



T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİĞİN FARKLI DÖNEMLERİNDE
İNSAN PLASENTASINDA
UBİKÜTİN PROTEAZOM SİSTEMİ
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONLARININ VE
FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Cansu ŞAHİN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GEBELİĞİN FARKLI DÖNEMLERİNDE
İNSAN PLASENTASINDA
UBİKÜTİN PROTEAZOM SİSTEMİ
PROTEİNLERİNİN EKSPRESYONLARININ VE
FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Cansu ŞAHİN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

**Bu araştırma; TÜBİTAK tarafından 119S849 nolu proje ile
desteklenmiştir.**

Ankara, 2021

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Gebeliğin Farklı Dönemlerinde İnsan Plasentasında Ubikülin Proteazom Sistemi
Proteinlerinin Ekspresyonlarının ve Fonksiyonlarının İncelenmesi

Cansu ŞAHİN

Doktora Tezi

21.01.2021

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Sevil ÇAYLI

Prof. Dr. Oya EVİRGEN

Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Doç. Dr. Selma ÇALIŞKAN

Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Doktora derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN

Enstitü Müdürü

Bu tezin Doktora derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

21.01.2021

Cansu ŞAHİN



TEŞEKKÜR

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalında doktora eğitimimin ilk gününden beri beni destekleyen, akademik bilgi ve yetenekleriyle her zaman yol gösteren, hayatım boyunca bana hep örnek olacak olan ve üzerimdeki sonsuz emekleriyle kendimi yanında hep şanslı hissettiğim başta çok kıymetli Danışman Hocam Prof. Dr. Sevil ÇAYLI'ya,

Her zaman yanımda olduğunu hissettiğim ve eğitim hayatımda destekleri olan Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER'e, bilgi ve tecrübesiyle eğitimime katkılarından dolayı Ana Bilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN'a, benden bilgi, yardım ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Hilal NAKKAŞ'a ve üzerimde emeği olan diğer hocalarıma,

Birlikte eğitim aldığım ve bana tezimin her aşamasında destek veren değerli bölüm arkadaşlarıma,

Erasmus+ Yaz Stajı Programı sayesinde tanıma fırsatı bulduğum, benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, aynı zamanda doktora tezime önemli katkılar sağladıkları için Reproductive Biology Laboratory, Amsterdam University Medical Centers'tan Assist. Prof. Dr. Marie van Dijk, Technician Souad Boussata ve PhD Student Danai Georgiadou'ya,

(I would like to extend my thanks to Assist. Prof. Dr. Marie van Dijk, Technician Souad Boussata and PhD Student Danai Georgiadou from the Reproductive Biology Laboratory, Amsterdam University Medical Centers, who I had the opportunity to meet thanks to the Erasmus+ Summer Internship Program, who never hesitated to share their knowledge and experiences with me, and who made important contributions to my doctoral thesis.)

Tez çalışmalarına katkılarından dolayı sevgili Op. Dr. Halise YOLLI, Dr. Öğr. Üyesi Can TÜRK'e,

Çalışma hayatımda yollarımızın kesiştiği çok kıymetli arkadaşlarıma ve beni her zaman destekleyen birlikte büyüdüğüm can dostlarıma,

Tez çalışmalarım ile ilgili ön deneylerin gerçekleştirilmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Hayatımın her alanında olduğu gibi, doktora eğitimimde de en büyük desteği veren, her türlü stresime katlanan, sonsuz sevgisiyle beni büyüten annem Ayşen ŞAHİN'e, manevi olarak hep yanımda olduğunu hissettiğim babam M. Cahit ŞAHİN'e, doktora sürecimi yakından takip edip her koşulda sevgilerini ve desteklerini hissettiğim canım ablam Özge NURAL'a, abim Barla Salih NURAL'a, dayım Sebati GÖKEN'e ve ailemin diğer güzel insanlarına,

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Tarihçe	4
2.2. Embriyonik Gelişimin Başlangıcı.....	4
2.3. İmplantasyon Aşamaları	4
2.4. Koryonik Villusların Gelişimi	5
2.5. İnvazyon Mekanizması	6
2.6. Plasenta	10
2.6.1. Plasenta Gelişimi.....	10
2.6.2. Plasentanın Anatomisi.....	11
2.6.3. Plasentanın Yapısı.....	12
2.6.4. Plasental Dolaşım.....	19
2.6.5. Plasentanın Endokrin Fonksiyonları	19
2.6.6. Plasental Hastalıklar.....	20
2.7. Ubikütün Proteozom Sistemi (UPS).....	22
2.8. UPS'nin Hastalıklardaki Rolü	23
2.9. p97/VCP (p97/Valosin-İçeren Protein)	24
2.10. SVIP (Küçük VCP ile Etkileşen Protein)	26
2.11. LC3II (Mikrotübülle İlişkili Protein 1 Hafif Zinciri 3 Beta)	27
2.12. SQSTM1/p62 (Ubikütün Bağlayıcı Protein p62)	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	29
3.1. Materyaller	29
3.1.1. Plasenta Doku Örnekleri	29
3.1.2. Hücre Hatları	29
3.1.3. Antikorlar	29
3.1.4. Primerler.....	30

3.1.5. İnhibitör ve siRNA'ler	31
3.1.6. Mikroskoplar	32
3.2. Yöntemler	32
3.2.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Yöntemi.....	32
3.2.2. Hücre Kültürü.....	33
3.2.3. Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama Yöntemleri	33
3.2.4. İmmünolojik Boyama Yöntemleri	34
3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemesi.....	35
3.2.6. Western Blot Analizi.....	35
3.2.7. Gen Analizleri	36
3.2.8. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Analizi	36
3.2.9. siRNA Transfeksiyonu.....	37
3.2.10. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR).....	38
3.2.11. İnvazyon ve Migrasyon Testleri.....	42
3.2.12. İstatistiksel Analizler.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. Plasenta Dokularının Histolojik İncelenmesi	45
4.2. Plasenta Dokularının Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Değerlendirilmesi	48
4.3. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi	53
4.3.1. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları.....	53
4.3.2. İmmünofloresan Boyama Bulguları.....	67
4.4. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında Western Blot Analizleri ile Değerlendirilmesi	71
4.5. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında qRT-PCR Analizleri ile Değerlendirilmesi	73
4.6. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarının Histolojik İncelenmesi.....	75
4.7. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında UPS proteinlerinin İmmünofloresan Boyama Bulguları.....	76
4.8. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında Canlılık ve Proliferasyon Analizleri .	77

4.9. HTR-8/SVneo HÜcre Hatlarında Western Blot Analizlerinin	
Değerlendirilmesi	78
4.10. HTR-8/SVneo HÜcre Hatlarında qRT-PCR Analizlerinin	
Değerlendirilmesi	84
4.11. HTR-8/SVneo HÜcre Hatlarında Manuel İnvazyon Testleri	87
4.12. HTR-8/SVneo HÜcre Hatlarında xCELLigence RTCA (Gerçek	
Zamanlı HÜcre Analiz Sistemi) ile İnvazyon ve Migrasyon	
Analizleri	88
4.13. Genlerin Ağ Analizlerinin Değerlendirilmesi.....	92
5. TARTIŞMA	94
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	103
7. KAYNAKLAR	106
8. EKLER.....	118
EK-1. Etik Kurul İzni.....	118
EK-2. Özgeçmiş.....	119

ÖZET

Gebeliğin Farklı Dönemlerinde İnsan Plasentasında Ubikütin Proteazom Sistemi Proteinlerinin Ekspresyonlarının ve Fonksiyonlarının İncelenmesi

İmplantasyon ve plasenta gelişimi sürecinde trofoblastların invazyon ve migrasyonlarına etki eden çeşitli moleküler mekanizmalar bulunmaktadır. Son çalışmalarla, p97/VCP (Valosin-İçeren Protein) ve SVIP (Küçük VCP ile Etkileşen Protein)'in kanser hücrelerinin invazyonlarında ve Ubikütin Proteazom Sistemi (UPS)'ndeki önemleri bildirilmesine rağmen, bu proteinlerin insan plasenta gelişimindeki rolleri ve fonksiyonları bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmanın ilk amacı bu proteinlerin farklı trimester insan plasentalarında ekspresyonlarını belirlemek ve karşılaştırmak, ikinci amacı ise bu proteinlerin ekstrasvillöz trofoblast hücreleri invazyon ve migrasyonlarına olası etkilerini belirlemektir.

Bu amaçlar doğrultusunda, üç trimestere ait insan plasenta dokularında histokimyasal değerlendirmeler ve Taramalı Elektron Mikroskopisi kullanılmıştır. Protein ve gen analizleri immünohistokimya, immünofloresan, Western Blot ve qRT-PCR ile değerlendirilmiştir. Fonksiyonel çalışmalar için ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinde (HTR-8/SVneo) p97/VCP inhibitörü (DBeQ) uygulaması ve p97/VCP-SVIP siRNA transfeksiyonlarıyla proteinlerin ekspresyonları baskılanmıştır. Bu baskılanmanın hücrelerin invazyon ve migrasyonlarına olan etkileri, gerçek zamanlı analiz sistemiyle (xCELLigence) belirlenmiştir.

p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının 1. trimestere ait sitotrofoblastlarda ve sinsisyotrofoblastlarda yoğun olduğu gözlenmiştir. Western Blot ve qRT-PCR bulgularıyla 1. trimesterdeki ekspresyonların 2. trimesterde anlamlı düzeyde azaldığı ve 3. trimesterde tekrar arttığı belirlenmiştir. Otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 ekspresyonları ise gebelik boyunca artmıştır. HTR-8/SVneo üzerinde DBEQ uygulamasının ve siRNA ile p97/VCP ekspresyonunun baskılanmasının, SVIP ekspresyonunu azalttığı ve otofajik proteinlerin (LC3II ve p62) ekspresyonlarını ise anlamlı derecede arttırdığı belirlenmiştir. DBEQ uygulaması ve p97/VCP siRNA transfeksiyonu hücrelerin invazyon ve migrasyonlarını anlamlı derecede azaltırken, SVIP siRNA transfeksiyonları hücrelerin invazyon ve migrasyonlarında artış sağlamıştır.

Sonuç olarak UPS'de rol oynayan p97/VCP ve SVIP'in üç trimesterde farklı düzeylerde eksprese edildiklerinin belirlenmesi bu proteinlerin insan plasenta gelişimindeki önemini ortaya çıkarmıştır. Aynı zamanda ekstrasvillöz trofoblastların invazyon ve migrasyonlarını etkiledikleri belirlenerek gebeliğin sürdürülebilirliği ve preeklampsi gibi patolojilerde etkin olabilecekleri ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Ekstrasvillöz trofoblast, insan plasenta, p97/VCP, SVIP, UPS

ABSTRACT

Investigation of Expressions and Functions of Ubiquitin Proteasome System Proteins in Human Placenta in Different Periods of Pregnancy

During implantation and placental development, there are molecular mechanisms in the invasion and migration of trophoblasts. Recent studies have reported the importance of p97/VCP (Valosin-Containing Protein) and SVIP (Small VCP-Interacting Protein) in invasion of cancer cells and Ubiquitin-Proteasome System (UPS). Although many studies have been conducted during pregnancy, the roles of p97/VCP and SVIP are unknown. In the first stage, the aim of the study was to compare the expressions of these proteins in different trimester human placentas. In the second stage, it was aimed to examine the possible effects of these proteins on invasion and migration in functional studies with extravillous trophoblast cells.

Histochemical evaluations and Scanning Electron Microscopy were used in placentas. Protein and gene analyses were performed by immunohistochemistry, immunofluorescence, Western Blot and qRT-PCR. Expressions were suppressed through extravillous trophoblast cell line HTR-8/SVneo by p97/VCP inhibitor (DBeq) administration and p97/VCP-SVIP siRNA transfections. Changes in invasion and migration were determined by real-time analysis system (xCELLigence).

In the 1st trimester, p97/VCP and SVIP expressions were found to be intense in cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts. In the Western Blot and qRT-PCR findings, the expressions in the 1st trimester decreased in the 2nd trimester and then increased again. Expressions of LC3II and p62 increased throughout pregnancy. It was determined that SVIP expressions decreased, LC3II and p62 increased significantly after DBeq. DBeq and p97/VCP siRNA transfection reduced invasion and migration of the cells. In addition, there was an increase in the SVIP siRNA groups in invasion and migration.

As a result, the determination that p97/VCP and SVIP, which play a role in UPS, were expressed at different levels in trimesters revealed the importance of these proteins in human placental development. Also, it was revealed that extravillous trophoblasts affected invasion and migration, and that they might be effective in pathologies such as pregnancy sustainability and preeclampsia.

Keywords: Extravillous trophoblast, human placenta, p97/VCP, SVIP, UPS

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ADAM	: Disintegrin ve Metaloproteinaz Alanı
ANOVA	: Varyans Analizi
ATP	: Adenozin Trifosfat
BSA	: Sığır Serum Albümin
CCl ₄	: Karbon Tetraklorür
cDNA	: Komplementer DNA
CHIP	: Hsc-70 ile Etkileşen Protein
CIM	: Hücre İnvazyon ve Migrasyon
CK7	: Sitokeratin-7
cm	: Santimetre
cm ²	: Santimetre Kare
CO ₂	: Karbondioksit
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	: 4', 6-Diamidino-2-Fenilindol Dihidroklörür
DBeQ	: N ² ,N ⁴ - Dibenzilkinazolin-2,4-Diamin
Dlx4	: Distal Olmayan Homeobox 4
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: 2'-Deoksiadenozin-5'-Trifosfat
DRAM	: DNA-Hasarı Düzenlenmiş Otofaji Modülatörü
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
egEVT	: Endoglandular Trofoblast
enEVT	: Endovasküler Trofoblast
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERAD	: Endoplazmik Retikulum İlişkili Protein Yıkımı
EVT	: Ekstravillöz Trofoblast
FBS	: Fetal Sığır Serum

g	: Gram
GABARAPL2	: GABA Tip A Reseptör İlişkili Protein Benzeri 2
Gp78	: Glikoprotein 78
H ₂ O	: Su
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HCl	: Hidroklorik Asit
HEPES	: 4-(2-Hidroksietil)-1-Piperazineetansulfonik Asit
HLA-G	: Majör Histo-Uyumluluk Kompleksi, Sınıf I, G
hPL	: İnsan Plasental Laktojen
IgG	: İmmünglobülin G
IUGR	: İntrauterin Gelişme Geriliği
iEVT	: İnterstisyel Trofoblast
Lamp1	: Lizozomla İlişkili Membran Protein 1
Lamp2	: Lizozomla İlişkili Membran Protein 2
LC3II	: Mikrotübülle İlişkili Protein 1 Hafif Zinciri 3 Beta
LIR	: Lökosit Ig Benzeri Reseptör
M	: Molar
m ²	: Metre Kare
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M-MLV	: Moloney Mürin Lösemi Virüsü
MÖ	: Milattan Önce
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
NP-40	: Nonidet P-40
OD	: Optik Yoğunluk
p62	: Ubikütün Bağlayıcı Protein p62
p97/VCP	: Valosin-İçeren Protein
PAS	: Periyodik Asit Schiff
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin

PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFA	: Paraformaldehit
pmol	: Pikomol
PSMD4	: Proteazom 26S Alt Birimi, ATPaz Olmayan 4
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR
RCF	: Relatif Santrifüj Kuvveti
RNA	: Ribonükleik Asit
RPM	: Dakikadaki Devir Sayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Enstitüsü
RTCA	: Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskop
siRNA	: Küçük İnterferans Ribonükleik Asit
STAR	: Steroidojenik Akut Düzenleyici
STAT3	: Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü 3
SVIP	: Küçük VCP ile Etkileşen Protein
UBA	: Ubikütin ile İlişkili
UPR	: Katlanmamış Protein Tepkisi
UPS	: Ubikütin Proteozom Sistemi
V	: Volt
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YWHAZ	: Tirozin 3-Monooksijenaz/Triptofan 5-Monooksijenaz Aktive Edici Protein, Zeta Polipeptit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	İmplantasyon aşamaları.....	5
Şekil 2.2.	Koryonik villus oluşum aşamaları.	6
Şekil 2.3.	Tutundurucu villus yapısının şematik gösterimi.	7
Şekil 2.4.	EVT'lerin invazyonu.....	8
Şekil 2.5.	EVT tipleri.....	9
Şekil 2.6.	Terme ait bir villus enine kesitinin basitleştirilmiş çizimi	12
Şekil 2.7.	Koryonik villus yüzeyinde bir sitotrofoblast hücresinin farklılaşması ve sinsisyal düğüm oluşumuna kadar olan sürecin şematik gösterimi	13
Şekil 2.8.	1. Trimestere ait koryonik villus yapısı.....	15
Şekil 2.9.	Trimestelere ait koryonik villus yapılarının karşılaştırılması	16
Şekil 2.10.	Plasental bariyer yapısı.....	17
Şekil 2.11.	Villus tiplerinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.12.	UPS ve otofaji arasındaki etkileşimler	22
Şekil 2.13.	p97/VCP'nin şematik yapısı.....	25
Şekil 2.14.	SVIP ile ERAD'ın düzenlendiği öne sürülen model	26
Şekil 3.1.	xCELLigence RTCA.....	43
Şekil 4.1.	Trimesterlere ait plasenta dokularının Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri (A-F).....	47
Şekil 4.2.	Trimesterlere ait koryonik villusların PAS boyama görüntüleri (A-C).	48
Şekil 4.3.	1. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri (A-D)	49
Şekil 4.4.	2. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri (A-B).....	50
Şekil 4.5.	3. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri (A-F)	52
Şekil 4.6.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası mIgG ve rIgG ekspresyonları.....	54
Şekil 4.7.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası p97/VCP ekspresyonları.	56
Şekil 4.8.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası SVIP ekspresyonları.....	58

Şekil 4.9.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası LC3II ekspresyonları.	60
Şekil 4.10.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası p62 ekspresyonları.	62
Şekil 4.11.	UPS proteinlerinin ekspresyonlarının her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında immünohistokimya sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri..	64
Şekil 4.12.	UPS proteinlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası çekirdek ve sitoplazma boyanmalarına göre birlikte gösterildiği istatistiksel karşılaştırma grafikleri.	65
Şekil 4.13.	1. Trimestere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası EVT'lerde p97/VCP ve SVIP ekspresyonları.	66
Şekil 4.14.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünofloresan sonrası p97/VCP ve SVIP ekspresyonları. p97/VCP ekspresyonlarının.....	68
Şekil 4.15.	Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünofloresan sonrası LC3II ve p62 ekspresyonları. LC3II ve p62 ekspresyonlarının nokta şeklinde olduğu izlenmiştir.	70
Şekil 4.16.	UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında Western Blot analizleri sonrası bant görüntüleri.....	71
Şekil 4.17.	UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında Western Blot analizleri sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri...	72
Şekil 4.18.	UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında qRT-PCR analizleri sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri.....	74
Şekil 4.19.	HTR-8/SVneo hücre hatlarının histolojik incelenmesi.	76
Şekil 4.20.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında UPS proteinlerinin immünofloresan boyama bulguları.	77
Şekil 4.21.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında farklı doz ve sürelerde DBeQ uygulamaları sonrası hücrelerin büyüme grafiği.	78
Şekil 4.22.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.....	79
Şekil 4.23.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri.....	80

Şekil 4.24.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA'ler ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.....	81
Şekil 4.25.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri.....	82
Şekil 4.26.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA'ler ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.....	83
Şekil 4.27.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri.....	84
Şekil 4.28.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası qRT-PCR analizleri.	85
Şekil 4.29.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası qRT-PCR analizleri.	86
Şekil 4.30.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası qRT-PCR analizleri.	86
Şekil 4.31.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası manuel invazyon testlerinin karşılaştırılması.	87
Şekil 4.32.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası manuel invazyon testlerinin karşılaştırılması.	88
Şekil 4.33.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması.	89
Şekil 4.34.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması.....	90
Şekil 4.35.	HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması.....	91
Şekil 4.36.	Genlerin ağ analizleri. p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genlerinin kendi aralarında ve 20 farklı gen ile birlikte ekspresyonlarının görüldüğü ağ analizi izlenmektedir.....	93

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1.	Villus tipleri ve karakteristik özellikleri	18
Tablo 3.1.	Primer ve sekonder antikorlar.....	30
Tablo 3.2.	Primer dizileri	31
Tablo 3.3.	siRNA'ler.....	32
Tablo 3.4.	Mikroskop çeşitleri ve markaları	32
Tablo 3.5.	Komplementer DNA (cDNA) sentez protokolü	40
Tablo 3.6.	Reaksiyon karışımı	41
Tablo 3.7.	Reaksiyon koşulları	41

1. GİRİŞ

Plasenta, gebelik döneminde anne ile gelişmekte olan embriyo/fetüs arasındaki iletişimi sağlayan geçici bir endokrin organdır. Plasentanın; maternal ve fetal plazma arasında gaz alışverişi, besinlerin ve atıkların transferi, immünglobulinlerin transferi ve hormon salgılama gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır (1).

İnsanda gebelik süreci, embriyo/fetüsün anne uterusundaki gelişimini ifade eder. Bu süreçte 1. trimester (1-12 hafta), 2. trimester (13-28 hafta) ve 3. trimester (29-40 hafta) olmak üzere 3 gelişim evresi bulunmaktadır (2). Bu gelişim evrelerinde plasentanın gelişimi, yapı ve fonksiyonlarındaki değişiklikler önemli rol oynar.

İnsanda plasenta yapısı 1. trimesterde desidüakoryal olarak tanımlanmıştır (3). 2. Trimesterin başından itibaren ise plasentanın, intervillöz boşluklardaki maternal ve fetal kan, koryonik villus yapılarıyla birbirinden ayrıldığı için, hemokoryal tipte olduğu bildirilmiştir (4).

Plasentanın erken gelişiminde prelaküner, laküner ve erken villöz evreleri görülmektedir. İlk gerçekleşen embriyo implantasyonu sürecinde, embriyo ve uterus arasında bir dizi fizyolojik olay meydana gelir (5). Trofoblast hücrelerinin proliferasyonu sonrası iki farklı tabaka meydana gelir. Bu tabakalar mitotik aktivitesi olan sitotrofoblast ve hücre sınırları belirgin olmayan sinsisyotrofoblast hücrelerinden oluşmaktadır. Laküner evrede, fertilizasyondan yaklaşık 9 gün sonra sinsisyotrofoblast hücreleri arasında vakuoller belirmeye başlar. Bu vakuoller birleşerek geniş laküner boşluklarını meydana getirirler. Maternal kanın bu boşlukları doldurmasıyla primordiyal uteroplental kan akışı sağlanmış olur. Erken villöz evresi ise primer, sekonder ve tersiyer villusların oluşum süreçlerini içermektedir (4).

Villöz sitotrofoblast hücrelerinin bir kısmı tutundurucu villusların uç kısımlarında invaziv ekstrasvillöz trofoblastlara dönüşür (6). Bu invazyon sürecinde invazyonu indükleyen ve inhibe eden faktörler arasındaki dengesizlikler gestasyonel diyabet, preeklampsi ve intrauterin gelişme geriliği (IUGR) gibi plasenta ile ilişkili

obstetrik hastalıklara neden olabilmektedir (7). Bu hastalıkların görülme sıklığı dünyada ve ülkemizde gün geçtikçe artmaktadır. Anne ve bebek ölümlerine sebep olabilen bu önemli hastalıkların tedavisine yönelik yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Bu hastalıklarda hastalığa sebep olan ve/veya hastalık sonucu oluşabilen birçok neden çalışılmaktadır.

Bu hastalıklardan biri olan preeklampsiye ait semptomlar gebeliğin yaklaşık 20. haftasından sonra görülmektedir. Bugüne kadar preeklampsinin erken teşhis edilebilmesi için herhangi bir biyobelirteç bulunamamıştır. Bu nedenle gebeliğin erken dönemlerinde meydana gelen fizyolojik olayların incelenmesi, hastalığı teşhiste önemli olacaktır (8).

Plasentasyon sırasında plasental trofoblast hücrelerinin normal olmayan invazyonları preeklampsinin en önemli nedenlerinden biri olarak bilinmektedir. Ancak trofoblast invazyonunun düzenlenmesinde rol oynayan mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır (9).

Ubikütin Proteozom Sistemi (UPS), kanser ve nörolojik hastalıklar gibi birçok hastalığın patofizyolojik mekanizmalarında rol oynayan başlıca protein yıkım yollarından biridir. Bu hastalıklarda UPS’de rol oynayan proteinlerin fonksiyonlarında bozukluk olabileceği öne sürülmektedir (10).

p97/VCP (Valosin-İçeren Protein) ATPaz protein ailesinin bir üyesidir ve birçok hücresel işlemin düzenlenmesinden sorumludur. UPS’de şaperon olarak görev yapan bu protein; golgi membranlarının yeniden oluşum sürecinde, endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımında (ERAD), hücre bölünmesinde ve otofajide otofagozom maturasyon basamağında da görev almaktadır (11). SVIP (Küçük VCP ile Etkileşen Protein) ise p97/VCP’ye direk bağlanabilen bir adaptör proteindir (12).

p97/VCP ve otofajik proteinlerin ekspresyonları ve bu proteinlerin aralarındaki ilişki insan preeklampitik plasentalarında ilk kez 2018 yılında gösterilmiştir (13). Ancak p97/VCP ve SVIP proteinlerinin plasentasyondaki rolleri bilinmemektedir. Buna ek olarak p97/VCP ve SVIP’in kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonlarında etkin moleküller olduğu bildirilmiştir (14,15). Yapılan bu çalışmalar

kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonlarında etkin olan UPS ailesinden bu iki proteinin insan plasentasında trofoblast invazyon ve migrasyonunda da etkin olabileceğini düşündürmüştür.

Bu bilgiler ışığında bu çalışmanın ilk basamağında amaç insan plasentasında gebeliğin üç farklı trimesterinde p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarını protein ve gen düzeylerinde karşılaştırmaktır. İkinci basamakta ise bu proteinler ile fonksiyonel çalışmalar planlanmıştır. Bunun için erken dönem ekstravillöz trofoblast hücre hatları üzerinde bir p97/VCP inhibitörü uygulaması ve p97/VCP ile SVIP gen ekspresyonlarının siRNA'ler kullanılarak susturulması istenmiştir. Sonrasında bu uygulamaların hücre hatları üzerindeki invazyon ve migrasyon özelliklerine olası etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Tarihte insan plasentasına ait ilk bulgular MÖ 3100 yıllarında Eski Mısırlılara aittir. Yunanca kökenli ‘Plasenta’ terimi İtalyan Anatomist Realdus Columbus tarafından 1559 yılında ilk kez kullanılmıştır. 17. Yüzyılın sonlarına doğru plasantanın yapısal ve fonksiyonel özellikleriyle ilgili önemli gelişmeler yaşanmıştır (4). ‘Trofoblast’ terimi ise ilk olarak 1889’da Hollandalı Embriyolog Ambrosius Arnold Willem Hubrecht tarafından besinleri taşıyan ve anne ile fetüs arasındaki koruyucu bariyeri oluşturan hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır (16). Ayrıca trofoblastların doğası gereği yüksek düzeyde invaziv (aşındırıcı) olduğunu ve gelişimini desteklemek için desidua’ya bağımlı olduğunu gözlemlemiştir. Yapılan bu erken çalışmalardan bugüne kadar çeşitli trofoblast alt tipleri tanımlanmıştır (17).

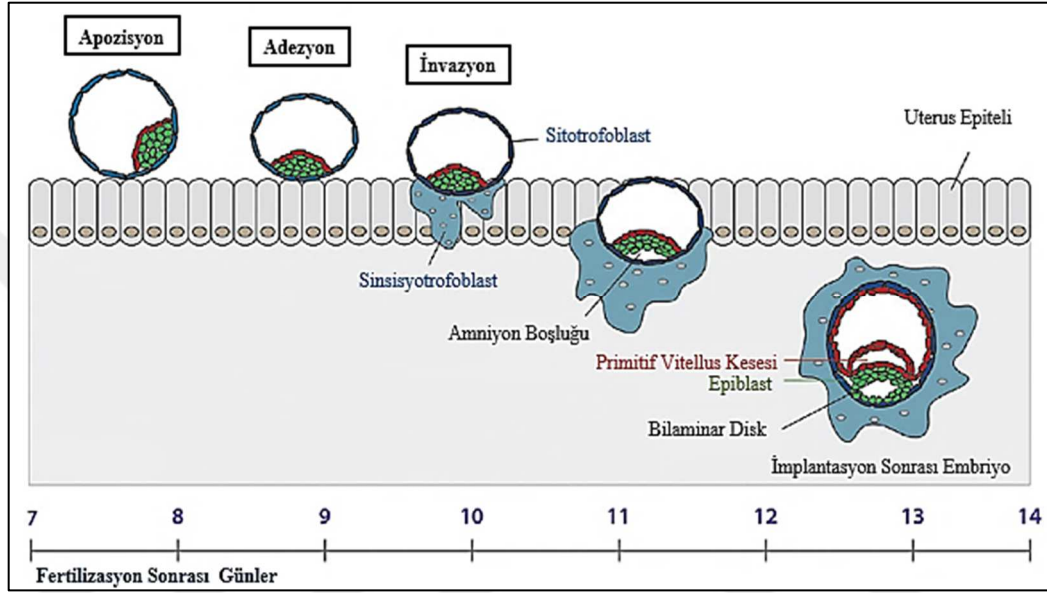
2.2. Embriyonik Gelişimin Başlangıcı

İnsanda embriyonik gelişim aşaması fertilizasyon ile başlar. Oluşan zigotun mitoz bölünmeler geçirerek yarıklanması sonrası blastomerler meydana gelir. Fertilizasyondan yaklaşık 3 gün sonra, kompakt halindeki embriyo yeniden bölünerek 12-32 hücreli morula haline dönüşür. Morulada iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi meydana gelir. Morula uterusu ulaştığında, uterus boşluğundaki sıvı zona pellusidayı geçip iç hücre kitlesinin hücrelerarası boşluğuna sızar ve orada toplanmaya başlar. Genişlemekte olan boşlukların birleşmesiyle blastosel denilen tek bir boşluk oluşur. Bu dönemdeki embriyoya blastosist adı verilir. İç hücre kitlesinden embriyonun dokuları, dış hücre kitlesinden de daha sonra plasentayı oluşturacak olan trofoblastlar gelişir. Ardından zona pellusida kaybolur. Blastosist fertilizasyondan yaklaşık 7 gün sonra, endometriyum sekresyon fazında iken, embriyonik kutuptan uterusu tutunur (18).

2.3. İmplantasyon Aşamaları

Gelişmekte olan embriyonun endometriyuma tutunması olayıdır. İmplantasyon aşamaları apozisyon, adezyon ve invazyondur. İmplantasyonda ilk önce apozisyon

aşamasında blastosist kendisini endometriyuma doğru yönlendirir. Adezyonda ise blastosist endometriyuma tutunur. Trofoblast hücrelerinin çoğalmasıyla içte sitotrofoblast hücreleri meydana gelir. İnvazyon bölgesinde bu hücrelerin farklanması ve füzyonuyla çok çekirdekli, hücre sınırları belirgin olmayan sinsisyotrofoblast hücreleri oluşur. Blastosist uterus epiteline nüfuz eder (19). Şekil 2.1.'de implantasyon aşamaları gösterilmektedir.

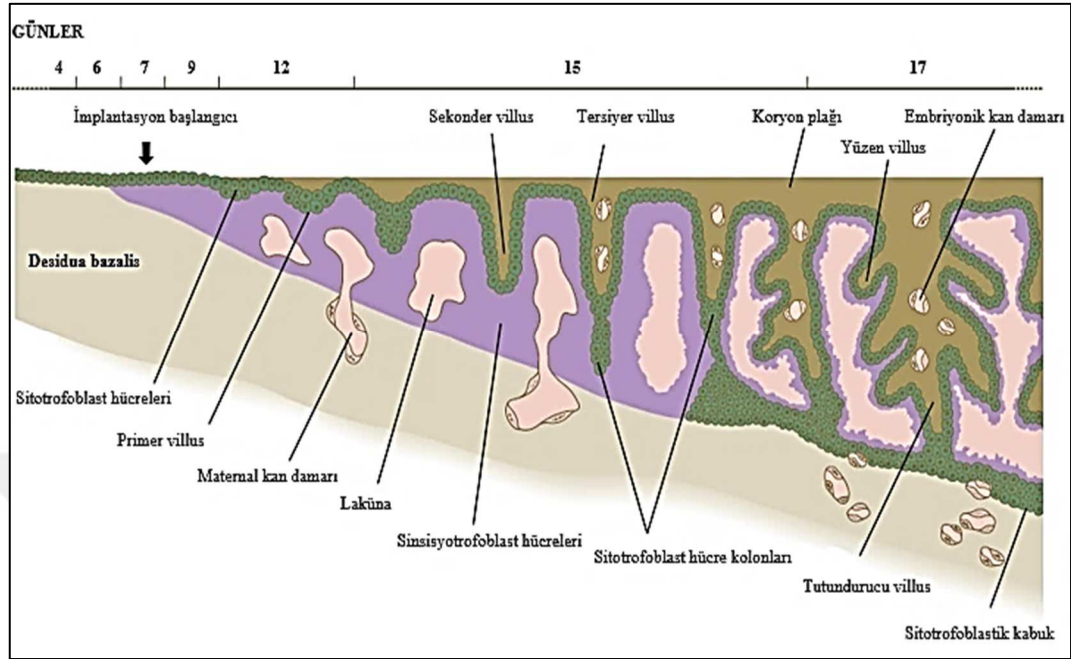


Şekil 2.1. İmplantasyon aşamaları (19).

2.4. Koryonik Villusların Gelişimi

İmplantasyon sonrası yaklaşık 9. günde sinsisyotrofoblast hücrelerinin arasında vakuoller görülmeye başlar. Maternal uterin kapillerlerin füzyona uğratılmasıyla bu boşluklar ve maternal kan arasında bağlantılar oluşur. Böylece primordiyal uteroplental dolaşım meydana gelir. Çoğalmakta olan sitotrofoblast tabakaları genişleyen sinsisyal kütlenin içerisine doğru girerek primer villusları oluşturur. Primer villuslar maternal desiduaya doğru uzanır ve uterin kan damarlarını ve bezlerini aşındırır. Bunu takiben ekstraembriyonik mezoderm hücrelerinin primer villuslara göçü ile sekonder villuslar meydana gelir. Gelişen villöz sitotrofoblastların devam eden proliferasyonu ve füzyonu ile villusların dallanmaları artar (20,21). Tersiyer villusta ise ekstraembriyonik mezoderm hücrelerinin farklanması ile kapiller ve kan hücreleri oluşur. Gebelikte 1. trimesterin sonuna kadar neredeyse tüm villuslar,

vaskülojenez nedeniyle, tersiyer villuslara dönüşür (3). Şekil 2.2.'de koryonik villusların oluşum aşamaları verilmiştir.



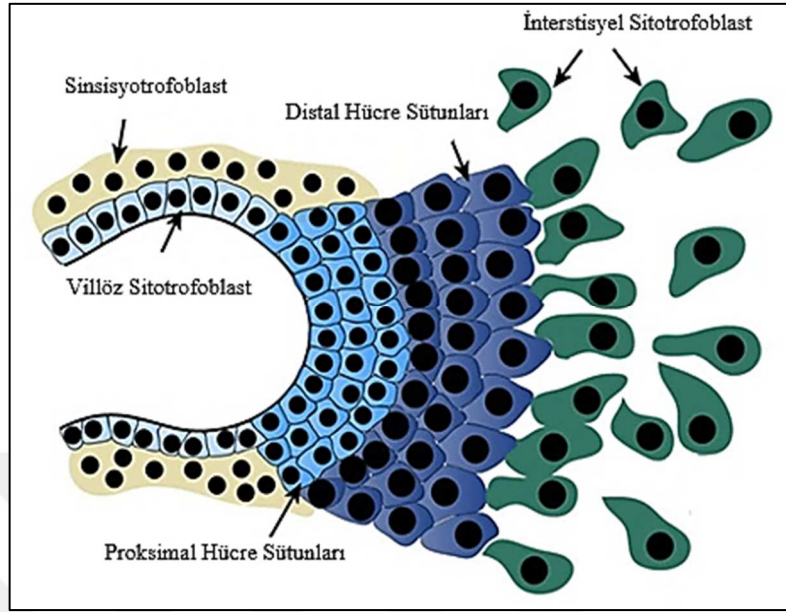
Şekil 2.2. Koryonik villus oluşum aşamaları (22).

Koryonik villus oluşumunda bazı genlerin (homeobox içeren genler, Msx2 ve Dlx4) trofoblast ve ekstraembriyonik mezoderm arasındaki ekspresyonları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu transkripsiyon faktörleri sıklıkla epitelyal-mezenkimal etkileşim bölgelerinde görülmüştür. Buna ek olarak bir transkripsiyon faktörü olan Gem-1'in villusların dallanma noktalarındaki ekspresyonları bildirilmiştir. Gem-1 ekspre edilen bölgenin her iki tarafındaki sitotroblast hücrelerinin çoğalmaya devam ettiği görülmüştür. Bu hücreler yeni villöz tomurcuklarının gelişmesini sağlamaktadır (22).

2.5. İnvazyon Mekanizması

15. Günden itibaren villusların bazılarında invazyonu sağlayan sitotroblastlar sinsisiotroblast hücrelerine doğru, bir havuz oluşturacak şekilde bir arada bulunurlar. Bunu takiben, bazı sitotroblast hücreleri villuslardan ayrılır ve invaziv fenotipli özel bir hücre türü olan ekstravillöz trofoblastlara (EVT) farklılaşırlar (23). Bu hücrelerin farklılaşması epitelyal-mezenkimal geçiş sürecine benzemektedir (17).

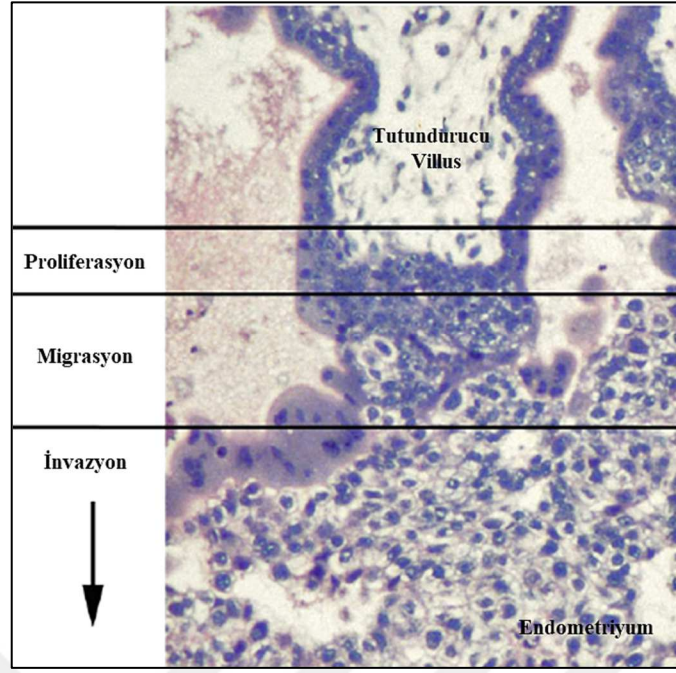
EVT'ler esas olarak tutundurucu villusun distal hücre sütunlarından oluşur (24). Bir tutundurucu villusa ait şematik yapı Şekil 2.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Tutundurucu villus yapısının şematik gösterimi (24).

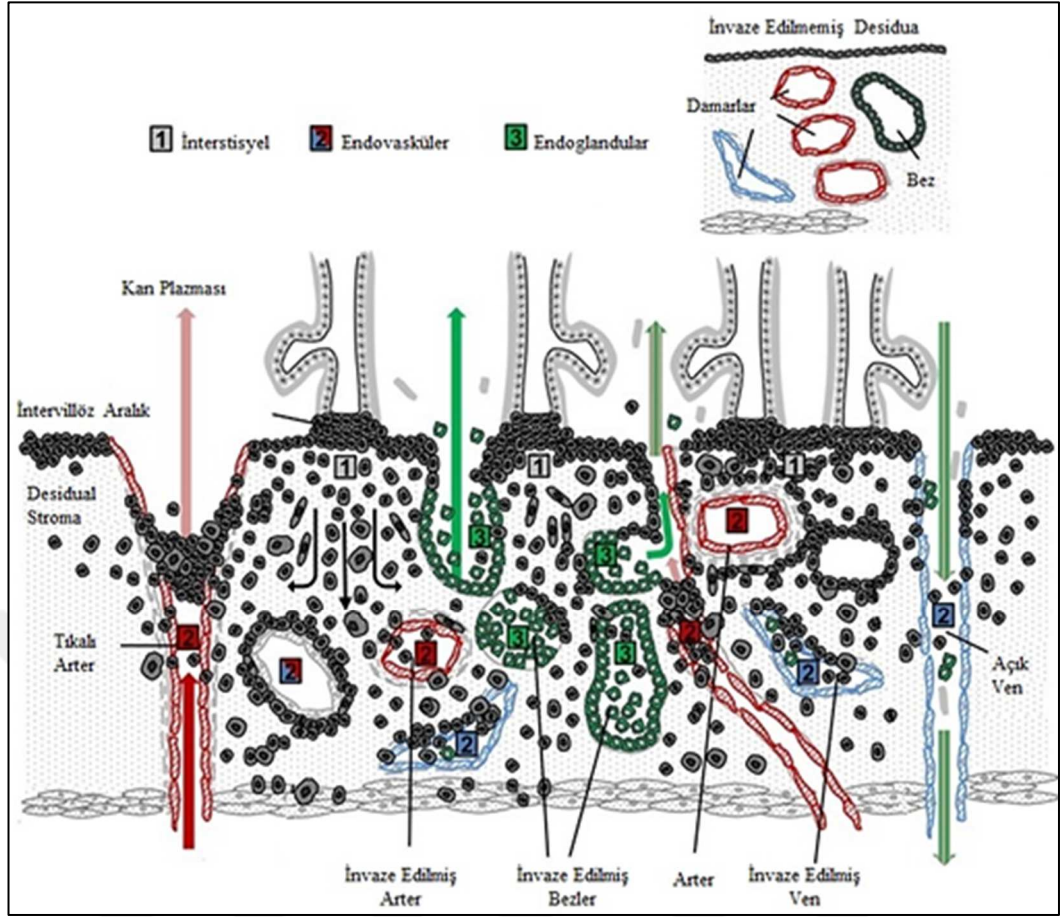
Literatürde EVT'ler ve kanser hücreleri arasında invazyon, damar oluşumu ve immün sistemden korunma gibi ortak özelliklerin bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (25). EVT'lerin tümör oluşumunun erken evrelerine benzer şekilde polaritelerini kaybettikleri öne sürülmektedir (24).

