 adet ince kağıt kondu, hava kabarcıkları çıkarıldı. Kağıtların üzerine jel, jelin üzerine de nitroselüloz membran kondu. Membranın üzerine kuru kağıtlar kondu. Kabın içerisine jel hizasına kadar 20XSSC kondu, üstteki kağıtların ıslanmamasına özen gösterildi. En üste su ile dolu erlen konularak ağırlık yapması sağlandı, gece boyu beklendi.

Ertesi gün UV ışığı altında incelenen akrinin orange boyamasına yani RNA kalitesine bağlı olarak hibridizasyona devam edilip edilmeyeceğine karar verildi. Nitroselüloz membran sandviçten çıkarılarak üzerine örnek adları ve kullanılacak probun adı yazıldı. Membranlar UV Crosslinker'a konarak mRNA stabilizasyonu sağlandı.

Hibridizasyon öncesi prob ile muamele edilecek membran sayısına göre 1. solüsyon hazırlandı. Bir membran için 15 ml 20XSET, 1 ml %10SDS, 100 ml'ye kadar ddH<sub>2</sub>O eklendi. 68°C'lik sıcak su banyosunda 10 dakika tutuldu. Plastik poşetlerin içine konan her bir membran için 20'er ml 1. solüsyondan kondu, poşetlerin ağzı sıcak mühür (sealer) aracılığıyla kapatıldı ve 30 dakika boyunca 68°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Bu esnada arta kalan 1. solüsyonun hacmine bağlı olarak içine yeni kimyasallar eklenerek 2. solüsyon oluşturuldu. Örneğin 400 ml 1. solüsyon kaldıysa 0.8 gr Fikol, 0.8 gr PVP, 0.8 gr BSA eklendi. Süre bitiminde 1. solüsyon uzaklaştırılarak 2. solüsyondan her poşet için 45'er ml eklendi ve 2 saat boyunca 68°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu.

2. solüsyonun arta kalanı 68°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Artan 2. solüsyonun miktarına göre 3. solüsyon hazırlandı. Örneğin 90 ml solüsyon arttıysa 450 µl 50 mg/ml tRNA (alkalin tamponu içinde) eklendi. Plastik poşetlere 20 ml 3. solüsyondan eklenerek 2 saat boyunca 68°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Bu esnada hibridizasyon solüsyonu hazırlandı. Artta kalan 3. solüsyonun miktarına bağlı olarak dekstran sülfat ve 1M fosfat tamponu (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) eklendi. Örneğin 3. solüsyondan 30 ml artmış ise 3 gr dekstran sülfat ve 600 µl 1M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> eklendi ve 68°C'de çözünmeye bırakıldı. Bu karışıma radyoaktif fosfor işaretli (<sup>32</sup>P) prob ilave edildi. Gece boyunca 68°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Ertesi gün içinde hibridizasyon solüsyonu bulunan plastik poşete 100 ml I. yıkama solüsyonu konduktan sonra tüm içerik radyoaktif atığa atıldı ve 100 ml yıkama solüsyonu ilave edildi, 68°C'de 1 saat tutuldu. Bu esnada II. yıkama solüsyonu hazırlandı. Süre bitiminde I. yıkama solüsyonu uzaklaştırılarak II. yıkama solüsyonu kondu ve 1 saat boyunca 68°C'de tutuldu. Süre bitiminde membranlar plastik poşetlerden çıkarılarak kurutuldu ve film kasetleri içine yerleştirilerek kasetin ağzı kapatıldı. Kasetin üzerine membranın konduğu tarih yazıldı. Karanlık odada membranların üzerine fotoğraf filmi (Scientific Imaging Film, Kodak, cat#1788207) kondu ve kaset -80°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün filmler geliştirme makinesinde geliştirildi. Yeterli sinyal alınamayan filmler için 24, 12 ya da 6 saat sonra tekrar geliştirme yapıldı. Bantlar elde edildikten sonraki aşama membranların strip edilerek (soyma) internal kontrol olan ribozomal protein L7 (Rp17) ile hibridize edilmesiydi.

Soyma işleminde membranlar soyma solüsyonu içinde 6 dakika kaynatıldı. Açık havada kurutulan membranlar Rp17 ile hibridize edildiler. 2-3 saat boyunca fotoğraf filmine ekspozite olan filmler geliştirildi. Membranlar tarayıcıda tarandıktan sonra bantlardaki mRNA miktarı Image J analiz programı (NIH) ile analiz edildi ve elde edilen değerler Rp17 bantlarından elde edilen değerlere oranlandı.

### **Northern Blot İçin Kullanılan Solüsyonlar**

#### **Örnek tamponu**

300 µl formamid

30 µl 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (MOPS) tamponu

100 µl formaldehid karıştırılıp vortekslenir

#### **RNA yükleme boyası**

%95 formamid

%0.025 bromfenol mavisi

%0.025 ksilen siyanol

5 mM EDTA (pH 8.0)

%0.025 SDS

-20°C'de saklanır.

#### **Sodyum fosfat tamponu**

10 ml 1M sodyum fosfat tamponu

1 lt'ye kadar ddH<sub>2</sub>O eklenir, pH'sı 7'ye ayarlanır.

### **I. yıkama solüsyonu**

15 ml 20X SSC  
3 ml %10 SDS  
300 ml'ye kadar ddH<sub>2</sub>O  
68°C'lik sıcak su banyosunda ısıtılır.

### **II. yıkama solüsyonu**

1.5 ml 20XSSC  
1 ml %10 SDS  
100 ml'ye kadar ddH<sub>2</sub>O  
68°C'lik sıcak su banyosunda ısıtılır.

### **Strip (soyma) solüsyonu**

900 ml ddH<sub>2</sub>O  
9 ml %10 SDS  
Kaynadıktan sonra 2.25 ml 20X SSC ilave edilir.

### **3.5.7. 8-İzoprostan Yöntemi İle Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi**

Lipidlerin oksidatif hasarlanması sonucu izoprostanlar oluşur. İzoprostanlar serbest radikallerin katalizörlüğünde, hücre membranı ve lipoproteinlerin fosfolipidlerinden fosfolipaz A2 etkisiyle oluşan araşidonik asit ürünleridir (31). 8-izoprostan (PGF<sub>2</sub> $\alpha$ ) F<sub>2</sub> isoprostan sınıfından olup siklooksijenazdan bağımsız olarak araşidonik asitin peroksidasyonu sonucu üretilir. İzoprostanlar lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres (OS)'in en güvenilir belirteçleridir. Bu maddelerin biyolojik sıvı ve dokulardaki düzeyleri OS'nin in vivo kantitatif ölçümünü sağlar (209).

C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişi fareler vazektomize erkek farelerle çiftleştirilerek yalancı gebelik oluşturuldu. 4 adet VT ile 3 adet *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare gebeliğin 4. gününde sakrifiye edilerek uterus, karaciğer ve böbrekleri toplandı ve 8-izoprostan düzeyleri enzim immünoassay yöntemi (Cayman, cat#516351.1) ile saptandı.

Sakrifiye edilen farelerden alınan organlar hemen çalışılmayacaksa %0.005 bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) (her 1 ml etanol için 5mg/ml'lik örnekten 10 $\mu$ l eklenmelidir) içine konup -80°C'de saklandı. Örnekler çalışılacağı zaman 1mM etilendiamintetraasetikasit (EDTA) ve 10 $\mu$ M indometasin içeren 0.1 M fosfat, pH 7.4 içerisinde homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası örnekler yüksek hızda çevrilerek süpernatantlar elde edildi ve kitte yer alan direktifler uygulandı.

Bu assay 8-izoprostan ile 8-izoprostan-asetilkolinesteraz (AChE) konjugatının (8-izoprostan izleyicisi) sınırlı sayıdaki 8-izoprostana spesifik tavşan anti-serum bağlanma bölgeleri için aralarındaki yarışa dayanır. 8-izoprostan konsantrasyonu değişmesine karşın 8-izoprostan izleyicisinin konsantrasyonu sabit tutulduğu için tavşan antiseruma bağlanabilen 8-izoprostan izleyicisinin miktarı kuyucuktaki 8-izoprostan konsantrasyonu ile ters olarak orantılıdır. Tavşan antiserumu-8-izoprostan kompleksi (serbest ya da izleyici şeklinde) daha önceden kuyucuklara yapıştırılmış olan tavşan IgG fare monoklonal antibadisine bağlanır. Kuyucuklu tabak yıkanarak bağlanmayan yapılar uzaklaştırılır ve kuyucuklara Ellman kimyasalı eklenir (AChE'ye substrat içerir). Bu

enzimatik reaksiyonun ürünü sarı renkli olup 412 nm’de spektrofotometrik olarak tespit edilir.

### 3.5.8. Progesteron (P<sub>4</sub>) ve Östrojen (E<sub>2</sub>) Uygulaması

Uterustaki *Prdx6* ekspresyonunu ovaryan hormonlar olan P<sub>4</sub> ve/ya E<sub>2</sub>’nin etkileyip etkilemediğini belirlemek için CD1 VT dişi fareler ovariectomize edildi ve 2 hafta boyunca dinlendirildiler. İki hafta sonunda susam yağı içerisinde hazırlanan P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml), E<sub>2</sub> (100ng) veya ikisinin kombinasyonu subkutan olarak enjekte edildi. Kontrol grubundaki farelere ise sadece susam yağı enjekte edildi. Fareler 24 saat sonra sakrifiye edildi, uterusları alınarak -80°C’ye kaldırıldı. Toplanan uteruslara İn situ hibridizasyon ve Northern Blot uygulandı.

## 3.6. İn Vivo Deneyler

### 3.6.1. Parakuat Herbisitinin Uygulanması

Parakuat, bitkilere zarar veren böcekleri öldüren bir çeşit herbisit olup oksidatif stres (OS) yaratmak amacıyla kullanılır. *Fkbp52-/-* farelere parakuat enjekte edilerek OS oluşturulduğunda OS ile mücadele etmede *Prdx6-/-* farelerde olduğu gibi (204) başarısız olup olmayacaklarını belirlemeyi amaçladık. Bunun için *Fkbp52-/-* ve VT farelerde parakuatın letal olmayan ve implantasyona engel olan en düşük dozunu belirlememiz gerekiyordu. Bu amaçla CD1 genetik zeminli VT ve gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52-/-* dişi farelere gebeliğin 4. gününde tek doz parakuat (Paraquat dichloride, Sigma Aldrich, cat#36541) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Ertesi gün kuyruk venlerinden Chicago mavisi enjekte edildikten sonra sakrifiye edilen farelerde implantasyon bölgeleri kontrol edildi. İmplantasyon bölgesi çok zayıf bantlar şeklinde görülen ya da görülmeyen farelerin uterusları PBS ile yıkanarak blastosist içerip içermedikleri kontrol edildi. İlk denenen doz olan 30mg/kg parakuatın hem VT hem de *Fkbp52-/-* farelerde implantasyona engel olduğu görüldükten sonra sırasıyla 20 mg/kg, 15 mg/kg ve 2 mg/kg parakuat denenerek implantasyona engel olan en düşük doz belirlendi.

### Parakuat’ın hazırlanması

3 mg parakuat 1 ml %0.9 NaCl içinde çözülerek stok parakuat solüsyonu hazırlandı, alikuatlanıp -80°C’de saklandı. Erişkin fareler yaklaşık 30 gr ağırlığında oldukları için denemek istenen konsantrasyona göre bu stok solüsyondan enjeksiyon yapıldı. Örneğin, 20mg/kg doz için stok solüsyondan 0.2 ml (200 µl), 10mg/kg doz için 0.1 ml (100 µl) alınarak intraperitoneal enjeksiyon yapıldı.

### 3.6.2. N-Asetil Sistein ve α-Tokoferol Antioksidanlarının Uygulanması

*Fkbp52-/-* gebe fareler için implantasyona engel olan en düşük parakuat dozu belirlendikten sonra *Fkbp52-/-* gebe dişilere dışarıdan verilecek antioksidan desteğinin implantasyon başarısını artırıp artırmayacağını belirlemeyi amaçladık. Bu amaçla N-asetil sistein (NAS) (Fisher Scientific, cat#616-91-1) ve α-tokoferol (α-TKF) (Twin Lab, Liqui E) antioksidanları kullanıldı. Literatür taraması yapılarak farelere 50mg/kg NAS ve 1g/kg α-TKF kullanılmaya karar verildi. CD1 genetik zeminli *Fkbp52-/-* farelerin bir

kısmına gebeliğin 2-4. günleri subkutan P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml) enjeksiyonunun yanı sıra intraperitoneal NAS (50mg/kg) ve  $\alpha$ -TKF (1g/kg) enjekte edilirken bir kısmına ise sadece subkutan P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml) enjeksiyonu yapıldı. Gebeliğin 4. gününde her iki gruptaki farelere antioksidan enjeksiyonundan yaklaşık 30 dakika sonra OS'nin indüklenmesi amacıyla tek doz parakuat (2mg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Ertesi gün yani gebeliğin 5. gününde farelere kuyruk venlerinden Chicago mavisi enjekte edildi, sakrifiye edilerek implantasyon bölgeleri (İB) kontrol edildi. İB görülmeyen farelerin uterusları %0.9 NaCl solüsyonu ile yıkanarak blastosist olup olmadığı kontrol edildi.

#### **$\alpha$ -tokoferol (1g/kg)'un hazırlanması**

500  $\mu$ l susam yağı içinde

500  $\mu$ l  $\alpha$ -tokoferol çözülür.

Farelere 0.1 ml enjekte edildi.

#### **NAS (50mg/kg)'ın hazırlanması**

40 ml %0.9 NaCl solüsyonu içinde

600 mg NAS çözülür

Farelere 0.1 ml enjekte edildi.

### **3.6.3. Blastosist Transferi Deneyleri**

Blastosist transfer deneyleri için CD1 genetik zeminli VT ya da *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişi farelerin vazektomize erkekler ile çiftleştirilmesi sonucu oluşan yalancı gebe fareler alıcı grubu oluşturdu. CD1 genetik zeminli VT erkeklerle çiftleştirilen VT dişi fareler ise verici grubu oluşturdu. Gebeliğin 4. günü sabah saat 7<sup>00</sup>'da alıcı gruptaki VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> yalancı gebe farelere 2mg/kg parakuat enjeksiyonu yapıldı. Saat 12<sup>00</sup>'da verici fareler sakrifiye edildi. Uterusların medyum (EmbryoMax MII Media, Millipore, cat#MR-015-D) ile yıkanması sonucu elde edilen sağlıklı VT blastosistler petride toplandı. Blastosistler içi medyum ile dolu cam pipetlere alındı. Alıcı farelere 5 ml anestezik (Avertin, 10mg/0.4ml) intraperitoneal olarak enjekte edildi, dorsal bölgeleri ovaryum hizasında tıraş edildi, bu bölge %70'lik etanol ile ıslatıldıktan sonra deri ve periton kesildi. Ovaryum ve uterus dışarı çıkarıldı, ovaryum yağ dokusundan kleplendi. Enjektörün ucu yardımıyla uterus girişi açılarak cam pipet içinde bulunan blastosistler uterusu transfer edildi. Transfer sonrası ovaryum ve uterus yerine yerleştirildi, kesilen deri zımbalandı ve fareler dinlenmeleri için sıcak plaka üzerinde bırakıldı. Ertesi gün yani gebeliğin 5. gününde saat 12<sup>00</sup>'da farelere kuyruk venlerinden Chicago mavisi enjekte edildi, sakrifiye edilen farelerin implantasyon bölgeleri kontrol edildi.

### **3.6.4. Hücre Kültürü**

İn vivo deneylerden elde edilen bulguların in vitroda da kanıtlanması gerekliliğinden yola çıkılarak CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> embriyolardan fibroblast izolasyonu ve kültürü yapıldı. Kültürü yapılan bu fibroblastlar ile çeşitli deneyler yapıldı.



### 3.6.4.1. Fare Embriyonik Fibroblastlarının İzolasyonu ve Kültürü

Fare embriyolarından fibroblast izolasyonu yapabilmek için öncelikle CD1 genetik zeminli *Fkbp52*+/- dişi fareler ile *Fkbp52*+/- erkek fareler çiftleştirildi. Fareler gebeliğin 14. gününde steril koşullarda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon devamında yapılan işlemler ateş yanında, aseptik koşullarda ve steril malzemelerle gerçekleştirildi. Toplanan implantasyon bölgeleri  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  içermeyen steril PBS (1X, İnvitrogen, cat#10010) içerisine alındı, burada plasenta ve embriyo birbirinden ayrıldı. Embriyoların her biri ayrı ayrı steril PBS ile dolu petri kaplarına alınarak yıkandı. Embriyolar steril PBS içeren ve üzeri numaralandırılmış üçüncü petrilere ayrı ayrı alınarak amniyon keselerinden ayrıldı. Embriyoların kuyukları genotiplendirme amacıyla kesilerek 1.7 ml'lik plastik tüplere alındı, tüplerin üzerine petrilere üzerindeki numaralar yazıldı, kuyuklara genotiplendirme için gerekli işlemler yapıldı. Embriyoların iç organları ve kafaları uzaklaştırıldı. Embriyodan geriye kalanlar küçük parçalara ayrıldı ve 25 ml %0.1 tripsin-EDTA (%25 1X, İnvitrogen, cat#25200-056) içeren 50 ml'lik plastik tüplere konarak 1 saat boyunca 37°C'lik sıcak su banyosunda tutuldu. Süre sonunda içerisine %10 oranında fetal bovin/sığır serumu (FBS) (Fisher Scientific, cat# #SH30070-03), 100 Unit/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin (İnvitrogen, cat#15140-122) eklenen 25 ml Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu (DMEM) (İnvitrogen, cat#11965-084) eklenerek tripsin-EDTA'nın enzimatik etkisi sonlandırıldı. Tüpte bulunan karışım 700 µm'lik naylon süzgeç kullanılarak başka bir tüpe süzülme ve 1000 rpm'de 5 dakika boyunca döndürüldü. Süpernatant atıldı, pelete 20 ml PBS eklenerek vortekslendi. 1000 rpm'de 5 dakika boyunca döndürüldü. Süpernatant atıldı, pelete 30 ml %10 FBS içeren DMEM eklenerek vortekslendi. Bu karışımdan 10 µl alınarak 10 µl tripan mavisi ile karıştırıldı. Hemositometre üzerine damlatılarak dört köşede bulunan karelerin içinde yer alan mavi olmayan yani ölü olmayan hücreler mikroskopta X4 büyütmede sayılarak ortalaması alındı. Mililitredeki hücre sayısı şu şekilde hesaplandı:

$$\text{Sayılan hücre sayısı} \times 10^4 \times 2$$

Petirler kültür öncesi PBS içerisinde hazırlanmış %0.1'lik jelatin (Sigma Aldrich, cat#G9391) ile kaplandı, üzerine numaralar yazıldı ve  $1 \times 10^7$  hücre olacak şekilde hücre süspansiyonundan eklendi. Petrinin hacmine uygun miktarda %10 FBS içeren DMEM ilave edildi ve petirler %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün petirler mikroskop altında kontrol edildi, debris aspiratör yardımıyla uzaklaştırıldı, üzerine 1ml PBS eklenerek yıkandı. PBS aspiratör ile uzaklaştırıldı, petrilere yeni medyum ilave edildi ve inkübatöre kaldırıldı. Bir sonraki gün aspiratör ile petrideki medyum çekildi, PBS eklenerek yıkandı, PBS aspiratör ile uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml %0.05 Tripsin-EDTA eklendi ve 37°C'de 5 dakika inkübe edilerek hücrelerin petri tabanından ayrılması sağlandı. Reaksiyonu durdurmak için 1ml DMEM eklendi. Genotiplendirme sonuçlarına göre aynı genotipten olan fibroblastlar aynı tüpte toplandı. Genotiplendirme sonucundan emin olunamayan örnekler atılarak deneye dahil edilmedi. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika boyunca döndürüldü. Süpernatant atıldı, peletin üzerine 32 ml DMEM eklendi, vortekslendi. 3X10 cm boyutlarındaki 4 petriye 8'er ml hücre süspansiyonundan ilave edilerek %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. Ertesi gün hücreler kontrol edildi. Yeterli sayıya ulaşılması sonucu hücrelere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NAS uygulaması ile hücre canlılık testi (MTT assay) gerçekleştirildi. Hücreler yaklaşık %70

konfluent ise tripsinize edilip yeni petrilere aktarıldı. Eğer gerekenden daha fazla hücre varsa kullanılmayan hücreler donduruldu. Bunun için aşağıdaki protokol uygulandı.

### **Fare Embriyonik Fibroblastlarının Dondurulması ve Çözülmesi**

Dondurulacak Fare Embriyonik Fibroblastları (FEF)'nin bulunduğu petri %80-100 konfluensiye ulaşmış olmalıydı. Petride bulunan medyum aspiratör ile uzaklaştırıldı. Yeterli miktarda PBS eklenip yıkandıktan sonra PBS aspiratör ile uzaklaştırıldı. Yıkama işlemi bir kere daha tekrar edildi. Petrinin hacmine uygun miktarda %0.05 Tripsin-EDTA eklendi, hücrelerin petri tabanından kalkması sağlandıktan sonra eşit miktarda DMEM eklenerek reaksiyon durduruldu. Hücreler 1000 rpm'de 5 dakika boyunca döndürüldü. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra peletin üzerine DMEM içerisinde hazırlanmış 5 ml %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich, cat#C6295) eklenerek karıştırıldı. Tripan mavisi kullanılarak hemasitometrede hücre sayısı hesaplandı. Bir mililitresinde yaklaşık 1 milyon hücre olacak şekilde hesaplanan hücreler 2 ml'lik kıyotüplere kondu, 12 saat boyunca -20°C'de tutulduktan sonra -80°C'ye kaldırıldı. Dondurulmuş hücreler tekrar kullanılmak istendiğinde şu şekilde çözüldü: tüpler 37°C'lik sıcak su banyosunda tutularak erimesi sağlandı. 15 ml'lik plastik tüpe PBS ve çözünen hücreler kondu, 1000 rpm'de 5 dakika döndürüldü. Süpernatant atıldıktan sonra pelete DMEM eklenerek hücreler süspanse edildi. Süspansiyon petriye kondu, üzerine petri hacmine uygun miktarda DMEM eklendi ve inkübatöre kaldırıldı.

### **3.6.4.2.Fare Embriyonik Fibroblastlarına Hidrojen Peroksit ve N-Asetil Sistein Uygulanması**

3.6.1. Parakuat Herbisitinin Uygulanması bölümünde anlatılan in vivo uygulanan parakuat deneylerinden elde edilen sonuçların in vitroda da kanıtlanması için kültüre edilen fibroblastlara OS oluşturmak amacıyla hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve antioksidan olarak N-asetil sistein (NAS) uygulandı. 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM ve 0.05 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30Fisher Scientific, cat#H323-500) hazırlandı. Stok H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonumuz yaklaşık 10M idi. Stok solüsyon 1:1000 oranında ddH<sub>2</sub>O ile dilüye edilerek 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elde edildi. 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> steroidik etkiye sahip fenol kırmızısı içermeyen Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medyumu/Ham'in F12'si içerisinde (DMEM/F12) dilüye edilerek 5, 2.5, 1.25, 1, 0.5 0.25, 0.1 ve 0.05 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elde edildi. 326 mg NAS (Fisher Scientific, cat#616-91-1) 100 ml %0.9 NaCl içerisinde çözülerek 200mM NAS hazırlandı, bunun DMEM/F12 içerisinde 1:10 oranında dilüye edilmesiyle 20mM NAS elde edildi.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamadan önce VT ve *Fkbp52*-/- FEF'ler 96 kuyucuklu plastik petrilere kuyucuklarında 1000 hücre olacak şekilde ekildi. En dış sırada yer alan kuyucuklara kontrol amaçlı hiç hücre ekilmedi. Ertesi gün hücrelerin petri tabanına yapışıp yapışmadığı kontrol edildi. Kontrol, 10 mM, 5 mM, 2.5 mM, 1.25 mM, 1 mM, 0.5 mM, 0.25 mM, 0.1 mM ve 0.05 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gruplarının her biri için 6 kuyucuk ayarlandı. Kuyucuklarda bulunan medyum aspiratör ile çekildi, üzerine PBS eklenerek kuyucuklar yıkandı. PBS aspiratör ile çekildikten sonra kontrol grubuna sadece %10 FBS içeren 200 µl DMEM/F12 medyumu eklenirken diğer gruplara içinde farklı

konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bulunan 200 µl %10 FBS içeren DMEM/F12 medyumuna eklendi. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edildiler.

Bir antioksidan olan NAS'ın FEF'ler üzerindeki etkisini belirlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasında olduğu gibi VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'ler 96 kuyucuklu petriye ekildi. Ertesi gün PBS ile yıkama sonrası kuyucukların bir kısmına 20mM NAS ilave edilirken bir kısmına da kontrol amaçlı sadece DMEM/F12 medyumuna eklendi. Hücreler 24 saat inkübe edildi. Ertesi gün kuyucuklardaki medyum uzaklaştırılarak 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20mM NAS, 20mM NAS+1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eklenirken bazı kuyucuklara da kontrol amaçlı sadece DMEM/F12 eklendi. Hücreler 24 saat inkübe edildi. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NAS uygulamaları sırasında kömürle muamele edilmiş (charcoal treated) FBS kullanıldı. Bunun nedeni, ısıca inaktive edilmiş FBS'nin steroid etki göstermesiydi.

#### **3.6.4.3.Fare Embriyonik Fibroblastlarında Hücre Canlılığının MTT Assay ile Belirlenmesi**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve NAS+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulamasından 24 saat sonra FEF'lerin bulunduğu kuyucuklardaki DMEM/F12 ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uzaklaştırıldı. Kuyucuklara 100 µl DMEM/F12 ve 20 µl 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Promega, cat#G3580) solüsyonu eklendi. Hücreler 4 saat boyunca %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda petripler spektrofotometrede 490 nm'de okutuldu. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+NAS uygulanan FEF'lerde MTT assay uygulamaları 6 kere farklı örneklerle tekrarlandı.

Kitte bulunan MTS tetrazolyum metabolik olarak aktif/canlı hücreler tarafından medyumda çözünebilir formazana indirgenir. Medyumdaki formazan miktarı aktif hücre sayısı ile doğru orantılı olduğundan spektrofotometrede elde edilen değerler farklı gruplara ait canlı hücre sayısını kıyaslamamıza izin verir.

#### **3.6.4.4.Fare Embriyonik Fibroblastlarında RT PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) Yöntemi**

VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde *Pgr* mRNA'sının olup olmadığını belirleyebilmek için öncelikle bu hücrelerde RNA izolasyonu yapıldı.

RNA izolasyonu için 75 cm<sup>2</sup>'lik petriplerde bulunan hücrelerin üzerindeki medyum uzaklaştırıldı, PBS ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine 200 µl Trizol ilave edildi. Kazıyıcı aracılığıyla hücreler kazındı ve 1.7 ml'lik tüplere alındı. Tüplere 200 µl kloroform (Sigma Aldrich, cat#319988) ilave edilip vortekslendi. 2-3 dakika oda ısısında beklendi. Tüpler 15 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüj edildi. Süpernatant kısmı (şeffaf katman, beyaz ve pembe katmanlar alınmaz) yeni plastik tüplere aktarıldı. Üstlerine 500 µl izopropanol (2-izopropanol) eklendi, vortekslendi, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. 10 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüjde döndürüldü. Süpernatant atılarak peletlerin üzerine 750 µl %75 etanol ilave edildi, vortekslendi. 5 dakika boyunca +4°C'de maksimum hızda santrifüjde döndürüldü, süpernatant atıldı. Tüplerin ağzı açık bırakılarak peletin 5 dakika boyunca kuruması sağlandı. 30 ya da 50 µl steril ddH<sub>2</sub>O tüplere eklendi, vortekslendi. Örnekleri resüspanse etmek zor olduğundan 65°C'lik ısıtıcıda 10 dakika boyunca tutuldular. mRNA konsantrasyonunu ölçmek için örnekler steril ddH<sub>2</sub>O ile 1:200

oranında dilüye edildi. Örnekler spektrofotometrede okutularak konsantrasyonları mg/ml cinsinden belirlendi.

RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction/Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu) protokolü şu şekilde uygulandı:

5 µl tampon (10X DNase 1 buffer, DNA free, Ambion, cat#8169G2)  
1 µl DNaz (rDNase 1 DNA free, Ambion, cat#2224G)  
5 µg RNA örneğini içeren hacim  
ddH<sub>2</sub>O  
Toplam hacim: 50 µl

Hazırlanan karışım 1.7ml'lik tüplere konarak 37°C'de 30 dakika tutuldu. Süre sonunda örnekler 5 µl of DNaz İnaktivasyon Reaktifi eklendi ve 1.5 dakika oda ısısında 15000 rpm'de döndürüldü. Başka bir tüpte her örnek için 1 µl olacak şekilde 10 mM dNTP ve oligo dT (Invitrogen P/N 58063 50µM) eşit miktarda konuldu. Bu karışımdan 2'şer µl yeni tüplere kondu ve üzerine daha önce hazırlanan RNA karışımından 10 µl eklendi. 65°C'de 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada örnek sayısına göre aşağıdaki karışım hazırlandı:

4 µl 5X tampon (5X first strand buffer, Invitrogen, cat#Y00146)  
2 µl DTT (0.1 M, Invitrogen, cat#Y00147)  
1 µl RNaz inhibitörü (RNase OUT recombinant ribonuclease inhibitor 5,000 UI, Invitrogen, cat# 100000840)

65°C'deki inkübasyon süresi dolunca örnekler buz üzerine alındı. Üstlerine hazırlanan karışımdan 7 µl eklendi. 42°C'de 2 dakika inkübe edildi. Süre bitiminden önce 1 µl Superscript II Reverse Transcriptase (10,000 U, Invitrogen, cat#100004925) eklendi. Tüpler 42°C'de 50 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde tüpler 70°C'de 15 dakika inkübe edildi. Böylece revers transkripsiyon aşaması bitmiş oldu. Örnekler +4°C'ye kaldırıldı.

Ertesi gün *Pgr* ve *Actb* (beta aktin) için RT-PCR yapıldı. *Pgr* için aşağıdaki formüle göre PCR karışımı hazırlandı:

10X tampon (+MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl
dNTP	2 µl
10X primer	0.2 µl
ddH <sub>2</sub> O	18.05 µl
TAq polimeraz (Invitrogen)	0.25 µl
cDNA	1 µl

Pozitif kontrol olarak gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelere ait uterustan izole edilen cDNA kullanıldı. PCR karışımına cDNA yerine 1 µl dH<sub>2</sub>O'nun bulunduğu tüp negatif kontrol olarak kullanıldı.

### ***Pgr* için primer sekansı**

F: 5'GCCATCACTTCCTGGTGTCT3'

R: 5'GCAATGGGAGAGTCTTGCTC3'

*Actb* için ise aşağıdaki formüle göre PCR karışımı hazırlandı:

10X tampon (+MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl
dNTP	2 µl
1X primer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	17.25 µl
TAq polimeraz (Invitrogen)	0.25 µl
cDNA	1 µl

### ***Actb* için primer sekansı**

F: 5'TTGCTGATCCACATCTGCTG3'

R: 5'GACAGGATGCAGAAGGAGAT3'

PCR koşulları belirlenirken <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techttools/calc> sitesinden yararlanılarak TM değerleri belirlendi. Bu değer *Pgr* için yaklaşık 54°C' idi.

*Pgr* için PCR koşulları aşağıdaki gibiydi:

95°C'de 2 dakika	} 30 siklus
95°C'de 30 saniye	
54°C'de 30 saniye	
72°C'de 30 saniye	
72°C'de 5 dakika	
4°C'de ∞	

*Actb* için PCR koşulları aşağıdaki gibiydi:

95°C'de 2 dakika	} 30 siklus
95°C'de 30 saniye	
60°C'de 30 saniye	
72°C'de 30 saniye	
4°C'de ∞	

PCR bittikten sonra PCR ürünleri BPB boyası kullanılarak %1.5'lük agaroz jelde 40 dakika boyunca 160 voltta yürütüldü. Jeller görüntüleme cihazında görüntülendi.

### **3.6.4.5. Fare Embriyonik Fibroblastlarında Western Blot Yöntemi**

VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde Western Blot gerçekleştirebilmek amacıyla öncelikle bu hücrelerden protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bunun için liziz tamponu hazırlandı. 3.5.3 Western Blot Yöntemi bölümünde hazırlanışı anlatılan RIPA tamponunun 2000 µl'ine 20 µl fosfataz inhibitörü I, 20 µl fosfataz inhibitörü II, 20 µl proteinaz inhibitörü eklenecek liziz tamponu hazırlandı. Petriyelerdeki medyum uzaklaştırıldı, üzerine yaklaşık

2-3 ml soğuk PBS eklenip buz üzerine kondu. Yaklaşık 1 dakika sonra PBS uzaklaştırıldı. Petriye 40 µl liziz tamponu eklendi, kazıyıcı yardımıyla hücreler kazındı, 20 dakika boyunca beklendi. Süre sonunda aynı gruba ait hücreler 1.7 ml'lik tüplerde toplandı. 14.000 rpm'de 10 dakika boyunca +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatantlar 1.7 ml'lik tüplere toplandı. Süpernatantlardaki protein konsantrasyonunu ölçmek için 3.5.3.1. Doku Homojenizasyonu ve Protein Elde Edilmesi bölümünde anlatıldığı gibi BioRad Dc ile protein assay yapıldı.

VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerin protein konsantrasyonları belirlendikten sonra PRDX6 ve FKBP52 proteinlerini belirlemek için Western Blot uygulandı. Farklı gruplara ait örnekler kullanılırken eşit miktarda protein yüklemesi yapıldı. İnternal kontrol olarak Aktin kullanıldı.

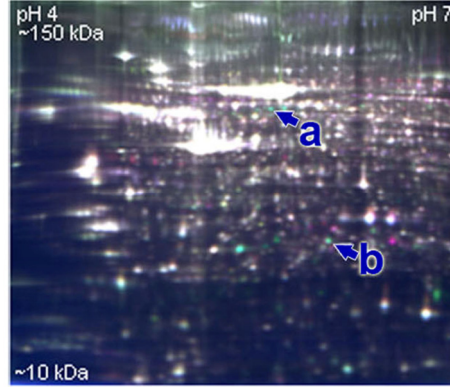
### **3.8. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analiz yapmak için SPSS (10.0 for Windows, Chicago, IL, USA) istatistik programı kullanıldı. Değerler Student's t-test ya da One Way Anova Test'ini takiben Post Hoc Tukey ve Dunn's testleri kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi  $p < 0.05$  olarak alındı.

## BULGULAR

### 4.1. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve *Pgr*<sup>-/-</sup> Fare Uteruslarında Vahşi Tip Uterusa Oranla Ekspresyonu Artan ve Azalan Proteinler

FKBP52'nin PR'den bağımsız rolleri olup olmadığını belirlemek için ovariectomize edildikten iki hafta sonra P<sub>4</sub> enjekte edilen C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Pgr*<sup>-/-</sup> ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uteruslarında 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi ve ardından kütle spektrometrisi (MS) uygulandı, proteom profilleri karşılaştırıldı. Jel elektroforezi sonucunda izoelektrik noktaları pH 4 ile pH 7 arasında olan ve molekül ağırlıkları 10 ile 150 kDa arasında değişen proteinler saptanabildi (Şekil 4.1). Kütle spektrometresi ile aşağıdaki sonuçlar elde edildi.



**Şekil 4.1.** VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarından elde edilen protein ekstraktlarının temsili 2-BAJE fotoğrafı. İzoelektrik noktası pH 4 ile 7; moleküler ağırlık 10 ile 150 kDa arasında. a, FKBP52'yi b, PRDX6'yı göstermekte.

Üç genotipe ait tüm örnekler arasında 100 protein istatistiksel olarak önemli derecede değişmişti ( $p < 0.01$ ). En büyük farklılık (PC1 = 63.5) *Pgr*<sup>-/-</sup> örnekler ile diğer örnekler arasında, ikinci en büyük farklılık ise (PC2 = 24.4) VT örnekler ile *Fkbp52*<sup>-/-</sup> örnekler arasında bulundu.

#### 4.1.1. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve *Pgr*<sup>-/-</sup> Fare Uteruslarında Ekspresyonu Artan Proteinler

FKBP52-PR sinyali aracılığıyla çalışan P<sub>4</sub> tarafından upregüle edilen/ekspresyonu artan proteinlerin Adenozin kinaz ve Osteoglisin olduğu bulundu (Çizelge 4.1). Adenozin kinaz, ATP'den adenozine fosfat transferini sağlayan bir adenozin kinaz olup anti-inflamatuvar etkilere sahiptir (210). Osteoglisin, lösince zengin tekrarlar içeren küçük bir proteoglikandır (211).

Tanımlanan Protein	Erişim numarası	MA pl	VT ile <i>Pgr-/-</i> karşılaştırması		VT ile <i>Fkbp52-/-</i> karşılaştırması		<i>Pgr-/-</i> ile <i>Fkbp52-/-</i> karşılaştırması		P (ANOVA)
			Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	
Adenozin kinaz	P55264	40.4 5.8	1.44	0.001	1.18	0.009	-1.22	0.006	0.0003
Osteoglisin	Q62000	34.3 5.5	2.67	0.0006	1.28	0.02	-2.08	0.001	0.00005

**Çizelge 4.1.** PR/FKBP52 sinyali aracılı  $P_4$  tarafından upregüle edilen proteinler. Swiss-Prot veritabanındaki erişim numaraları kullanılmıştır. Kilodalton (kDa) cinsinden moleküler ağırlık (MA) ve izoelektrik noktası (pl) veri tabanı girişlerinden hesaplanmıştır. Ortalama hacim oranları (Oh) ve Student's t-testi ve ANOVA'nın p değerleri DeCyder versiyon 6.5 yazılımı ile hesaplanmıştır.

#### 4.1.2. *Fkbp52-/-* ve *Pgr-/-* Fare Uteruslarında Ekspresyonu Azalan Proteinler

FKBP52-PR sinyali aracılığıyla çalışan  $P_4$  tarafından downregüle edilen/ekspresyonu azalan proteinler olarak Vakuolar ATP Sentaz altbirimi B ve Galektin-1 saptandı (Çizelge 4.2.). Vakuolar ATP Sentaz altbirimi B, vakuolar ATPaz'ın periferik kompleksinin non-katalitik altbirimidir. ATPazlar, membrandan protonların taşınımını ile ATP sentezi ve/ya hidrolizini birleştiren membran bağlı enzim kompleksleridir (212). Galektin-1, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin düzenlenmesinde rol oynayan beta-galatozidlere bağlanan bir proteindir (213).

Tanımlanan Protein	Erişim numarası	MA pl	VT ile <i>Pgr-/-</i> karşılaştırması		VT ile <i>Fkbp52-/-</i> karşılaştırması		<i>Pgr-/-</i> ile <i>Fkbp52-/-</i> karşılaştırması		P (ANOVA)
			Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	
Vakuolar ATP sentaz altbirimi B	P62815	57.0 5.5	-1.28	0.009	-1.17	0.0021	1.09	0.15	0.003
Galektin-1	P16045	15.1 5.3	-1.57	0.02	-1.39	0.016	1.13	0.22	0.008

**Çizelge 4.2.** PR/FKBP52 sinyali aracılı  $P_4$  tarafından downregüle edilen proteinler. Swiss-Prot veritabanındaki erişim numaraları kullanılmıştır. Kilodalton (kDa) cinsinden moleküler ağırlık (MA) ve izoelektrik noktası (pl) veri tabanı girişlerinden hesaplanmıştır. Ortalama hacim oranları (Oh) ve Student's t-testi ve ANOVA'nın p değerleri DeCyder versiyon 6.5 yazılımı ile hesaplanmıştır.

