



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI
VHE-2019-0001

2019

DOKTORA

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)

GÖKSEL DOĞAN

FARELERDE *IN VITRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO TRANSFERİNİN
FÖTAL AKCİĞER DOKUSUNDA NOTCH SİNYAL YOLAĞI HEDEF
GENLERİNDEN *HEY1* VE *SKP2* GENLERİNİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Göksel DOĞAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent KARAGENÇ

AYDIN-2019

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI
VHE-2019-0001

**FARELERDE *IN VITRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO
TRANSFERİNİN FÖTAL AKCİĞER DOKUSUNDA NOTCH
SİNYAL YOLAĞI HEDEF GENLERİNDEN *HEY1* VE *SKP2*
GENLERİNİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Göksel DOĞAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Levent KARAGENÇ

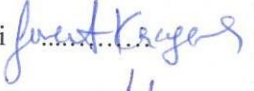

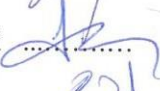


Sunulan tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17020 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Göksel DOĞAN tarafından hazırlanan “Farelerde *In Vitro* Embriyo Kültürü ve Embriyo Transferinin Fötal Akciğer Dokusunda Notch Sinyal Yolağı Hedef Genlerinden *Hey1* ve *Skp2* Genlerinin Ekspresyonu Üzerine Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 21/ 06/ 2019

Üye	: Prof. Dr. Levent KARAGENÇ (Tez Danışmanı)	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Funda KIRAL	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Berrin ZİK	Bursa Uludağ Üniversitesi	
Üye	: Prof. Dr. Artay YAĞCI	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarında yukarıdaki jüri tarafından UYGUN görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tarih vesayılı oturumunda alınan no'lu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Cavit Kum

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve Doktora eğitimlerim süresince ve tez çalışmalarımın her aşamasında, engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteklerini ve yardımlarını her zaman üzerimde hissettiğim, bana her konuda yol gösterici olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Levent KARAGENÇ'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans ve Doktora eğitimlerim ve tez çalışmalarım süresince yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI, Prof. Dr. Ülker EREN, Prof. Dr. Şadiye KUM ve Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam süresince bilgi ve desteğini benden esirgemeyen Doç. Dr. Mehtap Kılıç EREN'e teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmamda istatistiksel analizlere yönelik sorularımı geri çevirmeyen ve takıldığım her noktada bana yardımcı olan Prof. Dr. Mehmet Nurullah ORMAN'a teşekkür ederim.

Doktora eğitimim süresince maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşlarım Murat ÖZTÜRK, Tuğçe BALGİR, Emrah İPEK, Hediye İpek PORTAKAL, Musa TATAR, Ayşe ALKANDURUR, Gülsüm YILMAZ, Şengül ŞENTÜRK, Seçil ZORLU KOÇ, Ayşe Nur AKKOÇ ve Firuze TÜRKER'e teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteklerini üzerimden eksik etmeyen, her koşulda bana inanan ve güvenen başta annem ve babam olmak üzere, ablalarım, ağabeylerim ve diğer tüm aile üyelerine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, değerli eşime teşekkür ederek, sunulan tez çalışmasını, bana şans getirdiğine inandığım ve hayatıma ayrı bir anlam ve renk katan biricik kızım Şerife Kübra DOĞAN'a atfediyorum.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Farelerde Akciğer Gelişimi	3
2.2. Farelerde Akciğer Dokusunun Gelişim Aşamaları.....	5
2.2.1. Psödoglandüler Evre.....	6
2.2.2. Kanaliküler Evre.....	9
2.2.3. Sakküler Evre (terminal kese evresi).....	9
2.2.4. Alveolar Evre.....	10
2.3. Akciğer Gelişiminde Notch Sinyal Yolağı.....	11
2.3.1. Notch Sinyal Yolağı	11
2.3.2. Proksimal Akciğerde Notch Sinyal Yolağı'nın Rolü	13
2.3.3. Alveolar Gelişimde Notch Sinyal Yolağının Rolü	15
2.4. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genleri.....	17
2.4.1. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genlerinden <i>Hey1</i>	19
2.4.2. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genlerinden <i>Skp2</i>	21
2.5. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Yöntemleri.....	24
2.6. ÜYTE Yöntemlerinin Uygulanmasına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Sağlık Sorunları	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç.....	29
3.1.1. Çalışma Materyali	29
3.2. Yöntem	31

3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu.....	31
3.2.2. İmmunohistokimyasal Boyama Metodu.....	31
3.2.3. İmmunofloresan Boyama Metodu	32
3.2.4. Western Blot Metodu	33
3.2.5. Total RNA İzolasyonu.....	37
3.2.6. Real-Time PCR (qRT-PCR).....	37
3.2.6.1. cDNA (komplementer DNA) sentezi.....	37
3.2.6.2. TaqMan metodu ile kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) analizi.....	39
3.2.6.3. SYBR green metodu ile kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) analizi.....	41
3.2.7. İstatistiksel analizler.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. Fötal Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Yapısı.....	44
4.2. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde İmmunohistokimya ve İmmunofloresan Boyama Yöntemiyle Hey1 ve Skp2 Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	45
4.3. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Western Blot Tekniğiyle Hey1 ve Skp2 Ekspresyonlarının Belirlenmesi	49
4.4. Fötal Akciğer Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesi.....	52
4.5. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Real-Time PCR Tekniğiyle Hey1 ve Skp2 Ekspresyonlarının Belirlenmesi	54
4.6. Bireysel Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Hey1 ve Skp2 Ekspresyonlarının Belirlenmesi.....	64
5. TARTIŞMA.....	67
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR.....	79
EKLER	102
Ek 1. ÜYTE alanında sağlanan teknolojik ilerlemenin kronolojik bir tarihçesi	102
Ek 2. Üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri ve tanımları	106
Ek 3. Araştırmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar	107
Ek 4. Western Blot yönteminde kullanılan solüsyonlar ve Western Blot tekniği.....	108
Ek 5. c-DNA Sentezi ve materyalleri	113
Ek 6. RT- PCR solüsyonları ve materyalleri	115
Ek 7. Etik Kurul Raporu	117
ÖZGEÇMİŞ.....	119

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikro gram
µl	: Mikro litre
µm	: Mikro metre
nm	: Nano metre
ART	: Assisted reproductive technology
AH	: Assisted hatching (zar inceltme)
au	: Arbitrary unit
BCA	: Bicinchoninic acid / Bisinkoninik asit
BSA	: Bovine serum albumin
CO₂	: Karbondioksit
DAB	: 3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DAPT	: (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)- L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester)
DÇET	: Dondurulmuş çözdürülmüş embriyo transferi
ED	: Embriyo dondurma
ET	: Embriyo transferi
IVM	: In vitro maturasyon
GAPDH	: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIFT	: Gamete intrafallopian transfer (Gamet fallop içi tranferi)
Hey1	: Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1
HCl	: Hidroklorik asit
Ig	: İmmunoglobulin
ICSI	: Intracytoplasmic sperm injection / İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IUI	: İntrauterin inseminasyon
IVF	: In vitro fertilization / <i>In vitro</i> fertilizasyon
O₂	: Oksijen
PESA	: Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu
PGT	: Preimplantation genetic diagnosis (PGD) (pre-implantasyon genetik tanı)
pmol	: Piko mol
qRT-PCR	: kantitatif real time PCR

rRNA	: Ribozomal RNA
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi
Skp2	: S-phase kinase-associated protein 2
SUZI	: Subzonal insemination
TET	: Tubal embryo transfer
TLR	: Toll like receptor / Toll benzeri reseptör
TBS	: Tris buffer saline
TBST	: Tris buffer saline Twen-20
TESA	: Testiküler Sperm Aspirasyonu
TESE	: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
MESA	: Mikrocerrahi ile Epididimisten Sperm Aspirasyonu
ÜYTE	: Üremeye yardımcı tedavi
WHO	: World health organization / Dünya sağlık örgütü
ZIFT	: Zigot intrafallopian transfer (Zigot fallop içi tranferi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Laringo-trakeyal ve traqueo-özofageal olukların ön bağırsaktan şekillenmesi, trakeya, özefagus ve akciğer tomurcuklarının gelişim basamakları.....	3
Şekil 2. Trakeya, bronkus ve bronkiyolusların dallanma morfogenezinin şematik görünümü.....	5
Şekil 3. Fare akciğer dokusunun gelişim evrelerinin histolojisi.	6
Şekil 4. İnsan ve fare akciğer lobları arasındaki farklılıklar	7
Şekil 5. Gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c) izole edilen bir fare fötusunda trakeya ve akciğer loblarının genel görünümü.....	7
Şekil 6. Farede akciğer gelişim fazlarının şematik olarak gösterimi	8
Şekil 7. Çeşitli türlerde Notch sinyal yolağı reseptörleri ve ligandları	12
Şekil 8. Notch sinyal yolağı reseptör-ligand aktivasyonu ve bu aktivasyona bağlı meydana gelen değişimler	13
Şekil 9. Arteriyol endotel hücrelerinde Notch sinyaline bağlı olarak <i>Hey1</i> ve <i>Hey2</i> ekspresyonlarının düzenlenmesi ile ilgili senaryonun şematik görüntüsü	20
Şekil 10. SCFSkp2 E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bileşenleri ve Skp2 aracılı degradasyon yolağının şematik gösterimi.	22
Şekil 11. BSA-Protein standart eğrisi.	34
Şekil 12. Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer dokularının genel histolojik görünümü.....	44
Şekil 13. Fötal akciğer dokularında immunohistokimya boyama yöntemi ile <i>Hey1</i> ekspresyonunun belirlenmesi.....	46
Şekil 14. Fötal akciğer dokularında immünofloresan boyama yöntemi ile <i>Hey1</i> ekspresyonunun belirlenmesi.....	47
Şekil 15. Fötal akciğer dokularında immunohistokimya boyama yöntemi ile Skp2 ekspresyonunun belirlenmesi.....	48
Şekil 16. Fötal akciğer dokularında immünofloresan boyama yöntemi ile Skp2 ekspresyonunun belirlenmesi.....	49
Şekil 17. Western blot yöntemiyle fötal akciğer doku örneklerinde <i>Hey1</i> protein ekspresyonunun belirlenmesi.	50
Şekil 18. Western blot yöntemiyle fötal akciğer doku örneklerinde Skp2 protein ekspresyonunun belirlenmesi.	51

Şekil 19. Total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarının agaroz jelde görüntüsü.....	54
Şekil 20. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen Real-time PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında birleştirilmiş (pooled) örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.....	55
Şekil 21. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında birleştirilmiş (pooled) örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.....	55
Şekil 22. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında bireysel örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.....	56
Şekil 23. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Deneme ve Kontrol gruplarında Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.....	57
Şekil 24. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Deneme ve Kontrol gruplarında Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.....	57
Şekil 25. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.....	58
Şekil 26. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.....	58
Şekil 27. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen bireysel örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.....	59
Şekil 28. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen bireysel örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.....	59
Şekil 29. TaqMan metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	60
Şekil 30. TaqMan metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	60
Şekil 31. SYBR Green metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	61
Şekil 32. SYBR Green metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	62

Şekil 33. SYBR Green metoduna göre bireysel örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	63
Şekil 34. SYBR Green metoduna göre bireysel örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri.....	64
Şekil 35. SYBR Green metoduna göre Kontrol ve Deneme gruplarında Hey1 ve Skp2 genlerine ait bireysel ΔC_t dağılım grafikleri.	65

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Farelerde bazı Notch sinyal yolağı hedef genleri ve ilişkili diğer genler	19
Tablo 2. Her bir grup için 200 µg protein içeren total hacimler	35
Tablo 3. Birleştirilmiş (pooled) örneklerde RNA miktarlarının (500 ng) hazırlanması	38
Tablo 4. Bireysel örneklerde RNA miktarlarının (500 ng) hazırlanması	38
Tablo 5. 2X reverse transkripsiyon master karışımının hazırlanması.....	39
Tablo 6. Her bir örnek için qRT-PCR karışımının hazırlanması.....	40
Tablo 7. Birleştirilmiş örneklerde gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde kullanılan TaqMan problemleri.....	40
Tablo 8. TaqMan teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde termal döngü protokolü.....	40
Tablo 9. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde her bir örnek için hazırlanan real-time PCR karışımı (1X).....	41
Tablo 10. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde kullanılan primer dizileri	42
Tablo 11. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde termal döngü protokolü	42
Tablo 12. Kontrol ve Deneme gruplarına ait bireysel RNA örneklerinin A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri.....	52
Tablo 13. Kontrol ve Deneme gruplarına ait birleştirilmiş (pooled) RNA örneklerinin A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri.....	53

ÖZET

FARELERDE *IN VITRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO TRANSFERİNİN FÖTAL AKCİĞER DOKUSUNDA NOTCH SİNYAL YOLAĞI HEDEF GENLERİNDEN *HEY1* VE *SKP2* GENLERİNİN EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Doğan G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Doktora Programı (Veteriner) Doktora Tezi, Aydın, 2019.

Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin fötal (E18.5) akciğer dokusunda Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada bir Kontrol grubu ve bir Deneme grubuna yer verilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan fötal akciğer doku örnekleri, PMSG+hCG uygulaması yapılmamış olan dişilerin, aynı yaştaki erkeklerle çiftleştirilmelerinden elde edilen fötuslardan; Deneme grubunu oluşturan fötal akciğer doku örnekleri ise PMSG+hCG uygulamasını takiben çiftleştirilen dişilerden elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda büyütülmesiyle elde edilen blastosistlerin yalancı gebelere transferi sonucunda elde edilen fötuslardan izole edilmiştir. Akciğer dokularında, *Hey1* ve *Skp2* proteinlerinin ekspresyonlarını belirlemek amacıyla immunohistokimya/immunofloresan boyama teknikleri uygulanmıştır. *Hey1* ve *Skp2* genlerinin transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde ekspresyonlarının belirlenmesinde kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) ve western blot yöntemlerinden yararlanılmıştır. İmmunohistokimya/immunofloresan boyama sonuçları, Kontrol ve Deneme gruplarına ait akciğer dokularında *Hey1* ve *Skp2* proteinlerinin benzer bir ekspresyon profiline sahip olduklarını göstermiştir. Birleştirilmiş total RNA örneklerinde TaqMan problemleri kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubunda *Hey1* mRNA ekspresyonunun 3,30 kat azaldığını; *Skp2* mRNA ekspresyonunun ise 8,53 kat arttığını göstermiştir. Aynı örneklerde, SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri, *Hey1* mRNA ekspresyonunun 4,39 kat azaldığını; *Skp2* mRNA ekspresyonunun ise 10,57 kat arttığını göstermiştir. Ayrıca, SYBR green qRT-PCR yöntemi ile bireysel örneklerde yapılan analizler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1* mRNA ekspresyonunun 3,88 kat azaldığını; *Skp2* mRNA ekspresyonunun ise 7,57 kat arttığını göstermiştir. Western blot analizleri, Kontrol

grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubunda Skp2 proteininin ekspresyon düzeyinin 2,34 kat arttığını; istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Hey1 proteininin 1,17 kat azaldığını göstermiştir. Elde edilen veriler, Hey1 ve Skp2'nin farelerde fötal akciğer dokusunda belirli hücreler tarafından eksprese edildiğini göstermekte olup, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin Hey1 ve Skp2'nin transkripsiyonel/translasyonel ekspresyonlarını değiştirerek ftal akciğer dokusunun gelişimini etkileyebileceğini dşndrmektedir.