Şekil 2.4.'te görüldüğü gibi tutundurucu villusların uç kısmında çoğalan ve farklılaşan EVT'ler, migrasyonları sonrası desiduayı invaze ederler. İnvazyon aşamasında fetüse yeterli oksijen ve besin sağlamak için maternal damarları yeniden düzenlerler (26).



Şekil 2.4. EVT'lerin invazyonu (4).

Gelişmekte olan EVT'ler kendi içlerinde 3 farklı hücre tipine ayrılır (Şekil 2.5.). Bunlardan interstisyel trofoblastlar (iEVT), maternal endometriyumun derin tabakasına ve hatta miyometriyumun üçte birine kadar ilerleyebilirler. Bazıları ise endotel benzeri hücre özelliği kazanırlar ve endovasküler trofoblastlara (enEVT) dönüşürler. Uterus spiral arterlerine nüfuz eder ve maternal endotelial hücrelerinin yerini alırlar. Uterus spiral arterleri bu şekilde büyüyen fetüsün gereksinimlerini karşılamak için düşük dirençli arterlere dönüştürülür (27). Uterus bezlerinin epitelini invaze edenler ise endoglandular trofoblastlar (egEVT) olarak tanımlanmıştır (28).



Şekil 2.5. EVT tipleri (28).

Gebeliğin 6. haftasından önce implantasyon sırasında sinsisyotrofoblastların ve EVT'lerin erken invazyonları uterin bezlerin ve venlerin intervillöz boşluğa açılmasına yol açmaktadır. Endoglandular EVT'ler 'uterus sütü'nün plasentaya doğru akışını sağlamak için bezleri açar. Bunu endovenöz trofoblastların uterustaki venlere invazyonu izler. Daha sonra 1. trimesterde endoarteriyel trofoblastlar, maternal kanın plasentaya akışını engellemek için uterus spiral arterlerini invaze ederler, duvarlarını dönüştürür ve lümenlerini tıkarlar. Bu aşamada sadece kan plazması sızabilir. 2. Trimesterin başında ise arteriyel tıkaçlar parçalanır ve sonunda maternal kanın plasentaya akışı sağlanır. Bezlerin hangi noktadan itibaren azaldığı ve kaybolduğu bilgisi net değildir. Ancak gebeliğin 2. yarısında bezler neredeyse hiç görülmez (29).

Histolojik açıdan bakıldığında EVT'lerin en önemli özelliklerinden biri, majör histo-uyumluluk kompleksi, sınıf I, G (HLA-G) ekspresyonudur. HLA-G, yaygın olarak kullanılan sitokeratin 7 yerine, EVT'ler için özel bir işaretleyicidir (30,31).

EVT'ler için $\alpha 5\beta 1$ integrin (32), T-hücre faktör 4 (TCF4) (24) ile disintegrin ve metaloproteinaz alanı (ADAM) 12 (33,34) diğer işaretleyicilerdir.

2.6. Placenta

2.6.1. Placenta Gelişimi

Erken plasental gelişim, trofoblastların hızlı çoğalması, koryonik kesenin ve villusların gelişmesi ile karakterizedir. 3. Haftanın sonunda anne ile embriyo arasındaki fizyolojik değişimler için gerekli anatomik düzenlemeler oluşturulur. 4. Haftanın sonunda ise plasentada maternal-embriyonik gaz, besin ve metabolik atık ürünlerinin değiş tokuşuna izin veren kompleks bir vasküler ağ gelişir. Placenta, fetal ve maternal olmak üzere iki komponentten meydana gelir (35).

Placentanın fetal yüzeyinde tersiyer villuslar büyümeye ve dallanmaya devam ettikçe koryon frondozum bölgesini meydana getirir. Koryonik vezikülün karşı tarafında (abembriyonik kutup) bulunan villuslar ise atrofiye uğrar. Bu bölgeye koryon leve adı verilir (22).

Placentanın maternal bileşeni ise desidua bazalis'ten oluşur. Desidua bazalis, endometriyumun blastosist ve miyometriyum arasında (yani implantasyon yeri) bulunan kısmını içerir. Desidua parietalis ise implantasyon bölgesi dışındaki endometriyumun tüm kısımlarını kapsar. Desidua bazalis ve desidua parietalis, doğumla birlikte atılır. Bir diğer bölüm olan desidua kapsularis, endometriyumun blastosisti örten ve blastosisti uterus boşluğundan ayıran bölümdür. Desidua kapsularis, kan akışının azalması nedeniyle gelişimin 22. haftasında dejenere olur (36).

Gebeliğin ilerleyen dönemlerinde placenta, fetüsün büyümesi ile birlikte genişler ve kalınlaşır. Aynı zamanda toplam villus yüzeyi de genişler. 2. Trimesterde azalmış trofoblast hücre tabakasının kalınlığı ortalama 6,9 μm 'dir. Bu dönemde villöz yüzeyinin yaklaşık %45'i sitotrofoblast hücreleri ile kaplıdır. Buna ek olarak fetal kapillerlere ait lümenler villöz hacmin yaklaşık %9'unu oluşturur.

Toplam villus yüzeyi 3. trimesterde ise yaklaşık 10 m² ye kadar çıkar. Villöz sitotrofoblastlar, villöz yüzeyin yaklaşık %25'ini kaplar. Yeni oluşan villuslardaki fetal kılcal damarlarda sinüzoidal dilatasyonların başlaması sonucu vaskülosinsisyal membranlarda artış görülür. Bu dönemde ortalama trofoblast hücre tabakasının kalınlığı 6 µm'nin altına düşmüştür. Terme yakın plasenta 2,5 cm'ye kadar kalınlaşmaktadır. İyi korunmuş plasentalarda fetal kapiller lümenleri villöz hacmin %40'ından fazlasını oluşturmaktadır.

Term plasentada fibröz stroma villusların trofoblastik ve fibrinoid yüzeylerinin her yerine ulaşır. Toplam villöz hacim yaklaşık 12 m² ye çıkmıştır. Ortalama trofoblast hücre tabakası kalınlığı ise 4 µm'ye kadar düşer. Aynı zamanda ortalama materno-fetal difüzyon mesafesi 5 µm'nin altına düşmüştür. Villöz yüzeylerinin %20'sinde trofoblastik hücre tabakası sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblastlardan oluşmuş olup iki katlı bir yapı sergiler. Geriye kalan %80'i ise yalnızca sinsisyotrofoblastlar tarafından oluşturulur. Var olan villöz sitotrofoblastlar ise oldukça incedir, bu yüzden ayırt edilmelerinde zorluk yaşanmaktadır (4).

2.6.2. Plasentanın Anatomisi

Term plasenta anatomik olarak yaklaşık 20-22 cm çapında, 2,5 cm kalınlığında ve ağırlığı ortalama 470 g olan dairesel disk şeklinde bir organdır. Doğumun yöntemi, göbek kordonunun klemplenmesi, maternal veya fetal kan kayıpları vb. durumlara bağlı olarak fiziksel yapısı çeşitlilik gösterebilir.

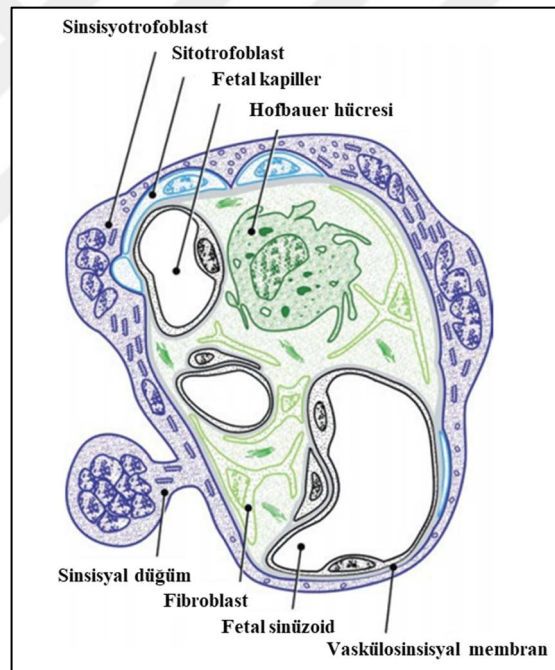
Plasentanın fetal yüzeyi amniyon zarı ile kaplı koryonik plakaya karşılık gelir. Göbek kordonu çoğunlukla koryonik plakanın merkezinde ya da merkezine yakın bir pozisyonda yerleşim gösterir (23,37). Fetal yüzeyde 5-8 adet büyük koryonik (fetal) kan damarları bulunur. Plasentanın maternal yüzeyi, maternal yüzeye parke taşı görünümü veren kotiledon adı verilen 8-10 bölme ile karakterizedir. Kotiledonlar birbirinden desidial (plasental) septa ile ayrılır (36).

Doğumdan yaklaşık 30 dakika sonra, plasenta, embriyonik membranlar ve göbek kordonunun geri kalanı, maternal desiduanın çoğu ile birlikte uterustan atılır (22).

2.6.3. Plasentanın Yapısı

Plasental koryonik villusların yapısında stroma etrafında sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücreleri bulunmaktadır (38). Bu trofoblastik tabaka stromadan bazal membran ile ayrılır. Villusların merkezinde sabit ve hareketli bağ dokusu hücreleri bulunur. Erken plasantasyon sürecinde çoğunlukla endotel hücreleri, kan hücreleri, Hofbauer hücreleri, miyofibroblastlar, düz kas hücreleri ve fibroblastlar gibi çeşitli hücre tiplerine farklanabilen mezenkimal hücreler ile doludur. Büyük kök villuslarda bulunan damarlar genellikle arter ve venler şeklinde iken, villöz ağacın uçlarına doğru kapillerler ve sinüzoidler olarak görülür (37).

Plasentanın villöz olmayan kısımları ise EVT'ler, fibrinoid ve desiduaı içerir (38).



Şekil 2.6. Terme ait bir villus enine kesitinin basitleştirilmiş çizimi (38).

2.6.3.1. Villöz Sitotrofoblastlar

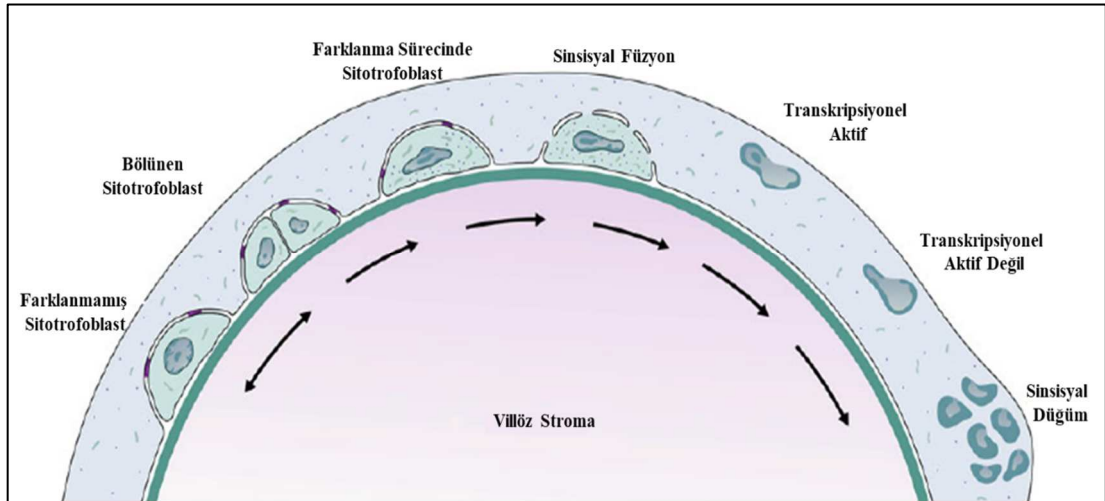
Gebeliğin 1. trimesterine ait plasenta örneklerinde, villöz sitotrofoblast çok çekirdekli sinsisyal tabakanın altında tam bir hücre tabakası olarak bulunur. Böylece gebeliğin bu aşamasında tüm villuslar iki katmanlı bir trofoblast epiteli ile kaplıdır. Gebelik ilerledikçe, sitotrofoblastların sayısı azalır. Term plasentada villöz

trofoblastların toplam hacimine yaklaşık %20 oranında katkıda bulunurlar. Stereolojik çalışmalar açıkça göstermektedir ki toplam sitotrofoblastların sayısı gebelik boyunca giderek artar. 13-16. Haftalarda bu sayı 1×10^9 iken, 37. hafta sonrasında 6×10^9 civarında olmaktadır. Sitotrofoblastlar kök hücreler gibi sürekli çoğalır ve üzerindeki sinsisyotrofoblast tabakasının devamlılığı sağlanmış olur (39).

Farklılaşmamış sitotrofoblastların, az miktarda organel içeren sitoplazmaları ile küboidal bir şekilleri vardır. Farklılaşma gerçekleştiğinde sitoplazmalarında çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyonlar izlenir (37,40). Bu aktif hücreler, aerobik ve anaerobik glikolizde yer alan enzimlerin aktivitelerini gösterir (37).

2.6.3.2. Sinsisyotrofoblastlar

Sitotrofoblast hücrelerinden çok çekirdekli sinsisyotrofoblastların oluşumu sürecinde öncelikle hücre bölünmeleri gerçekleşir. Hücre döngüsünden çıkan yeni hücreler farklılaşmaya başlar. Farklılaşma sürecinden sonra sinsisyal füzyon gerçekleşir ve yeni proteinler, hormonlar üretilmeye başlanır (41).



Şekil 2.7. Koryonik villus yüzeyinde bir sitotrofoblast hücresinin farklılaşması ve sinsisyal düğüm oluşumuna kadar olan sürecin şematik gösterimi (4).

Sinsisyotrofoblast hücreleri çok çekirdekli ve polar yapıda bir tabaka oluşturur. Bu sürekli tabakada hücrelerin lateral hücre sınırları yoktur ve değişik konsantrasyonlarda organellere sahiptir. Mikrovillusları sayesinde yüzeylerini

arttırırlar. Bu apikal yüzeyleri sayesinde maternal kan ile temas kurarlar. Oldukça farklılaşmış sinsisyotrofoblastlarda bile proliferatif aktivite görülmez. Sinsisyotrofoblastların bazı kısımlarında geç apoptotik olayların göstergesi olarak halka şeklinde kromatin agregasyonları sergilerler. Bu tür geç apoptotik çekirdekler sinsisyotrofoblastların apikal membranından maternal dolaşıma geçen sinsisyal düğümler halinde paketlenir. Normal gebelik sırasında maternal uterin ven kanında ve maternal pulmoner damarlarda çoklu çekirdek içeren sinsisyal düğümler tespit edilebilir (41).

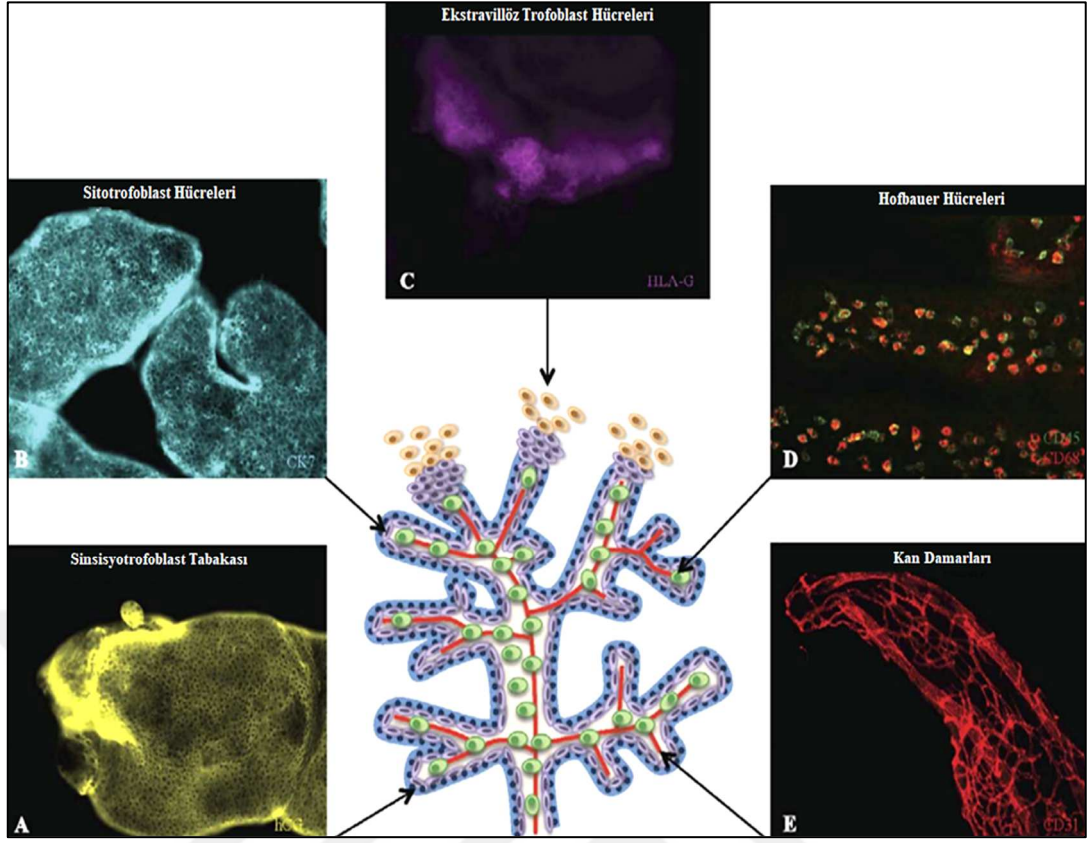
2.6.3.3. Hofbauer hücreleri (Plasental makrofajlar)

Plasental makrofajlar menstruasyon sonrası 5. haftadan başlayarak villöz stromada bulunabilir. Hofbauer hücreleri olarak da adlandırılan bu hücrelerin kökenleri:

1. Villöz stromadaki mezenkimal hücre popülasyonu içindeki progenitör hücrelerden (42),
2. Embriyonik/fetal kemik iliği kaynaklı monositlerin villöz stromaya nüfuz etmesinden ve embriyo ile plasenta arasındaki kan akışı sağlandıktan sonra makrofajlara farklılaşmasından meydana gelebilirler (4).

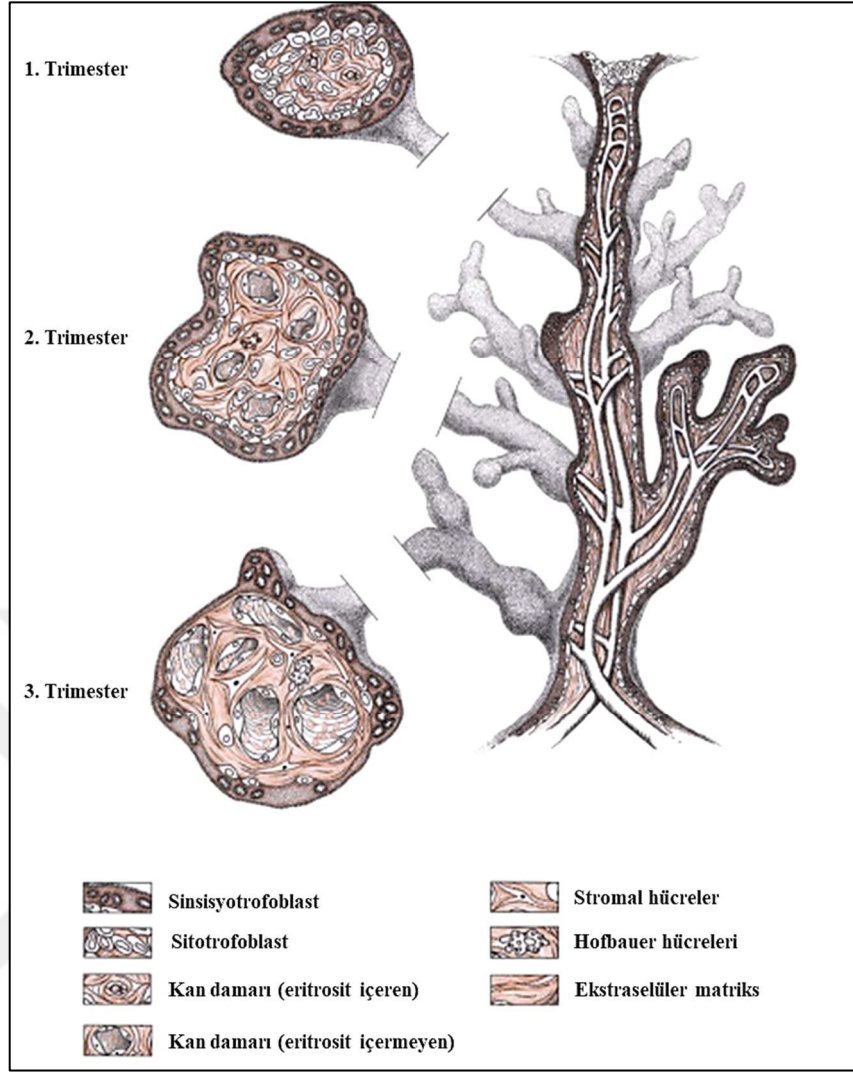
Hofbauer hücrelerinin sitoplazmalarında çok sayıda vakuol ve lizozom bulunur. Aynı zamanda yüzeylerinde hücre iskeleti uzantıları vardır (37).

Hofbauer hücreleri, villöz trofoblastların farklılaşmasının düzenlenmesi, stromal hücre büyümesinin düzenlenmesi, plasental anjiyogenez ve vaskülogenezin düzenlenmesi ve maternal bağışıklık komplekslerinin absorpsiyonu gibi farklı işlevler sergiler (43).



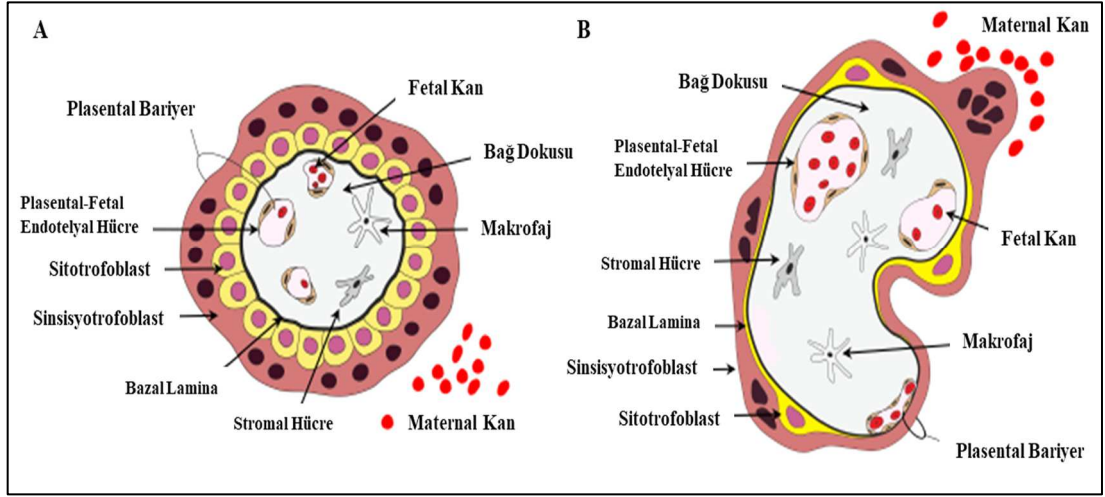
Şekil 2.8. 1. Trimestere ait koryonik villus yapısı A) Sinsisyotrofoblast tabakası (hCG), B) Sitotrofoblast hücreleri (CK7), C) Ekstravillöz trofoblast hücreleri (HLA-G), D) Hofbauer hücreleri (CD45/CD68), E) Kan damarları (CD31) (44).

Özetle, ilk trimesterde plasantanın koryonik villusları büyük bir yapı sergiler ve kan damarları belirgin değildir. 2. Trimesterde plasantanın büyümesine karşılık villuslar küçülür ve daha vasküler hale gelir. Sinsisyotrofoblast hücre tabakası sinsisyal düğüm oluşumlarını meydana getirir. 3. Trimesterde ise oldukça vaskülarize koryonik villuslarda sinsisyal düğümler belirgindir (45). Buna ek olarak sinsisyotrofoblast hücre tabakasının altında yer alan sitotrofoblast hücreleri kesintili hale gelmiştir. Villusların bazı bölgelerinde sinsisyotrofoblast tabakası incelmış ve çekirdek içermeyen alanlar halini almıştır. Işık mikroskop incelemelerde bu bölgeler stromadaki damar duvarları ile füzyon yapmış gibi görülmektedir. Bu yapıya vaskülosinsisyal membran adı verilir (46).



Şekil 2.9. Trimestellere ait koryonik villus yapılarının karşılaştırılması (45).

Plasental bariyer (membran) maternal kanı fetal kandan ayırır. Gebeliğin başlangıcında, plasental membranın dört tabakası vardır: sinsisyotrofoblast, sitotrofoblast, bağ dokusu ve fetal kılcal damarların endoteli. Bağ dokusu içerisinde ise mezenkimal hücreler, retiküler hücreler, miyofibroblastlar, düz kas hücreleri ve Hofbauer hücrelerini içeren çeşitli hücre tipleri tanımlanmıştır. Gebeliğin geç döneminde ise plasental membranda yalnızca iki tabaka bulunur: sinsisyotrofoblast ve fetal kılcal damarların endoteli. Şekil 2.10.'da 1. trimestere ve terme ait plasental bariyerler şematik olarak gösterilmiştir (36).



Şekil 2.10. Plasental bariyer yapısı A) 1. Trimester villus yapısı, B) Term villus yapısı (47).

Fetal lobüller (villöz ağaç) koryonik plaktan kalın bir kök villus oluşumu ile meydana gelir. Dallanmaya devam eden bu villuslar sonunda intervillöz aralıkta serbestçe yüzen villuslar halini alır. Birkaç dal trofoblastik hücre sütunlarını içeren tutundurucu villusları oluşturur. Bu villuslar sayesinde bazal plaka ile temas sağlanır. Serbestçe yüzen villuslar temelde stromal karakterlerine, damar yapılarına, görünümüne vb. özelliklerine göre çeşitlere ayrılır (37).

Mezenkimal villuslar gebeliğin en erken aşamalarında görülür (48). Gelişmekte olan plasentada menstruasyon sonrası 6 haftalık döneme kadar tek villus tipidir. 1. Trimester sonrası ise sayılarında azalma olur. Stromalarında çok sayıda mezenkimal hücreler ve gelişmekte olan damarlar bulunur.

Olgunlaşmamış ara villuslar mezenkimal villusların farklanmasıyla ortaya çıkar. Gebeliğin 8-22. haftaları arasında görülür. Villusların uzun eksenlerine paralel matriks içermeyen kanal benzeri boşluklar tarafından oluşturulan ve retiküler yapıda karakteristik stromaları vardır. Bol miktarda Hofbauer hücreleri bulunur. Aynı zamanda küçük arteriyoller, venüller ve kılcal damarlar içerir. Gebeliğin ortasından itibaren mezenkimal villuslar gibi sayıları azalır (37).

Kök villuslar, olgunlaşmamış ara villusların farklılaşmasından meydana gelir. En büyük çaplı villuslardır. Yoğun bir lifli stromaları sayesinde villöz ağaca mekanik

destek sağlarlar. Merkezi olarak yerleşim gösteren arterleri ve venleri ile karakterizedir. Kılcal damarlar ise az sayıdadır (49).

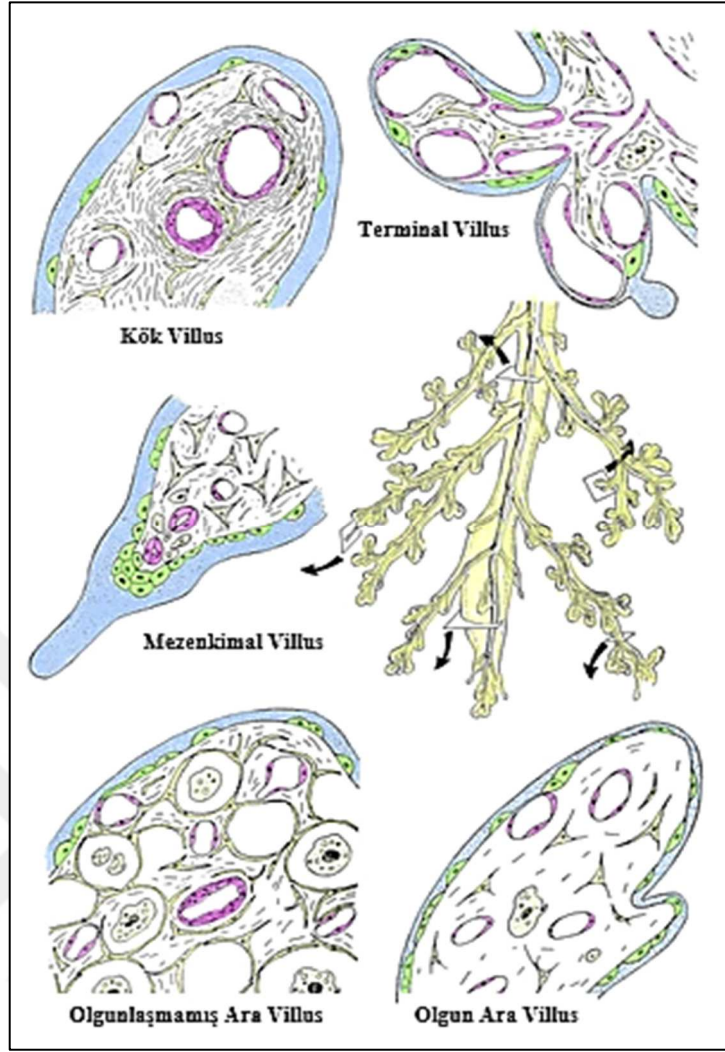
Olgun ara villuslar gebeliğin ortasından itibaren ortaya çıkar ve mezenkimal villuslardan farklıdır. Hafifçe kıvrımlı olan olgun ara villuslar bazı bölgelerde terminal villuslara dönüşür. Birkaç küçük periferik damar ve kılcal damar içeren gevşek bir stromaya sahiptir.

Terminal villuslar ise villöz ağaçların son dallarıdır. En önemli özelliklerinden biri yüksek derecede kılcallaşmalarıdır. Enine kesitlerde toplam villöz kesit alanının %50'sinden fazlasını kaplar. Oldukça genişlemiş sinüzoidleri ve ince vaskülosinsiyal mebranları bulunur (23,37). Tablo 2.1.'de villus tipleri karakteristik özellikleri ile birlikte özetlenmiştir.

Tablo 2.1. Villus tipleri ve karakteristik özellikleri (38).

Villus tipi	Görülme zamanı	Maksimum görüldüğü zaman	Termde görülme yüzdesi	Boyut	Karakteristik özellikleri
Mezenkimal villus	5 hafta-term	0-8 hafta	%1'den az	120-250 μm (8 haftadan az) 60-100 μm (8 haftadan fazla)	Primitif stroma, kalın trofoblastik tabaka, birkaç damar
Olgunlaşmamış ara villus	8 hafta-term	14-20 hafta	%5-10	100-200 μm (400 μm ye kadar olabilir)	Retiküler stroma
Kök villus	12 hafta-term	term	%20-25	150-300 μm	Fibrotik stroma, miyofibroblastik perivasküler kılıf, büyük damarlar
Olgun ara villus	3. trimester	3. trimester	%25	80-150 μm	%50'den az kapiller içeren hücreli stroma
Terminal villus	3. trimester	term	%25	60 μm	%50'den fazla kapiller

Özetle, erken primitif villuslardan adım adım villöz ağaç oluşur. Bir kök villus 3-5 adet olgun ara villusa, bunlar ise 10-12 adet terminal villuslara dallanır (23).



Şekil 2.11. Villus tiplerinin şematik gösterimi (38).

2.6.4. Plasental Dolaşım

Hem anne hem de fetüs placentaya dolaşımına katkıda bulunur. Fetal kan plasentaya 2 umbilikal arter ile ulaşır. Bu arterlerden küçük dallar koryonik villuslara girer ve maternal kan ile madde alışverişi yapılan terminal dallarda kılcal damarlara ayrılır. Buradan kan venöz dallardan umbilikal ven aracılığıyla fetüse ilerler. Plasentaya yeterli maternal kan akışı, fetüsün büyümesi ve gelişmesi için hayati önem taşır (22).

2.6.5. Plasentanın Endokrin Fonksiyonları

Plasentada özellikle sinsisyotrofoblast hücreleri hem protein hem de steroid hormonlar üretirler. Bunlar:

1. İnsan koryonik gonadotropin (hCG), korpus luteum tarafından progesteron üretimini uyaran bir glikoprotein hormondur. İmplantasyondan önce bile hCG sentezi ile, bu hormonun maternal idrarda varlığı hamilelik için yaygın olarak kullanılan testlerin temelini oluşturur. Üretilen hCG, gebeliğin yaklaşık 8. haftasında zirve yapar ve daha sonra yavaş yavaş azalır. 1. Trimester sonunda hCG sentezini tamamen plasenta üstlenir.

2. İnsan plasental laktojen (hPL), lipolizi indükleyen (annede serbest yağ asidi seviyelerini yükselten) ve insülin sekresyonunu inhibe eden (gestasyonel diyabette rol oynayan) bir protein hormondur. Bu hormon “fetüsün büyüme hormonu” olarak kabul edilir.

3. Estron, estradiol ve estriol plasenta tarafından üretilen steroid hormonlardır, ancak anne veya fetüsteki spesifik fonksiyonları hakkında bilgiler kısıtlıdır.

4. Anneyi etkileyen plasental hormonlardan bir diğeri insan plasental büyüme hormonudur. Hipofiz büyüme hormonundan 13 amino asit ile farklı olan bu hormon, sinsisyotrofoblastlar tarafından üretilir. Plasental büyüme hormonu fetal serumda tespit edilemez, ancak plasentanın büyümesini parakrin bir şekilde etkilediği düşünülmektedir (22).

2.6.6. Plasental Hastalıklar

a. Velamentöz plasenta fetal kan damarları, plasentaya ulaşmadan önce amniyokoryonik membrandan anormal bir şekilde geçtiği zaman meydana gelir. Vasa previa'da fetal kan damarlarından biri gebelik veya doğum sırasında yırtılırsa, fetüs ölebilir.

b. Sirkumvallat plasenta, plasentanın fetal yüzeyi üzerindeki amniyonun periferik, fincan şeklinde bağlanmasıdır.

c. İki (bipartite) veya üç taraflı (tripartite) plasenta, iki veya üç bağlı lobdan oluşan bir plasentadır.

d. Dupleks veya tripleks plasenta, iki veya üç ayrı lobdan oluşan bir plasentadır.

e. Aksesuar (succenturiate) plasenta, ana plasentadan tamamen ayrı küçük aksesuar loblardan oluşan bir plasentadır.

f. Membranöz plasenta, uterus boşluğunun büyük bir bölümünü oluşturan ince bir plasentadır.

g. Plasenta previa, plasenta uterusun alt kısmına yapıştığında ve iç servikal os'u kapladığında ortaya çıkar.

h. Plasental abrupsiyon, normal olarak implante edilen bir plasentanın fetüsün doğumundan önce uterustan erken ayrıldığında ortaya çıkar. Maternal hipertansiyon ile ilişkilidir.

i. Plasental akreata, koryonik villusun uterus duvarına anormal bir şekilde yapışması durumunda, desidua bazalisin kısmi veya tam yokluğu ile ortaya çıkar.

j. Plasenta perkreata, koryonik villusun perimetriyuma ulaşmak için miyometriyuma penetre olduğunda ortaya çıkar (36).

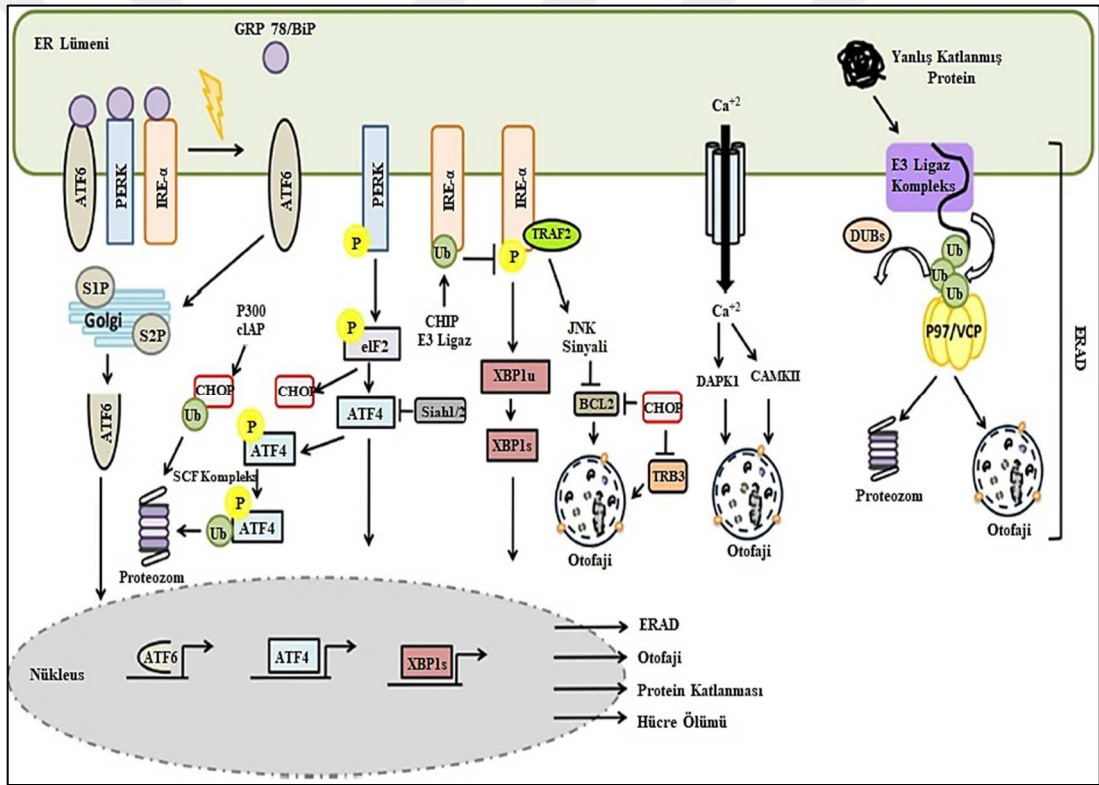
k. Koryokarsinomlar embriyonik sitotrofoblast ve sinsisyotrofoblast hücrelerinden türemiş malign tümörlerdir. Bu tümörler maternal desidual dokulara ve kan damarlarına oldukça invaziv özelliktedir (22).

l. Preeklampsi gebeliğin 20. haftasından sonra artan kan basıncı ve proteinüri ile teşhis edilir. Gebeliklerin %10'una kadar görülebilir ve ilk gebeliği olan annelerde daha sık görülür. Plasentanın hipoksik hale gelmesi ve anneden bağışıklık tepkisi başlatması sonucu ortaya çıkabilir. Bebeğin doğumu ve plasentanın alınması tek tedavi yoludur (50).

m. Plasental yetersizlik ve IUGR, plasentanın fetüse gerekli besinleri sağlayamadığı koşullarda ortaya çıkar. Alkol, uyuşturucu ve sigara kullanımı, preeklampsi, uzun süreli yüksek tansiyon, enfeksiyonlar, diyabet, böbrek fonksiyon bozuklukları veya Rh uyumsuzluğu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (51).

2.7. Ubikütin Proteozom Sistemi (UPS)

Ökaryotik hücrelerde proteinlerin yıkılmasında rol oynayan temelde iki yolak bulunmaktadır. Otofaji olarak adlandırılan lizozomal yıkım, hücrelerin yaşlanmış veya bozulmuş organellerine karşı ve hücre tarafından alınan hücre dışı proteinlere yönelik olarak gerçekleşir. Ubikütin proteozom sistemi (UPS) ise çekirdekte ve sitoplazmada bulunan proteinlerin yıkımından sorumlu, protein homeostazını sağlayan diğer bir yolaktır (52). UPS protein kalite kontrolünün yanı sıra; transkripsiyon, hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre stres yanıtı ve apoptoz gibi çeşitli hücresel işlemlerin düzenlenmesinde de rol oynar. Stres durumunda UPS ve otofaji arasında doğrudan ve dolaylı etkileşimlerin olduğu öne sürülmektedir (53).



Şekil 2.12. UPS ve otofaji arasındaki etkileşimler (53).

UPS, kısa ömürlü proteinlerin ve çözünür yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasından sorumluyken, otofaji uzun ömürlü proteinleri, çözünmeyen protein agregatlarını ve hatta mitokondriyon, peroksizom gibi tüm organelleri ve hücre içi parazitleri ortadan kaldırır (53).