#### 4.1.3. *Fkbp52-/-* Fare Uterusunda Ekspresyonu Artan Proteinler

Bazı proteinlerin ise  $P_4$ -PR sinyaline bağlı olmadan FKBP52 varlığına bağlı olarak farklı şekilde eksprese edildiği gözlemlendi. *Fkbp52-/-* fare uterusunda VT fare uterusuna oranla bazı proteinler PR'den bağımsız olarak upregüle edilmişti. Bu proteinler, Vimentin, Desmin, Aldehid Dehidrogenaz Mitokondriyel Öncü, Ökaryotik Başlama Faktörü 4A-1, Yüklü Multiveziküler Gövde Proteini 2, Indoletilamin N-metiltransferaz idi (Çizelge 4.3.). Bu proteinler için VT ile *Pgr-/-* fare uterusları arasında fark yoktu. Vimentin, organellerin sitoplazmada pozisyonlarının belirlenmesinde rol alan tip 3 ara filamandır. Dolayısıyla hücre bütünlüğünün sağlanmasından sorumlu hücre iskeleti elemanıdır (214). Desmin, sarkomerlerde Z bandı yakınında bulunan tip 3 ara



filamandır (215). Aldehid Dehidrogenaz Mitokondriyel Öncü, alkol türevli asetaldehitlerin detoksifikasyonunda rol alan bir proteindir. Kortikosteroid, biyojenik amin, nörotransmitter ve lipit peroksidasyon metabolizmasında rol alırlar (216). Ökaryotik Başlama Faktörü 4A-1, ökaryotik translasyonun başlama fazında rol alan bir proteindir (217). Yüklü Multiveziküler Gövde Proteini 2, transmembran proteinlerin degradasyon için lizozom lümenine taşınmasına aracılık eden multiveziküler cisimlerin oluşmasında rol alan ESCRT-II kompleksinin bileşenidir (218). Indoletilamin N-metiltransferaz ise triptamin ve yapıca ilişkili bileşenlerin N-metilasyonunu sağlayan bir enzimdir (219).

Tanımlanan Protein	Erişim numarası	MA pl	VT ile <i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		VT ile <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		<i>Pgr</i> <sup>-/-</sup> ile <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		P (ANOVA)
			Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	
Vimentin	P20152	53.5 5.1	1.0	0.93	1.28	0.017	1.28	0.005	0.008
Desmin	P31001	53.3 5.2	1.02	0.90	1.33	0.008	1.31	0.031	0.016
Aldehid dehidrogenaz, mitokondriyel öncü	F47738	57.0 7.5	1.05	0.50	1.26	0.005	1.20	0.005	0.005
Ökaryotik başlama faktörü 4A-1	P29562	45.4 5.3	-1.03	0.79	1.19	0.028	1.22	0.003	0.016
Yüklü multiveziküler gövde proteini 2	Q9DB34	25.1 5.9	-1.00	0.97	1.36	0.006	1.36	0.006	0.002
Indoletilamin N-metiltransferaz	P40936	30.0 6.0	1.08	0.73	2.39	0.01	2.21	0.013	0.008

**Çizelge 4.3.** *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda PR'den bağımsız olarak upregüle olan proteinler. Swiss-Prot veritabanındaki erişim numaraları kullanılmıştır. Kilodalton (kDa) cinsinden moleküler ağırlık (MA) ve izoelektrik noktası (pl) veri tabanı girişlerinden hesaplanmıştır. Ortalama hacim oranları (Oh) ve Student's t-testi ve ANOVA'nın p değerleri DeCyder versiyon 6.5 yazılımı ile hesaplanmıştır.

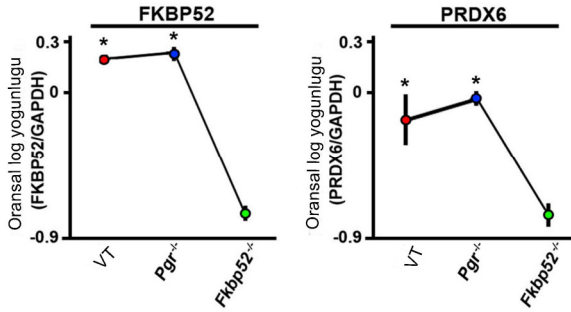
#### 4.1.4. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan Proteinler

İlginç bir şekilde sadece Peroksiredoksin6 (PRDX6) proteininin *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda PR'den bağımsız olarak anlamlı ölçüde (p=0.000043) downregüle olduğu gözlemlendi (Çizelge 4.4). FKBP52, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda saptanamamış, VT ve *Pgr*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında ise değişmemişti, bu da sonuçların güvenilirliğini ortaya koydu (Şekil 4.2).

Tanımlanan Protein	Erişim numarası	MA pI	VT ile <i>Fgr</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		VT ile <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		<i>Fgr</i> <sup>-/-</sup> ile <i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> karşılaştırması		P (ANOVA)
			Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	Oh oranı	P (t-testi)	
FK506'ya bağlanan Protein (FKBP52)	P30416	51.8 5.5	1.04	0.75	-3.62	0.0005	-3.77	0.0004	0.00006
Peroksiredoksın6 (PRDX6)	O008709	24.8 5.7	1.01	0.77	-2.01	0.04	-2.02	0.00004	0.036

**Çizelge 4.4.** *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda PR'den bağımsız olarak downregüle olan proteinler.

Swiss-Prot veritabanındaki erişim numaraları kullanılmıştır. Kilodalton (kDa) cinsinden moleküler ağırlık (MA) ve izoelektrik noktası (pI) veri tabanı girişlerinden hesaplanmıştır. Ortalama hacim oranları (Oh) ve Student's t-testi ve ANOVA'nın p değerleri DeCyder versiyon 6.5 yazılımı ile hesaplanmıştır.



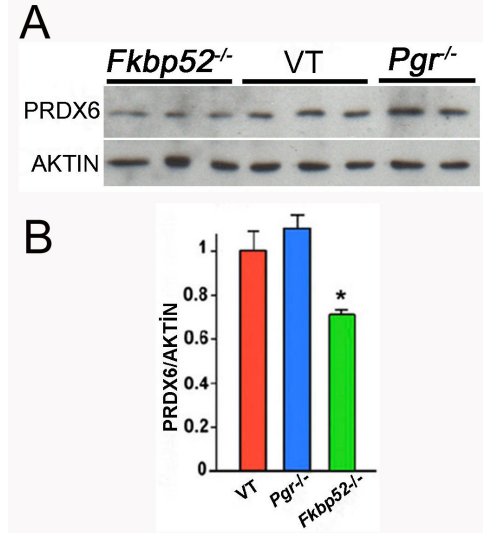
**Şekil 4.2.** Overektomize edildikten sonra P<sub>4</sub> uygulanan C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslardaki (n=4) PRDX6 protein düzeyleri VT (n=3) ve *Pgr*<sup>-/-</sup> (n=3) farelerin uterusundakilere oranla azalmıştı. FKBP52, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda saptanamamış, VT ve *Pgr*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında ise değişmemişti. \*p < 0.05. FKBP52 ve PRDX6 protein düzeyleri GAPDH protein düzeylerine oranlanmıştır.

İki boyutlu jel elektroforezi ve ardından yapılan kütle spektrometresi analizleri sonucunda *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda istatistiksel olarak downregüle olan tek proteinin PRDX6 olduğunu göstermemiz FKBP52'nin uterusu PR koşuaperon fonksiyonundan bağımsız olarak PRDX6 aracılığıyla gerçekleştirdiği bir başka rolü daha olduğunu ortaya koymuştur. Ancak elde edilen bu bulgunun Western Blot ve İmmünohistokimya yöntemleri ile de doğrulanması gerekiyordu. Bunun için C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Pgr*<sup>-/-</sup> ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler overektomize edildi, iki hafta süreyle dinlendirildikten sonra 2 gün boyunca tek doz intraperitoneal P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml) enjekte edildi, 24 saat sonra sakrifiye edilerek uterusları toplandı. Üç adet VT, 3 adet *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve 2 adet *Pgr*<sup>-/-</sup> fareye ait uterusu Western Blot ve İmmünohistokimya yöntemleri uygulandı.

#### 4.2. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan PRDX6'nın Western Blot Yöntemi İle Gösterilmesi

Western Blot sonuçlarına göre PRDX6 proteininin *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusuaki ekspresyonu VT ve *Pgr*<sup>-/-</sup> fare uteruslarına oranla daha düşüktü. PRDX6 ekspresyonu

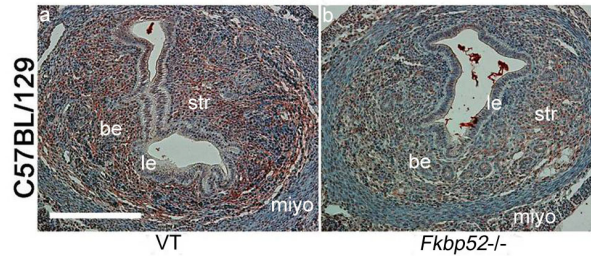
için VT ile *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.05$ ) ama *Pgr*<sup>-/-</sup> ve VT uteruslar arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi. Proteomiks bulgusu Western Blot yöntemi ile doğrulanmış oldu (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.A)** Overektomize edildikten sonra P<sub>4</sub> uygulanan C57BL/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve *Pgr*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda uygulanan PRDX6 ve Aktin Western Blotu. **B)** PRDX6 bant yoğunluklarının Aktin bant yoğunluklarına oranlanması ile elde edilen grafik. \* $p < 0.05$ , *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ile VT uterus oranlaması. Değerler iki ya da üç örneğin ortalama  $\pm$  standart hatasına aittir.

#### 4.3.*Fkbp52*<sup>-/-</sup> Fare Uterusunda Ekspresyonu Azalan PRDX6'nın İmmünohistokimya Yöntemi İle Gösterilmesi

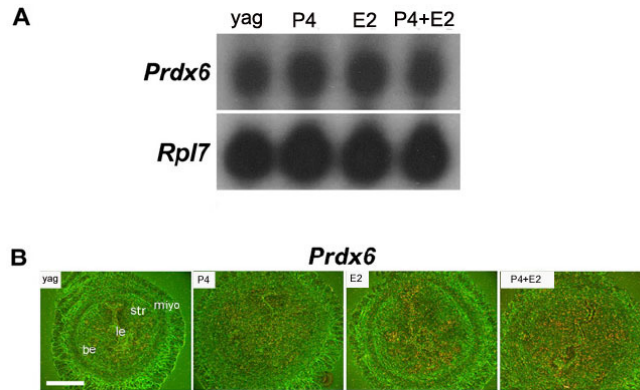
İmmünohistokimya sonuçlarına göre PRDX6, VT uterusunda stromada daha yoğun olacak şekilde stroma ve epitelde eksprese edildi. Buna karşın *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda ekspresyon aynı bölgelerde görülmekle birlikte VT'ye oranla daha azdı. Proteomiks bulgusu İmmünohistokimya yöntemi ile doğrulanmış oldu (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** Overektomize edildikten sonra P<sub>4</sub> uygulanan C57BL/129 genetik zeminli a)VT ve b)*Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda uygulanan PRDX6 immünohistokimyası. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, miyo: miyometriyum, str: stroma. Ölçek: 200  $\mu$ m.

#### 4.4. Progesteron (P<sub>4</sub>) ve Östrojenin (E<sub>2</sub>) Uterusta *Prdx6* Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Fare uterusunda *Prdx6* ekspresyonu üzerine ovaryan hormonlar olan P<sub>4</sub> ve E<sub>2</sub>'nin etkisini belirleyebilmek için overektomize edildikten sonra 2 hafta boyunca dinlendirilen ve tek doz intraperitoneal yağ, P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml), E<sub>2</sub> (100ng) veya P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub> kombinasyonu enjekte edilen CD1 genetik zeminli VT farelerden alınan uteruslarda İn situ hibridizasyon ve Northern Blot yöntemleri uygulandı. Northern Blot bulgularımız P<sub>4</sub> veya E<sub>2</sub>'nin *Prdx6* ekspresyon düzeyini önemli ölçüde değiştirmediyi gösterdi (Şekil 4.5A). İn situ hibridizasyon bulgularına göre; yağ enjekte edilen fare uterusunda *Prdx6* lümen ve bez epiteline lokalize zayıf bir ekspresyon gösterdi. P<sub>4</sub> enjekte edilen fare uterusunda *Prdx6* stromaya lokalizeydi. E<sub>2</sub> enjekte edilen fare uterusunda ise P<sub>4</sub> enjekte edilenden farklı olarak *Prdx6* lümen ve bez epiteline lokalizeydi. Hem P<sub>4</sub> hem de E<sub>2</sub> enjekte edilen fare uterusunda ise *Prdx6* sadece P<sub>4</sub> ya da sadece E<sub>2</sub> enjekte edilen gruptakilerle uyumlu olarak lümen ve bez epiteli ile stromaya lokalizeydi (Şekil 4.5B). Bulgularımıza göre gebe fare uterusunda stromal hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için gerekli olan P<sub>4</sub> (bknz 2.5.2.2. Uterus Reseptivitesi) *Prdx6* ekspresyonunun stromaya lokalize olmasını indükledi.



Şekil 4.5.A-B. A) Overektomize edildikten sonra yağ, P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> ya da P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub> enjekte edilen CD1 genetik zeminli VT farelerin uterusunda *Prdx6* mRNA'sını belirlemek için uygulanan Northern Blot, *Rpl7* yüklem kontrolü.

B) Overektomize edildikten sonra yağ, P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub> ya da P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub> enjekte edilen VT farelerin uterusunda uygulanan *Prdx6* İn situ hibridizasyonu. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, miyo: miyometriyum, str: stroma. Ölçek: 200 µm.

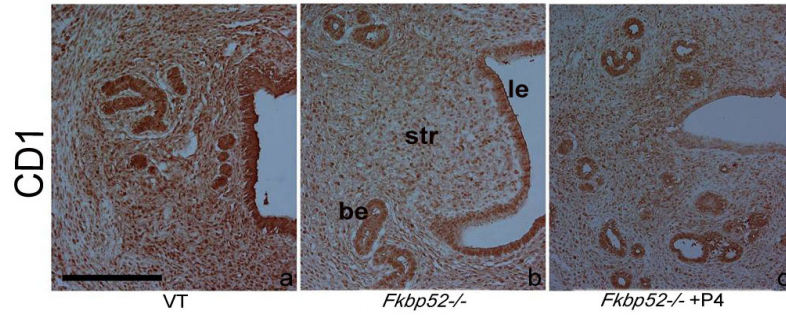
#### 4.5. Gebeliğin 4. Gününde Bulunan CD1 ve C57BL6/129 Genetik Zeminli Vahşi Tip, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> Uygulanmış *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelerin Uterusunda PRDX6 Ekspresyonunun İmmünohistokimya Yöntemi İle Gösterilmesi

Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli VT, gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ile P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda PRDX6 immünohistokimyası uygulandı ve aşağıdaki bulgular elde edildi:

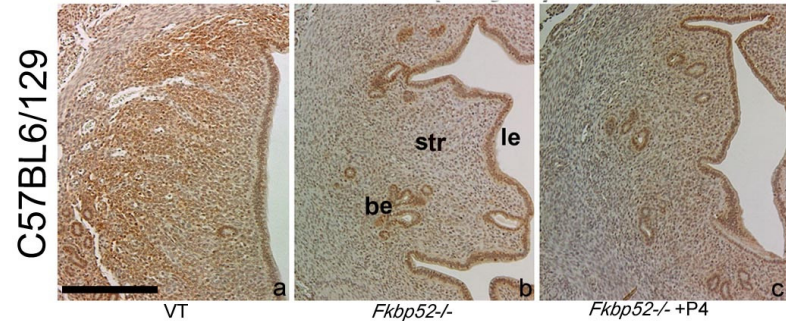
CD1 VT dişi farelerde PRDX6, lümen ve bez epiteli ile stromaya lokalizeydi (Şekil 4.6a). P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda PRDX6, VT uterusu benzer şekilde lümen ve bez epiteli ile stromaya lokalizeydi. Ancak bu bölgelerdeki ekspresyon

-özellikle stromadaki- VT uterusu oranla daha azdı (Şekil 4.6b). P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu ise ekspresyon bez epiteli ve özellikle stromadaydı, P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu oranla artmış ve VT uterusu benzer bir hal almıştı (Şekil 4.6c).

C57BL6/129 VT dişi farelerde PRDX6, lümen ve bez epiteli ile stromaya lokalizeydi (Şekil 4.7a). P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu PRDX6 lokalizasyonu VT uterusu ile aynı olmasına karşın ekspresyon şiddeti özellikle stromada çok daha azdı (Şekil 4.7b). C57BL6/129 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu PRDX6 ekspresyonu, CD1 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu farklı olarak P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu oranla artış göstermedi (Şekil 4.7c). CD1 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyon gerçekleşmesine karşın C57BL6/129 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyonun gerçekleşmeme nedeninin özellikle stromada azalan PRDX6 ekspresyonu olma ihtimali çok yüksektir. Dışarıdan uygulanan P<sub>4</sub> CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde stromada PRDX6 ekspresyonunu indükleyebilmesine karşın C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde indükleyememektedir. Bu nedenle bu farelerde implantasyonun gerçekleşmiyor olma ihtimali yüksektir.



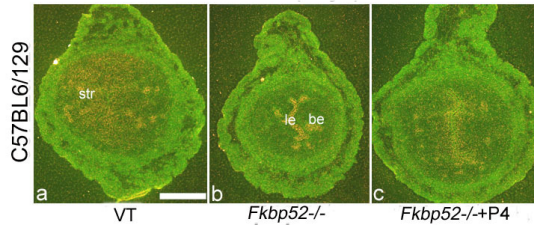
**Şekil 4.6.** Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli a)VT, b)*Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve c)P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında uygulanan PRDX6 immünohistokimyası. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, str: stroma. Ölçek: 200 µm.



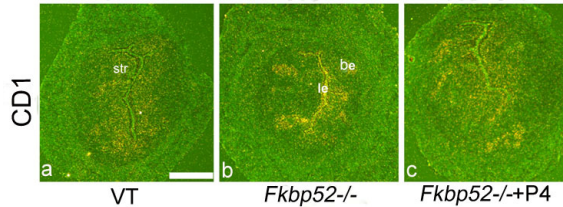
**Şekil 4.7.** Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli a)VT, b)*Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve c)P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında uygulanan PRDX6 immünohistokimyası. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, str: stroma. Ölçek: 200 µm.

#### 4.6. Gebeliğin Farklı Günlerinde Bulunan CD1 ve C57BL6/129 Genetik Zeminli Vahşi Tip, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> Uygulanmış *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelerin Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde *Prdx6* Ekspresyonunun İn Situ Hibridizasyon Yöntemi İle Gösterilmesi

Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde *Prdx6* için uygulanan İn situ hibridizasyon sonuçları şu şekildeydi: Her iki genetik zemindeki VT uteruslarda *Prdx6* hem stroma hem de epitelde eksprese edildi (Şekil4.8a ve Şekil4.9a). Buna karşın P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteruslarda *Prdx6* primer olarak epitelde eksprese edildi (Şekil4.8b ve Şekil 4.9b). C57BL6/129 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde *Prdx6* yoğunluklu olarak bez ve lümen epitelinde eksprese olmaya devam ederken stromada zayıf ekspresyon gözlemlendi. Buna karşın CD1 genetik zeminli P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde lümen ve bez epitelindeki ekspresyonun yanı sıra subluminal stromada belirgin *Prdx6* ekspresyonu gözlemlendi (Şekil4.8c ve Şekil4.9c). Bu sonuçlara göre CD1 genetik zeminli farelerde *Fkbp52* uterusunda *Prdx6* ekspresyonunun düzenleyicilerinden birisidir.



**Şekil 4.8.** Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli a)VT, b)*Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve c)P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında uygulanan *Prdx6* İn situ hibridizasyonu. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, str: stroma. Ölçek: 200 µm.

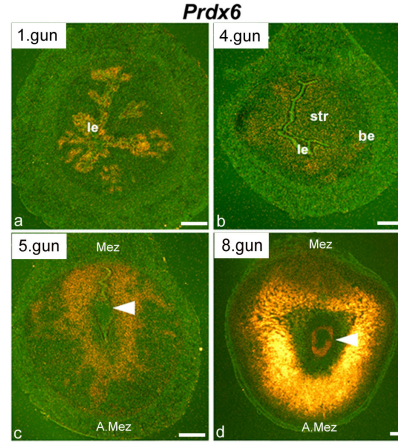


**Şekil 4.9.** Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli a)VT, b)*Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve c) P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında uygulanan *Prdx6* İn situ hibridizasyonu. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, str: stroma. Ölçek: 200 µm.

Ayrıca gebeliğin 1, 4, 5, 8 ve 12. günlerinde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde *Prdx6* ekspresyonu ile gebeliğin 5 ve 12. günlerinde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelere ait implantasyon bölgelerinde *Fkbp52* ekspresyonunu belirlemek amacıyla İn situ hibridizasyon yöntemi kullanıldı.

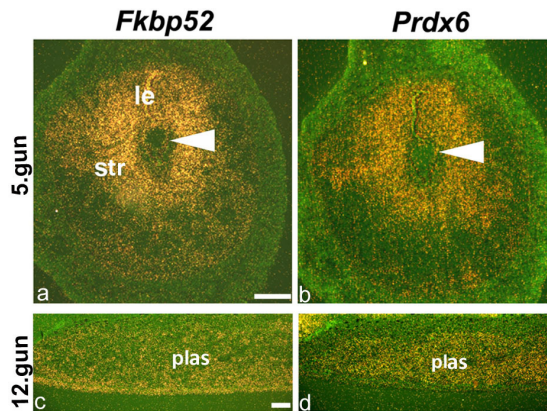
Gebeliğin 1. gününde *Prdx6* lümen ve bez epitelinde eksprese edildi (Şekil 4.10a). 4. günde ekspresyon stromada gözlemlendi (Şekil 4.10b). 5. günde yani implantasyonun gerçekleştiği günde hem *Fkbp52* hem de *Prdx6* implante olan blastosist

etrafındaki desidualize olan stromada eksprese edildi (Şekil 4.10c; Şekil 4.11a-b). 8.günde *Prdx6* primer olarak sekonder desial zondaki hücreler ve embriyoda eksprese edildi ve bu gündeki ekspresyon şiddeti önceki günlere göre daha fazlaydı (Şekil 4.10d). Gebeliğin 12. gününde hem *Fkbp52* hem de *Prdx6* plasentanın labirent tabakasında eksprese edildi (Şekil 4.11c-d).



**Şekil 4.10.** CD1 genetik zeminli farelerde gebeliğin a)1, b)4, c) 5 ve d)8. günlerine ait uterus ve implantasyon bölgelerinde uygulanan *Prdx6* İn situ hibridizasyonu. Okbaşları embriyoyu göstermektedir. be: bez epiteli, le: lümen epiteli, str: stroma, mez: mezometriyum, a.mez: antimezometriyum. Ölçek: 200 µm.

Gebeliğin 5. gününde implante olan blastosistin etrafında *Fkbp52* ve *Prdx6* ekspresyonlarının örtüşmesi implantasyon olayının, bu iki molekülü düzenleyebileceğini göstermektedir. Gebeliğin 12. gününde *Fkbp52* ve *Prdx6*'nın plasenta ve desiduada benzer lokalizasyon göstermesi ve plasentada gebeliğin 12. gününde *Pgr* eksprese edilmemesi literatür bilgisi (48) bu iki molekülün bu dokularda PR'den bağımsız rolleri olabileceğini göstermektedir.

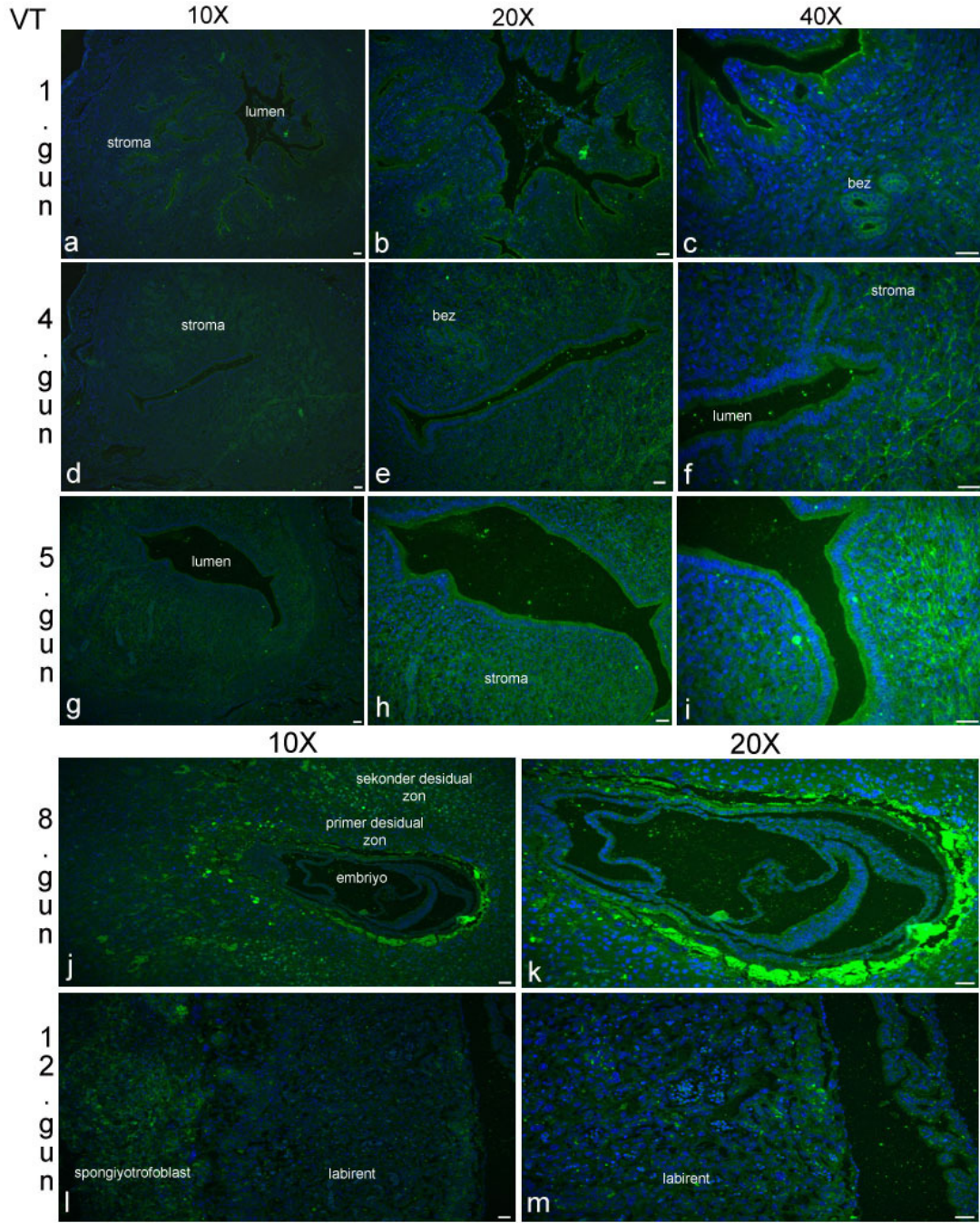


**Şekil 4.11.** CD1 genetik zeminli farelerde gebeliğin a)5 ve c)12. günlerindeki *Fkbp52* ile gebeliğin b)5 ve d)12. günlerindeki *Prdx6* ekspresyonları. Okbaşları embriyoyu göstermektedir. le: lümen epiteli, plas: plasenta, str: stroma. Ölçek: 200 µm.

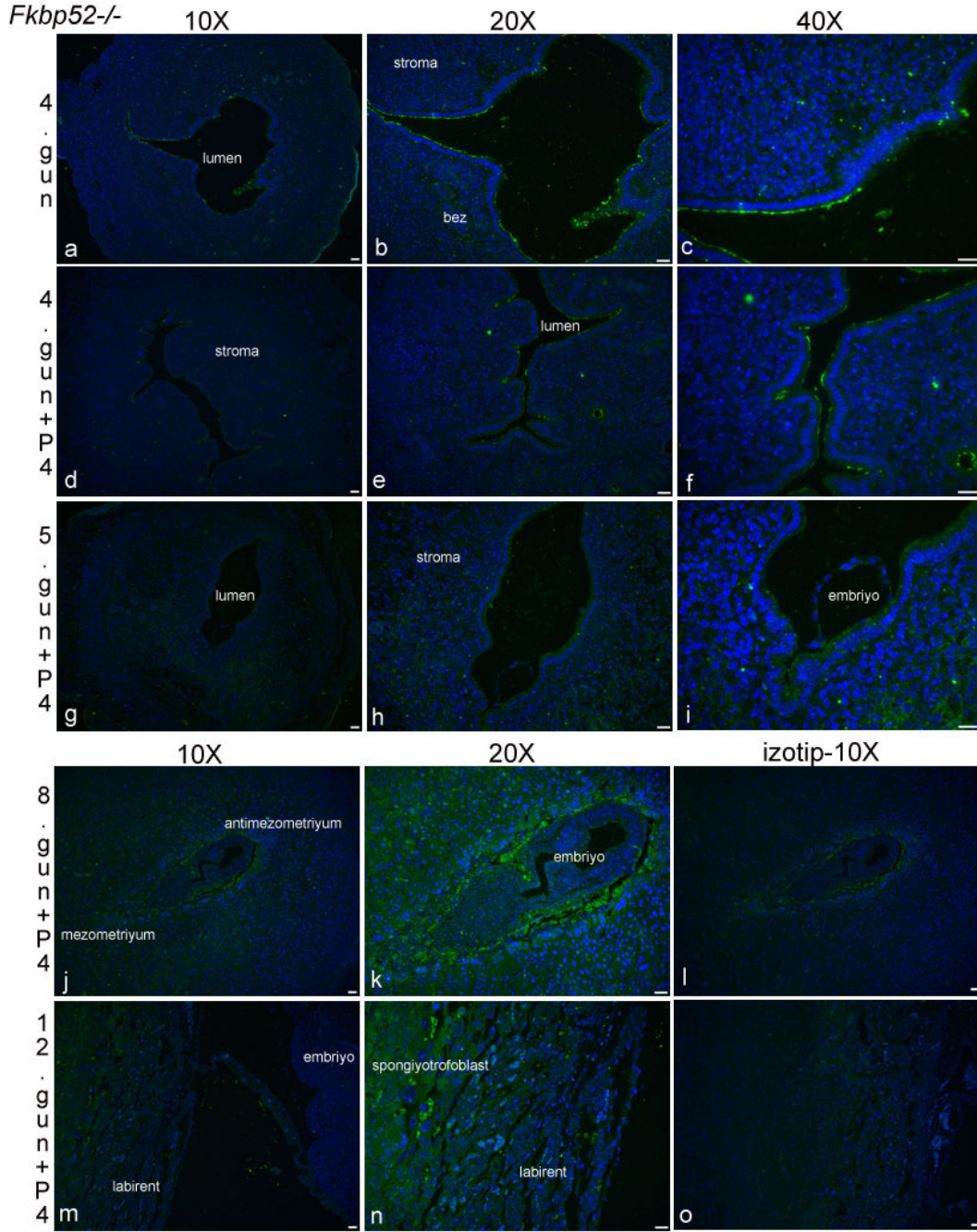
#### **4.7. Gebeliğin Farklı Günlerinde Bulunan CD1 Genetik Zeminli Vahşi Tip, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> Uygulanmış *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelere Ait Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde PRDX6 Ekspresyonunun İmmünofloresan Yöntemi İle Gösterilmesi**

Gebeliğin 1. gününde bulunan VT farelere ait uterusu PRDX6 lümen ve bez epitelinde eksprese edildi (Şekil 4.12a-b-c). Gebeliğin 4. gününde VT uterusu PRDX6 ekspresyonu lümen ve bez epitelinin yanı sıra stromada gözlemlendi (Şekil 4.12d-e-f). Gebeliğin 4. günündeki P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde PRDX6 ekspresyonu lümen epitel hücrelerinde devamlılık göstermeyecek şekildeydi. Diğer bir ifadeyle bazı epitel hücreleri PRDX6 eksprese ederken bazıları etmemekteydi. Bez epitel hücrelerinde ise ekspresyon yok denecek kadar azdı (Şekil 4.13a-b-c). Gebeliğin 4. günündeki P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uterusunda PRDX6 ekspresyonu lümen epitelinde devamlılık göstermeyecek şekildeydi, stromadaki ekspresyon ise aynı günde P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu oranla az miktarda artış gösterdi. Ayrıca enjekte edilen P<sub>4</sub>'ün etkisiyle lümen kapanma eğilimi gösterdi ve VT uterusu benzedi (Şekil 4.13d-e-f). Gebeliğin 5. gününde VT implantasyon bölgesindeki ekspresyon 4. güne oranla daha fazla olacak şekilde stromada görüldü, ayrıca lümen epitelinde ekspresyon devam etmekteydi (Şekil 4.12g-h-i). Aynı günde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> implantasyon bölgesindeki ekspresyon VT'dekine oranla çok daha azdı ve lümen epitel ile stromada gözlemlendi (Şekil 4.13g-h-i). Gebeliğin 8. gününe ait VT implantasyon bölgelerinde PRDX6 yoğun şekilde sekonder ve primer desidual zonda eksprese edildi (Şekil 4.12j-k). Aynı günde *Fkbp52* KO implantasyon bölgesine baktığımızda primer desidual zon ve daha yoğun olacak şekilde sekonder desidual zonda gözlemlendi (Şekil 4.13j-k). Pariyetal ve visseral endoderm hücreleri arasında gözlenen birikimlerin spesifik reaksiyon olmadığı negatif kontrol kesitlerinden anlaşıldı (Şekil 4.13l). Gebeliğin 12. gününe ait VT implantasyon bölgesinde PRDX6 ekspresyonunun plasentanın labirent ve özellikle spongiyotrofoblast tabakalarında olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12l-m). Aynı günde *Fkbp52*<sup>-/-</sup> implantasyon bölgesinde VT'dekine oranla labirent tabakasındaki PRDX6 ekspresyonunun azaldığı ancak spongiyotrofoblast tabakasındaki ekspresyonun değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.13m-n). İzotip kontrolde ekspresyonun gözlenmemesi PRDX6 ekspresyonunun spesifik olduğunu gösterdi (Şekil 4.13o).





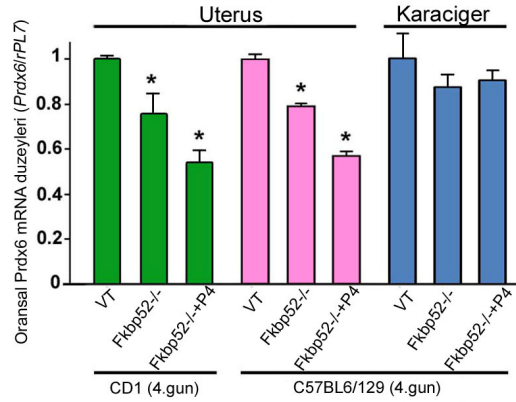
**Şekil 4.12.** Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli VT farelerde PRDX6 için uygulanan immüno Floresan yöntemi. a,b,c) 1. gün uterus; d,e,f) 4. gün uterus; g,h,i) 5. gün implantasyon bölgesi; j,k) 8. gün implantasyon bölgesi; l,m) 12. gün implantasyon bölgesi. Ölçek: 20 µm.



**Şekil 4.13.** Gebeliğin farklı günlerindeki CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde PRDX6 için uygulanan immüno Floresan yöntemi. a,b,c) P<sub>4</sub> enjekte edilmemiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait 4. gün uterus; d,e,f) P<sub>4</sub> enjekte edilmiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait 4. gün uterus; g,h,i) P<sub>4</sub> enjekte edilmiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait 5. gün implantasyon bölgesi; j,k) P<sub>4</sub> enjekte edilmiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait 8. gün implantasyon bölgesi; l) izotip kontrol; m,n) P<sub>4</sub> enjekte edilmiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait 12.gün implantasyon bölgesi; o) izotip kontrol. Ölçek: 20 µm.

#### 4.8. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelerde Uterusa Spesifik *Prdx6* Eksikliğinin Northern Blot Yöntemi İle Gösterilmesi

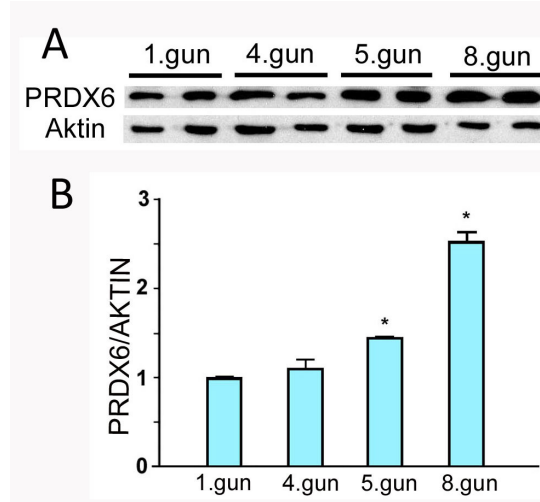
Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> 3'er farklı fareye ait karaciğer ve uteruslar ile CD1 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda *Prdx6* mRNA düzeyleri Northern Blot yöntemiyle belirlendi. Her iki genotipte de *Prdx6* ekspresyon düzeyleri VT uterusu oranla *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusu istatistiksel olarak önemli olacak şekilde azaldı. C57BL6/129 genetik zeminli farelere ait karaciğerlerde yapılan Northern Blot ise VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> veya P<sub>4</sub> verilmiş *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler arasında *Prdx6* açısından önemli bir farklılık olmadığını gösterdi (Şekil 4.14). Bu bulgu FKBP52 eksikliğinin uterusu spesifik etkisini göstermektedir. *Fkbp52* geni sistemik olarak silinmiş farelerde *Prdx6* sistemik olarak azalma eğilimi göstermek yerine uterusu azalma eğilimi göstermiştir. Bu da FKBP52'nin PR sinyalindeki koşaperon rolüne ek olarak uterusu PRDX6 aracılığıyla oksidan/antioksidan durumunun dengelenmesindeki rolünü gösterir.



Şekil 4.14. Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> 3'er farklı fareye ait karaciğer ve uteruslar ile CD1 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda *Prdx6* için uygulanan Northern Blot analizi. *Prdx6* mRNA düzeyi *Rpl7* mRNA düzeylerine oranlanmıştır.

#### 4.9. Farklı Gebelik Günlerine Ait Uterus ve İmplantasyon Bölgelerinde PRDX6 Ekspresyonunun Western Blot Yöntemi İle Gösterilmesi

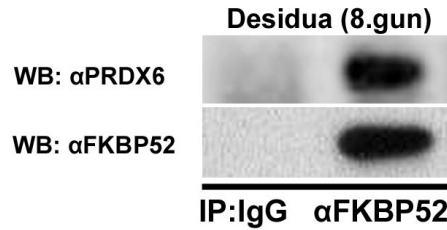
CD1 genetik zeminli ve gebeliğin 1, 4, 5 ve 8. günlerinde bulunan VT farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde PRDX6 ekspresyonu Western Blot ile belirlendi. 5. ve 8. günlere ait implantasyon bölgelerindeki PRDX6 ekspresyonu 1 ve 4. günlere ait uteruslara oranla daha fazlaydı (Şekil 4.15).



**Şekil 4.15.** A)Gebeliğin 1, 4, 5 ve 8. günlerinde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelere ait uterus ve implantasyon bölgelerinde PRDX6 ekspresyonunun Western Blot yöntemi ile belirlenmesi. Her grupta iki farklı fareye ait örnek kullanılmıştır. Veriler ortalama± standart hata olarak belirtilmiştir. B)PRDX6 bant yoğunluklarının Aktin bant yoğunluklarına oranlanması ile elde edilen grafik. \*p < 0.05, 1. güne oranla.

#### 4.10. Desidual Hücrelerde FKBP52 İle PRDX6 Arasındaki Fiziksel Etkileşimin İmmünopresipitasyon Yöntemiyle Gösterilmesi

CD1 genetik zeminli 8 günlük VT gebe farelere ait desidua hücrelerinde FKBP52 proteinini çöktürüldükten sonra yapılan Western Blot ile FKBP52'nin desiduada PRDX6 ile fiziksel olarak etkileşimde olduğu görüldü. Kontrol amacıyla çökteltideki FKBP52 proteininin varlığı gösterilerek deneyin doğruluğu kanıtlanmış oldu (Şekil 4.16).



**Şekil 4.16.** CD1 genetik zeminli 8 günlük VT gebe farelere ait desidua hücrelerinde FKBP52 ile PRDX6 arasındaki fiziksel etkileşimi gösteren immünopresipitasyon. Desidual hücrelerden izole edilen proteinler anti-FKBP52 antitadisi ile çöktürülmüş, çökteltideki PRDX6 ve FKBP52 proteinleri Western Blot ile belirlenmiştir. İmmüoglobulin G (IgG) kontrol amaçlı kullanılmıştır.