Anahtar kelimeler: Fare ftal akciğer dokusu, Hey1, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi, Notch sinyal yolağı, Skp2.

ABSTRACT

EFFECT OF *IN VITRO* MOUSE EMBRYO CULTURE AND EMBRYO TRANSFER ON THE EXPRESSION OF NOTCH SIGNALING PATHWAY TARGET GENES *HEY1* AND *SKP2* IN THE FETAL LUNG TISSUE

Dogan G. Aydin Adnan Menderes University, Institute of Health Sciences, Histology-Embryology PhD (Doctor of Philosophy) Program (Veterinary), PhD Thesis, Aydin, 2019.

The aim of the present study was to investigate whether or not *in vitro* embryo culture and embryo transfer have any effect on the expression of Notch signaling target genes *Hey1* and *Skp2* in the fetal mouse lung tissue (E18.5). The study included one Control group (CG) and one Experimental group (EG). Lung tissues constituting the CG were harvested from fetuses of naturally ovulating females. The Experimental group consisted of fetuses generated by transfer of *in vitro*-developed blastocysts obtained through *in vitro* culture of zygotes. Immunohistochemistry/immunofluorescence staining techniques were used to reveal Hey1/Skp2 immunopositive cells. qRT-PCR and western blot methods were used to quantify the expression of *Hey1/Skp2* genes. The results demonstrated that *Hey1/Skp2* genes have a similar expression pattern in both groups. Results from TaqMan and SYBR Green qRT-PCR analyses performed on pooled total RNA samples indicated that *Hey1* mRNA expression is decreased 3.30-fold and 4.34-fold, whereas the expression of *Skp2* is increased 8.53-fold and 10.57-fold in the EG compared to the CG, respectively. SYBR Green qRT-PCR analyses performed on individual total RNA samples demonstrated that *Hey1* mRNA expression is decreased by 3.88-fold; whereas *Skp2* mRNA expression was increased by 7.57-fold in the EG compared to the CG. Western blot analysis showed that the expression of Skp2 protein was increased by 2.34-fold in the EG compared to the CG. On the other hand, there was a 1.17-fold decrease in the expression of Hey1 protein in the lung tissue of fetuses comprising the EG. Taken together, data gathered in the present study indicate that Hey1/Skp2 are specifically expressed by certain cells in fetal mouse lung tissues and further suggest that *in vitro* embryo culture and embryo transfer might affect lung development in the fetal period by altering the expressions of *Hey1/Skp2* genes at transcriptional/translational levels.

Keywords: Hey1, *in vitro* embryo culture and embryo transfer, mouse fetal lung tissue, Notch signaling pathway, Skp2.

1. GİRİŞ

İnfertilite, en az on iki ay boyunca herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın ve düzenli olarak gerçekleştirilen cinsel ilişkiden sonra gebe kalınamaması durumu olarak tanımlanmaktadır (Zegers-Hochschild ve ark, 2009; WHO 2010). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan incelemelere göre, tüm dünyada ciddi bir sağlık problemi haline gelen infertilite, yetişkin bireylerin neredeyse %10-15'ini etkilemektedir (Cloonan ve ark, 2007; Nayak ve ark, 2013, Agarwal ve ark, 2015). Yapılan çalışmalar tüm dünya genelinde, 48.5 milyon infertil çiftin var olduğunu göstermektedir (Mascarenhas ve ark, 2012; Agarwal ve ark, 2015). Başka bir çalışmaya göre ise, 186 milyondan daha fazla insanın infertiliteden etkilendiği tahmin edilmektedir (Inhorn ve Patrizio, 2015). Bu rakamlar, infertilitenin yaygınlığını göstermesi ve infertilite tedavisinde çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemlerinin önemine işaret etmeleri açısından önem taşımaktadır. Feuer ve Rinaudo (2017)'ya göre, bu güne kadar ÜYTE yöntemi uygulanarak dünyaya gelen bebek sayısının 6.5 milyon civarında olduğu tahmin edilmektedir. Ancak 2018 verilerine göre bu rakamın 8 milyondan daha fazla olduğu rapor edilmiştir (ESHRE, 2018).

ÜYTE uygulamalarının en önemli hedefi tek bir embriyo transferi ile sağlıklı bir bebek elde etmektir. Bazı durumlarda gebelik oranını artırmak amacıyla birden fazla embriyo transfer edilebilmekte ise de bu durum çoğul gebelik riskinin artması ile sonuçlanmaktadır (Schieve ve ark, 1999). Çoğul gebelik, beraberinde erken doğum ve düşük doğum ağırlığı risklerini taşımaktadır ve bu nedenle kaçınılması gereken bir durum olarak değerlendirilmektedir (Daltveit ve ark, 1999; Bergmann ve ark, 2004; Magee, 2004; Lee ve ark, 2006). Erken doğan bebeklerde mortalite yüzdesi yüksektir (Imaizumi 1994). Daha da önemlisi, erken doğan bebekler çeşitli sağlık ve gelişim problemleri açısından yüksek risk altında olabilmektedirler (Ooki, 2010). Yapılan çalışmalar, yüksek serebral palsi prevalansı (Pettersson ve ark, 1993; Topp ve ark, 2004), ani bebek ölümü sendromu (Getahun ve ark, 2004) ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğu (Attention Deficit Hyperactive Disorder, Levy ve ark, 1996) gibi uzun vadeli çeşitli sağlık sorunlarının çoğul gebelikler ile ilişkilendirilebileceğini göstermektedir. Diğer yandan, düşük doğum ağırlığına sahip olan bebeklerin yetişkin dönemlerinde, Tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli sağlık problemleri ile karşılaşma risklerinin daha fazla olabileceği belirtilmektedir (Valdez ve ark, 1994; Curhan ve ark, 1996; Barker ve ark, 2002). ÜYTE uygulamaları ile elde

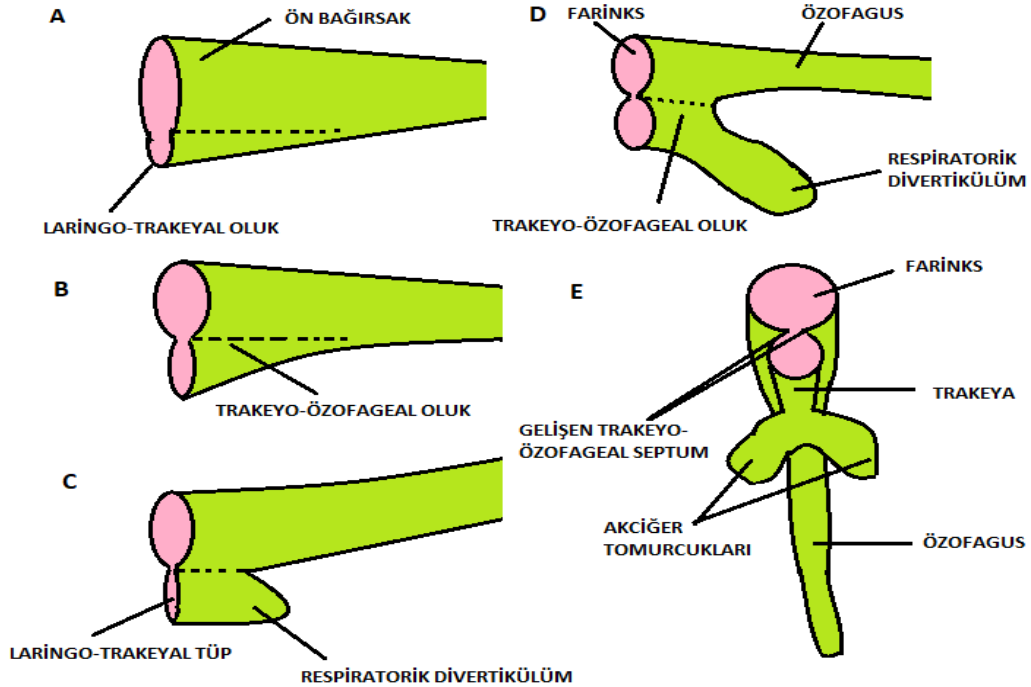
edilen gebeliklerde erken doğum oranının daha yüksek olduğu kabul edilmektedir (Koivurova ve ark, 2002; McGovern ve ark, 2004; Wisborg ve ark, 2010). Bu durum, normal bir gebelik sonucu dünyaya gelen bireyler ile kıyaslandıklarında, ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen bireyleri, solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha duyarlı hale getirebilmektedir (Koivurova ve ark, 2002). ÜYTE yöntemleri uygulanarak dünyaya gelen bireylerin, astım ve çeşitli enfeksiyöz hastalıklara yakalanma risklerinin daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar (Ericson ve ark, 2002; Carson ve ark, 2013) da bulunmaktadır.

Konuyla ilgili olarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent Karagenc tarafından yürütülen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-Benzeri Reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” isimli TÜBİTAK projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulanarak elde edilen farelerde fetal dönemde akciğer gelişiminin geri kaldığını, akciğer dokusunda TLR sinyal yolağı da dahil olmak üzere pek çok yolağın etkilendiğini ve doğal bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından birisini oluşturan Toll-benzeri reseptörlerden TLR-2, -3, -4, -5, -7, -8, -9 ve -13 genlerine ait mRNA düzeylerinin anlamlı düzeyde azaldığını göstermektedir. Benzer şekilde, Doğan (2014) tarafından gerçekleştirilen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” isimli yüksek lisans tez projesinden (Danışman Prof. Dr. Levent Karagenc, BAP Proje no: VTF14028) elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulanarak elde edilen fütüslerde (E18.5) trakeya gelişiminin geri kaldığını ve trakeya dokusunda bulunan bazal hücre sayılarının anlamlı düzeyde arttığını göstermektedir. Bütün bu sonuçlar, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin akciğer gelişimini ve bu süreçte rol oynayan pek çok gelişimsel mekanizmayı olumsuz yönde etkileyebildiğini düşündürmektedir. Buna karşın, literatürde akciğer dokusunun gelişiminde önemli işlevlere sahip olan Notch sinyal yolağının hedef genlerinden olan *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonları üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı konusunda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Sunulan tez çalışması, konuyla ilgili olarak yürütmekte olduğumuz çalışmaların bir parçasını oluşturmakta olup, farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transfer işlemlerinin fetal akciğer dokusunda *Hey1* ve *Skp2* genleri üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi amacını taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Farelerde Akciğer Gelişimi

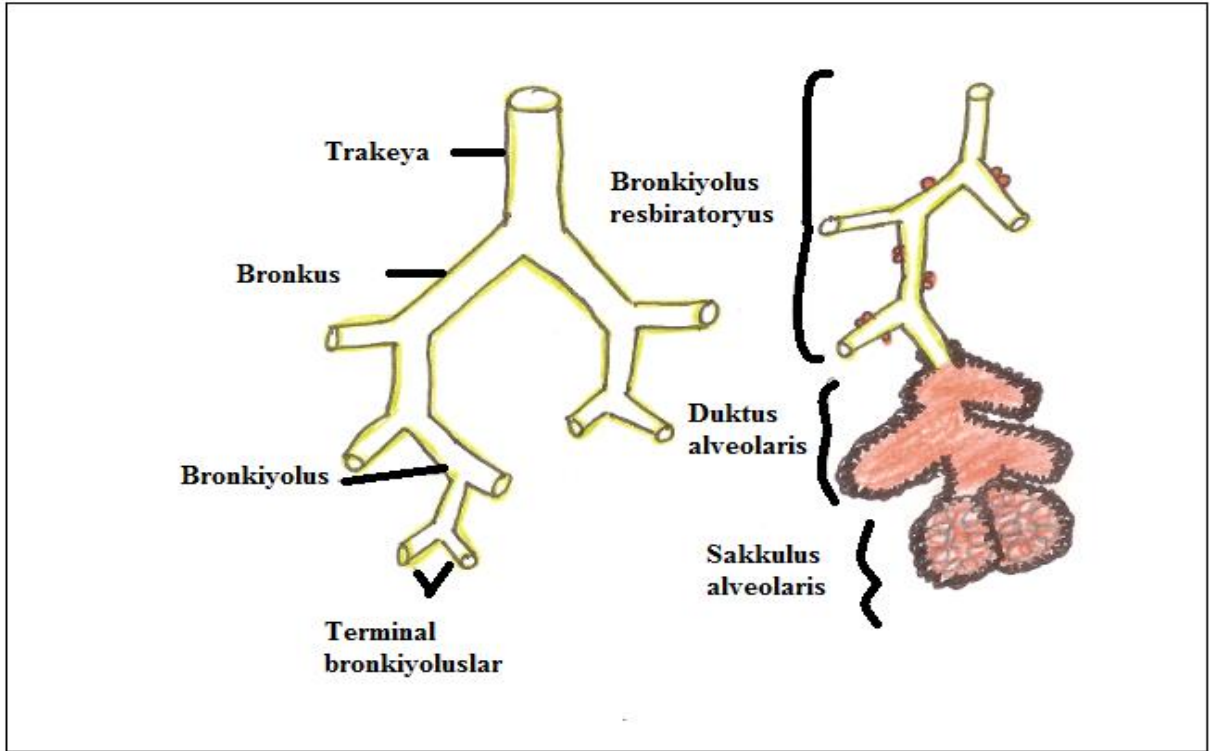
Farelerde ön bağırsağın (foregut) anteryör kısmından uzunlamasına (longitudinal) iki tüpe ayrılması ile solunum sisteminin gelişimi başlamış olur. Solunum sisteminin gelişim süreci, farelerde 9.5. embriyonik günde (E9.5, - 22 somit evresi) görülmektedir (Morrisey ve Hogan, 2010). Ön bağırsaktan ventral olarak gelişen laringo-trakeyal oluk dışa doğru büyür ve ön bağırsaktan bağımsız bir hal alır (Şekil 1A). Böylece ilerde trakeya ve özofagusu şekillendirecek olan trakeyo-özofageal oluk oluşmuş olur (Şekil 1B). Bu oluklar birleşerek trakeyo-özofageal septumu oluştururlar. İki septumun kaynaşması sonucu birbirinden ayrılan tüpler daha sonra özofagus ve trakeyayı oluşturmak üzere gelişimlerine devam ederler. Dorsal tüp özofagusu meydana getirirken, ventral tüp trakeya ve akciğer tomurcuklarını şekillendirir [(Şekil 1C-E), (McGeady, 2006; Que ve ark, 2006)].



Şekil 1. Laringo-trakeyal ve trakeyo-özofageal olukların ön bağırsaktan şekillenmesi, trakeya, özofagus ve akciğer tomurcuklarının gelişim basamakları (McGeady, 2006'dan modifiye edilmiştir).

İleride trakeya ve akciğer tomurcuklarını oluşturacak olan laringo-trakeyal tüp, içeride endoderm tabakası ve bu tabakayı dışarıdan saran splanchnik mezoderm tabakasından oluşmaktadır. Larinksten başlayarak, trakeya, bronşlar ve akciğerin iç yüzünü örten epitel katman endodermden oluşurken, trakeya ve akciğerlere ait kıkırdak ve kas yapıları ön barsağı çevreleyen mezodermden köken almaktadır (McGeady, 2006). Laringo-trakeyal tüpten bir kabartı meydana gelerek, kese şeklinde solunum divertikülümü (respiratorik divertikülüm, Şekil 1C-D) oluşur (Laudy ve Wladimiroff, 2000; Moore ve Persaud, 2002). Respiratorik divertikülüm lateral ve longitudinal olarak büyür ve akciğer tomurcuklarını meydana getirir (Şekil 1E).