UPS'de proteinler 76 aminoasitlik bir polipeptit olan ubikütün molekülleriyle modifiye edilir. Proteinlere ubikütün zincirlerinin eklenmesi (ubikütinlenme, ubikütinasyon) E1 (aktifleştirici), E2 (konjuge edici) ve E3 (ligaz) enzimleri ile gerçekleşir. Bu reseptörler aracılığıyla ubikütinlenmiş proteinler 26S proteozom tarafından tanınabilir ve yıkılabilirler. Aynı zamanda ubikütün molekülleri yeniden kullanılmak üzere geri dönüştürülür (54).

Bu enzimler arasında E3 kritik öneme sahiptir. Çünkü bu enzim yıkılacak proteini tanır ve ubikütini o hedef proteine özel yıkım için yönlendirir (55). Poliubikütinlenmiş proteinler daha sonra ATP-bağımlı bağlanma basamağında 19S düzenleyici partikül tarafından tanınır. 26S proteozom kompleksine girdikten sonra aminoasitlere ve küçük peptitlere ayrıştırılır (56).

2.8. UPS'nin Hastalıklardaki Rolü

UPS hücre fizyolojisi ve sağ kalım için oldukça önemlidir. Belli koşullarda UPS bileşenlerinden bir kısmının inhibe edildiği durumlarda, işlev bozukluklarının olduğu ve homeostatik dengesizlik sonucu hücre ölümünün meydana geldiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (57). Bunun en karakteristik örnekleri proteozom fonksiyonlarında bozuklukların meydana geldiği Alzheimer ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, bu hastalıklara özgü materyaller birikim göstermektedir (10,58). Protein katabolizması indüksiyonunun, yaşa bağlı görülen bu hastalıklara karşı güçlü bir savunma veya terapötik strateji oluşturabileceği öne sürülmektedir (58).

Kanser hücrelerinde proteazom aktivitesi yüksek seviyededir (59). Bu özellikleri proliferasyon oranlarının artışı, hücre içi gelişmiş oksidatif stres seviyeleri (60) proteozom yapı ve fonksiyonunu etkileyen büyüme faktörlerine sürekli maruz kalmaları gibi durumlarla bağlantılı olduğu düşünülmektedir (61,62).

Hsc-70 ile etkileşen protein (CHIP), şaperon ve proteazom sistemlerini birbirine bağlar ve sitoplazmada protein homeostazının korunmasında önemli bir rol oynar. CHIP, çeşitli onkogenik substrat proteinlerinin ubikütinasyonunu ve yıkımını indükler

ve bu nedenle tümör oluşumunun ilerlemesine yol açar. CHIP'nin üçlü negatif meme kanseri hücrelerindeki proliferasyonu ve invazyonu azalttığı izlenmiştir (63).

UPS bozukluğu sadece hastalıklarla değil, aynı zamanda yaşlanma ve oksidatif stres gibi doğal olarak ortaya çıkan durumlarla da bağlantılıdır (64,65).

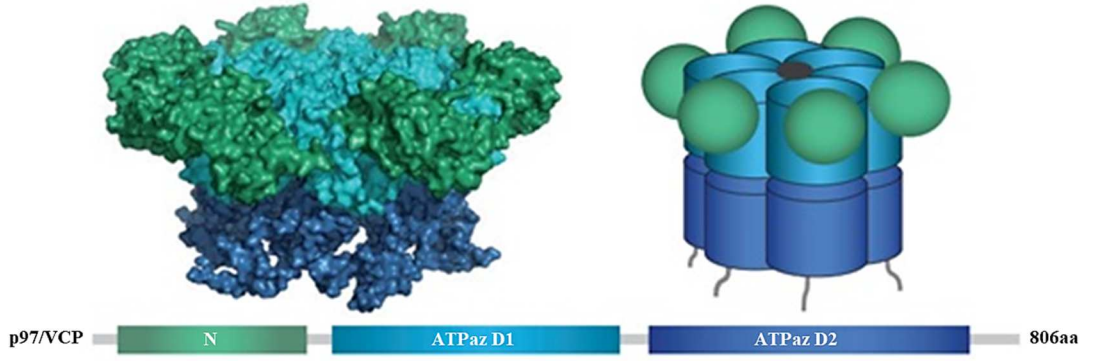
Buna ek olarak pluripotent kök hücre sağ kalımı ve motor nöron farklılaşmasında UPS'nin önemli düzenleyici rollerinin bulunduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (66).

2.9. p97/VCP (p97/Valosin-İçeren Protein)

p97/VCP (Valosin-Containing Protein: Valosin-İçeren Protein) ATPaz ailesine ait olup birçok hücresel işlemin düzenlenmesinden sorumlu bir proteindir. UPS ve otofaji gibi protein kalite kontrol mekanizmaları dahil olmak üzere protein homeostazının korunmasında temel fonksiyonlara sahiptir (67). p97/VCP'nin hücresel yollardaki işlevleri, substratları tanıma ve işlemede yer alan farklı kofaktörlerle olan bağlantıları ile düzenlenir (68,69).

p97/VCP UPS'de ubiküitinlenmiş proteinlerin 26S proteazoma taşınarak yıkımlarında bir şaperon protein olarak görev yapar (70). Aynı zamanda otofajide otofagozom maturasyonu basamağında rol oynamaktadır (71).

p97/VCP yapısal olarak halka benzeri bir hekzamer oluşturur. Hekzamerin her monomeri düzinelerce kofaktör içeren bir N-terminal, D1 ve D2 olarak adlandırılan iki ATPaz ve C-terminal kuyruk bölgelerini içerir (72). p97/VCP'nin şematik yapısı Şekil 2.13.'te gösterilmektedir.



Şekil 2.13. p97/VCP'nin şematik yapısı (72).

Her iki ATPaz alanında Walker A ve Walker B motifleri bulunur. Bu motifler daha yüksek ATPaz aktivitesine sahip olan D2'nin ATP'ye bağlanma ve hidroliz etme yeteneği kazanmasını sağlar. N-terminal bölgesi adaptör proteinler ile etkileşime aracılık eder. D1 ise N-terminal bölgesinin yapısını kontrol eden ve hekzamer oluşumunu destekleyen bir bölgedir (73,74).

Yapılan klinik çalışmalarda, yüksek p97/VCP ekspresyonu ile özofagus karsinomu (75), kolorektal karsinomu (76) ve prostat kanserinin (77) ilerlemesi, prognozu ve metastaz potansiyeli arasında bir korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

2016 yılında yapılan bir çalışmada ise p97/VCP'nin STAT3 sinyal aktivasyonu yoluyla kolorektal kanserinin büyümesini, invazyonunu ve metastazını desteklediği gösterilmiştir (78). Aynı zamanda p97/VCP'nin kanser hücrelerinde aktin ile ilişkili migrasyon özelliklerini değiştirerek anormal migrasyonlarını tetiklediği öne sürülmüştür (15).

p97/VCP'nin D2 ATPaz alanının birkaç inhibitörü mevcuttur. Son zamanlarda tanımlanmış en çok kullanılan inhibitörler DBEq, NMS-873 ve MSC1094308'dir (79,80). Bu inhibitörler kullanılarak p97/VCP'nin hedeflenmesiyle kanser, nörodejeneratif hastalık ve protein katlanma bozuklukları gibi durumlardaki terapötik potansiyelini değerlendirmek mümkün olacaktır (81).

NMS-873 inhibitör uygulaması ile yapılan bir çalışmada androjen bağımlı prostat kanseri hücre hatlarında proliferasyon, invazyon ve migrasyon özelliklerini azalttığı görülmüştür (82).

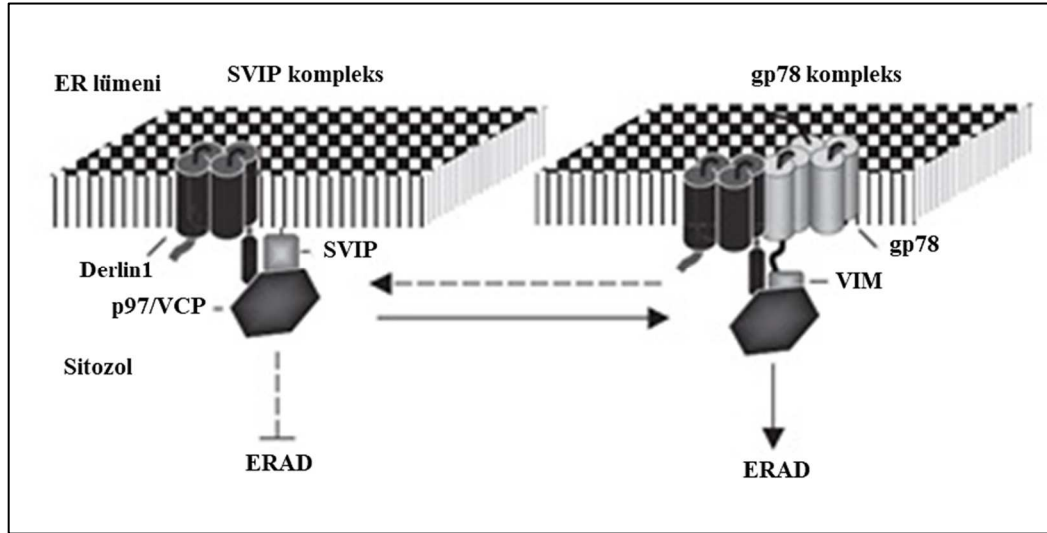
p97/VCP inhibitörlerinden DBeQ (N^2, N^4 -dibenzylquinazoline-2,4-diamine) ise 2011 yılında keşfedilmiştir (83). Hücre hatlarının (MRC-5, Hek293, HeLa ve RPMI8226) DBeQ ve NMS-873 ile inkübasyonu, Katlanmamış Protein Tepkisi (UPR) aktivasyonuna ve hücre ölümüne yol açtığı görülmüştür. Aynı zamanda otofajide ve otofagozom birikiminde bozukluklara sebep olduğu gözlenmiştir (83,84).

DBeQ ile yapılan diğer bir çalışmada ise fare kökenli Sertoli hücre hatlarında DBeQ uygulaması sonrası sitoplazmada vakuol oluşumları gözlenmiştir. Aynı zamanda otofagozomal LC3II ve p62 proteinlerinde birikim meydana gelmiştir (85).

2.10. SVIP (Küçük VCP ile Etkileşen Protein)

SVIP (Small VCP-Interacting Protein: Küçük VCP ile Etkileşen Protein) 76 aminoasitten oluşan ve p97/VCP'ye direk bağlanabilen bir adaptör proteindir (12).

SVIP, ER membranının sitozolik yüzeyinde lokalizedir. SVIP'in, ERAD'dan sorumlu olan kompleksin inhibitörü olduğu bilinmektedir. Bu inhibitör görevini ER proteinlerinden gp78-p97/VCP-Derlin1 kompleksinin yapısını bloke ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (86).



Şekil 2.14. SVIP ile ERAD'ın düzenlendiği öne sürülen model (86).

SVIP'in fare serebrum ve serebellumunda yüksek oranda eksprese edildiği; kalp, akciğer, iskelet kası ve ince bağırsakta da normal seviyelerdeki ekspresyonları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (87).

2017 yılında yapılan bir çalışmada prostat kanser hücrelerinde SVIP ekspresyonlarının androjenlerce baskılandığı gösterilerek bu proteinin prostat kanserindeki önemi vurgulanmıştır (14). Prostat kanserine benzer bir mekanizma ile glioma (beyin tümörü) hastalarında androjenlerce SVIP protein ekspresyonlarının baskılandığı ve glioma tedavisinde bu proteinin kullanılabileceği önerilmiştir (88).

SVIP'in bu fonksiyonlarına ek olarak otofajiyi aktive ettiği ve hepatositleri koruyarak CCl₄'ün neden olduğu karaciğer fibrozunu hafifletebileceği öne sürülmüştür (89). Yapılan başka bir çalışmada ise SVIP'de meydana gelen epigenetik kaybın, kanser hücrelerinde metabolik yeniden programlamayı indükleyebildiği bildirilmiştir (90).

SVIP ile yapılan bu zamana kadarki son çalışmada ise SVIP'in testis Leydig hücrelerindeki steroidogeneizde STAR proteini ile birlikte düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir (91).

2.11. LC3II (Mikrotübülle İlişkili Protein 1 Hafif Zinciri 3 Beta)

LC3II (Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta: Mikrotübülle İlişkili Protein 1 Hafif Zinciri 3 Beta) otofaji ile ilişkili bir proteindir. Otofagozom oluşumunda görev alır (92).

Otofaji sırasında LC3'ün karboksi terminali, sitoplazmik LC3I (serbest form) üretmek için hızla bölünür. LC3I'e lipid eklenmesi sonucu LC3II (fosfatidiletanolamin konjuge formu) oluşur. Böylece LC3 otofajik veziküllere bağlanmış olur. Otofagozomlarda LC3'nin yanı sıra LC3II'nin varlığı otofajinin ayırt edici bir özelliğidir (93,94).

2.12. SQSTM1/p62 (Ubikütün Bağlayıcı Protein p62)

p62 (Ubiquitin-Binding Protein p62: Ubikütün Bağlayıcı Protein p62) seçici bir otofaji substrat görevi görür (44). p62, C-terminal UBA bölgesiyle ubikütine ve LC3-etkileşimli bölge (LIR) aracılığıyla LC3II'ye bağlanır (95).

p62 aynı zamanda UPS ve otofaji arasındaki bağlantının kurulmasında da görevlidir. Örneğin protein agregatlarının birikmesi p62'nin up regüle olmasına neden olur. UPS negatif yönde etkilenir ve otofaji indüklenir (96).

Yapılan bir çalışmada LC3II ve p62 kompleks yapısının düzenlenmesi ve kanserlerde görülen otofaji aktivitesi arasında ilişki olduğu ileri sürülmektedir (92).

Bu çalışmaya konu olan UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP'in her üç trimestere ait insan plasentadaki ekspresyon düzeyleri ve özellikle de ilk trimesterdeki plasantasyon sırasında ekstrasvillöz trofoblastların invazyon ve migrasyonundaki rolleri ile ilgili araştırmalar henüz yapılmamıştır. Literatürde bu eksikliklerin tamamlanması ve plasental patogeneizde yer alan moleküler mekanizmaları aydınlatmak adına bu proje planlanmıştır. Bu proteinlerin önemleri ve fonksiyonel özellikleri tanımlandığında, gelecekte plasenta ile ilişkili obstetrik hastalıklarda kullanım potansiyelleri de olabilecektir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Plasenta Doku Örnekleri

İnsan plasenta örnekleri ile deneylerin yapılabilmesi için gerekli olan “Etik Kurul Belgesi” Lokman Hekim Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’ndan 30.01.2019 tarihinde alınmıştır (Kabul No: 2018001).

Gebeliğin üç farklı trimesterine ait; 1. trimester (1-12 hafta, n=10), 2. trimester (13-28 hafta, n=10) ve 3. trimester (29-40 hafta, n=10) gelişim evrelerinden insan plasenta örnekleri alındı. Örneklerin alınmasında yaş aralığı 15-49 olan sağlıklı gebeler seçildi (97). Önceden tanısı konulmuş preeklampsisi, gestasyonel diyabeti ve fetal anomalisi olan hasta gebelerden plasenta örnekleri alınmadı. Aynı zamanda intrauterin ölüm olguları ve çoğul gebelikler çalışma dışı bırakılmıştır.

3.1.2. Hücre Hatları

In vitro çalışmalarda insan plasenta dokusuna ait HTR-8/SVneo (ATCC® CRL-3271™) ekstrasvillöz trofoblast hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatları gebeliğin 1. trimesterine (6-12 hafta) ait olup adherent (yapışkan) özelliktedir.

3.1.3. Antikorlar

İnsan plasenta dokuları ve hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen immünolojik boyama yöntemlerinde ve Western Blot analizlerinde uygun primer ve sekonder antikorlar seçilmiştir. Deneylerde kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları Tablo 3.1.’de sunulmaktadır.

Tablo 3.1. Primer ve sekonder antikorlar.

İmmünohistokimya	İmmünofloresan	Western Blot
p97/VCP (Abcam, ab11433, 1:5000) SVIP (Sigma-Aldrich, HPA039807, 1:200) p62/SQSTM1 (Abnova, H00008878-M01, 1:2000) LC3II (Novus, NB100-2220, 1:5000) mIgG (1:1000) rIgG (1:2000)		p97/VCP (Abcam, ab11433, 1:2000)
		SVIP (Sigma-Aldrich, HPA039807, 1:500)
		p62/SQSTM1 (Abnova, H00008878, 1:1000)
		LC3II (Novus, NB100-2220, 1:1000)
		β -aktin (Biovision, 3598R-100, 1:1000)
		Goat pAb to Ms (Abcam, ab97023, 1:1000)
Poly-Hrp-anti Ms/Rb/Rt (ImmunoLogic, 030717)	Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 488	Goat pAb to Rb (Abcam, ab97069, 1:1000)

3.1.4. Primerler

Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) analizlerinde kullanılan primerler, Primer Blast online programı kullanılarak tasarlanmıştır. Kullanılan primerlerin baz dizilimleri Tablo 3.2.'de verilmiştir. Analizlerde PSMD4 (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 4) ve YWHAZ (Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta) genleri referans olarak kullanılmıştır.

Tablo 3.2. Primer dizileri.

Gen adı	Primer Dizisi (5'-3')
p97/VCP	F- GATGACACAGTGGAAGGCATTA R- AACAAATGCAATAAGGGCTAGGA
SVIP	F- GAGGCTGCAGAGAGAAGACA R- AGCCCACTTGATTGCAGATAA
LC3II	F- GGCTGAGGAGATACAAGGGA R- GGTTGGATGCTGCTCTCGAA
p62	F- GTGAACTCCAGTCCCTACAGATG R- TCCGATGTCATAGTTCTTGGTCT
PSMD4 (Referans 1)	F- GGCAAGATCACCTTCTGCAC R- CTTCCCACAAAGGCAATGAT
YWHAZ (Referans 2)	F- CTGGCCCTCAACTTCTCTGT R- AATGGCTTCATCGAAAGCTG

3.1.5. İnhibitör ve siRNA'ler

Hücre hatları üzerinde bir p97/VCP inhibitörü olan DBeQ (N2,N4-dibenzylquinazoline-2,4-diamine) (Sigma-Aldrich, SML0031) uygulaması yapılmıştır. Kontrol gruplarına ise, DBeQ dilüsyonlarında da kullanılan DMSO (Dimethyl Sulfoxide) (Merck, CAS 67-68-5) aynı oranlarda eklenmiştir.

Aynı zamanda hücrelerdeki p97/VCP ve SVIP gen ekspresyonlarını baskılamak amacıyla siRNA'ler ile transfeksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Kullanılan siRNA'ler Tablo 3.3.'te sıralanmıştır. Kontrol olarak ise kontrol siRNA (Qiagen, 1027281) kullanılmıştır.

Tablo 3.3. siRNA'ler.

p97/VCP siRNA'ler (Qiagen, GS7415)	SVIP siRNA'ler (Qiagen, GS258010)
SI04350444	SI04714038
SI03149657	SI04714031
SI03138611	SI04709544
SI00759535	SI04709537

3.1.6. Mikroskoplar

Deney aşamalarında kullanılan mikroskop çeşitleri ve markaları aşağıdaki tabloda sıralanmıştır.

Tablo 3.4. Mikroskop çeşitleri ve markaları.

Mikroskop Çeşitleri	Markaları
Işık Mikroskop	Olympus, BX43
Floresan Mikroskop	Leica, DM5000B
Ters Işık Mikroskobu (Inverted)	Olympus, IX73
SEM	Hitachi, SU5000

3.2. Yöntemler

3.2.1. Işık Mikroskopik Doku Takip Yöntemi

Gebeliğin 1. trimesterine ait plasentalar, isteğe bağlı ve yasal olarak sonlandırılmış normal seyirli gebeliklerin kürtaj dokularından elde edildi. Diğer trimesterlere ait plasentalar ise sezaryen operasyonlar sonrası alındı. Plasentaların bazalinde bulunan fetal yüzden, membranların ayrılması sonucu, 1 cm kalınlığında alınan doku örnekleri uygun koşullarda saklandı. Histolojik takiplerde plasenta örneklerinin bir kısmı parafin blok elde etmek için tespit işleminde %10'luk formaline (Merck, 104002) ve diğer kısmı ise hiçbir işleme maruz bırakılmadan protein ve gen düzeyindeki araştırmalar için -80 °C'lik buzdolabında saklandı. Tespit işlemi için

yaklaşık 48 saat bekletilen doku örnekleri 2-3 saat akarsu altında yıkandıktan sonra sırasıyla %75, %96, %100'lük etil alkollerden (Merck, 159010) geçirildi ve dehidratasyon işlemi tamamlandı. Saydamlaştırma işlemi ksilol (Sigma-Aldrich, 108298) ile yapıldı. Parafine (Merck, 107337) gömülen doku örneklerinden mikrotom (Leica, RM2255) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.2.2. Hücre Kültürü

HTR-8/SVneo hücre hatlarının çoğaltılması için L-Glutamine ilave edilmiş RPMI medyum 1640 (1x) (Gibco, 21875-034) kullanıldı. Medyum içerisine ayrıca 5 ml Sodyum Piruvat (Gibco, 11360-070), 6,4 ml glikoz solüsyonu (Gibco, A24940-01) ve 5 ml HEPES (Gibco, 15630056) eklendi. Medyum içerisine kullanılan tekniğe uygun olarak %10'luk Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco, 10270-106) ve Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep) (Gibco, 15140-122) eklendi. Hücre hatları 75 cm²'lik flasklarda, 37 °C ve %5 CO₂ inkübatör içerisinde çoğaltıldı.

Flask yüzeyini kaplayarak konfluensiye ulaşmış hücreler önce Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS) (Capricorn Scientific, PBS-1A), ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 2 ml Tripsin-EDTA (%0,25) (Gibco, 25200-056) eklendikten sonra 3 dk inkübatörde bekletilip flasktan kaldırıldı. Hücrelerin pasajlama işlemi için 6 ml medyum eklenip süspanse edildikten sonra, 1 ml alınarak yeni bir 75 cm²'lik flaska ekim yapıldı. Üzerine 11 ml medyum eklenerek yeniden çoğaltılmaları sağlandı.

3.2.3. Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama

Yöntemleri

İnsan plasentası kesitlerinin ve hücrelerin ışık mikroskobunda incelenebilmesi için öncelikle Hematoksilen-Eozin boyamalar yapılmıştır. Lam üzerine alınan doku kesitleri öncelikle 60°C etüvde 1 gece bekletildi. Sonra sırasıyla; 30 dk ksilol, her biri 2 dk %100, %96 ve %75'lik etil alkollerden geçirildikten sonra distile suya alındı. Hematoksilen (Sigma-Aldrich, 105174) ile 5 dk ve Eozin (Sigma-Aldrich, 109844) ile 1 dk boyandı. Suda yıkama işlemlerinden sonra artan alkol serilerinden geçirilen lamlar en son ksilolde bekletilip entellanla kapatıldı. Hücreleri boyamak için petriler içerisine yerleştirilen lamların üzerine ekimler yapıldı. Lam üzerine yapışan hücreler

distile su ile yıkandıktan sonra %10'luk formalinde 10 dk bekletildi. Azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra diğer basamaklara aynı şekilde devam edildi.

Dokularda değişik karbonhidrat gruplarını boyamak amacıyla Periyodik Asit Schiff (PAS) yöntemi uygulandı. Bu yöntem için PAS boyama kiti (MOSLAB, BKPS00001) kullanıldı. Alınan kesitler deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemleri sonrası solüsyon A (Periyodik Asit)'de 5 dk, solüsyon B (Schiff)'de 20 dk ve solüsyon C (Mayer's Hematoksilen)'de 5 dk bekletildi. Artan alkol serilerinden sonra 30 dk ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.

3.2.4. İmmünolojik Boyama Yöntemleri

3.2.4.1. İmmünohistokimyasal Boyama

Farklı trimesterlere ait insan plasentası örneklerinde p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 lokalizasyonlarını belirlemek amacıyla uygulandı. Doku bloklarından adhezyon özellikli lamalar üzerine 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve 37°C etüvde 1 gece bekletildi. Deparafinizasyon için örnekler önce beşer dakika 2 farklı ksilole alındı. Ardından sırasıyla %100, %96 ve %70 etil alkol serilerinden geçirildi. Antijen retrieval için 10mM Trisodyum sitrat dihidrat solüsyonu (pH: 6.0) içerisinde mikrodalgada 3 dk yüksek derecede ve ardından 10 dk en düşük derecede kaynatıldı. PBS ile yıkama işleminden sonra, kesitler karanlık ortamda %0,3 H₂O₂/PBS içerisinde 10 dk bekletildi. Yıkama işleminden sonra, oda ısısında 1 saat %5 Sığır Serum Albumin (BSA)/PBS ile spesifik olmayan bağlanmalar bloklandı. Doku kesitleri belirli dilüsyon oranlarında gece boyu primer antikor ile muamele edildi. Negatif kontroller için fare ve tavşan kökenli immünglobülin G (IgG)'ler kullanıldı. İkinci gün kesitlere yıkama işleminden sonra sekonder antikorlar uygulandı. DAB bright substrat kiti (ImmunoLogic, 170804) ile reaksiyon görünür hale getirildi. Ardından çekirdek boyanması için Mayer's Hematoksilen (Merck, 109249) kullanıldı. Kesitler artan alkol serileri ve ardından ksilolden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.2.4.2. İmmünofloresan Boyama

Doku kesitleri için ilk gün normal immünohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı. Hücre hatları üzerinde immünofloresan boyama için ise 24 kuyucuklu hücre plağı kullanıldı. Lamellerin üzerinde çoğaltılan hücre hatlarında fiksasyon için öncelikle %4 paraformaldehit (PFA) eklendi ve 15 dk bekletildi. Ardından 15 dk PBST (PBS + %0,2 Triton X-100) ile permeabilize edildi. Bloklama 1 saat 30 dk PBST + %3 BSA ile yapıldı. Lameller lam üzerine yerleştirildi. Primer antikörler PBST + %1 BSA içerisinde hazırlandıktan sonra üzerlerine eklendi. Gece boyu +4°C’de bekletildi.

İkinci gün doku kesitleri ve hücre hatları preparatlarında fare kökenli antikörler için Alexa Fluor 647 ve tavşan kökenliler için Alexa Fluor 488 floresan özellikte sekonder antikörler kullanıldı. Oda ısısında 1 saat bekletilen lamalar PBS ile yıkandı. DAPI (1 mg/ml) damlatılıp 5 dk bekletildi. Kapatma medyumunu kullanılarak kapatma işlemi gerçekleştirildi.

3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemesi

İnsan plasenta dokuları tespit için %10’luk paraformaldehit (PFA) içine alındı ve 1 gece +4°C’de bekletildi. Distile su ile 1 dk çalkalandı. Sırasıyla %50, %75, %95 ve %100 lük etil alkolden geçirildikten sonra kritik nokta kurutucu cihazında (Leica EM, CPD300) kurutuldu. Dokuların üzeri altın kaplama cihazıyla (Leica EM, ACE200) kaplandıktan sonra SEM’de incelendi.

3.2.6. Western Blot Analizi

Plasental doku örneklerinde ve hücre hatlarında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 protein ekspresyonlarını saptamak için kullanıldı. Dokular soğuk havanda fiziksel olarak parçalanarak homojenize edildi. Üzerlerine hacimce dokuların 10 katı kadar olacak şekilde Lizis (RIPA) tampon çözeltisi (50 mM Tris-HCl pH:8.0, 150 mM NaCl, %1 Nonidet P-40 (NP-40)) eklendi. Hücrelerin üzerine inhibitör ve siRNA uygulamalar sonrasında aynı şekilde Lizis tampon çözeltisi eklendi ve kazıyıcı yardımıyla sıvı eppendorf tüplere toplandı. Hazırlanan hücre ekstraktları buz üzerinde ultrasonik homojenizatörden geçirildi. Santifüj (4°C, 14.000 RPM, 10 dk) sonrası süpernatanta örnek tamponu (10X) (%4 SDS, %10 2- merkaptoetanol, %20 gliserol,

%0,004 bromfenol mavisi, 0,125M Tris-HCl pH: 6.8) eklendi. Proteinler Dryblock cihazında 95°C’de 5 dk kaynatılarak denatüre edildi.

Örnekler yürütme tamponu (25mM Tris, 190 mM glisin, %0,1 SDS) içerisindeki hazır jellere (Thermo, NuPAGE™ %4-12 Bis-Tris Protein Gels, 1.5 mm) yüklendi ve elektroforez yöntemiyle (120V, 1 saat 40 dk) yürütüldü. Proteinlerin membranlara transferi ise yarı-kuru yöntem kullanılarak yapıldı. Bu işlem transfer tampon (25 mM Tris, 190 mM glisin, %0,1 SDS) içerisinde (200 mA, 1 saat 30 dk) gerçekleştirildi. Proteinler Ponceau çözeltisiyle kontrol amaçlı (%0,2 Ponceau S, %5 glasiyal asetik asit) boyandı. Spesifik olmayan bağlanmaları bloklamak için membran 1 saat bloklama tamponunda (%5 süt tozu, %0,1 Tween 20) bırakıldı. Membranlar primer antikorlar ile gece boyu +4°C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda yıkanıp, 1 saat sekonder antikor uygulaması yapıldı.

Membrandaki proteinlerin görüntülenmesi amacıyla kemilüminesans (BioVision, K820-500) reaktifi kullanıldı. Oluşan ışıma jel görüntüleme sisteminde (UVP-GelDoc-It2 310) izlendi.

3.2.7. Gen Analizleri

Cytoscape 3.8.2, birden fazla entegre veri setine erişim sağlayabilen, açık erişimli bir biyoinformatik yazılım platformudur. Bu çalışmada p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genleri arasında etkileşimlerin gösterilmesi amacıyla kullanılmıştır. Aynı zamanda bu genlerin, etkileşimde olduğu diğer genler ile olan ilişkileri de yapılan ağ analizleri sonrası değerlendirilmiştir. Genlerin birlikte ekspresyonları ve genler arası fiziksel etkileşimlerin gösterildiği ağ analizleri görselleştirilmiştir.

3.2.8. Hücre Canlılık ve Proliferasyon Analizi

Kullanılan HTR-8/SVneo hücre hatları üzerinde p97/VCP inhibitörü DBeQ’nun hücre canlılığı ve proliferasyonlarına etkisini gösterebilmek amacıyla analizler yapıldı. DBeQ’nun hücreler üzerindeki toksik etkisinin hangi konsantrasyon ve sürelerde görülüp görülmediğini belirlemek için Alamar Blue (Bio-Rad, BUF012B) hücre canlılık ve proliferasyon kiti kullanıldı. Kontrol amaçlı olarak hücre içermeyen

medyumlar kullanıldı. Dilüsyonlarda DMSO kullanıldı. Bu test için 96 kuyucuklu hücre plağında her kuyucuğa 1.000 hücre ekildi. 72 saat boyunca 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 0,3125 μ M ve 0,156 μ M DBeQ eklenerek Alamar Blue yardımıyla microplate okuyucu (BioTek, Synergy H1) ile ölçümler yapıldı.

3.2.9. siRNA Transfeksiyonu

HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP ve SVIP'in fonksiyonlarını belirlemek amacıyla hücrelerdeki gen ekspresyonlarının düşürülmesi, baskılanması (down regüle edilmesi) için geçici transfeksiyon yöntemi uygulanmıştır. Her iki gen için 4 farklı siRNA bir arada kullanıldı. Transfeksiyonda kullanılan materyaller şunlardır:

- 24 kuyucuklu hücre plağı
- X-tremeGENE HP DNA transfeksiyon reaktifi (Roche, 6366236001)
- Genlere ait siRNA'ler (10 μ M solüsyonlar), kontrol siRNA (20 μ M)
- FBS ve Pen-Strep içermeyen medyum

Transfeksiyonda X-tremeGENE HP DNA transfeksiyon reaktifi (μ l)'nin siRNA (μ g)'ye oranı 2,5:0,5 (40pmol) olacak şekilde kullanılmıştır. 75.000 HTR-8/SVneo hücreleri 40 pmol siRNA (2,5 μ l) ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon toplam 48 saat sonrasında sonlandırıldı. Aşamaları günlere göre aşağıda sıralanmıştır:

1. Gün: 500 μ l medyum içerisinde 75.000 hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu hücre plağına ekim yapıldı.

2. Gün: Eppendorf tüplerden biri siRNA'ler (p97/VCP ya da SVIP), diğeri ise kontrol siRNA için hazırlandı. İlk tüpe 46 μ l FBS ve Pen-Strep içermeyen transfeksiyon medyum ve 4 farklı siRNA'den 1'er μ l eklendi. Diğer tüpe 48 μ l transfeksiyon medyum ve 2 μ l kontrol siRNA eklendi. Her iki tüpün üzerine 47,5 μ l transfeksiyon medyum içerisinde 2,5 μ l reaktif eklendi. 15 dk oda ısısında bekletildikten sonra damla damla kuyucuktaki medyum üzerine eklendi.

3. Gün: Hücrelerin medyumları yenisi ile değiştirildi.

4. Gün: Medyumlar atıldıktan sonra PBS ile yıkandı ve hücreler 50 µl Tripsin-EDTA (%0,25) ile kaldırıldı. İnvazyon ve migrasyon analizleri için kaldırılan hücreler matrijellerin üzerine eklendi. Transfekte edilen bir grup hücre ise Western Blot, qRT-PCR yöntemlerinde kullanmak üzere -80°C’de saklandı.

3.2.10. RNA İzolasyonu, Komplementer DNA (cDNA) Sentezi ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

Her üç trimestere ait insan plasenta dokularında ve HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 gen ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde geleneksel PCR’den farklı olarak, DNA’nın çoğaltılması ile doğru orantılı olarak artan floresan sinyallerinin ölçülmesiyle kantitatif sonuçlar elde edilmektedir.

qRT-PCR için öncelikle doku ve hücrelerden RNA izolasyonu yapıldı. Toplam RNA elde edildikten sonra ise komplementer DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirildi.

Doku ve hücre lizatlarından toplam RNA izolasyonu için öncelikle parçalama (homojenizasyon) işlemi gerçekleştirildi. Bunun için hücre membranlarını parçalarken DNA veya RNA degradasyonlarını engellemek amacıyla tek kullanımlık QIAshredder (Qiagen, 79654) kullanılmıştır. QIAshredder, mikrosantrifüj spin kolon formatında bir biyopolimer parçalama sistemidir. Viskoziteyi azaltmak için doku ve hücre lizatlarını homojenleştirir. Homojenizasyon için plasentalardan 20 mg örnek kullanılmıştır. Kullanılacak hücrelerin sayısı ise 5×10^6 ’dan az olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlemi takiben toplam RNA izolasyonu için RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74104) kullanıldı. Kit içerisindeki bölümler aynen uygulandı. Örnekler üçlü tekrar çalışıldı. Toplam RNA izolasyonu için protokol basamakları aşağıda sıralanmıştır:

1. Doku ve hücre lizatları üzerlerine öncelikle 350 µl Buffer RLT lizis tamponu eklendi. Bu lizis tamponu 1000 µl Buffer RLT içinde 10 µl β-merkaptoetanol olacak şekilde hazırlandı. QIAshredder mor kolonlara eklenen örnekler 15.000 Relatif Santrifüj Kuvveti (RCF)’nde 3 dk santrifüj edildi.

2. Kolonlardan süpernatant kısımları alındıktan sonra RNA izolasyon kitinde bulunan pembe kolonlar üzerine eklendi. 350 µl %70'lik etanol ilave edildikten sonra 12.000 RCF'te 15 sn santrifüj edildi.

3. Kolonlara 350 µl Buffer RW1 yıkama tamponu eklendikten sonra tekrar 15 sn santrifüj edildi.

4. RNA saflaştırma sırasında DNaz ile yıkım RNase-Free DNase Set (Qiagen, 79254) ile gerçekleştirildi. Her bir kolonda 10 µl DNaz I solüsyonu ve dilüye etmek için 70 µl Buffer RDD kullanıldı. 15 dk inkübasyona bırakıldı.

5. İnkübasyon sonrası kolonlara 350 µl Buffer RW1 yıkama tamponu eklendikten sonra 15 sn santrifüj edildi.

6. Ardından 500 µl Buffer RPE yıkama tamponuyla sırasıyla 15 sn ve 2 dk santrifüj edildi. Son olarak 15.000 RCF'te 1 dk daha santrifüj gerçekleştirildi.

7. Kolonlar yeni eppendorflara alındıktan sonra üzerlerine 30 µl nükleaz içermeyen H₂O eklendi ve 14.000 RCF'te 1 dk santrifüj edildi. Elde edilen toplam RNA'lar -20 °C'de saklandı.

Bu protokol sonrası cDNA sentezi için elde edilen toplam RNA miktarı spektrofotometre (Thermo, ND-1000) ile ölçüldü. Örneklerden 1 µl cihaza eklendikten sonra 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm alınmıştır. OD_{260/280} değerleri 1,8-2,0 arasında olan toplam RNA'lar saf kabul edilmiştir. Toplam RNA miktarına (ng/µl) göre hesaplamalar sonucu cDNA sentezi yapıldı. Bu sentez için Tablo 3.5.'te verilen Promega protokolü uygulandı:

Tablo 3.5. Komplementer DNA (cDNA) sentez protokolü.

		Protokol	
Toplam RNA	1		
Rastgele Primerler, 20 ug (500 ng/μl, Promega, C118A)		2	500 ng/1 μg RNA
M-MLV Ters Transkriptaz 5x Reaksiyon Tamponu (Promega, M531A)		5	
dNTP karışımı, 10 mM (Thermo, 716198)		1,25	
Rekombinant Rnasin Ribonükleaz İnhibitörü (40u/μl, Promega, N251B)	40	0,625	25 birim
M-MLV Ters Transkriptaz (200u/μl, Promega, M170B)		1	200 birim
H ₂ O		0,925	
		25 μl	
1. 70 °C' de 5 dk (RNA ve Rastgele Primerler)		Thermocycler	
2. Buz üzerinde soğutma			
3. 37 °C' de 60 dk			
4. 4 °C bekleme			
5. 3x dilüye etme			

Ters transkripsiyon sonucu elde edilen cDNA'ler kullanılarak qRT-PCR analizleri gerçekleştirildi. Bu analizlerde 1 örnek için kullanılan reaktifler Tablo 3.6.'da verilmiştir.

Tablo 3.6. Reaksiyon karışımı.

Malzemeler	Hacim
cDNA (3x dilüye)	2,5 µl
SYBR Green I Master (Roche, 04707516001)	10 µl
Primer- Forw/Rev Karışımı (10 µl stok Forw primer+10 µl stok Rev primer+ 180µl H ₂ O)	2 µl
H ₂ O	5,5 µl
Toplam	20 µl

qRT-PCR analizlerinde Lightcycler 480 cihazı kullanılmıştır. Örnekler 96 kuyucuklu hücre plaklarında üçlü tekrar çalışıldı. qRT-PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.7.'de sıralanmıştır.

Tablo 3.7. Reaksiyon koşulları.

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü	Rampa Oranı (°C/sn)
Ön inkübasyon	95 °C	5 dk	1	4,4
Amplifikasyon	95 °C	15 sn	40	4,4
	60 °C	20 sn	40	2,2
	72 °C	20 sn	40	4,4
Erime eğrisi	95 °C	5 sn	1	4,4
	65 °C	1 dk	1	2,2
	95 °C	Devam	1	0,11
Soğutma	40 °C	10 sn	1	1,5

Analizler sonrası elde edilen nispi gen ekspresyon miktarları (RQ) $RQ=2^{-\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Buradaki $\Delta Ct=Ct_{\text{hedef gen}}-Ct_{\text{kontrol gen}}$ geometrik ortalamasıdır.

3.2.11. İnvazyon ve Migrasyon Testleri

Migrasyon testlerinin amacı; hücrelerin aralarındaki boşlukları kapatma potansiyellerinin değerlendirilmesidir. Bu test hücrelerin maruz kaldıkları ajanlara göre migrasyon hızlarının nasıl değiştiğini göstermek için kullanılır. İnvazyon testlerinde ise ekstraselüler matriksi taklit eden bir bileşik olan matrijel kullanılır. Bu testlerdeki amaç ise; hücrelerin çeşitli proteazlar salgılayarak ortamda bulunan matrijeli degrade ederek, matrijelin bir tarafından diğer tarafına geçip geçemediklerini ortaya çıkarmaktır. Bu amaç için hücreler FBS içermeyen medyum içerisine eklenir. Matrijelin diğer tarafında bulunan FBS içeren medyum ise hücreler için aktive edici bir ortam olarak kullanılmaktadır.

HTR-8/SVneo hücre hatları 1. trimester insan plasentasına ait olup koryonik villus eksplantlarından çoğaltılmıştır. İnvaziv özelliğe sahip bu hücreler üzerinde DBEq, p97VCP siRNA ve SVIP siRNA uygulamaları sonrası invazyon ve migrasyon özelliklerinin değişip değişmediğini gösterebilmek amacıyla manuel invazyon testi ve xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi) kullanılmıştır.

3.2.11.1. Matrijel Kaplama ve Manuel İnvazyon Testi

Manuel invazyon deneylerinde matrijel (Corning, 354277) kaplı 24 kuyucuklu hücre plakları için 8 µm porları bulunan insertler (Merck, MCEP24H48) kullanıldı. Aşağıda protokol aşamaları günlere göre sıralanmıştır:

1. Gün: Manuel invazyon testi için öncelikle kullanılacak insertler 100 µl matrijel ile kaplandı ve 37°C inkübatörde bekletildi. Matrijel dilüsyon oranları DBEq inhibisyon deneylerinde 10x, siRNA transfeksiyon deneylerinde ise 16x olacak şekilde kullanıldı. Dilüsyonlarda FBS içermeyen medyum kullanıldı.