#### 4.11. Parakuatın İmplantasyona Etkileri

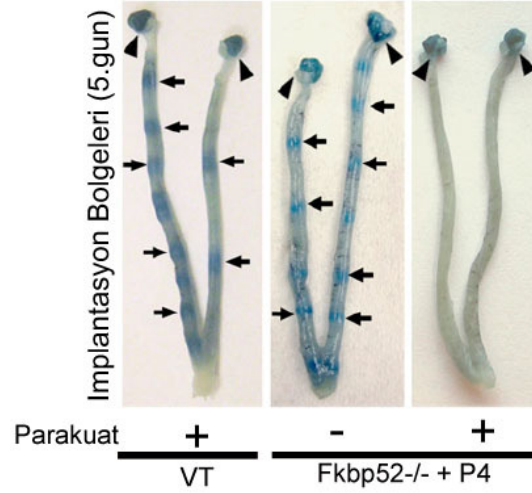
Gebeliğin 4. gününde bulunan hem CD1 hem de C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde özellikle stromada *Prdx6* mRNA'sı ve proteininin azalması bulgusundan yola çıkarak *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterusunun oksidatif strese (OS) daha

yatkın olduğunu düşündük. Bunu kanıtlayabilmek için VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> gebe farelere OS indükleyici parakuatın farklı dozlarını enjekte ederek OS'ye karşı hassasiyetlerini belirledik ve karşılaştırdık.

Parakuatın letal olmayan ve implantasyona engel olan en düşük dozunu belirlemek amacıyla gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT fareler ile gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> (2mg/0.1ml) enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilere gebeliğin 4. gününde farklı dozlarda parakuat intraperitoneal olarak enjekte edildi ve gebeliğin 5. gününde implantasyon bölgeleri incelendi. İlk denenen parakuat dozu 30mg/kg idi. Bu dozun hem VT hem de *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyona tamamen engel olduğu görüldü. İkinci denenen parakuat dozu 20mg/kg idi. Bu doz ile VT farelerin hepsinde (%100) implantasyon gerçekleşirken dışarıdan P<sub>4</sub> desteği verilmesine rağmen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin sadece %20'sinde implantasyon gerçekleşti (Çizelge 4.5, Şekil 4.17).

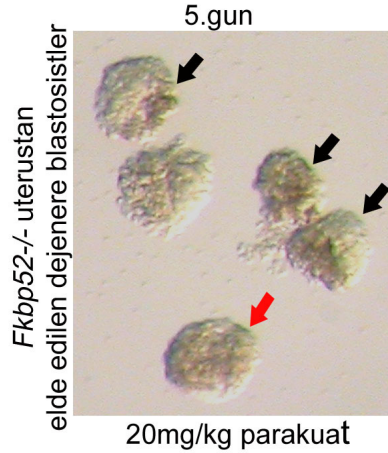
Genotip	Parakuat (mg/kg)	Fare sayısı	İB'ne sahip fare sayısı (%)	İB sayısı	Elde edilen blastosist sayısı
Vahşi Tip	15	7	7 (%100)	12.1 ± 1.7	Uterus yıkanmamıştır
	20	7	7 (%100)	12.0 ± 0.7	Uterus yıkanmamıştır
<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> + P <sub>4</sub>	0	8	8 (%100)	10.6 ± 0.6	Uterus yıkanmamıştır
	2	11	3 (%27)	10.0 ± 2.1	36 <sup>a</sup>
	15	7	2 (%29)*	12.0 ± 2.3	25 <sup>b</sup>
	20	5	1 (%20)*	5.0	17 <sup>c</sup>

**Çizelge 4. 5.** CD1 genetik zeminli VT dişi fareler ile gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişi farelere gebeliğin 4. gününde farklı dozlarda parakuat enjekte edilmiş ve implantasyon bölgeleri (İB) gebeliğin 5. gününde kontrol edilmiştir. Değerler ortalama± standart hata şeklinde gösterilmiştir. \*p < 0.05 (student's t-testi) aynı doz parakuat enjekte edilen VT fare ile karşılaştırıldığında. a, 9 fareden 36 blastosist elde edilmiştir; b, 5 fareden 25 blastosist elde edilmiştir; c, 4 fareden 17 blastosist elde edilmiştir.



**Şekil 4.17.** CD1 genetik zeminli VT, P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen ve gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52-/-* dişi farelere gebeliğin 4. gününde 20 mg/kg parakuat enjekte edilmiş ve gebeliğin 5. gününde implantasyon bölgeleri fotoğraflandırılmıştır. Oklar implantasyon bölgelerini, okbaşları ovaryumları göstermektedir.

Normal koşullarda gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> desteği verilen *Fkbp52-/-* farelerde implantasyonun gerçekleşme oranı %100 idi. İmplantasyon bölgesi görülmeyen ya da zayıf bant şeklinde görülen farelerin uterusları PBS ile yıkandığında dormant/aktif olmayan görünümü ya da dejenere olan blastosistler elde edildi (Şekil 4.18). Yani 20 mg/kg parakuat blastosistlerin dormant hale gelmesine ya da dejenere olmasına neden olmaktadır.



**Şekil 4.18.** CD1 genetik zeminli ve gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52-/-* dişi farelere gebeliğin 4. gününde 20 mg/kg parakuat enjekte edilmiş, 5. günde sakrifikasyon öncesi kuyruk veninden Chicago mavisi enjekte edilmiştir. Sakrifikasyon sonrası implantasyon bölgesi görülmeyen farelerin uterusları PBS ile yıkanmış ve dormant halde (kırmızı ok) ve dejenere olan blastosistler (siyah oklar) izole edilmiştir.

Daha sonra 2 mg/kg parakuat denendi. 2mg/kg parakuat uygulanan VT farelerin hepsinde implantasyon bölgesi (İB) gözlenirken, *Fkbp52-/-* farelerin %27'sinde İB

gözlendi (Çizelge 4.5). Sonuç olarak *Fkbp52-/-* farelerde letal olmayan ve implantasyona engel olan en düşük parakuat dozunun 2mg/kg olduğuna karar verildi.

CD1 genetik zeminli *Fkbp52-/-* farelerde OS'ye karşı azalan tolerans, implantasyonun parakuat indüklü başarısızlığına neden olur. Bu farelerde fazla P<sub>4</sub>, parakuat tarafından indüklenen OS durumunda implantasyon başarısızlığını ortadan kaldıramamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak FKBP52'nin PR koşaperon aktivitesi ve diğer potansiyel fonksiyonlarından başka OS'yi düzenlemede rolü olduğunu söyleyebiliriz.

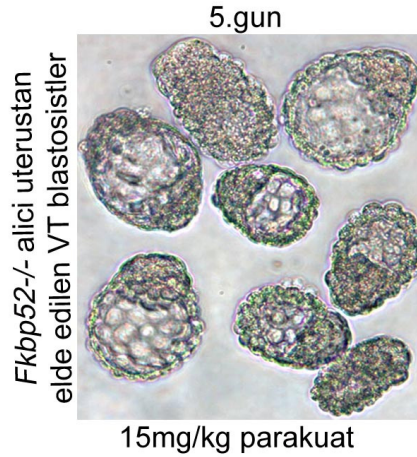
#### 4.12. Parakuatın Blastosist Transferine Etkileri

Parakuat uygulanan *Fkbp52-/-* farelerde implantasyonun gerçekleşmeme nedeninin uterus mu yoksa blastosist mi olduğunu belirleyebilmek için blastosist transfer deneyleri yapıldı. Blastosistin parakuat uygulaması sonucu dejenere olması ya da inaktif hale gelmesi ihtimalini ortadan kaldırmak için sağlıklı VT blastosistler kullanıldı. Bunun için CD1 genetik zeminli VT gebe farelerden elde edilen 4 günlük blastosistler, transferden yaklaşık 5 saat önce 15mg/kg parakuat enjekte edilen yalancı gebeliğin 4. gününde bulunan VT ve P<sub>4</sub> enjekte edilmiş *Fkbp52-/-* farelere transfer edildi. *Fkbp52-/-* farelerde implantasyona engel olan en düşük parakuat dozu 2mg/kg olmasına rağmen transfer deneylerinde 15mg/kg parakuat kullandık. Çünkü transfer ettiğimiz blastosistler VT farelerden elde edilen VT blastosistlerdi. Daha önceki denemelerimizde 15mg/kg parakuatın VT farelerde implantasyona engel olmadığını gösterdik. 2mg/kg parakuat kullansaydık bu düşük dozun blastosist üzerinde bir etkisi olup olmadığını görmemiz mümkün olmayabilirdi. Yalancı gebe farelerde pre-implantasyon periyodu boyunca hormonal çevre ve uterus reseptivitesi normal gebeliktekine benzerdir. Transferin ertesi günü farelerin implantasyon bölgeleri kontrol edildi. *Fkbp52-/-* farelerde implantasyon bölge sayıları VT farelere oranla azaldı. VT fareler ise normal implantasyon gösterdiler (Çizelge 4.6).

Blastosistlerin genotipi	Alıcıların genotipi	Parakuat (mg/kg)	Transfer edilen blastosist sayısı	Alıcı sayısı	İB'ne sahip fare yüzdesi (%)	İB sayısı (%)	Elde edilen blastosist sayısı
VT	VT	15	77	6	6 (%100)	58/77 (%75)	Uterus yıkanmamıştır
VT	<i>Fkbp52-/-</i> +P <sub>4</sub>	15	60	5	1 (%20)	1/60 (%2)	30*

**Çizelge 4.6.** CD1 genetik zeminli 4 günlük gebe VT farelere ait blastosistler yalancı gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 VT fareler ile yalancı gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52-/-* farelere transfer edilmiştir. Transferden yaklaşık 5 saat önce alıcı farelere 15mg/kg parakuat enjekte edilmiştir. İmplantasyon bölgesi (İB) gözlenmeyen farelerin uterusları PBS ile yıkanmıştır. \*: 4 fareden 30 blastosist elde edilmiştir.

İmplantasyon yüzdesi çok düşük olan *Fkbp52-/-* farelerde uterusun PBS ile yıkanmasından sonra elde edilen blastosistlerin sağlıklı olduğu görüldü (Şekil 4.19). *Fkbp52-/-* farelere VT blastosistler transfer edilmesine rağmen implantasyonun gerçekleşmeme nedeni bu farelerin uteruslarının OS'ye olan hassasiyetidir. Yani, implantasyonun başarısızlığa uğraması blastosist değil uterus kaynaklıdır.



**Şekil 4.19.** CD1 genetik zeminli 4 günlük gebe farelerden elde edilen VT blastosistlerin 15 mg/kg parakuat enjekte edilen yalancı gebeliğin 4. günündeki *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelere transferinden 1 gün sonra *Fkbp52<sup>-/-</sup>* fare uteruslarının yıkanmasıyla elde edilen sağlıklı VT blastosistler.

#### 4.13. N-Asetil Sistein ve $\alpha$ -Tokoferol Antioksidanlarının Parakuat Uygulanmış Farelerde İmplantasyona Etkileri

Oksidatif strese daha hassas olan *Fkbp52<sup>-/-</sup>* dişilere N-Asetil Sistein (NAS) ve  $\alpha$ -Tokoferol ( $\alpha$ -TKF) antioksidanlarını uygulamanın implantasyon başarısını artırıp artırmayacağını belirlemeyi amaçladık. P<sub>4</sub>, parakuat ve NAS ile  $\alpha$ -TKF uygulanan ya da NAS ile  $\alpha$ -TKF'nin uygulanmadığı CD1 genetik zeminli *Fkbp52<sup>-/-</sup>* fareleri gebeliğin 5. gününde sakrifiye edip implantasyon bölgelerini (İB) inceledik. Antioksidan uygulanmayıp sadece 2mg/kg parakuat uygulanan *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelerde implantasyonun gerçekleştiği fare yüzdesi oldukça düşüktü-%10. Parakuatın yanısıra NAS ve  $\alpha$ -TKF uygulanan *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelerde ise implantasyon başarısı %63 idi (Çizelge 4.7).

OS'ye daha hassas olan *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelere uygulanan NAS ve  $\alpha$ -TKF antioksidan kombinasyonu parakuatın oluşturduğu implantasyon başarısızlığını ortadan kaldırmıştır.

Genotip	Parakuat (2mg/kg)	NAS + $\alpha$ TKF	Fare sayısı	İB'ne sahip fare sayısı (%)	İB sayısı (ortalama $\pm$ SEM)	Elde edilen blastosist sayısı
<i>Fkbp52<sup>-/-</sup></i> +P <sub>4</sub>	+	-	10	1 (%10)	13.0	35 <sup>a</sup>
	+	+	8	5 (%63)*	6.2 $\pm$ 1.7	22 <sup>b</sup>

**Çizelge 4.7.** Gebeliğin 2-4 günleri boyunca P<sub>4</sub>, NAS (50 mg/kg) ile  $\alpha$ -TKF (1 g/kg) uygulanan ve NAS ile  $\alpha$ -TKF'nin uygulanmadığı CD1 genetik zeminli *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelere gebeliğin 4. gününde 2mg/kg parakuat enjekte edilmiştir. Gebeliğin 5. gününde implantasyon bölgeleri (İB) incelenmiştir. \*p < 0.05, sadece aynı dozda parakuat enjekte edilen *Fkbp52<sup>-/-</sup>* farelere oranla. a: 9 fareden 35 blastosist elde edilmiştir. b: 3 fareden 22 blastosist elde edilmiştir. Mavi bantların çok zayıf olduğu ya da görünmediği farelerden dormant görünümlü blastosistler elde edilmiştir.

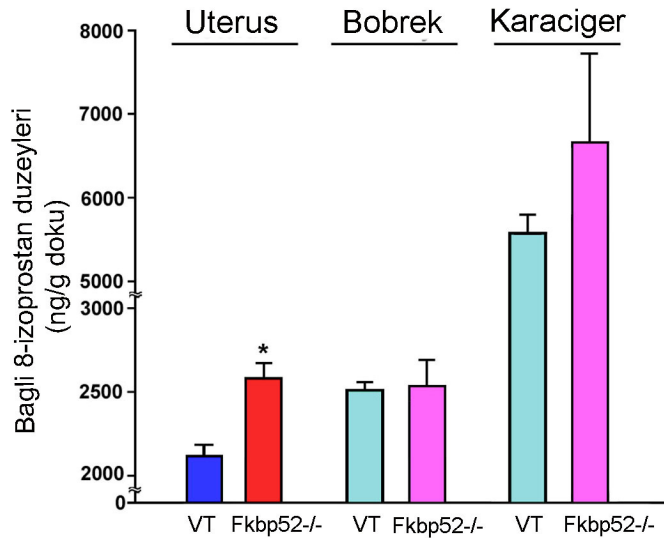


#### 4.14. Yalancı Gebeliğin 4. Gününde Bulunan Farelere Ait Uterus, Karaciğer ve Böbreklerde 8-izoprostan İle Lipit Peroksidasyonunun Belirlenmesi

*Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin OS'ye daha hassas olduklarını lipid peroksidasyon belirteci olan 8-izoprostan düzeylerini ölçerek kanıtlamak istedik. Bu amaçla yalancı gebeliğin 4. gününde olan C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerdeki 8-izoprostan düzeylerini ng/gr doku düzeyinden belirledik. Böbrek için bağı 8-izoprostan miktarları VT fareler için  $2.50 \pm 0.05$  ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler için  $2.53 \pm 0.18$  idi yani 8-izoprostan düzeyleri birbirine yakındı. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin karaciğerlerindeki 8-izoprostan düzeyi ( $6.77 \pm 0.99$ ) VT farelerdekine ( $5.55 \pm 0.25$ ) oranla daha yüksekti ancak bu değerler arasında istatistiksel bir farklılık yoktu. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterustaki 8-izoprostan düzeyi ( $2.56 \pm 0.12$ ) VT farelerdekine ( $2.13 \pm 0.05$ ) oranla daha yüksekti ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.8). Bu değerlere ait grafik Şekil 4.20'de görülmektedir.

Doku	Genotip	Bağı 8-izoprostan (ng/gr doku)
Uterus	VT	$2.13 \pm 0.05$
	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup>	$2.56 \pm 0.12^*$
Karaciğer	VT	$5.55 \pm 0.25$
	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup>	$6.77 \pm 0.99$
Böbrek	VT	$2.50 \pm 0.05$
	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup>	$2.53 \pm 0.18$

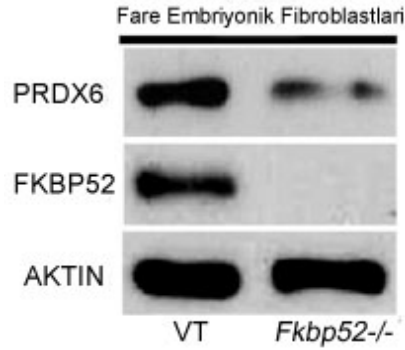
**Çizelge 4.8.** Yalancı gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerde ölçülen 8-izoprostan düzeyleri. 4 VT ve 3 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareye ait sonuçlar ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p < 0.05, VT'ye oranla.



**Şekil 4.20.** Yalancı gebeliğin 4.gününde bulunan C57BL6/129 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerde ölçülen 8-izoprostan düzeylerine ait grafik. 4 VT ve 3 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareden elde edilen sonuçlar ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p < 0.05, VT'ye oranla.

#### 4.15. Fare Embriyonik Fibroblastlarında PRDX6 Ekspresyonunun Western Blot İle Belirlenmesi

Kültüre edilen VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerden önce protein izole edildi ardından PRDX6 ve FKBP52 ekspresyonları Western Blot yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.21). *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lerde FKBP52 proteini beklenildiği gibi eksprese edilmedi. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lerde PRDX6 ekspresyonu VT farelere ait FEF'lerdekine oranla önemli ölçüde azaldı.



Şekil 4.21. VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerden elde edilen fare embriyonik fibroblastlarında PRDX6 ekspresyonunun Western Blot yöntemi ile belirlenmesi. Aktin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

#### 4.16. Hidrojen Peroksit ve N-Asetil Sistein Uygulanan Fare Embriyonik Fibroblastlarında Hücre Canlılığının MTT Assay İle Belirlenmesi

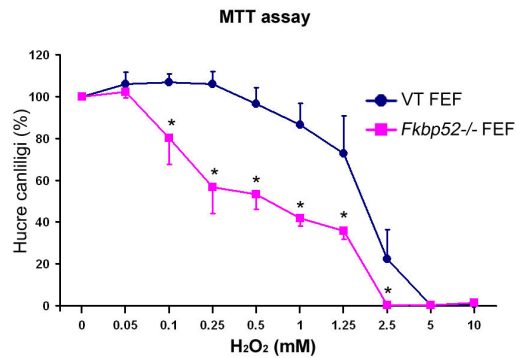
PRDX6 fosfolipid peroksidasyonu ile ilişkili membran hasarından hücreleri koruduğu için *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lerde hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ile OS oluşturulması durumunda bu hücrelerde PRDX6 miktarının azalması nedeniyle hücre canlılığının azalacağını düşündük. Bunu göstermek amacıyla CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lere farklı konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulandı.  $H_2O_2$ 'nin bu hücrelere yaptığı etki canlılık testi olan MTT assay ile belirlendi. Yaptığımız bir diğer deneyde ise FEF'leri hem OS indükleyici  $H_2O_2$  hem de antioksidan NAS ile muamele ettik ve NAS'ın hücre canlılığı üzerindeki etkisini MTT assay ile belirledik.

Farklı konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulanan FEF'lerde yapılan MTT assay sonunda kültür ortamına salınan formazan miktarı ölçüldü ve matematiksel değerler elde edildi. Bu değerler Çizelge 4.9'da görülmektedir.

$H_2O_2$ konsantrasyonu (mM)	0	0.05	0.1	0.25	0.5	1	1.25	2.5	5	10
VT FEF (ortalama±SEM)	100±0	106,1±5,5	106,7±4	106±5,9	96±7,6	86±10	72±17,9	22±14	0,28±0,27	0,86±0,5
<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> FEF (ortalama±SEM)	100±0	102±2,76	80±12,7*	56,7±12,6*	53±6,9*	41,8±3,7*	35,8±4*	0,23±0,44*	0,46±0,21	1,35±0,05

Çizelge 4.9. 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda  $H_2O_2$  uygulanan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lere uygulanan MTT assay sonunda kültür ortamına salınan formazan miktarları. Sonuçlar 3 bağımsız deneyde kullanılan 6 pasajın ortalaması olup ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p < 0.05, VT'ye oranla.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmayan, sadece medyum ile kültüre edilen hücrelerin canlılık değerleri 100 olarak kabul edildi. 0.05 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerin canlılık değerleri arasında önemli bir farklılık yoktu. Yani 0.05 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerin canlılığını etkilemedi. 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.25 ve 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerdeki canlılık oranının VT FEF'lere oranla istatistiksel olarak önemli olacak ölçüde daha az olmasına neden oldu. 5 ve 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise hem VT hem de *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerin çoğunun ölümüne neden oldu, çok az sayıda canlı hücre elde edilebildi (Şekil 4.22).

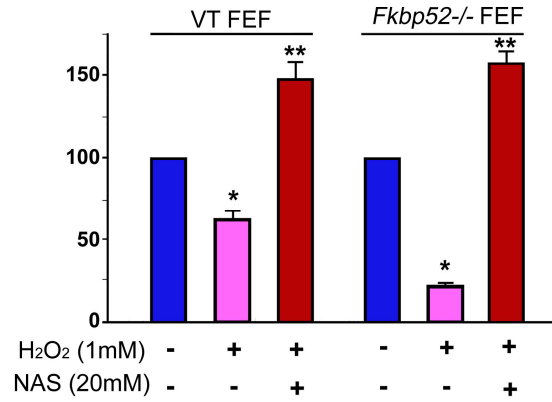


**Şekil 4.22.** 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait FEF'lere uygulanan MTT assay sonunda kültür ortamına salınan formazan miktarlarını gösteren grafik. Sonuçlar 3 bağımsız deneyde kullanılan 6 pasajın ortalaması olup ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p < 0.05, VT'ye oranla.

Hidrojen peroksit ve N-Asetil Sistein uygulanan FEF'lere yapılan MTT assay sonucu kültür ortamına salınan formazan miktarlarını gösteren matematiksel değerler Çizelge 4.10'da görülmektedir. Sadece medyum ile kültüre edilen hücrelerin canlılık değerleri 100 olarak kabul edildi. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerdeki canlılık oranı 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan VT FEF'lerdekine oranla istatistiksel olarak önemli olacak şekilde daha azdı. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 20 mM NAS uygulanan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerdeki canlılık oranları hem sadece medyum hem de 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kültüre edilen gruptakilere oranla istatistiksel olarak önemli olacak şekilde artış gösterdi (Şekil 4.23).

	medyum	1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 20mM NAS
<b>VT FEF</b> (ortalama±SEM)	100±0	62,9±4,9*	147,9±10,6**
<b><i>Fkbp52</i><sup>-/-</sup> FEF</b> (ortalama±SEM)	100±0	22±1,6*	157,7±7,1**

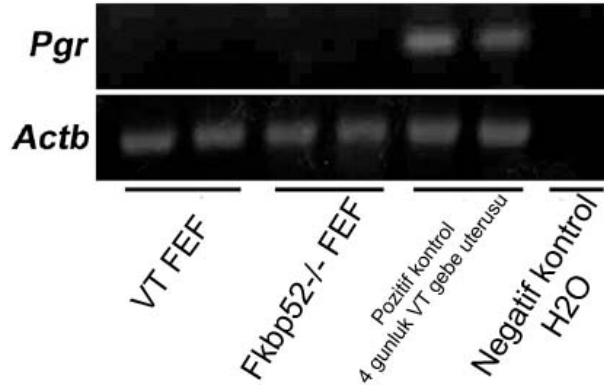
**Çizelge 4.10.** Medyum, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+20mM N-Asetil Sistein (NAS) uygulanan FEF'lere yapılan MTT assay sonunda kültür ortamına salınan formazan miktarları. Sonuçlar 3 bağımsız deneyde kullanılan 6 pasajın ortalaması olup ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p<0.05, aynı genotipteki farelerden elde edilen ve medyumla kültüre edilen hücrelere oranla. \*\* p<0.05 aynı genotipteki farelerden elde edilen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kültüre edilen hücrelere oranla.



**Şekil 4.23.** Medyum, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+20mM N-Asetil Sistein (NAS) uygulanan FEF'lere yapılan MTT assay sonunda kültür ortamına salınan formazan miktarlarını gösteren grafik. Sonuçlar 3 bağımsız deneyde kullanılan 6 pasajın ortalaması olup ortalama± standart hata şeklinde sunulmuştur. \*p<0.05, aynı genotipteki farelerden elde edilen ve medyumla kültüre edilen hücrelere oranla. \*\*p<0.05 aynı genotipteki farelerden elde edilen ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile kültüre edilen hücrelere oranla.

#### 4.17. Fare Embriyonik Fibroblastlarında Progesteron Reseptörü (*Pgr*) Ekspresyonunun RT-PCR İle Belirlenmesi

Yaptığımız deneyler sonucunda FKBP52'nin PR koşaperon fonksiyonundan bağımsız olarak uterusu PRDX6 ile etkileşerek oksidan/antioksidan düzeylerini etkilediği ortaya çıktı. PR'den bağımsız bir fonksiyondan bahsedebilmemiz için PR'yi kodlayan *Pgr* mRNA'sının FEF'lerde eksprese edilmediğini göstermemiz gerekliydi. Bunun için VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde *Pgr* için RT-PCR yapıldı. Negatif kontrolde bant gözlenmemesi deneyimizin doğruluğunu gösterdi. Pozitif kontrol olarak kullanılan CD1 genetik zeminli VT farelere ait 4 günlük gebe uterusunda *Pgr* mRNA'sı eksprese edilmekteydi. Ancak VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde *Pgr* mRNA'sının eksprese edilmediği gözlemlendi (Şekil 4.24). FEF'lerde *Pgr* eksprese edilmemesi diğer bir ifadeyle PR olmaması FKBP52'nin PR koşaperon fonksiyonundan bağımsız rolünü gösterir.



**Şekil 4.24.** VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare embriyonik fibroblastlarında (FEF) progesteron reseptörü (*Pgr*) mRNA'sının RT-PCR ile belirlenmesi. Aktin (*Actb*) internal kontrol olarak kullanılmıştır. CD1 genetik zeminli 4 günlük VT gebe uterusu pozitif, su ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

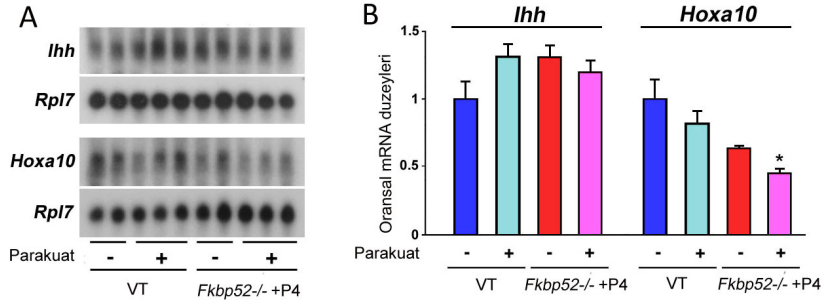
FEF'ler ile yaptığımız deneyler sonucunda elde ettiğimiz bulguları şu şekilde özetleyebiliriz: FKBP52 eksikliği azalan PRDX6 düzeyleri ile ilişkilidir; bu da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tarafından indüklenen hücre ölümünü artırır. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerdeki bu olumsuz etki NAS desteği ile tersine çevrilir. FKBP52 eksikliği PRDX6 düzeylerini azaltarak Reaktif Oksijen Türleri (ROT)'ne karşı eşik değerin düşmesine sebep olabilir.

#### 4.18. Vahşi Tip ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelerin Uterusunda *Indian Hedge Hog (Ihh)* ve *Hoxa10* Ekspresyonlarına Parakuatın Etkisinin Northern Blot Yöntemi İle Belirlenmesi

Gebeliğin 4. gününde VT uterusunda *Prdx6* özellikle stromada eksprese edilir. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda ise stromadaki ekspresyon büyük ölçüde azalmıştır. VT farelere 20 mg/kg'lık parakuat uygulaması implantasyonu olumsuz etkilemezken OS'ye daha hassas olan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere 2mg/kg'lık parakuat uygulaması bile implantasyonu büyük ölçüde engellemiştir. Gebeliğin 4. gününde bulunan P<sub>4</sub> uygulanmış *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde stromada azalan *Prdx6*, parakuat uygulandığında stromal fonksiyonun daha çok azalmasına neden olarak bu farelerde implantasyonun gerçekleşmemesine neden olabilir. Bunu araştırabilmek amacıyla CD1 VT fareler ile gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere gebeliğin 3. gününde 2 mg/ml parakuat enjekte edildi, bu fareler gebeliğin 4. gününde sakrifiye edilerek uterusları alındı. P<sub>4</sub> sinyal yolağının etkilediği genlerden olan ve gebeliğin 4. günündeki fare uterusunda stromada eksprese edilen *Hoxa10* ile epitelde eksprese edilen *Indian Hedge Hog (Ihh)*'nin ekspresyonları Northern Blot ile belirlendi. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda parakuat uygulaması *Ihh* ekspresyonunu değiştirmezken *Hoxa10* ekspresyonunu azalttı (Çizelge 4.11, Şekil 4.25). Bu bulgudan yola çıkarak stromal *Prdx6* uterusun OS'den korunmasında ve implantasyonun gerçekleşmesinde daha önemlidir diyebiliriz.

	<i>Indian hedge hog</i> ( <i>Ihh</i> )		<i>Hoxa-10</i>	
	Parakuat (-)	Parakuat (+)	Parakuat (-)	Parakuat (+)
VT	1±0,11	1,31±0,08	1±0,14	0,82±0,09
<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup>	1,3±0,07	1,19±0,07	0,64±0,02	0,46±0,03*

**Çizelge 4.11.** Gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> uygulanan CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler ile VT farelere gebeliğin 3. gününde 2mg/ml parakuat enjekte edilmiş, gebeliğin 4. gününde toplanan uteruslara uygulanan Northern Blot ile belirlenen *Indian hedge hog* (*Ihh*) ve *Hoxa10* mRNA düzeyleri *Rpl7* mRNA düzeylerine oranlanarak tablodaki değerler elde edilmiştir. Değerler ortalama±standart hata şeklinde belirtilmiştir. \*p<0.05, parakuat uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterustaki *Hoxa10* ekspresyonunun parakuat uygulanmayan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterustaki *Hoxa10* ekspresyonuna kıyaslanması.

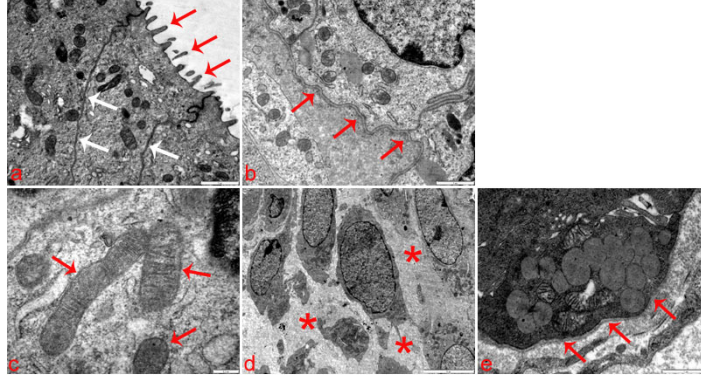


**Şekil 4.25. A)** Gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> uygulanan CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler ile VT farelere gebeliğin 3. gününde 2mg/ml parakuat enjekte edilmiş, 4. gününde sakrifiye edildikten sonra elde edilen uteruslarda *Indian hedge hog* (*Ihh*) ve *Hoxa10* mRNA ekspresyonları Northern Blot ile belirlenmiştir. Her grupta farklı farelere ait 2 ya da 3'er örnek kullanılmıştır. **B)** *Indian hedge hog* (*Ihh*) ve *Hoxa10* mRNA düzeylerinin *Rpl7* mRNA düzeylerine oranlanması sonucu elde edilen değerlere ait grafik. Değerler ortalama±standart hata şeklinde belirtilmiştir. \*p<0.05, parakuat uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterustaki *Hoxa10* ekspresyonunun parakuat uygulanmayan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterustaki *Hoxa10* ekspresyonuna kıyaslanması.

#### 4.19. Gebeliğin 4. Gününde Bulunan CD1 Genetik Zeminli Vahşi Tip, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> Uygulanmış *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Farelerin Uterusunda Elektron Mikroskopik Bulgular

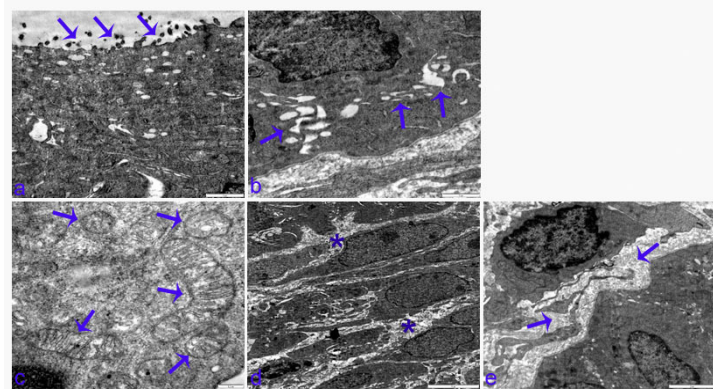
Gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler ile VT fareler gebeliğin 4. gününde sakrifiye edildi, alınan uteruslar gerekli işlemlerden geçirildikten sonra transmisyon elektron mikroskopunda incelendi. VT farelere ait uteruslarda yaptığımız incelemeler sonucunda lümeni döşeyen tek katlı prizmatik epitel yüzeyindeki silyumlar ile epitel hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin (Şekil 4.26a) ayrıca epitel hücrelerinin bazal laminalarının düzenli olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26b). Şekil 4.26c'de VT fareye ait uterusta normal yapıdaki mitokondriler kristalleriyle birlikte görülmekte. Stroma hücreleri arasında geniş hücre

dışı matriks alanları bulunmaktaydı (Şekil 4.26d). Şekil 4.26e’de mitokondri ve salgı damlaları ayırtebileilen stromada yer alan normal bir bez yapısı görülmekte.



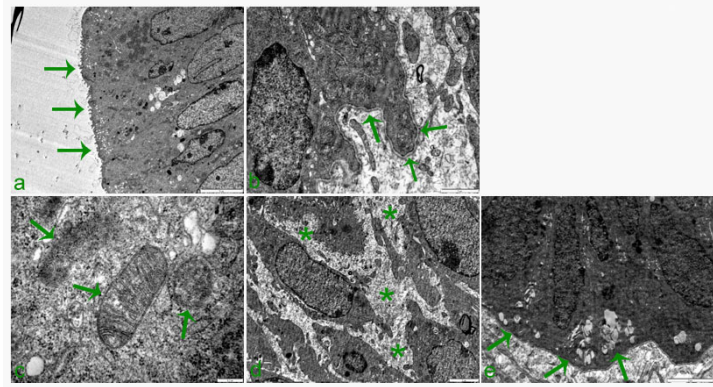
**Şekil 4.26.** Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli VT farelerin uterus elektronmikrografı. a) lümen epiteli hücrelerinin apikalinde yer alan düzenli silyumlar ve hücrelerarası bağlantılar sırasıyla kırmızı ve beyaz oklar ile gösterilmekte, büyütme 10000X. b) oklar epitel hücrelerine ait düzenli bazal lamina yapısını göstermekte, büyütme 10000X. c) oklar mitokondrileri işaret etmekte, büyütme 35970X. d) yıldızlar stroma hücreleri arasındaki geniş hücre dışı matriks alanlarını göstermekte, büyütme 2610X. e) oklarla işaret edilen stromada yer alan bez yapısı, büyütme 12930X.

P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus örneklerinde VT örneklerden farklı olarak epitel yüzeyindeki silyumların düzensiz olduğu gözlemlendi (Şekil 4.27a). Lümeni döşeyen tek katlı prizmatik epitel hücreleri arasında intersiyal boşluklar bulunmaktaydı (Şekil 4.27b). VT uterusüne oranla mitokondri sayısında artış gözlemlendi (Şekil 4.27c). Stroma hücreleri arasındaki hücre dışı matriks alanları VT uterusüne oranla çok daha azdı (Şekil 4.27d). Şekil 4.27e’de bezi oluşturan hücreler arasındaki boşluklar dikkat çekmekteydi.



**Şekil 4.27.** Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterus elektronmikrografı. a) düzensiz lümen epiteli ve silyum yapıları oklar ile gösterilmekte, büyütme 10000X. b) epitel hücreleri arasında yer alan intersiyal boşluklar oklar ile gösterilmekte, büyütme 10000X. c) sayıları artmış mitokondriler oklar ile gösterilmekte, büyütme 10000X. d) stroma hücreleri arasında azalmış hücre dışı matriks alanları yıldızlar ile gösterilmekte, büyütme 2610X. e) stromada yer alan bezi oluşturan hücreler arasındaki boşluklar oklar ile gösterilmekte, büyütme 6000X.

P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus örneklerinde lümeni döşeyen tek katlı prizmatik epitel hücreleri düzenli sil yapıları ile VT uterustaki epitel hücrelerine benzemektedir (Şekil 4.28a). Epitel hücrelerinin bazal laminaları VT uterustan farklı olarak düzenli olmayan bir yapı gösterdi (Şekil 4.28b). P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> örneklerde artış gösteren mitokondri sayısı azalarak VT uterustakine benzer bir hal almıştı (Şekil 4.28c). VT uterusta olduğu gibi stroma hücreleri arasında geniş hücre dışı matriks alanları bulunmaktaydı (Şekil 4.28d). Stromada yer alan bez yapıları VT uterustakiler gibi normal yapıda gözlemlendi ancak P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda gözlenen hücrelerarası boşluk yapılarına rastlandı (Şekil 4.28e).



**Şekil 4.28.** Gebeliğin 2-4. günlerinde P<sub>4</sub> enjekte edilen CD1 genetik zeminli 4 günlük gebe *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterus elektronmikrografı. a) lümen epitel hücreleri ve apikalinde yer alan düzenli silyumlar oklar ile gösterilmekte, büyütme 2156X. b) oklar epitel hücrelerine ait düzensiz bazal lamina yapısını göstermekte, büyütme 10000X. c) mitokondriler oklar ile gösterilmekte, büyütme 35970X. d) stroma hücreleri arasında bulunan geniş hücre dışı matriks alanları yıldızlar ile gösterilmekte, büyütme 3597X. e) stromada yer alan ve hücrelerarası boşluk içeren bezler oklar ile gösterilmekte, büyütme 6000X.



## TARTIŞMA

Embriyo ve uterus arasındaki karşılıklı etkileşim hala merak uyandıran ve sırları tam olarak ortaya çıkarılamamış bir konudur. İnsanlarda bu konuyu çalışmak hem zorlukları hem de etik kısıtlamalar nedeniyle mümkün olmamaktadır. Bu nedenle bu alandaki çalışmalar genleri insan ile %99 benzerlik gösteren farelerde yapılmaktadır. Gelişimin erken dönemleri de dahil olmak üzere insan biyolojisinin birçok özelliğinin fareler ile benzer olması ve gen teknolojisinin ilerlemesi sonucu üretilen geni çıkarılmış modelleri sayesinde fareler, insan fizyolojisi ve patofizyolojisini çalışmak için uygun modeller olmuşlardır.

Embriyonun uterusu yerleşmesi olarak basit bir şekilde tanımlayabileceğimiz implantasyon sürecinde birçok karmaşık olay yaşanır. Farede uterus gebelik boyunca pre-reseptif, reseptif ve non-reseptif fazlara ayrılır (7, 20). Uterus gebeliğin sadece 4. gününde (implantasyon günü) reseptif olur, 5. günde non-reseptif olur ve blastosist olsa bile implantasyon gerçekleşmez. Bu kadar sınırlı bir zamanda gerçekleşen ve oldukça hassas dengelere bağlı olan implantasyon olayında birçok farklı sinyal yolağı rol almasına karşın primer rolü P<sub>4</sub>-PR sinyali oynar.

P<sub>4</sub> etkisini nükleer progesteron reseptörü (PR) aracılığıyla gerçekleştirir. PR'nin tek bir genden eksprese edilen PRA ve PRB olmak üzere iki izoformu vardır. Her iki izoforma ait genlerin silindiği farelerin infertil olması bu sinyal yolağının dışı üreme sistemindeki önemini göstermektedir (71, 72). P<sub>4</sub>'ün hedefindeki genler arasında homeobox transkripsiyon faktörleri, büyüme faktörleri ve sitokinler yer alır (49).