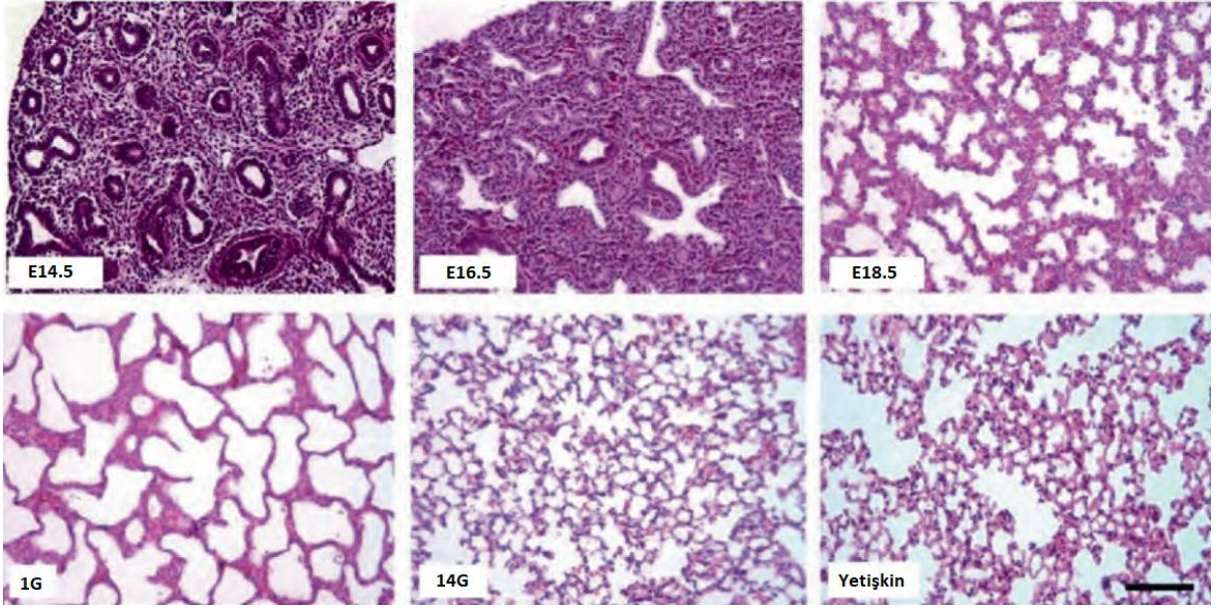
Gelişim devam ederken tomurcuklar da buna paralel olarak genişlerler ve bronkus prensipalisleri (primer ve sekonder bronşlar) oluştururlar. Dorso-ventral eksen boyunca kaudal olarak uzayan ve hilusdan akciğer loblarının içerisine giren primitif bronşlar sürekli dallanmaya maruz kalırlar (dallanma morfogenezi). İlk bronşların dallanması sonucunda, bronkus lobaris ya da tersiyer bronşlar; tersiyer bronşların dallanması sonucunda ise bronşcuk (bronşiyol, bronkulus ya da bronkiyolus) olarak isimlendirilen yapılar meydana gelir. Bronşcukları oluşturan ilk kısım bronkiyolus verus (terminal), alveolarilere açılan son kısım ise bronkiyolus respiratoryus (alveolaris) olarak bilinmektedir. Bronkiyolus alveolarisler ise birkaç kola ayrılır ve duktus alveolarislere (alveol kanalları) açılırlar. Son olarak duktus alveolarisler, sakkulus alveolaris (alveol keseleri) ile bağlantı kurarlar (McGeady, 2006). Trakeyadan başlayarak alveollere kadar dallanma morfogenezi sonucu oluşan yapılar Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Trakeya, bronkus ve bronkiyolusların dallanma morfogenezinin şematik görünümü.

2.2. Farelerde Akciğer Dokusunun Gelişim Aşamaları

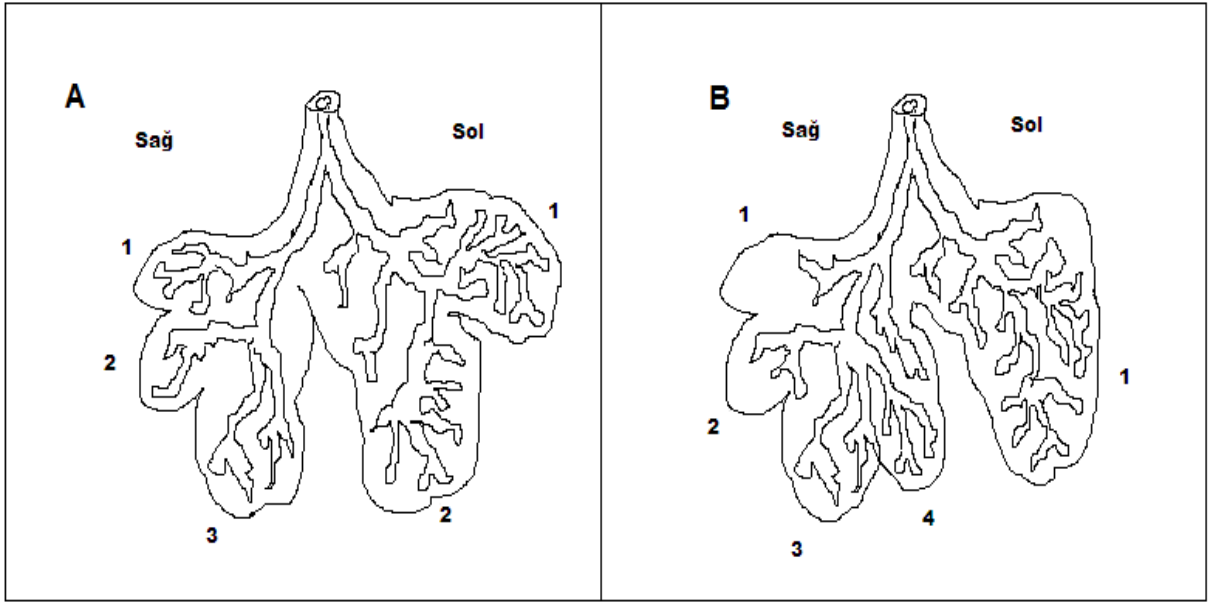
Akciğer dokusunun gelişim basamakları literatürde çeşitli şekillerde ele alınmıştır (Burri, 1984; Laudy ve Wladimiroff, 2000; Moore ve Persaud, 2002). İnsanlarda, embriyonik, psödoglandüler, kanaliküler, sakküler ve alveolar evreler olmak üzere beş ana grupta incelenen akciğer gelişim evreleri, farelerde embriyonik ve psödoglandüler evrelerin histolojik olarak benzer bir yapı göstermelerinden dolayı (Laudy ve Wladimiroff, 2000), psödoglandüler (E9.5-16.6), kanaliküler (E16.6-17.4), sakküler (E17.4 - (P5)) ve alveolar evreler (P5-30) olmak üzere dört ana başlıkta incelenmektedir (Cardoso ve Lü 2006; Rawlins ve ark, 2009; Waburton ve ark, 2010). Waburton ve ark (2010) histolojik olarak fare akciğer gelişimini ışık mikroskopik görüntülerle tanımlamışlardır (Şekil 3).



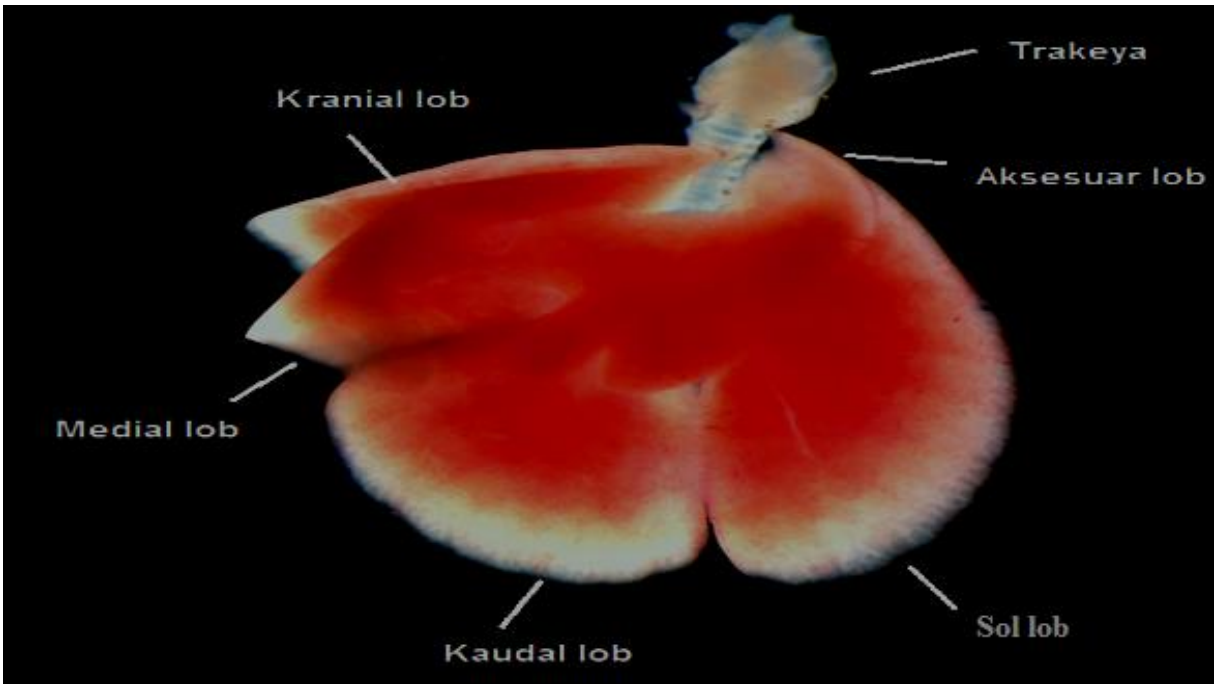
Şekil 3. Fare akciğer dokusunun gelişim evrelerinin histolojisi. Fötal fare akciğer dokusunun gelişimi, psödoglandüler evre (E14.5), kanaliküler evre (E16.5), sakkuler evre (E18.5 ve 1G) ve alveolar evrelerden (14G) oluşmaktadır. Akciğer gelişim evrelerinin tümü tamamlandıktan sonra, yetişkin fare akciğer dokusunda tamamen şekillenmiş, olgun, bal peteği benzeri bir yapıya sahip normal solunum yapısını ve fonksiyonunu sağlayan alveol kanalları görülmektedir (Yetişkin). Skala bar: 100 µm (Warburton ve ark, 2010).

2.2.1. Psödoglandüler Evre

Ön bağırsaktan köken alan primer akciğer tomurcukları şekillendikten sonra (~E9.5), dallanma morfogenezi (branching morphogenesis) başlar (~E10.5) ve bu süreç doğum gerçekleşinceye kadar devam eder (Weaver ve ark, 1999; Eblaghie ve ark, 2006). Psödoglandüler evrede akciğer tomurcukları simetrik olup pleuroperitoneal kanallar içerisine doğru çıkıntılar meydana getirirerek büyürler. Dallanma morfogenezi türler arasında farklılık göstermektedir. Örneğin, insanlarda sağ akciğer üç, sol akciğer iki lob olmak üzere toplamda beş lob bulunur. Farelerde de beş lob oluşmasına karşın, sağ akciğer dört, sol akciğer ise bir lobdan oluşmaktadır (Şekil 4). Bu yapılanma 12. embriyonik günde (E12) tamamlanmaktadır (Warburton ve ark, 2000). Farelerde sağ akciğer lobları cranial (Cr), medial (Md), caudal (Cd) ve accessory (Ac) loblar olarak isimlendirilirler (Şekil 5).

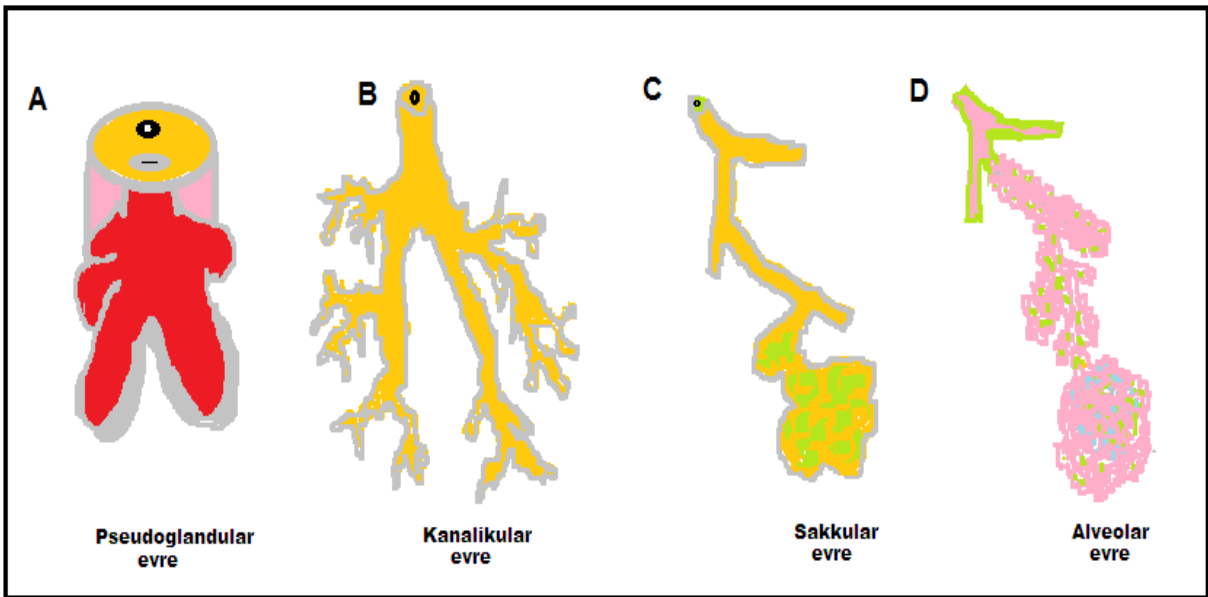


Şekil 4. İnsan ve fare akciğer lobları arasındaki farklılıklar; A) insan akciğeri şematik çizimi; B) fare akciğeri şematik çizimi.



Şekil 5. Gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c) izole edilen bir fare fötüsünde trakeya ve akciğer loblarının genel görünümü (Orijinal, Doğan, 2014). Farelerde akciğer lobları sağda dört ve solda tek lob olarak bulunmaktadır. Sağda kranial, medial, kaudal ve aksesuar loblar bulunurken, solda ise sadece bir lob bulunur.