2. Gün: 250 µl FBS içermeyen medyum içerisinde 50.000 hücre olacak şekilde insertlere ekim yapıldı. İnsertlerin dışına ise 1 ml FBS içeren medyum eklendi. Sonrasında hücreler 48 saat inkübasyona bırakıldı.

3. Gün: İnkübasyona devam edildi.

4. Gün: İnsertlerin içi ve dışı PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine %4'lük PFA eklendi. Hücreler 15 dk boyunca tespit edildi. Yeniden PBS ile yıkama sonrası kesilen membranlara DAPI uygulandı ve kapatma medyumunu ile lamlara yerleştirildi. Floresan mikroskobu altında her bir insert için rastgele seçilen 9 farklı alandan hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.2.11.2. xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi)

Hücrelerin invazyon özellikleri manuel yöntemle alternatif olarak xCELLigence RTCA sisteminde de analiz edilmiştir. Optimizasyon sonucu Hücre İnvazyon ve Migrasyon (CIM) 16 kuyucuklu hücre plaklarında 40.000 hücre ve 10x dilüye matrijel kullanıldı.



Şekil 3.1. xCELLigence RTCA (98).

CIM 16 kuyucuklu hücre plaklarında iç içe geçebilen 2 farklı plaka bulunmaktadır. İnvazyon deneyleri için üst plağın 8 kuyucuğuna 25'er µl matrijel eklendi ve inkübatörde 4 saat bekletildi. Matrijel eklenmeyen diğer 8 kuyucukta ise migrasyon deneyleri yapıldı. Alt plağa ise 160 µl FBS içeren medyum eklendi ve iki plak birleştirildi. 1 saat inkübasyondan sonra üst plağa 50 şer µl FBS içermeyen medyum eklendi. Analizöre yerleştirilen plakta arka plan ölçümü yapıldı. Ardından üst plağa 100 µl FBS içermeyen medyum içerisinde 40.000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kabin içerisinde 30 dk bekletildikten sonra yeniden analizöre yerleştirildi. 48 saat boyunca her 15 dk da bir ölçümler yapıldı. Yapılan ölçümler sonrası, zamana bağlı

hücre indekslerine göre gerçekleştirilen analizler xCELLigence RTCA yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.12. İstatistiksel Analizler

İnsan plasenta dokularındaki protein ekspresyon düzeyleri, immünohistokimyasal boyama sonrası elde edilen mikroskop görüntülerinde Image J programı IHC Profiler eklentisi ile analiz edildi. Görüntülerin skorlanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

Skor= (Bir bölgedeki piksel sayısı X Bölgenin skoru) / Görüntüdeki toplam piksel sayısı

Bölgenin skoru; yüksek pozitif bölge için 4, pozitif bölge için 3, düşük pozitif bölge için 2 ve negatif bölge için 1 olarak belirlendi. Herhangi bir görüntüde, piksel yüzdesi %66'dan fazla olduğunda o bölgeye doğrudan skor verildi. Bu oran %66'dan az olduğunda ise yukarıdaki formül kullanılarak skor hesabı yapıldı (99).

Dokular ve hücreler ile yapılan Western Blot yöntemlerinde elde edilen bantlarda yoğunluk belirleme çalışmaları yine Image J programı ile yapıldıktan sonra proteinlerin ekspresyon düzeyleri ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi.

İmmünohistokimya ve Western Blot analizleri sonrası istatistiksel değerlendirmelerde GraphPad Prism 5.0 programı kullanılarak karşılaştırma testleri (tek yönlü ANOVA ve Student's t testi) yapıldı. qRT-PCR analizleri sonrası elde edilen nispi gen ekspresyon miktarları Student's t testi kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Manuel invazyon testleri ve xCELLigence RTCA sonuçları Student's t testi kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Tüm bu analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmanın ilk aşamasında insan plasentasında gebeliğin üç farklı trimesterinden elde edilen plasental koryonik villus kesitlerinde histokimyasal ve elektron mikroskopi düzeyinde değerlendirilmeler yapılmıştır. Histokimyasal çalışmalar için Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit Schiff (PAS) ile koryonik villus yapısı ve Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile de koryonik villusların daha detaylı yapısı incelenmiştir. Sonrasında, çalışmaya konu olan UPS’de rol oynayan p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının protein ve gen düzeyinde belirlenmesi ve elde edilen ekspresyonların üç trimester için immünohistokimya, immünofloresan, Western Blot ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak karşılaştırılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu proteinlerle ilişkisi olduğu bilinen otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 ekspresyonları da aynı yöntemlerle değerlendirilmiştir.

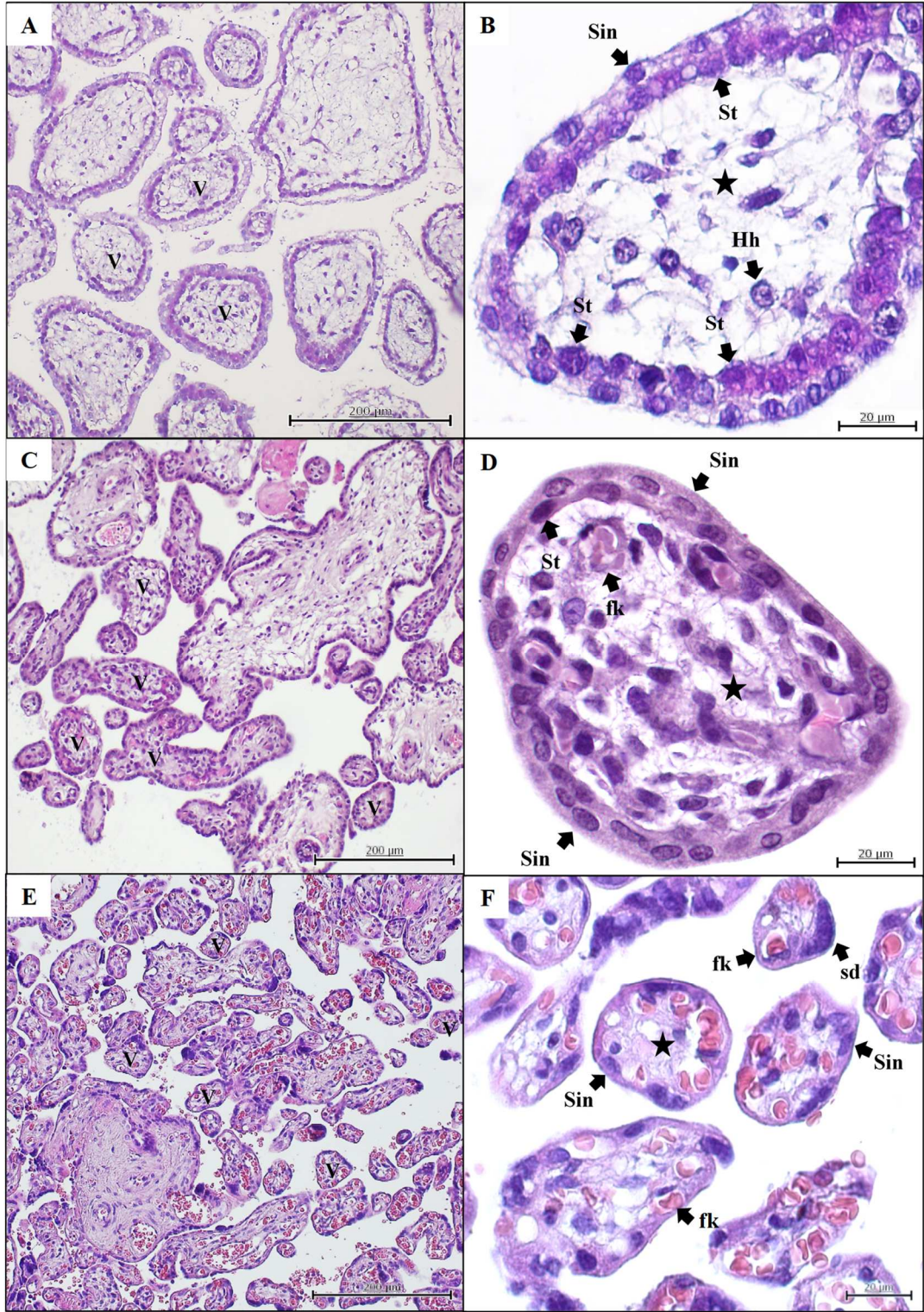
Bu çalışmanın 2. basamağında ise, protein ve gen düzeyinde her üç trimesterde de ekspresyonları belirlenen p97/VCP ve SVIP’in plasental hücrelerdeki fonksiyonunu belirlemek amacıyla hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında 1. trimestere ait bir ekstrasvillöz trofoblast hücre hatları olan HTR-8/SVneo kullanılarak, UPS proteinlerinden p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62’nin ekspresyonları öncelikle protein ve gen düzeyinde belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarının 2. basamağında ise p97/VCP ve SVIP’in bu hücrelerdeki fonksiyonunu belirlemek amacıyla bir p97/VCP inhibitörü (DBeq) ve p97/VCP ve SVIP siRNA’ler kullanarak bu proteinlerin ekspresyonları ve aktivitelerinin düşürülmesi, baskılanması (down regüle edilmesi) sağlanmıştır. Yapılan bu inhibitör ve siRNA uygulamaları sonrasında, manuel invazyon testi ve xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi) ile bu proteinlerin ekstrasvillöz trofoblast hücrelerinin invazyon ve migrasyonlarında etkili olup olmadıkları araştırılmıştır.

4.1. Placenta Dokularının Histolojik İncelenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında 1., 2. ve 3. trimesterlere ait insan plasentalarından alınan örneklerin histolojik takibi, mikrotom ile 5 µm’lik kesitlerin alınması ve elde edilen kesitlerde Hematoksilen-Eozin ve PAS ile boyamalar sonrası histolojik değerlendirmeler yapılmıştır.

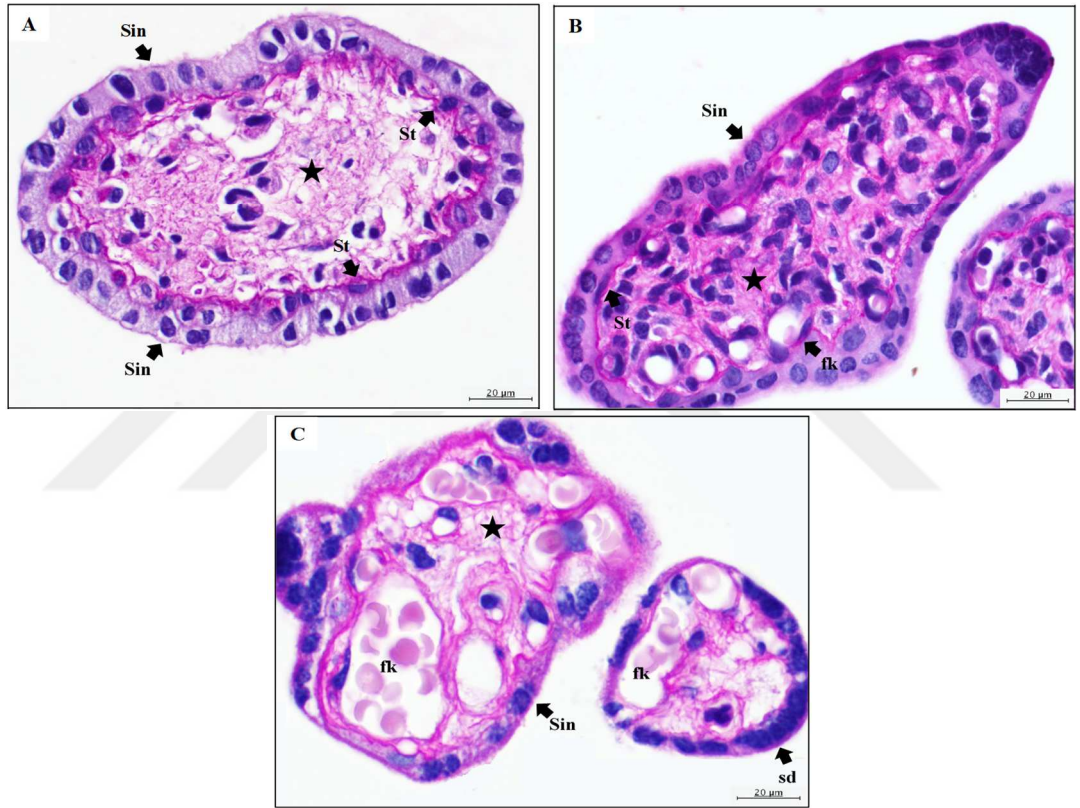
1. Trimester (Bkz. Şekil 4.1.A), 2. trimester (Bkz. Şekil 4.1.C) ve 3. trimester (Bkz. Şekil 4.1.E) plasenta dokularının küçük büyültmelerinde koryonik villusların enine kesitleri izlenmektedir. 1. Trimesterde koryonik villusların çoğunlukla mezenkimal tipte olduğu görülmektedir. Bu villuslarda kalın trofoblast tabakası ve gevşek stroma yapısı belirgindir. 2. Trimesterde ise olgunlaşmamış ara villuslar çoğunluktadır. Trofoblast hücre tabakalarının 1. trimestere göre incelendiği görülmektedir. Stroma yapısında daha çok kanal benzeri boşluklar görülmektedir. 3. Trimesterde ise yaygın olarak terminal villuslar bulunmaktadır. Trofoblast tabakasının oldukça incelendiği, buna ek olarak stromalarındaki liflerin azlığı dikkati çekmektedir. Gruplar halinde izlenen villuslarda damarlanmanın arttığı da açıkça görülmektedir.

1. Trimestere (Bkz. Şekil 4.1.B) ait büyük büyültmede tek bir koryonik villusun hücresel düzeydeki yapısı verilmiştir. Villus yapısında gevşek yapıdaki bağ dokusunu çevreleyen içte sitotrofoblast, dışta sinsisyotrofoblastlardan oluşan kalın bir trofoblastik tabaka görülmektedir. Buradaki hücreler kübik yapı sergilemektedir. Gebeliğin bu döneminde plasental makrofoljlar olan Hofbauer hücrelerinin sayıca fazla olduğu izlenmektedir. 2. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.1.D) trofoblast hücre tabakasının daha ince olduğu görülmektedir. Özellikle sitotrofoblast hücrelerinin oldukça yassılaştığı dikkati çekmektedir. Villöz stroma yapısında azalma görülmesine rağmen fetal kapillerler görece artmıştır. Ayrıca Hofbauer hücre sayısında önceki döneme göre azalma gözlenmiştir. 3. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.1.F) ise baskın hücre tipi sinsisyotrofoblast hücreleridir. Sitotrofoblastların ise oldukça yassılaştığı ve seyrek yerleşimlerinden dolayı ayırt edilmelerinde zorluk yaşandığı görülmektedir. Aynı zamanda villöz stromanın ve Hofbauer hücre sayısının azaldığı izlenmektedir. Ancak kapiller sayısının oldukça arttığı ve bunların sinsisyotrofoblast hücre tabakasına plasental bariyeri oluşturmak için yakınlaştıkları görülmektedir. Böylece plasental bariyer ince bir yapı sergilemiştir. Aynı zamanda 3. trimesterde sinsisyotrofoblast hücrelerinden meydana gelen sinsisyal düğüm oluşumları belirgindir. Bu dönemde Hofbauer hücreleri ise önceki trimesterlere göre oldukça seyrek yerleşimlidir.



Şekil 4.1. Trimesterlere ait plasenta dokularının Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimester koryonik villus (V) yapılarının enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh), fetal kapiller (fk), sinsisyal düğüm oluşumları (sd), bağ dokusu (yıldız) (Bar: A-C-E: 200 µm, B-D-F: 20 µm).

Farklı trimesterlere ait koryonik villuslardaki bazal membranların kolay seçilebilmesi amacıyla PAS reaksiyonu ile boyama yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.2.A-C). 1. Trimesterde membran yapılarını koruyan kübik yapıdaki sitotrofoblast hücreleri ayırt edilmektedir. 2. Trimestere ait koryonik villus yapısında da yassılaştırmış sitotrofoblast tabakası bu boya ile kolayca izlenmiştir. 3. Trimesterde ise artan fetal kapillerin endotelleri PAS reaksiyonu ile belirgin hale getirilmiştir. Bu dönemde plasental bariyerin ince olmasından dolayı damar endotel hücreleri ile yassı sitotrofoblastların ayırt edilmesi zor olmaktadır.

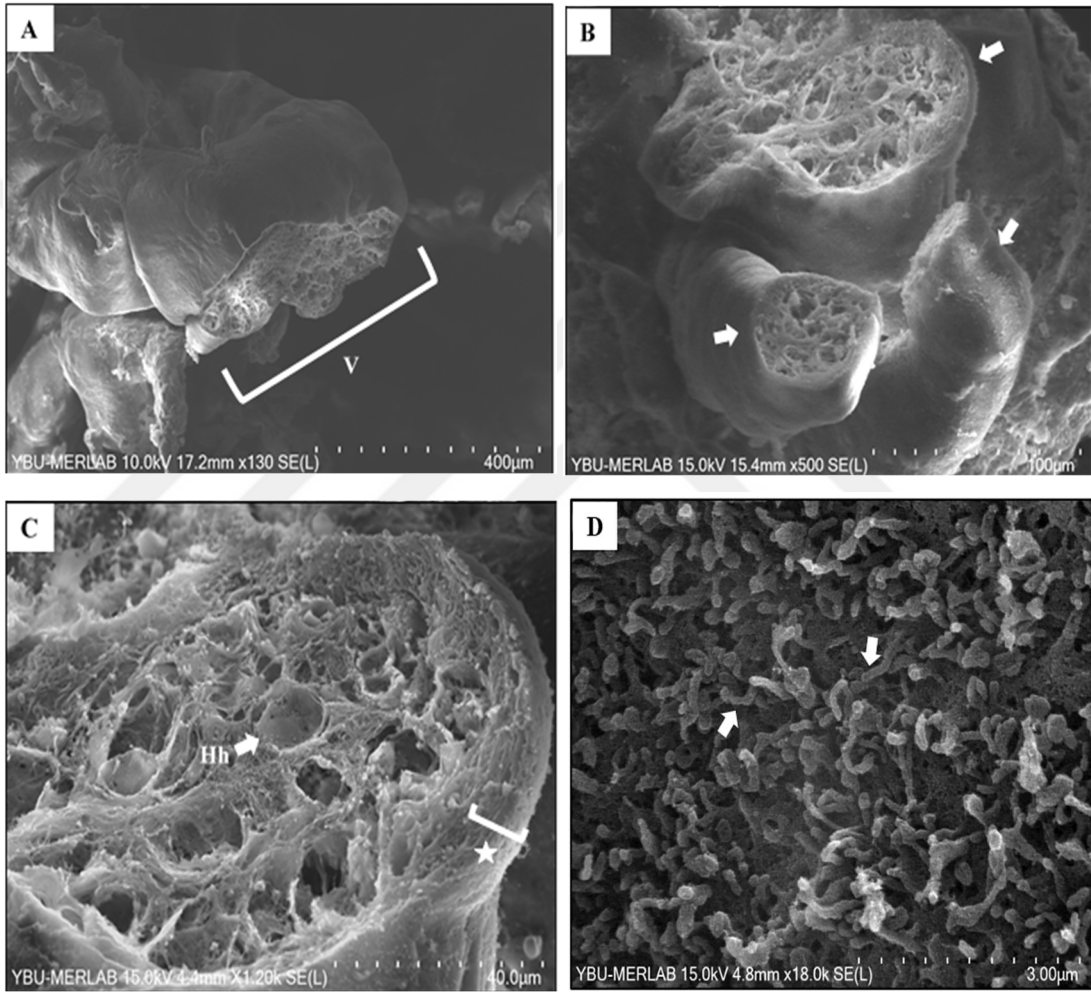


Şekil 4.2. Trimesterlere ait koryonik villusların PAS boyama görüntüleri. A) 1. Trimester, B) 2. Trimester, C) 3. Trimester koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, fetal kapiller (fk), sinsisyal düğüm oluşumları (sd), bağ dokusu (yıldız) (Bar: 20 µm).

4.2. Plasenta Dokularının Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) ile Değerlendirilmesi

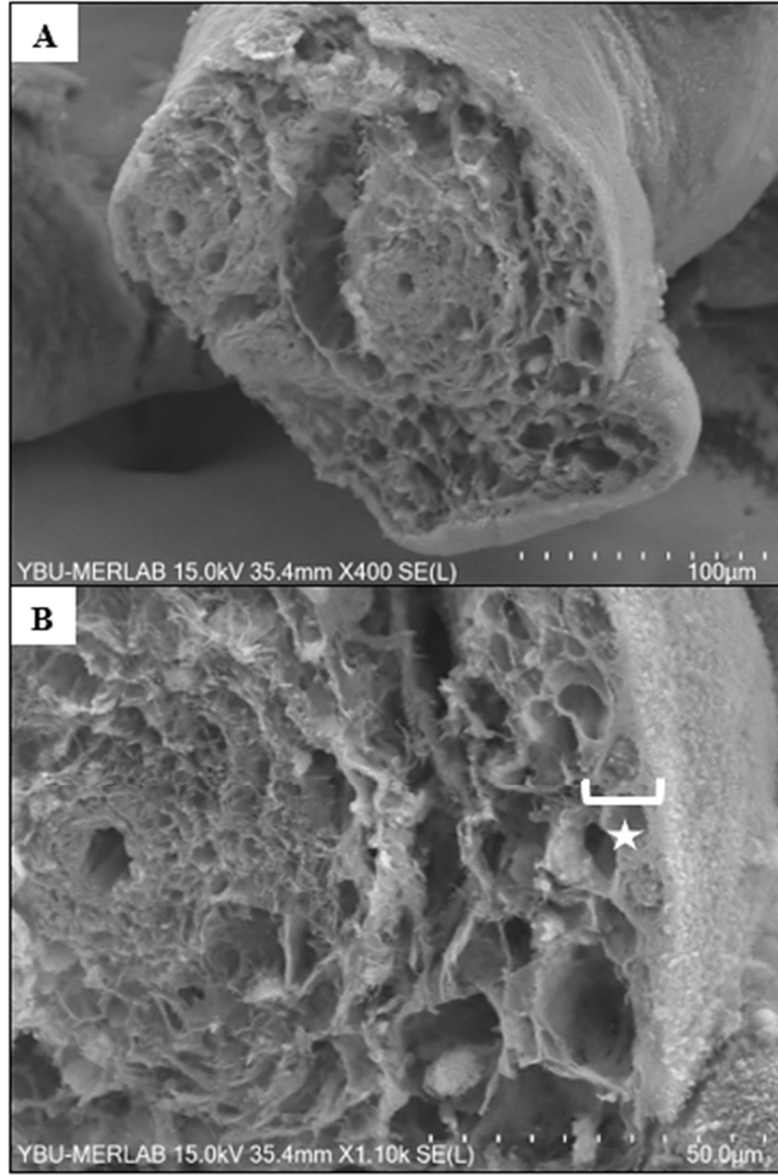
Farklı trimesterlere ait insan plasentalarında 3 boyutlu koryonik villus yapıları SEM’de görüntülenmiştir.

1. Trimester plasentada yer alan mezenkimal tip koryonik villusların dallanmaları gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.3.A-B). Koryonik villusların yapısı büyük büyültmede incelendiğinde gevşek yapılı bir stroma çevresinde kalın trofoblastik tabakanın varlığı dikkati çekmektedir. Aynı zamanda vakuollü Hofbauer hücrelerinin sayıca fazla olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.3.C). Bunlara ek olarak sinsisyotrofoblastlara ait mikrovillusların üstten görünümü izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.3.D).



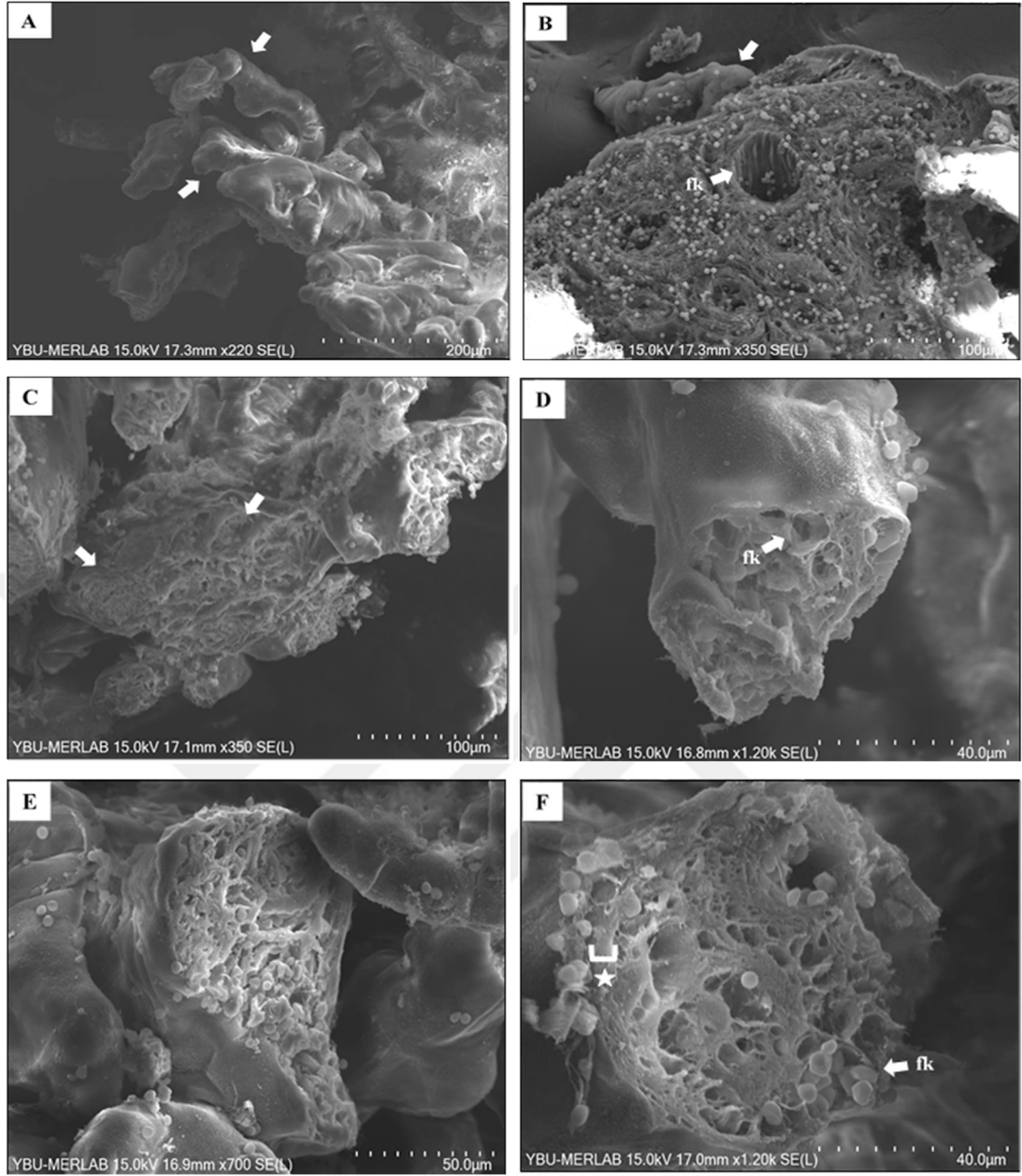
Şekil 4.3. 1. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri. A) Mezenkimal tip koryonik villus, B) Dallanma gösteren koryonik villuslar, C) Büyük büyültmede koryonik villus yapısı, D) Sinsisyotrofoblastlara ait mikrovillusların üstten görünümü. Villus (V), trofoblastik tabaka (yıldız), Hofbauer hücresi (Hh) (Bar: A: 400 µm, B: 100 µm, C: 40 µm, D: 3 µm).

2. Trimestere ait bir olgunlaşmamış ara villusun SEM görüntüsünde (Bkz. Şekil 4.4.A) 1. trimester ile karşılaştırıldığında bağ dokusunda yer alan liflerin az olduğu görülmüştür. Trofoblastik tabaka ise 1. trimester ile karşılaştırıldığında daha ince bir yapı sergilemektedir. Sinsisyotrofoblast hücrelerine ait önceki döneme göre azalmış mikrovilluslar yine dikkati çekmiştir (Bkz. Şekil 4.4.B).



Şekil 4.4. 2. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri. A) Olgunlaşmamış ara villus yapısı, B) Büyük büyültmede koryonik villus yapısı. Trofoblastik tabaka (yıldız) (Bar: A: 100 µm, B: 50 µm).

Terme yaklaşıkça koryonik villusların fazla dallanmaları nedeniyle sayılarında artış görüldüğü ve boyut olarak da küçüldükleri izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.5.A). 3. Trimestere ait bir kök villusun dallanması görülmektedir. Kök villusun dikkat çekici bir özelliğı olan bağ dokusundaki büyük kapiller damarlar açıkça görülmektedir (Bkz. Şekil 4.5.B). 3. Trimestere ait terminal villuslar plasentada gruplar halinde izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.5.C). Terminal villuslardaki stroma yapısı önceki dönemler ile karşılaştırıldığında sıkı bir yapı sergiler. Aynı zamanda fetal kapillerlerin artması dikkat çekicidir. Fetal kapillerlerin plasental bariyere katılmak üzere sinsisyotrofoblast hücrelerine yakınlığı görülmektedir (Bkz. Şekil 4.5.D). Bunlara ek olarak terminal villuslardaki kanlanmanın artması nedeniyle eritrositlerin fazla olduğu izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.5.E). Bir terminal villustaki trofoblastik tabakanın önceki dönemlere göre ince olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.5.F).



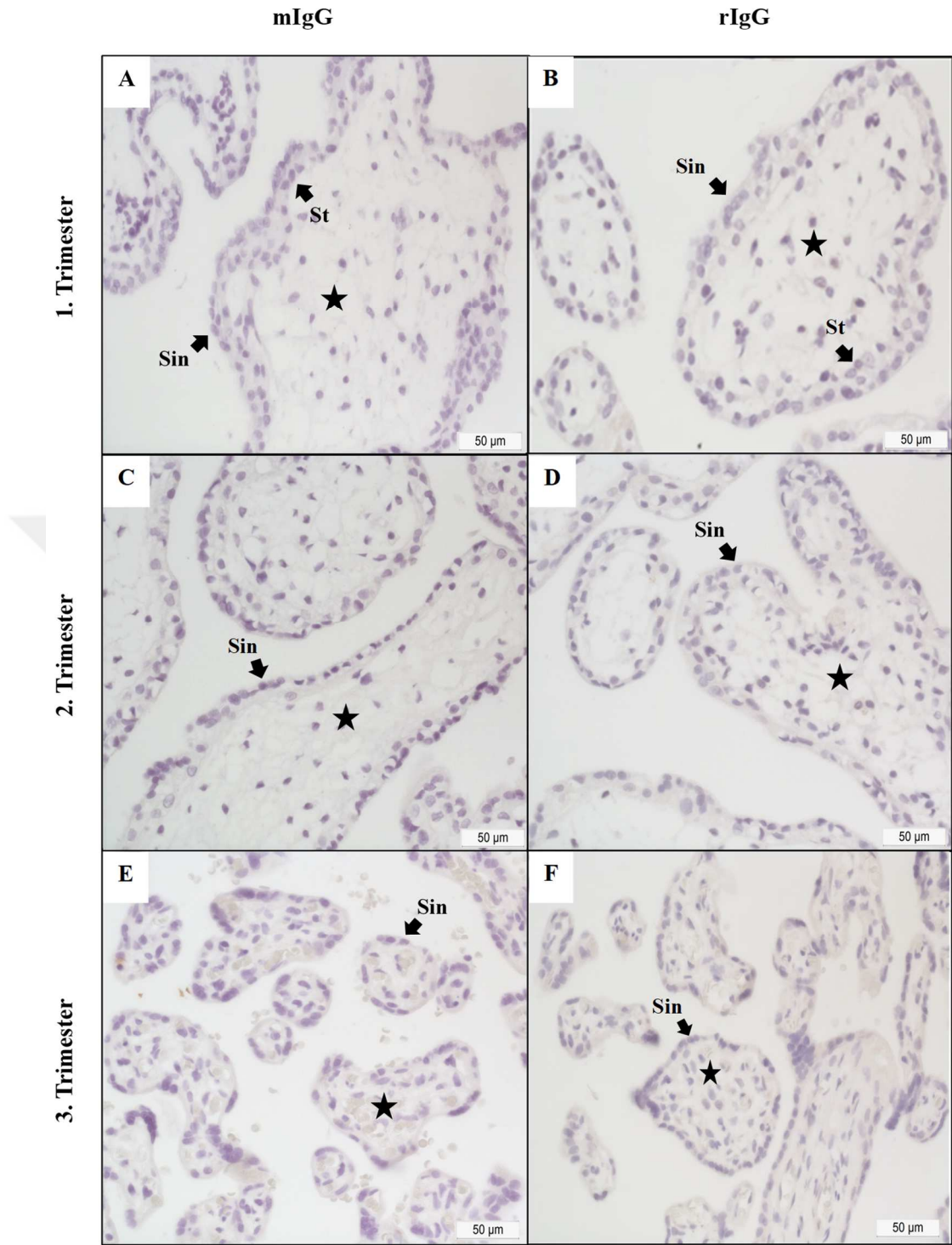
Şekil 4.5. 3. Trimestere ait koryonik villus SEM görüntüleri. A) Dallanma gösteren koryonik villuslar (oklar), B) Kök villus yapısı, C) Grup halindeki terminal villus yapıları, D) Fetal kapillerlerin (fk) sinsisyotrofoblastlara olan yakın yerleşimleri, E-F) Terminal villuslardaki eritrosit yoğunluğu. Trofoblastik tabaka (yıldız) (Bar: A: 200 μ m, B-C: 100 μ m, D-F: 40 μ m, E: 50 μ m).

4.3. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi

Her üç trimestere ait insan plasentalarında UPS'de rol oynayan p97/VCP ve SVIP ile otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 protein ekspresyonlarını belirlemek amacıyla immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. Bu proteinlerin ekspresyonları kontrol amaçlı kullanılan fare kökenli IgG (mIgG) ve tavşan kökenli IgG (rIgG) izotip antikorlar ile karşılaştırıldı. Öncelikle bu proteinlerin koryonik villuslardaki lokalizasyonları belirlenip, ekspresyon düzeyleri Image J programı IHC Profiler ile analiz edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.3.1. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

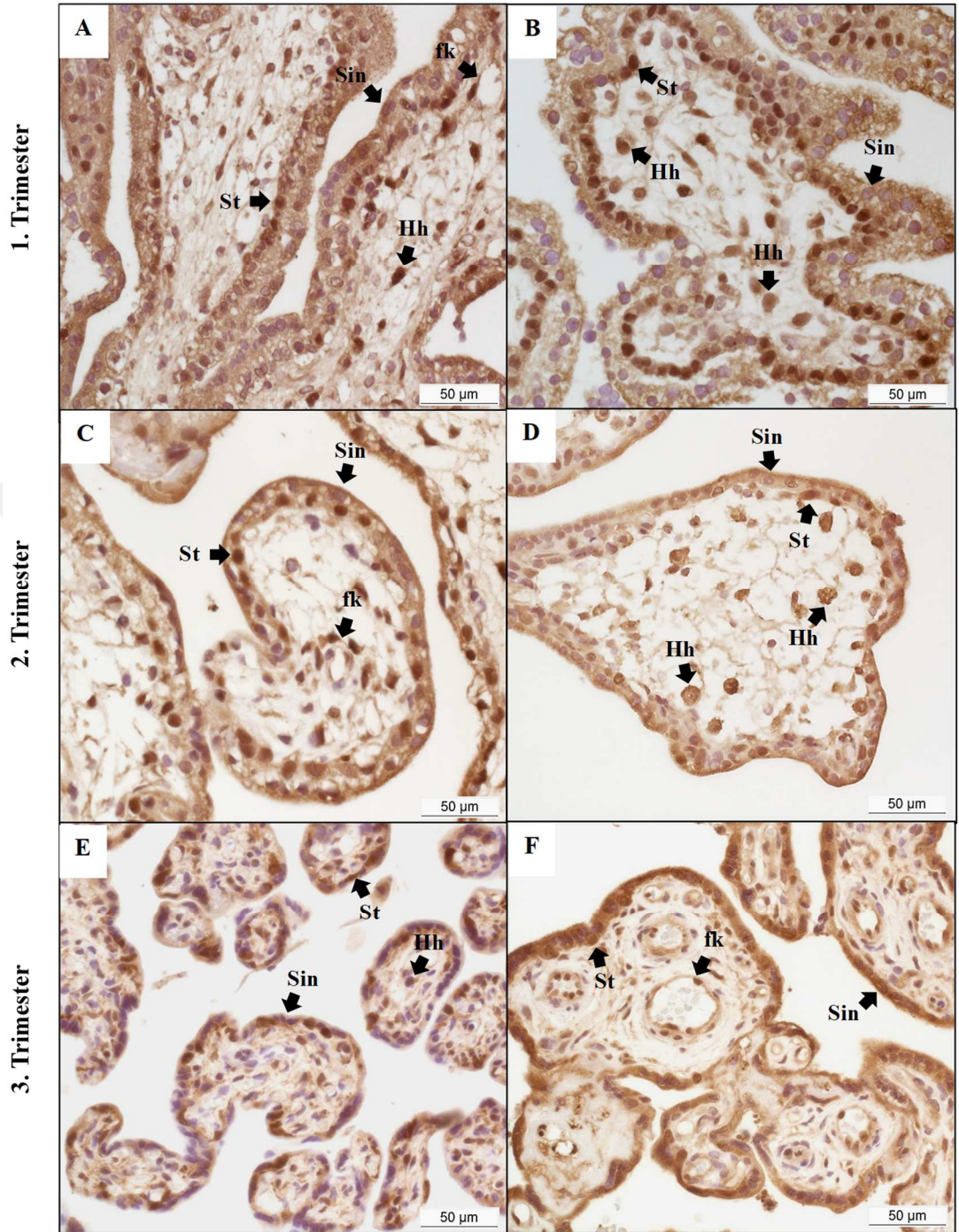
Farklı trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitlerinde negatif kontrol olarak seçilmiş mouse IgG ve rabbit IgG izotip antikorları ile immünohistokimya boyama sonrasında ekspresyonlar değerlendirilmiştir. 1. Trimester (Bkz. Şekil 4.6.A-B), 2. trimester (Bkz. Şekil 4.6.C-D) ve 3. trimesterlere (Bkz. Şekil 4.6.E-F) ait koryonik villuslarda izotip kontrol antikorlar ile yapılan immünohistokimya sonrası herhangi bir ekspresyon izlenmemiştir.



Şekil 4.6. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası mIgG ve rIgG ekspresyonları. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, bağ dokusu (yıldız) (Bar: 50 µm).

p97/VCP antikoru ile yapılan immünohistokimya sonuçlarında, 1. trimester plasentalara ait mezenkimal tipteki koryonik villus enine kesitlerinde (Bkz. Şekil 4.7.A-B) p97/VCP ekspresyonlarının özellikle sitotrofoblast hücrelerinin çekirdeklerinde şiddetli olduğu gözlemlenmiştir. Aynı zamanda sitoplazmalarındaki ekspresyonlar da belirgindir. Sinsisyotrofoblastlarda ise hem çekirdek hem de sitoplazmik ekspresyonlar görülmektedir. Bunlara ek olarak merkezde yer alan gevşek stromada da p97/VCP ekspresyonları izlenmiştir. 1. Trimesterde sayıca çok bulunan Hofbauer hücrelerindeki şiddetli p97/VCP ekspresyonları belirgindir. Aynı zamanda fibroblastlar ve kapiller endotel hücrelerinde de yoğun ekspresyonlar görülmüştür. 2. Trimester (Bkz. Şekil 4.7.C-D) olgunlaşmamış ara villuslara ait enine kesitlerde 1. trimestere göre incelmış trofoblastik hücre tabakasındaki şiddetli p97/VCP ekspresyonları belirgindir. Azalmış sitotrofoblast hücrelerinin çekirdeklerindeki yoğun ekspresyonlar ve incelen sinsisyotrofoblast tabakasındaki çekirdek ve sitoplazmik ekspresyonlar görülmektedir. Bağ dokusu hücrelerindeki p97/VCP ekspresyonları yine Hofbauer hücrelerinde, fibroblastlarda ve endotel hücrelerinde belirgindir. Ayrıca Hofbauer hücrelerindeki vakuoller dikkati çekmiştir. 3. Trimesterde yaygın olarak bulunan terminal villusların enine kesitlerinde (Bkz. Şekil 4.7.E) p97/VCP ekspresyonlarının özellikle kesintiye uğramış yassı sitotrofoblastlarda yoğun olduğu görülmüştür. İnce bir tabaka halinde görülen sinsisyotrofoblast tabakasında da ekspresyonlar belirgindir. Bunlara ek olarak 3. trimesterde bulunan bir kök villustaki p97/VCP ekspresyonları görülmektedir (Bkz. Şekil 4.7.F). Kök villusların ayırt edici özelliklerinden biri olan damar yapıları belirgin bir şekilde görülmektedir. Önceki trimesterler ile karşılaştırıldığında azalan Hofbauer hücrelerinde ve artan endotel hücrelerinde yine yoğun p97/VCP ekspresyonları izlenmiştir.