Steroid reseptörler ligand yokluğunda sitoplazma ve/ya nükleusta şaperon ve koşaperon proteinleri ile birlikte bulunur. Bu proteinlere örnek olarak Hsp90, Hsp70, p23 ve immünofilinler olarak adlandırılan Hsp90'a bağlanan tetratrikopeptit tekrar (TPR) domeni içeren protein ailesi verilebilir (93). Bir immünofilin olan FK506'ya bağlanan protein 52 (FKBP52), steroid hormon reseptör aktivitesini değiştiren bir Hsp90 koşaperonudur. İmmünofilinler, belli immün baskılayıcı ilaçların etkilerine aracılık ederler. FKBP52'nin reseptör-şaperon kompleksleri ile işbirliği reseptör-hormon bağlanmasının artmasını sağlar (94) (97) (98). FKBP52, PR aktivitesini etkin hale getirmesine karşın verimli olmayan bazal PR aktivitesi FKBP52 olmadan da gerçekleşir. Ligand bağlanması reseptör-şaperon heterokompleksinin bozulmasına neden olur ve reseptör aktif hale gelerek transkripsiyon faktörü olarak davranır. Nükleusta DNA'ya bağlanarak gen transkripsiyonunu aktive eder ya da diğer transkripsiyon faktörleri ile etkileşerek transkripsiyonu inhibe eder.

Dr. Dey ve ekibi ekspresyonu P<sub>4</sub> tarafından düzenlenen genlerden biri olan *Hoxa-10* geni çıkarılmış farelerin uterusunda yaptıkları proteomiks çalışması ile bu farelerin uterusunda FKBP52'nin downregüle olduğunu bulmuşlardır (112). Bu bulgudan yola çıkarak yaptıkları bir sonraki çalışmada C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli *Fkbp52*-/- dişi farelerin infertil olduğunu göstermişlerdir (48, 95). Bu fareler morfolojik olarak normaldir; ovulasyon ve fertilizasyonda belirgin bir anormallik göstermezler. *Fkbp52*-/- dişilerin infertil fenotipi ovulasyon ve/ya fertilizasyondaki defektler nedeniyle değil implantasyondaki başarısızlık nedeniyledir bu da *Fkbp52*-/- farelerde uterusun PR sinyaline yanıtının ovaryumunkinden farklı olduğunu gösterir. Bunun nedenlerinden biri, P<sub>4</sub>'ün sentezlendiği ovaryumdaki lokal P<sub>4</sub> düzeylerinin yüksek olması olabilir (122), yüksek düzey P<sub>4</sub> ovulasyon ve fertilizasyon olaylarında bazal PR aktivitesini artırır. İkinci neden P<sub>4</sub>'ün hedefindeki diğer organlara kıyasla uterusun gebelik boyunca daha güçlü P<sub>4</sub>/PR sinyaline ihtiyaç duyması olabilir. Üçüncü neden ise FKBP52'nin PR sinyalini etkilemenin yanısıra diğer organlarda gözlenmeyen ancak uterusu gözlenen PR'den bağımsız bir rolünün olması olabilir.

*Fkbp52*-/- dişilerin uterusundaki PR ekspresyonu ve serum P<sub>4</sub> konsantrasyonlarının vahşi tip (VT) farelerdekine benzer olduğu, ancak P<sub>4</sub>'ün PR'ye bağlanmasının azaldığı bulunmuştur [48, 95]. Yani bu farelerde P<sub>4</sub> direnci söz konusudur. PR aktivitesinin bozulduğu *Fkbp52*-/- farelere normalden daha yüksek düzeyde P<sub>4</sub> uygulamasının PR aktivitesini artırarak FKBP52 yokluğunda gebelik kaybını önleyebileceği düşünülmüştür. Bu amaçla her iki genetik zemindeki *Fkbp52*-/- dişilere gebeliklerinin 2. gününden itibaren P<sub>4</sub> içeren silastik implantlar yerleştirilmiş ve gebeliklerinin 5. gününde implantasyon bölgeleri kontrol edilmiştir. CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşirken C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda implantasyon gerçekleşmemiştir. Silastik implant aracılı P<sub>4</sub> desteği CD1 *Fkbp52*-/- dişilerde uterus reseptivitesi ve implantasyon başarısını indüklemek için serumda yeterli P<sub>4</sub> artışını sağlamış ancak gebeliğin terme kadar ilerlemesini sağlayamamıştır. Bu farelere daha fazla P<sub>4</sub> desteği sağlandığı zaman gebelik terme kadar gidebilmiş ve VT fareler gibi yavrulamışlardır.

CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli farelerde FKBP52 yokluğunda modifier (değiştirici) genler, uterusun P<sub>4</sub>-PR sinyaline farklı yanıt vermesine neden olabilirler. Bir gen mutasyona uğradığında farenin genetik zeminine bağlı olarak değişik fenotipler ile karşılaşılır (117). Bu farklı fenotiplerin modifier (değiştirici) genlerin farklı ekspresyonu ve/ya regülasyonu nedeniyle olduğu düşünülmektedir (118) ancak bu genler hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. FKBP52'nin PR aktivitesini optimize etmedeki gerekliliği genetik zemine bağlıdır ve başarılı gebelik için gereken P<sub>4</sub>-PR sinyalinin düzeyi gebeliğin evresine bağlıdır.

*Fkbp52*-/- farelere dışarıdan sağlanan P<sub>4</sub> desteği CD1 genetik zeminli olanlarda implantasyonu kurtarıırken C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda kurtaramaması, CD1 *Fkbp52*-/- farelerde gebeliğin terme ulaşabilmesi için daha fazla P<sub>4</sub> düzeylerine gereksinim duyulması, daha önce yapılan bir çalışmada plasentada *Fkbp52* eksprese edildiği halde *Pgr*'nin eksprese edilmediğinin gösterilmesi (48, 95) bulgularından yola

çıkarak FKBP52'nin PR aktivitesini optimize etmekten başka bir fonksiyonu olabileceği hipotezini kurduk. Bunu araştırmak amacıyla overektomize edildikten iki hafta sonra P<sub>4</sub> enjekte edilen C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Pgr*<sup>-/-</sup> ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uteruslarında 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi ve ardından kütle spektrometresi uygulayarak uterusların proteom profillerini karşılaştırdık. Analizler sonucunda istatistiksel olarak anlamlılık gösterecek şekilde hem *Pgr*<sup>-/-</sup> hem de *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda azalan ya da artış gösteren yani P<sub>4</sub>-PR sinyali tarafından düzenlenen proteinler ile sadece *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda artış gösteren yani P<sub>4</sub>-PR sinyali tarafından düzenlenmeyen proteinler bulundu. Ancak sadece bir proteininin ekspresyonu P<sub>4</sub>-PR sinyalinden bağımsız olarak VT oranla *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda istatistiksel olarak anlamı olacak şekilde azaldı. Bu, antioksidan protein Peroksiredoksin 6 (*Prdx6*) idi. Bu proteomiks bulgusu immünohistokimya ve Western Blot yöntemleri ile de doğrulandı.

Gebeliğin 4. gününde bulunan C57BL6/129 ve CD1 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus ve karaciğerlerde *Prdx6* mRNA düzeylerini Northern Blot yöntemiyle belirledik. Karaciğer için VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler arasında fark gözlenmezken uterus için her iki genetik zemindeki *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerdeki *Prdx6* düzeylerinin VT'ye oranla daha az olduğunu bulduk. Bu bulgu bize FKBP52 eksikliğinin uterusu spesifik etkisini gösterdi. *Fkbp52* geni sistemik olarak silinmiş farelerde *Prdx6* sistemik olarak azalmak yerine uterusu azalma eğilimi gösterdi. Bu da FKBP52'nin PR'den bağımsız uterusu spesifik rolünü gösteren diğer bir destek bulguydu.

Gebeliğin 4. gününde bulunan CD1 ve C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uteruslarda İn situ hibridizasyon ve immünohistokimya yöntemleri ile ekspresyonunu incelediğimiz *Prdx6*'nın her iki genetik zemindeki VT farelerde stromada bulunurken P<sub>4</sub> uygulanmayan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde lümen ve bez epitelinde bulunduğunu gözledik. P<sub>4</sub> uygulanan CD1 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uteruslarında ekspresyon VT'deki gibi stromada gözlenirken C57BL6/129 genetik zeminli olanlarda ekspresyon epitelde gözlenmeye devam etti. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde stromada azalan *Prdx6* ekspresyonunun parakuat uygulandığında stromal fonksiyonun daha da azalmasına neden olacağını düşünerek parakuat enjekte edilen CD1 genetik zeminli VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uterusunda P<sub>4</sub> sinyal yolağının hedef genlerinden *Ihh* ve *Hoxa-10* ekspresyonlarını Northern Blot ile belirledik. Parakuat uygulaması *Ihh* ekspresyonunu değiştirmezken *Hoxa10* ekspresyonunu azalttı. Buna göre, stromal *Prdx6* uterusun aşırı oksidatif stres (OS)'den korunmasında ve implantasyonun gerçekleşmesinde daha önemlidir diyebiliriz.

Hem CD1 hem de C57BL6/129 genetik zeminli *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare uteruslarında *Prdx6*'nın azalması bulgusundan yola çıkarak bu farelerin uterusunun OS'ye daha yatkın olduğu fikrini ortaya attık. Bunu kanıtlamak için gerçekleştirdiğimiz parakuat deneylerinde VT farelerde 20mg/kg parakuatın implantasyona engel olmazken P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde ise 2 mg/kg parakuatın implantasyona engel olduğunu gördük. Normal koşullarda P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyon %100 başarıyla gerçekleşmekteydi. Bu farelerde implantasyonun gerçekleşmeme nedeni

parakuatın uterus ya da blastosisti etkilemesi olabilirdi. Blastosist transferi çalışmaları sonucunda VT blastosistlerin transfer edildiği P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere enjekte edilen 2 mg/kg parakuatın implantasyona engel olduğunu gördük. Yani, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyonun başarısızlığa uğramasının nedeni blastosist kaynaklı değil, bu farelerin uteruslarının OS'ye olan hassasiyetiydi.

*Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde antioksidan Prdx6'nın azalmasına bağlı olarak OS'ye karşı artan hassasiyeti lipid peroksidasyon belirteci olan 8-izoprostan düzeyleri ile de gösterdik. VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus, karaciğer ve böbreklerde yaptığımız 8-izoprostan ölçümleri sonucunda karaciğer ve böbrekler için VT ile *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fareler arasında fark bulunamazken *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde uterustaki 8-izoprostan düzeyi VT'ye oranla istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksekti. Oysaki *Prdx6*<sup>-/-</sup> farelerde OS'ye karşı hassasiyet tüm sistemde gözlenmişti (204).

OS'ye karşı hassasiyet gösteren *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere antioksidan uygulanması durumunda implantasyon başarısının artacağını öngörerek bu farelere parakuatın yanı sıra N-Asetil sistein ve  $\alpha$ -Tokoferol uyguladık. Uygulanan antioksidan kombinasyonu bu farelerde implantasyon başarısını artırdı.

İn vivoda elde ettiğimiz bulguları in vitroda da kanıtlamamız gerektiğini düşünerek VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> fare embriyolarından fibroblast izolasyonu gerçekleştirdik. Fare embriyonik fibroblastlarına (FEF) OS indükleyici ajan hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) uyguladığımızda *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerin VT FEF'lere oranla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye karşı çok daha hassas olduklarını MTT assay ile gösterdik. FEF'lere N-Asetil sistein uyguladığımızda canlılık oranlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanan VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lere oranla arttığını gözledik.

Ayrıca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indüklü hücre hasarına karşı PRDX6'nın etkisini belirlemek için *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'leri *Prdx6* taşıyan plazmid ile transfekte edip 24 saat boyunca H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe ettik. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inkübe edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde yüksek oranda gözlenen ölüm oranları transfeksiyon sonrası azaldı (220). Bu sonuçlara göre, FKBP52 eksikliği PRDX6 düzeylerinin azalmasına neden olarak reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı eşik değerin düşmesine neden olur.

FKBP52'nin PR'den bağımsız fonksiyonundan bahsedebilmemiz için PR'yi kodlayan *Pgr* mRNA'sının FEF'lerde eksprese edilmediğini göstermemiz gerekliydi. FEF'lerde *Pgr* için yaptığımız RT-PCR ile VT ve *Fkbp52*<sup>-/-</sup> FEF'lerde *Pgr* mRNA'sının eksprese edilmediğini gösterdik. FEF'lerde PR olmaması FKBP52'nin PR koşaperon fonksiyonundan bağımsız rolünü kanıtlayan bir diğer bulguydu.

CD1 genetik zeminli VT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ve P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerin uteruslarında elektron mikroskopik gözlemler gerçekleştirdik. P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelere ait uterus örneklerinde VT örneklerden farklı olarak lümen epiteli yüzeyindeki silyumların düzensiz olduğu, bu epitel hücreleri arasında çok sayıda vakuol bulunduğu ve VT uterustakine oranla mitokondri sayısında artış olduğu gözlemlendi. Stroma hücreleri arasındaki hücre dışı matriks alanları VT uterusuna oranla çok daha azdı.

P<sub>4</sub> enjekte edilen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus örneklerinde ise lümen epitel hücreleri düzenli sil yapıları ile VT uterustaki epitel hücrelerine benzemektedir. P<sub>4</sub> enjekte edilmeyen *Fkbp52*<sup>-/-</sup> örneklerde artış gösteren mitokondri sayısı azalarak VT uterustakine benzer bir hal almıştır. VT uterusunda olduğu gibi stroma hücreleri arasında geniş hücre dışı matriks alanları bulunmaktaydı. Lümen epiteli ve stroma hücreleri açısından *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus ile VT uterus arasında gözlemlendiğimiz farklılıklar *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde implantasyonun gerçekleşmemesinin nedenini bize ultrastrüktürel düzeyde açıklayabilir. İmplantasyonda öncelikle trofoektoderm hücrelerinin lümen epiteline tutunması ardından epitel hücrelerinde apoptoz ve sonrasında penetrasyon basamakları gerçekleşir. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda lümen epiteli hücrelerinin yüzeyinde ve hücrelerarasında gözlenen vakuoller nedeniyle trofoektoderm hücreleri implantasyonun ilk basamağı olan tutunma olayını gerçekleştirilemiyor olabilir. Stromal hücreler de gerek desidualizasyona katılmaları gerekse parakrin etkileşimlerle epitel hücrelerini etkilemeleri nedeniyle implantasyonda önemlidirler. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterusunda stroma hücreleri arasında VT'ye oranla daha az gözlenen hücre dışı matriks alanları stromal hücreler ile epitel hücreleri arasında parakrin etkileşimde bir bozulmanın olduğunu gösterebilir.

İnsan endometriyumunda PRDX6 ve FKBP52 ekspresyonlarını incelediğimizde her iki proteinin de proliferatif faz boyunca epitel hücrelerinde, sekretuar faz boyunca epitel ve stromal hücrelerde eksprese edildiğini gördük. *Prdx6* düzeyini kantitatif PCR ile proliferatif faza oranla sekretuar fazda daha yüksek düzeyde bulduk. Bu bulgular PRDX6'nın insan implantasyonunda da antioksidan roller oynadığını göstermektedir (220).

FKBP52'nin PR kompleksindeki koşapron fonksiyonundan başka fonksiyonları da vardır. Örneğin mitoz boyunca motor protein dinein ve hücre iskeletine bağlanır (221), tübülüne bağlanarak mikrotübül dinamiklerini etkiler (222). Protein katlanması, birleşmesi, trafiği ve protein aktivitesinin düzenlenmesi rolleri vardır (223). *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde OS'ye karşı azalan tolerans implantasyonun parakuat indüklü başarısızlığına ve uterusunda yüksek düzeyde ROT üretimine neden olur. CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde parakuatın indüklediği OS nedeniyle oluşan implantasyon başarısızlığını fazla miktarda P<sub>4</sub> önleyemediği için FKBP52'nin PR koşapron aktivitesi ve diğer fonksiyonlarına ek olarak oksidan/antioksidan dengesini düzenlediğini düşünmekteyiz. Çalışmamız FKBP52'nin fonksiyonlarına bir diğerini eklemiştir.

*Fkbp52*<sup>-/-</sup> uterus azalan PRDX6 düzeyleri nedeniyle OS'ye karşı hassastır. İmmünopresipitasyon ile gösterdiğimiz FKBP52 ile PRDX6 arasındaki fiziksel etkileşimden yola çıkarak FKBP52'nin, PRDX6 proteinini stabilize ettiği ve degradasyonunu azalttığını söyleyebiliriz. Ancak FKBP52'nin PRDX6 düzeylerini hangi mekanizmalarla düzenlediğini belirlemek için daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

P<sub>4</sub> uygulanan C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> farelerde PRDX6 ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak oksidan/antioksidan sisteminin dengelenememesi nedeniyle implantasyon gerçekleşemez. PRDX6'nın azalması C57BL6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> dişilerde

yüksek miktarda P<sub>4</sub>'e rağmen implantasyon başarısızlığına ve CD1 *Fkbp52*-/- dişilerde term gebelik için normalden çok daha fazla P<sub>4</sub>'e ihtiyaç duyulmasına neden olur. Diğer bir ifadeyle P<sub>4</sub> desteği ile OS'ye karşı artan hassasiyetin bir genetik zeminde üstesinden gelinebilirken diğer genetik zeminde üstesinden gelinebilir.

*Prdx6*-/- farelerde parakuat ile OS indüklendiğinde ilginç bir şekilde diğer peroksiredoksinler, glutatyon peroksidazlar, katalazlar, süperoksit dismutazlar, tiyoredoksinler ve glutaredoksinler artış göstermez. Bu gözlem PRDX6'nın diğer peroksiredoksinler ve antioksidan proteinlerden bağımsız olarak fonksiyon gören bir antioksidan olduğunu gösterir (201) (224, 225). *Prdx6*-/- fareler yaşar ve fertildirler ancak tüm sistemlerinde parakuat tarafından oluşturulan OS'ye karşı artış gösteren bir hassasiyet gösterirler, yaşam oranları düşer, ciddi doku hasarı gösterirler ve yüksek oranda protein oksidasyon düzeylerine sahiptirler (204) (226). Bu farelerdeki parakuat indüklü OS düşük sağkalım oranı gibi anormal fenotiplere neden olur ancak buna diğer genlerin ekspresyonu ve/ya antioksidan enzimlerin aktivitesi neden olmaz (204).

PRDX6 ekzojen OS karşısında önemli bir antioksidandır (204). *Prdx6*-/- dişiler fertil olmalarına karşın bu farelerde OS'ye maruz bırakma fertilitiyi etkileyebilir. Belli genlerin fizyolojik olarak değişen koşullarda kritik fonksiyonları yerine getirdiği bilinmektedir. Örneğin, fare plasentasında eksprese edilen prolaktin benzeri protein-A (PLP-A)'nın eksikliği normal koşullar altında dişi üremesinde önemsiz bir etkiye sahiptir ancak PLP-A mutantları hipoksi stresine maruz bırakıldıklarında gebelikleri tehlikeye girer (227). *Prdx6*-/- dişilerde de PRDX6 eksikliği, OS ile birleştirilirse fertilitiyi tehlikeye düşebilir.

Peri-implantasyon boyunca embriyolar OS'ye hassas oldukları için (228) uterusda düşük O<sub>2</sub>'ye maruz kalırlar (229). Düşük O<sub>2</sub> koşullarının normal embriyo gelişimine yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bu görüş kültür ortamına konulan antioksidanların ROT-indüklü anormal embriyo gelişimini önlediği bulgusu ile uyumludur (230), (231).

Yaptığımız deneyler sonucunda; FKBP52 ve PRDX6'nın ekspresyonunun azalmasının gebelik olaylarına zarar veren oksidatif stresin oluşmasına neden olduğu, FKBP52'nin PR koşaperon etkisinden bağımsız olarak uterusda PRDX6 ile etkileşip oksidan/antioksidan düzeylerini etkileyerek gebeliği oksidatif stresten koruduğu sonucuna vardık. *Fkbp52*-/- farelerde implantasyon başarısızlığının nedeni sadece PR aktivitesinin azalması değil ayrıca OS düzeylerinin artmasıdır.

Serbest radikal hasarı ile antioksidan aktivitesi arasında bir dengesizlik olduğu zaman OS olur. Pre-eklampsi hastalarında sağlıklı gebelere oranla birçok OS markırı yüksek ve antioksidan markırları daha düşük bulunmuştur (232).

Endometriyum benzeri dokuların uterus dışında gelişmesi olan endometriyoz genellikle pelvik ağrı ve infertilitenin eşlik ettiği bir hastalıktır (233). Yapılan çalışmalara göre oksidatif stres endometriyoz patogenezi ve endometriyozla ilişkili

implantasyon başarısızlığı ile ilişkilidir (234). Hirota ve arkadaşları yaptıkları çalışmada endometriyozlu kadınların endometriyumundaki FKBP52 düzeylerinin sağlıklı kadınlara oranla azaldığını göstermişlerdir (111). Azalan FKBP52 düzeyleri endometriyal PRDX6 düzeylerinin azalmasına neden olabilir bu da uterusun ROT'ye karşı hassasiyetini artırıp endometriyozu şiddetlendirebilir ve reseptiviteyi olumsuz etkileyebilir. Endometriyoz hastası kadınların endometriyumunda yapılan gen ekspresyon profili çalışmaları ile bu kadınlarda uterus reseptivitesinin olduğu aralık boyunca P<sub>4</sub>'ün hedefindeki birçok genin ekspresyonunun sağlıklı kadınlara göre değiştiği gösterilmiştir (235). P<sub>4</sub> uygulamasının endometriyozda gerilemeye neden olması nedeniyle *Fkbp52*-/- farelerden elde edilen bulgular klinik önem taşımaktadır. P<sub>4</sub> uygulanan CD1 *Fkbp52*-/- fareler klinik açıdan P<sub>4</sub> direnci nedeniyle infertilite gösteren kadınlara benzerlik göstermektedir.

FKBP52'nin üremedeki rolleri göz önüne alındığında kontraseptif ilaçlar için bir hedef olabilir. İmplantasyondaki önemi [48,108] düşünülerek dişi kontrasepsiyonunda; *Fkbp52*-/- erkek farelerde sperm motilitesinin düşük olması (110) sebebiyle erkek kontrasepsiyonunda hedef seçilebilir.

## SONUÇLAR

Bu tezde FKBP52'nin P<sub>4</sub>-PR sinyal yolağındaki koşaperon fonksiyonundan bağımsız rolü araştırılmış ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

**1-Overektomize edildikten iki hafta sonra P<sub>4</sub> enjekte edilen C57BL6/129 genetik zeminli VT, *Pgr*-/- ve *Fkbp52*-/- farelerin uteruslarında 2 Boyutlu Ayrım Jel Elektroforezi ve ardından uygulanan kütle spektrometresi ile uterusların protein profilleri karşılaştırılmış, *Fkbp52*-/- uterusu VT uterusu oranla P<sub>4</sub>-PR sinyalinden bağımsız olarak sadece antioksidan protein PRDX6'nın azaldığı bulunmuştur.**

**2-*Fkbp52*-/- farelerde *Prdx6* spesifik olarak uterusu azalmıştır. FKBP52 ve PRDX6'nın ekspresyonunun azalması gebelik olaylarına zarar veren oksidatif stresin oluşmasına neden olmuştur.**

**3-Lipid peroksidasyon belirteci olan 8-izoprostanın sadece uterusu VT'ye oranla daha yüksek düzeyde olması oksidatif stresin uterusu spesifik etkisini göstermiştir.**

**4-FKBP52, PR koşaperon etkisinden bağımsız olarak uterusu PRDX6 ile etkileşip oksidan/antioksidan düzeylerini etkileyerek gebeliği oksidatif stresten korur.**

**5-P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*-/- farelere bir herbisit olan parakuat enjeksiyonu bu fareleri oksidatif strese daha hassas hale getirerek implantasyonu büyük ölçüde inhibe etmiştir.**

**6-P<sub>4</sub> uygulanan *Fkbp52*-/- farelere parakuatın yanı sıra N-Asetil sistein ve  $\alpha$ -Tokoferol antioksidanlarının uygulanması bu farelerdeki implantasyon başarısını artırmıştır.**

**7-*Fkbp52*-/- fareler ile in vivoda elde edilen bulgular in vitroda fare embriyonik fibroblast çalışmaları ile de doğrulanmıştır.**

**8-Elektron mikroskopi incelemeleri *Fkbp52*-/- farelerin uterusunda VT'ye oranla ultrastrüktürel düzeyde değişiklikler olduğunu göstermiştir.**

**9-Çalışmamız FKBP52'nin fonksiyonlarına bir diğerini eklemiştir.**



## KAYNAKLAR

1. Sadler T. Langman's Medikal Embriyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık; 1993.
2. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2002.
3. [www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml](http://www.informatics.jax.org/greenbook/frames/frame1.shtml).
4. <http://en.wikipedia.org/wiki/Estrus#Estrus>.
5. Sezer DZ. Ergot Alkaloidleri Ve Yarı Sentetik Türevlerinin Uterus Üzerindeki Etki Mekanizmaları Tıpta Uzmanlık Tezi. Kayseri; 2005.
6. Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996.
7. Psychoyos A. Endocrine Control of Egg Implantation. Handbook of Physiology. Washington, DC: American Physiology Society; 1973.
8. Beer AE, Billingham RE. Immunoregulatory aspects of pregnancy. Fed Proc 1978; 37: 2374-2378.
9. DeFeo VJ. Decidualization. Cellular Biology of the Uterus. Amsterdam: North Holland; 1967.
10. Kirby DRS, Cowell TP. Trophoblast-host Interactions. Epithelial-Mesenchymal Interactions. Baltimore: Williams&Wilkins; 1968.
11. Soares MJ, Hunt JS. Methods in Molecular Medicine Placenta and Trophoblast Methods and Protocols Volume I. Totowa, New Jersey Humana Press; 2006.

12. Yoshinaga K, Takahide M. Development of preimplantation mammalian embryos and their environment. Satellite symposium of the 8th International Congress of Endocrinology. Japan: July 14-16, 1988.
13. Magnuson T, Epstein CJ. The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation. New York: Plenum; 1987.
14. Wu TC, Wang L, Wan YJ. Expression of estrogen receptor gene in mouse oocyte and during embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 1992; 33: 407-412.
15. Gardner RL. Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol* 1982; 68: 175-198.
16. Snell GD, Stevens LC. Early Embryology, in *Biology of the Laboratory Mouse*. New York: McGraw-Hill; 1996.
17. Rossant J, Cross J. Extraembryonic lineages, in *Mouse Development; Patterning, Morphogenesis and Organogenesis*. San Diego: Academic; 2002.
18. Dickson AD. Trophoblastic Giant Cell Transformation of Mouse Blastocysts. *J Reprod Fertil* 1963; 6: 465-466.
19. Barlow PW, Sherman MI. The biochemistry of differentiation of mouse trophoblast: studies on polyploidy. *J Embryol Exp Morphol* 1972; 27: 447-465.
20. K Y. Inhibition of implantation by advancement of uterine sensitivity and refractoriness. In: Leroy F, Finn CA, Psychoyos A, Hubinot PO, eds *Blastocyst-endometrium relationships: progress in reproductive biology* Basel, Switzerland Karger 1980; 7: 189-199.
21. Yoshinaga K, Adams CE. Delayed implantation in the spayed, progesterone treated adult mouse. *J Reprod Fertil* 1966; 12: 593-595.
22. Huet YM, Dey SK. Role of early and late oestrogenic effects on implantation in the mouse. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 453-458.
23. Huet-Hudson YM, Dey SK. Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990; 193: 259-263.

24. Dey SK, Johnson DC. Embryo-uterine interaction in implantation. *Life Sci* 1980; 27: 2381-2384.
25. Dey SK DD, Hersey RM, Weisz J, Johnson DC, Pakrasi PL. Physiological aspects of blastocyst uterine interaction. *J Biosci* 1984; 6: 23-31.
26. Shelesnyak MC. A history of research on nidation. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 476: 5-24.
27. Kennedy TG. Prostaglandins and uterine sensitization for the decidual cell reaction. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 476: 43-48.
28. Dey SK, Johnson DC. Embryonic signals in pregnancy. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 476: 49-62.
29. Pakrasi PL, Becka R, Dey SK. Cyclooxygenase and lipoxigenase pathways in the preimplantation rabbit uterus and blastocyst. *Prostaglandins* 1985; 29: 481-495.
30. Harper MJ. Platelet-activating factor: a paracrine factor in preimplantation stages of reproduction? *Biol Reprod* 1989; 40: 907-913.
31. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ, 2nd. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10721-10725.
32. Krehbiel RH. Cytological studies of the decidual reaction in the rat during early pregnancy and in the production of deciduomata. *Physiol Zool* 1937; 10: 212-238.
33. Huet-Hudson YM, Andrews GK, Dey SK. Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 1989; 125: 1683-1690.
34. Enders AC SS. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat* 1967; 120: 185-226.
35. Enders AC, Schlafke S. Cytological aspects of trophoblast-uterine interaction in early implantation. *Am J Anat* 1969; 125: 1-29.

36. Kirby DRS. *The Biology of the Blastocysts*. Chicago: University of Chicago Press; 1971.
37. Finn CA, Porter DG. *The uterus*. Acton, MA: Publishing Sciences Group; 1975.
38. Parr EL, Tung HN, Parr MB. Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biol Reprod* 1987; 36: 211-225.
39. Bonnet R. Beitrage zur embryologie der wiederkauer, gewonnen am schafei. *Arc Anat Physiol* 1884; 8: 170-230.
40. Schlafke S, Enders AC. Cellular basis of interaction between trophoblast and uterus at implantation. *Biol Reprod* 1975; 12: 41-65.
41. McLaren A. A study of blastocysts during delay and subsequent implantation in lactating mice. *J Endocrinol* 1968; 42: 453-463.
42. Lataste MF. Des variations de duree de la gestation chez les mammiferes et des circonstances qui determinant ces variations theorie de la gestation retardee. *C R Soc Biol* 1891; 9: 21.
43. Yoshinaga K HT. On the delayed implantation in lactating pregnant rat. I. The effect of estrogen. *Jpn J Anim Reprod* 1958; 3: 93-94.
44. Aitken RJ. *Embryonic diapause. Development in mammals*. Amsterdam: North Holland; 1977.
45. Dey SK. *Implantation. Reproductive endocrinology, surgery and technology*. New York: Lippincott-Raven; 1996.
46. Lundkvist O, Nilsson BO. Endometrial ultrastructure in the early uterine response to blastocysts and artificial decidualogenic stimuli in rats. *Cell Tissue Res* 1982; 225: 355-364.
47. Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, Hogan BL. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1047-1052.

48. Tranguch S, Wang H, Daikoku T, Xie H, Smith DF, Dey SK. FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest* 2007; 117: 1824-1834.
49. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004; 25: 341-373.
50. Tranguch S, Smith DF, Dey SK. Progesterone receptor requires a co-chaperone for signalling in uterine biology and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006; 13: 651-660.
51. Frobenius W. Ludwig Fraenkel: 'spiritus rector' of the early progesterone research. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999; 83: 115-119.
52. Corner GW, Sr. The early history of progesterone. *Gynecol Invest* 1974; 5: 106-112.
53. Fraenkel L. Die funktion des corpus luteum. *Archiv fur gynaekologie* 1903; 67: 438-445.
54. Ancel P, Bouin P. Sur le determinisme de la preparation de l'uterus a la fixation de l'oeuf. *J Physiol Path Gen* 1910; 12: 1-16.
55. Heilbrunn Lea. Initiation of maturation in the frog egg. *Physiological Zoology* 1939; 12: 97-100.
56. Rugh R. Ovulation in the frog. I. Pituitary relations in induced ovulation. *Journal of Experimental Zoology* 1935; 71: 149-162.
57. Ryan F. The stimulus for maturation and for ovulation of the frog's egg. *Physiological Zoology* 1940; 13: 383-390.
58. Wright PA. Factors affecting in vitro ovulation in the frog. *J Exp Zool* 1945; 100: 565-575.
59. Fannon SA, Vidaver RM, Marts SA. An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *J Appl Physiol* 2001; 91: 1854-1859.
60. O'Malley BW, Sherman MR, Toft DO. Progesterone "receptors" in the cytoplasm and nucleus of chick oviduct target tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970; 67: 501-508.

61. Smith RG, Iramain CA, Buttram VC, Jr., O'Malley BW. Purification of human uterine progesterone receptor. *Nature* 1975; 253: 271-272.
62. Schwartz RJ, Chang C, Schrader WT, O'Malley BW. Effect of progesterone receptors on transcription. *Ann N Y Acad Sci* 1977; 286: 147-160.
63. Wilder RL. Adrenal and gonadal steroid hormone deficiency in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol Suppl* 1996; 44: 10-12.
64. Staples LD, Heap RB, Wooding FB, King GJ. Migration of leucocytes into the uterus after acute removal of ovarian progesterone during early pregnancy in the sheep. *Placenta* 1983; 4: 339-349.
65. Freedman LP. Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr Rev* 1992; 13: 129-145.
66. Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991; 352: 497-505.
67. Schowalter DB, Sullivan WP, Maihle NJ, Dobson AD, Conneely OM, O'Malley BW, Toft DO. Characterization of progesterone receptor binding to the 90- and 70-kDa heat shock proteins. *J Biol Chem* 1991; 266: 21165-21173.
68. Kraus WL, Weis KE, Katzenellenbogen BS. Inhibitory cross-talk between steroid hormone receptors: differential targeting of estrogen receptor in the repression of its transcriptional activity by agonist- and antagonist-occupied progesterone receptors. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 1847-1857.
69. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1244-1255.
70. Conneely OM, Mulac-Jericevic B, Lydon JP, De Mayo FJ. Reproductive functions of the progesterone receptor isoforms: lessons from knock-out mice. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179: 97-103.
71. Chappell PE, Lydon JP, Conneely OM, O'Malley BW, Levine JE. Endocrine defects in mice carrying a null mutation for the progesterone receptor gene. *Endocrinology* 1997; 138: 4147-4152.

72. Lydon JP, DeMayo FJ, Funk CR, Mani SK, Hughes AR, Montgomery CA, Jr., Shyamala G, Conneely OM, O'Malley BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 1995; 9: 2266-2278.
73. Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 2000; 289: 1751-1754.
74. Mulac-Jericevic B, Lydon JP, DeMayo FJ, Conneely OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9744-9749.
75. Tian J, Kim S, Heilig E, Ruderman JV. Identification of XPR-1, a progesterone receptor required for *Xenopus* oocyte activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14358-14363.
76. Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progestin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2231-2236.
77. Kazeto Y, Goto-Kazeto R, Thomas P, Trant JM. Molecular characterization of three forms of putative membrane-bound progestin receptors and their tissue-distribution in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 781-791.
78. Raza FS, Takemori H, Tojo H, Okamoto M, Vinson GP. Identification of the rat adrenal zona fasciculata/reticularis specific protein, inner zone antigen (IZAg), as the putative membrane progesterone receptor. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2141-2147.
79. Peluso JJ, Pappalardo A, Losel R, Wehling M. Progesterone membrane receptor component 1 expression in the immature rat ovary and its role in mediating progesterone's antiapoptotic action. *Endocrinology* 2006; 147: 3133-3140.
80. Das SK, Chakraborty I, Paria BC, Wang XN, Plowman G, Dey SK. Amphiregulin is an implantation-specific and progesterone-regulated gene in the mouse uterus. *Mol Endocrinol* 1995; 9: 691-705.
81. Luetkeke NC, Qiu TH, Fenton SE, Troyer KL, Riedel RF, Chang A, Lee DC. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles

for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development* 1999; 126: 2739-2750.

82. Paria BC, Das N, Das SK, Zhao X, Dileepan KN, Dey SK. Histidine decarboxylase gene in the mouse uterus is regulated by progesterone and correlates with uterine differentiation for blastocyst implantation. *Endocrinology* 1998; 139: 3958-3966.
83. Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Hogan BL, Dey SK. Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus. *Dev Biol* 2002; 245: 280-290.
84. Lee K, Jeong J, Kwak I, Yu CT, Lanske B, Soegiarto DW, Toftgard R, Tsai MJ, Tsai S, Lydon JP, DeMayo FJ. Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet* 2006; 38: 1204-1209.
85. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell* 1994; 78: 191-201.
86. Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Brown JM, Tickle C, Duboule D. HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev* 1991; 5: 1767-1767.
87. Izpisua-Belmonte JC, Falkenstein H, Dolle P, Renucci A, Duboule D. Murine genes related to the Drosophila AbdB homeotic genes are sequentially expressed during development of the posterior part of the body. *EMBO J* 1991; 10: 2279-2289.
88. Benson GV, Lim H, Paria BC, Satokata I, Dey SK, Maas RL. Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 1996; 122: 2687-2696.
89. Gendron RL, Paradis H, Hsieh-Li HM, Lee DW, Potter SS, Markoff E. Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* 1997; 56: 1097-1105.
90. Hsieh-Li HM, Witte DP, Weinstein M, Branford W, Li H, Small K, Potter SS. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development* 1995; 121: 1373-1385.
91. <http://www.scq.ubc.ca/studying-gene-function-creating-knockout-mice/>.



92. Nakao K, Myers JE, Faber LE. Development of a monoclonal antibody to the rabbit 8.5S uterine progesterin receptor. *Can J Biochem Cell Biol* 1985; 63: 33-40.
93. Smith DF, Toft DO. Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Mol Endocrinol* 2008; 22: 2229-2240.
94. Riggs DL, Roberts PJ, Chirillo SC, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D, Smith DF. The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *EMBO J* 2003; 22: 1158-1167.
95. Tranguch S, Cheung-Flynn J, Daikoku T, Prapapanich V, Cox MB, Xie H, Wang H, Das SK, Smith DF, Dey SK. Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 14326-14331.
96. Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox MB, Riggs DL, Suarez-Quian C, Smith DF. Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 1654-1666.
97. Davies TH, Ning YM, Sanchez ER. Differential control of glucocorticoid receptor hormone-binding function by tetratricopeptide repeat (TPR) proteins and the immunosuppressive ligand FK506. *Biochemistry* 2005; 44: 2030-2038.
98. Riggs DL, Cox MB, Tardif HL, Hessling M, Buchner J, Smith DF. Noncatalytic role of the FKBP52 peptidyl-prolyl isomerase domain in the regulation of steroid hormone signaling. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8658-8669.
99. Echeverria PC, Picard D. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803: 641-649.
100. Fanghanel J, Fischer G. Insights into the catalytic mechanism of peptidyl prolyl cis/trans isomerases. *Front Biosci* 2004; 9: 3453-3478.
101. Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997; 18: 306-360.
102. Pirkel F, Buchner J. Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *J Mol Biol* 2001; 308: 795-806.

103. Schiene C, Fischer G. Enzymes that catalyse the restructuring of proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 40-45.
104. Sivils JC, Storer CL, Galigniana MD, Cox MB. Regulation of steroid hormone receptor function by the 52-kDa FK506-binding protein (FKBP52). *Curr Opin Pharmacol* 2011; 11: 314-319.
105. Hernandez MP, Chadli A, Toft DO. HSP40 binding is the first step in the HSP90 chaperoning pathway for the progesterone receptor. *J Biol Chem* 2002; 277: 11873-11881.
106. Barent RL, Nair SC, Carr DC, Ruan Y, Rimerman RA, Fulton J, Zhang Y, Smith DF. Analysis of FKBP51/FKBP52 chimeras and mutants for Hsp90 binding and association with progesterone receptor complexes. *Mol Endocrinol* 1998; 12: 342-354.
107. Storer CL, Dickey CA, Galigniana MD, Rein T, Cox MB. FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol Metab* 2011; 22: 481-490.
108. Yang Z, Wolf IM, Chen H, Periyasamy S, Chen Z, Yong W, Shi S, Zhao W, Xu J, Srivastava A, Sanchez ER, Shou W. FK506-binding protein 52 is essential to uterine reproductive physiology controlled by the progesterone receptor A isoform. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2682-2694.
109. Yong W, Yang Z, Periyasamy S, Chen H, Yucel S, Li W, Lin LY, Wolf IM, Cohn MJ, Baskin LS, Sanchez ER, Shou W. Essential role for Co-chaperone Fkbp52 but not Fkbp51 in androgen receptor-mediated signaling and physiology. *J Biol Chem* 2007; 282: 5026-5036.
110. Hong J, Kim ST, Tranguch S, Smith DF, Dey SK. Deficiency of co-chaperone immunophilin FKBP52 compromises sperm fertilizing capacity. *Reproduction* 2007; 133: 395-403.277.
111. Hirota Y, Tranguch S, Daikoku T, Hasegawa A, Osuga Y, Taketani Y, Dey SK. Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *Am J Pathol* 2008; 173: 1747-1757.
112. Daikoku T, Tranguch S, Friedman DB, Das SK, Smith DF, Dey SK. Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the periimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* 2005; 19: 683-697.