Psödoglandüler evrede akciğer tomurcukları üzerlerini kuşatan mezenşim içerisinde büyüyerek genişlerler (Şekil 6A). Dallanma morfojezi ile şekillenen bronşiyal ağacın (Metzger ve ark, 2008) iç yüzü henüz farklılaşmamış epitel hücreleri ile döşenir ve bu epitel örtünün yüzeyi splanchnik mezoderm ile sarılır (Warburton ve ark, 2000; Costa ve ark, 2001). Epitel örtüyü oluşturan ve henüz farklılaşmamış hücreler projenitör karakterde olup, hem kendilerini yenileyebilme hem de yeni hücre tiplerini oluşturabilme yeteneğine sahiptirler. Ayrıca, 13,5. embriyonik günden (E13.5) itibaren, diğer solunum yolu hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler (Rock ve Hogan, 2011). Örneğin, silli, Clara ve nöroendokrin hücreleri bu evrede projenitör hücrelerden farklılaşırlar (Rawlins ve ark, 2009). Dallanan bronşiyal ağaçta hücrelerin farklılaşması ile eş zamanlı olarak bazı histolojik değişimler de izlenir. Epitel hücrelerinin yanı sıra kıkırdaklar, submukozal bezler ve düz kaslar bu evrede şekillenir (McGeedy, 2006). Dallanmanın artışı ile birlikte psödoglandular evreyi kanaliküler evre takip eder.



Şekil 6. Farede akciğer gelişim fazlarının şematik olarak gösterimi (Leibel ve Post, 2016'dan modifiye edilmiştir).

2.2.2. Kanaliküler Evre

Kanaliküler evrede akciğer dokusunun asıl işlevi olan gaz değişimi ile ilgili temel bölümleri şekillenir ve damarlanma başlar (Şekil 6B). Dallanma morfogenezi akciğer dokusunun distaline doğru devam eder. Bir seri dallanma sonucu mezoderm kökenli damarlar ve bu damarlar ile iç içe girmiş epitel hücreleriyle sıralanmış olan terminal sakkuluslar oluşur (Warburton ve ark, 2000). Büyüme devam ederken bronş ve bronşiyollerin lümeni de genişler. Bronkiyolus respiratoryuslar, terminal bronkiyolusların dallanması sonucu oluşurlar. Solunum kanalında yer alan epitel hücreler, periferal skuamöz hücreleri ve proksimal kübik hücreleri meydana getirirler (Waburton ve ark, 2010). Bu evrede yoğun bir damarlaşmanın sonucunda, epitel ile bağlantılı perikanaliküler-vasküler bir ağ oluşur (McGeady, 2006).

2.2.3. Sakküler Evre (terminal kese evresi)

Sakküler evrede, seri dallanmalar sonucu akciğer dokusunun distal bölgelerinde son bulan çok sayıda kalın duvarlı sakkulus alveolaris oluşur (Şekil 6C). Bu evre, terminal kese evresi olarak da adlandırılır (Burri, 1984; Waburton ve ark, 2010). Bronkiyolus respiratoryusların içerisine açıldığı çok sayıda terminal kese gelişir. Bu keselerin iç yüzü kübik epitel hücreleri ile kaplıdır. Kübik epitel hücreler, gelişimin devamında alveollerde farklılaşarak Pönomosit I ve Pönomosit II hücrelerini oluştururlar (McGeady 2006, Waburton ve ark, 2010). Kanaliküler evrede başlayan damarlaşma bu evrede de devam eder. Mevcut kan damarlarının uzunlukları ve çapları artarak yeni arteriyo-venöz damarlar şekillenir (Burri, 1984; 2006). Ayrıca lenfatik bağlantıların da iyi geliştiği sakküler evreyi alveolar evre takip eder (Warburton ve ark, 2010; Chao ve ark, 2015).

2.2.4. Alveolar Evre

Akciğer dokusunun gelişimi alveolar evrede tamamlanır (Warburton ve ark 2010, Şekil 6D). İnsanlarda akciğer gelişiminin alveolar fazı uterusda gelişimin son haftalarında başlar ve doğumdan sonra devam eder (Emery ve Wilcock, 1966; Davies ve Reid, 1970; Boyden, 1974; Langston ve ark, 1984). Ancak farelerde esas olarak doğumdan sonra (postnatal dönemde) gerçekleşmektedir (Amy ve ark, 1977). İnsanlarda, alveolar evre, yaklaşık olarak gebeliğin 32. haftasında başlar ve tahmini olarak 2-8 yaşları arasında devam eder (Dunnill, 1962; Thurlbeck, 1982; Langston ve ark, 1984). Farelerde ise, yaklaşık olarak doğumdan sonra 4/5. günde (~P4/~P5) başlar, yaklaşık olarak 7.günde (~P7) pik yapar (Mund ve ark, 2008; Schittny ve ark, 2008) ve yaklaşık olarak 30/36. günde (~P30/~P36) sona erer (Cardoso ve Lü 2006; Mund ve ark, 2008; Schittny ve ark, 2008; Rawlins ve ark, 2009; Warburton ve ark, 2010).

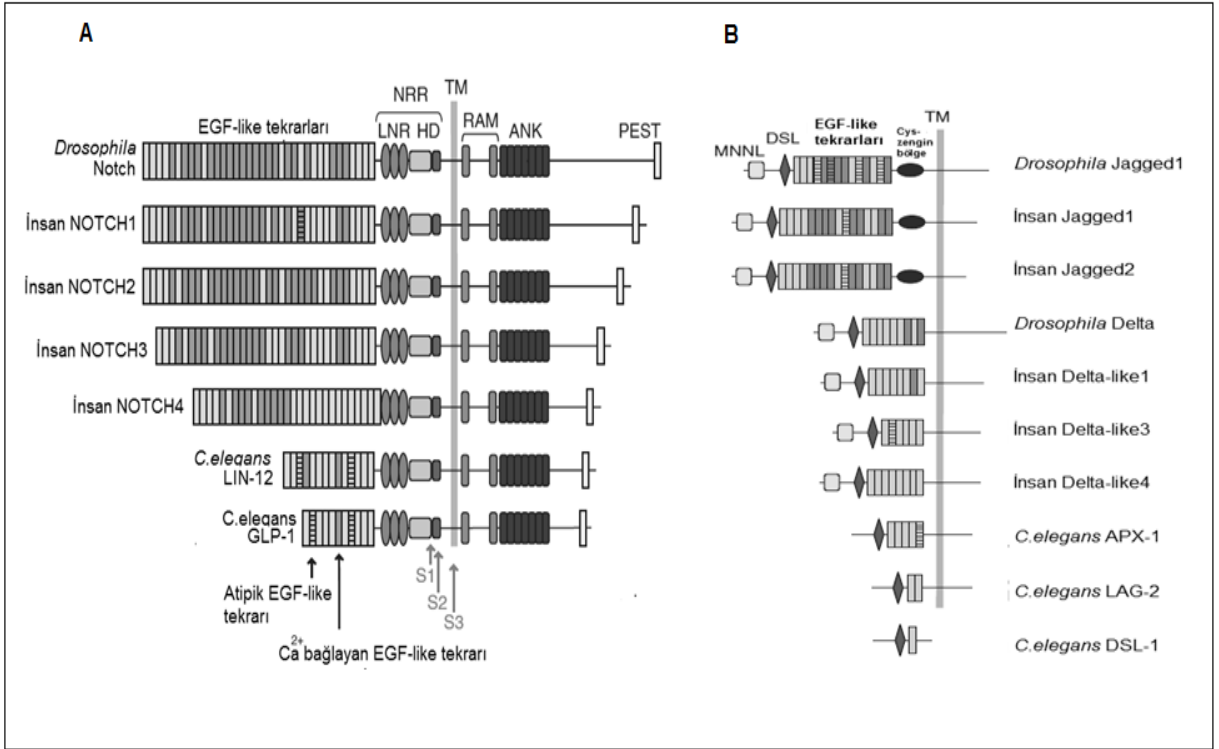
Alveolarizasyon, alveollerin oluşması ile sonuçlanan, akciğer gelişimi sırasında akciğerin distal kısımlarının oluşumuna ve olgunlaşmasına yol açan bir süreci temsil eder (Rodríguez-Castillo ve ark, 2018). Alveolarizasyonun tamamlanması mutlaka damarların genişlemesini gerektirir (DeMello ve ark, 1997; Schachtner ve ark, 2000). Bu süreç yeni damarların önceden var olanların anjiyogenezi ile yeni damar filizlerinin oluşmasını içerir (DeLisser ve ark, 2006). Akciğer dokusunun en önemli özelliklerinden biri, alveollerin gaz değişimini kolaylaştırmak amacıyla, yüksek derecede vaskülarizasyona uğramış olmaları ve damar endotel hücrelerinin alveolar epitel hücrelere yakın bir yerde bulunmasıdır (Bhattacharya, 2005; Komarova ve Malik 2010). Vaskülarizasyon sonucunda meydana gelen kılcal damarlar alveoller ile kaynaşarak alveolar epitel hücreleri ile sıkı bir bağ kurarlar. Alveoller ve kılcalların yakın ilişki kurarak meydana getirdikleri yapı hava-kan bariyerinin oluşturulmasında etkin bir rol oynar. Hava-kan bariyerini alveolar epitel hücreleri, alveolar sıvı (alveolar fluid), bazal membran ve endotel hücreleri meydana getirirler (Fronius ve ark, 2012). Hava-kan bariyerinin işlevi damar endotel hücreleri ve alveolar epitel hücrelerinin karşılıklı olarak etkileşimi sonucu sağlanır (McGeady, 2006). Esas olarak gaz alışverişini sağlayan alveollerin gelişimini tamamlaması oldukça önemli olup, erişkin dönemde de akciğer dokusunun işlevini etkileyebilmektedir. Bu nedenle alveolar gelişimde etkin rol oynayan moleküler mekanizmalar ve hücre tiplerinin daha iyi araştırılması gerekmektedir (Kwinta ve Pietrzyk, 2010; Lum ve ark 2011).

2.3. Akciğer Gelişiminde Notch Sinyal Yolağı

Solunum yollarını döşeyen epitel örtü içerisinde yer alan farklı hücre tiplerinin oluşmasında Notch sinyal yolağının etkili olduğu düşünülmektedir. Notch sinyal yolağı, gelişimin erken dönemlerinde proksimalden distale kadar tüm hücre tiplerinin farklılaşmasını regüle etmekle kalmayıp, gelişimin ilerleyen dönemlerinde de spesifik hücre hatlarının farklılaşmasını düzenlemektedir (Xu ve ark, 2012). Örneğin, bazal hücreler, Clara hücreleri, silli hücreler, goblet hücreleri, nöroendokrin hücreler ve alveolar hücrelerin gelişimleri ve farklılaşmalarının Notch sinyal yolağı ile düzenlendiği düşünülmektedir (Rock ve Hogan, 2011). Notch sinyal yolağı aynı zamanda, vasküler düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinin arteriyo-venöz yapılanması ve farklılaşması, anjiyogenez/vaskülogenezin düzenlenmesinde ve vasküler düz kas hücrelerinin fizyolojik tepkilerinin belirlenmesinde de rol oynamaktadır (Gridley 2010).

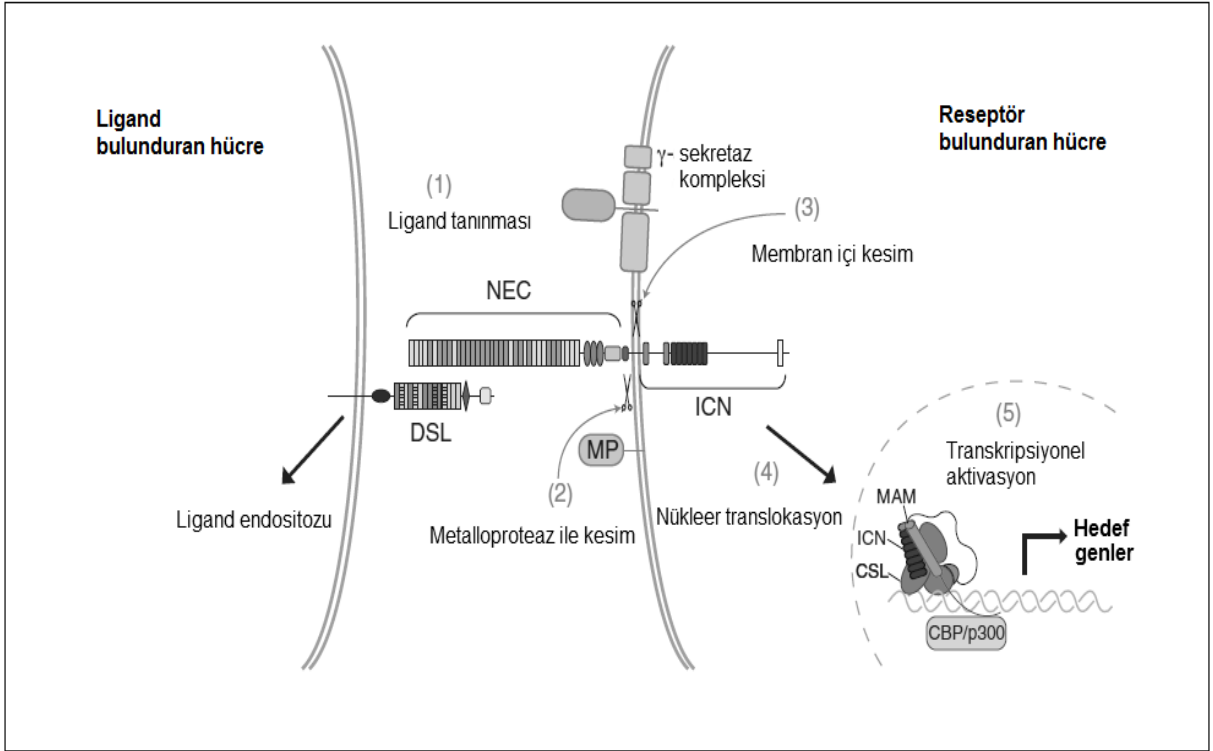
2.3.1. Notch Sinyal Yolağı

Farelerde, Notch sinyal yolağı, dört adet Notch reseptörü (Notch 1-4) ve üçü Delta-like (Dll-1,2,4) ve ikisi Jagged proteinleri (Jagged-1 and Jagged-2) olmak üzere beş adet ligand içermektedir (Artavanis-Tsakonas ve ark, 1999; Lai, 2004). Notch reseptörleri, komşu hücrelerde yerleşmiş transmembran ligandlardan sinyalleri alan, uzun tek geçişli Tip 1 transmembran proteinleridirler (D'Souza ve ark, 2008). Çeşitli hayvan türlerinde bulunan Notch reseptörleri (A) ve ilgili ligandlar (B) Şekil 7 'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Çeşitli türlerde Notch sinyal yolağı reseptörleri ve ligandları (Kwon ve ark, 2012'den modifiye edilmiştir). A, Notch reseptörlerini; B ise Notch ligandlarını göstermektedir.