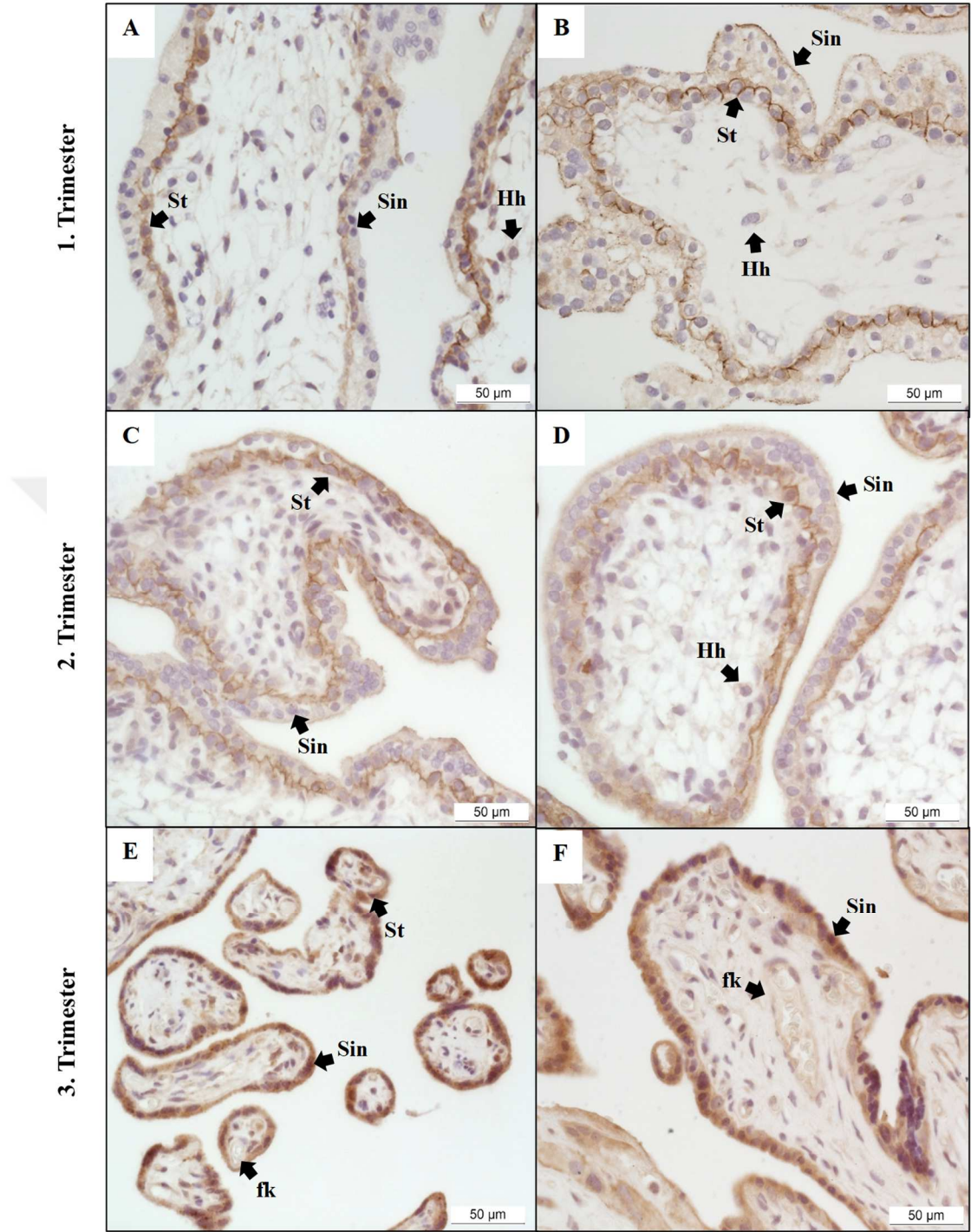
p97/VCP



Şekil 4.7. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası p97/VCP ekspresyonları. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh), fetal kapiller (fk) (Bar: 50 µm).

Her üç trimestere ait koryonik villusların enine kesitlerinde SVIP ekspresyonları değerlendirildiğinde, 1. trimestere (Bkz. Şekil 4.8.A-B) ait mezenkimal tipteki villuslarda sitotrofoblastlardaki hafif çekirdek boyanmaları ile membranlarındaki şiddetli ekspresyonlar görülmektedir. Sinsisyotrofoblastlarda, Hofbauer hücrelerinde ve endotel hücrelerinde hafif ekspresyonlar izlenmiştir. Ancak fibroblastlarda belirgin SVIP ekspresyonlar görülmemiştir. 2. Trimesterdeki (Bkz. Şekil 4.8.C-D) olgunlaşmamış ara villusların yapısında yine membranal SVIP ekspresyonu sitotrofoblastlarda yoğunken, sinsisyotrofoblastlarda hafif boyanmalar mevcuttur. Hofbauer hücrelerinde ve kapiller endotel hücrelerindeki yine hafif SVIP ekspresyonlar izlenmiştir. Ayrıca 1. trimestere benzer şekilde fibroblastlarda belirgin ekspresyonlar görülmemiştir. 3. Trimestere ait terminal villuslarda (Bkz. Şekil 4.8.E) ise kesintiye uğramış yassı sitotrofoblastlardaki yoğun SVIP ekspresyonları izlenmektedir. Bunun yanında sinsisyotrofoblastlardaki sitoplazmik ekspresyonlar belirgindir. Az sayıda bulunan Hofbauer hücrelerinde ve artan kapiller endotel hücrelerinde SVIP ekspresyonları belirgindir. Fibroblastlarda ise hafif boyanmalar görülmüştür. 3. Trimestere (Bkz. Şekil 4.8.F) ait bir kök villus yapısında büyük fetal kapillerdeki endotel hücrelerine ait ekspresyonlar ve trofoblastik tabakadaki SVIP ekspresyonları görülmektedir.

SVIP

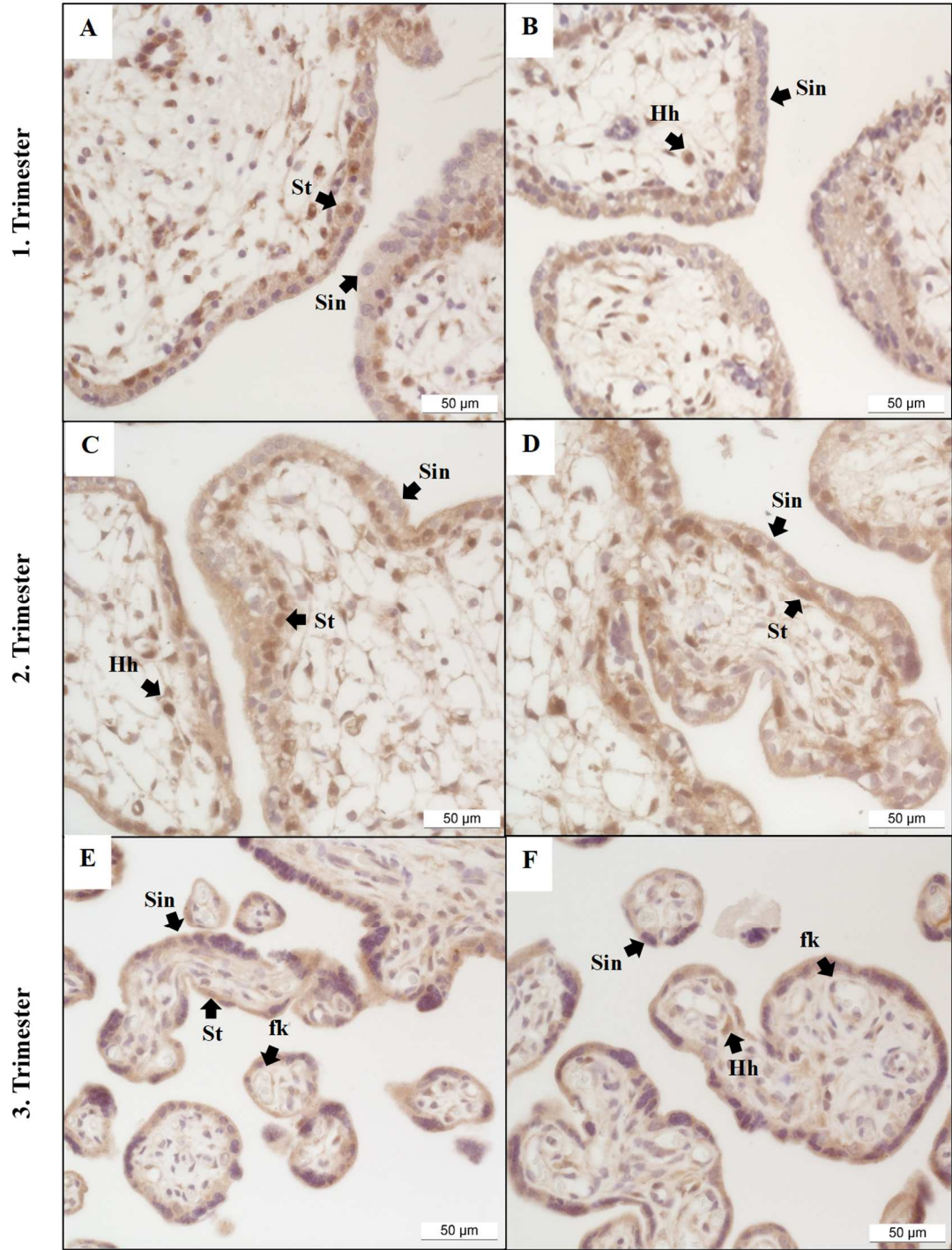


Şekil 4.8. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası SVIP ekspresyonları. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsiyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh), fetal kapiller (fk) (Bar: 50 µm).

Farklı trimesterlerde UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak incelenmesinden sonra otofajide görevli proteinlerden LC3II ve p62'nin ekspresyonları da incelenmiştir.

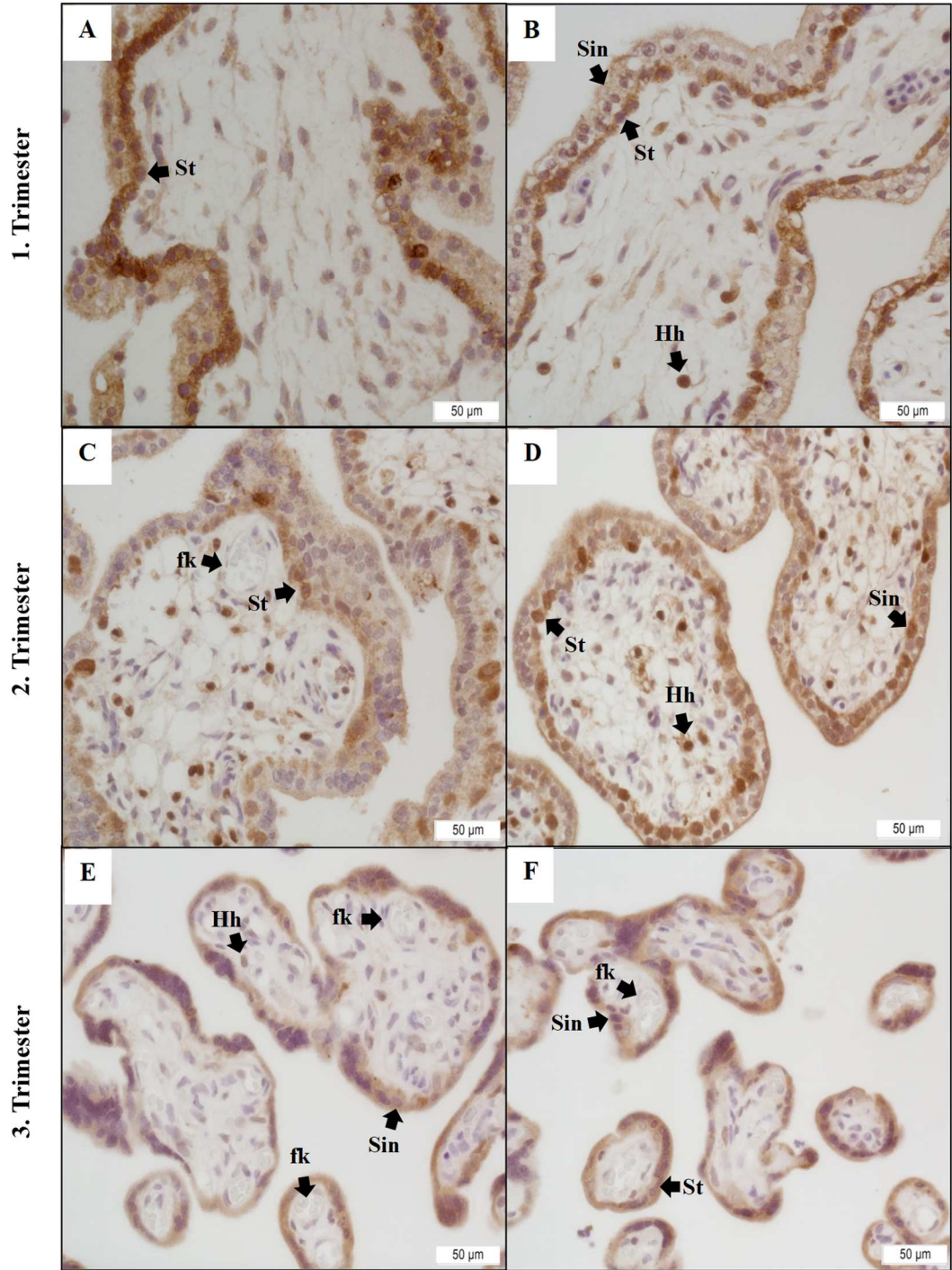
1. Trimester (Bkz. Şekil 4.9.A-B) plasentalara ait mezenkimal tipteki koryonik villuslarda LC3II protein ekspresyonlarının özellikle sitotrofoblast hücre çekirdeklerinde yoğun olduğu görülmüştür. Bu hücrelerin sitoplazmalarında ve sinsisyotrofoblastlardaki ekspresyonlar da belirgindir. Bağ dokusunda bulunan Hofbauer hücrelerinde, fibroblastlarda ve kapiller endotel hücrelerindeki yoğun ekspresyonlar dikkati çekmektedir. 2. Trimestere (Bkz. Şekil 4.9.C-D) ait olgunlaşmamış ara villuslardaki LC3II ekspresyonlarının ise 1. trimestere benzer bir şekilde sitotrofoblastlarda yoğun olduğu görülmüştür. Sayıca azalan Hofbauer hücrelerindeki ekspresyonlar ile fibroblast ve endotel hücrelerindeki ekspresyonlar yine belirgindir. 3. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.9.E-F) yaygın olarak görülen terminal villusların enine kesitlerinde LC3II protein ekspresyonunun ince bir yapı sergileyen trofoblastik tabakadaki yoğunluğu belirgindir. Seyrek yerleşimli Hofbauer hücrelerinde, fibroblastlarda ve kapiller endotellerindeki LC3II ekspresyonları da izlenmiştir.

LC3II



Şekil 4.9. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası LC3II ekspresyonları. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh), fetal kapiller (fk) (Bar: 50 µm).

Otofajide görevli diğer bir protein olan p62'nin farklı trimesterlere ait plasental koryonik villuslardaki ekspresyonları karşılaştırıldığında 1. trimestere (Bkz. Şekil 4.10.A-B) ait mezenkimal tip villuslarda yer alan sitotrofoblastlardaki yoğunluk dikkati çekmiştir. Aynı zamanda sinsisyotrofoblast hücrelerinin sitoplazmalarında da hafif boyanmalar görülmektedir. Bağ dokusu hücrelerinden Hofbauer hücrelerinde yoğun ekspresyonlar izlenmiştir. Fibroblastlarda ve endotel hücrelerindeki ekspresyonlar ise azdır. 2. Trimester (Bkz. Şekil 4.10.C-D) olgunlaşmamış tipteki ara villuslarda ise 1. trimester ile karşılaştırıldığında sitotrofoblastlar ve Hofbauer hücrelerindeki yoğun p62 ekspresyonları belirgindir. Sinsisyotrofoblastların sitoplazmalarında da ekspresyonlar görülmektedir. Bağ dokusu hücrelerinde ekspresyonlar 1. trimester ile benzerlik göstermektedir. 3. Trimester (Bkz. Şekil 4.10.E-F) terminal villuslarda ise sitotrofoblastların yanında sinsisyotrofoblastlarda da yoğun p62 ekspresyonları izlenmiştir. Seyrek yerleşimli Hofbauer hücrelerinde yoğun ekspresyonlar görülmüştür. Fibroblastlarda ve kapiller endotellerinde ise belirgin ekspresyonların olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.10. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası p62 ekspresyonları. A-B) 1. Trimester, C-D) 2. Trimester, E-F) 3. Trimesterlere ait koryonik villusların enine kesitleri. Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh), fetal kapiller (fk) (Bar: 50 µm).

1., 2. ve 3. Trimesterlere ait plasentalarda p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 ile immünohistokimya sonrası proteinlerin ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla Image J programı kullanılarak analizler yapılmıştır. Elde edilen veriler GraphPad

Prism ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Bu analizler için her bir trimestere ait üç farklı haftadan alınan plasenta kesitlerinde, 40x büyültmede rastgele seçilen 5 farklı alandan görüntüler kullanılmıştır. Analizler hücrelerin çekirdek ve sitoplazma boyanma özelliklerine göre ayrı ayrı yapılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldıktan sonra grafik üzerinde gösterilmiştir.

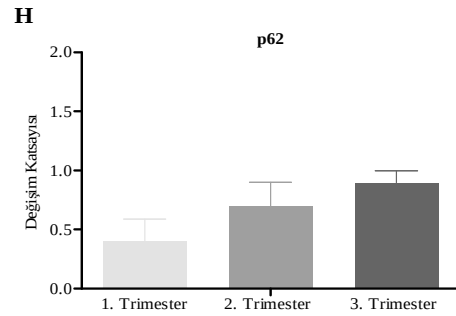
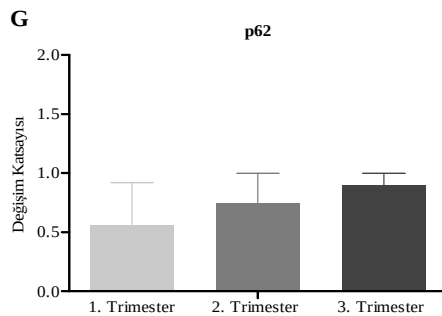
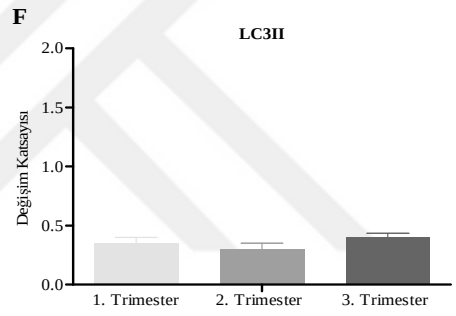
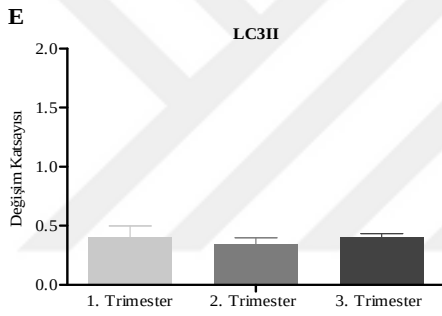
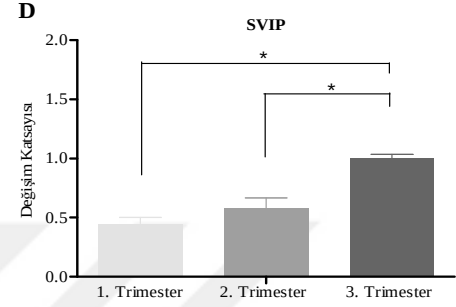
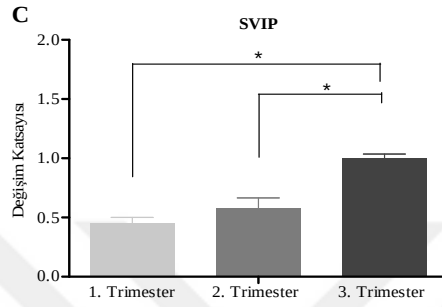
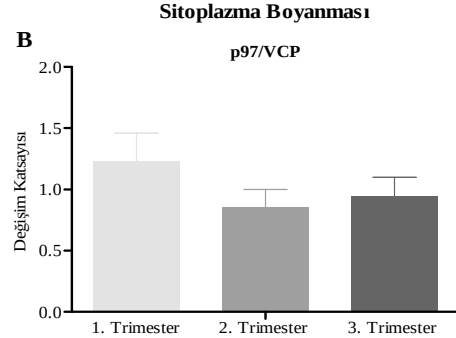
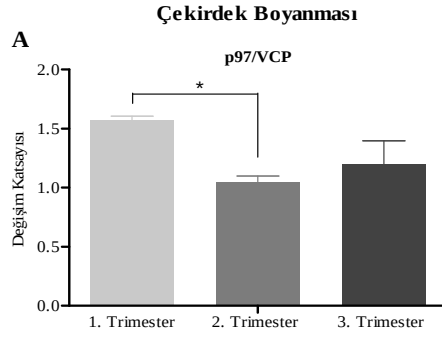
İmmünohistokimya sonrası trimesterler arasında p97/VCP ekspresyonları karşılaştırıldığında ekspresyonların en fazla 1. trimesterde görülmesi dikkati çekmiştir. Çekirdek (Bkz. Şekil 4.11.A) (p:0,1162) ve sitoplazma boyanma (Bkz. Şekil 4.11.B) (p:0,4080) özelliklerine göre trimesterler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Ancak ikili karşılaştırmalar sonucu 1.-2. trimesterler arasında çekirdek boyanmalarına göre anlamlı farklılık görülmektedir (p:0,0153).

SVIP ekspresyonunun ise gebelik dönemi ilerledikçe arttığı grafikte izlenmektedir. Bu artış istatistiksel olarak değerlendirildiğinde çekirdek (Bkz. Şekil 4.11.C) ve sitoplazma boyanmalarına (Bkz. Şekil 4.11.D) (p:0,0151) göre anlamlı olduğu izlenmektedir. İkili karşılaştırmalar sonucu iki boyanma özelliğine göre yapılan değerlendirmelerde 2.-3. trimesterler (p:0,0441) ve 1.-3. trimesterler arasında (p:0,0122) istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar belirlenmiştir.

LC3II ekspresyonları trimesterler arasında değerlendirildiğinde hem çekirdek (Bkz. Şekil 4.11.E) (p:0,8423) hem de sitoplazma (Bkz. Şekil 4.11.F) (p:0,4141) boyanma özelliklerine göre aralarında istatistiksel olarak anlamlı farkın olmadığı izlenmiştir.

Farklı trimesterlerde p62 ekspresyonlarının SVIP ekspresyonlarına benzer şekilde ilerleyen gebelik dönemlerinde artış gösterdiği izlenmektedir. Ancak bu artış çekirdek (Bkz. Şekil 4.11.G) (p:0,6906) ve sitoplazma (Bkz. Şekil 4.11.H) (p:0,2545) boyanma özelliklerine göre istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İstatistiksel analizlerde ikili karşılaştırmalar sonucu çekirdek (Bkz. Şekil 4.11.I) ve sitoplazma (Bkz. Şekil 4.11.J) boyanmalarına göre elde edilen p değerleri verilmiştir.



I

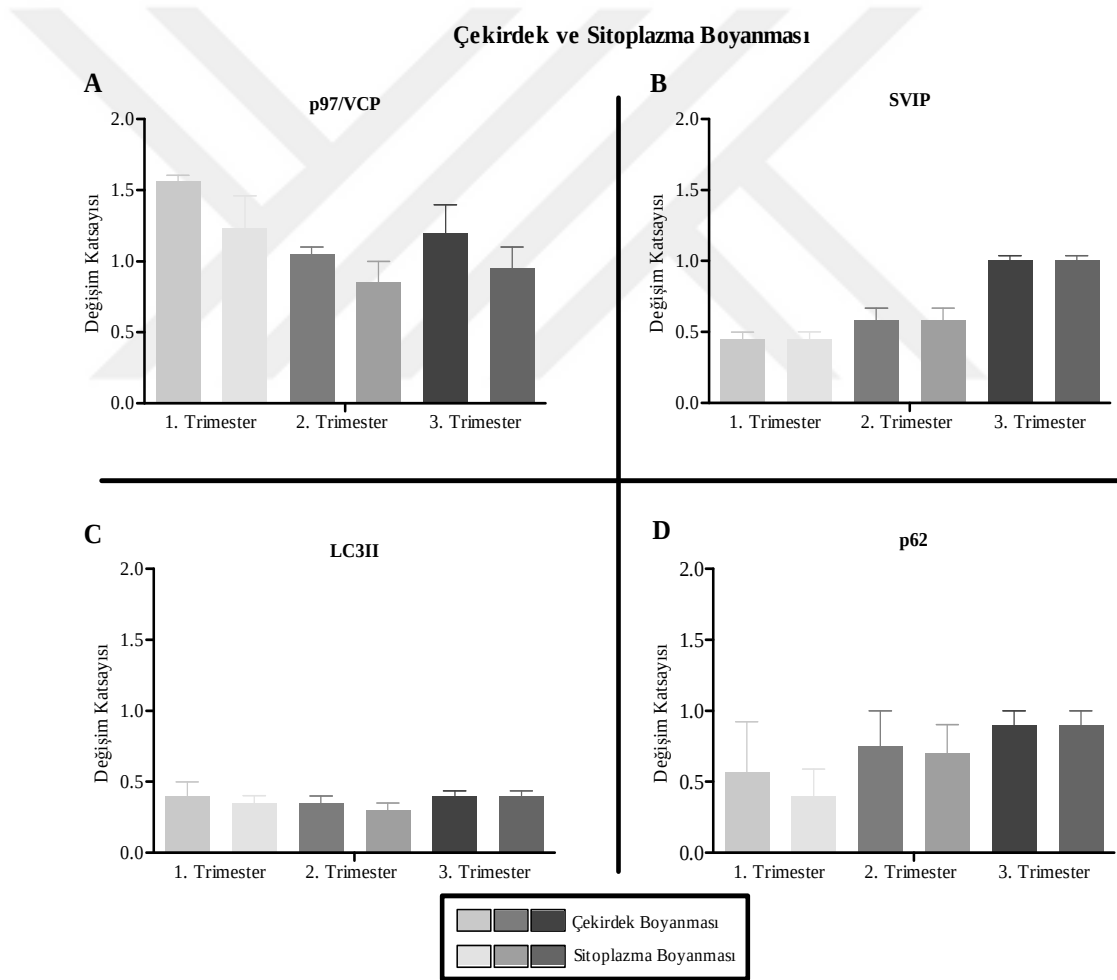
	1.-2.Trimester	2.-3.Trimester	1.-3.Trimester
p97/VCP	0,0153	0,5425	0,2143
SVIP	0,3037	0,0441	0,0122
LC3II	0,6985	0,5000	1,0000
p62	0,7144	0,6335	0,4624

J

	1.-2.Trimester	2.-3.Trimester	1.-3.Trimester
p97/VCP	0,2946	0,6838	0,4074
SVIP	0,3037	0,0441	0,0122
LC3II	0,5528	0,2441	0,5000
p62	0,3876	0,4655	0,1425

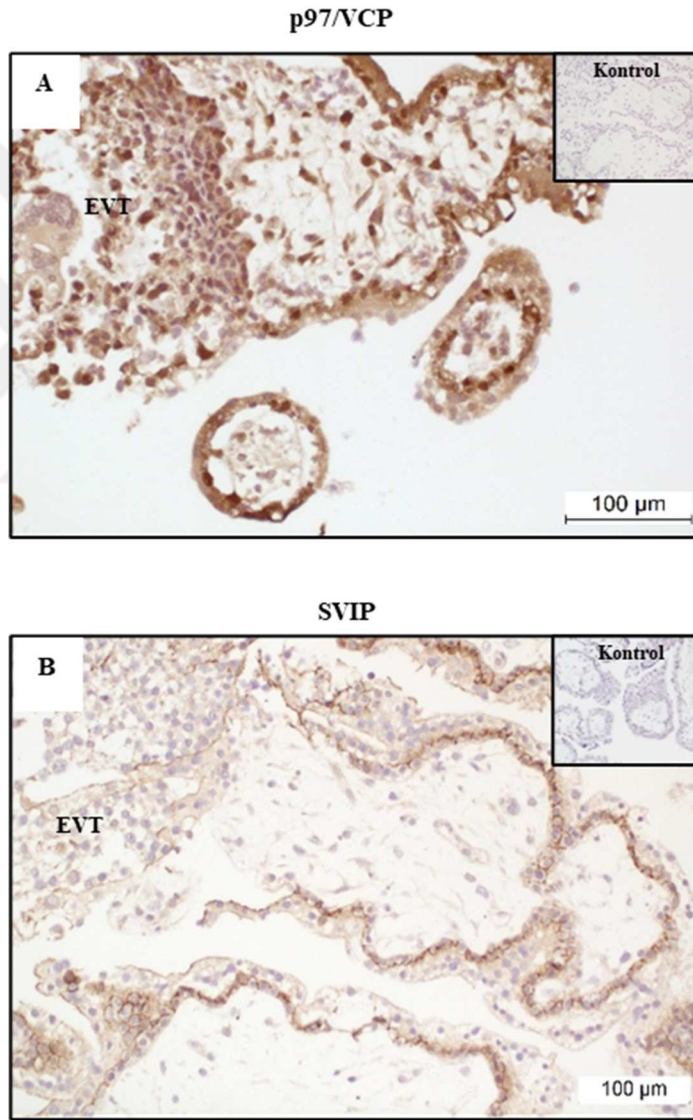
Şekil 4.11. UPS proteinlerinin ekspresyonlarının her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında immünohistokimya sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A-B) p97/VCP ekspresyonlarının çekirdek ve sitoplazma boyanmaları, C-D) SVIP ekspresyonlarının çekirdek ve sitoplazma boyanmaları, E-F) LC3II ekspresyonlarının çekirdek ve sitoplazma boyanmaları, G-H) p62 ekspresyonlarının çekirdek ve sitoplazma boyanmaları, I-J) İkili karşılaştırmalarda çekirdek ve sitoplazma boyanmalarına göre elde edilen p değerleri (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

Farklı trimesterlerde immünohistokimya sonrası p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 protein ekspresyonları, çekirdek ve sitoplazma boyanma özelliklerine göre yapılan karşılaştırmalar aynı grafikte gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.12.). p97/VCP ekspresyonlarının üç farklı trimesterdeki çekirdek boyanmalarının, sitoplazma boyanmalarına göre fazla olduğu izlenmiştir (Bkz. Şekil 4.12.A). SVIP ekspresyonlarına göre karşılaştırmalarda çekirdek ve sitoplazma boyanmalarının grafikte eşit olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.12.B). LC3II (Bkz. Şekil 4.12.C) ve p62 (Bkz. Şekil 4.12.D) ekspresyonları için ise 1. ve 2. trimesterlerde sitoplazma boyanmalarının daha az olduğu görülmüştür, ancak 3. trimesterdeki çekirdek ve sitoplazma boyanmaları birbirine eşittir.



Şekil 4.12. UPS proteinlerinin ekspresyonlarının immünohistokimya sonrası çekirdek ve sitoplazma boyanmalarına göre birlikte gösterildiği istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 ekspresyonları.

Plasentanın 1. trimesterdeki gelişim aşamasında villöz sitotrofoblastlar, sinsisyotrofoblastlara ya da villusların dışında ekstrasitotrofoblastlara (EVT) farklılaşır. Hücre sütunlarından farklılaşan EVT’lerde p97/VCP (Bkz. Şekil 4.13.A) ve SVIP (Bkz. Şekil 4.13.B) proteinlerinin ekspresyonları immünohistokimyasal boyama ile gösterilmiştir. EVT’lerde görülen yoğun p97/VCP ekspresyonları, sitotrofoblastlar ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca 1. trimesterde sitotrofoblastların membranlarında yoğun SVIP ekspresyonları izlenmektedir. EVT’lerdeki hafif SVIP ekspresyonlarının ise sinsisyotrofoblastlara benzer şekilde olduğu dikkati çekmiştir.



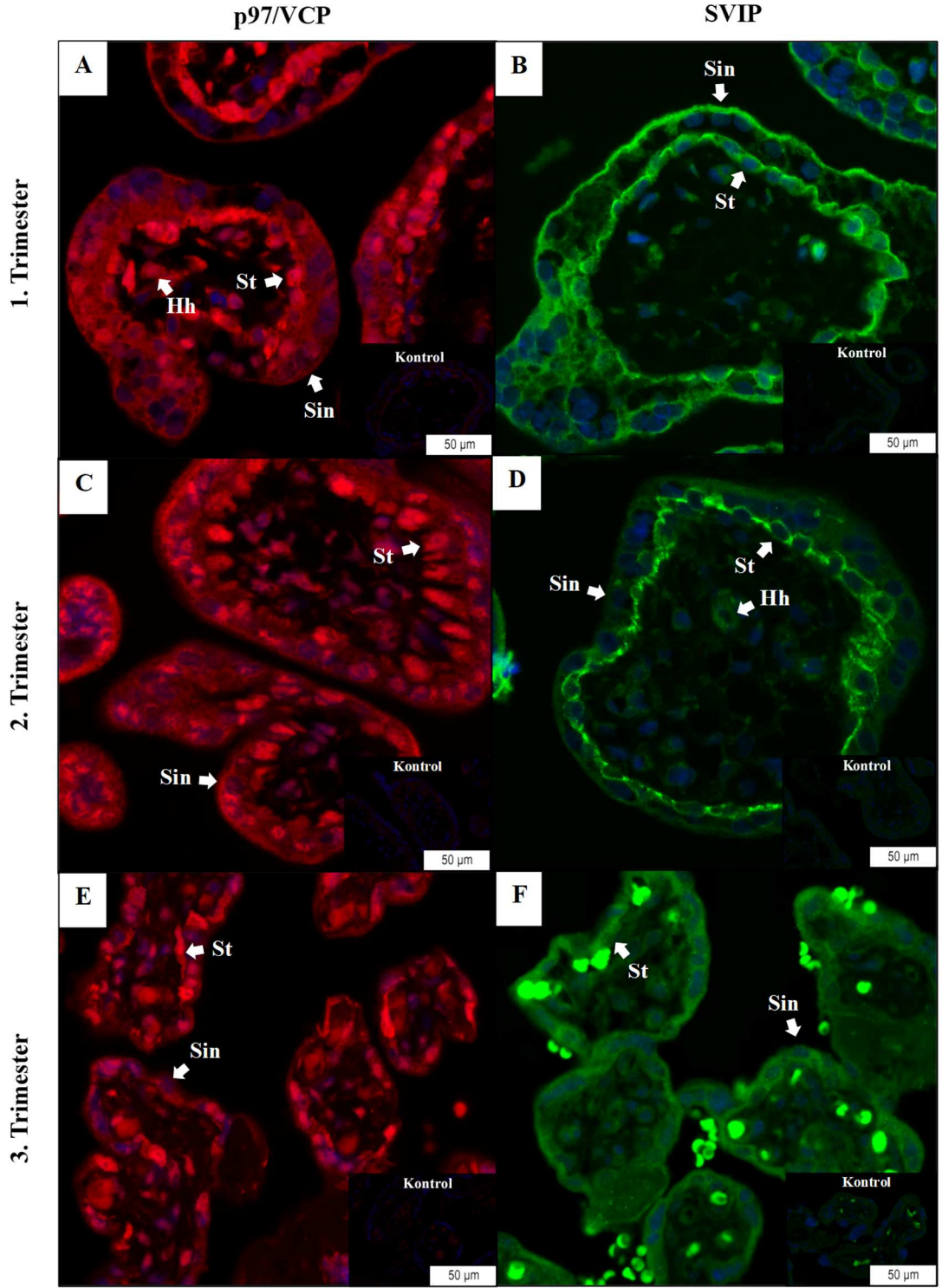
Şekil 4.13. 1. Trimestere ait plasentalarda immünohistokimya sonrası EVT’lerde p97/VCP ve SVIP ekspresyonları. A) p97/VCP, B) SVIP ekspresyonları. Kontrol grupları (sağ üst köşe) (Bar: 100 µm).

4.3.2. İmmünofloresan Boyama Bulguları

Farklı trimesterlere ait plasenta dokularında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 ekspresyonları immünofloresan boyama yöntemiyle de doğrulanmıştır. Kontrol amaçlı kullanılan mIgG ve rIgG izotip antikorları ile boyama sonrasında koryonik villusların enine kesitlerinde herhangi bir ekspresyon izlenmemiştir.

p97/VCP ekspresyonlarının immünohistokimyasal boyama bulgularına benzer bir şekilde 1. trimesterde (Bkz. Şekil 4.14.A) sitotrofoblast çekirdeklerinde şiddetli olduğu izlenmektedir. 2. Trimester (Bkz. Şekil 4.14.C) ve 3. trimestere (Bkz. Şekil 4.14.E) ait koryonik villuslardaki sitotrofoblastlarda şiddetli ekspresyonlar yine dikkati çekmiştir. Her üç trimesterde sitotrofoblastlarda ve sinsisyotrofoblastlardaki sitoplazmik ekspresyonlar belirgindir. Aynı zamanda bağ dokusu hücrelerindeki p97/VCP ekspresyonları görülmektedir.

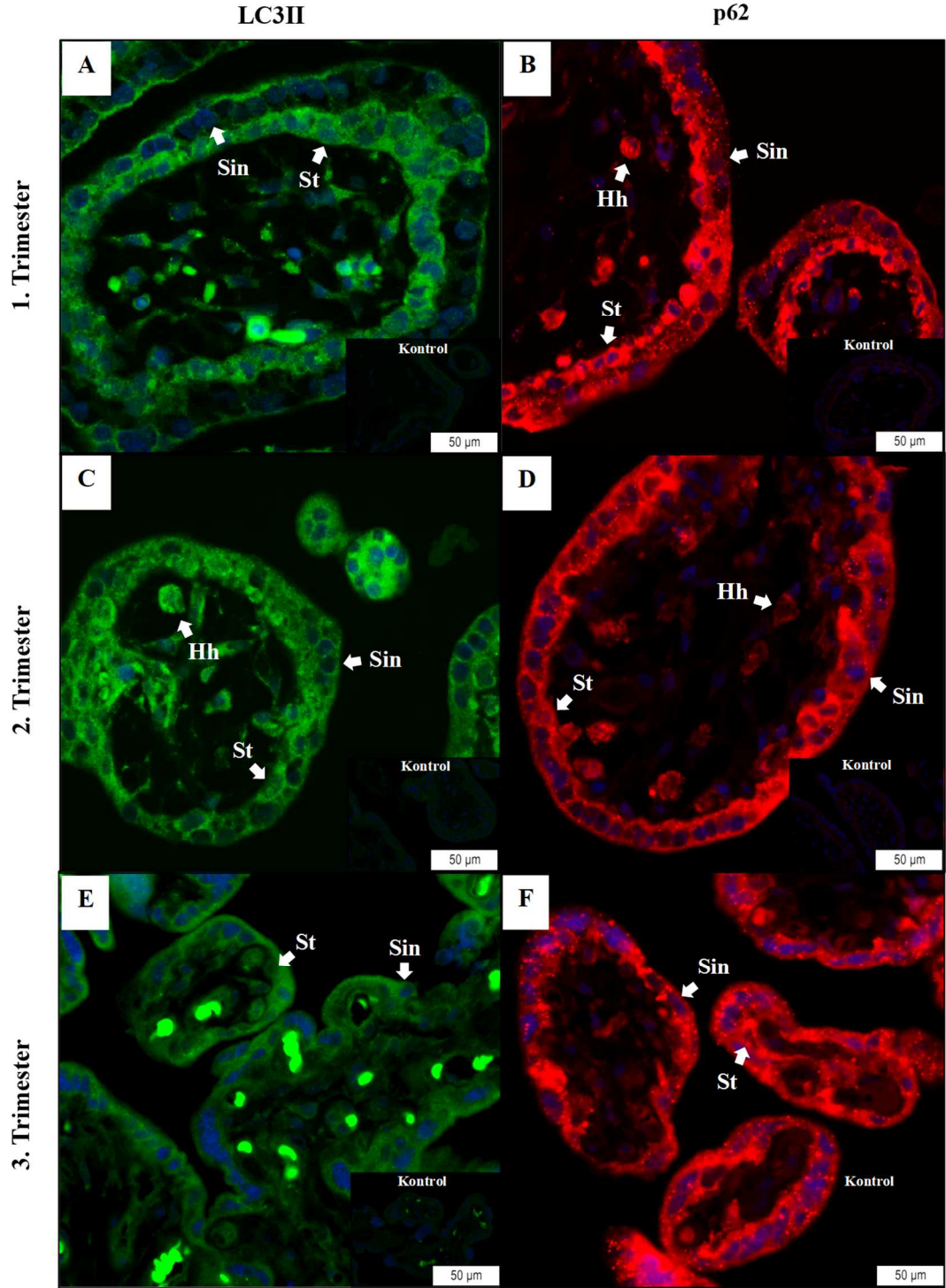
1. Trimester (Bkz. Şekil 4.14.B) ve 2. trimestere (Bkz. Şekil 4.14.D) ait koryonik villuslardaki sitotrofoblast hücrelerinde membranal SVIP ekspresyonları belirgindir. 3. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.14.F) ise sitotrofoblastlardaki membranal ekspresyonların yanında sinsisyotrofoblastlarda sitoplazmik ekspresyonlar izlenmektedir.



Şekil 4.14. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immünofloresan sonrası p97/VCP ve SVIP ekspresyonları. A) 1. Trimester, C) 2. Trimester, E) 3. Trimester koryonik villuslarda p97/VCP ekspresyonları, B) 1. Trimester, D) 2. Trimester, F) 3. Trimester koryonik villuslarda SVIP ekspresyonları. Kontrol grupları (sağ alt köşe), Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh) (Bar: 50 µm).