113. Rijli FM, Matyas R, Pellegrini M, Dierich A, Gruss P, Dolle P, Chambon P. Cryptorchidism and homeotic transformations of spinal nerves and vertebrae in Hoxa-10 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8185-8189.
114. Satokata I, Benson G, Maas R. Sexually dimorphic sterility phenotypes in Hoxa10-deficient mice. *Nature* 1995; 374: 460-463.
115. Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, Dey SK. Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol* 1999; 13: 1005-1017.
116. Wang H, Ma WG, Tejada L, Zhang H, Morrow JD, Das SK, Dey SK. Rescue of female infertility from the loss of cyclooxygenase-2 by compensatory up-regulation of cyclooxygenase-1 is a function of genetic makeup. *J Biol Chem* 2004; 279: 10649-10658.
117. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science* 1995; 269: 230-234.
118. Bonyadi M, Rusholme SA, Cousins FM, Su HC, Biron CA, Farrall M, Akhurst RJ. Mapping of a major genetic modifier of embryonic lethality in TGF beta 1 knockout mice. *Nat Genet* 1997; 15: 207-211.
119. Ewart-Toland A, Mounzih K, Qiu J, Chehab FF. Effect of the genetic background on the reproduction of leptin-deficient obese mice. *Endocrinology* 1999; 140: 732-738.
120. Fowler KJ, Hudson DF, Salamonsen LA, Edmondson SR, Earle E, Sibson MC, Choo KH. Uterine dysfunction and genetic modifiers in centromere protein B-deficient mice. *Genome Res* 2000; 10: 30-41.
121. Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, Moser AR, Gould KA, Luongo C, Borenstein N, Dove W. Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 1993; 75: 631-639.
122. Pointis G, Rao B, Latreille MT, Mignot TM, Cedard L. Progesterone levels in the circulating blood of the ovarian and uterine veins during gestation in the mouse. *Biol Reprod* 1981; 24: 801-805.

123. McCormack JT, Greenwald GS. Progesterone and oestradiol-17beta concentrations in the peripheral plasma during pregnancy in the mouse. *J Endocrinol* 1974; 62: 101-107.
124. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Temel Tıptan Kliniğe Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.
125. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem* 1998; 44: 1309-1315.
126. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 1173-1181.
127. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 1191-1212.
128. Shapiro HM. Redox balance in the body: an approach to quantitation. *J Surg Res* 1972; 13: 138-152.
129. <http://www.physics.uc.edu/~hanson/ASTRO/LECTURENOTES/ET/S04/Life/Page2.html>.
130. Kohen R, Moor E, Oron M. Measurements of biological reducing power in health and diseases by voltammetric methods. *Redox Genome Interaction in Health and Disease*  
  
New York Marcel Decker Inc; 2004.
131. Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 2002; 30: 620-650.
132. Proctor PH, Reynolds ES. Free radicals and disease in man. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984; 16: 175-195.
133. [www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc\\_topics/radicals](http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/misc_topics/radicals).
134. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 1986; 246: 501-514.

135. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201: 875-880.
136. McCord JM, Fridovich I. The biology and pathology of oxygen radicals. *Ann Intern Med* 1978; 89: 122-127.
137. Bielski BH, Arudi RL, Sutherland MW. A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-with unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 1983; 258: 4759-4761.
138. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989; 264: 7761-7764.
139. Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G. An attempt to evaluate the rate of the Haber-Weiss reaction by using OH radical scavengers. *FEBS Lett* 1977; 80: 130-132.
140. McCord JM, Day ED, Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett* 1978; 86: 139-142.
141. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 1995; 82-83: 969-974.
142. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000; 486: 10-13.
143. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
144. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
145. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 269-285.
146. Akkuş I. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları, 1. Baskı; 1996.
147. Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem* 2002; 269: 1996-2002.

148. Canas PE. The role of xanthine oxidase and the effects of antioxidants in ischemia reperfusion cell injury. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam* 1999; 49: 13-20.
149. Lewen A, Matz P, Chan PH. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 2000; 17: 871-890.
150. Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002; 64: 749-774.
151. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-493.
152. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.
153. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J Biol Chem* 1987; 262: 9895-9901.
154. Grune T, Reinheckel T, Davies KJ. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J* 1997; 11: 526-534.
155. Ames BN. DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer. *Mutat Res* 2001; 475: 7-20.
156. Halliwell B. Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 1999; 443: 37-52.
157. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; 91 Spec No: 179-194.
158. Padh H. Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem Cell Biol* 1990; 68: 1166-1173.
159. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1991; 8: 211-218.
160. Di Mascio P, Kaiser S, Sies H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 532-538.

161. Reiter RJ. Antioxidant actions of melatonin. *Adv Pharmacol* 1997; 38: 103-117.
162. Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6858-6862.
163. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993; 19: 141-158.
164. Jozwik M, Wolczynski S, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 409-413.
165. Tamate K, Sengoku K, Ishikawa M. The role of superoxide dismutase in the human ovary and fallopian tube. *J Obstet Gynaecol (Tokyo)* 1995; 21: 401-409.
166. Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clin Chim Acta* 1995; 236: 173-180.
167. El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y. Expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse oocytes during the final stages of maturation. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 720-725.
168. Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999; 72: 720-726.
169. Tatemoto H, Sakurai N, Muto N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. *Biol Reprod* 2000; 63: 805-810.
170. Sugino N, Shimamura K, Takiguchi S, Tamura H, Ono M, Nakata M, Nakamura Y, Ogino K, Uda T, Kato H. Changes in activity of superoxide dismutase in the human endometrium throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *Hum Reprod* 1996; 11: 1073-1078.
171. Sugino N. The role of oxygen radical-mediated signaling pathways in endometrial function. *Placenta* 2007; 28 Suppl A: S133-136.

172. Garrel C, Fowler PA, Al-Gubory KH. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes. *J Endocrinol* 2010; 205: 107-116.
173. Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer IA, Lyall F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 1433-1438.
174. Szczepanska M, Kozlik J, Skrzypczak J, Mikolajczyk M. Oxidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertil Steril* 2003; 79: 1288-1293.
175. Liu Y, Luo L, Zhao H. Levels of lipid peroxides and superoxide dismutase in peritoneal fluid of patients with endometriosis. *J Tongji Med Univ* 2001; 21: 166-167.
176. Ho HN, Wu MY, Chen SU, Chao KH, Chen CD, Yang YS. Total antioxidant status and nitric oxide do not increase in peritoneal fluids from women with endometriosis. *Hum Reprod* 1997; 12: 2810-2815.
177. Osborn BH, Haney AF, Misukonis MA, Weinberg JB. Inducible nitric oxide synthase expression by peritoneal macrophages in endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril* 2002; 77: 46-51.
178. Ota H, Igarashi S, Hatazawa J, Tanaka T. Endometriosis and free radicals. *Gynecol Obstet Invest* 1999; 48 Suppl 1: 29-35.
179. Harma M, Erel O. Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2005; 118: 47-51.
180. Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Ohira S, Konishi I. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Arch* 2004; 444: 49-55.
181. Wang Y, Sharma RK, Falcone T, Goldberg J, Agarwal A. Importance of reactive oxygen species in the peritoneal fluid of women with endometriosis or idiopathic infertility. *Fertil Steril* 1997; 68: 826-830.
182. Polak G, Koziol-Montewka M, Gogacz M, Blaszkowska I, Kotarski J. Total antioxidant status of peritoneal fluid in infertile women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001; 94: 261-263.



183. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril* 1997; 67: 1115-1120.
184. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 334-346.
185. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.
186. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999; 115: 1-7.
187. Aitken RJ. Molecular mechanisms regulating human sperm function. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 169-173.
188. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989; 41: 183-197.
189. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-1295.
190. Zini A, De Lamirande E, Gagnon C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation in vitro. *J Androl* 1995; 16: 424-431.
191. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1995; 64: 868-870.
192. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993; 16: 183-188.
193. Ollero M, Gil-Guzman E, Lopez MC, Sharma RK, Agarwal A, Larson K, Evenson D, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1912-1921.

194. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod* 2001; 16: 1922-1930.
195. Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 869-880.
196. Twigg JP, Irvine DS, Aitken RJ. Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not preclude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 1864-1871.
197. Fraga CG, Motchnik PA, Wyrobek AJ, Rempel DM, Ames BN. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat Res* 1996; 351: 199-203.
198. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1543-1552.
199. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003; 28: 32-40.
200. Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ. Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *J Biol Chem* 2001; 276: 29826-29832.
201. Manevich Y, Fisher AB. Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 1422-1432.
202. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem* 2000; 275: 28421-28427.
203. Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI. Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1999; 274: 21326-21334.

204. Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, Lerner CP, Paigen B. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 25179-25190.
205. Mo Y, Feinstein SI, Manevich Y, Zhang Q, Lu L, Ho YS, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin knock-out mice express mRNA but not protein for a highly related intronless gene. *FEBS Lett* 2003; 555: 192-198.
206. Wang Y, Manevich Y, Feinstein SI, Fisher AB. Adenovirus-mediated transfer of the 1-cys peroxiredoxin gene to mouse lung protects against hyperoxic injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L1188-1193.
207. Leyens G, Knoop B, Donnay I. Expression of peroxiredoxins in bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 243-251.
208. Leyens G, Verhaeghe B, Landtmeters M, Marchandise J, Knoop B, Donnay I. Peroxiredoxin 6 is upregulated in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation: role of intercellular communication. *Biol Reprod* 2004; 71: 1646-1651.
209. Moore K, Roberts LJ, 2nd. Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 1998; 28: 659-671.376.
210. [www.uscnk.com/directory/Adenosine-kinase%28ADK%29-2281.htm](http://www.uscnk.com/directory/Adenosine-kinase%28ADK%29-2281.htm).
211. [www.epitomics.com/products/product\\_info/10774/Osteoglycin-antibody-5518-1.html](http://www.epitomics.com/products/product_info/10774/Osteoglycin-antibody-5518-1.html).
212. [en.wikipedia.org/wiki/ATP\\_synthase\\_alpha/beta\\_subunits](http://en.wikipedia.org/wiki/ATP_synthase_alpha/beta_subunits).
213. [en.wikipedia.org/wiki/Galectin-1](http://en.wikipedia.org/wiki/Galectin-1).
214. [en.wikipedia.org/wiki/Vimentin](http://en.wikipedia.org/wiki/Vimentin).
215. [en.wikipedia.org/wiki/Desmin](http://en.wikipedia.org/wiki/Desmin).
216. [www.uniprot.org/uniprot/Q66HF8](http://www.uniprot.org/uniprot/Q66HF8).
217. [en.wikipedia.org/wiki/Eukaryotic\\_initiation\\_factor](http://en.wikipedia.org/wiki/Eukaryotic_initiation_factor).

218. <http://www.antibodies-online.com/antibody/350223/anti-Charged+Multivesicular+Body+Protein+2A+CHMP2A+N-Term/>.
219. [www.uniprot.org/uniprot/O95050](http://www.uniprot.org/uniprot/O95050).
220. Hirota Y, Acar N, Tranguch S, Burnum KE, Xie H, Kodama A, Osuga Y, Ustunel I, Friedman DB, Caprioli RM, Daikoku T, Dey SK. Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)-peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 15577-15582.
221. Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, Pratt WB. Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem* 2001; 276: 14884-14889.
222. Chambraud B, Belabes H, Fontaine-Lenoir V, Fellous A, Baulieu EE. The immunophilin FKBP52 specifically binds to tubulin and prevents microtubule formation. *FASEB J* 2007; 21: 2787-2797.
223. Kay JE. Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J* 1996; 314 ( Pt 2): 361-385.
224. Phelan SA. AOP2 (antioxidant protein 2): structure and function of a unique thiol-specific antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 1999; 1: 571-584.
225. Dial CA, Dial NA. Effects of paraquat on reproduction and mortality in two generations of mice. *Arch Environ Contam Toxicol* 1987; 16: 759-764.
226. Wang Y, Feinstein SI, Manevich Y, Ho YS, Fisher AB. Lung injury and mortality with hyperoxia are increased in peroxiredoxin 6 gene-targeted mice. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1736-1743.
227. Ain R, Dai G, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ. A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 16543-16548.
228. Dennery PA. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007; 81: 155-162.

229. Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 673-679.
230. Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 1991; 6: 1305-1310.
231. Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril* 2002; 78: 1272-1277.
232. Sharma JB, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Int J Gynaecol Obstet* 2006; 94: 23-27.
233. Giudice LC, Kao LC. Endometriosis. *Lancet* 2004; 364: 1789-1799.
234. Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatsas G. The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecol Endocrinol* 2009; 25: 75-81.
235. Kao LC, Germeyer A, Tulac S, Lobo S, Yang JP, Taylor RN, Osteen K, Lessey BA, Giudice LC. Expression profiling of endometrium from women with endometriosis reveals candidate genes for disease-based implantation failure and infertility. *Endocrinology* 2003; 144: 2870-2881.

## ÖZGEÇMİŞ

Nuray ACAR 1980 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini 1991 yılında Hamdullah Suphi Tanrıöver İlkokulu’nda, ortaöğrenimini 1994 yılında Cumhuriyet Lisesi orta kısmında, lise öğrenimini 1998 yılında Ayrancı Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Kısım’da tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ndeki lisans eğitimini 2002 yılında Fakülte ve Bölüm üçüncüsü olarak tamamladı ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Özel Ödülü’nü aldı. 2002-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, “Üreme Biyolojisi” yüksek lisans programını Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL danışmanlığında tamamladıktan sonra “Yabancı Hükümetlerce Türk Hükümetine verilen burslar” kapsamında Milli Eğitim Bakanlığı’ndan Norveç Hükümet Bursunu kazanarak, Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU), Kanser Araştırmaları ve Moleküler Tıp Enstitüsü, Trondheim’da 11 ay süreyle Prof. Dr. Rigmor Austgulen ile çalıştı. Daha sonra Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı. TÜBİTAK tarafından verilen 2214 numaralı “Doktora Öğrencileri İçin YurtDışı Araştırma Bursu”nu kazanarak 1 yıl süreyle Cincinnati Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cincinnati Çocuk Hastanesi, Üreme Biyolojisi Bölümü’nde doktora tez projesi çalışmalarını Prof. Dr. Sudhansu K. DEY’in ikinci danışmanlığında tamamladı.

Science Citation Index’te kayıtlı 15 makale ve yurtiçi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 40’ı aşkın kongre bildirisi bulunmaktadır. 16.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi’nde en iyi poster yarışması birincilik ödülü almış ayrıca 13. IFPA/2.PAA Kongresi’nde Genç Araştırmacı Seyahat Ödülü kazanmıştır.

## ÖZGEÇMİŞ

Nuray ACAR 1980 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini 1991 yılında Hamdullah Suphi Tanrıöver İlkokulu’nda, ortaöğrenimini 1994 yılında Cumhuriyet Lisesi orta kısmında, lise öğrenimini 1998 yılında Ayrancı Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Kısım’da tamamladı. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’ndeki lisans eğitimini 2002 yılında Fakülte ve Bölüm üçüncüsü olarak tamamladı ve Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Özel Ödülü’nü aldı. 2002-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, “Üreme Biyolojisi” yüksek lisans programını Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL danışmanlığında tamamladıktan sonra “Yabancı Hükümetlerce Türk Hükümetine verilen burslar” kapsamında Milli Eğitim Bakanlığı’ndan Norveç Hükümet Bursunu kazanarak, Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet (NTNU), Kanser Araştırmaları ve Moleküler Tıp Enstitüsü, Trondheim’da 11 ay süreyle Prof. Dr. Rigmor Austgulen ile çalıştı. Daha sonra Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı. TÜBİTAK tarafından verilen 2214 numaralı “Doktora Öğrencileri İçin Yurtdışı Araştırma Bursu”nu kazanarak 1 yıl süreyle Cincinnati Üniversitesi Tıp Fakültesi, Cincinnati Çocuk Hastanesi, Üreme Biyolojisi Bölümü’nde doktora tez projesi çalışmalarını Prof. Dr. Sudhansu K. DEY’in ikinci danışmanlığında tamamladı.

Science Citation Index’te kayıtlı 15 makale ve yurtiçi-yurtdışı kongrelerde sunulmuş 40’ı aşkın kongre bildirisi bulunmaktadır. 16.Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi’nde en iyi poster yarışması birincilik ödülü almış ayrıca 13. IFPA/2.PAA Kongresi’nde Genç Araştırmacı Seyahat Ödülü kazanmıştır.

# EKLER



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

**acta**  
**histochemica**  
[www.elsevier.de/acthis](http://www.elsevier.de/acthis)

# Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy?

Nuray Acar, Emin Turkay Korgun, Sevil Cayli, Zeliha Sahin, Ramazan Demir, Ismail Ustunel\*

*Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey*

Received 22 July 2007; received in revised form 20 November 2007; accepted 23 November 2007

## KEYWORDS

Diabetes;  
Placenta;  
Rat;  
PCNA;  
Immuno  
histochemistry;  
Western blot

## Summary

We aimed to investigate the distribution pattern of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) by immunohistochemistry and Western blot in placentas of control and diabetic rats at different stages of pregnancy. It is still not clear how proliferation is coordinated and how this coordination is affected by diabetes in the placenta. Diabetes was induced by streptozocin on the first day of pregnancy. Animals were sacrificed on days 11, 13, 17 and 21 of pregnancy. In control placentas immunolabeling intensity of PCNA was the highest on days 11 and 13 of pregnancy and decreased with progression of pregnancy. In the diabetic groups immunolabeling was less intense on days 11 and 13 of pregnancy compared to controls. However, in parallel with placental weights, PCNA immunopositivity was more intense in diabetic groups than control groups on days 17 and 21 of pregnancy, and the difference was statistically significant on day 17. According to Western blot data, on days 11 and 13 of pregnancy the amount of PCNA was greater in control groups than in the diabetics, whereas it was greater in diabetic groups than the controls on days 17 and 21 of pregnancy. We conclude that PCNA may play a role in abnormal placenta formation resulting from diabetes.

© 2008 Elsevier GmbH. All rights reserved.

*Abbreviations:* AMT, allantoic mesenchymal tissue; AVEC, allantoic vessel endothelial cell; GC, giant cell; Gly C, glycogen cell; LFVEC, labyrinth fetal vessel endothelial cell; LT, labyrinth trophoblast; PEC, parietal endoderm cell; ST, spongiotrophoblast; VEC, visceral endoderm cell.

\*Corresponding author. Tel.: +90 242 249 68 82;  
fax: +90 242 227 44 86.

E-mail address: [iustunel@akdeniz.edu.tr](mailto:iustunel@akdeniz.edu.tr) (I. Ustunel).

## Introduction

The placenta promotes the delivery of nutrients and oxygen from the maternal circulation to the fetus and is essential for fetal growth. It forms the surface for transport of nutrients and gas exchange

and directs maternal metabolism, ovarian function and growth and blood supply to the uterus (Hemberger and Cross, 2001). The rat placenta is of the hemochorial type (Yan et al., 2005), as is the human placenta, and is therefore regularly used as an animal model to study pregnancy-related problems in humans, such as those associated with diabetes and hypertension (Vercruyse et al., 2006).

Maternal diabetes increases the risk of placental dysfunction and diseases in both the neonate and in the later life of the offspring. *Diabetes mellitus* is a disorder that affects the normal development of pregnancy and may result in increased spontaneous abortion, congenital abnormalities and increased neonatal morbidity and mortality rates. In addition, diabetic pathology leads to structural and functional disturbances in the placenta that can result in deleterious consequences to the developing embryo. Maternal diabetes increases the risk of neonatal respiratory distress and the development of cardiovascular anomalies and glucose intolerance during the later life of the offspring (Pustovrh et al., 2005). Placental enlargement is a common feature of human diabetic pregnancies.

Although placental development depends on careful coordination of trophoblast proliferation and differentiation, little is known about the mitotic regulators that play key roles in synchronizing these events (Genbacev et al., 2000).

Pregnancy in the streptozocin (STZ)-induced diabetic rat is also characterized by placentomegaly and varying degrees of fetal growth retardation (Robinson et al., 1988). The laboratory rat, rendered diabetic by STZ, has been widely used as a model for studying the pathophysiological effects of maternal diabetes. Fetal growth retardation is a consistent feature of these diabetic pregnancies. As such, this rat model closely reflects the early events in human diabetic pregnancies and may be useful for studying the etiology of delayed somatic growth (Canavan and Goldspink, 1988).

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a marker for the cell cycle. It is an accessory protein that is necessary for deoxyribonucleic acid (DNA) synthesis in mammalian cells (Jonsson and Hubscher, 1997), whereas lack of this protein prevents cell division (Bravo and Macdonald-Bravo, 1987). PCNA loads onto DNA through the action of replication factor C complex and provides a scaffold for consecutive attachment of various DNA nucleases, DNA polymerases, DNA ligases and others, and is involved in DNA replication, recombination and repair (Paunesko et al., 2001). PCNA also plays a role in DNA repair and control of the cell cycle (Cayli et al., 2002).

On the basis of the literature, we hypothesized that the mitotic activity of the rat placenta under diabetic conditions might show alterations as pregnancy progresses. In the present study, we aimed to examine the distribution patterns of PCNA and to determine the relationship between placental development and PCNA in normal and diabetic rat placentas.

## Materials and methods

### Animals

Sixty-four female and 32 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 200–250 g were used in the study and none of them had mated previously. All rats were allowed free access to standard rat laboratory diet and tapwater and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle. Two females and one male were kept overnight in one cage. A sperm-positive vaginal smear observed on the following morning was considered to indicate successful copulation. The sperm-positive day was designated as day 0 of pregnancy. Pregnant animals were caged separately and were randomly assigned to either the control or diabetic groups. Diabetes was induced in the appropriate group of rats by a single injection of STZ on the first day of pregnancy. Rats in the diabetic-induced group were injected intraperitoneally with a single dose of 50 mg/kg of STZ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; 63178) freshly prepared in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5). Animals in the control group received an identical volume of citrate buffer.

Blood glucose concentrations were measured 48 h after STZ injection to confirm that diabetes had been induced. Blood samples were obtained from the tail vein. Animals exhibiting blood glucose level higher than 200 mg/dl (Accu-Chek Active test strips, Roche Diagnostic GmbH Mannheim, Germany, 3146332) were considered to be diabetic. Animals that did not develop diabetes were excluded from the experiments.

Control and STZ diabetic mothers were anesthetized with ether, sacrificed by cervical dislocation, and embryos, fetuses and placentas were taken on days 11, 13, 17 and 21 of gestation. Fetal and placental weights were recorded. Results are presented as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The experimental protocols were approved by the Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University and were in accordance with the guidelines of the International Association for the Study of Pain.

## Tissue processing

Placental samples were fixed in Holland's fixative consisting of 4% formaldehyde, 5 ml glacial acetic acid, 4 g picric acid and 2.5 g cupric acetate in 100 ml distilled water. After dehydration in ethanol, tissues were cleared in xylene and embedded in paraffin wax. Subsequently, serial 5- $\mu$ m-thick sections were cut and mounted on poly-L-lysine-coated slides (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA, P8920).

## PCNA immunohistochemistry

The immunohistochemical procedure has been described elsewhere (Ustunel et al., 2003). Briefly, sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol. To unmask antigens, an antigen retrieval procedure was performed by treating the samples in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, in a microwave oven at 750 W for 5 min, twice. After cooling for 20 min at room temperature, the sections were washed in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in methanol containing 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min and sections were then washed with PBS three times. Afterwards, sections were incubated in a blocking serum (Ultra UV Block, LabVision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) for 7 min at room temperature to block non-specific binding. Mouse monoclonal anti-PCNA antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-56) was applied at a 1:200 dilution for 1 h at room temperature. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with the appropriate non-immune IgG. Sections were rinsed three times in PBS and incubated with biotinylated secondary antibody (DAKO, Glostrup, Denmark; LSAB-2 system HRP K0609-ready to use) and a peroxidase labeled streptavidin (DAKO, Glostrup, Denmark; LSAB-2 system HRP K0609-ready to use), respectively, for 30 min, with each of the steps being followed by three rinses in PBS. Peroxidase activity was visualized with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125-HAC) chromogen in large-volume AEC substrate (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125 HAS) as one drop chromogen in 1 ml substrate for 4 min. All dilutions were performed using PBS unless otherwise stated. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, mounted in Kaisers glycerin gelatin (Merck, NJ, USA; OB514196) and examined by light microscopy. Tissue sections from different pregnancy days were

evaluated for protein localization and immunolabeling intensity. All samples were treated with exactly the same protocol.

## H-SCORE and semi-quantitative evaluations

The evaluation of the immunohistochemical labeling of PCNA in samples from both diabetic and control groups was performed using H-SCORE (Celik-Ozenci et al., 2004). Briefly, sections were evaluated using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a special ocular scale. Three randomly selected slides, each of five different fields (two maternal and three fetal zones) at 200 $\times$  magnification, were evaluated for immunohistochemical labeling of PCNA. The labeling was scored in a semi-quantitative fashion that included the intensity of specific labeling in sections. The evaluations were recorded as percentages of labeled cells of all types in each of four intensity categories, denoted as 0 (no labeling), 1+ (weak labeling but detectable above control), 2+ (distinct labeling) and 3+ (intense labeling). For each tissue, an H-SCORE value was derived by summing the percentages of cells that were labeled at each intensity multiplied by the weighted intensity of the labeling:  $H\text{-SCORE} = \sum P_i (i+1)$ , where  $i$  is the intensity score and  $P_i$  is the corresponding percentage of the cells. Two observers blinded to the experimental groups performed the H-SCORE evaluations, and the average score was used. The distribution of immunoreactive cells in all experimental groups was also determined semi-quantitatively: 0 = negative; (+) = weak positive; + = positive; ++ = strong positive; +++ = very strong positive.

## Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting

Protein extraction and immunoblot analysis were performed as described previously (Hahn et al., 2001). Four placenta samples for each group were weighed and put into a homogenization buffer supplemented with CompleteR protease inhibitor cocktail (Boehringer, Mannheim, Germany). After homogenization, samples were centrifuged at 10,000g for 10 min. Supernatants were collected and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

The protein concentration was determined by Lowry assay (Lowry et al., 1951), and 50  $\mu$ g of protein was applied per lane. Samples were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (30% acrylamide in 7.5% gel) at 100 V for approximately 1.5 h and were then transferred onto

nitrocellulose membranes (Pharmacia, Kirkland, Quebec, Canada) in a buffer containing 0.2 mol/L glycine, 25 mmol/L Tris and 20% methanol overnight, at +4 °C, under 32 V and 65 A. The membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) and 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 0.14 mol/L Tris-buffered saline (TBS; pH 7.2–7.4) at 4 °C. Membranes were incubated with a 1:750 dilution of mouse monoclonal anti-PCNA antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-56), overnight. After the washing steps, the membranes were further incubated with goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA; 170-6516), diluted 1:4000, for 1 h at room temperature.

Immunolabeling was visualized by using the chemiluminescence-based SuperSignal CL HRP Substrate System (Pierce, Rockford, IL, USA) prepared according to the manufacturer's instructions, and the membranes were exposed to Hyperfilm (Amersham, Bucks, UK; 28906837). Membranes were also labeled by identical protocol for binding of a 1:6000 dilution of an anti-mouse  $\beta$ -actin antibody (Abcam, Cambridge, UK; ab 6276-100) as an internal control to confirm the equal loading of the samples. The bands were quantified using NIH image analysis software (Image J Version 1.36b, National Institutes of Health, USA).

## Statistical analysis

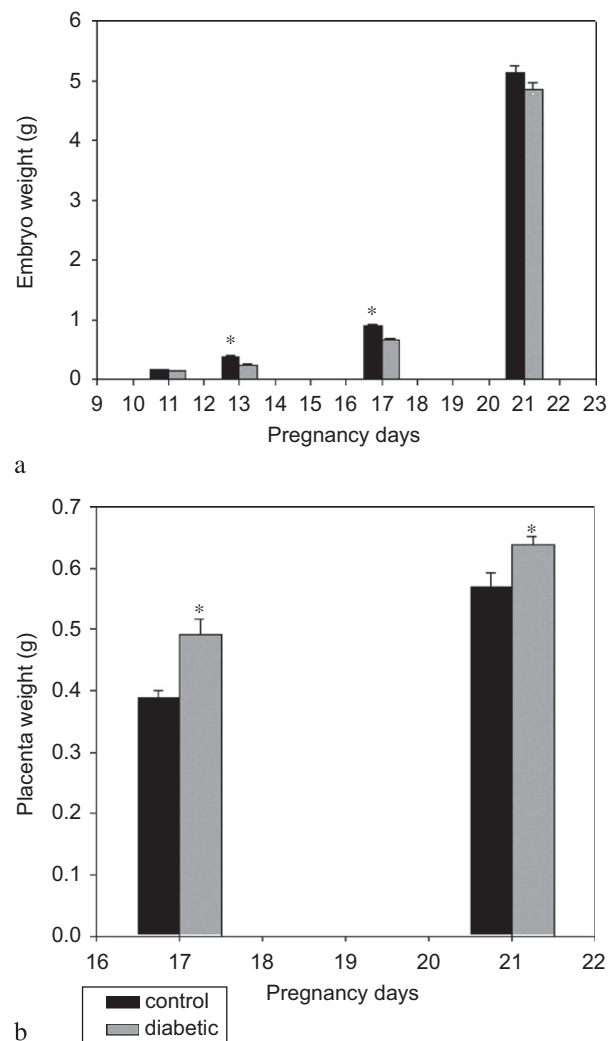
The following comparisons between control and diabetic groups were performed by Mann–Whitney rank sum test and Wilcoxon signed-rank test: embryo and placenta weights, H-SCORE values for PCNA immunohistochemistry, PCNA Western blot band values. Mann–Whitney rank sum test comparisons were made between control and diabetic groups samples taken from the same day. Wilcoxon signed-rank test comparisons were made between days for the same group, i.e. between control group day 11 and control group day 13. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. All statistical analyses were performed using SPSS (statistical package for the social sciences 10.0 for Windows, Chicago, IL, USA).

## Results

### Embryo weights

Embryo weights increased both in control and diabetic groups with the progression of pregnancy.

Embryo weights of the diabetic group were found to be lower than those of the control group. Embryo weights, for control and diabetic groups, respectively (in g), were  $0.174 \pm 0.01$  and  $0.152 \pm 0.01$  for day 11 of pregnancy;  $0.384 \pm 0.02$  and  $0.249 \pm 0.02$  for day 13 of pregnancy;  $0.913 \pm 0.02$  and  $0.679 \pm 0.02$  for day 17 of pregnancy;  $5.138 \pm 0.12$  and  $4.859 \pm 0.10$  for day 21 of pregnancy. These decreases were statistically significant on days 13 and 17 of pregnancy ( $p < 0.001$ ) but not on day 11 and 21 of pregnancy (Mann–Whitney rank sum test) (Figure 1a).



**Figure 1.** Embryo and placenta weights. (a) Embryo weights in control and diabetic groups. Control group embryos were heavier than the diabetic group embryos. The difference was statistically significant on days 13 and 17 ( $p < 0.001$ ). (b) Placental weights in control and diabetic groups. Diabetic group placentas were heavier than the control placentas. The differences were statistically significant. \* $p < 0.001$ .

**Table 1.** Semi-quantitative scoring of PCNA immunolabeling intensities in control and diabetic group rat placenta zones.

Gestation days	Allantois				Labyrinth		Junctional zone		
	VEC	PEC	AVEC	AMT	LFVEC	LT	ST	Gly.C	GC
<i>Control</i>									
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	X	+++
13	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	X	+++
17	+++	+	++	+	+	+	++	(+)	++
21	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	++	0	+
<i>Diabetic</i>									
11	+++	+++	+++	+++	++	++	++	X	+++
13	++	+	++	++	++	++	++	X	+++
17	+++	+	++	++	++	++	+++	(+)	++
21	++	(+)	+	+	+	(+)	+++	0	+++

0 = negative; (+) = weak positive; + = positive; ++ = strong positive; +++ = very strong positive; X = this zone does not exist.

### Placenta weights

On days 17 and 21 of pregnancy, the placenta weights in the diabetic group were greater than the controls. Placental weights (in g) for control and diabetic groups, respectively, were  $0.389 \pm 0.01$  and  $0.491 \pm 0.03$  for day 17 of pregnancy; and  $0.569 \pm 0.02$  and  $0.638 \pm 0.01$  for day 21 of pregnancy. The difference was 26.2% and 12.1%, respectively, for day 17 and day 21 of pregnancy and the differences were statistically significant (Mann–Whitney rank sum test) (Figure 1b).

### Immunohistochemical labeling of PCNA

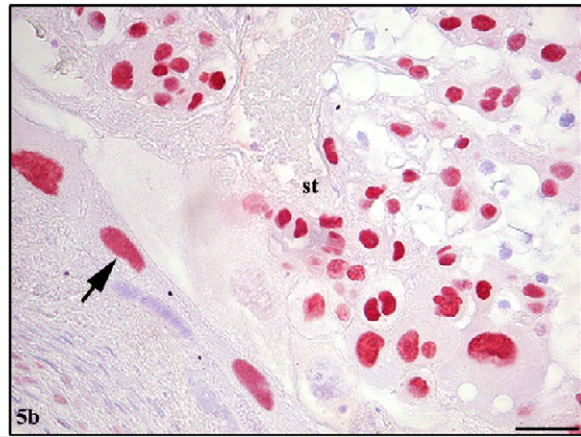
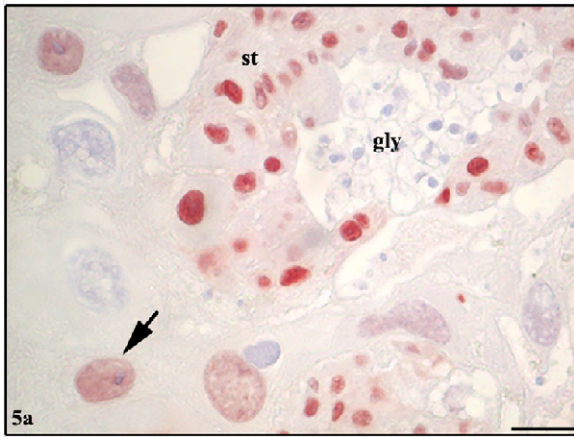
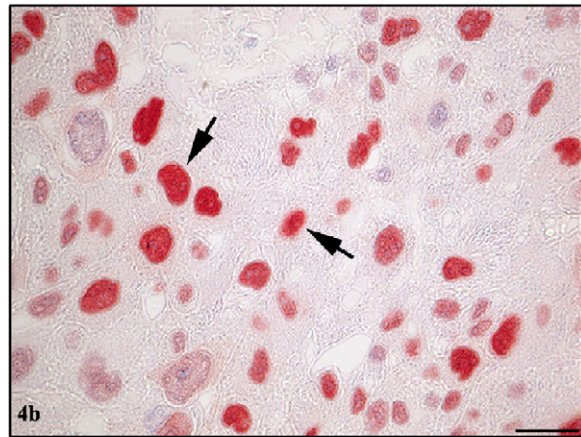
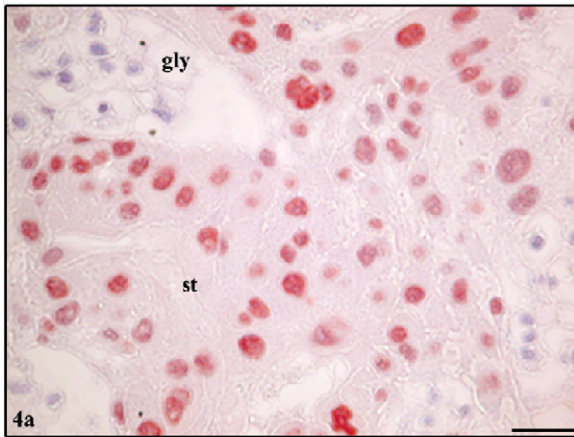
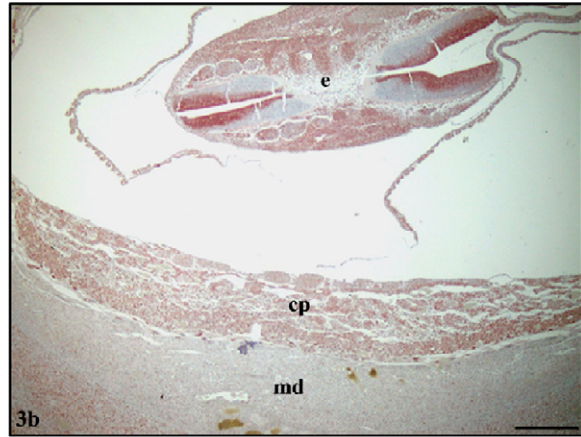
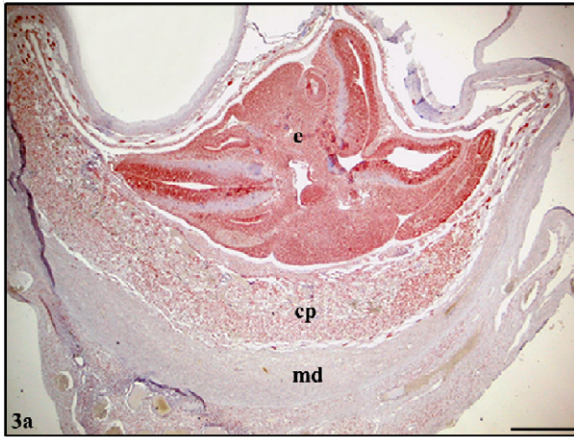
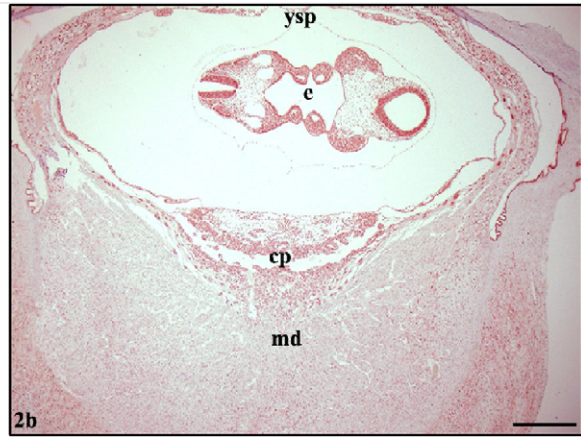
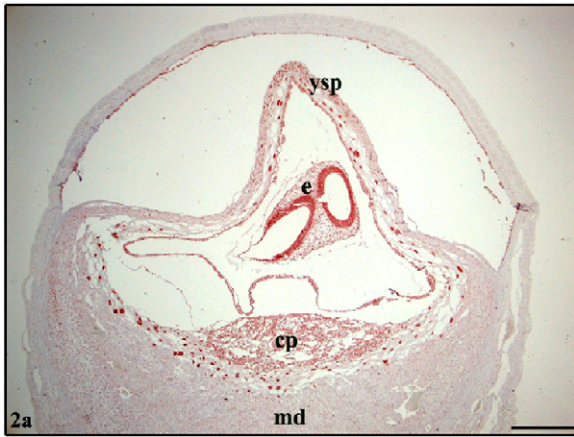
The distribution pattern of PCNA immunolabeling intensity in control and diabetic group placentas is summarized in Table 1.

On day 11 of pregnancy, PCNA immunolabeling was intense in all the placenta zones (allantois,

labyrinth and junctional zone) of the control group (Figure 2a). PCNA localization was nuclear. On the same day in the diabetic group, PCNA immunolabeling intensities decreased compared to the control group (Figure 2b).

On day 13 of pregnancy, in the control group, visceral endodermal cells, allantoic vessel endothelial cells, allantoic mesenchymal tissue, labyrinth trophoblasts, labyrinth fetal vessel endothelial cells, spongiorophoblasts and giant cells revealed very strong PCNA immunolabeling intensity; parietal endodermal cells were labeled strongly positive. In the diabetic group, PCNA immunolabeling intensities decreased compared to the control group, except for the giant cells in the junctional zone. Giant cells in the junctional zone were labeled very strong positive, similar to the giant cells in the junctional zone of the control group. The overall general appearance of immunolabeling in these groups is indicated in Figure 3a, b.