Kanonik Notch sinyali, DSL (Delta, Serrate, Lag2) ligandlarının, komşu hücre yüzeyindeki Notch reseptörlerine bağlanması ile başlar (D'Souza ve ark, 2010). Notch ligandlarının bağlanmasını takiben, Notch reseptörü transmembran domeini ve jukstamembran (juxtamembrane) bölgesi içinde, ADAM/TACE metalloproteazların aracılık ettiği, iki basamaklı bir proteoliziz bölünme süreci başlatılır (De Strooper ve ark, 1999; Brou ve ark, 2000; Okochi ve ark, 2002). Bu sürecin tamamlanması, Notch hücre içi domeininin (*NICD*) sitoplazmada serbest kalması ile sonuçlanır (Wolfe ve Kopan, 2004; Ilagan ve ark, 2007; Selkoe ve Wolfe, 2007). Sitoplazmada serbest kalan *NICD*, çekirdeğe geçerek DNA bağlayan protein ilişkili bölgeye bağlanır. Böylece, CSL (memelilerde *CBF1/RBPJK*, sineklerde *Su(H)* ve solucanlarda *LAG-1*), ICN ve Mastermind (MAM)/Lag-3 ailesi ko-aktivatör proteinlerinden oluşan bir transkripsiyonel kompleks şekillenir (Artavanis-Tsakonas ve ark, 1999; Petcherski ve Kimble, 2000a,b; Bray, 2006). Bu kompleks daha sonra, p300 gibi ko-aktivatörlerin katkısı ile *downstream* hedef genleri aktive ederler ve *ICN* aracılığı ile transkripsiyonel aktivasyona aracılık ederler (Wallberg ve ark, 2002; Fryer ve ark, 2004). Şekil 8'de Notch sinyal yolağının aktivasyonu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8. Notch sinyal yolağı reseptör-ligand aktivasyonu ve bu aktivasyona bağlı meydana gelen değişimler (Kwon ve ark, 2012'den modifiye edilmiştir). İlk olarak Notch ligandı bulunduran hücre ve Notch reseptörü bulunduran hücre yüzeylerinde reseptör-ligand tanınması sağlanır. Tanınma gerçekleştikten sonra bir dizi olay meydana gelmektedir. Ligandın bağlanmasına bağlı olarak Metalloproteaz (MP)'da konformasyonel değişim geçirerek membran bağımlı kesim gerçekleşir ve Notch ekstraselüler (NEC) domein hücreden ayrılır. Daha sonra ikinci bir kesim ise, γ -sekretaz kompleksi ile membran içinden gerçekleştirilerek intraselüler Notch (INC) domein serbest bırakılır. ICN translokasyon ile çekirdek içine girerek koaktivatör proteinler ile birlikte DNA-bağlı protein CSL proteinine bağlanarak hedef geni eksprese eder.

2.3.2. Proksimal Akciğerde Notch Sinyal Yolağı'nın Rolü

Notch sinyal yolağı komponentleri, gelişen akciğerde eksprese edilmektedir (Ito ve ark, 2000; Post ve ark, 2000; Taichman ve ark, 2002; van Tuyl ve ark, 2005; Tsao ve ark 2008). Tsao ve ark, (2008)'de yaptıkları bir çalışmada, 9-12.5. günde (E9-12.5) fare embriyolarından izole ettikleri ön bağırsak ve akciğer dokularında whole mount in situ hybridization (WMISH) tekniğini kullanarak Notch komponentlerinin dağılımlarını

göstermişlerdir (Tsao ve ark, 2008). Elde ettikleri verilere göre, yaklaşık E9'da, akciğer progenitörlerinin ön bağırsak endoderminde yer aldıklarında, akciğer tomurcuklanmasının henüz başlamadığını ve akciğeri oluşturacak olan kısımda Notch reseptör ve ligandlarının endodermal ekspresyonlarının görülmediğini tespit etmişlerdir. Devam eden gelişim süreciyle birlikte (E10), primer akciğer tomurcuklarının uçlarında yer alan akciğer progenitör hücrelerinde, akciğer ile ilişkili mezenşimde ve öncül trakeyada (tracheal promordia) Notch1 transkriptlerinin varlığı görülmüştür. Aynı zamanda E10'da akciğer epitelinde Notch1 eksprese eden bölgelerde diğer *Jag* ya da *Dll1*(Delta-like1) ligandları hariç *Jag2* ligandının eksprese edildiği, Notch2 ve Notch3 sinyallerinin gözlenmediği ve çok az düzeyde Notch4 ekspresyonunun var olduğu bildirilmiştir. Tsao ve ark, (2008)'nin E10'da Notch2 ve Notch3'ün eksprese edilmeyip, Notch1'in eksprese edilmesine yönelik elde ettikleri bulgunun, Kong ve ark, (2004)'nin RT-PCR verileri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Akciğer gelişimi devam ettikçe (E11-11.5'te), distal epitel tübüllerinde *Notch1* ve *Jag2* mRNA ekspresyonlarının devam ettiği ve *Jag1* ekspresyonun başladığı rapor edilmiştir. Aynı gelişim evresinde (E11-11.5'te), proksimal hava yollarında *Dll1*eksprese edildiği, ancak Notch ya da *Jag* mRNA'larının yok denecek kadar az eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca bu gelişim evresinde (E11-11.5'te), Notch transkripsiyonel efektörü *Rbpjk*'nin her yerde eksprese edildiği ve Notch hedef genlerinden *Hes1*, *Hes5* ve *Hey2*'nin ağırlıklı olarak distal tomurcuklardaki hava yolu epitelinde eksprese edildikleri tespit edilmiştir. Bu durum, Notch'un epitel aktivasyonunun esas olarak dallanan tübüllerin uçlarında (at the tips of branching tubules) meydana geldiğini göstermiştir. Yine E11-11.5'te, Notch'un hedef genlerinden *Hey1*'in epitelde düşük düzeylerde eksprese edildiği, ancak akciğer damar yapılarında güçlü bir biçimde varlığını gösterdiği bildirilmiştir. Aynı evrede (E11-11.5'te), akciğer dokusunun damar, düz kas ve kıkırdak gibi yapılarının gelişiminde potansiyel bir role sahip olan mezenşimde *Jag1*, *Jag2*, *Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*, *Hey1*, *Hes1*, and *Dll4* mRNA'larının güçlü bir biçimde eksprese edildiği yine bu çalışmada bildirilmiştir.

Akciğer gelişiminde Notch sinyal yolağını tanımlayabilmek ve anlayabilmek amacıyla Notch inaktivasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir (Tsao ve ark, 2008; 2009). Gebeliğin sekizinci gününde (E 8.5) fetal fare ön bağırsak eksplantları ile yapılan deneylerde (E8.5 ön bağırsak eksplantları 3 gün kültüre edilmişlerdir), γ -sekretaz inhibitörü olan DAPT (N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester) ile Notch sinyal yolağının inhibisyonu sonucunda, normalde belirli düzeylerde *Nkx2.1* (*Titf1*) eksprese eden distal uç progenitör popülasyonlarının daha fazla artarak geniş alana yayıldıkları gözlemlenmiştir (Tsao

ve ark, 2008). Bununla birlikte bu eksplantlarda proksimal bölgenin de daraldığı/kısaldığı (shortening) tespit edilmiştir. Benzer olarak, DAPT ile muamele edilmiş ön bağırsak eksplantlarında (E8.5+3 gün) distal bölge hücreleri olma olasılığı yüksek olan hücrelerde artış gözlenirken, *Sox2* ekspresyonu ile karakterize olan proksimal bölge hücrelerinde azalma görülmüştür (Tsao ve ark, 2008). Yani distal bölge epitel hücrelerinde görülen artışa zıt olarak *Sox2* ekspresyon eden proksimal bölge epitel hücrelerinde azalma görülmüştür. Dolayısıyla *Sox2* ekspresyonunda görülen bu azalma, primordiyal akciğer dokusunda proksimal-distal yapısında meydana gelen değişimi destekler niteliktedir. *Sox2*, bazal hücreler ve Clara hücreleri de dahil olmak üzere birçok proksimal hücre tipinin üretilmesi ve/veya onarımı için gereklidir (Tompkins ve ark, 2009; Que ve ark, 2009). DAPT ile muamele edilmiş daha ileri yaştaki akciğer eksplantlarında (E11.5+2 gün) ise proksimal bölgelerde ektopik tomurcuklar görülmüş ve distal tomurcukların sayısında ve boyutunda artış tespit edilmiştir (Tsao ve ark, 2008). Tsao ve ark (2009)'nın yaptığı başka bir çalışmada ise, *Pofut1* geninin (*Pofut1* geni Notch proteininin işlevi için zorunludur ve O-fokoziltransferazı kodlar) delesyonu ile *Sox2*'nin akciğer dokusunun proksimal bölgesinde üstlendiği rolü yerine getirebilmesi için Notch sinyal yolağına gereksinim duyduğu ortaya konulmuştur. Sonuç olarak bu çalışmalar ile Notch sinyal yolağının gelişimin erken dönemlerinde akciğer dokusunun proksimal bölgelerindeki hücresel kaderi düzenlediği ortaya konulmuştur, ancak akciğer dokusunun distal bölgelerindeki progenitör hücre kimliğinin düzenlenmesindeki rolü net olarak bilinmemektedir (Xu ve ark, 2012).

2.3.3. Alveolar Gelişimde Notch Sinyal Yolağının Rolü

Alveolar gelişim, akciğer dokusunun distal bölgelerinde üç hücresel kompartmanda (epitel, endotel, mezenşimal stroma) düzenlenen olaylar aracılığı ile meydana gelmektedir (Xu ve ark, 2012). Notch sinyal yolağı, mikro-vaskülarizasyon ve alveolar gelişimi düzenlemek amacıyla paraneşim ve vasküler kompartmanlarda hücre kaderinin belirlenmesinde ve hücre farklılaşmasında önemli roller üstlenmektedir (Hussain ve ark, 2017). Örneğin, distal akciğer epitelinde yerleşik bulunan hücrelerde, hücre içi *Notch3* domeini (*N3ICD*)'nin ektopik ekspresyonu, alveolar epitel hücrelerinin farklılaşmasının engellenmesine neden olmaktadır (Dang ve ark, 2003). Benzer şekilde, distal akciğer epitelinde yerleşik bulunan hücrelerde *NIICD*'in (ektopik olarak) ekspresyon edilmesi, akciğer

gelişimini tamamen ortadan kaldırmakta, kist şekillenerek bu yapıların içerisindeki hücreler alveolar belirteçleri (marker) eksprese edemez duruma gelmektedirler (Guseh ve ark, 2009). Bu veriler, DAPT ile inkübe edilmiş eksplant akciğer (E11.5) dokuları ile yapılan çalışmalarından elde edilen sonuçları desteklemektedir. Nitekim akciğer eksplantlarının (E11.5) DAPT ile inkübe edilmesi, dallanmanın artmasına ve $Nkx2.1^+$ ve SPC^+ hücrelerin sayısında artmaya neden olmaktadır (Tsao ve ark, 2008). Ancak, distal akciğer gelişiminde rol oynayan *Pofut1* ya da *Rbpjk*'nin şartlı delesyonları, distal akciğer gelişimini olumsuz yönde etkilememektedir (Tsao ve ark, 2009; Morimoto ve ark, 2010). Böyle olmakla birlikte, *Rbpjk*'nin delesyonu sonucunda E14.5- E18.5 farelerde alveolar epitel hücrelerinde her hangi bir değişiklik gözlenmezken, miyofibroblast hücrelerinin farklılaşmasında kusurlar ortaya çıkmaktadır (Xu ve ark, 2010). Benzer olarak, Lunatic Fringe (*Lnfng*, N-asetilglukozamintransferaz; Dll ligand bağlanması aktivasyonunu düzenlemek için Notch reseptörünü modifiye eder) delesyonu, alveolar epitel hücrelerinden sadece Tip I pönomositlerin geç farklılaşmasına neden olmaktadır (Xu ve ark, 2010). *Notch2^{β-geo} / +* *Notch3^{β-geo} / β-geo* mutant farelerde de benzer bir hata gözlemlenmektedir (Xu ve ark 2010). *Lnfng* mutant farelerindeki durumun aksine, *Notch2^{β-geo} / +* *Notch3^{β-geo} / β-geo* çift mutant farelerde (*Notch2^{β-geo} / +* ya da *Notch3^{β-geo} / β-geo* tekli mutant farelerde değil) distal akciğer epitel farklılaşmasında gecikme tespit edilmemiştir. Ancak, *Notch2^{β-geo} / +* *Notch3^{β-geo} / β-geo* mutantlarının çoğu doğumdan kısa bir süre sonra ölürken, süttten kesilmiş olan altı *Notch2^{β-geo} / +* *Notch3^{β-geo} / β-geo* mutant farenin üçünde alveol gelişiminin değişmiş olduğu gözlenmiştir. Bir bütün olarak ele alındığında bu veriler, alveolar gelişimin düzenlenmesi amacıyla miyofibroblastların düzenli bir şekilde farklılaşması ve mobilizasyonunun sağlanmasında Notch sinyal yolağının gerekliliğini ortaya koymaktadır (Xu ve ark, 2010).

Akciğer dokusunun doğumdan sonra fonksiyonunu sağlayabilmesi amacıyla, alveolar gelişim boyunca alveol epiteli ile mezenşimal kapiller bağlantıları arasında yakın ve sıkı bir ilişki sağlanır (Schittny, 2017). Akciğer damar sisteminde, Notch sinyal yolağı genlerinin ekspresyonu, erken akciğer gelişiminden geç akciğer gelişimine kadar sürekli bir biçimde artar (Xu ve ark, 2012). Bu durum, alveolar gelişim boyunca, mikro-vaskülarizasyonun genişlemesinde Notch sinyal yolağının önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (Post ve ark, 2000; Taichman ve ark, 2002; Xu ve ark, 2010). Örneğin, *Foxf1* heterozigot mutantlarda, pulmoner *Notch2* ve hedef geni *Hes1*'in ekspresyonunun bozulması sonucunda akciğerin damar morfogenezinde anormallik ve yeni doğanlarda letalite görülebilmektedir (Kalinichenko ve ark, 2004). Krebs ve ark (2000), yaptıkları bir çalışmada, Notch sinyal

yolağının embriyonik vasküler morfogenezin düzenlenmesinde ve yeniden düzenlenmesinde (remodeling) esansiyel bir role sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Elde ettikleri verilere göre, *Notch4* geninin embriyonik gelişim sırasında zorunlu olmadığı, ancak *Notch4* ve *Notch1* genlerinin farelerde embriyogenez sırasında kısmen örtüşen rolleri olduğu bildirilmiştir. Domenga ve ark (2004) ise *Notch3*'ün vasküler düz kas hücrelerinin arteriyel düzenlenmesinde (arterial specification) gerekli olduğunu göstermişlerdir (Domenga ve ark, 2004).

2.4. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genleri

Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, Notch'un hedef genleri de dahil Notch sinyali yolağının embriyonik vasküler gelişimde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir (Herreman ve ark, 1999; Xue ve ark, 1999; Huppert ve ark, 2000; Krebs ve ark, 2000; 2004, Uyttendaele ve ark, 2001; Li ve ark, 2003; Duarte ve ark, 2004; Gale ve ark, 2004; Fischer ve ark, 2004; Barsi ve ark, 2005; Koo ve ark, 2005; Kokubo ve ark, 2005; Limbourg ve ark, 2005; Carlson ve ark, 2005). *Hes* (Hairy and enhancer-of-split) ve *Hey* (*Hesr*, *Hrt* ya da *Chf*, Hairy and enhancer-of-split-related) genleri, Notch sinyali yolağının en iyi şekilde tanımlanmış hedef genleri arasında yer almaktadırlar (Kageyama ve Ohtsuka, 1999; Leimeister ve ark, 1999; Iso ve ark, 2003; Fischer ve Gessler, 2007; Borggreffe ve Oswald, 2009). *Hes1*, *Hes5*, *Hes7*, *Hey1*, *Hey2* ve *HeyL* (*Hes*'in alt ailesi, YRPW motifi ile ilişkili) genleri *Notch1* ile aktive edilebilmektedirler (Jarriault ve ark, 1995; Nishimura ve ark, 1998; Maier ve Gessler, 2000).