Plasentalarda immünofloresan boyama sonrası LC3II ekspresyonlarının nokta şeklinde olduğu izlenmiştir. 1. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.15.A) LC3II ekspresyonlarının sitotrofoblastların sitoplazmasında şiddetli olduğu görülmektedir. 2. Trimesterde (Bkz. Şekil 4.15.C) ve 3. trimesterde (Bkz. Şekil 4.15.E) LC3II ekspresyonları sitotrofoblastlara ek olarak sinsisyotrofoblastların sitoplazmalarında da belirgindir. Aynı zamanda bağ dokusunda bulunan fibroblastlarda ve Hofbauer hücrelerinde ekspresyonlar izlenmiştir.

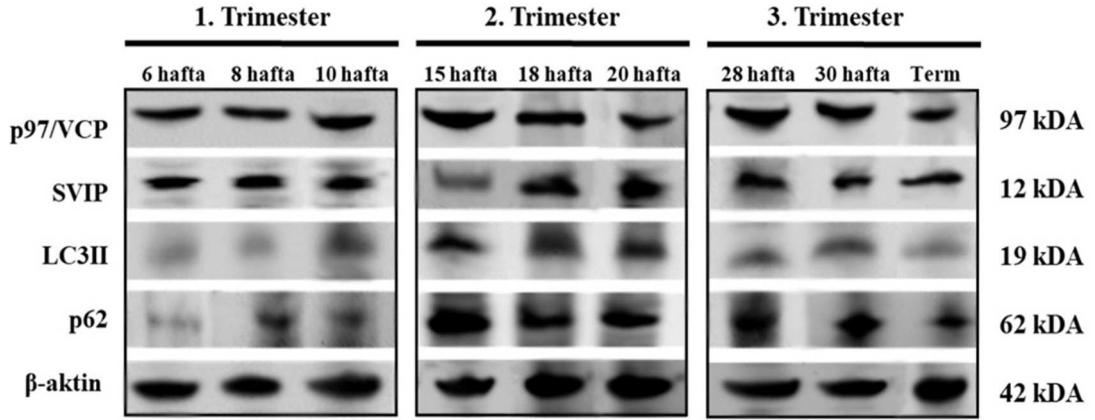
p62 ekspresyonları incelendiğinde 1. trimesterde (Bkz. Şekil 4.15.B) sitotrofoblastların sitoplazmalarında şiddetli ve noktasal olduğu izlenmektedir. 2. Trimester (Bkz. Şekil 4.15.D) ve 3. trimesterde (Bkz. Şekil 4.15.F) bu hücrelere ek olarak sinsisyotrofoblastlarda da yoğun sitoplazmik ekspresyonlar görülmektedir. Aynı zamanda p62 ekspresyonlarının Hofbauer hücrelerindeki yoğun ekspresyonları dikkati çekmiştir.



Şekil 4.15. Farklı trimesterlere ait plasentalarda immüno Floresan sonrası LC3II ve p62 ekspresyonları. A) 1. Trimester, C) 2. Trimester, E) 3. Trimester koryonik villuslarda LC3II ekspresyonları, B) 1. Trimester, D) 2. Trimester, F) 3. Trimester koryonik villuslarda p62 ekspresyonları. Kontrol grupları (sağ alt köşe), Sitotrofoblast (St) ve sinsisyotrofoblast (Sin) hücreleri, Hofbauer hücreleri (Hh) (Bar: 50 µm).

4.4. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında Western Blot Analizleri ile Değerlendirilmesi

Farklı trimesterlere ait insan plasenta dokularında immünolojik boyama yöntemlerini desteklemek amacıyla Western Blot analizleri yapılmıştır. Her trimesterden üç farklı haftaya ait örnekler kullanılmıştır. Plasenta dokularında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 protein ekspresyonlarının değerlendirmesinde Image J ile elde edilen veriler, kontrol amaçlı kullanılan β -aktin antikor verileri ile normalize edilmiştir. Bu proteinlerin ekspresyonlarına ait bant görüntüleri Şekil 4.16.'da verilmiştir.

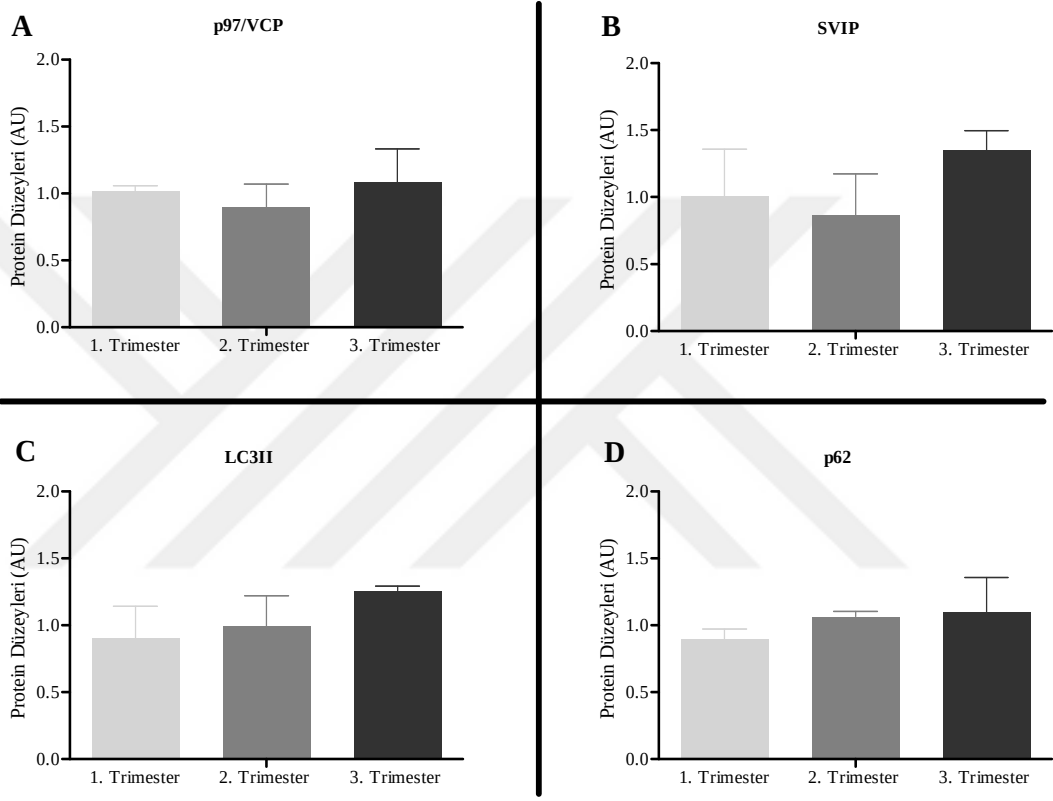


Şekil 4.16. UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında Western Blot analizleri sonrası bant görüntüleri.

Western Blot analizleri sonrası elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Çoklu karşılaştırmalarda tek yönlü ANOVA analizleri ve ikili karşılaştırmalarda Student's t testi kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmelerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Western Blot sonrası yapılan değerlendirmelerde p97/VCP (Bkz. Şekil 4.17.A) protein ekspresyonlarının immünohistokimyasal sonuçlara benzer şekilde 2. trimesterde önceki döneme göre azaldığı ve 3. trimesterde tekrar arttığı görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak her üç trimester arasında anlamlı farklılıklar görülmemiştir ($p:0,7587$). SVIP (Bkz. Şekil 4.17.B) ekspresyonlarının ise benzer şekilde 3. trimesterde fazla olduğu görülmektedir. Ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p:0,5066$). Otofaji proteinlerinin ekspresyonları trimesterler

arasında değerlendirildiğinde LC3II (Bkz. Şekil 4.17.C) ve p62 (Bkz. Şekil 4.17.D)’nin 3. trimesterdeki fazla ekspresyonları dikkati çekmiştir. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde trimesterler arasında farklılıklar görülmemiştir (p:0,4451 ve p:0,6336). Bunlara ek olarak yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu da gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılıklar bulunmamıştır. Şekil 4.17.E’de ikili karşılaştırmalar sonucu elde edilen p değerleri verilmiştir.



E

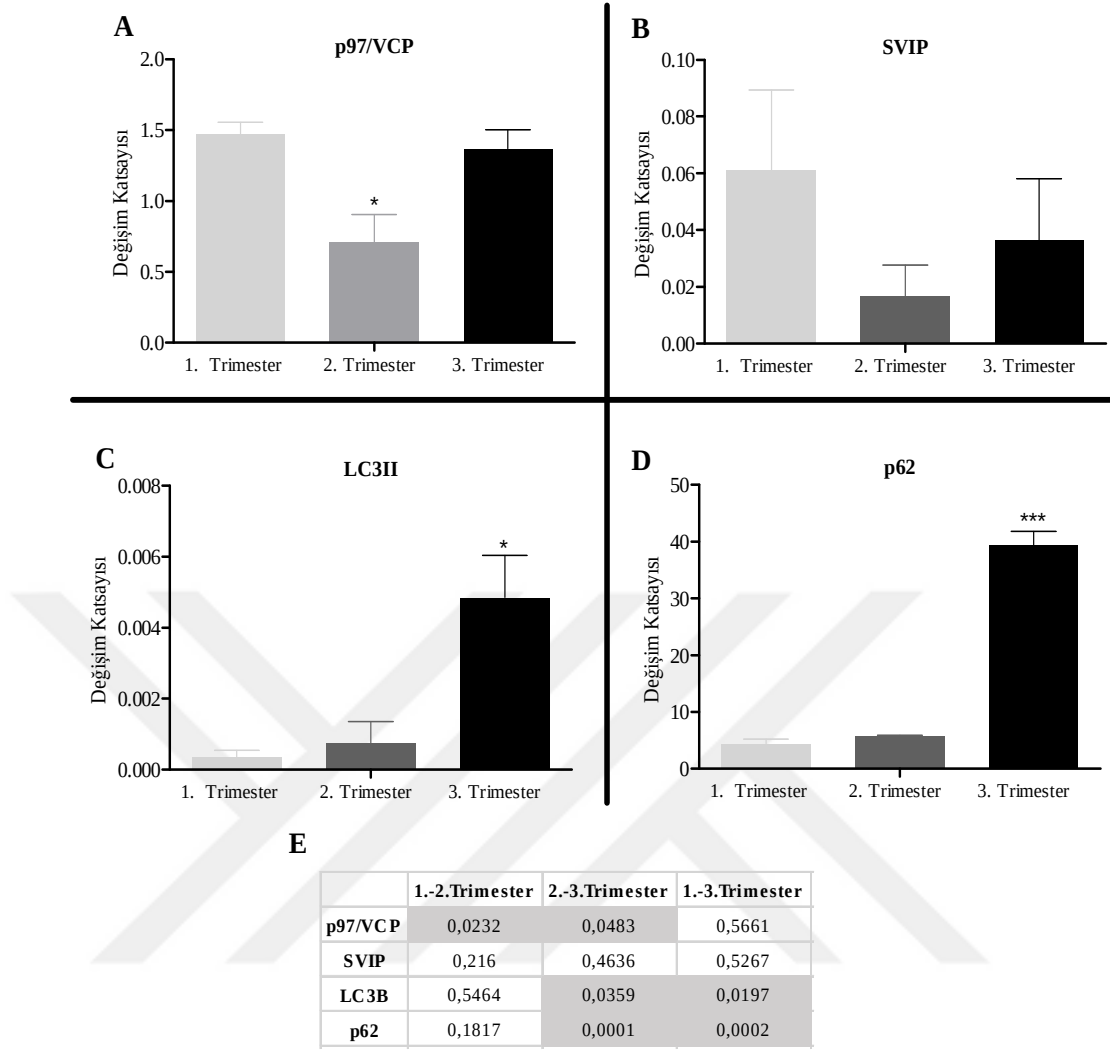
	1.-2.Trimester	2.-3.Trimester	1.-3.Trimester
p97/VCP	0,5378	0,5694	0,8009
SVIP	0,7801	0,2337	0,4214
LC3II	0,8031	0,314	0,2135
p62	0,1252	0,8996	0,4869

Şekil 4.17. UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında Western Blot analizleri sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 protein ekspresyonları, E) İkili karşılaştırmalar sonucu p değerleri (İstatistiksel anlamlılık: $p < 0,05$).

4.5. UPS Proteinlerinin Her Üç Trimesterdeki İnsan Plasenta Dokularında qRT-PCR Analizleri ile Değerlendirilmesi

Farklı trimesterlere ait plasenta dokularında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 gen ekspresyonlarının karşılaştırılması amacıyla qRT-PCR analizleri yapıldı. Analizler değerlendirilirken PSMD4 ve YWHAZ genleri referans olarak kullanılmıştır. Kantitatif sonuçlar LightCycler 480 software 1.5'te analiz edildikten sonra GraphPad Prism'de tek yönlü ANOVA analizleri ve Student's t testleri kullanılarak karşılaştırmalar yapılmıştır. Genlerin ekspresyonları değişim katsayılarına göre grafikler üzerinde gösterilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

1. Trimestere ait plasentalarda p97/VCP gen ekspresyonunun fazla görülmesi dikkati çekmiştir. 2. Trimesterde ise ekspresyonun azalmakta olduğu ve ilerleyen dönemde tekrar arttığı izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.18.A). İstatistiksel değerlendirmelerde trimesterler arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür ($p:0,0195$). 1.-2. Trimester ($p:0,0232$) ve 2.-3. trimesterler ($p:0,0483$) arasında anlamlı farklılıklar görülmüştür, ancak 1.-3. trimesterler ($p:0,5661$) arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır. SVIP gen ekspresyonlarında da benzer durum söz konusudur (Bkz. Şekil 4.18.B) ancak trimesterler arasında anlamlı farklılıklar bulunmamaktadır ($p:0,4006$). LC3II (Bkz. Şekil 4.18.C) ve p62 (Bkz. Şekil 4.18.D) için karşılaştırma yapıldığında ise 3. trimestere doğru ekspresyonların arttığı görülmektedir. İstatistiksel olarak LC3II ekspresyonları karşılaştırıldığında trimesterler arasındaki farklılıklarda anlamlılık söz konusudur ($p:0,0110$). 2.-3. Trimester ($p:0,0359$) ve 1.-3. trimesterler ($p:0,0197$) arasında anlamlı farklılıklar görülmektedir. Buna ek olarak, p62 ekspresyonlarına göre trimesterler arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu izlenmiştir ($p:<0,0001$). Bu farklılıklar 2.-3. trimester ($p:0,0001$) ve 1.-3. trimesterler ($p:0,0002$) arasında görülmektedir. Yapılan ikili karşılaştırmalar sonucu elde edilen p değerleri tabloda sunulmuştur (Bkz. Şekil 4.18.E).



Şekil 4.18. UPS proteinlerinin her üç trimesterdeki insan plasenta dokularında RT-qRT-PCR analizleri sonrası istatistiksel karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 gen ekspresyonları, E) İkili karşılaştırmalar sonucu p değerleri (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

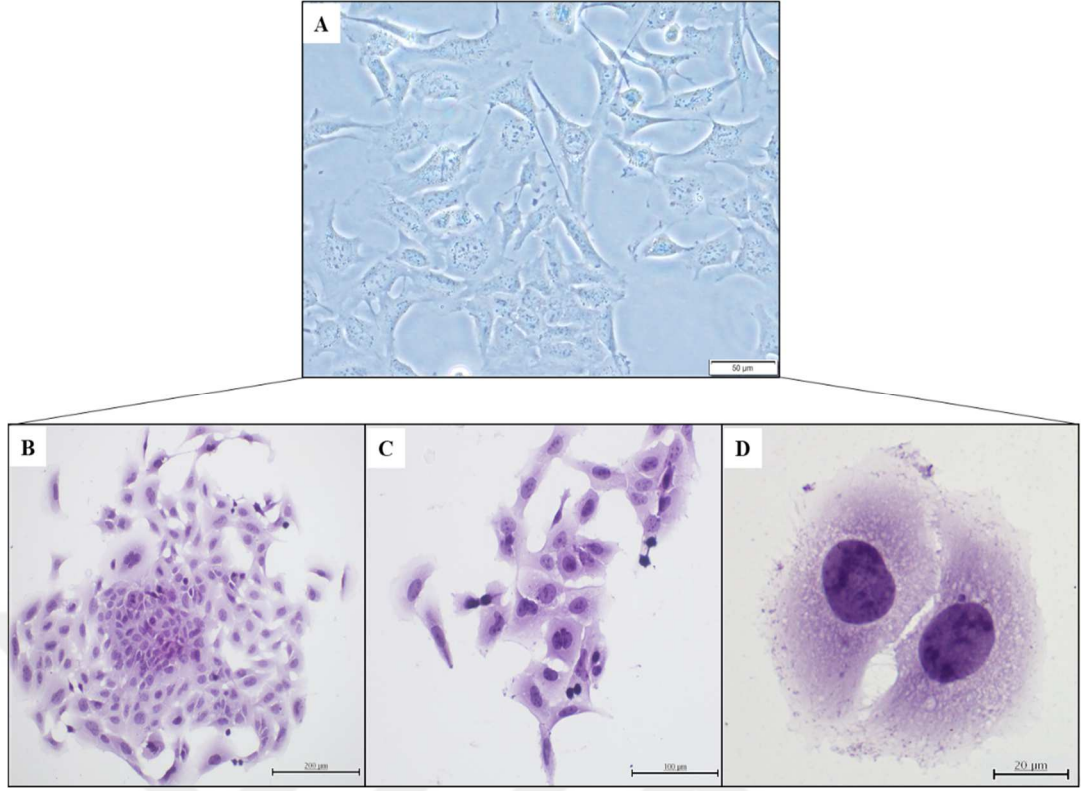
Çalışmanın ilk basamağında üç trimestere ait insan plasenta dokularında histolojik ve elektron mikroskopik incelemeler, immünolojik boyama yöntemleri, Western Blot ve qRT-PCR analizleri ile UPS proteinlerinden p97/VCP ile SVIP ve otofaji proteinlerinden LC3II ile p62'nin ekspresyonları değerlendirilmiştir. Özetle, trimesterler arasındaki p97/VCP protein ekspresyon farklılıklarında istatistiksel olarak anlamlılık görülmezken, gen ekspresyonlarının 1. trimestere göre 2. trimesterde anlamlı derecede azaldığı, 3. trimesterde tekrar arttığı izlenmiştir. SVIP ekspresyonlarında p97/VCP ile benzer durum söz konusudur ancak trimesterler arasındaki farklılıklar anlamlı bulunmamıştır. LC3II ve p62 ekspresyonlarının ise

gebelik dönemi boyunca anlamlı derecede arttığı görülmüştür. Ayrıca p97/VCP ve SVIP'in ilk trimesterde ekstrasillöz trofoblast hücrelerindeki ekspresyonları nedeniyle çalışmanın 2. aşamasında 1. trimester hücre hatlarında bu proteinlerin fonksiyonlarının araştırılmasına yönelik hücre kültürü çalışmaları planlanmıştır.

4.6. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarının Histolojik İncelenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında, 1. trimesterde UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının genellikle koryonik villuslardaki villöz sitotrofoblastlarda ve sinsisyotrofoblastlarda olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda sitotrofoblastlardan farklılaşan ekstrasillöz trofoblastlarda (EVT) p97/VCP ve SVIP ekspresyonları görülmüştür. Plasentanın gelişiminde önemli rolleri bulunan EVT'lerde bu proteinlerle ilgili fonksiyonel deneyler yapabilmek için çalışmanın 2. aşamasında 1. trimestere ait bir EVT hücre hattı olan HTR-8/SVneo kullanılmıştır. Bu hücre hatlarında histolojik incelemelerin ardından p97/VCP inhibitör uygulamaları ve p97/VCP-SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası protein ve gen düzeyindeki ekspresyonların değerlendirilmesi ve bu uygulamaların hücrelerin invazyon ve migrasyonlarına olası etkilerini incelemek amaçlanmıştır.

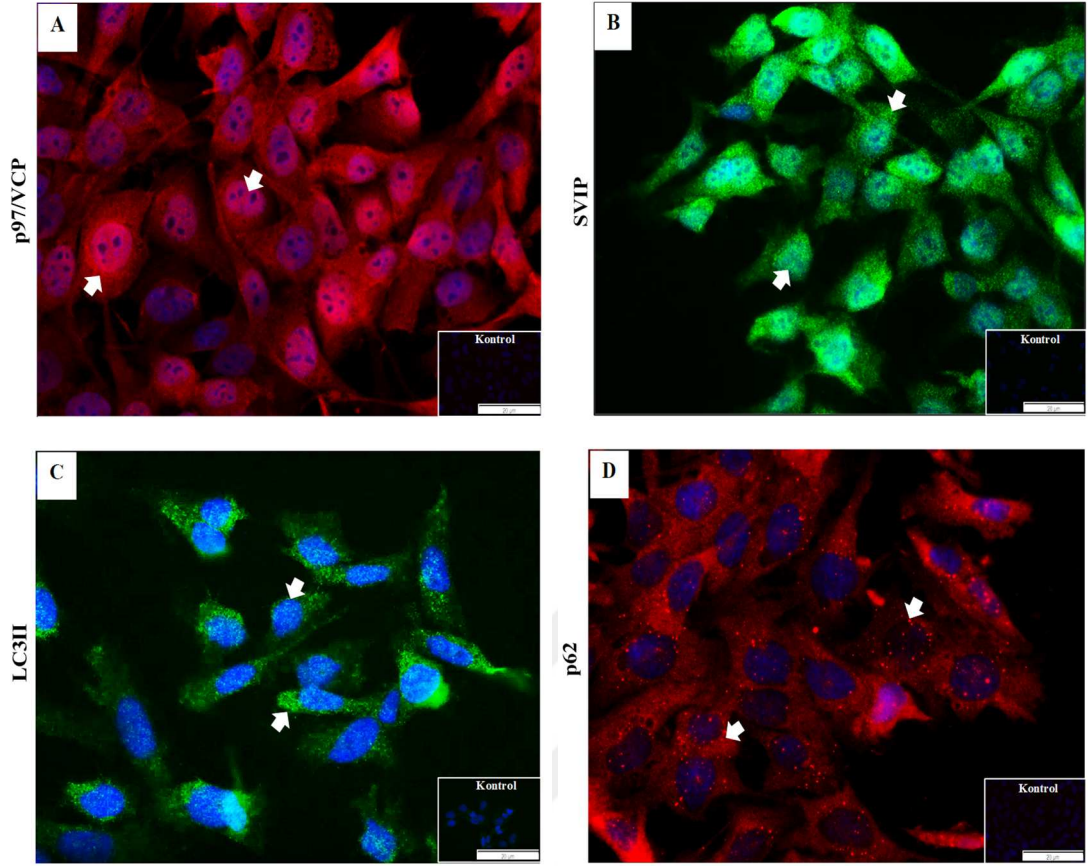
HTR-8/SVneo hücre hatları çoğaltıldıktan sonra histolojik değerlendirme amacıyla invert mikroskop altında incelenmiş (Bkz. Şekil 4.19.A) ve sonrasında Hematoksilen-Eozin ile boyama (Bkz. Şekil 4.19.B-D) yapılmıştır. İncelemeler sonrası hücrelerin epitelyal benzeri morfoloji sergiledikleri ve adherent özellik gösterdikleri görülmektedir.



Şekil 4.19. HTR-8/SVneo hücre hatlarının histolojik incelenmesi. A) İnvirt mikroskop görüntüsü, B-D) Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri (Bar: A: 50 µm, B: 200 µm, C: 100 µm, D: 20 µm).

4.7. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında UPS proteinlerinin İmmüno Floresan Boyama Bulguları

HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 protein ekspresyonlarını ve lokalizasyonlarını göstermek amacıyla immüno floresan boyama yapılmıştır. Hücrelerde p97/VCP protein ekspresyonunun çekirdek ve sitoplazmalarda yoğun olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.20.A). SVIP'in de aynı şekilde çekirdek ve sitoplazmalardaki şiddetli ekspresyonları belirgindir (Bkz. Şekil 4.20.B). LC3II (Bkz. Şekil 4.20.C) ve p62 (Bkz. Şekil 4.20.D) ekspresyonlarının özellikle sitoplazmalarda noktasal ve şiddetli olduğu görülmektedir. Bunun yanında çekirdeklerdeki hafif noktasal ekspresyonlar da izlenmiştir.



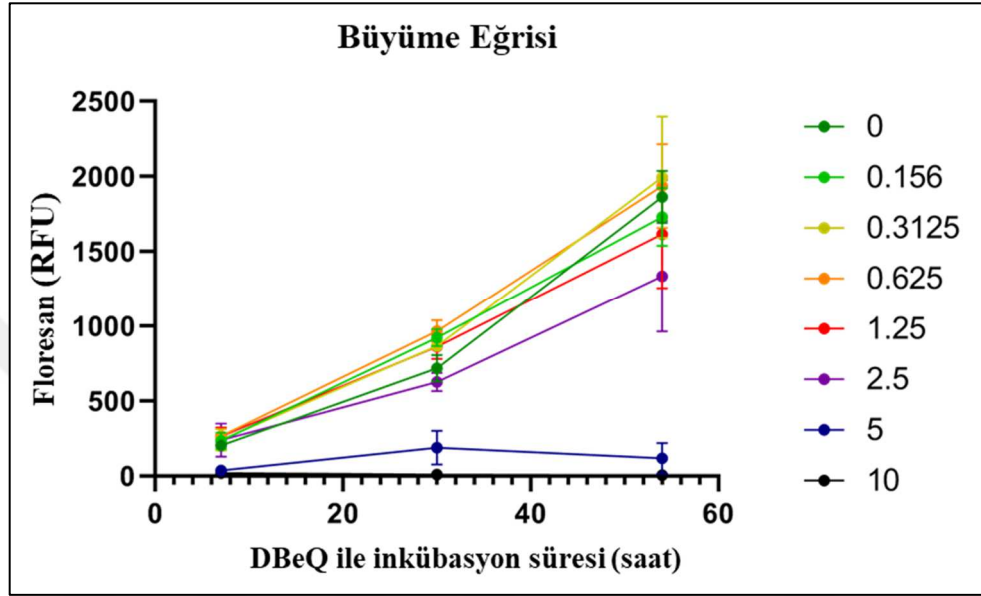
Şekil 4.20. HTR-8/SVneo hücre hatlarında UPS proteinlerinin immüno Floresan boyama bulguları. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 ekspresyonları. Kontrol grupları (sağ alt köşe), yoğun ekspresyon alanları (oklar) (Bar: 20 µm).

4.8. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında Canlılık ve Proliferasyon Analizleri

HTR-8/SVneo hücre hatlarında bir p97/VCP inhibitörü olan DBeQ uygulaması için canlılık ve proliferasyon analizleri Alamar Blue testi kullanılarak yapıldı. Microplate okuyucu ile ölçümler sonrası veriler GraphPad Prism’de analiz edildi.

HTR-8/SVneo hücre hatlarında DBeQ uygulamaları için farklı doz ve süreler kullanıldı. DBeQ uygulamaları için 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1,25 µM, 0,625 µM, 0,3125 µM ve 0,156 µM konsantrasyonlar seçildi. DBeQ dilüsyonlarında DMSO kullanıldı. Maksimum uygulama süresi ise 72 saat olarak belirlendi.

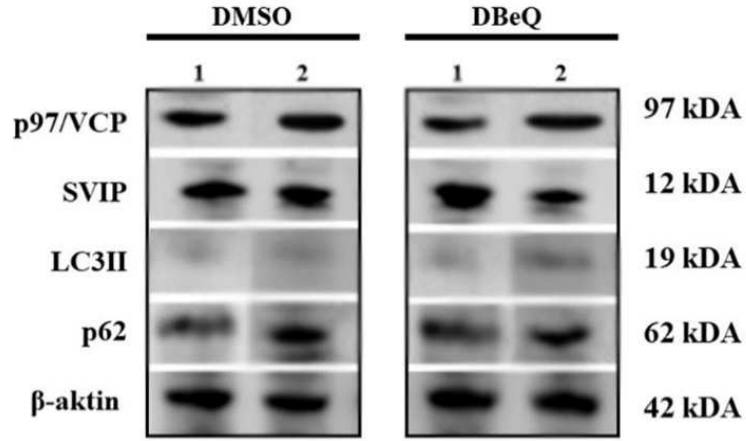
Büyüme eğrilerinin görüldüğü grafikte 10 μ M ve 5 μ M DBeQ konsantrasyonlarında hücrelerin yaşam sürelerinin az olduğu izlenmektedir. 2,5 μ M konsantrasyon ve altında hücrelerin büyüme eğrilerinde artış görülmektedir. Bu grafiğe göre DBeQ optimum konsantrasyonu 1 μ M ve inkübasyon süresi 48 saat olarak belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.21.).



Şekil 4.21. HTR-8/SVneo hücre hatlarında farklı doz ve sürelerde DBeQ uygulamaları sonrası hücrelerin büyüme grafiği.

4.9. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında Western Blot Analizlerinin Değerlendirilmesi

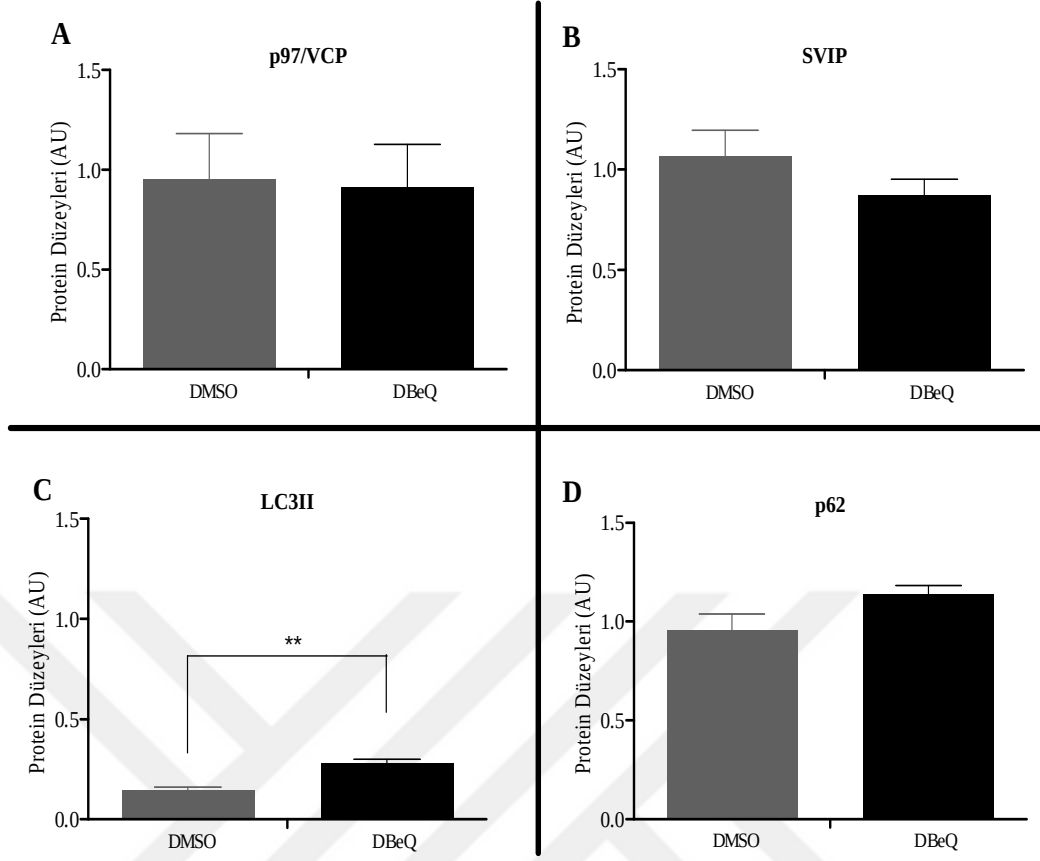
HTR-8/SVneo hücre hatlarında 48 saat süreyle 1 μ M DBeQ uygulama sonrası hücrelerde p97/VCP, SVIP, LC3II, p62 ve kontrol amaçlı kullanılan β -aktin protein ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla Western Blot analizleri yapılmıştır. Kontrol gruplarındaki hücrelere ise 48 saat süreyle 1 μ M DMSO uygulanmıştır. DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası protein ekspresyonları incelenmiştir. Western Blot analizi ile elde edilen bantlar proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre değerlendirilmiştir (Bkz. Şekil 4.22.).



Şekil 4.22. HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBE-Q uygulamaları sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

Hücrelere DMSO ve DBE-Q uygulamaları sonrası elde edilen bant görüntüleri Image J programı ile değerlendirildikten sonra veriler istatistiksel olarak Student's t testi ile değerlendirilmiş ve grafik üzerinde gösterilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Bkz. Şekil 4.23.).

HTR-8/SVneo hücre hatlarında DBE-Q uygulama sonrası DMSO verilen grup ile karşılaştırıldığında p97/VCP ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Bkz. Şekil 4.23.A) ($p:0,8947$). SVIP ekspresyonlarında DBE-Q uygulanan grupta azalma görülmüştür, ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Bkz. Şekil 4.23.B) ($p:0,2796$). LC3II ekspresyonları DMSO ve DBE-Q verilen gruplarda karşılaştırıldığında ise DBE-Q uygulama sonrası meydana gelen artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.23.C) ($p:0,0051$). p62 ekspresyonları değerlendirildiğinde ise DBE-Q verilen grupta artış görüldüğü grafikte görülmektedir. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Bkz. Şekil 4.23.D) ($p:0,1183$).

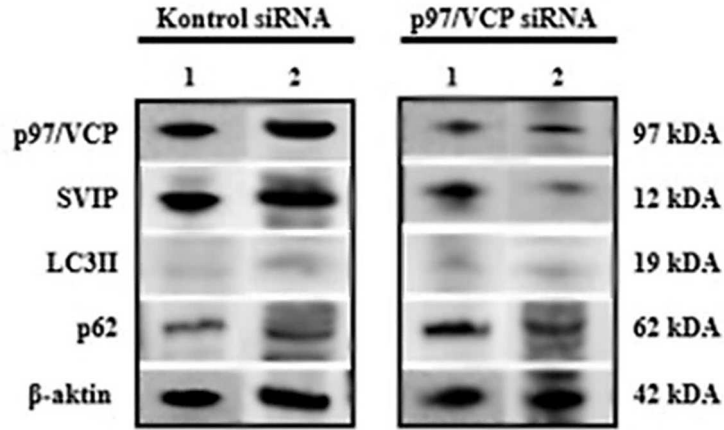


Şekil 4.23. HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBE9 uygulamaları sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 protein ekspresyonları (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP aktivitesini baskılayacak inhibitör uygulamasının yanı sıra p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarını baskılayacak p97/VCP ve SVIP siRNA'ler kullanılarak transfeksiyonlar yapılmış ve sonrasında p97/VCP, SVIP, LC3II, p62 ve β -aktin ekspresyonları karşılaştırılmıştır.

Hücrelerdeki p97/VCP genini susturmak amacıyla aynı anda 4 farklı p97/VCP siRNA kullanılmıştır. Bu transfeksiyon işlemi 48 saat süre sonunda sonlandırılmıştır. Aynı işlem SVIP siRNA'ler kullanılarak da gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyonlar sonrası p97/VCP, SVIP, LC3II, p62 ve β -aktin protein ekspresyonları yine 48 saat kontrol siRNA ile transfekte edilen gruplar ile karşılaştırılmıştır.

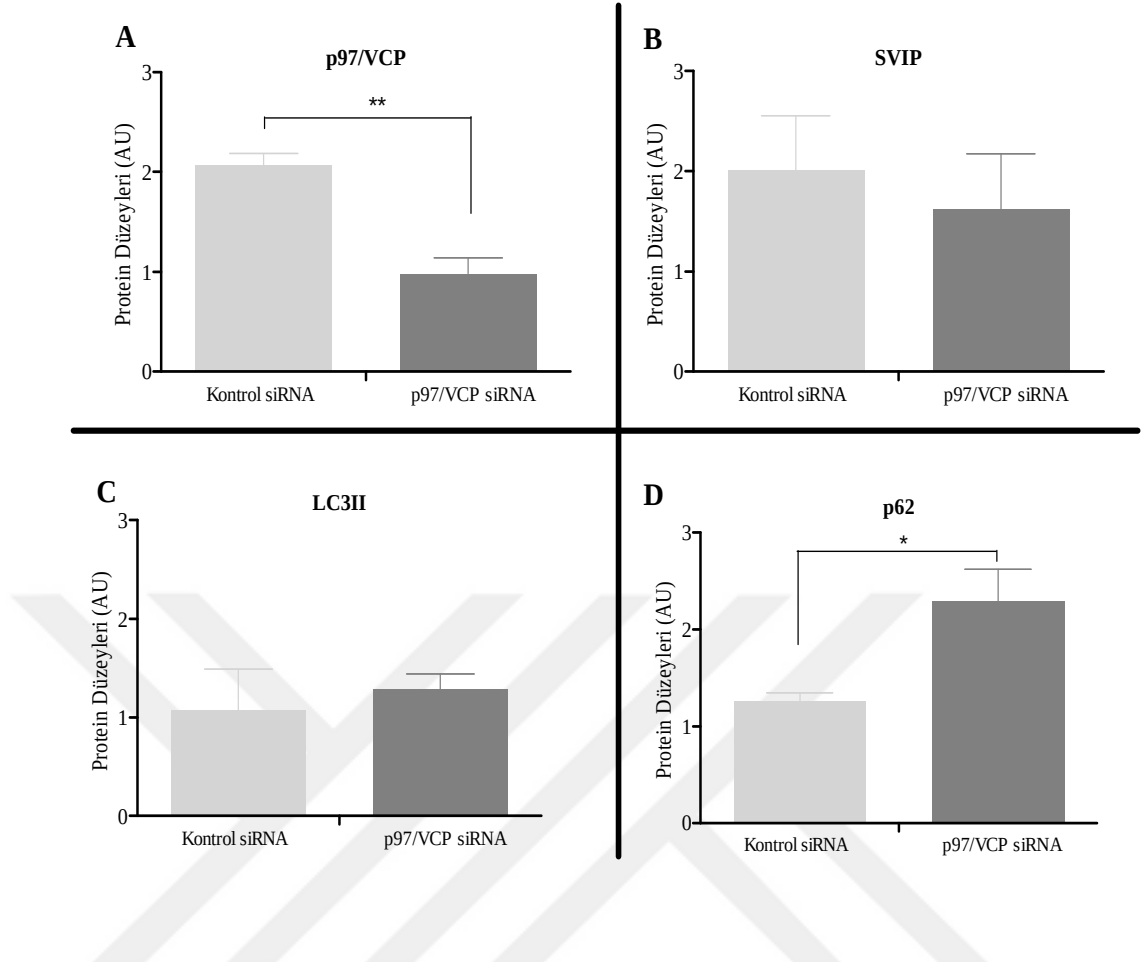
Hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası Western Blot analizlerinden elde edilen bantlar, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.24.).



Şekil 4.24. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA'ler ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

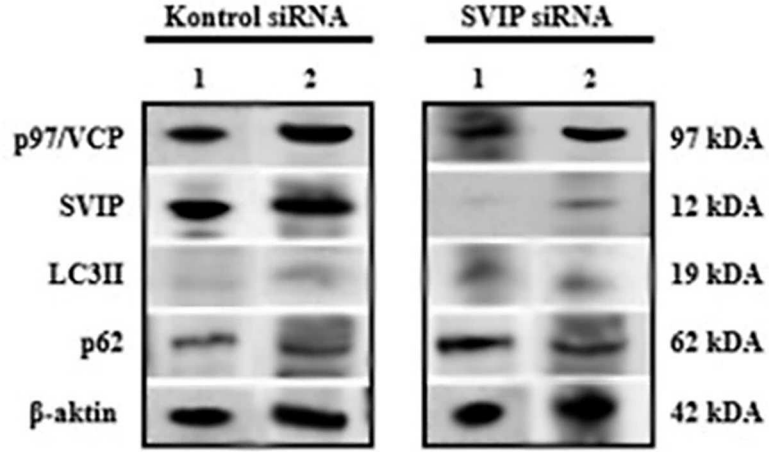
Hücrelerin kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA ile transfeksiyonları sonrası bant görüntüleri Image J programı ile değerlendirildikten sonra veriler istatistiksel olarak Student's t testi ile karşılaştırılmış ve grafik üzerinde gösterilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası protein ekspresyonları karşılaştırıldığında p97/VCP'nin azalışı istatistiksel olarak da anlamlıdır ($p:0,0053$). SVIP ekspresyonu ise p97/VCP siRNA verilen grupta azalmıştır ancak bu azalış anlamlı bulunmamıştır ($p:0,6378$). LC3II ekspresyonlarında anlamlı farklılıklar görülmemiştir ($p:0,6542$). Ancak p97/VCP siRNA ile transfekte grupta p62 ekspresyonlarında anlamlı bir artış izlenmektedir ($p:0,0399$) (Bkz. Şekil 4.25.).