**Figures 2–5.** PCNA immunolabeling on day 11 of pregnancy. (a) Very strong positive PCNA immunolabeling intensity was seen in all zones of day 11 control group rat placenta. Scale bar = 500  $\mu$ m. (b) PCNA immunolabeling intensity was decreased in all zones in the diabetic group compared to the control group on the same day. ysp: yolk sac placenta, e: embryo, cp: chorioallantoic placenta, md: mesometrial decidua. Scale bar = 500  $\mu$ m. 3. PCNA immunolabeling on day 13 of pregnancy. (a) PCNA immunolabeling intensity in control group on day 13 of pregnancy. Overall appearance is seen. Scale bar = 1.5 mm. (b) PCNA immunolabeling intensity was decreased in diabetic group compared to control group on the same day. Overall appearance is seen e: embryo, cp: chorioallantoic placenta, md: mesometrial decidua. Scale bar = 350  $\mu$ m. 4. PCNA immunolabeling on day 17 of pregnancy. (a) Strong positive PCNA immunolabeling intensity in spongiorophoblast of control group placenta on day 17 of pregnancy. st: spongiorophoblast, gly: glycogen cells. Scale bar = 25  $\mu$ m. (b) PCNA immunolabeling intensity was increased in spongiorophoblasts (arrows) compared to the same day control group—very strong positive. Scale bar = 25  $\mu$ m. 5. PCNA immunolabeling on day 21 of pregnancy. (a) PCNA immunolabeling intensity in control group on day 21 of pregnancy. While strong positive PCNA immunolabeling intensity continued in spongiorophoblasts (st), it was positive in giant cells (arrow) and there was no reaction in glycogen cells (gly). Scale bar = 25  $\mu$ m. (b) Stronger PCNA immunolabeling intensities both in spongiorophoblasts (st) and giant cells (arrow) were observed in the diabetic group on day 21 of pregnancy compared to the same day control group. Scale bar = 25  $\mu$ m.



On day 17 of pregnancy in the control group, PCNA immunolabeling intensity decreased in the allantoic mesenchymal tissue and in giant cells compared to control groups of days 11 and 13 of pregnancy. Labeling intensity in the visceral endodermal cells was the same as that of the day 13 control group. Labeling intensity in spongiotrophoblasts decreased and there was a weak positive immunoreactivity in glycogen cells (Figure 4a). When the same day diabetic group was compared to the control group it was seen that PCNA immunolabeling was similar in the visceral endodermal cells and giant cells and increased in the labyrinth trophoblasts and spongiotrophoblasts (Figure 4b).

On day 21 of pregnancy in the control group, PCNA immunolabeling intensity was observed as strong positive in spongiotrophoblasts, positive in visceral endodermal cells and giant cells. There was no PCNA immunoreactivity in glycogen cells, and all other cell types were labeled weakly positive (Figure 5a). On the same day, the diabetic group PCNA immunolabeling intensity increased in the visceral endodermal cells, allantoic vessel endothelial cells, allantoic mesenchymal tissue, spongiotrophoblasts and giant cells (Figure 5b).

The H-SCORE analysis revealed that PCNA immunolabeling intensity in the control group placentas was higher than that in the diabetic group placentas on days 11 and 13 of pregnancy. On day 17 and day 21 of pregnancy, PCNA immunolabeling intensity was higher in the diabetic group compared to the control group placentas. H-SCORE values, for control and diabetic groups, respectively, were  $240 \pm 8$  and  $225 \pm 9$  for day 11 of pregnancy;  $254 \pm 4$  and  $236 \pm 1$  for day 13 of pregnancy;  $137 \pm 1$  and  $191 \pm 8$  for day 17 of pregnancy;  $125 \pm 2$  and  $135 \pm 2$  for day 21 of pregnancy. These differences were statistically significant on day 17 ( $p < 0.05$ ).

Wilcoxon signed rank test showed that in the control group, the decrease in PCNA immunolabeling intensity between day 11 and days 17 and 21; and between day 13 and days 17 and 21 was statistically significant ( $p < 0.05$ ). In the diabetic group, the decrease in PCNA immunolabeling intensity between day 11 and days 17 and 21, between day 13 and days 17 and 21, and between day 17 and day 21 was statistically significant ( $p < 0.05$ ) (not shown).

## Western blot results

On day 11 and 13 of pregnancy, PCNA protein amounts appeared to be higher in control group

placentas; however, these differences were not statistically significant ( $p = 0.60$  and  $p = 0.42$ , respectively). On day 17 and 21 of pregnancy, PCNA protein amounts appeared to be higher in the diabetic group placentas compared to control group placentas; however, these differences were not statistically significant ( $p = 0.31$  and  $p = 0.69$ , respectively) (Figure. 6a, b).

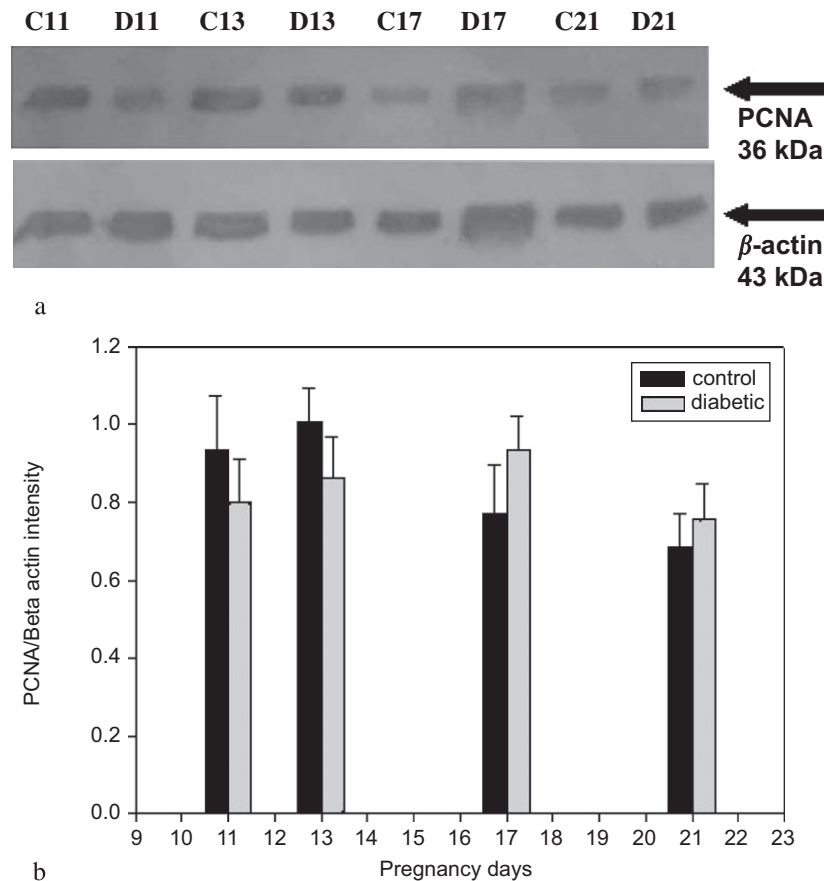
## Discussion

The placenta, which forms the interface between the embryo/fetus and the mother, is a critical determinant of the outcome of pregnancy. The placenta is the first organ to function during development (Genbacev et al., 2000). Adequate placental growth and function are fundamental to the well-being, growth and development of the fetus throughout gestation (Waddell et al., 2000).

The altered metabolic environment in maternal diabetes during pregnancy interferes with normal fetal development (Padmanabhan and al-Zuhair, 1987). Abnormally elevated glucose levels in maternal blood, which lead to increased glucose transport to the embryo, are responsible for the teratogenic effects of maternal diabetes. Consequently, expression of genes that control essential developmental processes are disturbed (Loeken, 2005), although the precise molecular mechanisms underlying malformations still remain unknown (Reece et al., 2005).

Placental enlargement is a feature of human diabetic pregnancies. Pregnancy in the STZ-induced diabetic rat is also characterized by placentomegaly and varying degrees of fetal growth retardation (Robinson et al., 1988). Whereas macrosomia often occurs in infants of diabetic women, growth retardation is almost a rule in spontaneous and experimental diabetes in animals. The functional significance of placentomegaly in the presence of maternal diabetes in rats and other species is unclear (Husain et al., 2001), and it is not clear when the growth inhibition starts or how placental pathology might affect fetal growth in maternal diabetes (Padmanabhan and Shafullah, 2001). Some researchers hypothesized that hyperglycemia leads to a relative immaturity of rat placentas by providing a stimulus for continuous growth and cell division-delayed maturation (Gewolb et al., 1986).

Caluwaerts et al. (2000) showed that on day 9 of pregnancy the weight of the decidual swellings in diabetic rats and the mitotic index in the ectoplacental cone were lower compared to controls ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.05$ , respectively). In the study reported here, we observed that placental weights



**Figure 6.** (a) Western blot results of PCNA in control and diabetes-induced group.  $\beta$ -Actin was used as an internal standard. (b) Quantitative analysis of PCNA Western blot data. The values in the bar graphs were obtained by dividing the protein intensity value by its corresponding  $\beta$ -actin intensity value. The differences seen in (a) and (b) were not statistically significant. Abbreviations: C11, C13, C17 and C21 for control group on days 11, 13, 17 and 21 of pregnancy, respectively; D11, D13, D17 and D21 for diabetic group on parallel days of pregnancy, respectively.

in the diabetic groups were less than in control groups on days 11 and 13 of pregnancy, while higher placental weights were recorded on days 17 and 21 of pregnancy, in accordance with [Caluwaerts et al. \(2000\)](#) as well as some other studies ([Padmanabhan and Shafiqullah, 2001](#); [Robinson et al., 1988](#); [Padmanabhan and al-Zuhair, 1987](#)). Moreover, although either pregnancy-induced or pre-existing macrosomia is seen in diabetic pregnancies, [Pedersen and Molsted-Pedersen \(1979\)](#) reported that there appears to be a subgroup of cases in which fetal growth is retarded early in pregnancy, leading to low birth weight and possibly a higher incidence of congenital malformations. We have also observed low embryo weights in our study as early as day 11 of rat pregnancy. Furthermore, the embryo weights in the diabetic groups were lower than that of the controls on all days examined.

In a study performed by [Robinson et al. \(1988\)](#), it was demonstrated that on days 14 and 16 of pregnancy placental weights of animals in the

diabetic group were less than those in the control group, but the weight of placentas increased after day 18 of pregnancy. In this study, they also showed that although in the early stages of pregnancy placentas of animals in the diabetic group had lower amounts of protein, RNA (ribonucleic acid), DNA and cell number were similar to levels seen in the control group. After day 18 of pregnancy, placentas had more protein, RNA, DNA and cells compared to control group placentas. Glycogen storage increased in the diabetic group placentas starting from day 16 of pregnancy, but it decreased slowly with advancing pregnancy in control group placentas ([Robinson et al., 1988](#)). Consistent with this study, we also observed an increase in placental weights after day 17 of rat pregnancy, suggesting that this increase might be due to increased protein synthesis and cell proliferation since we have shown a significant increase in PCNA on this day. Our findings regarding placental weight and diameter (data not shown) are consistent with



previous studies. These data indicate that diabetes may contribute to fetal growth retardation and placentomegaly starting in the third trimester in rats.

PCNA, which is a ring-like protein involved in the major DNA replication and repair machinery of the cell, is expressed during the last 5% of G1 phase and the first 35% of S phase of the cell cycle (Takahashi and Caviness, 1993). Maruo et al. (2001) reported that PCNA is most abundantly expressed in very early placenta, and is less abundant in mid-term placenta and the least abundant in term placenta in humans. In our study we found that PCNA immunolabeling intensity decreased after days 13 and 17 in normal and diabetic placentas, respectively. On day 17 of pregnancy, PCNA protein intensity/amount appeared to be higher in the diabetic group than in the control group as shown by both immunohistochemistry and Western blot analysis. According to our semi-quantitative evaluations of immunolabeling, this difference may arise from spongiotrophoblasts. Indeed this cell type was observed to maintain its very strong immunolabeling intensity until day 21 of pregnancy. On the contrary, in a study by Mark et al. (2006) it was emphasized that during the final third of rat pregnancy the basal zone exhibits apoptosis and shows little, if any, growth, whereas the labyrinth zone grows substantially and apoptosis is very low over this period. This difference might be due to spongiotrophoblasts being affected much more than the labyrinth trophoblasts under diabetic conditions.

We observed greater PCNA immunolabeling intensity in diabetic group placentas on days 17 and 21 of pregnancy when compared to the controls. Likewise, Hinck et al. (2003) reported that when they cultured Rcho-1 cell line in high glucose concentration the number of cells were higher. This suggests that high glucose disrupts the progression through the endocycle, perhaps by impairing the cyclin/cyclin-dependent kinase complexes controlling each step of the endocycle. It was also reported in an ultrastructural study that giant cells in diabetic rat placenta proliferated to a greater degree compared to those of control (Padmanabhan and Shafiullah, 2001).

There are relatively few studies on the role of mitotic regulators involved in rat placental development. In conclusion, small placenta in the early stages of pregnancy and placentomegaly in later stages of pregnancy in diabetic rats may occur as a result of disturbed cell cycle pathways with the participation of PCNA and other mitotic regulators. Our study may provide the basis for further studies to improve our understanding of factors leading to abnormal placentation; however, more detailed

studies are required to explain the molecular mechanisms of diabetic placentation.

## Acknowledgments

This study is a part of the masters thesis of Nuray Acar and was supported by a grant from the Akdeniz University Research Fund (2004.02.0122.001), Antalya, Turkey. The authors would like to thank Gamze Tanriover and Yasemin Seval for their assistance.

## References

- Bravo R, Macdonald-Bravo H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol* 1987;105:1549–54.
- Caluwaerts S, Pijnenborg R, Luyten C, Van Assche FA. Growth characteristics of diabetic rat ectoplacental cones in vivo and in vitro. *Diabetologia* 2000;43:939–45.
- Canavan JP, Goldspink DF. Maternal diabetes in rats II: Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 1988;37:1671–7.
- Cayli S, Ustunel I, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir R. Distribution patterns of PCNA and ANP in perinatal stages of the developing rat heart. *Acta Histochem* 2002;104:271–7.
- Celik-Ozenci C, Akkoyunlu G, Korgun ET, Savas B, Demir R. Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol Reprod Dev* 2004;67:414–23.
- Genbacev O, McMaster MT, Fisher SJ. A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol* 2000;157:1337–51.
- Gewolb IH, Merdian W, Warshaw JB, Enders AC. Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes* 1986;35:1254–61.
- Hahn D, Blaschitz A, Korgun ET, Lang I, Desoye G, Skofitsch G, et al. From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta. *Mol Hum Reprod* 2001;7:1173–8.
- Hemberger M, Cross JC. Genes governing placental development. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:162–8.
- Hinck L, Thissen JP, Pampfer S, Hertog R. Effect of high concentrations of glucose on differentiation of rat trophoblast cells in vitro. *Diabetologia* 2003;46:276–83.
- Husain SM, Frost R, Mughal ZM. Effect of diabetes mellitus on rat placenta cellularity. *Early Hum Dev* 2001;60:207–14.
- Jonsson ZO, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases. *Bioessays* 1997;19:967–75.

- Loeken MR. Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;135:77–87.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Mark PJ, Smith JT, Waddell BJ. Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. *Placenta* 2006;27:208–14.
- Maruo T, Ishihara N, Samoto T, Murakoshi H, Laoag-Fernandez JB, Matsuo H. Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. *Early Pregnancy* 2001;5:28–9.
- Padmanabhan R, al-Zuhair AG. Congenital malformations and intrauterine growth retardation in streptozotocin induced diabetes during gestation in the rat. *Reprod Toxicol* 1987;1:117–25.
- Padmanabhan R, Shafiullah M. Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Arch Physiol Biochem* 2001;109:260–71.
- Paunesko T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1007–21.
- Pedersen JF, Molsted-Pedersen L. Early growth retardation in diabetic pregnancy. *Br Med J* 1979;1:18–9.
- Pustovrh MC, Jawerbaumi A, Capobianca E, White V, Martinez N, Lopez-Costa JJ, et al. Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the feto-placental unit of diabetic rats. *Free Radic Res* 2005;39:1285–93.
- Reece EA, Ma XD, Zhao Wu YK, Dhanasekaran D. Aberrant patterns of cellular communication in diabetes-induced embryopathy in rats: II, Apoptotic pathways. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:967–72.
- Robinson J, Canavan JP, el Haj AJ, Goldspink DF. Maternal diabetes in rats I: Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 1988;37:1665–70.
- Takahashi T, Caviness VS. PCNA-binding to DNA at the G1/S transition in proliferating cells of the developing cerebral wall. *J Neurocytol* 1993;22:1096–102.
- Ustunel I, Cayli S, Guney K, Celik-Ozenci C, Tanriover G, Sahin Z, et al. Immunohistochemical distribution patterns of collagen type II, chondroitin 4-sulfate, laminin and fibronectin in human nasal septal cartilage. *Acta Histochem* 2003;105:109–14.
- Vercruyse L, Caluwaerts S, Luyten C, Pijnenborg R. Interstitial trophoblast invasion in the decidua and mesometrial triangle during the last third of pregnancy in the rat. *Placenta* 2006;27:22–33.
- Waddell BJ, Hisheh S, Dharmarajan AM, Burton PJ. Apoptosis in rat placenta is zone-dependent and stimulated by glucocorticoids. *Biol Reprod* 2000;63:1913–7.
- Yan YE, Wang H, Feng YH. Alterations of placental cytochrome P450 1A1 and P-glycoprotein in tobacco-induced intrauterine growth retardation in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:1387–94.

# Cell cycle inhibitor p57 expression in normal and diabetic rat placentas during some stages of pregnancy

Nuray Acar, Emin Turkay Korgun and Ismail Ustunel

Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, Antalya, Turkey

**Summary.** Placentomegaly, an abnormal increase in the size of the placenta, is commonly seen in human diabetic pregnancies and diabetic animal experimental models. Proper placental development depends on the proliferation and differentiation of trophoblasts. However, our knowledge about the mitotic regulators that play key roles in synchronizing these events is limited. p57 is a cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor acting in the G1/S transition of the cell cycle. There is no data regarding p57 expression in either rat or human diabetic placentas. The purpose of this study was to investigate p57 expression in control and diabetic rat placentas at different stages of pregnancy. Diabetes was induced by streptozotocin on the first day of pregnancy, and placentas were taken on days 11, 13, 17, and 21 of pregnancy. Our results showed that on day 11, p57 immunostaining intensity was stronger in control group placentas compared to the diabetic group. On day 13, p57 immunostaining intensity increased in both groups, but increased more in the diabetic group. On day 17, p57 immunostaining intensity decreased in both the control and diabetic groups compared to day 13, yet the intensity remained higher in control placentas compared to diabetic placentas. On day 21 of pregnancy, p57 immunostaining intensity increased in the control group and it decreased from the day 17 level in the diabetic group. Western blot results showed consistency with immunohistochemistry results. Our study shows different expression patterns of p57 between control and diabetic rat placentas, which indicate p57 may play a role in abnormal placental formation resulting in placentomegaly arising from diabetes.

**Key words:** Diabetes, Placenta, Rat, p57

## Introduction

The birth of a healthy infant at term is dependent upon normal placental development. The placenta is the first organ to form during mammalian embryogenesis. Problems in its formation and function underlie many aspects of pregnancy complications (Matsuura et al., 2002; Kim et al., 2005).

Several important aspects of human diabetic pregnancies, such as the increases in the rates of early embryo loss, spontaneous abortions, malformations, fetoplacental impairments, and offspring's diseases in later life, can be studied using the appropriate animal models. Models of diabetes have been widely used to address early embryo developmental defects, placental abnormalities, fetal maldevelopment, and intrauterine transmission of metabolic diseases. Since there is no animal model equal to the human situation, rats have been mostly studied in chemically-induced type 1 diabetes and pregnancy experimental models. The administration of drugs like streptozotocin (STZ) and alloxan to pregnant animals leads to the selective destruction of pancreatic cells, thus generating a maternal diabetic state related to type 1 diabetes during pregnancy.

Both rat and human placentas are hemochorial (Yan et al., 2005), meaning maternal blood is no longer contained in blood vessels but is in direct contact with fetal trophoblasts that also embed fetal capillaries in the labyrinthine trophoblast zone (Zhang et al., 1998). This similarity, combined with the short duration of their pregnancies and their easy maintenance, are advantages of using rats in diabetes studies. Despite the existence of developmental and morphological differences in the placentas of rodents and women, there are many similarities in the alterations induced by maternal diabetes in the placenta from diabetic patients and diabetic experimental models (Kuhn et al., 1990; Desoye

and Shafir 1994; Georgiades et al., 2002; Radaelli et al., 2003; Lappas et al., 2004; Jawerbaum and Gonzalez, 2006).

Placentomegalia is observed in various mild and severe chemically-induced diabetic experimental models (Diamant et al., 1982; Eriksson et al., 1989; Capobianco et al., 2005; Suwaki et al., 2007; Acar et al., 2008). Structural, functional, and developmental abnormalities are found in the placentas of streptozotocin induced diabetic rodents (Barash et al., 1985; Padmanabhan and al-Zuhair 1990; Caluwaerts et al., 2000). Moreover, array studies have shown an aberrant gene expression pattern in placentas from streptozotocin-induced diabetic mice (Yu et al., 2008). Increased amounts of lipids, glycogen, and DNA characterize the placentas from streptozotocin-induced diabetic rodents (Diamant et al., 1982; Shafir and Barash, 1987). Glucose transfer through the placenta increases linearly with maternal glucose in streptozotocin-induced diabetic rats (Herrera et al., 1985). Some of these changes mirror the changes seen in human diabetic placentas, indicating that this is a reasonable model for the exploration of human diabetic pregnancy.

Proper development of an organism requires an integration of cell cycle exit and differentiation pathways. Proliferation is positively regulated by cyclin-dependent kinases (CDKs) (Zhang et al., 1998). Cell cycle arrest and activation of differentiation processes require inhibition of CDKs by CDK inhibitors (CKIs) (Rao et al., 1994; Skapek et al., 1995, 1996). p57 is a CDK inhibitor that has the ability to bind with a variety of cyclin-CDK complexes and to inhibit their kinase activities. Based on their sequence homology and specificity of action, CKIs are divided into two distinct families: INK4 and Cip/Kip (Sherr et al., 1999). INK4 family members include p15, p16, p18, and p19, and specifically inhibit the activity of CDK4 and CDK6. Cip/Kip members include p21, p27, and p57 (el-Deiry et al., 1993; Gu et al., 1993; Harper et al., 1993; Polyak et al., 1994; Toyoshima and Hunter, 1994; Lee et al., 1995). This family causes cells to arrest in the G1 phase. Even though p21 and p27 are widely expressed, p57 is expressed in a tissue-specific manner (Lee et al., 1995; Matsuoka et al., 1995). p57 inhibits cyclin A- and E-associated CDKs and therefore regulates the G1/S transition and the completion of S phase (Lee et al., 1995), and is primarily expressed in terminally differentiated cells (Yan et al., 1997). Recently, p57 was identified among the paternally imprinted (maternally expressed) genes in humans and mice (Matsuoka et al., 1996). p57 has a restricted tissue distribution with high levels of expression in human placentas, suggesting that it has a specialized function in cell cycle control during implantation and placental development (Lee et al., 1995; Chilosi et al., 1997, 1998).

p57 deficient mice displayed organomegaly and abdominal wall defects (Zhang et al., 1997), increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development (Yan et al., 1997), immaturity of some

tissues, and severe growth retardation (Takahashi et al., 2000a). In a study done by Takahashi et al. (2000b), placentas of p57<sup>-/-</sup> mouse embryos showed hyperplasia involving both labyrinthine trophoblasts and spongiotrophoblasts. p57 may function in the proper development of labyrinthine and spongio-trophoblasts by pathways that are not involved with the regulation of CDK activities.

Developmental defects in the placenta were observed in another study regarding p27 and p57 knockout mice. Since the labyrinthine trophoblast zone was less vascularized and contained more trophoblasts compared with that in wild-type mice, it was suggested that the absence of these CDK inhibitors might alter the differentiation of trophoblasts in the labyrinthine zone, allowing them to proliferate inappropriately (Zhang et al., 1998). p57 expression is markedly reduced in patients with malignant trophoblastic neoplasms, which can result in spontaneous abortions and preterm deliveries (Chilosi et al., 1998), and deficiency in p57 expression induced preeclampsia-like symptoms in mice (Kanayama et al., 2002).

Recent studies suggest that Cip/Kip proteins play additional roles outside of the nucleus (Coqueret, 2003). p57 modulates subcellular localization of LIMK, a serine/threonine kinase involved in the regulation of actin filaments (Yokoo et al., 2003). Although placental development depends on careful coordination of trophoblast proliferation and differentiation, little is known about the mitotic regulators that play key roles in synchronizing these events (Genbacev et al., 2000).

Since we observed different expression patterns of the cell cycle protein proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in diabetic rat placentas compared to control rat placentas, we hypothesized that the mitotic activity of the rat placenta under diabetic conditions might show alterations during pregnancy. This study was to investigate the expression of CDK inhibitor p57 during the growth and differentiation of normal and diabetic rat placentas.

## Materials and methods

### Animals

Sixty-four female and 32 male adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 200–250 g were used in the study and none of them had mated previously. All rats were allowed free access to a standard rat laboratory diet and tapwater and were maintained on a 12:12 h light/dark cycle. Two females and one male were kept overnight in one cage. A sperm-positive vaginal smear observed on the following morning was considered to indicate successful copulation. The sperm-positive day was designated as day 0 of pregnancy. Pregnant animals were caged separately and were randomly assigned to either the control or diabetic groups. Diabetes was induced in the appropriate group of rats by a single injection of STZ on the first day of pregnancy. Rats in

## *p57 expression in normal and diabetic rat placenta*

the diabetic-induced group were injected intraperitoneally with a single dose of 50 mg/kg of STZ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA; 63178) freshly prepared in 0.1M citrate buffer (pH 4.5). Animals in the control group received an identical volume of citrate buffer.

Blood glucose concentrations were measured 48 h after STZ injection to confirm that diabetes had been induced. Blood samples were obtained from the tail vein. Animals exhibiting blood glucose levels higher than 200 mg/dl (Accu-Chek Active test strips, Roche Diagnostic GmbH Mannheim, Germany, 3146332) were considered to be diabetic. Animals that did not develop diabetes were excluded from the experiments.

Control and STZ diabetic mothers were anesthetized with ether, sacrificed by cervical dislocation, and embryos, fetuses, and placentas were taken on days 11, 13, 17, and 21 of gestation. Fetal and placental weights were recorded (Acar et al., 2008). The experimental protocols were approved by the Animal Care and Usage Committee of Akdeniz University and were in accordance with the guidelines of the International Association for the Study of Pain.

### *Tissue processing*

Placental samples were fixed in Holland's fixative consisting of 4% formaldehyde, 5ml glacial acetic acid, 4 g picric acid, and 2.5 g cupric acetate in 100 ml distilled water. After dehydration in ethanol, tissues were cleared in xylene and embedded in paraffin wax. Subsequently, serial 5-mm-thick sections were cut and mounted on poly-L-lysine coated slides (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA, P8920).

### *p57 immunohistochemistry*

The immunohistochemical procedure has been described elsewhere (Acar et al., 2008). Briefly, sections were deparaffinized in xylene and rehydrated through a graded series of ethanol. To unmask antigens, an antigen retrieval procedure was performed by treating the samples in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, in a microwave oven at 750W for 5 min, twice. After cooling for 20 min at room temperature, the sections were washed in phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4). Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in methanol containing 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min and sections were then washed with PBS three times. Afterwards, sections were incubated in a blocking serum (Ultra UV Block, LabVision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125UB) for 7 min at room temperature to block non-specific binding. Rabbit polyclonal anti-p57 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-8298) was applied at a 1:200 dilution for 1 h at room temperature. Negative controls were performed by replacing the primary antibody with rabbit serum. Sections were rinsed three times in PBS and incubated

with biotinylated secondary antibody (DAKO, Glostrup, Denmark; LSAB-2 system HRP K0609-ready to use) and a peroxidase labeled streptavidin (DAKO, Glostrup, Denmark; LSAB-2 system HRP K0609-ready to use), respectively, for 30 min, with each of the steps being followed by three rinses in PBS. Peroxidase activity was visualized with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC) (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125-HAC) chromogen in large-volume AEC substrate (Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA; TA-125 HAS) as one drop chromogen in 1ml substrate for 4 min. All dilutions were performed using PBS unless otherwise stated. Sections were counterstained with hematoxylin, dehydrated, mounted in Kaiser's glycerin gelatin (Merck, NJ, USA; OB514196), and examined by light microscopy. Tissue sections from different pregnancy days were evaluated for protein localization and immunolabeling intensity. All samples were treated with exactly the same protocol.

### *H-SCORE and semi-quantitative evaluations*

The evaluation of the immunohistochemical labeling of p57 in samples from both diabetic and control groups was performed using H-SCORE (Celik-Ozenci et al., 2004). Briefly, sections were evaluated using an Axioplan microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with a special ocular scale. Three randomly selected slides, each of five different fields (two maternal and three fetal zones) at 200X magnification, were evaluated for immunohistochemical labeling of p57. The evaluations were recorded as percentages of labeled cells of all types in each of four intensity categories, denoted as 0 (no labeling), 1+ (weak labeling but detectable above control), 2+ (distinct labeling), and 3+ (intense labeling). For each tissue, an H-SCORE value was derived by summing the percentages of cells that were labeled at each intensity multiplied by the weighted intensity of the labeling:  $H\text{-SCORE} = \sum P_i (i+1)$ , where  $i$  is the intensity score and  $P_i$  is the corresponding percentage of the cells. Two observers blind to the experimental groups performed the H-SCORE evaluations, and the average score was used. The distribution of immunoreactive cells in all experimental groups was also determined semi-quantitatively: 0=negative; (+)=weak positive; +=positive; ++=strong positive; +++=very strong positive.

### *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting*

Protein extraction and immunoblot analysis were performed as described previously (Hahn et al., 2001). Four placenta samples for each group were weighed and put into a homogenization buffer supplemented with CompleteR protease inhibitor cocktail (Boehringer, Mannheim, Germany). After homogenization, samples were centrifuged at 10,000g for 10 min. Supernatants

were collected and stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

The protein concentration was determined by Lowry assay (Lowry et al., 1951), and 50  $\mu\text{g}$  of protein was applied per lane. Samples were subjected to SDS polyacrylamide gel electrophoresis (30% acrylamide in 12% gel) at 100 V for approximately 1.5 h and were then transferred onto nitrocellulose membranes (Pharmacia, Kirkland, Quebec, Canada) in a buffer containing 0.2 mol/L glycine, 25 mmol/L Tris, and 20% methanol overnight, at  $4^{\circ}\text{C}$ , under 32 V and 65 A. The membranes were blocked for 1 h with 5% non-fat dry milk (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) and 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in 0.14 mol/L Tris-buffered saline (TBS; pH 7.2-7.4) at  $4^{\circ}\text{C}$ . Membranes were incubated with a 1:200 dilution of rabbit polyclonal anti-p57 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; sc-8298), overnight. After the washing steps, the membranes were further incubated with goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA; 170-6515), diluted to 1:2500, for 1 h at room temperature.

Immunolabeling was visualized by using the chemiluminescence-based SuperSignal CL HRP Substrate System (Pierce, Rockford, IL, USA), prepared according to the manufacturer's instructions, and the membranes were exposed to Hyperfilm (Amersham, Bucks, UK; 28906837). Membranes were also labeled by an identical protocol for binding of a 1:5000 dilution of an anti-mouse  $\beta$ -actin antibody (Abcam, Cambridge, UK; ab 6276-100) as an internal control to confirm equal loading of the samples. After the washing steps, the membranes were further incubated with goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugate (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA; 170-6516), diluted to 1:5000, for 1 h at room temperature. The bands were quantified using NIH image analysis software (Image J Version 1.36b, National Institutes of Health, USA).

### Statistical analysis

The following comparisons between control and diabetic groups were performed by a Mann-Whitney rank sum test and Wilcoxon signed-rank test: H-SCORE values for p57 immunohistochemistry and p57 Western blot band values. Mann-Whitney rank sum test comparisons were made between control and diabetic group samples taken from the same day. Wilcoxon signed-rank test comparisons were made between days for the same group, i.e. between control group day 11 and control group day 13. Values are presented as mean  $\pm$  SEM. All statistical analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 10.0 for Windows, Chicago, IL, USA).

## Results

### Immunohistochemical staining of p57

The distribution pattern of p57 immunolabeling intensity in control and diabetic group placentas is summarized in Table 1.

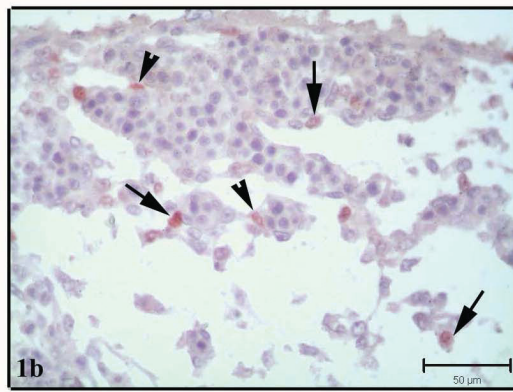
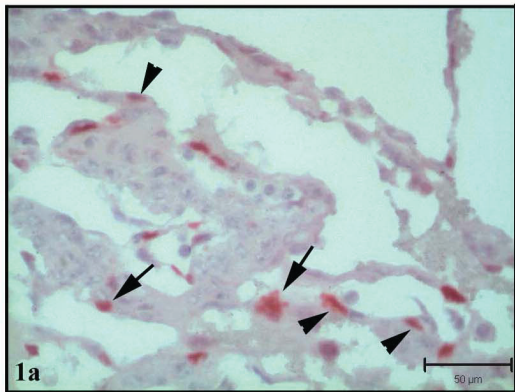
p57 immunostainings were in nuclei in both control and diabetic placentas. On day 11 of pregnancy, p57 immunolabeling was seen in a few cell types in the placenta of the control group. Most of the positive cells were labyrinthine trophoblasts, labyrinthine fetal vessel endothelial cells, and spongiotrophoblasts. A few giant cells showed strong positive immunopositivity. In Figure 1a positive labyrinthine trophoblasts and strong positive labyrinthine fetal vessel endothelial cells are seen. On the same day in the diabetic group the positive stainings for cell types and region were similar to the control group; however, the staining intensity of the p57 positive cells was less in the labyrinthine trophoblast zone when compared to control group. Weak positive labyrinthine trophoblasts and labyrinthine fetal vessel endothelial

**Table 1.** Semi-quantitative scoring of p57 immunostaining intensities in control and diabetic group rat placenta zones.

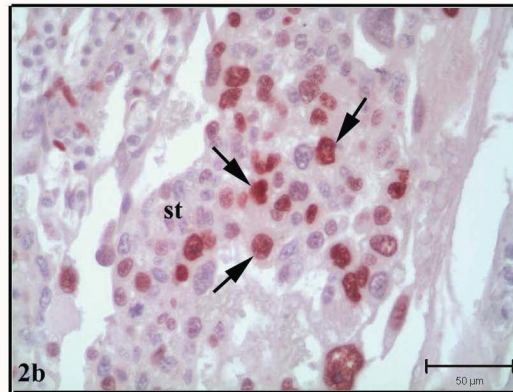
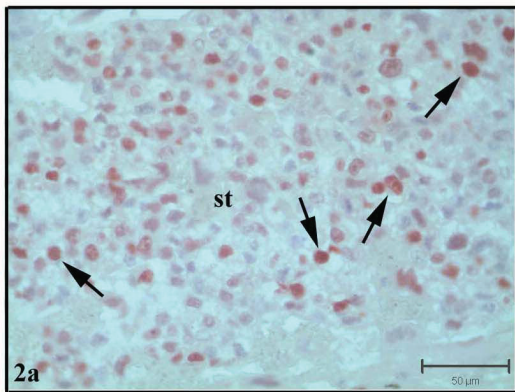
Gestation days	Allantois				Labyrinth		Junctional zone		
	VEC	PEC	AVEC	AMT	LFVEC	LT	ST	Gly. C	GC
Control									
11	0	0	0	0	++	+	+	x	++
13	0	0	0	0	++	++	++	x	+++
17	++	(+)	+	0	+	++	+	+	++
21	(+)	0	+++	0	+++	+++	+++	x	+++
Diabetic									
11	0	0	0	0	(+)	(+)	+	x	++
13	+	0	(+)	0	+++	+++	+++	x	+++
17	+	+	+	0	(+)	+	(+)	(+)	++
21	0	0	++	0	++	++	++	0	+++

0: negative; (+): weak positive; +: positive; ++: strong positive; +++: very strong positive; x: this zone doesn't exist; AMT: allantoic mesenchymal tissue; AVEC: allantoic vessel endothelial cell; CDK: cyclin-dependent kinase; CKI: cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor; GC: giant cell; Gly C: glycogen cell; LFVEC: labyrinthine fetal vessel endothelial cell; LT: labyrinthine trophoblast; PCNA: proliferating cell nuclear antigen; PEC: parietal endoderm cell; ST: spongiotrophoblast; VEC: visceral endoderm cell.

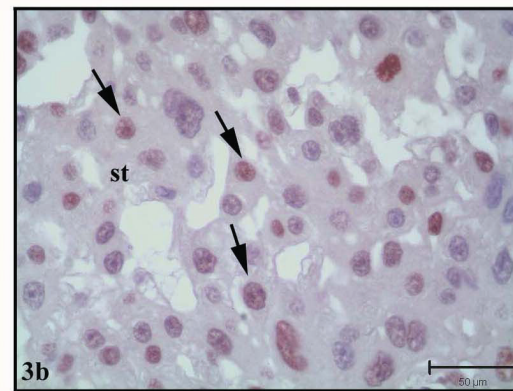
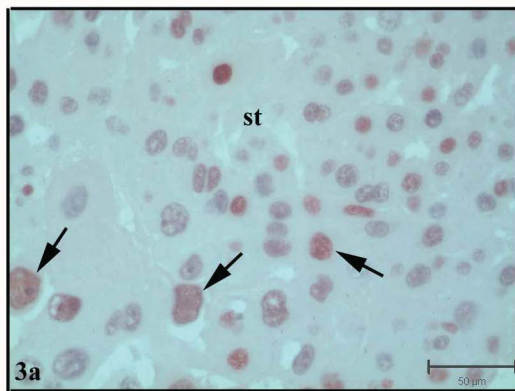
*p57 expression in normal and diabetic rat placenta*



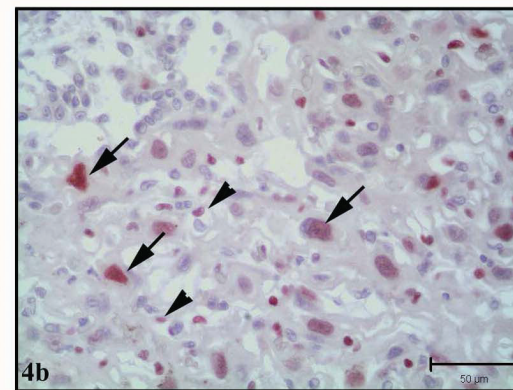
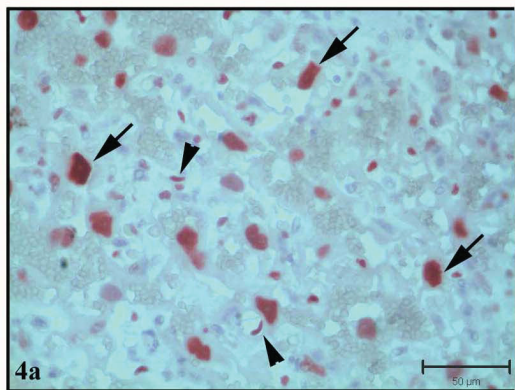
**Fig. 1.** p57 immunolabeling on day 11 of pregnancy. **a.** Positive p57 immunolabeling in labyrinthine trophoblasts (arrows) and strong positive p57 immunolabeling in labyrinthine fetal vessel endothelial cells (arrow heads) on day 11 control group rat placenta. **b.** p57 immunolabeling intensity was weak positive in labyrinthine trophoblasts (arrows) and labyrinthine fetal vessel endothelial cells (arrow heads) in the diabetic group, which is less than the same day control group. Scale bar: 50 μm.



**Fig. 2.** p57 immunolabeling on day 13 of pregnancy. **a.** Strong positive p57 immunolabeling in spongiotrophoblasts (arrows) on day 13 control group rat placenta. **b.** p57 immunolabeling intensity was greater (very strong positive) in diabetic group spongiotrophoblasts (arrows) compared to the control group on the same day. st: spongiotrophoblast. Scale bar: 50 μm.



**Fig. 3.** p57 immunolabeling on day 17 of pregnancy. **a.** p57 immunolabeling intensity was positive in spongiotrophoblasts (arrows) in control group placentas on day 17 of pregnancy. **b.** p57 immunolabeling intensity was less (weak positive) in diabetic group spongiotrophoblasts (arrows) compared to the same day control group. st: spongiotrophoblast. Scale bar: 50 μm.