Hes ve *Hey* (aynı zamanda *Hesr*, *Chf*, *Hrt*, *Herp* ya da *gridlock* olarak da adlandırılır) proteinleri, transkripsiyonel baskılayıcılar olarak işlev gören helix-loop-helix (sarmal-ilmek-sarmal) transkripsiyon faktörleridir (Iso ve ark 2001a,b). Fare ve sıçan genomlarında yedi *Hes* [*Hes1-7*] (Sasai ve ark 1992; Bae ve ark 2000; Bessho ve ark 2001) ve üç *Hey* (*Hey1,2,L*; ayrıca *Hrt1,2,3*; *Hesr1,2*; *Herp2,1* ya da *Chf2,1* olarak da belirtilir) geni tanımlanmıştır (Leimeister ve ark, 1999; Nakagawa ve ark, 2000; Iso ve ark, 2001a). *Hes1*, *Hes5* ve *Hes7* Notch yolağı tarafından indüklenebiliyorken (Ohtsuka ve ark, 1999; Bessho ve ark 2001); *Hes2*, *Hes3* (Nishimura ve ark 1998) ve *Hes6* (Koyano-Nakagawa ve ark, 2000) genlerinin ekspresyonu Notch sinyali yolağından bağımsız olarak şekillenmekte; *Hes4* hakkında ise yeterli veri bulunmamaktadır. Diğer yandan, *Hey* gen ailesinin tüm üyeleri Notch tarafından

indüklenebilir (Maier ve Gessler, 2000; Iso ve ark, 2001a; Nakagawa ve ark, 2000) ve evrimsel süreçte bu denge çok iyi korunmuştur (Fischer ve ark, 2007). Notch sinyal yolağının hedef genleri arasında sadece *Hey* ve *Hes* genleri yoktur, ayrıca *CD25 (IL2-R and preTa, pre-T-cell receptor alphachain)*'in T-hücrelerinde Notch sinyal yolağı hedef genlerinden biri olduğu gösterilmiştir (Deftos ve ark, 2000; Reizis ve Leder, 2002; Adler ve ark, 2003). T hücre gelişiminin daha sonraki aşamalarında rol alan GATA3 transkripsiyon faktörünü kodlayan *GATA3* geninin de Notch'un direk hedef geni olduğu bildirilmiştir (Amsen ve ark, 2007; Fang ve ark, 2007; Hozumi ve ark, 2008). Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *NRARP* ve *Deltex-1*'in ise, Notch sinyalinin negatif regülatörlerinden oldukları gösterilmiştir (Lamar ve ark, 2001; Izon ve ark, 2002). Diğer yandan, kanserde Notch sinyal yolağı hedef genleri de bulunmaktadır. Örneğin, *c-myc* (Palemero ve ark, 2006; Weng ve ark, 2006), *cyclinD1* (Ronchini ve Capobianco, 2001; Cohen ve ark, 2010) ve *p21/Walf* (Rangarajan ve ark, 2001; Guo ve ark, 2009) kanserde ortaya çıkan Notch hedef genleridir. Dohda ve ark (2007), *c-myc* ve *Skp2* genlerinin T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) hücrelerinde Notch sinyal yolağının direk hedef genleri olabileceklerini belirtmişlerdir. Bütün bunların dışında, *NFKB2* (Oswald ve ark, 1998), *Ifi-204*, *IfiD3*, *ADAM19* (Deftos ve ark, 2000), *bcl2* (Deftos ve ark, 1998) , *E2A* (Ordentlich ve ark, 1998) ve *HoxA5,9,10* (Weerkamp ve ark, 2006)'da dahil olmak üzere pek çok Notch sinyal yolağı hedef geni bulunmaktadır. Farelerde bazı Notch sinyal yolağı hedef genleri ve Notch sinyal yolağı ile ilgili diğer genlerin listesi Tablo 1'de verilmiştir.

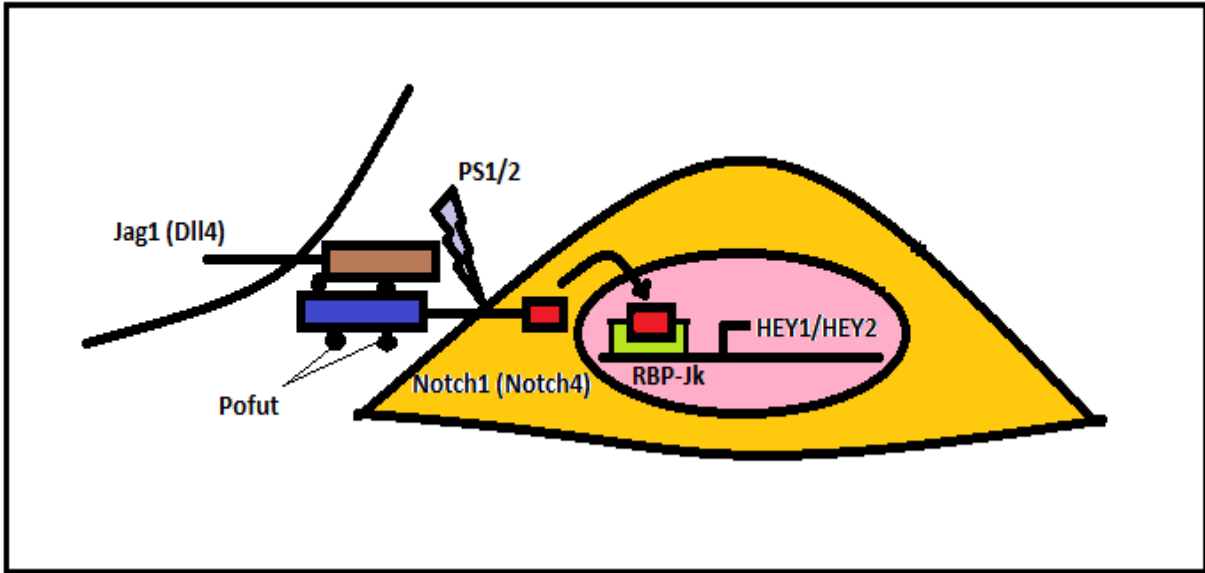
Tablo 1. Farelerde bazı Notch sinyal yolağı hedef genleri ve ilişkili diğer genler (Web_1)

Notch sinyal yolağı genleri	Notch sinyal yolağı hedef genleri	Diğer Notch Sinyal yolağı genleri	Notch Sinyal Yolağı ile bağlantılı diğer yolak genleri
<i>Notch1,</i> <i>Notch2,</i> <i>Notch3,</i> <i>Notch4,</i> <i>Dll1 (Delta1),</i> <i>Dll3,</i> <i>Dll4,</i> <i>Dtx1,</i> <i>Jag1,</i> <i>Jag2,</i> <i>Lfng,</i> <i>Mfng,</i> <i>Numb,</i> <i>Rfng,</i> <i>Adam10,</i> <i>Adam17 (CD156b),</i> <i>Ncstn,</i> <i>Psen1,</i> <i>Psen2,</i> <i>Psenen,</i> <i>Ep300,</i> <i>Maml1,</i> <i>Maml2,</i> <i>Ncor2,</i> <i>Rbpjl,</i> <i>Snw1 (Skiip)</i>	<i>Cflar (Casper),</i> <i>Id1,</i> <i>Ifng,</i> <i>Ptcra,</i> <i>Ccnd1,</i> <i>Cdkn1a (p21Cip1, Waf1),</i> <i>Cd44,</i> <i>Jag1,</i> <i>Lfng</i> <i>ErbB2 (Her-2, neu),</i> <i>Dtx1,</i> <i>Hes1,</i> <i>Hes5,</i> <i>Hey1,</i> <i>Hey2,</i> <i>Heyl,</i> <i>Krt1,</i> <i>Lor,</i> <i>Nr4a2 (Nurr1),</i> <i>Chuk (IKBKA),</i> <i>Il17b,</i> <i>Il2ra (CD25),</i> <i>Nfkb1,</i> <i>Nfkb2,</i> <i>Stat6,</i> <i>Fos,</i> <i>Fosl1 (fra-1),</i> <i>Pparg,</i>	<i>Axin1,</i> <i>Ccne1,</i> <i>Figf (Vegfd),</i> <i>Gsk3b,</i> <i>Lrp5,</i> <i>Shh,</i> <i>Wisp1,</i> <i>Ctnnb1 (Catnb),</i> <i>Il6st (gp130),</i> <i>Lmo2,</i> <i>Mmp7,</i> <i>Pax5,</i> <i>Runx1 (AML1),</i> <i>Stil,</i> <i>Neurl1a (Neu1),</i> <i>Pofut1,</i> <i>Zic2 (HPE5),</i> <i>Aes (Tle5, Groucho),</i> <i>Cbl,</i> <i>Gli1,</i> <i>Hoxb4,</i> <i>Hr,</i> <i>Tle1,</i> <i>Sel1l,</i> <i>Supt6</i>	<i>Hedgehog Sinyali:</i> <i>Gli1,</i> <i>Gsk3b,</i> <i>Shh,</i> <i>Smo,</i> <i>Sufu</i> <i>WNT Sinyali:</i> <i>Aes (Tle5, Groucho),</i> <i>Axin1,</i> <i>Ctnnb1 (Catnb),</i> <i>Fzd2,</i> <i>Fzd3,</i> <i>Fzd4,</i> <i>Fzd5,</i> <i>Fzd7,</i> <i>Gsk3b,</i> <i>Lrp5,</i> <i>Tle1,</i> <i>Wisp1,</i> <i>Wnt11</i>

2.4.1. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genlerinden *Hey1*

Hey genlerinin gelişimdeki rolleri tam olarak açıklanamamış olmasına karşın, farelerde üç *Hey* geni (*Hey1*, *Hey2*, ve *HeyL*) de embriyonik dönemde birçok doku ve organda eksprese edilmektedir (Leimeister ve ark, 1999; Nakagawa ve ark 1999; Fischer ve ark, 2004). *Hey1* geni tarafından kodlanan *Hey1* transkripsiyon faktörü, bir çok doku ve organdaki spesifik ve dinamik ekspresyon yapısı ile önemli bir role sahiptir (Leimeister ve ark, 1999; Fischer ve ark, 2004). *Hey1*, somitlerin, branşiyal kavislerin (branchial arch) ve böbrek gibi dokuların gelişimleri boyunca eksprese edilmektedir (Fischer ve ark, 2004). Ayrıca, patolojik koşullarda *Hey1*'in anjiyogenezde önemli ve direkt bir rol oynadığı da ortaya konulmuştur (Guan ve ark, 2017).

Hey1 ve Hey2 transkripsiyon faktörlerini kodlayan *Hey1* ve *Hey2* genleri, kardiovasküler sistemde Notch sinyal yolağının birincil hedef genlerinden olup, *Hey* genlerinin ekspresyonu ile Notch sinyal yolağının aktive olduğunun en önemli göstergelerinden birisi olarak kabul edilmektedir (Wöltje ve ark, 2015). Endotel hücrelerinde *Hey1* ve *Hey2*'nin ekspresyonu *Notch1*'e bağlı olarak düzenlenmektedir (Şekil 9). Her iki gen de *Notch1*^{-/-} fare dokusunda düşük seviyelerde de olsa eksprese edilmektedir (Fischer ve ark, 2004; Wöltje ve ark, 2015). Bu durum, *Hey1* ve *Hey2* ekspresyonlarının sadece Notch'a değil, diğer sinyal yollarına da bağlı olduğunu göstermektedir (Wöltje ve ark, 2015). Nitekim anjiyozenez sırasında, endotel hücrelerinde *Hey* genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesinde, Notch sinyal yolağının yanısıra, TGF-beta ve BMP sinyal yollarının da rol oynadığı bilinmektedir (Beets ve ark, 2013; Wöltje ve ark, 2015).



Şekil 9. Arteriyol endotel hücrelerinde Notch sinyaline bağlı olarak *Hey1* ve *Hey2* ekspresyonlarının düzenlenmesi ile ilgili senaryonun şematik görüntüsü (Fischer ve ark, 2004'ten modifiye edilmiştir). *Jag1 (Dll4)* ligandı, endotel hücreleri ve öncülleri için gereklidir. *Notch1 (Notch4)*, *Pofut* ve *Ps1/2* ile kesilerek Notch hücre içi kısmı (ICN), *Rbpjk* ile birlikte, *Hey1* ve *Hey2* transkripsiyonunu aktive eder. Bu bileşenlerden herhangi birisinde bir eksiklik olması, benzer vasküler bozukluklara yol açar (Fischer ve ark, 2004).

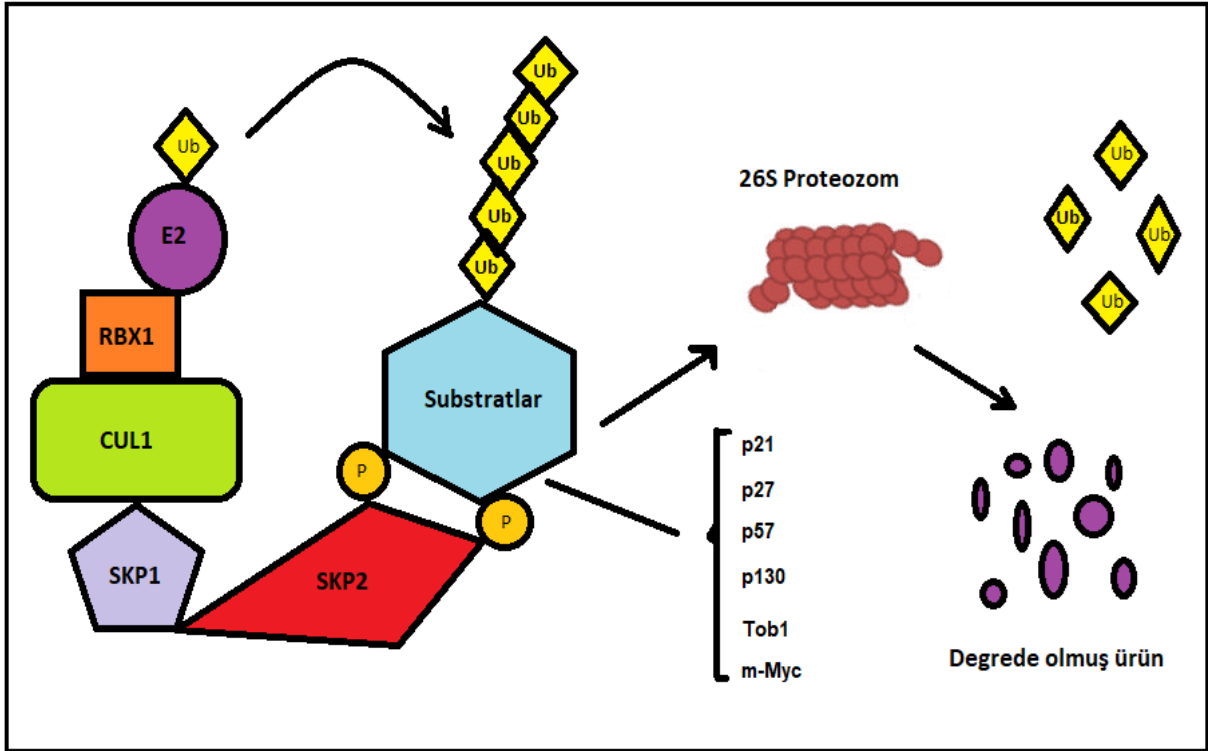
Hey genleri somitogenez ve kardiyovasküler sistemde kritik rol oynarlar (Iso ve ark, 2001b; Fischer ve ark, 2002; Fischer ve Gessler, 2003; 2007). İnsan ve fare genomunda kodlanmış üç *Hey* geni vardır (*Hey1*, *Hey2* ve *HeyL*) ve üç gen farede düzenli olarak kalp gelişimine katkıda bulunur (Wiese ve ark, 2010). Olgunlaşan somitlerde üç *Hey* (*Hey1,2* ve

Hey1) geni de her somitin caudal yarımında eksprese edilmektedir. Bunlar arasında, *Hey1* ekspresyonu dinamik bir varyasyon göstermekte ve presomitik mezoderm ile sınırlı kalmaktadır (Fischer ve ark, 2004). *Hey1* knockout fare çalışmalarından elde edilen veriler, *Hey1* gen kaybının tek başına gözle görülür fenotipik bir etkisinin olmadığını, ancak, *Hey2* ile birlikte bir kayıp söz konusu olduğunda plasenta, vitellüs kesesi (yolk sac) ve embriyonun kendisini de etkileyen ölümcül bir vasküler bozukluğa neden olduğunu göstermektedir (Fischer ve ark, 2004). Bu durum, farelerde *Hey1* ve *Hey2*'nin ortak fonksiyonunun arterial hücre kaderinin veya kimliğinin belirlenmesi açısından destekleyici niteliktedir (Fischer ve ark, 2004). Birlikte ele alındığında tüm bu bulgular, farelerde arterial endotel hücrelerin, vasküler öncüllerden doğru bir biçimde gelişimi ve farklılaşmasının *Notch1* ve *Hey1/Hey2* sinyaline bağlı olduğunu göstermektedir (Fischer ve ark, 2004).