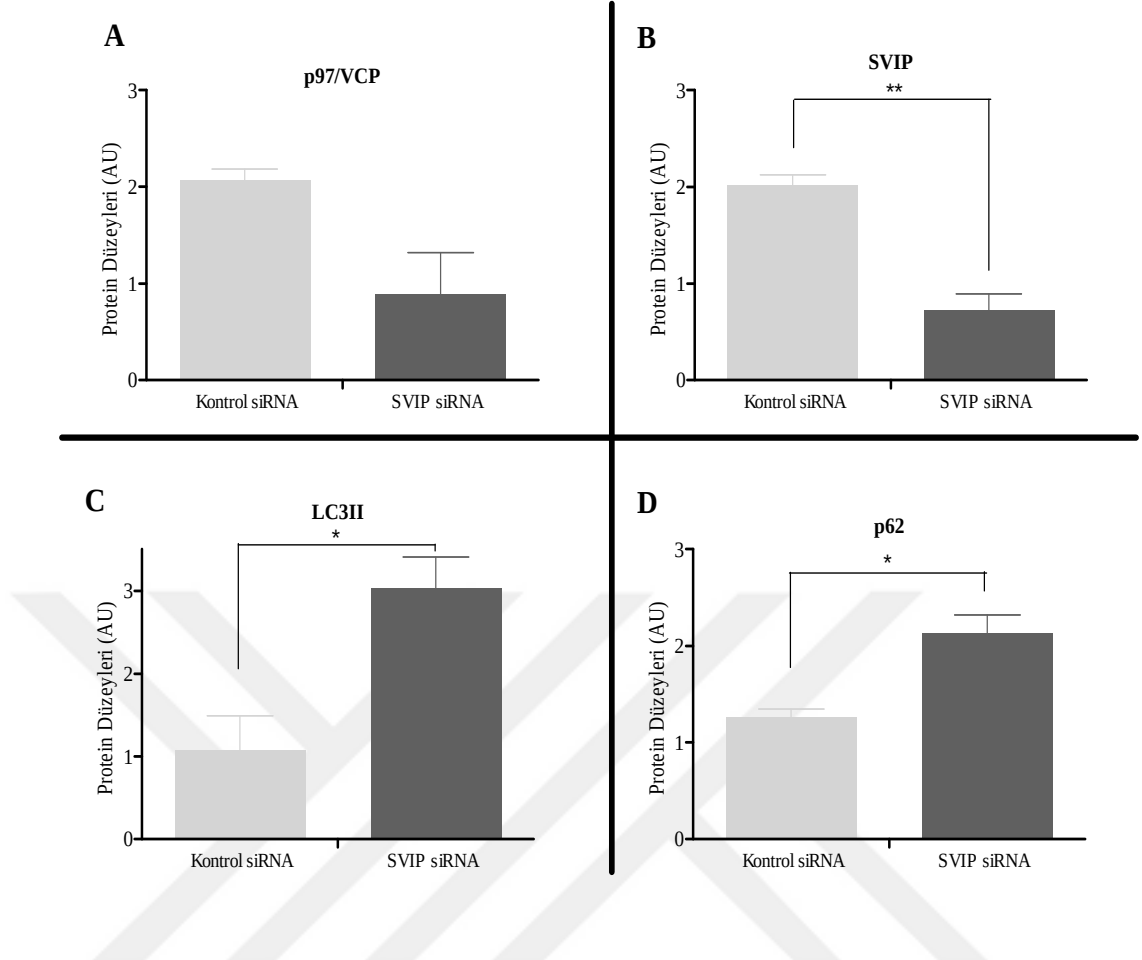
Şekil 4.25. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 protein ekspresyonları (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası Western Blot bant görüntüleri izlenmektedir (Bkz. Şekil 4.26.)



Şekil 4.26. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA’ler ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot analizi bant görüntüleri.

Protein ekspresyonları değerlendirildiğinde SVIP siRNA ile transfekte grupta p97/VCP ekspresyonlarında artış görüldüğü ancak istatistiksel olarak anlamlılığın olmadığı izlenmiştir ($p:0,0587$). SVIP ekspresyonlarındaki azalış ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p:0,0032$). LC3II ve p62 ekspresyonlarının SVIP siRNA ile transfekte gruplarda kontroller ile karşılaştırıldığında artışı açıkça görülmektedir. Bu artışlar istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p:0,0258$ ve $p:0,0129$) (Bkz. Şekil 4.27.).

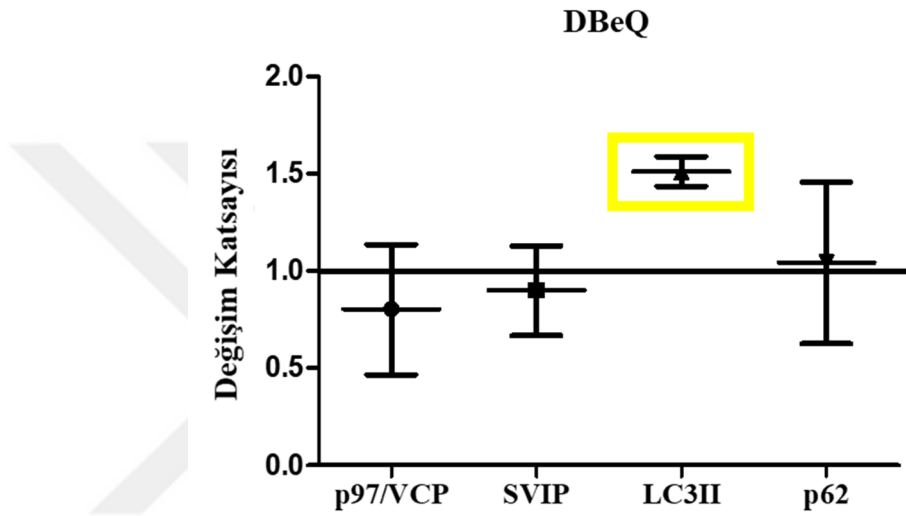


Şekil 4.27. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA ile transfeksiyonlar sonrası Western Blot karşılaştırma grafikleri. A) p97/VCP, B) SVIP, C) LC3II, D) p62 protein ekspresyonları (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

4.10. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında qRT-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi

HTR-8/SVneo hücre hatlarında inhibitör uygulamaları ve siRNA transfeksiyonları sonrası p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 gen ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacıyla qRT-PCR analizleri yapılmıştır. Analizler değerlendirilirken PSMD4 ve YWHAZ genleri referans olarak kullanılmıştır. Elde edilen kantitatif sonuçlar LightCycler 480 software 1.5'te analiz edildikten sonra istatistiksel değerlendirmeler yapıldı. Genlerin ekspresyonları değişim katsayılarına göre grafikler üzerinde gösterilmiştir. Analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

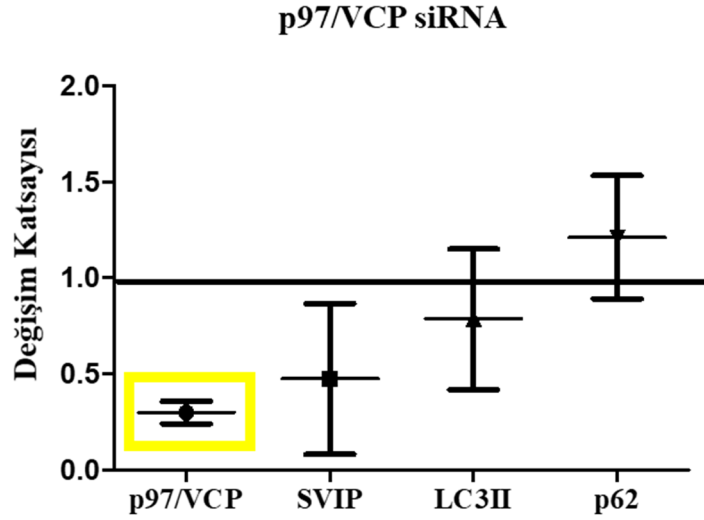
HTR-8/SVneo hücre hatları üzerinde 48 saat boyunca 1 μ M DBeQ ve kontrol amaçlı DMSO uygulamaları sonrası 3 tekrarlı qRT-PCR analizleri yapıldı. Sonuçta DBeQ uygulama sonrası p97/VCP (p:0,4163), SVIP (p:0,5339) ve p62 (p:0,8828) ekspresyonlarında istatistiksel anlamlı farklılıklar saptanmadı. Ancak LC3II ekspresyonları değerlendirildiğinde, Western Blot analiz sonuçlarıyla benzer şekilde, DBeQ uygulaması sonrası anlamlı olarak arttığı görülmüştür (p:0,0071) (Bkz. Şekil 4.28.).



Şekil 4.28. HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası qRT-PCR analizleri. (İstatistiksel anlamlılık (sarı): p<0,05).

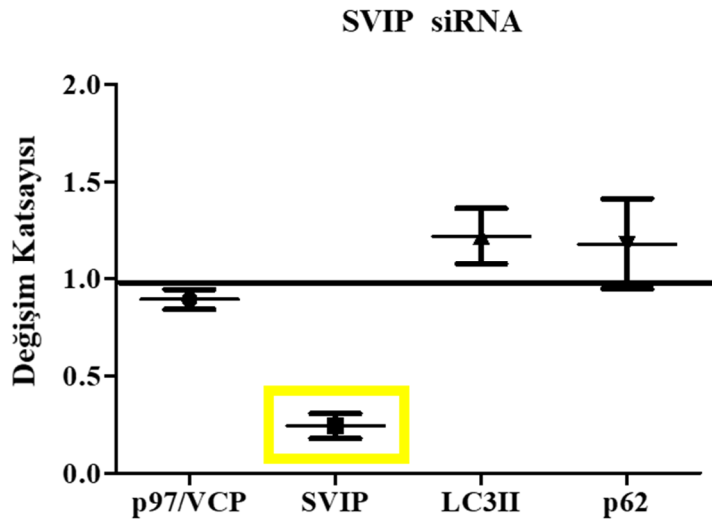
HTR-8/SVneo hücre hatları üzerinde kontrol siRNA, p97/VCP siRNA ve SVIP siRNA'ler ile 48 saat süre transfeksiyon işlemleri sonrası yine 3 tekrarlı qRT-PCR analizleri yapılmıştır. İstatistiksel olarak yapılan karşılaştırmalar grafikler üzerinde gösterildi.

Kontrol ve p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda, p97/VCP gen ekspresyonunun yaklaşık %70 oranında azaldığı belirlenmiştir (p:0,0378). SVIP (p:0,3078), LC3II (p:0,5609) ve p62 (p:0,5235) ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmadı (Bkz. Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası qRT-PCR analizleri. (İstatistiksel anlamlılık (sarı): $p < 0,05$).

Kontrol ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda ise SVIP gen ekspresyonunda yaklaşık %83 oranında bir azalma meydana gelmiştir ($p:0,0024$). Karşılaştırmalar sonucu p97/VCP ($p:0,0679$), LC3II ($p:0,1198$) ve p62 ($p:0,3152$) ekspresyonlarında ise istatistiksel farklılıklar görülmemiştir (Bkz. Şekil 4.30.).

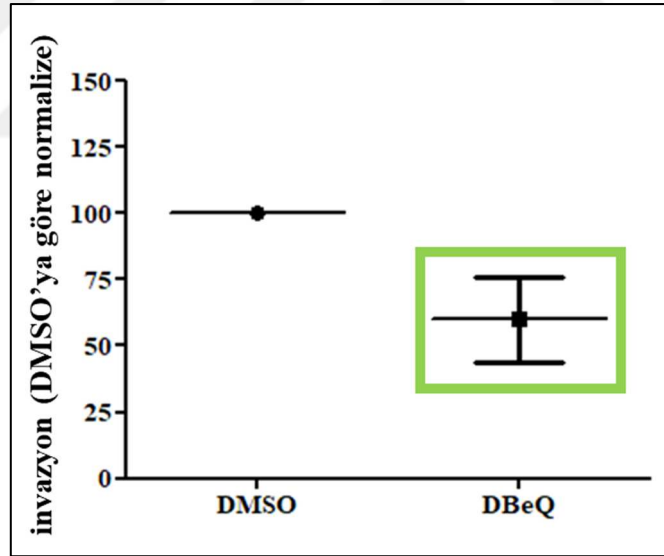


Şekil 4.30. HTR-8/SVneo hücre hatlarında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası RT-qRT-PCR analizleri. (İstatistiksel anlamlılık (sarı): $p < 0,05$).

4.11. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında Manuel İnvazyon Testleri

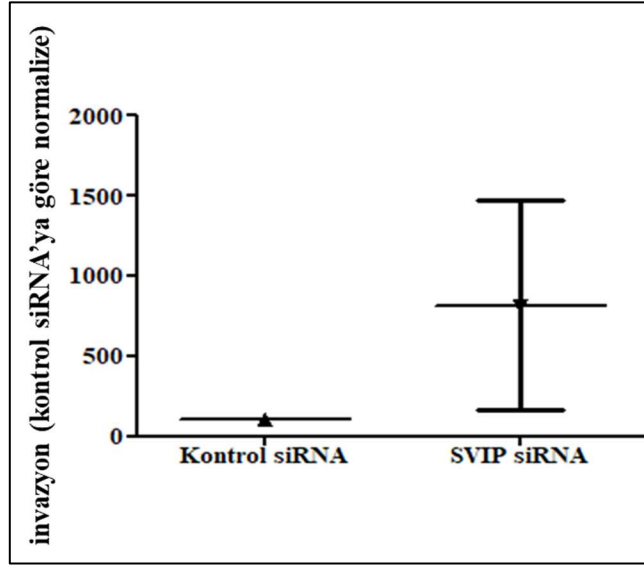
UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP'in HTR-8/SVneo hücre hatlarında invazyon ve migrasyon özelliklerine etkisi olup olmadığını saptamak için öncelikle manuel invazyon testleri yapılmıştır. DBeQ inhibitör uygulaması ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası hücrelerin invazyonlarındaki değişimler istatistiksel olarak değerlendirildi.

HTR-8/SVneo hücre hatlarına 1 μ M DBeQ ve kontrol grubuna 1 μ M DMSO eklendikten sonra insertler yardımıyla 7 tekrarlı manuel invazyon testleri gerçekleştirildi. İnkübasyon 48 saat süreyle yapıldı ve ardından invaze olan hücrelerin çekirdekleri DAPI kullanılarak immüno Floresan mikroskopunda sayıldı. Rastgele seçilen 9 farklı alandaki hücre sayıları kontrol amaçlı uygulanan DMSO grupları ile karşılaştırıldı. DBeQ uygulaması sonrası hücrelerin invazyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p:0,0472$) (Bkz. Şekil 4.31.).



Şekil 4.31. HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBeQ uygulamaları sonrası manuel invazyon testlerinin karşılaştırılması. (İstatistiksel anlamlılık (yeşil): $p<0,05$).

HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol ve SVIP siRNA transfeksiyonları 48 saat süre sonunda sonlandırılmıştır. Transfekte edilen hücreler 48 saat süre boyunca invazyona bırakılmıştır. Yapılan istatistiksel sonuçlara göre iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p:0,3148$) (Bkz. Şekil 4.32.).

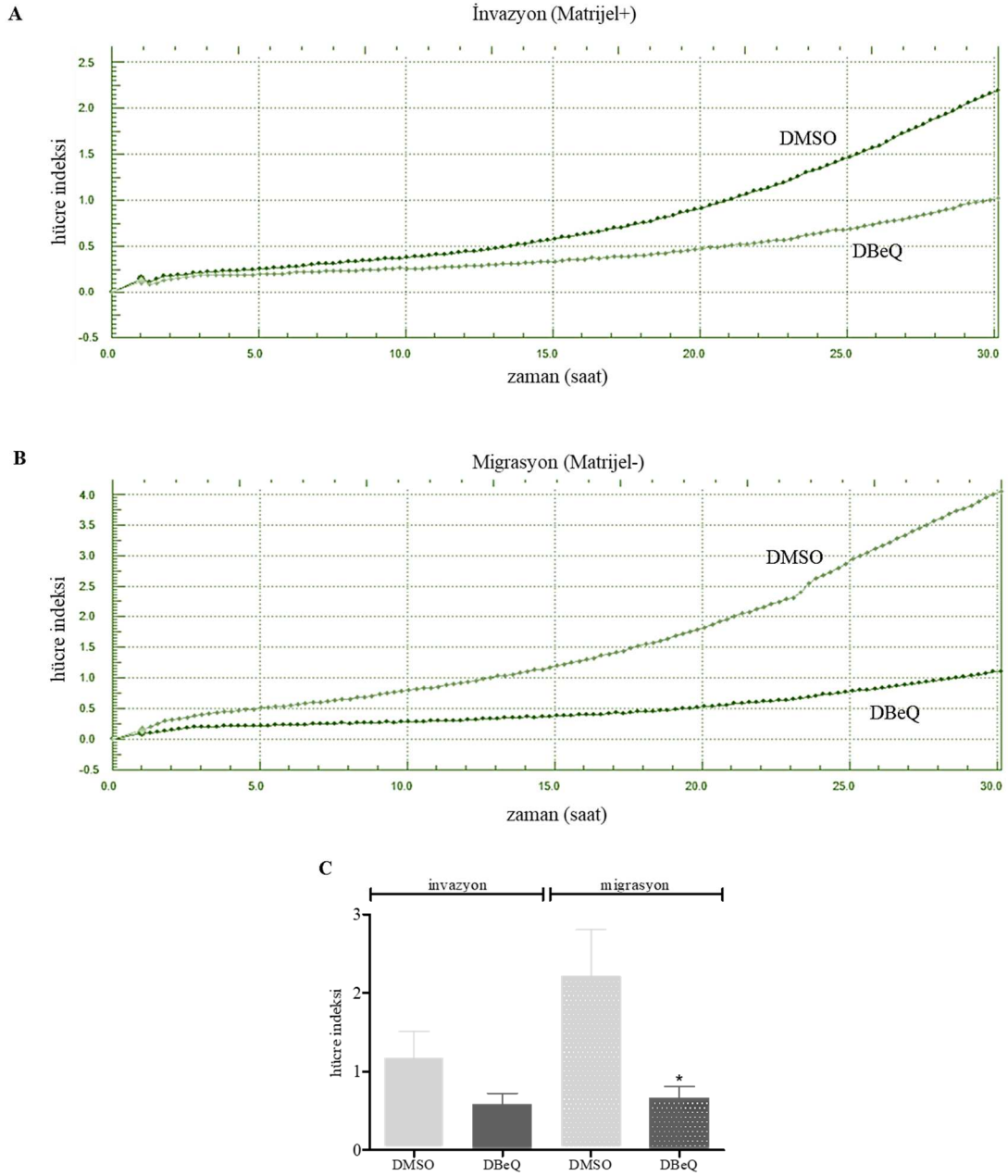


Şekil 4.32. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası manuel invazyon testlerinin karşılaştırılması. (İstatistiksel anlamlılık: $p < 0,05$).

4.12. HTR-8/SVneo Hücre Hatlarında xCELLigence RTCA (Gerçek Zamanlı Hücre Analiz Sistemi) ile İnvazyon ve Migrasyon Analizleri

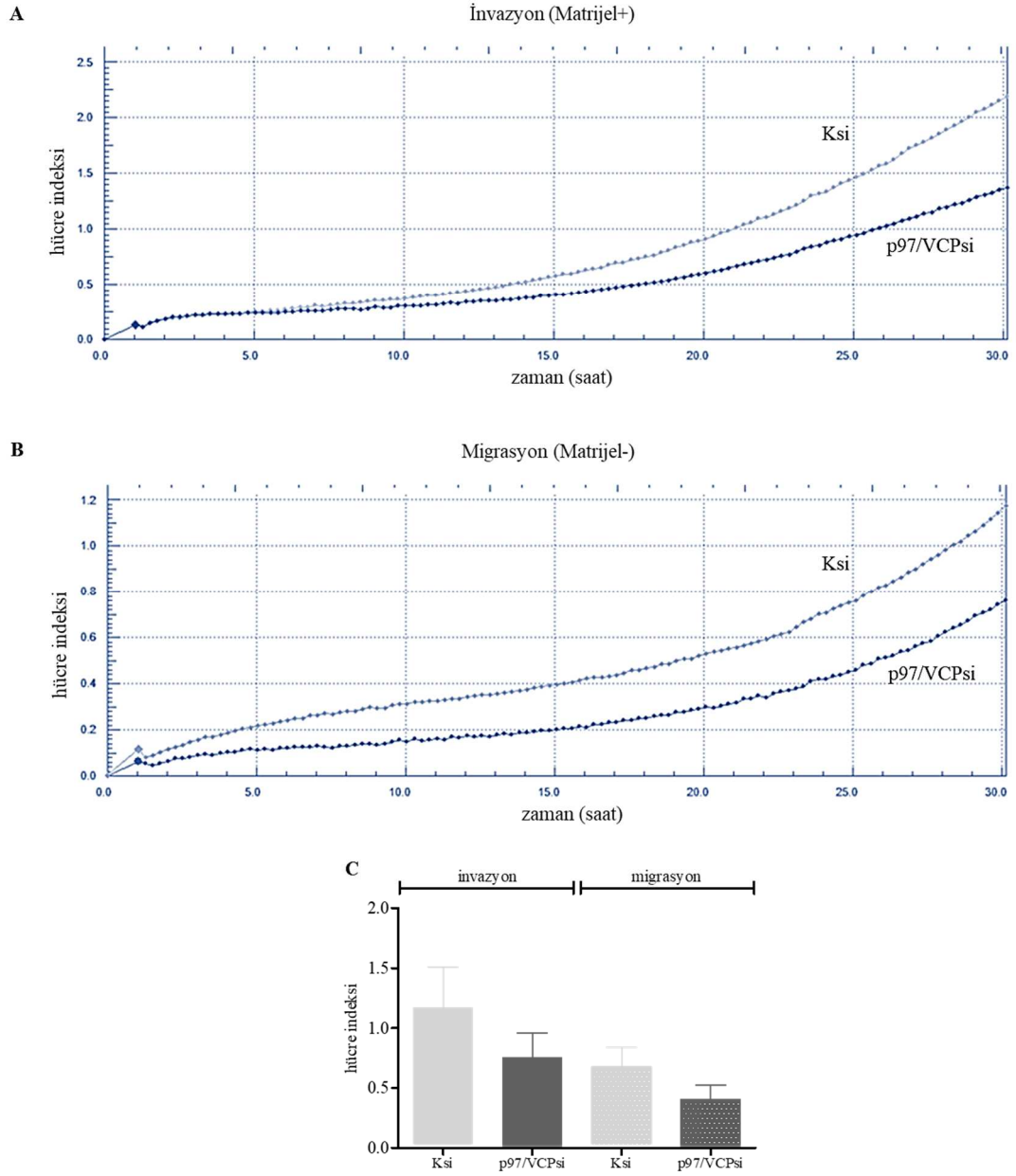
HTR-8/SVneo hücre hatlarında invazyon ve migrasyon özelliklerinin belirlenmesi amacıyla manuel invazyon testlerine ek olarak xCELLigence RTCA kullanıldı. CIM 16 kuyucuklu hücre plaklarında analizler 3 tekrarlı yapılmıştır. Matrijel eklenen kuyucuklarda invazyon analizleri, matrijel eklenmeyen kuyucuklarda ise migrasyon analizleri gerçekleştirildi. İlk 30 saatlik dilimdeki hücre indekslerinin ortalamalarına göre yapılan karşılaştırmalar grafikler üzerinde gösterildi. İstatistiksel değerlendirmelerde 10., 20. ve 30. saatlerdeki hücre indeksi verileri kullanılmıştır.

Hücrelere 1 μ M DBeQ eklendikten sonra DMSO uygulanan kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, invazyonlarında belirgin şekilde azalma gözlenmiştir. Hücrelerin migrasyonlarında da invazyonlarıyla korele bir azalma olmuştur. Sonuçta invazyonlardaki azalmaların anlamlı olmadığı ($p:0,1452$) ancak migrasyonlardaki azalmaların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu ($p:0,0307$) görülmüştür (Bkz. Şekil 4.33.).



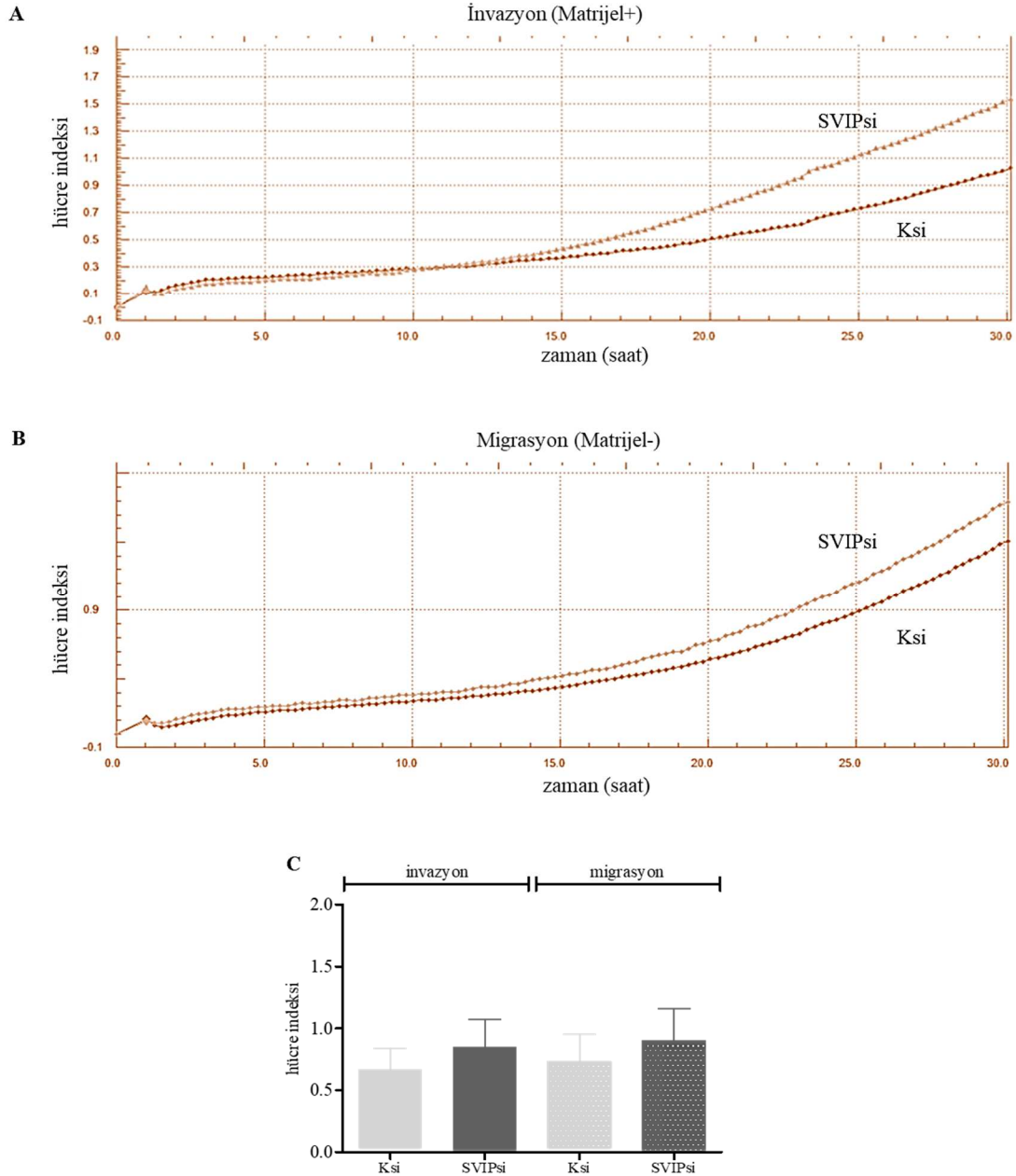
Şekil 4.33. HTR-8/SVneo hücre hatlarında DMSO ve DBE-Q uygulamaları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması. A) Hücrelerin invazyonları, B) Hücrelerin migrasyonları, C) İstatistiksel karşılaştırma grafiği (İstatistiksel anlamlılık (yıldız): $p < 0,05$).

Hücre hatları p97/VCP siRNA ile transfekte edildikten sonra ilk 30 saatlik invazyon ve migrasyon özelliklerinde ise inhibitör uygulamasıyla benzer bir sonuç ortaya çıkmıştır. İnvazyon ve migrasyonlarda p97/VCP siRNA transfeksiyonu sonrası kontrol siRNA'ler ile karşılaştırıldığında azalmalar meydana gelmiştir. Ancak bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p:0,3283$ ve $p:0,2075$) (Bkz. Şekil 4.34.).



Şekil 4.34. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve p97/VCP siRNA transfeksiyonları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması. A) Hücrelerin invazyonları, B) Hücrelerin migrasyonları, C) İstatistiksel karşılaştırma grafiği (İstatistiksel anlamlılık: $p < 0,05$).

Hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA'ler ile gerçekleştirilen transfeksiyonlar sonrası da invazyon ve migrasyon özellikleri değerlendirilmiştir. SVIP siRNA ile transfekte gruplar kontroller ile karşılaştırıldığında hücrelerin invazyonlarında artış görülmüştür. Migrasyonlarında da invazyonları ile benzer bir şekilde artış meydana gelmiştir. Ancak yapılan istatistiksel değerlendirmelerde anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p:0,5413$ ve $p:0,6363$) (Bkz. Şekil 4.35.).



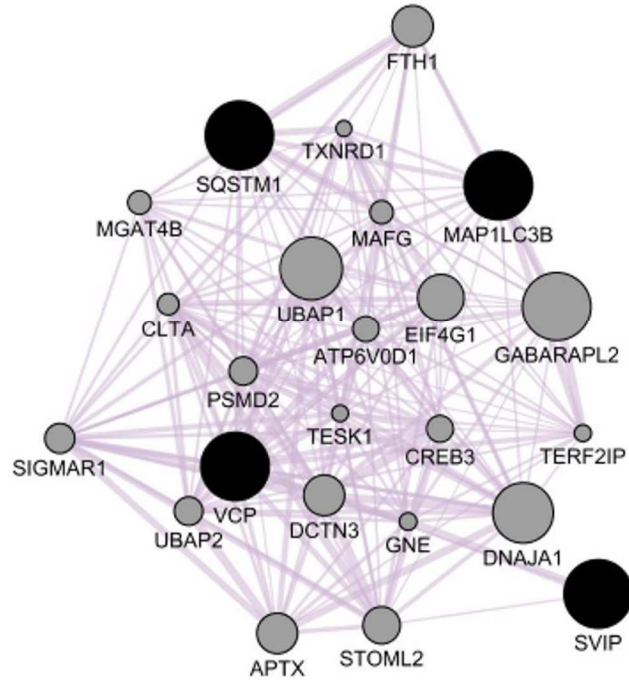
Şekil 4.35. HTR-8/SVneo hücre hatlarında kontrol siRNA ve SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların karşılaştırılması. A) Hücrelerin invazyonları, B) Hücrelerin migrasyonları, C) İstatistiksel karşılaştırma grafiği (İstatistiksel anlamlılık: $p<0,05$).

Çalışmanın 2. aşamasında HTR-8/SVneo hücre hatlarında UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının histolojik incelemeleri yapılmıştır. Ardından fonksiyonel çalışmalar için hücrelerde DBEq inhibitör uygulaması ve p97/VCP-SVIP siRNA'lar ile transfeksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Yapılan protein ve gen düzeyindeki analizler sonucunda DBEq uygulamasının p97/VCP ekspresyonlarında değişiklik olmadan SVIP'te azalmaya yol açtığı, otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 ekspresyonlarında ise artışa sebep olduğu görülmüştür. Aynı zamanda DBEq uygulaması sonrası hücrelerde invazyon ve migrasyonların anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Hücrelerde p97/VCP ve SVIP siRNA'lar ile transfeksiyon sonrası yine LC3II ve p62 ekspresyonlarında artış olduğu görülmüştür. Ayrıca p97VCP siRNA transfekte edilen hücre gruplarında invazyon ve migrasyonların azaldığı, SVIP siRNA transfekte grupta ise arttığı izlenmiştir. Ancak transfeksiyonlar sonrası invazyon ve migrasyonlardaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

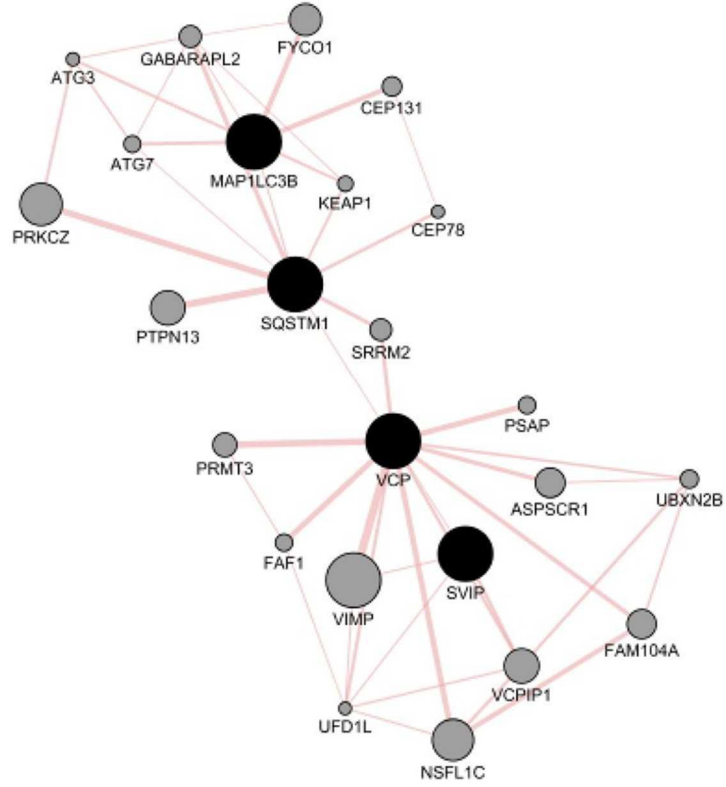
4.13. Genlerin Ağ Analizlerinin Değerlendirilmesi

Genlerin birbirleriyle olan etkileşimlerinin gösterilmesi amacıyla Cytoscape ağ analizleri yapıldı. p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genlerinin kendi aralarında ve bu genlerin 20 farklı gen ile birlikte ekspresyonlarının görüldüğü ağ analizi görselleştirilmiştir (Bkz. Şekil 4.36.A). Genler arasındaki fiziksel etkileşimlerin görüldüğü ağ analizinde ise bu 4 genin kendi aralarında ve 20 farklı gen ile ilişkileri görülmektedir (Bkz. Şekil 4.36.B). Yapılan bu iki ağ analizi sonuçlarında görülen GABARAPL2 (GABA Type A Receptor Associated Protein Like 2) geninin; p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genleri ile olan etkileşimleri dikkati çekmiştir.

A



B



Şekil 4.36. Genlerin ağ analizleri. A) p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genlerinin kendi aralarında ve diğer genler ile birlikte ekspresyonlarının görüldüğü ağ analizi, B) Genler arası fiziksel etkileşimlerin gösterildiği ağ analizi.

5. TARTIŞMA

Plasenta ilk gelişim gösteren ve en büyük fetal organdır. Plasenta hem fetüsün hem de annenin sağlığında merkezi bir rol oynar (17).

İnsanda gebelik süreci 1. trimester (1-12 hafta), 2. trimester (13-28 hafta) ve 3. trimester (29-40 hafta) gelişim evrelerini içerir (2). Bu evrelerde plasentanın gelişimi, yapı ve fonksiyonlarındaki değişiklikler önemli rol oynar. Plasentanın erken gelişiminde embriyonun implantasyon süreci karmaşık biyolojik etkileşimleri içerir. Blastosist uterusu fertilizasyondan yaklaşık 7-10. günler arasında implante olur. Bu süreçte apozisyon, adezyon ve invazyon olayları gerçekleşir (100).

Blastosist oluşumu sırasında hücre popülasyonları meydana gelir. Bunların bir kısmı tüm plasental villusların dış kısmını oluşturan villöz sitotrofoblastlar ile çok çekirdekli sinsisyotrofoblastların bulunduğu villöz trofoblastlardır. Diğerleri ise tutundurucu villusların distal sütunlarından farklılaşan, uterus dokularını invaze eden ve miyometriyumun iç üçte birlik kısmına kadar ulaşabilen EVT'lerdir. EVT invazyonunun düzenli ve sıkı bir şekilde kontrol edilmesi plasenta gelişimi ve uterusu fetüsün büyümesi için gereklidir (29). Plasental yetersizlik durumunda görülen bozuklukların daha iyi anlaşılabilmesi için EVT'lerin invazyon ve migrasyon özelliklerine etki eden faktörlerin araştırılması gerekmektedir.

İnsanda plasenta yapısı gebeliğin ilerleyen dönemlerinde, fetüsün büyümesi ile birlikte genişler ve kalınlaşır. Aynı zamanda toplam villus yüzeyi de genişler. 1. Trimester plasentada görülen mezenkimal tip villuslardaki kalın trofoblastik hücre tabakası 2. trimesterde inceler. Bağ dokusunda bulunan Hofbauer hücreleri ise gebelik dönemi boyunca seyrekleşir. 2. Trimesterde olgunlaşmamış ara villusların yerini, 3. trimesterde olgun ara villuslar ve terminal villuslar alır. Aynı zamanda plasentada gebeliğin 12. haftasından itibaren kök villuslar görülebilir. 3. Trimesterde villusların büyük bölümünü oluşturan terminal villuslarda trofoblastik hücre tabakası oldukça inceler. Sinsisyotrofoblastların çoğunlukta görüldüğü bu villuslarda sitotrofoblast hücreleri yassılaşır kesintili hale gelir. Aynı zamanda artan fetal kapillerler sinsisyotrofoblastlara yakınlaşır.

Trofoblast invazyonundaki değişiklikler preeklampsi ve IUGR gibi gebelik patolojileriyle ilişkilendirilmiştir (29). Anne ve bebek ölümlerine sebep olabilen bu önemli hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu hastalıklarda hastalığa sebep olan ve/veya hastalık sonucu oluşabilecek birçok neden çalışılmaktadır.

Gebelik sürecinde görülebilen preeklampsi, normotansif bir gebe kadında 20. haftadan sonra hipertansiyona proteinüri gibi belirtilerin eşlik etmesi sonucu teşhis edilebilmektedir (101). Bu durum için etkili bir tedavi yolu bulunmamaktadır. Klinisyenler genellikle plasentayı alarak tedavi yoluna giderler ancak bu durumdan erken doğum sebebiyle yeni doğanın ve annenin sağlığı etkilenebilir. Preeklampsi gibi gebelik döneminde oluşabilecek hastalıkların tedavisinde plasentadaki fizyolojik değişimlerin aydınlatılması önemli olacaktır.

UPS, protein yıkımını düzenleyen önemli bir mekanizmadır. Hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalmasının düzenlenmesinde önemli rol oynar ve bu sistemin düzensizliği genellikle kanser ve nörolojik hastalıklar gibi patolojilere yol açmaktadır (102). Şaperonlar ise, protein sentezinden sonra proteinlerin bağlanma ve katlanmalarında, makromoleküllerin oluşmasında ve yanlış katlanmış proteinlerin birikiminin önlenmesinde etkin rol oynarlar (103). Son zamanlarda, şaperonlar ve protein yıkımı arasında hem otofaji hem de UPS ile ilişkilendirilerek bağlantılar kurulmuştur (104).

Birçok hücresel işlemin düzenlenmesinden sorumlu olan p97/VCP, ATPaz ailesine ait bir proteindir. Memeli hücrelerinde p97/VCP; endoplazmik retikulum, golgi, mitokondriyon ve endozom gibi organellerin zarlarıyla ilişkilidir ve çoğunlukla sitoplazmada lokalizedir. Çekirdekte de bulunan p97/VCP, kromatinle ilişkili süreçlerde ve nükleer protein kalite kontrolünde rol oynamaktadır (105). UPS'de şaperon protein olarak rol oynayan p97/VCP, aynı zamanda otofajide otofagozom maturasyonu basamağında görev alarak protein homeostazının devamını sağlar (67).

Yapılan çalışmalarda insanda bazı kanser türlerinde p97/VCP mRNA ekspresyon düzeyinde artış görülmüştür. Anderson ve ark. tarafından p97/VCP inhibitörlerinin kansere karşı potansiyel bir ilaç olarak kullanılabileceği öne

sürülmektedir (106). p97/VCP'nin bunun gibi birçok fonksiyonu bilinmesine rağmen plasentanın erken gelişim evrelerindeki rolleri bilinmemektedir.

SVIP, UPS'de rol oynayan ve p97/VCP'ye direk bağlanabilen bir adaptör proteindir (12). Literatürde SVIP ile yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Fakat p97/VCP ve SVIP'in kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonlarında etkin moleküller olduğu bildirilmiştir (14,15). Yapılan bu çalışmalar kanser hücrelerinin invazyon ve migrasyonlarında etkin olan UPS'de görevli p97/VCP ve SVIP proteinlerinin, insan plasentasında ekstrasvillöz trofoblastların invazyon ve migrasyonunda da etkin olabileceğini düşündürmüştür.

Otofajik belirteçlerden LC3II ve p62 proteinleri ise, çalışmalarda otofaji aktivitesini gösterebilmek için sıklıkla kullanılır. LC3II otofagozom oluşumunda rol oynar. p62 ise seçici bir otofajik substrat olarak görev yapmaktadır. LC3II ve p62'nin kompleks düzenlemesinin kanserlerdeki otofaji aktivitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (92).

İnsan preeklampitik plasentalarında p97/VCP ve otofajide görevli diğer proteinler (Ubikütin, LC3II, p62, Lamp1 ve Lamp2) arasındaki ilişki ilk defa 2018 yılındaki çalışmayla gösterilmiştir. Normal ve preeklampitik plasentalardaki protein ekspresyonları karşılaştırıldığında p97/VCP'nin preeklampitik plasentalarda azaldığı izlenmiştir. Ubikütin ve otofagozomal proteinlerin (LC3II ve p62) ekspresyonlarında ise artış görülmüştür (13). Ancak p97/VCP ve ona bağlanabilen SVIP'in üç farklı trimestere ait insan plasentalarındaki ekspresyon düzeylerinin karşılaştırıldığı ve özellikle de ilk trimesterdeki plasantasyon sırasında EVT'lerin invazyonu ve migrasyonlarındaki rolleri ile ilgili araştırmalar literatürde mevcut değildir. Bu nedenle çalışmanın ilk aşamasında UPS'de rol oynayan p97/VCP ve SVIP ile otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 ekspresyonlarının incelenmesi için üç farklı trimestere ait insan plasentaları kullanılmıştır.