**Fig. 4.** p57 immunolabeling on day 21 of pregnancy. **a.** p57 immunolabeling intensity in the control group on day 21 of pregnancy. Very strong positive p57 immunolabeling intensity in labyrinthine trophoblasts (arrows) and labyrinthine fetal vessel endothelial cells (arrow heads). **b.** Weaker (strong positive) p57 immunolabeling intensities were observed in both the labyrinthine trophoblasts (arrows) and labyrinthine fetal vessel

endothelial cells (arrow heads) in the diabetic group on day 21 of pregnancy compared to the same day control group. Scale bar: 50 μm.

cells are seen in Figure 1b.

On day 13 of pregnancy, in both the control and diabetic groups, p57 immunostaining intensity was stronger compared to control and diabetic groups on day 11 of pregnancy. Positively stained cells were mostly labyrinthine trophoblasts, spongiotrophoblasts, and giant cells. Immunoreactivity was strong positive in spongiotrophoblasts (Fig. 2a). In diabetic group placentas p57 immunostaining was more intense compared to the control group. Spongiotrophoblasts were very strong positive (Fig. 2b).

On day 17 of pregnancy p57 immunostaining intensity decreased both in control and diabetic group placentas compared to day 13 of pregnancy. Immunostaining intensity was positive in allantoic vessel endothelial cells, labyrinthine fetal vessel endothelial cells, glycogen cells, and spongiotrophoblasts. Positive p57 immunostaining is seen in spongiotrophoblasts in Figure 3a. On the same day diabetic group placentas exhibited weaker immunoreactivity in almost every stained cell compared to the control group. Immunoreactivity in spongiotrophoblasts in the diabetic group was less than the control group's weak positive reactivity (Fig. 3b).

On day 21 of pregnancy the control group's p57 positive cell number and staining intensity was greater in all zones of the placenta than on days 11, 13, and 17 in the control and diabetic groups' placentas. Very strong positive p57 immunostaining is seen in labyrinthine trophoblasts and labyrinthine fetal vessel endothelial cells in control group placentas (Fig. 4a). On the other hand, on day 21 the diabetic group's p57 positive cell number and immunostaining intensity was less than the day 21 control group. Strong positive immunostaining is seen in labyrinthine trophoblasts and labyrinthine fetal vessel endothelial cells in diabetic group placentas (Fig. 4b).

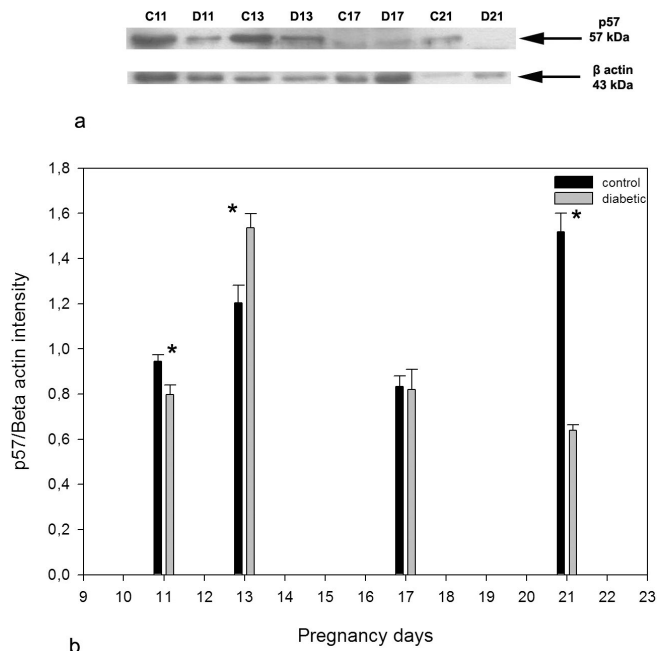
H-SCORE analysis revealed that immunolabeling intensity in the control group placentas was higher than that in the diabetic group placentas on days 11, 17, and 21 of pregnancy. On day 13 of pregnancy p57 immunolabeling intensity was higher in the diabetic group compared to the control group placentas. All stained cell numbers and immunolabeling intensity in the control group on day 21 of pregnancy was greater when compared to the control and diabetic groups on

pregnancy days 11, 13, and 17. H-SCORE values for control and diabetic groups are shown in Table 2. The differences between control and diabetic groups were statistically significant on days 11 and 21.

A Wilcoxon signed rank test showed that in the control group the changes in p57 immunolabeling intensity was statistically significant ( $p < 0.05$ ) between: day 11 and days 13 and 21; day 13 and day 17; and, day 17 and day 21. In the diabetic group, the changes in p57 immunolabeling intensity was statistically significant ( $p < 0.05$ ) between: day 11 and day 13; and, between day 13 and days 17 and 21 (not shown).

#### Western blot results

Consistent with p57 immunohistochemistry H-SCORE results, p57 protein amounts on days 11, 17, and 21 of pregnancy were higher in control group placentas; these differences were statistically significant on days 11 and 21 ( $p = 0.029$ ,  $p < 0.001$  respectively) but not on day 17 ( $p = 1$ ). On day 13 of pregnancy the p57 protein amount appeared to be higher in diabetic group placentas compared to control group placentas; this difference was statistically significant ( $p = 0.017$ ) (Fig. 5a, b).



**Fig. 5. a.** Western blot results of p57 in control and diabetes-induced groups.  $\beta$ -actin was used as an internal standard. **b.** Quantitative analysis of p57 Western blot data. The values in the bar graphs were obtained by dividing the protein intensity value by its corresponding  $\beta$ -actin intensity value. The differences seen between groups on days 11, 13, and 21 were statistically significant. Abbreviations: C11, C13, C17, and C21 for the control group on days 11, 13, 17, and 21 of pregnancy, respectively; D11, D13, D17, and D21 for the diabetic group on parallel days of pregnancy, respectively.

**Table 2.** H-SCORE values of p57 immunostaining in control and diabetic group rat placentas on days 11, 13, 17, and 21 of pregnancy.

Gestation Days	CONTROL	DIABETIC
<b>H-SCORE VALUES</b>		
11	104,455 $\pm$ 2,201	66,545 $\pm$ 3,627
13	113,909 $\pm$ 3,204	121,545 $\pm$ 8,218
17	90,818 $\pm$ 6,923	71,364 $\pm$ 7,148
21	131,273 $\pm$ 9,135	73,545 $\pm$ 6,338



## Discussion

Proper development of the placenta is dependent on the formation of trophoblasts. Trophoblast proliferation is tightly controlled, because it is important for normal proliferation, differentiation, and function of the decidual trophoblastic unit, which are necessary for successful implantation. Therefore, there must be a balance between the positive cell cycle factors and the negative cell cycle inhibitors (Zhang et al., 1997).

The altered metabolic environment in maternal diabetes during pregnancy interferes with normal fetal development (Padmanabhan and al-Zuhair, 1987). Abnormally elevated glucose levels in maternal blood, which lead to increased glucose transport to the embryo, are responsible for the teratogenic effects of maternal diabetes. Consequently, the expression of genes that control essential developmental processes is disturbed (Loeken, 2005). Deregulation of the cell cycle can cause uncontrolled cell division, resulting in the development or progression of trophoblastic disease. Since p57 is a cell cycle inhibitor and tumor suppressor, lack of p57 activity can lead to a loss of cell cycle control and hyperproliferation (Zhang et al., 1997).

STZ-induced diabetic rats are characterized by placentomegaly and varying degrees of fetal growth retardation (Robinson et al., 1988; Acar et al., 2008). Placental enlargement is also a feature of human diabetic pregnancies. Whereas macrosomia often occurs in infants of diabetic women, growth retardation is almost a rule in spontaneous and experimental diabetes in animals. The functional significance of placentomegaly in the presence of maternal diabetes in rats and other species is unclear (Husain et al., 2001), and it is not clear when the growth inhibition starts or how placental pathology might affect fetal growth in maternal diabetes (Padmanabhan and Shafiullah, 2001). Some researchers hypothesize that hyperglycemia leads to a relative immaturity of rat placentas by providing a stimulus for continuous growth and cell division-delayed maturation (Gewolb et al., 1986).

Takahashi et al. (2000b) reported that both p57<sup>-/-</sup> and p57<sup>+/-</sup> mice had heavier placentas compared to wild type mice but detected no difference in the body weights of embryos between the genotypes. Histopathologic analysis of placentas from homozygote knock-out mice showed that labyrinthine- and spongio-trophoblasts had prominent proliferation, resulting in thickened placentas and narrowed interlabyrinthine trophoblast spaces. Fibrin deposition of the intervillous space was also observed. There were no statistically significant increases in glycogen or giant cells in the knock-out group.

To elucidate the mechanism underlying trophoblastic hyperplasia seen in the placentas of mice lacking p57 expression, Matsuura et al. (2002) studied the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and they showed higher VEGF mRNA and protein levels in knock-out placentas compared to wild-type placentas.

They concluded that VEGF is involved in the hyperplasia that occurs in placentas of p57 null embryos.

In another study, Zhang et al. (1998) conducted histopathological observations on p27<sup>-/-</sup>p57<sup>+/-</sup> mice. In placentas derived from p57<sup>+/-m</sup> single or p27<sup>-/-</sup> p57<sup>+/-m</sup> double mutants, the labyrinthine trophoblast zone was less vascularized and contained more trophoblasts than those from wildtype or p27<sup>-/-</sup> mice. The diameter of most mutant fetal capillaries was reduced to the size of a single fetal red blood cell, leading to the appearance of less vascularization. They suspected that the absence of these CKIs might alter the differentiation of trophoblasts in the labyrinthine trophoblast zone, allowing them to proliferate inappropriately.

Knox and Baker (2007) showed the localization of p57 in wild-type mouse placenta on embryonic days 10 (e10) and 17 (e17) with the in situ hybridization method. At e10, there was staining of the labyrinthine- and spongio-trophoblast layers, as well as the overlying trophoblast giant cells. At e17, there was intense staining in the labyrinthine trophoblast, as well as in clusters of cells within the spongiotrophoblast layer (Knox and Baker, 2007). We also observed p57 expression in the labyrinthine trophoblast, spongiotrophoblast, and giant cell layers on day 11 of pregnancy. Similarly, on day 17 of pregnancy there was p57 immunoreactivity in both the labyrinthine- and spongio-trophoblasts.

Kim et al. (2005) studied the expressions of p27 and p57 in mouse placenta on days 12, 14, and 16 of pregnancy. They reported the immunolocalization of p57 in both the nucleus and cytoplasm of decidua, spongio- and labyrinthine-trophoblast cells. According to their Western blot results, p57 expression increased from day 12 to day 14 and then decreased on days 16 and 18. They concluded that p27 may play a role in the late period of mouse placental development and p57 may play a role in the middle period of mouse placental development. Consistent with this study, we observed an increase in p57 protein amounts from day 11 to day 13 of pregnancy. Then there was a decrease on day 17; afterwards, p57 expression increased in the control group on day 21 of pregnancy.

Pedersen and Molsted-Pedersen (1979) noted that in diabetic pregnancies fetal growth is retarded early in pregnancy, leading to low birth weight and possibly a higher incidence of congenital malformations. In our previous study (Acar et al., 2008), embryo weights in diabetic groups on all studied days (days 11, 13, 17, and 21 of pregnancy) were lower than that of the control group embryos on all days examined (not represented here). We also showed that placental weights in the diabetic groups were less than in control groups on days 11 and 13 of pregnancy, while higher placental weights were recorded on days 17 and 21 of pregnancy; these results were consistent with previous studies (Padmanabhan and al-Zuhair, 1987; Robinson et al., 1988; Caluwaerts et al., 2000; Padmanabhan and Shafiullah, 2001). There was an increase in placental weights after day 17 of rat pregnancy, suggesting that

this increase might be due to increased protein synthesis and cell proliferation (Acar et al., 2008). These studies indicate that diabetes may contribute to fetal growth retardation and placentomegaly starting in the last third of pregnancy in rats. Robinson et al. (1988), reported that on days 14 and 16 of pregnancy placental weights of animals in the diabetic group were less than those in the control group, but the weight of placentas increased after day 18 of pregnancy. In this study, they also showed that in the early stages of pregnancy placentas of animals in the diabetic group had levels of protein, RNA, DNA, and cell numbers that were similar to levels seen in the control group. But after day 18 of pregnancy, diabetic placentas had more protein, RNA, DNA, and cells compared to control group placentas. Glycogen storage increased in the diabetic group placentas starting from day 16 of pregnancy, but decreased slowly with advancing pregnancy in control group placentas.

We showed abnormal expression patterns of PCNA in diabetic rat placenta in our previous study (Acar et al., 2008). On days 11 and 13 of pregnancy, PCNA protein amounts were higher in control group placentas; however, these differences were not statistically significant. We also observed greater PCNA immunolabeling intensity in diabetic group placentas on days 17 and 21 of pregnancy when compared to the controls, with no statistically significant difference. We had suggested that higher PCNA protein intensity/amounts in diabetic groups on days 17 and 21 of pregnancy may arise from spongiotrophoblasts, because this cell type was observed to maintain its very strong immunolabeling intensity until day 21 of pregnancy. This is contradictory to the report of Mark et al. (2006). They emphasized that during the final third of rat pregnancy the basal zone exhibits apoptosis and shows little, if any, growth, whereas the labyrinthine trophoblast zone grows substantially and apoptosis is very low over this period. It is possible that spongiotrophoblasts are affected much more than the labyrinthine trophoblasts under diabetic conditions.

Trophoblast cells at the periphery of the placenta undergo terminal differentiation to form polyploid giant cells in rodents. The formation of the terminally differentiated outer layer of trophoblast cells is critical for implantation and for the establishment of connections between the placenta and the maternal vasculature. According to our study, p57 expression was strong/very strong positive in all studied pregnancy days in control group placentas. However expression was lower in diabetic group placentas compared to control group placentas. The less differentiated giant cells in diabetic group placentas may not be able to invade the endometrium deeply enough at the beginning of implantation.

Cell proliferation is internally regulated by a balance of cell cycle activator proteins and cell cycle inhibitor proteins. As most cells differentiate during development, they begin to express CDK inhibitors to arrest cell cycle progression. Genbacev et al. (2000) showed that the

percentage of cytotrophoblasts that expressed cell cycle inhibitors correlated positively with increased gestational age in human placentas; they speculated that this population was composed of differentiating cytotrophoblasts.

Goffin et al. (2003) examined the localization of p57 in first trimester human placentas. According to their immunohistochemistry results, there was no reaction in syncytium, villous cytotrophoblasts, and proliferative extravillous cytotrophoblasts, but they found reaction in invasive extravillous cytotrophoblasts. Korgun et al. (2006) investigated the immunolocalization of some cell cycle markers in first trimester human placentas, and p57 was shown to localize predominantly in villous and extravillous cytotrophoblasts. They commented that p57 expression in extravillous cytotrophoblasts, which invade the decidua deeply, inhibit cell cycle progression and allow the cells to differentiate and change their phenotype, accounting for the loss of mitogenic potential of these cells.

p57 may be important as a tumour suppressor during pregnancy (Takahashi et al., 2000b). It has been shown that p57 expression is markedly reduced in patients with malignant trophoblastic neoplasms which can result in spontaneous abortions and preterm deliveries (Chilosi et al., 1998). Fukunaga et al. (2002, 2004) reported p57 to be at high frequency in normal placentas, but absent or at low frequency in diploid and tetraploid complete hydatidiforms. Currently, there have not been any studies examining p57 expression in diabetic human placentas. However, because we observed abnormal expression of p57 in our streptozotocin-induced diabetic model, and because many alterations in these types of experimental models are similar to those found in human diabetic placentas (Jawerbaum and White, 2010), our work could point to an area that deserves to be explored in human tissue samples.

In brief, we observed an abnormal expression pattern of PCNA and p57 in our previous and current study, respectively, concerning diabetic rat placentas. Since p57 controls the cell cycle exit and is expressed less in diabetic placentas on days 17 and 21 of pregnancy, diabetic placentas may continue to proliferate on these days. Less p57 expression in diabetic placentas on days 17 and 21 of pregnancy compared to control placentas may explain the reason why diabetic placentas are heavier and bigger.

In conclusion, small placentas in the early stages of pregnancy and placentomegaly in later stages of pregnancy in diabetic rats may occur as a result of disturbed cell cycle pathways with the participation of p57 and other mitotic regulators, like PCNA, as we previously showed. There are relatively few studies on the role of mitotic regulators involved in rat placental development. Our research may provide the basis for further investigations to improve our understanding of factors leading to abnormal placentation; however, more detailed studies are required to explain the molecular mechanisms of diabetic placentation.

*p57 expression in normal and diabetic rat placenta*

---

*Acknowledgements.* This study is a part of the Master's thesis of Nuray Acar and was supported by a grant from the Akdeniz University Research Fund (2004.02.0122.001), Antalya, Turkey.

---

## References

- Acar N., Korgun E.T., Cayli S., Sahin Z., Demir R. and Ustunel I. (2008). Is there a relationship between PCNA expression and diabetic placental development during pregnancy? *Acta Histochem.* 110, 408-417.
- Barash V., Gutman A. and Shafrir E. (1985). Fetal diabetes in rats and its effect on placental glycogen. *Diabetologia* 28, 244-249.
- Caluwaerts S., Pijnenborg R., Luyten C. and Van Assche F.A. (2000). Growth characteristics of diabetic rat ectoplacental cones *in vivo* and *in vitro*. *Diabetologia* 43, 939-945.
- Capobianco E., Jawerbaum A., Romanini M.C., White V., Pustovrh C., Higa R., Martinez N., Mugnaini M.T., Sonez C. and Gonzalez E. (2005). 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPAR  $\gamma$  agonist on nitridergic and lipid placental metabolism. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 423-433.
- Celik-Ozenci C., Akkoyunlu G., Korgun E.T., Savas B. and Demir R. (2004). Expressions of VEGF and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 414-423.
- Chilosi M., Doglioni C., Menestrina F., Lestani M., Piazzola E., Benedetti A., Pedron S., Montagna L., Pizzolo G., Mariuzzi G.M. and Janossy G. (1997). Expression of extracellular matrix molecules, proliferation markers and cyclin-dependent kinase inhibitors in inflamed tissues. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 524-528.
- Chilosi M., Piazzola E., Lestani M., Benedetti A., Guasparri I., Granchelli G., Aldovini D., Leonardi E., Pizzolo G., Doglioni C., Menestrina F. and Mariuzzi G.M. (1998). Differential expression of p57kip2, a maternally imprinted Cdk inhibitor, in normal human placenta and gestational trophoblastic disease. *Lab. Invest.* 78, 269-276.
- Coqueret O. (2003). New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: A function for each cell compartment? *Trends Cell Biol.* 13, 65-70.
- Desoye G. and Shafrir E. (1994). Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol. Aspects. Med.* 15, 505-682.
- Diamant Y.Z., Metzger B.E., Freinkel N. and Shafrir E. (1982). Placental lipid and glycogen content in human and experimental diabetes mellitus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 144, 5-11.
- el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M., Lin D., Mercer W.E., Kinzler K.W. and Vogelstein B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Eriksson U.J., Bone A.J., Turnbull D.M. and Baird J.D. (1989). Timed interruption of insulin therapy in diabetic BB/E rat pregnancy: effect on maternal metabolism and fetal outcome. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 120, 800-810.
- Fukunaga M. (2002). Immunohistochemical characterization of p57KIP2 expression in early hydatidiform moles. *Hum. Pathol.* 33, 1188-1192.
- Fukunaga M. (2004). Immunohistochemical characterization of p57Kip2 expression in tetraploid hydropic placentas. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 897-900.
- Genbacev O., McMaster M.T. and Fisher S.J. (2000). A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am. J. Pathol.* 157, 1337-1351.
- Georgiades P., Ferguson-Smith A.C. and Burton G.J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta.* 23, 3-19.
- Gewolb I.H., Merdian W., Warshaw J.B. and Enders A.C. (1986). Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats. *Diabetes* 35, 1254-1261.
- Goffin F., Munaut C., Malassine A., Evain-Brion D., Frankenke F., Fridman V., Dubois M., Uzan S., Merviel P. and Foidart J.M. (2003). Evidence of a limited contribution of fetomaternal interactions to trophoblast differentiation along the invasive pathway. *Tissue Antigens* 62, 104-116.
- Gu Y., Turck C.W. and Morgan D.O. (1993). Inhibition of CDK2 activity *in vivo* by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366, 707-710.
- Hahn D., Blaschitz A., Korgun E.T., Lang I., Desoye G., Skofitsch G. and Dohr G. (2001). From maternal glucose to fetal glycogen: expression of key regulators in the human placenta. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 1173-1178.
- Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K. and Elledge S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Herrera E., Palacin M., Martin A. and Lasuncion M.A. (1985). Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes* 34 (Suppl 2), 42-46.
- Husain S.M., Frost R. and Mughal Z.M. (2001). Effect of Diabetes mellitus on rat placenta cellularity. *Early Hum. Dev.* 60, 207-214.
- Jawerbaum A. and Gonzalez E. (2006). Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment. *Curr. Med. Chem.* 13, 2127-2138.
- Jawerbaum A. and White V. (2010). Animal models in diabetes and pregnancy. *Endocr. Rev.* 31, 680-701.
- Kanayama N., Takahashi K., Matsuura T., Sugimura M., Kobayashi T., Moniwa N., Tomita M. and Nakayama K. (2002). Deficiency in p57kip2 expression induces preeclampsia-like symptoms in mice. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1129-1135.
- Kim S.T., Lee S.K. and Gye M.C. (2005). The Expression of Cdk Inhibitors p27kip1 and p57kip2 in Mouse Placenta and Human Choriocarcinoma JEG-3 Cells. *Placenta.* 26, 73-80.
- Knox K.S. and Baker J.C. (2007). Genome-wide expression profiling of placentas in the p57Kip2 model of pre-eclampsia. *Mol. Human Reprod.* 13, 251-263.
- Korgun E.T., Celik-Ozenci C., Acar N., Cayli S., Desoye G. and Demir R. (2006). Location of cell cycle regulators cyclin B1, cyclin A, PCNA, Ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol.* 125, 615-624.
- Kuhn D.C., Crawford M.A., Stuart M.J., Botti J.J. and Demers L.M. (1990). Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies. *Diabetes* 39, 914-918.
- Lappas M., Permezel M. and Rice G.E. (2004). Release of proinflammatory cytokines and 8-isoprostane from placenta, adipose tissue, and skeletal muscle from normal pregnant women and women with gestational diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 5627-5633.
- Lee M.H., Reynisdottir I. and Massague J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev.* 9, 639-649.

*p57 expression in normal and diabetic rat placenta*

- Loeken M.R. (2005). Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy. *Am. J. Med. Genet. C. Semin. Med. Genet.* 135, 77- 87.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Mark P.J., Smith J.T. and Waddell B.J. (2006). Placental and fetal growth retardation following partial progesterone withdrawal in rat pregnancy. *Placenta.* 27, 208-214.
- Matsuoka S., Edwards M.C., Bai C., Parker S., Zhang P., Baldini A., Harper J.W. and Elledge S.J. (1995). p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 9, 650-662.
- Matsuura T., Takahashi K., Nakayama K., Kobayashi T., Choi-Miura N.H., Tomita M. and Kanayama N. (2002). Increased expression of vascular endothelial growth factor in placentas of p57Kip2 null embryos. *FEBS Lett.* 532, 283-288.
- Matuoka S., Thompson J.S., Edwards M.C., Bartletta J.M., Grundy P. and Kalikin L.M., Harper J.W., Elledge S.J., Feinberg A.P. (1996). Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 3026-3030.
- Padmanabhan R. and al-Zuhair A.G. (1987). Congenital malformations and intrauterine growth retardation in streptozotocin induced diabetes during gestation in the rat. *Reprod. Toxicol.* 1, 117-125.
- Padmanabhan R. and al-Zuhair A.G. (1990). Ultrastructural studies on the placentae of streptozotocin induced maternal diabetes in the rat. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.* 104, 212-230.
- Padmanabhan R. and Shafiullah M. (2001). Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 260-271.
- Pedersen J.F. and Molsted-Pedersen L. (1979). Early growth retardation in diabetic pregnancy. *Br. Med. J.* 1, 18-19.
- Polyak K., Kato J.Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massague J., Roberts J.M. and Koff A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev.* 8, 9-22.
- Radaelli T., Varastehpour A., Catalano P. and Hauguel-de Mouzon S. (2003). Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes.* 52, 2951-2958.
- Rao S.S., Chu C. and Kohtz D.S. (1994). Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by myogenic basic helixloop-helix regulators. *Mol. Cell Biol.* 14, 5259-5267.
- Robinson J., Canavan J.P., el Haj A.J. and Goldspink D.F. (1988). Maternal diabetes in rats I. Effects on fetal growth and protein turnover. *Diabetes* 37, 1665-1670.
- Shafir E. and Barash V. (1987). Placental function in maternalfetal fat transport in diabetes. *Biol. Neonate* 51, 102-112.
- Sherr C.J. and Roberts J.M. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. (1999). *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Skapek S.X., Rhee J., Spicer D.B. and Lassar A.B. (1995). Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin D1-dependent kinase. *Science* 267, 1022-1024.
- Skapek S.X., Rhee J., Kim P.S., Novitch B.G. and Lassar A.B. (1996). Cyclin-mediated inhibition of muscle gene expression via a mechanism that is independent of pRB hyperphosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7043-7053.
- Suwaki N., Masuyama H., Masumoto A., Takamoto N. and Hiramatsu Y. (2007). Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in the placenta of diabetic pregnancy. *Placenta* 28, 315-323.
- Takahashi K., Nakayama K. and Nakayama K. (2000a). Mice lacking a Cdk inhibitor, p57Kip2, exhibit skeletal abnormalities and growth retardation. *J. Biochem.* 127, 73-83.
- Takahashi K., Kobayashi T. and Kanayama N. (2000b). P57Kip2 regulates the proper development of labyrinthine and spongiosotrophoblasts. *Mol. Human Reprod.* 6, 1019-1025.
- Toyoshima H. and Hunter T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell.* 78, 67-74.
- Yan Y., Frisen J., Lee M.H., Massague J. and Barbacid M. (1997). Ablation of the CDK inhibitor p57Kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development. *Genes Dev.* 11, 973-983.
- Yan Y.E., Wang H. and Feng Y.H. (2005). Alterations of placental cytochrome P450 1A1 and P-glycoprotein in tobacco-induced intrauterine growth retardation in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 1387-1394.
- Yokoo T., Toyoshima H., Miura M., Wang Y., Iida K.T., Suzuki H., Sone H., Shimano H., Gotoda T., Nishimori S., Tanaka K. and Yamada N. (2003). p57Kip2 regulates actin dynamics by binding and translocating LIM-kinase 1 to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 278, 52919-52923.
- Yu Y., Singh U., Shi W., Konno T., Soares M.J., Geyer R. and Fundele R. (2008). Influence of murine maternal diabetes on placental morphology, gene expression, and function. *Arch. Physiol. Biochem.* 114, 99-110.
- Zhang P., Liegeois N.J., Wong C., Finegold M., Hou H., Thompson J.C., Silverman A., Harper J.W., De Pinho R.A. and Elledge S.J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387, 151-158.
- Zhang P., Wong C., DePinho R.A., Harper J.W. and Elledge S.J. (1998). Cooperation between the Cdk inhibitors p27(KIP1) and p57(KIP2) in the control of tissue growth and development. *Genes Dev.* 12, 3162-3167.

# Uterine FK506-binding protein 52 (FKBP52)–peroxiredoxin-6 (PRDX6) signaling protects pregnancy from overt oxidative stress

Yasushi Hirota<sup>a,b,1</sup>, Nuray Acar<sup>a,c,1</sup>, Susanne Tranguch<sup>a</sup>, Kristin E. Burnum<sup>d</sup>, Huirong Xie<sup>a</sup>, Ako Kodama<sup>b</sup>, Yutaka Osuga<sup>b</sup>, Ismail Ustunel<sup>c</sup>, David B. Friedman<sup>d</sup>, Richard M. Caprioli<sup>d</sup>, Takiko Daikoku<sup>a</sup>, and Sudhansu K. Dey<sup>a,2</sup>

<sup>a</sup>Division of Reproductive Sciences, The Perinatal Institute, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, University of Cincinnati College of Medicine, Cincinnati, OH 45229; <sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo, Tokyo 113-8655, Japan; <sup>c</sup>Department of Histology and Embryology, School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey; and <sup>d</sup>Mass Spectrometry Research Center, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232

Edited by Bert W. O'Malley, Baylor College of Medicine, Houston, TX, and approved July 26, 2010 (received for review July 1, 2010)

Immunophilin FK506-binding protein 52 (FKBP52) is a cochaperone that binds to the progesterone receptor (PR) to optimize progesterone (P<sub>4</sub>)–PR signaling. We recently showed that *Fkbp52*-deficient (*Fkbp52*<sup>−/−</sup>) mice have reduced uterine PR responsiveness and implantation failure which is rescued by excess P<sub>4</sub> supplementation in a genetic background-dependent manner. This finding led us to hypothesize that FKBP52 has functions in addition to optimizing PR activity. Using proteomics analysis, we found that uterine levels of peroxiredoxin-6 (PRDX6), a unique antioxidant, are significantly lower in *Fkbp52*<sup>−/−</sup> mice than in WT and PR-null (*Pgr*<sup>−/−</sup>) mice. We also found that *Fkbp52*<sup>−/−</sup> mice with reduced uterine PRDX6 levels are susceptible to paraquat-induced oxidative stress (OS), leading to implantation failure even with P<sub>4</sub> supplementation. The same dose of paraquat did not interfere with implantation in WT mice. Moreover, treatment with antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and N-acetylcysteine (NAC) attenuated paraquat-induced implantation failure in P<sub>4</sub>-treated *Fkbp52*<sup>−/−</sup> mice. Functional analyses using mouse embryonic fibroblasts show that *Fkbp52* deficiency associated with reduced PRDX6 levels promotes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death, which is reversed by the addition of NAC or by forced expression of PRDX6, suggesting that *Fkbp52* deficiency diminishes the threshold against OS by reducing PRDX6 levels. These findings provide evidence that heightened uterine OS in *Fkbp52*<sup>−/−</sup> females with reduced PRDX6 levels induces implantation failure even in the presence of excess P<sub>4</sub>. This study shows that FKBP52–PRDX6 signaling protects pregnancy from overt OS.

embryo implantation | mouse | uterus

Infertility is a global social and economic concern. It is estimated that by 2050 15% of couples worldwide will be childless because of infertility. Although many causes of infertility have been overcome by the application of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), implantation failure is still a major obstacle for optimal pregnancy outcome. Pregnancy rates remain low in patients undergoing IVF-ET because of the transfer of embryos into a nonreceptive uterus, resulting in implantation failure (1). Heterogeneous uterine cell types respond differentially to estrogen and progesterone (P<sub>4</sub>) to prepare the uterus to the receptive state. For successful implantation to occur, the uterus must be transiently receptive to implantation-competent blastocysts. P<sub>4</sub> signaling is an absolute requirement for implantation and pregnancy maintenance in most mammals studied (2). P<sub>4</sub> acts via the nuclear progesterone receptor (PR) to activate transcription of genes involved in ovulation, uterine receptivity, implantation, decidualization, and pregnancy maintenance (3).

We recently found that the immunophilin FK506-binding protein 52 (FKBP52) serves as a cochaperone to govern normal PR function in the mouse uterus, where its expression overlaps with that of PR. Immunophilins are so named because they bind to certain immunosuppressive drugs to mediate their actions. They are grouped into two families, FKBP and cyclosporin A-binding (cyclophilin, CyP) proteins. Some FKBP and CyP family members have a tetratricopeptide repeat (TPR) domain that targets binding to the conserved C terminus of Hsp90. FKBP52 is one such TPR-

containing cochaperone that influences steroid hormone receptor function (4). The mature PR complex bound to FKBP52 binds to P<sub>4</sub> with high affinity and efficiency, although some basal PR responsiveness to P<sub>4</sub> is retained in the absence of FKBP52. In addition, FKBP52 plays a role in immunoregulation and basic cellular processes involving protein stability, folding, and trafficking (5–7).

We found that *Fkbp52*<sup>−/−</sup> females on both C57BL/6/129 mixed and CD1 backgrounds have implantation failure with normal ovulation (8, 9). However, P<sub>4</sub> supplementation rescues implantation and decidualization in CD1, but not in C57BL/6/129, *Fkbp52*<sup>−/−</sup> females. In CD1 *Fkbp52*<sup>−/−</sup> females, P<sub>4</sub> at higher-than-normal levels confers PR signaling sufficient for implantation, but even higher levels of P<sub>4</sub> are required to rescue full-term pregnancy (9). How P<sub>4</sub> overcomes reduced PR responsiveness to allow implantation in CD1 *Fkbp52*<sup>−/−</sup> mice is still unknown. Because FKBP52 positions PR in optimal conformation for binding to P<sub>4</sub>, one possibility is that excess P<sub>4</sub> in the absence of FKBP52 increases the probability of random binding of P<sub>4</sub> to the PR complex even in its less optimal configuration. Alternatively, FKBP52 may influence other pathways along with PR signaling, because exogenous P<sub>4</sub> cannot rescue implantation in C57BL/6/129 *Fkbp52*<sup>−/−</sup> mice and significantly higher P<sub>4</sub> levels are necessary to restore implantation and full-term pregnancy in CD1 *Fkbp52*<sup>−/−</sup> females (9). Moreover, *Fkbp52* also is expressed in the placenta with no detectable PR expression (9), implying that FKBP52 has other functions in addition to its role in optimizing PR activity. Our present study, using proteomics analysis, found that FKBP52 regulates oxidative stress (OS) by regulating the levels of a unique antioxidant, peroxiredoxin-6 (PRDX6), which operates independently of other peroxiredoxins and antioxidant proteins (10–12). Here we show that uterine FKBP52–PRDX6 signaling is a major player in countering the adverse effects of OS during early pregnancy.

## Results

**PRDX6 Levels Are Reduced in *Fkbp52*<sup>−/−</sup> Uteri.** To explore downstream targets of FKBP52 independent of PR, we used proteomics approaches. Ovariectomized WT, *Fkbp52*<sup>−/−</sup>, and PR-null (*Pgr*<sup>−/−</sup>) mice on the C57BL/6/129 background were treated with P<sub>4</sub> (2 mg/d) for 2 d, and uteri were collected 24 h after the second injection. Uterine protein lysates were subjected to 2D difference in gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis with detection limits from 10- to 150-kDa proteins (pH 4–7) (Fig. 1A). Among the differentially expressed proteins, we found that PRDX6 levels are markedly down-regulated in *Fkbp52*<sup>−/−</sup> uteri compared with

Author contributions: Y.H., S.T., T.D., and S.K.D. designed research; Y.H., N.A., S.T., K.E.B., H.X., A.K., Y.O., D.B.F., and T.D. performed research; R.M.C. contributed new reagents/analytic tools; Y.H., N.A., S.T., I.U., T.D., and S.K.D. analyzed data; and Y.H., S.T., T.D., and S.K.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>Y.H. and N.A. contributed equally to this work.

<sup>2</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: sk.dey@cchmc.org.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1009324107/-DCSupplemental](http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1009324107/-DCSupplemental).

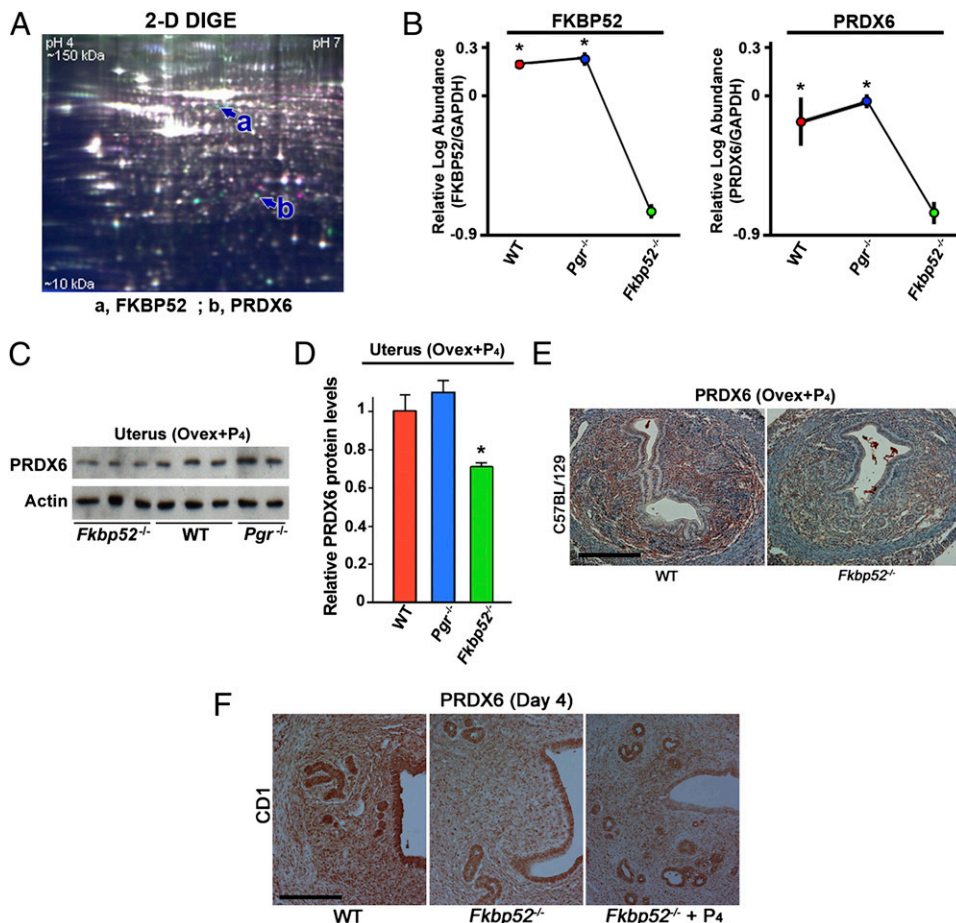
*Pgr*<sup>-/-</sup> and WT uteri, with the exception of FKBP52, serving as an internal control (Table S1 and Fig. 1B). This finding led us to focus on PRDX6 as a potential downstream mediator of FKBP52 function, independent of its PR co-chaperone activity, and to assess uterine expression of *Prdx6* in early pregnancy. Notably, we found that levels of six proteins increased in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri compared with WT uteri, but no differences were detected between WT and *Pgr*<sup>-/-</sup> uteri (Table S2). We confirmed down-regulated PRDX6 protein levels in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri compared with *Pgr*<sup>-/-</sup> and WT uteri by Western blotting (Fig. 1C and D) and immunohistochemistry (Fig. 1E). In addition, both stromal and epithelial localization of PRDX6 was reduced in ovariectomized *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri treated with P<sub>4</sub> (Fig. 1E).

To examine the effects of ovarian hormones on *Prdx6* expression in mouse uteri, we performed Northern and in situ hybridization using uteri from ovariectomized WT mice. Neither P<sub>4</sub> nor estradiol-17β (E<sub>2</sub>) significantly altered *Prdx6* expression levels (Fig. S1A), but P<sub>4</sub> changed the expression domain from the epithelium to the stroma (Fig. S1B).

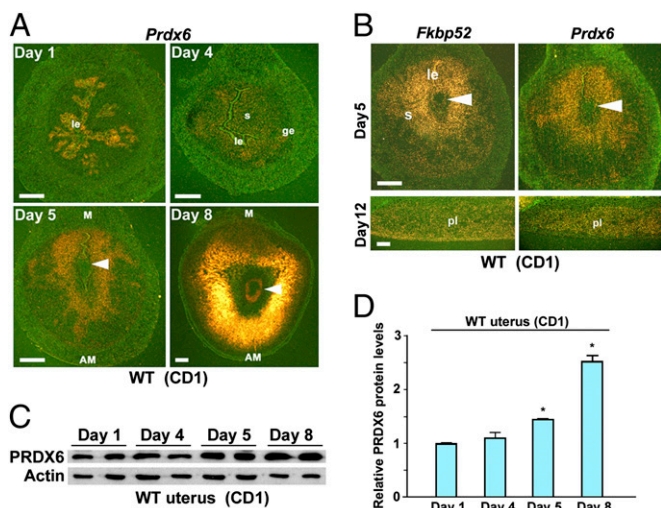
**PRDX6 Is Aberrantly Expressed in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> Uteri.** On day 4 of pregnancy the uterus is under the influence of P<sub>4</sub> produced by the newly formed corpus luteum. PRDX6 is localized in both the stroma and epithelium in WT CD1 mice on day 4 of pregnancy (Fig. 1F). In contrast, in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri PRDX6 is restricted primarily to the epithelium but is localized in the subluminal stroma after P<sub>4</sub> supplementation (Fig. 1F). These results suggest that FKBP52 deficiency attenuates PRDX6 levels in the stroma that are compensated to some extent by P<sub>4</sub>.