2.4.2. Notch Sinyal Yolağı Hedef Genlerinden *Skp2*

İnsan genomunda üç sınıf (FBXWs, FBXLs ve FBXOs) içerisinde toplam altmış sekiz adet F-box proteini bulunmaktadır (Jin ve ark, 2004; Frescas ve Pagano, 2008; Chan ve ark, 2010a). FBXWs sınıfı, WD40 tekrarlarını içeren F-box proteinlerden oluşmaktadır. FBXLs sınıfı, Leucine Rich Repeats (LRR)'leri içeren proteinlerden; FBXOs sınıfı ise C terminal bölgesinde çeşitli domainler içeren proteinlerden oluşmaktadır (Chan ve ark, 2010a).

FBXL1 olarak da bilinen S-phase kinase-associated protein 2 (*Skp2*), üzerinde en çok çalışılan ve en iyi tanımlanmış FBXLs proteinleri arasında yer almaktadır (Chan ve ark, 2010a). *Skp2* geni tarafından kodlanan *Skp2* proteini, lösinden zengin tekrarlar içeren bir enzimdir (Demetrick ve ark, 1996). *Skp2*, SCF^{*Skp2*} E3 ubiquitin ligaz kompleksinin F-box komponentini oluşturmaktadır (Nakayama ve ark 2004). SCF^{*Skp2*} E3 ubiquitin ligaz kompleksi, değişmez bir adaptör protein (*Skp1*), RING finger proteini (*Rbx1*), Scaffold proteini (*Cullin1*) ve reseptör protein olarak işlev gören değiştirilebilir bir F-box proteini (*Skp2*) olmak üzere dört bileşenden oluşmaktadır (Wang ve ark, 2011; 2012, Şekil 10).



Şekil 10. SCF^{Skp2} E3 ubiquitin ligaz kompleksinin bileşenleri ve Skp2 aracılı degradasyon yolağının şematik gösterimi (Wang ve ark, 2011; 2012'ten modifiye edilmiştir). SCF^{Skp2} E3 ubiquitin ligaz kompleksi ubiquitin konjugasyonunu sağlamak amacıyla E2 enzime yakından sunulan hedef substratları tanıyarak ardarda ubiquitin ilavesi ile proteinlerin parçalanması amacıyla 26S-proteozoma sunar. Başka bir ifadeyle, Skp2, protein ubiquitinasyonunu indüklemekte ve bu durum proteozom bağımlı degradasyon ile sonuçlanmaktadır (Chan ve ark, 2010a). Ayrıca, p21, p27, p57, p130, Tob1, FOXO1 ve c-Myc, Skp2'nin spesifik substratları arasında yer almaktadırlar (Wang ve ark, 2011; 2012).

Skp2 proteinini kodlayan *Skp2* geni, Sarmiento ve ark (2005) tarafından ilk kez Notch sinyal yolağı hedef geni olarak tanımlanmıştır. Aynı araştırmacılar, Notch sinyal yolağının spesifik bir biçimde, *Skp2*'nin CSL-bağımlı transkripsiyonunu direk olarak indükleyerek, p27^{Kip1} ve p21^{Cip1}'i degrade ettiğini göstermiştir (Sarmiento ve ark, 2005). Notch sinyal yolağı aktive edilmesi durumunda, Notch sinyalinin artışı ile birlikte *Skp2* düzeylerinin arttığı, CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitörü (CKI) p27^{Kip1}'in de buna paralel olarak düşük düzeylerde olduğu saptanmıştır (Dohda ve ark, 2007). Notch sinyal yolağının farmakolojik olarak bloke edilmesi ise, *Skp2* ekspresyonunda bir azalmaya ve dolaylı olarak CDK inhibitör (CKI)'ü p27^{Kip1}'in ekspresyonunda de bir artışa neden olmakta ve buna bağlı olarak hücre döngüsünün G1 fazında takılı kalmasına sebep olmaktadır (Dohda ve ark, 2007).

Skp2, hücre siklusunun özellikle S, G2 fazı ve M fazlarının başlangıcında fosforillenmiş cyclin-bağımlı kinaz inhibitörü 1B (CDKN1B/p27^{Kip1})'nin degradasyonunda rol almaktadır (Carrano ve ark, 1999; Tsvetkov ve ark, 1999). p27^{Kip1}, Skp2'nin ubiquitinilasyon için hedef substratı olup, miktarı SCF^{Skp2} kompleksi tarafından negatif olarak düzenlenir (Carrano ve ark, 1999). Başka bir ifadeyle, Skp2'nin yüksek miktarlarda eksprese edilmesi p27 ubiquitinasyonu ve degradasyonunu indüklerken, Skp2'nin susturulması p27 ubiquitinasyonu ve degradasyonunu azaltır (Chan ve ark, 2010a). Skp2'nin p27'ye bağlanmasında, kofaktör görevi gören Cks1'e gereksinim duyulur. Bu nedenle, Cks1 eksikliği Skp2'nin p27'ye bağlanmasını engeller ve bu durum p27'nin up-regülasyonu ile sonuçlanır (Ganoth ve ark, 2001; Harper, 2001; Spruck ve ark, 2001; Chan ve ark, 2010a).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar, Skp2'nin hücre siklusundaki bilinen işlevlerinin yanı sıra hücrelerin canlılıklarını (*survival*) ve apoptozis süreçlerinde de rol aldıklarını göstermektedir (Chan ve ark, 2010a). Örneğin, RNA interferens teknolojisi ile *Skp2* ekspresyonunun ortadan kaldırılması (knockdown) çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi indüklemektedir (Yokoi ve ark 2003; Lee ve McCormick, 2005; Kitagawa ve ark, 2008; Wang ve ark, 2010). Başka bir çalışmada ise *Skp2*'den yoksun fare embriyo fibroblastlarında (*Skp2*^{-/-} MEFs), normal fare embriyosu fibroblastları (wild-type MEFs) ile karşılaştırıldığında, apoptozis oranının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Nakayama ve ark, 2000).

Skp2 ekspresyonunun fizyolojik sınırların üstüne çıkması (*over expression*) kanser gelişimi ile de ilişkilendirilmektedir (Ben-Izak ve ark, 2003; Bloom ve Pagano, 2003; Drobnjak ve ark, 2003; Fukuchi ve ark, 2004; Li ve ark, 2004; Chan ve ark, 2010a; Huang ve ark, 2017). Örneğin, prostat kanserini de içeren çeşitli insan kanserlerinde *Skp2*'nin çok fazla miktarda eksprese edilmesi sıklıkla görülen bir durumdur ve bu ekspresyon farklılığı p27 ekspresyonu ile zıt yönde korelasyon göstermektedir (Bloom ve Pagano, 2003; Nakayama ve Nakayama, 2005). Bu veriler, *Skp2*'nin insan kanserlerinin gelişiminde rol alabileceği hipotezini desteklemektedir (Chan ve ark, 2010a). Nude fareler ile gerçekleştirilen deneylerden (soft agar assay" ve "tumor formation assays) elde edilen sonuçlar, *Skp2*'nin, HRas^{G12V} (hRas'ın onkojenik formu) ile birlikte hücre transformasyonunu indüklediğini göstermektedir (Gstaiger, 2001). Bu bulgular, *Skp2*'nin *in vitro* ve *in vivo* olarak bir proto-onkogen olarak işlev görebildiğini düşündürmektedir. Lin ve ark (2009) tarafından xenograft tümör modeli kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma, prostat kanser hücrelerinde gözlenen aşırı *Skp2* ekspresyonunun, prostat kanseri hücrelerinin büyümesini ve tümörogenezini önemli düzeyde arttırdığını göstermektedir. Ayrıca aşırı *Skp2* ekspresyonu ile kanser metastazı

arasında yüksek bir korelasyonun varlığı (Chan ve ark, 2010b), *Skp2*'nin kanser hücrelerinin göç ve metastazının düzenlenmesinde de rol oynayabileceğini göstermektedir. *Skp2*'nin yetersiz olması durumunda hücre göçü ve metastazda belirli aksaklıkların ortaya çıkabildiğini gösteren çalışmalar (Lin ve ark 2009, Chan ve ark 2010a,b), *Skp2*'nin hücre göçü ve invazyonunda rol oynadığını desteklemektedir. Bütün bu veriler, primer tümör oluşumu, hücre göçü ve kanser metastazında *Skp2*'nin onkojenik rollerini ortaya koymaktadır (Chan ve ark 2010a,b).

2.5. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Yöntemleri

Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri (ÜYTE) terimi, anne adayından elde edilen olgun yumurta hücreleri (ovum) ve baba adayından elde edilen sperm hücrelerinin çeşitli yöntemlerle fertilizasyona hazır hale getirilmesi, fertilizasyon işleminin gerektiğinde vücut dışında gerçekleştirilmesi, gametlerin ya da embriyoların anne adayının genital organlarına transferini de kapsayan uygulamaların tamamını ifade etmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Yönetmeliği 2005). Subfertilite ve infertilite tedavisinde çeşitli ÜYTE yöntemleri kullanılmaktadır. Dünyanın ilk tüp bebeği olarak tarihe geçen Louise Brown'un 1978 yılında doğumundan (Steptoe ve Edward, 1978) günümüze kadar bu alanda birçok teknolojik gelişme sağlanmıştır. Ülkemizde *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi çalışmaları ilk kez Prof. Dr. Refik Çapanoğlu ve arkadaşları tarafından Ege Üniversitesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tüp Bebek Merkezi'nde başlatılmış, bu öncü çalışmaların sonucunda ilk tüp bebek (Ece Çoker) 16.04.1989 tarihinde dünyaya gelmiştir (Web_2). Tüp bebek alanında sağlanan gelişmelere paralel olarak, tüp bebek merkezlerinin sayısı da hızla artış göstermiştir. Son verilere göre, ülkemizde 107 adedi özel ve 41 adedi devlete ait olmak üzere toplam 148 adet tüp bebek merkezi aktif olarak hizmet vermektedir (Web_3). İnsanlarda başarılı ilk tüp bebek uygulamasından günümüze kadar ÜYTE alanında sağlanan teknolojik ilerlemenin kronolojik bir tarihçesi Ek 1'de özetlenmiştir. Ayrıca her bir ÜYTE yönteminin tanımı Ek 2'de sunulmuştur.

2.6. ÜYTE Yöntemlerinin Uygulanmasına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Sağlık Sorunları

ÜYTE uygulamalarının en önemli hedefi tek bir embriyo transferi ile sağlıklı bir bebek elde etmektir. Bazı durumlarda gebelik oranını artırmak amacıyla birden fazla embriyo transfer edilebilmektedir. Ancak, bu durum çoğul gebelik riskini artırmakta (Schieve ve ark, 1999) ve beraberinde birçok sağlık sorununu da getirmektedir. Diğer yandan, ÜYTE uygulaması sonucunda gebe kalan bireylerde erken doğum oranının daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Koivurova ve ark, 2002; McGovern ve ark, 2004; Wisborg ve ark, 2010). Erken doğum sonucunda dünyaya gelen bebeklerin normal doğum sonucu dünyaya gelen bebeklere oranla solunum yolu enfeksiyonlarına karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Koivurova ve ark, 2002). Ayrıca, erken doğumun şiddetli respiratuar sinsityal virüs (Respiratory syncytial virüs) enfeksiyonu için en büyük risk faktörlerinden birisi olduğu kabul edilmektedir (Law ve ark, 2002). Diğer yandan, çoğul gebeliklerle birlikte seyreden düşük doğum ağırlığı olgularının bireyi erişkin dönemde Tip 2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklara daha duyarlı kıldığına ilişkin güçlü epidemiyolojik veriler bulunmaktadır (Valdez ve ark, 1994; Curhan ve ark, 1996; Barker ve ark, 2002). Ayrıca, ÜYTE yöntemleri uygulanarak dünyaya gelen bireylerin, astım ve çeşitli enfeksiyöz hastalıklara yakalanma risklerinin daha yüksek olduğunu gösteren çalışmalar (Ericson ve ark, 2002; Carson ve ark, 2013) da bulunmaktadır.