Yapılan analizlerde farklı trimesterlere ait insan plasentalarında p97/VCP protein ekspresyonlarının villöz sitotrofoblastlardaki yoğunluğu dikkati çekmiştir. Sinsisyotrofoblastlarda ve bağ dokusu hücrelerinde de p97/VCP ekspresyonları görülmüştür. Protein ve gen düzeyindeki analizler sonucunda 1. trimesterdeki yoğun

p97/VCP ekspresyonlarının 2. trimesterde anlamlı olarak azaldığı ve gebeliğin ilerleyen döneminde yeniden arttığı izlenmiştir.

Farklı trimesterlere ait insan plasentalarında SVIP protein ekspresyonları ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir. SVIP ekspresyonlarının 1. ve 2. trimester koryonik villuslarda özellikle sitotrofoblast membranlarında yoğun olduğu görülmüştür. Ayrıca sinsisyotrofoblastlarda ve bağ dokusu hücrelerinde hafif SVIP ekspresyonları izlenmiştir. 3. Trimesterde ise azalmış sitotrofoblastların yanında incelmış sinsisyotrofoblast tabakasında da ekspresyonlar belirgindir. İmmünohistokimya sonrası çekirdek ve sitoplazma boyanmalarına göre yapılan istatistiklerde SVIP ekspresyonlarının gebeliğin ilerleyen dönemlerinde arttığı izlenmiştir. Ancak protein ve gen analizlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar görülmemiştir. Bu sonuçlarda maternal faktörlerin etkisi olabilir.

Sonuçta UPS proteinlerinden p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının gebelik boyunca trimesterlerdeki artış ve azalışlarının benzer olduğu görülmüştür. Özellikle 1. trimesterde plasentanın erken gelişiminde bu proteinlerin ekspresyonlarının fazla olması dikkati çekmiştir. Aynı zamanda koryonik villuslardaki kök hücre gibi görev yapan sitotrofoblast hücrelerindeki yoğun ekspresyonları izlenmiştir. Bunlara ek olarak, sitotrofoblastlardan farklılaşan EVT'lerde p97/VCP ve SVIP ekspresyonları görülmüştür. Elde edilen bulgular bu iki proteinin plasentanın gelişiminde rol oynadığını göstermektedir.

Hung ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada otofaji ile ilişkili beclin-1, LC3II ve DRAM (DNA Damage Regulated Autophagy Modulator) gen ekspresyonlarının normal doğum gebeliklerinin farklı dönemlerinde değişmediği izlenmiştir. Sezaryen ile doğum sonrası plasentalardaki LC3II ekspresyonları karşılaştırıldığında ise 3. trimesterde normal doğuma göre daha az olduğu görülmüştür (107). Bu çalışmada otofajide görevli LC3II ve p62 ekspresyonları her üç trimestere ait insan plasentalarında değerlendirilmiştir. Koryonik villuslardaki noktasal ekspresyonların sitotrofoblastlardaki yoğunluğu dikkati çekmiştir. Aynı zamanda sinsisyotrofoblastlarda ve bağ dokusu hücrelerinde belirgin ekspresyonlar izlenmiştir. Yapılan protein ve gen analizleri sonucunda 1. trimesterde az görülen LC3II ve p62 ekspresyonlarında gebelik ilerledikçe artış görülmüştür.

Literatürdeki çalışmalarda trofoblastların invazyon ve migrasyon özelliklerini incelemek için EVT'lerin izole edildiği plasental eksplantlar ve hücre hatları kullanılmaktadır (107). Farklı plasental hücre hatları arasında, retroviral vektörlerle enfekte edilmiş 1. trimester EVT'lerden geliştirilen HTR-8/SVneo, invazyon ve migrasyon özelliklerini incelemek için en yaygın kullanılan hücre hatları olmaya devam etmektedir. Bu çalışmanın 2. aşamasında fonksiyonel deneyler yapabilmek amacıyla da HTR-8/SVneo hücre hatları kullanılmıştır.

HTR-8/SVneo hücre hatlarında ilk kez gösterilen p97/VCP ve SVIP protein ekspresyonları değerlendirildiğinde hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında yoğun olduğu izlenmiştir. LC3II ve p62 ekspresyonlarının ise özellikle sitoplazmalarda noktasal ve şiddetli olduğu görülmüştür. Bunun yanında çekirdeklerdeki hafif noktasal ekspresyonlar da izlenmiştir.

Chou ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ATPaz aktivitesinin inhibitörlerini belirlemek amacıyla taramalar gerçekleştirilmiştir (81). Bir p97/VCP inhibitörü olan DBE_Q; seçici, güçlü, geri dönüşümlü ve ATP-kompetitif bir inhibitör olarak tanımlanmıştır. DBE_Q, ubikütin bağımlı proteolitik yıkım ve endoplazmik retikulum ile ilişkili yıkımın yanı sıra otofagozom maturasyonu dahil birden fazla işlemi bloke edebilmektedir. DBE_Q hem D1 hem de D2 ATPaz alanlarını hedeflemektedir (11). Diğer bir p97/VCP inhibitörü olan ML240, D2 ATPaz alanını hedefler. NMS-873 ise güçlü kovalent olmayan, ATP-kompetitif olmayan allosterik bir inhibitördür. Bu inhibitör katlanmamış protein yanıtını aktive eder, otofajiyi inhibe eder ve hücre ölümünü indükler (108). OSS_L_325096 ise DBE_Q ile benzer kimyasal özelliklere sahip bir diğer p97/VCP inhibitörüdür (109).

İnsan karaciğer kanseri hücre hatları (HepG2) ile yapılan bir çalışmada membranla ilişkili ERAD substratlarını tutan CB-5083 inhibitörü, 6 saat süresince 5 µM dozda uygulanmıştır (109). Over kanseri hücre hatlarında ise DBE_Q, ML240 ve CB-5083 farklı dozlarda 48 saate kadar uygulanmıştır (11). Fare testis kökenli Sertoli hücre hatları ile yapılan çalışmada ise 3 saat boyunca 5 µM, 10 µM ve 15 µM DBE_Q uygulamaları sonrası hücrelerdeki vakuolizasyonun en fazla 15 µM konsantrasyonda olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bir grup hücre p97/VCP siRNA ile transfekte

edilmiştir. Bu uygulamalar sonucunda hücrelerdeki noktasal LC3II ve p62 protein ekspresyonlarının istatistiksel olarak arttığı izlenmiştir (85).

Yapılan başka bir çalışmada ise HTR-8/SVneo hücre hatlarında 24 saat titanyum dioksit nanopartikül uygulaması sonrası LC3II ve p62 ekspresyonlarında artış görülmüştür (110).

Bu çalışmada da p97/VCP aktivitesini bloke etmek amacıyla DBeQ inhibitörü kullanılmıştır. HTR-8/SVneo hücre hatları üzerinde öncelikle canlılık ve proliferasyon analizleri yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki DBeQ uygulamaları maksimum 72 saat süreyle yapılmıştır. Sonuç olarak 10 μ M ve 5 μ M DBeQ konsantrasyonlarında hücrelerin yaşam sürelerinin kısa olduğu görülmüştür. Bu dozlar hücreler için fazla toksik olduğundan çalışmada tercih edilmemiştir. 2,5 μ M konsantrasyon ve altında ise hücrelerin büyüme eğrilerinde artış olduğu izlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildikten sonra HTR-8/SVneo hücre hatları için DBeQ optimum konsantrasyonu 1 μ M ve inkübasyon süresi ise 48 saat olarak belirlenmiştir.

HTR-8/SVneo hücre hatlarında DBeQ uygulaması sonrası DMSO kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, protein ve gen analizlerine göre p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir. Ancak DBeQ, p97/VCP'nin aktivitesini bloke ederek otofajide görevli LC3II ve p62 proteinlerinin birikimine yol açmıştır.

Bu çalışmada DBeQ inhibitörü uygulamasının yanında p97/VCP ve SVIP genlerinin susturulması amacıyla siRNA'ler ile transfeksiyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. İki gen için 4 farklı siRNA bir arada kullanılmıştır. Transfeksiyon işlemleri 48 saat süre sonunda sonlandırılmıştır. HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP siRNA'ler ile transfeksiyon sonrası kontrol gruplarına göre p97/VCP ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmüştür. SVIP ekspresyonlarında ise görülen azalma anlamlı değildir. Otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 protein ekspresyonlarında ise artış görüldü. Gen analizlerinde ise yine p97/VCP ekspresyonlarındaki azalma anlamlı bulunmuştur. SVIP, LC3II ve p62 ekspresyonlarında ise anlamlı değişiklikler izlenmemiştir.

2011 yılında yapılan bir çalışmada, Hela hücre hatlarında SVIP siRNA transfeksiyonu sonrası, LC3 lipidasyonunun azaldığı ve p62 protein ve mRNA seviyelerinin arttığı belirlenmiştir (87). Bu çalışmada ise HTR-8/SVneo hücre hatlarında SVIP siRNA'ler ile transfeksiyon sonrası kontrol grupları ile karşılaştırıldığında SVIP protein ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalma izlenmiştir. Ancak p97/VCP ekspresyonlarındaki azalış anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca LC3II ve p62 protein ekspresyonlarında artışlar meydana gelmiştir. SVIP'in gen ekspresyonları bulgularında ise yine anlamlı azalma dikkati çekmiştir. P97/VCP, LC3II ve p62 ekspresyonlarında ise istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler bulunmamıştır.

İnvaziv özelliğe sahip HTR-8/SVneo hücre hatlarında DBEq inhibitör uygulaması ve p97/VCP-SVIP siRNA transfeksiyonları sonrası invazyon ve migrasyon özelliklerinin değişip değişmediğini gösterebilmek amacıyla manuel invazyon testleri ve xCELLigence RTCA kullanılmıştır.

Walworth ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada p97/VCP inhibitörlerinden DBEq ve NMS-873, insan küçük hücreli olmayan akciğer karsinomu hücre hatları (H1299) üzerindeki invazyon ve migrasyonlarına etkileri gösterilmiştir. İnhibitörler 25 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarda ve 12 saat boyunca uygulandıktan sonra Infinity Analiz Software sistemi kullanılarak migrasyonları görüntülenmiştir. Sonuçta DBEq uygulaması sonrası, kontrol amaçlı kullanılan DMSO ve NMS-873 inhibitör uygulamaları ile karşılaştırıldığında migrasyonların engellendiği görülmüştür. Aynı zamanda hücrelere dendrimer ile kapsüllenmiş DBEq uygulamaları yapılmış ve insertler kullanılarak manuel invazyon testleri gerçekleştirilmiş. Kontrol grupları ile karşılaştırıldıklarında hücrelerin invazyonlarında azalma olduğu izlenmiştir (111). Bu çalışmada ise HTR-8/SVneo hücre hatlarında 1 μ M DBEq ve kontrol amaçlı 1 μ M DMSO kullanılarak hem manuel hem de xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyon analizleri yapılmıştır. Manuel invazyon testlerinde DBEq uygulanan hücre hatlarında invazyonların anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Aynı zamanda xCELLigence RTCA ile invazyon ve migrasyonların azaldığı izlenmiş ve migrasyonlardaki azalmaların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu bulgular p97/VCP'nin EVT'lerde önemli rolleri olabileceğini göstermiştir. Aynı zamanda p97/VCP, preeklampsi gibi plasenta ile ilişkili hastalıklarda görülen plasental

yetersizliklerde ve hastalık durumlarında EVT’lerde görülen yetersiz invazyon ve migrasyonlarda rol oynuyor olabilir.

İnsan osteosarkom hücre hatlarında (U-2 OS ve 143B) p97/VCP siRNA’ler kullanılarak yapılan çalışmada 24 saat transfeksiyon sonrası hücrelerin invazyon ve migrasyonlarında azalma meydana geldiği görülmüştür (112). Başka bir çalışmada kolorektal kanser hücre hatlarında matrijel kullanılarak manuel invazyon testleri yapılmıştır. Sonuçta p97/VCP geninin susturulmasıyla hücre proliferasyonu, kemorezistansı ve invazyonu inhibe ettiği görülmüştür (78). Lenfoma hücre hatları ile yapılan çalışmada ise 48 saat boyunca p97/VCP siRNA ile transfeksiyon sonrası hücreler manuel matrijel yöntemle invazyona bırakılmıştır. Hücrelerin invazyonlarında kontrol gruplarına göre azalma gözlenmiştir (113).

Bu çalışmada HTR-8/SVneo hücre hatlarında SVIP siRNA’ler ile transfeksiyon sonrası manuel invazyon testleri yapılmıştır. Sonuçta kontrol siRNA ile transfekte grupla karşılaştırıldığında hücrelerin invazyonlarında artış görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir. Aynı zamanda p97/VCP ve SVIP siRNA’ler ile transfeksiyonlar sonrası xCELLigence RTCA kullanılarak invazyon ve migrasyon analizleri yapılmıştır. p97/VCP siRNA’ler ile transfeksiyon sonrası hücre hatlarının invazyon ve migrasyonlarında azalma, SVIP siRNA kullanılması sonrasında ise invazyon ve migrasyonlarda artış görülmüştür. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İleriki çalışmalarda transfeksiyon sürelerinin değiştirilmesi, farklı matrijel dilüsyonlarının kullanılması ve deney tekrarlarının artırılması sonuçlarda değişiklik meydana getirebilir.

Son olarak bu çalışmada üzerinde durulan p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genlerinin hem kendi aralarında hem de başka genlerle olan etkileşimleri Cytoscape ağ analizleri ile gösterilmiştir. Bu genlerin 20 farklı gen ile birlikte ekspresyonlarının ve fiziksel etkileşimlerinin görüldüğü ağ analizlerinde GABARAPL2 geninin her iki analizde de ortak olduğu dikkati çekmiştir. İnsanda plasentanın gelişiminde ve EVT’lerin invazyon ve migrasyonlarında bu genlerin de etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada UPS’de rol oynayan p97/VCP ve SVIP proteinlerinin insanda plasental gelişim dönemlerinde farklı ekspresyon ve dağılım gösterdikleri bulunmuştur. Ayrıca plasentalarda otofajide görevli LC3II ve p62 proteinlerinin ekspresyonları da değerlendirilmiştir. Plasentanın erken gelişiminde p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının 2. trimestere kıyasla daha fazla olduğu ve 3.trimesterde tekrar arttığı belirlenmiştir. LC3II ve p62’nin ise gebelik dönemlerinde arttığı görülmüştür. Bu proteinlerin koryonik villuslarda sitotrofoblastlardaki yoğun ekspresyonlarının yanında sinsisyotrofoblastlarda ve bağ dokusu hücrelerindeki ekspresyonları da dikkat çekici olmuştur.

İnsanda 1. trimester plasentaya ait HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP ve SVIP ekspresyonlarının gösterilmesi çalışmanın orijinal bulgularındandır. Aynı zamanda bu hücrelerdeki p97/VCP aktivitesini bloke etmek için kullanılan DBeQ inhibitör uygulaması sonrası protein ve gen düzeyinde analizler yapılmıştır. Hücrelerde DBeQ uygulaması sonrası yapılan analizlerde kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hücrelerin invazyon ve migrasyonlarında anlamlı azalmalar görülmüştür. Buna ek olarak hücrelerdeki p97/VCP ve SVIP gen ekspresyonları siRNA’ler kullanılarak susturulmuştur. Sonrasında yapılan protein ve gen analizlerinde p97/VCP ve SVIP genlerinin susturulması sonucu, otofaji proteinlerinden LC3II ve p62 ekspresyonlarının arttığı izlenmiştir. Ayrıca kontrol grupları ile karşılaştırıldığında p97/VCP siRNA transfekte edilen hücre hatlarında DBeQ uygulaması ile benzer bir tablo ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar p97/VCP proteinin ekstrasvillöz trofoblastların invazyon ve migrasyonlarında etkisi olabileceğini göstermiştir. SVIP siRNA gruplarında ise invazyon ve migrasyonlarda artış olduğu görülmüştür. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İnsan plasentasında UPS’de rol oynayan p97/VCP ve SVIP ile bunlarla ilişkili diğer genlerin ekspresyonlarının belirlenmesi ve bunların plasental gelişimdeki rollerinin tam olarak aydınlatılması gelecekte plasental hastalık patogenezlerinin tedavisine önemli katkılar sağlayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

1) Gebeliğin üç farklı trimesterine ait insan plasentalarında histokimyasal ve elektron mikroskopi incelemeler ile koryonik villus yapıları karşılaştırıldı. 1. Trimesterdeki mezenkimal tip villuslarda trofoblast tabakası kalındır ve gevşek stromada Hofbauer hücreleri sayıca fazladır. 2. Trimester olgunlaşmamış ara villuslarda bu tabaka inceldir. 3. Trimesterde ise baskın olan terminal villuslarda incelmış trofoblast tabakasındaki yassı sitotrofoblast hücreleri seyrekleşir. Bu dönemde ayrıca Hofbauer hücreleri azalır ve damarlanmalar artar.

2) UPS'de rol oynayan p97/VCP ve SVIP protein ekspresyonlarının lokalizasyonları immünohistokimyasal boyama yöntemleriyle gösterildi. Bu proteinlerin koryonik villuslarda özellikle sitotrofoblastlarda yoğun ekspresyonları ve sinsisyotrofoblastlar ile bağ dokusu hücrelerinde ekspresyonları bulunmaktadır.

3) 1. Trimestere ait plasentalarda p97/VCP ve SVIP'in protein ve gen düzeyindeki ekspresyonları fazladır, 2. trimesterde ekspresyonlar azalmaktadır ve gebeliğin ilerleyen döneminde tekrar artmaktadır.

4) Otofaji proteinlerinden p97/VCP ve SVIP ile direkt ilişkili LC3II ve p62'nin sitotrofoblastlardaki ekspresyonları yükündür. Protein ve gen düzeyindeki ekspresyonlar ilerleyen gebelik dönemlerinde artmaktadır.

5) 1. Trimestere ait HTR-8/SVneo hücre hatlarında p97/VCP ve SVIP protein ekspresyonları çekirdek ve sitoplazmalarda yükündür. LC3II ve p62 ekspresyonları ise özellikle sitoplazmalarda noktasal ve şiddetlidir. Bunun yanında çekirdeklerde hafif noktasal ekspresyonlar da bulunmaktadır.

6) HTR-8/SVneo hücre hatlarında yapılan canlılık ve proliferasyon analizleri sonucu bir p97/VCP inhibitörü olan DBeQ'nun optimum konsantrasyonu 1 μ M ve inkübasyon süresi 48 saattir.

7) Hücrelere DBeQ uygulaması sonrası yapılan protein ve gen düzeyindeki analizlerde p97/VCP, SVIP ve p62 ekspresyonları değişmemektedir ancak LC3II ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede artmaktadır.

8) Hücre hatlarında p97/VCP siRNA'ler ile transfeksiyonlar sonrası kontrollere göre, p97/VCP protein ve gen ekspresyonlarındaki azalmalar anlamlıdır. Ayrıca p62 protein ekspresyonları anlamlı olarak artmaktadır.

9) Hücrelerin SVIP siRNA'ler ile transfeksiyonları sonrası SVIP protein ve gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar vardır. LC3II ve p62 protein ekspresyonlarındaki artışlar ise anlamlıdır.

10) HTR-8/SVneo hücre hatlarında DBeQ uygulaması, kontrol gruplarına göre invazyon ve migrasyonları anlamlı derecede azaltmaktadır.

11) Hücrelerde p97/VCP siRNA'ler ile transfeksiyon sonrası invazyon ve migrasyonlarda azalmalar vardır. Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir.

12) SVIP siRNA'ler ile transfekte grupta invazyon ve migrasyonlarda artış bulunmaktadır, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildir.

13) Yapılan ağ analizleri sonrası p97/VCP, SVIP, LC3II ve p62 genlerinin kendi aralarındaki ve 20 farklı gen ile olan ilişkileri belirlendi.

Çalışma sonrası öneriler aşağıda sıralanmıştır:

1) DBeQ için farklı konsantrasyon ve süreler ileriki çalışmalarda kullanılabilir. Aynı zamanda başka p97/VCP inhibitörler kullanılarak HTR-8/SVneo hücre hatlarında ileri fonksiyonel çalışmalar yapılabilir.

2) Bu hücre hatlarında p97/VCP ve SVIP siRNA'ler ile transfeksiyon sürelerinin arttırılması, kullanılan matrijel dilüsyonlarının değiştirilmesi ve deney tekrarlarının arttırılması ile sonuçların değişebileceği öngörülmektedir.

3) Gelecekte bu genler ile ilişkili diğer genlerin de plasentadaki ekspresyonları belirlenmeli ve ileri fonksiyonel çalışmalar yapılmalıdır.

4) Bu çalışmada UPS proteinlerinden yalnızca p97/VCP ve SVIP ile çalışmalar gerçekleştirildi. UPS’de rol oynayan diğer proteinlerin de insan plasenta gelişimindeki rolleri belirlenmelidir.

Elde edilen bulgular ışığında gebeliğin farklı dönemlerine ait insan plasentalarında UPS’ye ait p97/VCP ve SVIP proteinlerinin hem yapısal hem de fonksiyonel işlevleri ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinlerin özellikle ilk trimester plasentalardaki belirgin ekspresyonları ve hücrelerin invazyon ve migrasyonlarını etkileme kapasiteleri, bu proteinlerin gebeliğin devamında ve preeklampsi gibi bazı plasental patolojilerde etkin moleküller olabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Solli GS, Sandbakk Ø. Training characteristics during pregnancy and postpartum in the world's most successful cross country skier, *Frontiers in Physiology*, 2018, 9: 595.
2. Griffiths SK, Campbell JP. Placental structure, function and drug transfer, *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*, 2015, 84–89.
3. Burton GJ. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function, *Journal of Anatomy*, 2009, 215(1): 27–35.
4. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the human placenta*, sixth edition. Berlin Heidelberg, Springer, 2012: 1–941.
5. Fukui Y, Hirota Y, Matsuo M, Gebril M, Akaeda S, Hiraoka T, et al. Uterine receptivity, embryo attachment, and embryo invasion: Multistep processes in embryo implantation, *Reprod Med Biol*. 2019, 18: 234–240.
6. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface, *Sci Immunol.*, 2019, 4(31): 6114.
7. Nelson DM, Myatt L. The Human Placenta in Health and Disease, *An Issue of Obstetrics and Gynecology Clinics*, 1st Edition. Washington, 2020: xv–xviii.
8. Medjedovic E, Suljevic A, Iglica A, Rama A, Mahmutbegovic E, Muftic A, et al. Uric Acid Values Along with Doppler Sonography Findings as a Tool for Preeclampsia Screening, *Medical archives*, 2019,73(6): 11-408.
9. Fisher SJ. Why is placentation abnormal in preeclampsia? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2015, 213(4): 22-115.
10. Zheng Q, Huang T, Zhang L, Zhou Y, Luo H, Xu H, et al. Dysregulation of ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases, *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2016, 8: 303.
11. Bastola P, Neums L, Schoenen FJ, Chien J. VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and

- synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal, *Mol Oncol.*, 2016, 10: 1559-1574.
12. Nagahama M, Suzuki M, Hamada Y, Hatsuzawa K, Tani K, Yamamoto A, et al. SVIP is a novel VCP/p97-interacting protein whose expression causes cell vacuolation. *Molecular Biology of the Cell*, 2003,14(1): 73-262.
 13. Ozsoy AZ, Cayli S, Sahin C, Ocakli S, Sancı TO, İlhan DB. Altered expression of p97/Valosin containing protein and impaired autophagy in preeclamptic human placenta, *Placenta*, 2018, 67: 45–53.
 14. Erzurumlu Y, Ballar P. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer, *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1–12.
 15. Khong ZJ, Lai SK, Koh CG, Geifman-Shochat S, Li HY. A novel function of AAA-ATPase p97/VCP in the regulation of cell motility. *Oncotarget*, 2020, 11(1): 74–85.
 16. Pijnenborg R, Vercruysse L. A.A.W. Hubrecht and the naming of the trophoblast, *Placenta*, 2013, 34(4): 9-314.
 17. Turco MY, Moffett A. Development of the human placenta, *Development*, 2019, 146(22): 1–14.
 18. Mundy DC, Vilchez G. The Diagnosis and Management of the Acute Abdomen in Pregnancy, *Springer*, 2018, 25–39.
 19. Wamaitha SE, Niakan KK. *Cell Fate in Mammalian Development*, 1st ed. Elsevier Inc., 2018: 295–338.
 20. Aplin JD. Developmental cell biology of human villous trophoblast: Current research problems, *International Journal of Developmental Biology*, 2010, 54(2–3): 9-323.
 21. Knöfler M, Haider S, Saleh L, Pollheimer J, Gamage TKJB, James J. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76(18): 96-3479.

22. Carlson B M. *Human Embryology and Developmental Biology*, 5th Edition. Elsevier, 2013: 120-129.
23. Avagliano L, Massa V, Bulfamante G. *Histology of Human Placenta*, Milano, Histopathology, 2016: 1–15.
24. Pollheimer J, Vondra S, Baltayeva J, Beristain AG, Knöfler M. Regulation of placental extravillous trophoblasts by the maternal uterine environment, *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 1–18.
25. Costanzo V, Bardelli A, Siena S, Abrignani S. Exploring the links between cancer and placenta development, *Open Biology.*, 2018, 8(6): 2046-2441.
26. Lyall F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia, *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2006, 46(4): 73-266.
27. Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia, *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 34(5): 981–1023.
28. Moser G, Sundl M, Lichtensteiner M, Weiss G, Huppertz B. A revised picture of extravillous trophoblast invasion, *Journal of Reproductive Health and Medicine*, 2016, 2: 9–14.
29. Huppertz B. Traditional and new routes of trophoblast invasion and their implications for pregnancy diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(1): 289.
30. Moser G, Huppertz B. Implantation and extravillous trophoblast invasion: From rare archival specimens to modern biobanking, *Placenta*, 2017, 56 :19–26.
31. Velicky P, Knöfler M, Pollheimer J. Function and control of human invasive trophoblast subtypes: Intrinsic vs. maternal control, *Cell Adhesion and Migration*, 2016, 10(1–2): 62-154.
32. Kabir-Salmani M, Shiokawa S, Akimoto Y, Sakai K, Iwashita M. The role of $\alpha 5 \beta 1$ -integrin in the IGF-I-induced migration of extravillous trophoblast cells

- during the process of implantation, *Molecular Human Reproduction*, 2004, 10(2): 7-91.
33. Aghababaei M, Perdu S, Irvine K, Beristain AG. A disintegrin and metalloproteinase 12 (ADAM12) localizes to invasive trophoblast, promotes cell invasion and directs column outgrowth in early placental development, *Molecular Human Reproduction*, 2014, 20(3): 49-235.
 34. Biadasiewicz K, Fock V, Dekan S, Proestling K, Velicky P, Haider S, et al. Extravillous trophoblast-associated ADAM12 exerts pro-invasive properties, including induction of integrin beta 1-Mediated cellular spreading, *Biology of Reproduction*, 2014, 90(5): 101.
 35. Moore KL, Persaud TVN, et al. Before we are Born: Essentials of Embriology and Birth Defects, *Before We Are Born*, 9th Edition. Elsevier, 2016: 252–275.
 36. Dudek RW. *BRS Embryology*, 6th Edition. Wolters Kluwer, 2014: 55-67.
 37. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta, *Journal of Clinical Pathology*, 2008, 61(12): 302-1296.
 38. Baergen RN. *Manual of Pathology of the Human Placenta*, 2nd Edition. Springer, 2011: 3-118.
 39. Mayhew TM, Leach L, McGee R, Wan Ismail W, Myklebust R, Lammiman MJ. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes), *Placenta*, 1999, 20(5–6): 22-407.
 40. Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade- Morphological and immunohistochemical methods for its visualization, *Anatomy and Embryology*, 1999, 200(1): 1–18.
 41. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JCP, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta, *Histochemistry and Cell Biology*, 1998, 110(5): 495–508.

42. Demir R, Kayisli UA, Seval Y, Celik-Ozenci C, Korgun ET, Demir-Weusten AY, et al. Sequential expression of VEGF and its receptors in human placental villi during very early pregnancy: Differences between placental vasculogenesis and angiogenesis, *Placenta*, 2004, 25(6): 72-560.
43. Huppertz B, Ghosh D, Sengupta J. An integrative view on the physiology of human early placental villi, *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2014, 114(1): 33–48.
44. Bushway ME, Gerber SA, Fenton BM, Miller RK, Lord EM, Murphy SP. Morphological and phenotypic analyses of the human placenta using whole mount immunofluorescence, *Biology of Reproduction*, 2014, 90(5): 110.
45. Sultana Z, Maiti K, Aitken J, Morris J, Dedman L, Smith R. Oxidative stress, placental ageing-related pathologies and adverse pregnancy outcomes, *Am J Reprod Immunol.*, 2017, 77(5): e12653.
46. Burton GJ, Tham W. Formation of vasculo-syncytial membranes in the human placenta, *Journal of Developmental Physiology*, 1992, 18(1): 7-43.
47. Chatuphonprasert W, Jarukamjorn K, Ellinger I. Physiology and pathophysiology of steroid biosynthesis, transport and metabolism in the human placenta, *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 1-29.
48. Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: Fundamental mechanisms of human placental development, *Human Reproduction Update*, 2000, 6(5): 94-485.
49. Demir R, Kosanke G, Kohnen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: Review of structural and functional aspects, *Microscopy Research and Technique*, 1997, 38(1–2): 29–41.
50. Fishel Bartal M, Lindheimer MD, Sibai BM. Proteinuria during pregnancy: definition, pathophysiology, methodology, and clinical significance, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2020, 9378(20): 2.

51. Webster, S, De Wreede, R. *Embryology at a Glance*, 2nd Edition. Wiley-Blackwell, 2016: 26-28.
52. Kwon YT, Ciechanover A. The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy, *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(11): 86-873.
53. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, 6: 1–27.
54. Deshaies RJ. Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy, *BMC Medicine*, 2014, 12(1): 1–14.
55. Rojas VK, Park IW. Role of the ubiquitin proteasome system (Ups) in the hiv-1 life cycle, *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 1–19.
56. Liu CW, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang T ling, Tang Z, et al. ATP Binding and ATP Hydrolysis Play Distinct Roles in the Function of 26S Proteasome, *Molecular Cell*, 2006, 24(1): 39–50.
57. Chondrogianni N, Gonos ES. Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: Modulation of components, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2012, 109: 41-74.
58. Paul S. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: Therapeutic approaches, *BioEssays*, 2008, 30(11–12): 84-1172.
59. Kanayama H omi, Tanaka K, Aki M, Kagawa S, Miyaji H, Satoh M, et al. Changes in Expressions of Proteasome and Ubiquitin Genes in Human Renal Cancer Cells, *Cancer Research*, 1991, 51(24): 85-6677.
60. Montero AJ, Jassem J. Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer, *Drugs*, 2011, 71(11): 96-1385.
61. Llovera M, García-Martínez C, Agell N, López-Soriano FJ, Argilés JM. TNF can directly induce the expression of ubiquitin-dependent proteolytic system in rat soleus muscles, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 230(2): 41-238.

62. Rock KL, York IA, Saric T, Goldberg AL. Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides, *Advances in Immunology*, 2002, 80: 1–70.
63. Xu J, Wang H, Li W, Liu K, Zhang T, He Z, et al. E3 ubiquitin ligase CHIP attenuates cellular proliferation and invasion abilities in triple-negative breast cancer cells, *Clinical and Experimental Medicine*, 2020, 20(1): 19-109.
64. Chondrogianni N, Gonos ES. Proteasome dysfunction in mammalian aging: Steps and factors involved, *Experimental Gerontology*, 2005, 40(12): 8-931.
65. Kriegenburg F, Poulsen EG, Koch A, Krüger E, Hartmann-Petersen R. Redox control of the ubiquitin-proteasome system: From molecular mechanisms to functional significance, *Antioxidants and Redox Signaling*, 2011, 15(8): 99-2265.
66. Bax M, McKenna J, Do-Ha D, Stevens CH, Higginbottom S, Balez R, et al. The Ubiquitin Proteasome System Is a Key Regulator of Pluripotent Stem Cell Survival and Motor Neuron Differentiation, *Cells*, 2019, 8(6): 581.
67. Miyachiro M, Contreras-Martel C, Dessen A. *Macromolecular protein complexes II: structure and fuction*, 6th Edition. Springer, 2020: 221-273.
68. Buchberger A, Schindelin H, Hänzelmann P. Control of p97 function by cofactor binding, *FEBS Letters*, 2015, 589(19): 89-2578.
69. Hänzelmann P, Schindelin H. The interplay of cofactor interactions and post-translational modifications in the regulation of the AAA+ ATPase p97, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 1–22.
70. Saffert P, Enenkel C, Wendler P. Structure and function of p97 and Pex1/6 Type II AAA+ complexes, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2017, 4: 1–13.
71. Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnica-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease, *Journal of Cell Biology*, 2009, 187(6): 88-875.
72. Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system, *Nature Cell Biology*, 2012, 14(2): 23-117.

73. Jentsch S, Rumpf S. Cdc48 (p97): a “molecular gearbox” in the ubiquitin pathway?, *Trends in Biochemical Sciences*, 2007, 32(1): 6–11.
74. Figuerola-Conchas A, Saarbach J, Daguer JP, Cieren A, Barluenga S, Winssinger N, et al. Small-Molecule Modulators of the ATPase VCP/p97 Affect Specific p97 Cellular Functions, *ACS Chemical Biology*, 2020, 15(1): 53-243.
75. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Iizuka N, Kidogami S, Miyata H, et al. Expression level of valosin-containing protein (p97) is associated with prognosis of esophageal carcinoma, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(16): 65-5558.
76. Yamamoto S, Tomita Y, Hoshida Y, Sakon M, Kameyama M, Imaoka S, et al. Expression of Valosin-Containing Protein in Colorectal Carcinomas as a Predictor for Disease Recurrence and Prognosis, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(2): 7-651.
77. Tsujimoto Y, Tomita Y, Hoshida Y, Kono T, Oka T, Yamamoto S, et al. Elevated Expression of Valosin-Containing Protein (p97) Is Associated with Poor Prognosis of Prostate Cancer, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10(9): 12-3007.
78. Fu Q, Jiang Y, Zhang D, Liu X, Guo J, Zhao J. Valosin-containing protein (VCP) promotes the growth, invasion, and metastasis of colorectal cancer through activation of STAT3 signaling, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2016, 418(1–2): 98-189.
79. Chapman E, Maksim N, de La Cruz F, la Clair JJ. Inhibitors of the AAA+ chaperone p97, *Molecules*, 2015, 20(2): 49-3027.
80. Pöhler R, Krahn JH, van den Boom J, Dobrynin G, Kaschani F, Eggenweiler H-M, et al. A Non-Competitive Inhibitor of VCP/p97 and VPS4 Reveals Conserved Allosteric Circuits in Type I and II AAA ATPases, *Angewandte Chemie*, 2018, 130(6): 6-1592.
81. Chou TF, Deshaies RJ. Development of p97 AAA ATPase inhibitors, *Autophagy*, 2011, 7(9): 2-1091.

82. Duscharla D, Reddy Kami Reddy K, Dasari C, Bhukya S, Ummanni R. Interleukin-6 induced overexpression of valosin-containing protein (VCP)/p97 is associated with androgen-independent prostate cancer (AIPC) progression, *Journal of Cellular Physiology*, 2018, 233(10): 64-7148.
83. Chou TF, Brown SJ, Minond D, Nordin BE, Li K, Jones AC, et al. Reversible inhibitor of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(12): 9-4834.
84. Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, et al. Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death, *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(9): 59-548.
85. Cayli S, Sahin C, Sancı TO, Nakkas H. Inhibition of p97/VCP function leads to defective autophagosome maturation, cell cycle arrest and apoptosis in mouse Sertoli cells, *Theriogenology*, 2020, 158: 196–206.
86. Ballar P, Zhong Y, Nagahama M, Tagaya M, Shen Y, Fang S. Identification of SVIP as an endogenous inhibitor of endoplasmic reticulum-associated degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(47): 14-33908.
87. Wang Y, Ballar P, Zhong Y, Zhang X, Liu C, Zhang Y-J, et al. SVIP Induces Localization of p97/VCP to the Plasma and Lysosomal Membranes and Regulates Autophagy, *Autophagy PLoS ONE*, 2011, 6(8): e24478.
88. Bao D, Cheng C, Lan X, Xing R, Chen Z, Zhao H, et al. Regulation of p53wt glioma cell proliferation by androgen receptor-mediated inhibition of small VCP/p97-interacting protein expression, *Oncotarget*, 2017, 8(14): 54-23142.
89. Jia D, Wang YY, Wang P, Huang Y, Liang DY, Wang D, et al. SVIP alleviates CCl₄ -induced liver fibrosis via activating autophagy and protecting hepatocytes, *Cell Death and Disease*, 2019, 10(2): 71.
90. Llinàs-Arias P, Rosselló-Tortella M, López-Serra P, Pérez-Salvia M, Setién F, Marin S, et al. Epigenetic loss of the endoplasmic reticulum-associated

degradation inhibitor SVIP induces cancer cell metabolic reprogramming, *JCI Insight*, 2019, 4(8): 1–16.

91. Akcan G, Alimogullari E, Abu-Issa R, Cayli S. Analysis of the developmental expression of small VCP-interacting protein and its interaction with steroidogenic acute regulatory protein in Leydig cells, *Reproductive Biology*, 2020, 20(1): 88–96.
92. Kim JS, Bae GE, Kim KH, Lee S il, Chung C, Lee D, et al. Prognostic significance of LC3B and p62/SQSTM1 expression in gastric adenocarcinoma, *Anticancer Research*, 2019, 39(12): 22-6711.
93. Lee SJ, Smith A, Guo L, Alastalo TP, Li M, Sawada H, et al. Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2011, 183(5): 58-649.
94. Tang J, Zhu J, Ye Y, Liu Y, He Y, Zhang L, et al. Inhibition LC3B can increase chemosensitivity of ovarian cancer cells, *Cancer Cell International*, 2019, 19(1): 1–15.
95. Islam MA, Sooro MA, Zhang P. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy, *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5): 1405.
96. Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, Romanov J, Tremel S, Ebner M, et al. p62 Filaments Capture and Present Ubiquitinated Cargos for Autophagy, *The EMBO Journal*, 2018, 37(5): 1–21.
97. Dünya Sağlık Örgütü (WHO). [https://www.who.int/data/maternal-newborn-child-adolescent-ageing/indicator-explorer-new/mca/women-of-reproductive-age-\(15-49-years\)-population-\(thousands\)](https://www.who.int/data/maternal-newborn-child-adolescent-ageing/indicator-explorer-new/mca/women-of-reproductive-age-(15-49-years)-population-(thousands)). 21 Eylül 2020.
98. Scrace S, O'Neill E, Hammond EM, Pires IM. Use of the xCELLigence system for real-time analysis of changes in cellular motility and adhesion in physiological conditions, *Methods in Molecular Biology*, 2013, 1046: 295–306.

99. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples, *PLoS ONE*, 2014, 9(5): e96801.
100. Wang H, Zhang S, Lin H, Kong S, Wang S, Wang H, et al. Physiological and molecular determinants of embryo implantation, *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, 80-939.
101. Peraçoli JC, Therezinha V, Borges M, Geraldo J, Ramos L, de Carvalho Cavalli R, et al. Pre-eclampsia/Eclampsia Pré-eclâmpsia/Eclâmpsia Febrasgo Statement, *Rev Bras Ginecol Obstet.*, 2019, 41: 32-318.
102. Ding F, Xiao H, Wang M, Xie X, Hu F. The role of the ubiquitin-proteasome pathway in cancer development and treatment, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 2014, 95-886.
103. Ellis RJ. Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding, *Trends Biochem Sci.*, 2006, 395–401.
104. Carlisle C, Prill K, Pilgrim D. Chaperones and the proteasome system: Regulating the construction and demolition of striated muscle, *Int J Mol Sci.*, 2017, 19(1): 32.
105. Sun X, Qiu H. Valosin-containing protein, a calcium-associated atpase protein, in endoplasmic reticulum and mitochondrial function and its implications for diseases, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 3842.
106. Anderson DJ, le Moigne R, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Wong S, et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis, *Cancer Cell*, 2015, 28(5): 65-653.
107. Hung T-H, Hsieh T-T, Chen S-F, Li M-J, Yeh Y-L. Autophagy in the Human Placenta throughout Gestation, *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e83475.
108. Nishimura N, Radwan MO, Amano M, Endo S, Fujii E, et al. Novel p97/VCP inhibitor induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in both bortezomib-sensitive and -resistant multiple myeloma cells, *Cancer Science*, 2019, 110: 87-3275.

109. Huang EY, To M, Tran E, Lorraine TAD, Cho HJ, Baney KLM, et al. A VCP inhibitor substrate trapping approach (VISTA) enables proteomic profiling of endogenous ERAD substrates, *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(9): 30-1021.
110. Zhang Y, Xu B, Yao M, Dong T, Mao Z, Hang B, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce proteostasis disruption and autophagy in human trophoblast cells, *Chemico-Biological Interactions*, 2018, 296: 33-124.
111. Walworth K, Bodas M, Campbell RJ, Swanson D, Sharma A, Vij N. Dendrimer-based selective proteostasis-inhibition strategy to control NSCLC growth and progression, *PLoS ONE*, 2016, 11(7): e0158507.
112. Hua Long X, Fei Zhou Y, Lan M, Hu Huang S, Li Liu Z, Shu Y. Valosin-containing protein promotes metastasis of osteosarcoma through autophagy induction and anoikis inhibition via the ERK/NF- κ B/beclin-1 signaling pathway, *Oncology Letters*, 2019, 18(4): 9-3823.
113. Zhu W, Li D, Xiao L. OncoTargets and Therapy Dovepress Upregulation of valosin-containing protein (VcP) is associated with poor prognosis and promotes tumor progression of orbital B-cell lymphoma, *Onco Targets Ther.*, 2018, 12: 243-253.