**PRDX6 Is Differentially Expressed in Uteri During Early Pregnancy.** The uterus is under the influence of preovulatory estrogen with increased epithelial cell proliferation on day 1 of pregnancy. On day 4, the uterus is exposed to heightened P<sub>4</sub> levels along with

a small amount of estrogen, resulting in epithelial cell differentiation with stromal cell proliferation. The first molecular and physical interaction between the blastocyst and receptive uterus is observed on the evening of day 4, and the attachment process continues through day 5. The attachment reaction coincides with increased stromal vascular permeability solely at the site of the blastocyst and can be demarcated by distinct blue bands along the uterus after i.v. injection of a blue dye solution (13). The proliferating stromal cells surrounding the implanting blastocyst start to differentiate to decidual cells in the afternoon of day 5. Differentiating stromal cells in the immediate vicinity of the implanting blastocyst begin to form the primary decidual zone (PDZ) at this time. The PDZ is well formed on day 6 with the beginning of a proliferating secondary decidual zone (SDZ). Although cell proliferation ceases in the PDZ, it continues in the SDZ. The PDZ progressively degenerates as pregnancy progresses. On day 8, the implantation process is well advanced with maximal decidualization. We assessed *Prdx6* expression on days 1, 4, 5, and 8 of pregnancy by in situ hybridization. We found that *Prdx6* is detected mostly in the luminal epithelium on day 1 (Fig. 2A). On day 4, the expression is restricted to the stroma (Fig. 2A). *Prdx6* expression on these days closely resembles that of *Fkbp52* (14). On day 5, *Fkbp52* and *Prdx6* are expressed in a similar fashion in the decidualizing stroma surrounding the implanting blastocyst (Fig. 2A and B). This overlapping expression of *Fkbp52* and *Prdx6* surrounding the implanting blastocyst suggests that the process of implantation may regulate these two molecules. On day 8, *Prdx6* is expressed primarily in the SDZ cells and in the embryo. PRDX6 protein levels also are up-regulated in uteri on days 5 and 8 of pregnancy (Fig. 2C and D). In the placenta, *Fkbp52* and *Prdx6* showed a similar expression pattern in the labyrinth layer (Fig. 2B), with undetectable levels of PR (9). The similar localization of FKBP52 and PRDX6 in the deciduum and placenta suggests their PR-independent roles in these tissues. Furthermore, pull-down assays show that FKBP52 is physically



**Fig. 1.** PRDX6 expression is reduced in uteri of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice. (A) A representative DIGE gel comprising protein extracts from WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri shows proteins of isoelectric points between pH 4–7 and apparent molecular mass between 10–150 kDa. a, FKBP52; b, PRDX6. (B) Decreased protein levels of PRDX6 and FKBP52 in P<sub>4</sub>-treated uteri of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ovariectomized mice (n = 4) compared with WT (n = 3) and *Pgr*<sup>-/-</sup> (n = 3) ovariectomized mice on a C57BL6/129 background. Values are mean ± SEM. \*P < 0.05 compared with *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice. (C and D) Decreased PRDX6 protein levels in P<sub>4</sub>-treated uteri of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> ovariectomized mice compared with WT and *Pgr*<sup>-/-</sup> ovariectomized females as determined by Western blotting. Band intensities are normalized against actin and expressed as relative ratios compared with WT samples on the C57BL6/129 background. Values are mean ± SEM of two or three independent samples. \*P < 0.05 compared with WT mice. (E) Differential expression patterns of PRDX6 protein in P<sub>4</sub>-treated ovariectomized mouse uteri of WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice on the C57BL6/129 background. (Scale bar, 200 μm.) (F) Differential expression patterns of PRDX6 protein in day 4 uteri of WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice on a CD1 background. (Scale bar, 200 μm.)



**Fig. 2.** Uterine PRDX6 is expressed differentially during early pregnancy. (A) In situ hybridization showing spatiotemporal expression of *Prdx6* in WT CD1 uteri on days 1, 4, 5, and 8 of pregnancy. Arrowheads indicate implanting embryos. AM, antimesometrial pole; ge, glandular epithelium; le, luminal epithelium; M, mesometrial pole; s, stroma. (Scale bar, 200  $\mu$ m.) (B) Overlapping expression of *Fkbp52* and *Prdx6* in CD1 WT uteri on days 5 and 12 of pregnancy. Arrowheads indicate implanting embryos. le, luminal epithelium; pl, placenta; s, stroma. (Scale bars, 200  $\mu$ m.) (C and D) Levels of uterine PRDX6 protein during early pregnancy as determined by Western blotting. Band intensities of PRDX6 were normalized against actin. Two independent samples from different mice were examined in each group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with day 1 uteri.

associated with PRDX6 in the deciduum (Fig. S2), suggesting that FKBP52 influences PRDX6 status through this interaction.

In the human endometrium, both PRDX6 and FKBP52 are expressed in epithelial cells during the proliferative phase and in both epithelial and stromal cells in the secretory phase (Fig. S3A). The higher levels of *Prdx6* in the secretory (receptive) phase suggest that uterine PRDX6 also plays antioxidant roles in human implantation (Fig. S3B).

***Fkbp52*<sup>-/-</sup> Uteri Are More Prone to Overt OS During Implantation.** Because PRDX6 levels are reduced in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri on day 4 of pregnancy, especially in the stroma (Fig. 1F), we speculated that *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri are more susceptible to OS during implantation. We have shown previously that  $P_4$  levels are comparable in WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice. However, excess  $P_4$  supplementation that markedly elevates circulating  $P_4$  levels is required for implantation in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females (9). Although  $P_4$  supplementation rescues implantation failure in CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice (9), concomitant administration of the OS-inducing agent paraquat (15 or 20 mg/kg) prevented this rescue (Table 1 and Fig. 3A). In contrast, similar doses of paraquat failed to affect implantation in WT mice (Table 1

and Fig. 3A). To minimize the detrimental effects of paraquat on embryo growth and activation, we also performed embryo-transfer experiments. Day 4 WT blastocysts were transferred into day 4 WT or  $P_4$ -treated *Fkbp52*<sup>-/-</sup> recipients that received paraquat 7 h before the embryo transfer. Again, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice had reduced numbers of implantation sites, whereas WT recipients showed normal implantation when examined on day 5 (Table 2). It is interesting that even a smaller dose of paraquat (2 mg/kg) inhibited implantation in  $P_4$ -treated *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice (Table 3). These results suggest that *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice are quite prone to OS in the context of implantation. More interestingly, a combined treatment of two antioxidants, N-acetylcysteine (NAC) and  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ TCP), significantly attenuated paraquat-induced implantation failure in  $P_4$ -treated *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice (Table 3), indicating the contribution of OS to implantation failure. Our speculation that *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice are sensitive to OS is supported by the finding of higher levels of bound 8-isoprostane, a lipid peroxidation marker, in C57BL/6/129 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri than in WT uteri on day 4 of pseudopregnancy (Fig. 3B).

***Fkbp52*<sup>-/-</sup> Mouse Embryonic Fibroblasts with Reduced PRDX6 Levels Are Susceptible to OS.** Because PRDX6 protects cells from membrane damage associated with phospholipid peroxidation, we speculated that reduced PRDX6 would reduce cell viability if challenged with overt OS. Indeed, in vitro studies with WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEFs) show that FKBP52 deficiency is associated with reduced PRDX6 levels (Fig. 3C) and enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death (Fig. 3D). This adverse effect in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs was reversed substantially by supplementation of NAC (Fig. 3E) and, more importantly, by forced expression of PRDX6 (Fig. 3E and F), suggesting that *Fkbp52* deficiency lowers the threshold against reactive oxygen species (ROS) by reducing PRDX6 levels. Because PR expression is undetectable in these MEFs (Fig. S4), these results provide evidence for FKBP52's role independent of PR function.

## Discussion

The highlight of the present study is that *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri are susceptible to OS because of reduced PRDX6 levels. Although further investigation is warranted to explore the mechanism by which FKBP52 regulates PRDX6 levels, our observation of physical interaction between FKBP52 and PRDX6 suggests that FKBP52 stabilizes PRDX6 protein and attenuates its degradation as a function of its chaperone activity. FKBP52's roles in protein stability, folding, and trafficking have been reported previously (5–7).

The reduced tolerance to OS in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice results in paraquat-induced failure of implantation and higher levels of ROS generation in the uterus. Because excess  $P_4$  cannot prevent implantation failure in the face of overt OS induced by paraquat in CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females, we believe that FKBP52 regulates OS, in addition to its function in optimizing PR activity and other potential functions. In fact, FKBP52 has several physiological roles, including binding and sequestration of calcineurin, protein folding and assembly, protein trafficking, and direct regulation of protein activity (15). Our present study adds another function to the list of various activities that have been reported for FKBP52.

**Table 1. Paraquat adversely affects implantation in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice**

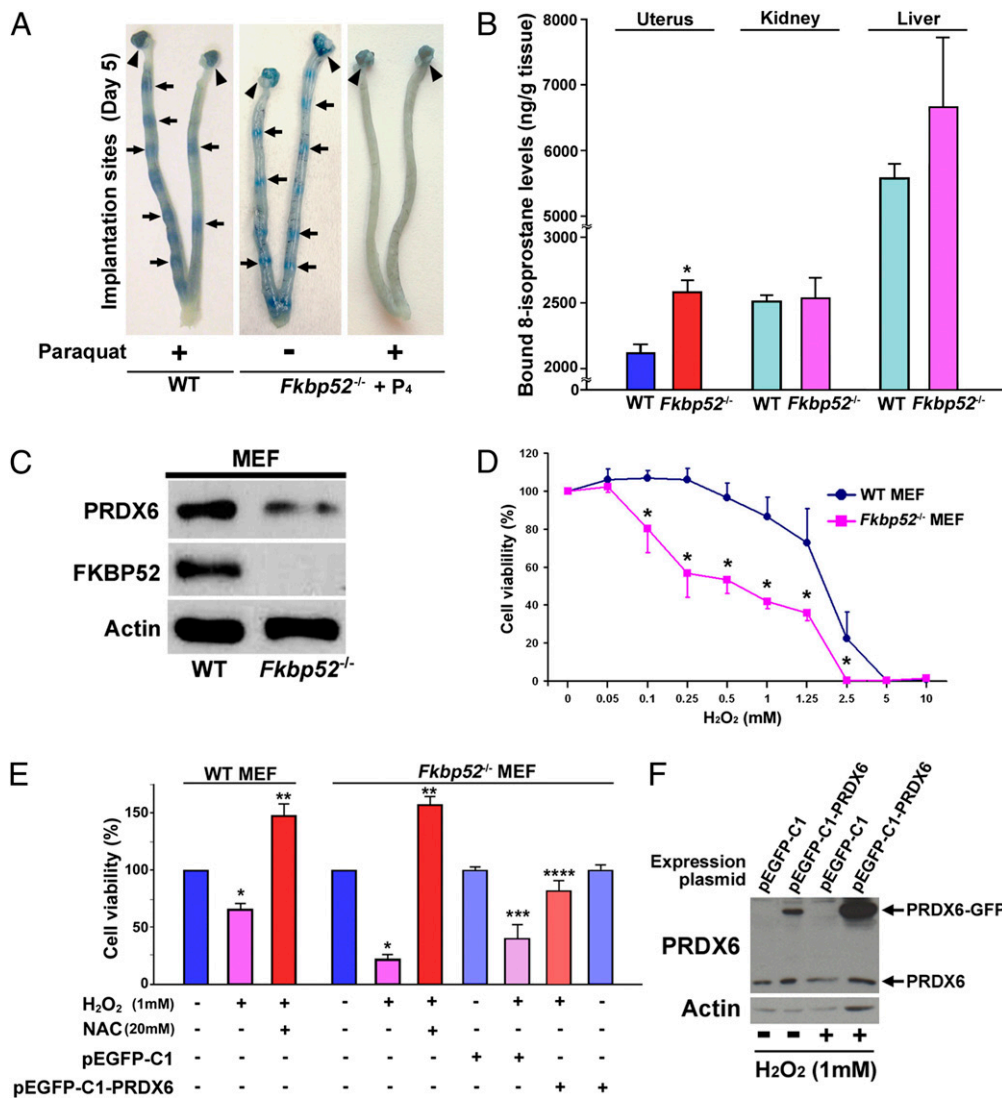
Genotype	Paraquat (mg/kg)	No. of mice	No. of mice with IS (%)	No. of IS	No. of blastocysts recovered
WT	15	7	7 (100%)	12.1 $\pm$ 1.7	N/A
	20	7	7 (100%)	12.0 $\pm$ 0.7	N/A
<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> + $P_4$	0	8	8 (100%)	10.6 $\pm$ 0.6	N/A
	15	7	2 (29%)*	12.0 $\pm$ 2.3	25 <sup>†</sup>
	20	5	1 (20%)*	5.0	17 <sup>‡</sup>

WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females on a CD1 background were mated with CD1 WT fertile males, and the number of implantation sites (IS) was examined on day 5 of pregnancy. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females were treated with  $P_4$  (2 mg/d) on days 2–4 of pregnancy. Paraquat was injected on day 4. Uteri without IS were flushed with saline to recover any unimplanted blastocysts. Values are mean  $\pm$  SEM.

\* $P < 0.05$  compared with WT mice treated with the same dose of paraquat; Student's *t* test. N/A = not applicable.

<sup>†</sup>Twenty-five blastocysts were recovered from five mice.

<sup>‡</sup>Seventeen blastocysts were recovered from four mice.



**Fig. 3.** *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri are more prone to OS. (A) OS inducer paraquat blocks embryo implantation in P<sub>4</sub>-primed CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females on day 5 of pregnancy, whereas paraquat-treated CD1 WT uteri have normal numbers of implantation sites as demarcated by blue bands. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females were treated with P<sub>4</sub> (2 mg/d) on days 2–4 of pregnancy. Paraquat was injected on day 4. Arrows and arrowheads indicate implantation sites and ovaries, respectively. (B) Increased levels of bound 8-Isoprostane, a lipid peroxidation marker, in C57BL/6J *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri on day 4 of pseudopregnancy. Values are mean  $\pm$  SEM of three independent samples. \**P* < 0.05 compared with WT mice. (C) Decreased levels of PRDX6 in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs. Actin was used as a loading control. (D) Heightened sensitivity of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced OS. Cells were treated with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h, and cell viability was evaluated by MTT assay. Values are mean  $\pm$  SEM of six replicates from three independent experiments. \**P* < 0.05 compared with WT mice. (E) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs is protected by addition of NAC and forced expression of PRDX6. Cell viability was evaluated by MTT assay. Values are mean  $\pm$  SEM of six replicates from three independent experiments. \**P* < 0.05, compared with vehicle-treated cells derived from mice of the same genotype. \*\**P* < 0.05, compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells derived from mice of the same genotype. \*\*\**P* < 0.05, compared with *Fkbp52*<sup>-/-</sup> cells transfected with pEGFP-C1 control plasmids; \*\*\*\**P* < 0.05 compared with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated *Fkbp52*<sup>-/-</sup> cells with transfection of pEGFP-C1 control plasmids. (F) PRDX6-GFP fused protein is induced effectively by transfection of pEGFP-C1-PRDX6 plasmids in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs. pEGFP-C1 is a control plasmid.

PRDX6 is a unique nonredundant antioxidant that acts independently of other PRDXs and antioxidant enzymes (10–12). A recent study shows that *Prdx6*-deficient (*Prdx6*<sup>-/-</sup>) mice have normal development, but paraquat-induced OS causes abnormal phenotypes such as lower survival rate, again not resulting from changes in gene expression and/or activity of other antioxidant enzymes (12). Thus, PRDX6 might be a critical antioxidant against exogenous OS. Our present finding of increased susceptibility of *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri to OS during implantation because of reduced PRDX6 levels underscores the importance of uterine FKBP52–PRDX6 signaling during the periimplantation period. Although *Prdx6*<sup>-/-</sup> females were reported to be fertile (12), it is possible that exposure to OS will impair fertility in these mice. Indeed, it is known that certain genes serve critical functions during physiologically altered conditions. For example, deficiency

of prolactin (PRL)-like protein A (PLP-A), a nonclassical member of the PRL family expressed in the mouse placenta, has little effect on female fertility under normal conditions, but PLP-A mutants show compromised pregnancy when exposed to a stressor (16). Thus, fertility in *Prdx6*<sup>-/-</sup> females could be compromised if PRDX6 deficiency is superimposed with OS. Future studies are warranted to characterize the female fertility phenotype in *Prdx6*<sup>-/-</sup> mice in a more systematic manner under normal and OS conditions. Collectively, our observations suggest that implantation failure in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice not only is caused by the reduced PR activity but also is compounded by increased OS levels.

There is evidence that smoking and alcohol consumption reduce fertility in women by elevating OS (17, 18). Evidence also indicates that dietary antioxidant and diet-related exposures to ROS affect the timing and maintenance of pregnancy (19). These



**Table 2. Paraquat inhibits implantation of transferred WT blastocysts in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> recipients**

Genotype of blastocysts	Genotype of recipients	Paraquat (mg/kg)	No. of blastocysts transferred	No. of recipients	No. of mice with IS (%)	No. of IS (%)	No. of blastocysts recovered
WT	WT	15	77	6	6 (100%)	58/77 (75%)	N/A
WT	<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> +P <sub>4</sub>	15	60	5	1 (20%)	1/60 (2%)	30*

Day 4 CD1 WT blastocysts were transferred into uteri of CD1 WT or CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> recipients on day 4 of pseudopregnancy. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> recipients were treated with P<sub>4</sub> (2 mg/d) on days 2–4 of pregnancy. Paraquat was injected into the recipients 5 h before embryo transfer on day 4 of pregnancy. Uteri without IS were flushed with saline to recover any unimplanted blastocysts. N/A, not applicable.

\*Thirty blastocysts were recovered from four mice.

findings, together with our observation that commercial rodent diets influence uterine gene expression and the timing of implantation in mice (20), suggest the possibility of ROS-induced alterations in uterine functions related to implantation. Because *Prdx6* is expressed primarily in the stroma in WT uteri on day 4 of pregnancy, the reduction of stromal *Prdx6* in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri even with P<sub>4</sub> supplementation may attenuate stromal function more drastically when exposed to OS. *Hoxa10* and *Ihh* are expressed in the stroma and epithelium, respectively, in day 4 pregnant mouse uteri (21, 22). Our results show that paraquat down-regulates *Hoxa10* expression without altering *Ihh* expression in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri (Fig. S5). In this respect, stromal *Prdx6* could be more important in protecting the uterus from overt OS and allowing implantation to proceed. Interestingly, we found a similar expression pattern of PRDX6 and FKBP52 in human endometrium and higher expression of *Prdx6* during the secretory phase, suggesting that these proteins may have physiological roles in human endometrium and implantation. It will be interesting to see whether endometria from patients with recurrent implantation failure have higher ROS because of low PRDX6 levels.

During the periimplantation period, embryos are exposed to low oxygen tension (23). Because preimplantation embryos are sensitive to OS (24), it is believed that a low oxygen condition is conducive to normal embryonic growth and development. This notion is consistent with the finding that antioxidants prevent ROS-induced abnormal embryo growth in culture (25, 26). Thus, the embryonic environment facing excess OS interferes with successful implantation. It also is a distinct possibility that the uterine environment is hypoxic during the periimplantation period to protect embryos from OS. Our findings that WT, but not *Fkbp52*<sup>-/-</sup>, pregnant females treated with paraquat have normal implantation suggest that the uterus has a built-in protective system to combat OS to a degree and that PRDX6 is a critical player in this system. With increased angiogenesis after implantation, oxygen tension in the uterus and placenta increases, gradually exposing the developing embryo to higher ROS levels. Because a major role of the deciduum and placenta is to accommodate and protect the growing embryos, our data showing strong expression of *Prdx6* in these tissues in WT mice suggest that decidual and placental PRDX6 has an antioxidant function and protects embryos against increased oxygen tension at that time.

Endometriosis, the growth of endometrium-like tissues outside the uterus, is a common gynecological disease often associated with pelvic pain and infertility (27). Accumulating evidence shows that OS is associated with the pathogenesis of endometriosis and endometriosis-related infertility including implantation failure (28).

Because our recent study has shown that FKBP52 levels are down-regulated in endometria of women with endometriosis compared with women without endometriosis (29), reduced FKBP52 levels may lead to endometrial PRDX6 deficiency, increasing uterine susceptibility to ROS, aggravating endometriosis, and adversely affecting endometrial receptivity in patients with endometriosis.

In conclusion, we show here that uterine FKBP52–PRDX6 signaling is a key player against ROS during pregnancy, an intriguing finding regarding a role of FKBP52–PRDX6 in uterine biology in the context of implantation.

## Materials and Methods

**Mice.** C57BL/6J129 and CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice (9, 30) and C57BL/6J129 *Pgr*<sup>-/-</sup> mice (31) were used in this study. FKBP52 and PR mutant mice were originally obtained from David Smith (Mayo Clinic, Scottsdale, AZ) and Bert O'Malley (Baylor College of Medicine, Houston, TX), respectively. All protocols for the present study were reviewed and approved by the Cincinnati Children's Research Foundation Institutional Animal Care and Use Committee.

**Analysis of Implantation and Blastocyst Transfer.** Mice were examined for implantation as described previously (9). WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females (2- to 5-month-old) were mated with WT fertile males to induce pregnancy (day 1 = vaginal plug). To supplement *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females with exogenous P<sub>4</sub>, they were given an s.c. injection of P<sub>4</sub> (2 mg/d, s.c.) on days 2–4 of pregnancy. For induction of OS, paraquat was given i.p. to WT or *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice on day 4 (0900 hours) of pregnancy. For antioxidant treatment, NAC (50 mg/kg body weight) and  $\alpha$ TCP (1g/kg body weight) were given i.p. daily on days 2–4. Pregnant females were killed on day 5 (0900 hours), and implantation sites were evaluated by i.v. injection of a Chicago blue dye solution. Uteri without implantation sites were flushed with saline to recover any unimplanted blastocysts. For blastocyst transfer experiments, pseudopregnant recipients were generated by mating females with vasectomized males. Paraquat was injected into recipients 5 h before embryo transfer on day 4 (0700 hours) of pregnancy. Day-4 WT blastocysts were transferred into day 4 uteri of WT or *Fkbp52*<sup>-/-</sup> pseudopregnant recipients (1200 hours), and implantation sites were examined 24 h later (day 5, 1200 hours).

**Treatment with P<sub>4</sub> and/or E<sub>2</sub>.** To assess the effects of ovarian hormones on uterine *Prdx6* expression, CD1 WT females were ovariectomized and rested for 2 wk. They then were given a single s.c. injection of P<sub>4</sub> (2 mg) and/or E<sub>2</sub> (100 ng) (32). The control group of mice received only the vehicle (oil). Mice were killed after 24 h, and uteri were collected for Northern and in situ hybridization.

**Human Tissues.** Endometrial tissues were obtained from 24 women who had shown regular menstrual cycles without any hormonal treatment for at least 6 months. Endometrial samples were dated according to the women's

**Table 3. Reversal of paraquat-induced implantation failure by treatment of antioxidants**

Genotype	Paraquat (2 mg/kg)	NAC + $\alpha$ TCP	No. of mice	No. of mice with IS (%)	No. of IS (mean $\pm$ SEM)	No. of blastocysts recovered
<i>Fkbp52</i> <sup>-/-</sup> + P <sub>4</sub>	+	–	10	1 (10%)	13.0	35 <sup>†</sup>
	+	+	8	5 (63%)*	6.2 $\pm$ 1.7	22 <sup>‡</sup>

Mice were given an i.p. injection of paraquat on day 4 of pregnancy. P<sub>4</sub> (2 mg/d) was administered s.c. into each CD1 *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mouse on days 2–4. NAC (50 mg/kg) and  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ TCP) (1 g/kg) were injected i.p. on days 2–4. Mice were killed on day 5, and their IS were examined by the blue dye method.

\* $P < 0.05$  compared with *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice treated with the same dose of paraquat, P<sub>4</sub>; Student's *t* test.

<sup>†</sup>Thirty-five blastocysts were recovered from nine mice.

<sup>‡</sup>Twenty-two blastocysts were recovered from three mice. Dormant-looking blastocysts were recovered from mice in which blue bands were not present or were very weak.

menstrual history and standard histological criteria (33). The experimental procedures were approved by the institutional review board of the University of Tokyo, and signed informed consent for the use of tissues was obtained from each woman.

**2D-DIGE Analysis and Protein Identification.** WT, *Fkbp52*<sup>-/-</sup>, and *Pgr*<sup>-/-</sup> mice on C57BL6/129 background were ovariectomized, rested for 2 wk, and then treated daily with P<sub>4</sub> (2 mg) for 2 d. Mice were killed 24 h after the second P<sub>4</sub> injection, and their uteri were collected and processed for 2D-DIGE. Proteins were extracted from uterine tissues from three independent WT and *Pgr*<sup>-/-</sup> mice and four *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice, and 2D-DIGE and protein identification were performed as previously described by us (*SI Materials and Methods*) (14).

**Immunoblotting.** Protein extraction and Western blotting were performed as described (14). Antibodies to PRDX6, FKBP52 (kindly provided by Marc B. Cox, University of Texas, El Paso, TX), and actin were used. Actin served as a loading control.

**Immunohistochemistry.** Immunostaining of PRDX6 was performed in formalin-fixed paraffin-embedded sections using a specific antibody to PRDX6 (kindly provided by Aron B. Fisher, University of Pennsylvania, Philadelphia).

**In Situ Hybridization.** Paraformaldehyde-fixed frozen sections were hybridized with <sup>35</sup>S-labeled cRNA probes as described (13).

**Northern Hybridization.** Northern blotting was performed as described previously (13). *Rpl7* served as a housekeeping gene.

**Immunoprecipitation.** Decidual cells were isolated as described previously (34). Protein lysates were immunoprecipitated with an anti-FKBP52 antibody, and complexes were run on SDS/PAGE and immunoblotted using antibodies specific to PRDX6 or FKBP52. The control immunoprecipitation was performed by incubating the lysates with rabbit IgG.

**Quantitative PCR.** Quantitative PCR was performed as previously described (29). A housekeeping gene *Gapdh* was used as an internal standard.

**RT-PCR.** RT-PCR was performed as previously described (14). *Actb* served as a housekeeping gene.

**8-Isoprostane Assay.** Tissue levels of 8-isoprostane were assayed as described previously (35).

**Isolation and Culture of MEFs.** WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs (kindly provided by Marc B. Cox, University of Texas, El Paso, TX) were isolated as described previously (8). The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin/streptomycin.

**MTT Assays.** MEFs were cultured for 24 h in DMEM containing various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and cell viability was determined with MTT assay as described previously (Promega) (36). To examine the effects of NAC on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage, MEFs were pretreated with NAC for 24 h and then were treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. To examine the effects of PRDX6 on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell damage, *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs were transiently transfected with pEGFP-C1 (control vector carrying GFP alone, Clontech) or pEGFP-C1-PRDX6 (carrying GFP-PRDX6 fusion construct) plasmids (kindly provided by Aron Fisher, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA) by liposome transfection. The cells expressing GFP or PRDX6-GFP fusion proteins were incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h.

**Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed using two-tailed Student's *t* test and ANOVA as appropriate. *P* < 0.05 was considered statistically significant.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Erin L. Adams for editing the manuscript. Tissue 8-isoprostane levels were measured by the late Dr. Jason Morrow (Vanderbilt University, Nashville, TN) who died in 2008. We are very grateful for his contributions to our research. Anti-PRDX6 antibody and pEGFP-C1 and pEGFP-C1-PRDX6 plasmids were kindly provided by Dr. Aron Fisher (University of Pennsylvania, Philadelphia, PA). Anti-FKBP52 antibody and WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs were kindly provided by Dr. Marc B. Cox (University of Texas, El Paso, TX). This study was supported in part by National Institutes of Health Grants HD12304 and DA006668. Y.H. is supported by the Japan Society for the Promotion of Science Postdoctoral Fellowships for Research Abroad. N.A. is supported by the 2214-Abroad Research Fellowship for PhD students from the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK).

- Margalioth EJ, Ben-Chetrit A, Gal M, Eldar-Geva T (2006) Investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET. *Hum Reprod* 21:3036–3043.
- Dey SK, et al. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25:341–373.
- Lydon JP, et al. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266–2278.
- Smith DF (2004) Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes. *Cell Stress Chaperones* 9:109–121.
- Zhong L, et al. (2004) Heat-shock treatment-mediated increase in transduction by recombinant adeno-associated virus 2 vectors is independent of the cellular heat-shock protein 90. *J Biol Chem* 279:12714–12723.
- Davies TH, Sánchez ER (2005) Fkbp52. *Int J Biochem Cell Biol* 37:42–47.
- Mamane Y, Sharma S, Petropoulos L, Lin R, Hiscott J (2000) Posttranslational regulation of IRF-4 activity by the immunophilin FKBP52. *Immunity* 12:129–140.
- Tranguch S, et al. (2005) Cochaperone immunophilin FKBP52 is critical to uterine receptivity for embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:14326–14331.
- Tranguch S, et al. (2007) FKBP52 deficiency-conferred uterine progesterone resistance is genetic background and pregnancy stage specific. *J Clin Invest* 117:1824–1834.
- Manevich Y, Fisher AB (2005) Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism. *Free Radic Biol Med* 38:1422–1432.
- Phelan SA (1999) AOP2 (antioxidant protein 2): Structure and function of a unique thiol-specific antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 1:571–584.
- Wang X, et al. (2003) Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem* 278:25179–25190.
- Das SK, et al. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor gene is induced in the mouse uterus temporally by the blastocyst solely at the site of its apposition: A possible ligand for interaction with blastocyst EGF-receptor in implantation. *Development* 120:1071–1083.
- Daikoku T, et al. (2005) Proteomic analysis identifies immunophilin FK506 binding protein 4 (FKBP52) as a downstream target of Hoxa10 in the perimplantation mouse uterus. *Mol Endocrinol* 19:683–697.
- Kay JE (1996) Structure-function relationships in the FK506-binding protein (FKBP) family of peptidylprolyl cis-trans isomerases. *Biochem J* 314:361–385.
- Ain R, Dai G, Dunmore JH, Godwin AR, Soares MJ (2004) A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:16543–16548.
- Hakim RB, Gray RH, Zacur H (1998) Alcohol and caffeine consumption and decreased fertility. *Fertil Steril* 70:632–637.
- Howe G, Westhoff C, Vessey M, Yeates D (1985) Effects of age, cigarette smoking, and other factors on fertility: Findings in a large prospective study. *Br Med J (Clin Res Ed)* 290:1697–1700.
- Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB (2008) Oxidative stress and antioxidants: Exposure and impact on female fertility. *Hum Reprod Update* 14:345–357.
- Wang H, et al. (2005) Variation in commercial rodent diets induces disparate molecular and physiological changes in the mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9960–9965.
- Lim H, Ma L, Ma WG, Maas RL, Dey SK (1999) Hoxa-10 regulates uterine stromal cell responsiveness to progesterone during implantation and decidualization in the mouse. *Mol Endocrinol* 13:1005–1017.
- Matsumoto H, Zhao X, Das SK, Hogan BL, Dey SK (2002) Indian hedgehog as a progesterone-responsive factor mediating epithelial-mesenchymal interactions in the mouse uterus. *Dev Biol* 245:280–290.
- Fischer B, Bavister BD (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99:673–679.
- Denney PA (2007) Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81:155–162.
- Nonogaki T, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T (1991) Protection from oxidative stress by thioredoxin and superoxide dismutase of mouse embryos fertilized in vitro. *Hum Reprod* 6:1305–1310.
- Wang X, et al. (2002) Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertil Steril* 78:1272–1277.
- Giudice LC, Kao LC (2004) Endometriosis. *Lancet* 364:1789–1799.
- Augoulea A, Mastorakos G, Lambrinoudaki I, Christodoulakos G, Creatas G (2009) The role of the oxidative-stress in the endometriosis-related infertility. *Gynecol Endocrinol* 25:75–81.
- Hirota Y, et al. (2008) Deficiency of immunophilin FKBP52 promotes endometriosis. *Am J Pathol* 173:1747–1757.
- Cheung-Flynn J, et al. (2005) Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Mol Endocrinol* 19:1654–1666.
- Lydon JP, et al. (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9:2266–2278.
- Lim H, et al. (1997) Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91:197–208.
- Noyes RW, Hertig AI, Rock J (1950) Dating the endometrial biopsy. *Fertil Steril* 1:3–25.
- Hirota Y, et al. (2010) Uterine-specific p53 deficiency confers premature uterine senescence and promotes preterm birth in mice. *J Clin Invest* 120:803–815.
- Morrow JD, Roberts LJ, 2nd (1999) Mass spectrometric quantification of F2-isoprostanes in biological fluids and tissues as measure of oxidant stress. *Methods Enzymol* 300:3–12.
- Daikoku T, et al. (2007) Extracellular signal-regulated kinase is a target of cyclooxygenase-1-peroxisome proliferator-activated receptor-delta signaling in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 67:5285–5292.

# Supporting Information

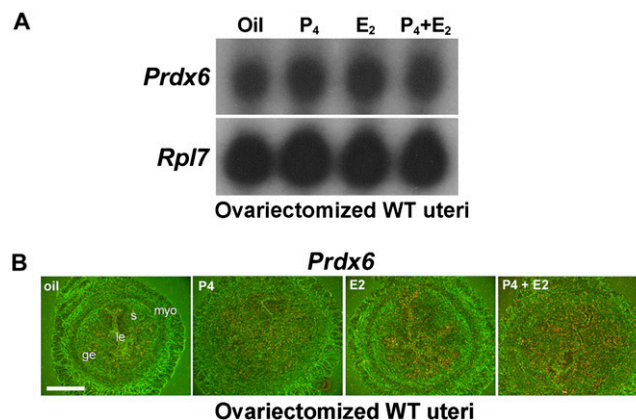
Hirota et al. 10.1073/pnas.1009324107

## SI Materials and Methods

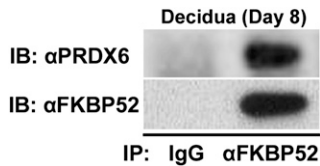
**2D-DIGE Analysis and Protein Identification.** DeCyder v6.5 software (Amersham Biosciences) was used for simultaneous comparison of abundance changes across all 10 samples with statistical confidence. Data reduction by principle components analysis demonstrated that in *ca.* 100 intact protein features that changed significantly ( $P < 0.01$ , ANOVA) among these three genotypes across all samples, the major source of variation (PC1 = 63.5) separated the PR-null ( $Pgr^{-/-}$ ) samples from the others, and the second greatest source of variation (PC2 = 24.4) separated the remainder of the samples by WT vs. FK506-binding protein 52-deficient ( $Fkbp52^{-/-}$ ). These results provided additional confidence that the observed changes were reflective of the biology rather than arising from unanticipated experimental or biological variation. Proteins of interest were robotically excised and processed for MS analyses using an Ettan Spot Handling Workstation

(GE Healthcare). MALDI-TOF MS and TOF/TOF tandem MS were performed on a Voyager 4700 (Applied Biosystems) using data-dependent tandem MS acquisition on the 20 most abundant ions in each MALDI-TOF peptide mass map. MALDI-TOF peptide mass maps and accompanying tandem mass spectra then were collectively searched against the Swiss-Prot and NCBI nr databases using GPS Explorer software (Applied Biosystems) running the Mascot database search engine (Matrix-Science). Searches were performed without constraining protein molecular weight or isoelectric point and allowed for carbamidomethylation of cysteine, partial oxidation of methionine residues, and one missed trypsin cleavage. Identifications were accepted based on a tripartite evaluation that takes into account significant molecular weight search (MOWSE) scores, spectrum annotation, and observed vs. expected migration on the 2D gel (1).

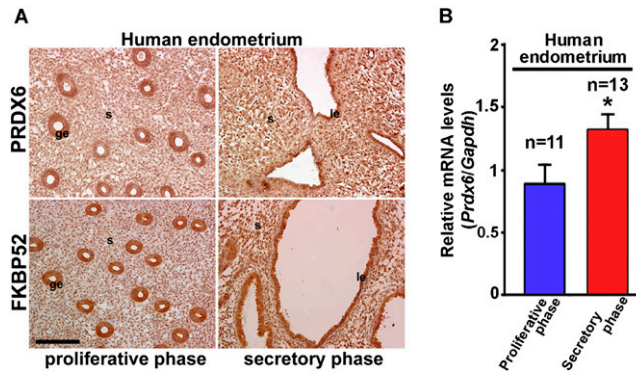
1. Friedman DB, et al. (2004) Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4: 793–811.



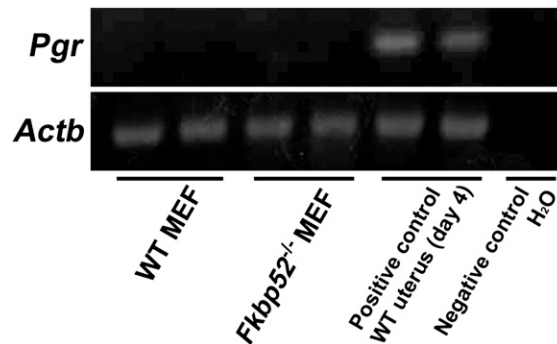
**Fig. S1.** Effects of progesterone (P<sub>4</sub>) and/or estradiol-17β (E<sub>2</sub>) on peroxiredoxin-6 (*Prdx6*) expression in ovariectomized WT uteri. (A) Expression levels of uterine *Prdx6* mRNA in ovariectomized CD1 WT mice treated with oil (vehicle), P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>, or P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub> for 24 h as determined by Northern hybridization. *Rpl7* was used as a loading control. (B) In situ hybridization showing differential patterns of *Prdx6* expression in ovariectomized CD1 WT uteri treated with oil, P<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>, or P<sub>4</sub>+E<sub>2</sub>. ge, glandular epithelium; le, luminal epithelium; myo, myometrium; s, stroma. (Scale bar, 200 μm.)



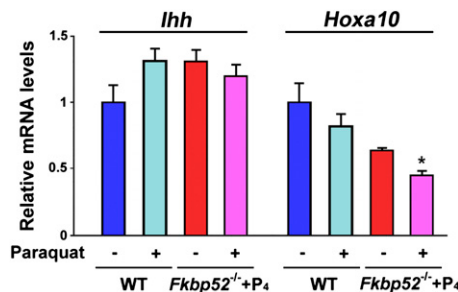
**Fig. S2.** Physical association of FK506-binding protein 52 (FKBP52) with PRDX6 in day 8 decidua. Decidual cell protein extracts were immunoprecipitated with an anti-FKBP52 antibody. Pulled-down complexes were run on SDS/PAGE and immunoblotted using antibodies specific to PRDX6 or FKBP52. The control immunoprecipitation (IP) was performed by incubating protein lysates with a rabbit IgG. IB, immunoblotting.



**Fig. S3.** PRDX6 expression in the human endometrium. (A) Immunostaining of PRDX6 and FKBP52 in human endometrium. Brown deposits indicate sites of positive immunostaining. ge, glandular epithelium; le, luminal epithelium; s, stroma. (Scale bar, 200  $\mu$ m.) (B) Expression levels of *Prdx6* mRNA are higher in the secretory phase of human endometrium than in the proliferative phase. The number of samples assessed is indicated above each bar. Values are mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .



**Fig. S4.** Progesterone receptor (*Pgr*) mRNA is undetectable in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Undetectable levels of *Pgr* mRNA in WT and *Fkbp52*<sup>-/-</sup> MEFs as determined by RT-PCR. *Actb* served as an internal control. WT uteri at day 4 of pregnancy and water were used as positive and negative controls, respectively.



**Fig. S5.** Paraquat reduces *Hoxa10* expression in *Fkbp52*<sup>-/-</sup> uteri on day 4 of pregnancy. Expression levels of *Ihh* and *Hoxa10* mRNA in paraquat-treated uteri from WT and  $P_4$ -primed *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice on day 4 of pregnancy as determined by Northern hybridization are shown. Band intensities of *Ihh* and *Hoxa10* were normalized against *Rpl7*. *Fkbp52*<sup>-/-</sup> females were treated with  $P_4$  (2 mg/d) on days 2–4 of pregnancy. Paraquat was injected on the evening (1800 hours) of day 3 of pregnancy. Two or three independent samples from different mice were examined in each group. Data are given as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$  compared with  $P_4$ -primed *Fkbp52*<sup>-/-</sup> mice without paraquat.