Tüp bebek ya da ICSI yöntemiyle, zigot/embriyo eldesi ve bunu takiben gerçekleştirilen embriyo transferi çocuk sahibi olmak isteyen milyonlarca anne ve baba adayı için tek bir umut ışığıdır. Böyle olmakla birlikte, ovülasyonu uyarmak amacıyla kullanılan ilaçlar, gametlerin elde edilmesi ve embriyoların *in vitro* ortamda büyütülmeleri, dondurulmaları ve daha sonra çözdürülmeleri gibi birçok işlem gamet/embriyolara zarar verebilmektedir (Lu ve ark, 2013). ÜYTE yöntemlerinin uygulanması sonucu ortaya çıkabilen bu durum, çocuk sahibi olmak isteyen anne/ baba adayları başta olmak üzere toplumun genelini kaygılandırmaktadır. Bilim insanları da bu kaygılara duyarsız kalmamış ve konuyla ilgili birçok bilimsel araştırma gerçekleştirilmiştir. Elimizdeki veriler, ÜYTE uygulaması ile dünyaya gelen çocukların, normal doğum sonucu dünyaya gelen çocuklara oranla daha fazla sağlık riskine maruz kaldıklarını göstermektedir (Schieve ve ark 2004; Shevell ve ark, 2005; Klemetti ve ark, 2006; Alukal ve Lipshultz, 2008; Basatemur ve ark, 2008; Hediger ve ark, 2013). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, bu düşüncüyü desteklemekte ve *in vitro* ortamda yapılan işlemlerin, gamet ve embriyo gelişimi üzerinde ek

bir stres oluşturabileceğini göstermektedir (Giritharan ve ark, 2007). Yine, implantasyon öncesi uterusu meydana gelebilecek bir stres, implantasyon öncesi embriyonal gelişimin yanı sıra fetal ve postnatal gelişimi de etkileyebilmektedir (Farin ve ark, 2004; Ceelen ve ark, 2008). DeBaun ve ark (2003), ÜYTE yöntemleri uygulanarak elde edilen embriyolarda epigenetik değişikliklerin şekillenebileceğini ve bunun sonucunda da doğum kusurlarının ortaya çıkabileceğini bildirmektedir. ÜYTE uygulamaları sonucunda doğan bireylerde Beckwith-Wiedemann Sendromu, Prader-Willi Sendromu ve Angelman Sendromu gibi ender görülen çeşitli epigenetik hastalıkların daha yüksek oranda ortaya çıkması (Falls ve ark, 1999; DeBaun ve ark, 2003; Weksberg ve ark, 2003; Maher ve ark, 2003; Ørstavik ve ark, 2003), bu bulguları destekler niteliktedir. Bu bulgulara paralel olarak ÜYTE uygulamaları sonucunda, 11p15.5 kromozomundaki imprinting özelliği gösteren genlerin mutasyona uğradıkları ve buna bağlı olarak aşırı büyüme bozukluğu ile karakterize olan Beckwith-Wiedemann Sendromu'nun görülme riskinin arttığı bildirilmiştir (Gicquel ve ark, 2003). Cox ve ark (2002), ICSI yöntemiyle dünyaya gelmiş iki bireyde Angelmen Sendromu geliştiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca, ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen bireylerde serebral palsi (Hvidtjørn ve ark, 2006) ve epilepsi (Sun ve ark, 2007) gibi hastalıkların görülme riskinin, normal doğum sonucu dünyaya gelen bireyler ile kıyaslandıklarında, daha yüksek olduğu bildirilmiştir. ÜYTE uygulanarak doğan çocuklarda otizm teşhisi konan çocuk sayısının da ciddi bir şekilde arttığı rapor edilmiştir (Fountain ve ark, 2015). Ayrıca, ÜYTE uygulamaları sonucunda dünyaya gelen bireylerin kansere yakalanma risklerinin daha yüksek olabileceğine dair veriler de bulunmaktadır (Källén ve ark, 2010). Moll ve ark (2003), ÜYTE uygulaması ile doğan bebeklerin göz kanseri olarak bilinen retinoblastomaya yakalanma risklerinin normal bireylere göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Ülkemizde birçok tüp bebek merkezinin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise, ÜYTE uygulanarak doğan bebeklerde neonatal sepsis ve mortalite oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür (Türk Neonatoloji Derneği Yardımcı Üreme Teknikleri ve Çoğul Gebelikler Çalışma Grubu, 2010). İmplantasyon öncesi embriyo gelişiminin, fetal gelişimi etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğu göz önüne alındığında (Lane ve Gardner, 2005), bütün bu veriler erken embriyonal dönemde maruz kalınan stresin organların gelişiminde ve işlevlerinde kalıcı değişikliklere neden olabileceğini ve bu durumun ileriki yaşlarda söz konusu bireylerde çeşitli hastalıkların gelişimine zemin hazırlayabileceğini düşündürmektedir (Ceelen ve ark, 2008). Başka bir ifadeyle, erişkin dönemde görülen bazı hastalıklar, fetal gelişim sürecinde

görülebilecek olan aksaklıkların bir yansıması/sonucu olarak ortaya çıkabilmektedir (Barker , 2007).

ÜYTE uygulaması sonucu dünyaya gelen çocuklarda, astım, romatoid artrit ve enfeksiyöz hastalıklar gibi immünolojik sistem hastalıklarının daha fazla görüldüğüne ilişkin veriler bulunmaktadır (Ericson ve ark, 2002; Koivurova ve ark, 2007; Carson ve ark, 2013; National Collaborating Centre for Women's and Children's Health, 2013). Fernández-Gonzalez ve ark (2008) tarafından gerçekleştirilen ve ICSI yöntemiyle doğan farelerde pnömoni insidansının arttığını gösteren deneysel bir çalışmadan elde edilen sonuçlar bu bulguları destekler niteliktedir. Diğer yandan IVF tekniklerinin karşılaştırmalı olarak incelendiği bir diğer çalışmada, ICSI tekniği kullanılarak doğan bireylerin, standart IVF teknikleri uygulanarak doğan bireylere göre daha düşük solunum problemleri riskine sahip olduğu gösterilmiştir (Källén ve ark, 2005). Yine son dönemlerde astım ve atopik hastalıklar ile ilgili yapılan çalışmalar (Klemetti ve ark, 2006; Çetinkaya ve ark, 2009; Sicignano ve ark, 2010; Jäderberg ve ark, 2012; Carson ve ark, 2013; Guibas ve ark, 2013; 2014; Källén ve ark, 2013), ÜYTE yöntemleri kullanılarak doğan çocukların, doğal yollarla dünyaya gelen çocuklarla karşılaştırıldığında astım ve atopik hastalıklar açısından daha büyük bir risk altında olabileceklerini düşündürmektedir (Nwaru ve ark, 2016). Konuyla ilgili olarak, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-Benzeri Reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” isimli TÜBİTAK projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulanarak elde edilen fütuslarda akciğer gelişiminin geri kaldığını ve belirli TLR genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını göstermiştir. Ayrıca, birimizde gerçekleştirilen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin solunum sisteminde epitel hücre sayıları üzerine etkisi” isimli bir projeden (Adnan Menderes Üniversitesi, BAP proje no: VTF15057) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fetal ve yetişkin fare trakeya ve akciğer dokularında bazal, nöroendokrin, silli, Clara, TipI ve TipII pnomosit hücre popülasyonlarının etkilenmiş olduklarını göstermektedir. Benzer şekilde, yürütücülüğü Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından gerçekleştirilen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” isimli yüksek lisans tez projesinden (Adnan Menderes Üniversitesi, BAP proje no: VTF14028) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fütuslarda (E

18.5), bazal hücre sayılarının anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir. Bütün bu veriler, ÜYTE uygulamaları sonucunda dünyaya gelen ve özellikle düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde, normal doğum sonucu dünyaya gelen bebekler ile karşılaştırıldıklarında, akciğer gelişiminin geri kalabileceğini, akciğerde hücre sayılarının/dinamiklerinin değişebileceğini, bağışıklık sistemlerinin tam olarak gelişmemiş olabileceğini ve buna bağlı olarak çeşitli enfeksiyöz ve alerjik akciğer hastalıklarına karşı daha duyarlı olabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca, 112O259 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilen mikro-array analizlerinden elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubuna ait fetal akciğer doku örneklerinde Notch sinyal yolağı ile indüklenen *Inpp5k*, *Pik3R1*, *Cdkn1a*, *Fhl1*, *Stat3*, *Nfkbia*, *Rbpjl*, ve *Hey1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını; *Cdk2*, *Hat1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığını göstermiştir. Bu bilgi ve bulgular doğrultusunda gerçekleştirilen tez çalışmasında mikroarray sonuçlarını qRT-PCR ve western blot yöntemleri ile doğrulamak, *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyon profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Çalışma Materyali

Sunulan tez çalışması, 2017-2019 yılları arasında Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Sunulan tez çalışmasının gerçekleştirilmesi amacıyla, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan, 30.11.2016 tarihli 64583101/2016/178 (revize: 07.12.2018 tarihli 64583101/2018/0140) sayılı karar ile onay alınmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, çalışma materyali olarak, yürütücülüğü Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yapılmış olan ve tamamlanan “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-Benzeri Reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” (112O259 numaralı TÜBİTAK projesi) isimli proje kapsamında alınmış olan fetal akciğer doku örnekleri kullanılmıştır. 112O259 numaralı TÜBİTAK projesinde C57BL/6 erkek farelerin ve BALBc dişi fareler ile çiftleştirilmesi sonucu elde edilen F1 hibrit fareler deney süresince 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık ışık siklusunda barındırılmış, yem ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. Çalışmada Kontrol grubu ve Deneme grubu olmak üzere iki farklı gruba yer verilmiştir. Kontrol grubu, PMSG+hCG uygulaması yapılmamış olan 8-12 haftalık F1 hibrit dişi farelerin aynı yaştaki F1 hibrit erkek farelerle çiftleştirilmesi sonucu elde edilen ve gebeliğin 18.5 gününde (E18.5) izole edilen fötuslardan oluşturulmuştur. Deneme grubu ise, PMSG+hCG uygulaması yapılarak F1 hibrit erkek farelerle çiftleştirilen dişilerden elde edilen döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen konsantrasyonunda büyütülmeleriyle elde edilen, dolayısıyla *in vitro* ortamda geliştirilen blastosistlerin yalancı gebe dişilere transferleri ile elde edilen fötuslardan (E18.5) oluşturulmuştur.

Yukarıda sözü edilen “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-Benzeri Reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” isimli, TÜBİTAK projesi kapsamında fetal (E18.5) akciğer doku örneklerinde gerçekleştirilen mikro-array çalışmaları ile ~45.000 adet genin ekspresyon düzeyleri belirlenmiş ve Notch sinyal yolağı ile ilişkili olan bütün genlerin ekspresyon düzeylerinde bir farklılık olup

olmadığı saptanmıştır. Yapılan incelemeler, Kontrol grubunu oluşturan fötuslar ile kıyaslandığında, Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* geninin ekspresyon düzeyinin azaldığı (down-regüle), *Skp2* geninin ise ekspresyon düzeyinin arttığı (up-regüle) saptanmıştır. Bu çalışmaların devamı niteliğinde olan sunulan tez çalışması, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara (E18.5) ait akciğer dokularında Notch sinyal yolağının hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonunun değiştiği hipotezini test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Buna yönelik olarak, *Hey1* ve *Skp2* ekspresyonları immünohistokimya/immünofloresan boyama yöntemleri ile saptanmış, ilgili genlere ilişkin protein ve mRNA ekspresyon düzeylerinde herhangi bir değişimin olup olmadığı, western blot ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Sunulan tez çalışmasında 1120259 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında izole edilerek uygun koşullarda muhafaza edilen fötal akciğer doku örnekleri, histokimyasal/immunohistokimyasal/immunofloresan boyama yöntemlerini gerçekleştirmek amacıyla paraplast içerisinde bloklanmış ve +4 °C’de muhafaza edilmişlerdir. Ayrıca Western blot ve qRT-PCR tekniklerinin uygulanması amacıyla –80 °C’de muhafaza edilen fötal akciğer doku örnekleri kullanılmıştır.

Bloklanan fötal akciğer doku örneklerinden mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında 100 µm aralıklarla alınan seri kesitler üzerinde, hematoksilin-eozin, immunohistokimya ve immunofloresan boyama metotları uygulanmıştır.

Hey1 ve *Skp2* genlerine ilişkin olarak mikro-array yöntemi ile belirlenen ekspresyon farklılıklarının bağımsız ve daha duyarlı bir yöntem ile belirlemek amacıyla qRT-PCR yönteminden yararlanılmıştır. qRT-PCR yönteminin uygulanmasında TaqMan ve SYBR Green olmak üzere iki farklı prob sisteminden yararlanılmıştır. *Hey1* ve *Skp2*’nin translasyonel düzeyde eksprese edilip edilmediğinin semi-kantitatif olarak değerlendirilmesi amacıyla western blot tekniği kullanılmıştır.

Western blot ve qRT-PCR analizlerinde, her bir grup için 18 adet fötal akciğer dokusu kullanılmıştır. Her grubu oluşturan 18 adet fötal akciğer doku örnekleri rastgele seçilerek her bir doku havuzunda altı adet örnek olacak şekilde Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3 ve Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3 biyolojik replikasyonları elde edilmiştir. Bu şekilde hem Kontrol, hem de Deneme grubunda üçer adet biyolojik replikasyon grubu oluşturulmuştur. Western blot ve TaqMan bazlı qRT-PCR çalışmaları, oluşturulan doku havuzları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir grupta *Hey1* ve *Skp2* transkripsiyon düzeyleri açısından bireysel farklılıkları belirleyebilmek amacıyla Kontrol ve Deneme

gruplarına ait fötal akciğer doku rnekleri SYBR Green PCR metodu ile bireysel olarak analiz edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Metodu

Sunulan tez çalışmasında, fötal akciğer dokularının genel histolojik yapısını belirlemek amacıyla hematoksilen- eozin boyama yöntemi kullanılmıştır. Paraplast içerisinde gömülü olan fötal akciğer doku örneklerinden alınan 5 µm kalınlığındaki doku kesitleri, deparafinize edilerek standart yöntemlere göre hematoksilen- eozin boyama yöntemi ile boyanmıştır. Boyanan kesitler, entellan ile kapatılarak, mikroskopik incelemeye alınmıştır.

3.2.2. İmmunohistokimyasal Boyama Metodu

İmmunohistokimya boyamalarında Avidin-biyotin peroksidaz yönteminden yararlanılmıştır. Mikrotomda alınan 5 µm kalınlığındaki fötal akciğer kesitleri deparafinizasyondan sonra, alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınmışlardır. Daha sonra, %0,05 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (pH 6) içerisinde 5 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan kesitler daha sonra 3x5 dakika süreyle Tris Buffered Saline (TBS, pH 7.6) içerisinde yıkanarak endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla %5 oranında H₂O₂ içeren TBS ile 5 dakika inkübe edilmişlerdir. Kesitler 3x5 dakika süreyle TBS içerisinde yıkanarak, serum blocking solüsyonu (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu ilei takiben, kesitler Hey1 (NBP2-47436, Novus, 1/100) ve Skp2 (NB100-91962, Novus, 1/100) rabbit poliklonal primer antikorları ile bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Eş zamanlı olarak aynı işlemlere tabi tutulan, fakat primer antikor ilave edilmeksizin (primer antikor yerine TBS kullanıldı) boyanan doku kesitleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Primer antikorla inkübasyonu takip eden ertesi sabah tüm kesitler 3x5 dakika süreyle TBS içerisinde yıkama işlemini takiben biyotin ile işaretli sekonder antikor (Histostain Plus Broad Spectrum,

Invitrogen) içerisinde 37 °C'de 1 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonu takiben kesitler 3x5 dakika süreyle tekrar yıkanarak HRP (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) solüsyonu ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. TBS içerisinde yıkama işlemini (3x5 dakika) takiben, antikora bağlanma gösteren immunpozitif hücreleri saptamak amacıyla kesitler TBS içerisinde hazırlanan %3 oranında H₂O₂ ve 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, 3 mg/ml) solüsyonu ile 1 dakika süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu işlemi takiben kesitler Harris hematoksilenle 10 saniye süre ile boyanarak hücre çekirdeklerinin görülebilmesi sağlanmıştır. Kesitler rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek entellan ile kapatılmış ve mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir. İmmunpozitif hücrelerin görüntülenmesinde BX51 (Olympus) araştırma mikroskopu ve DP70 kamera/görüntü analiz sistemi kullanılmıştır.

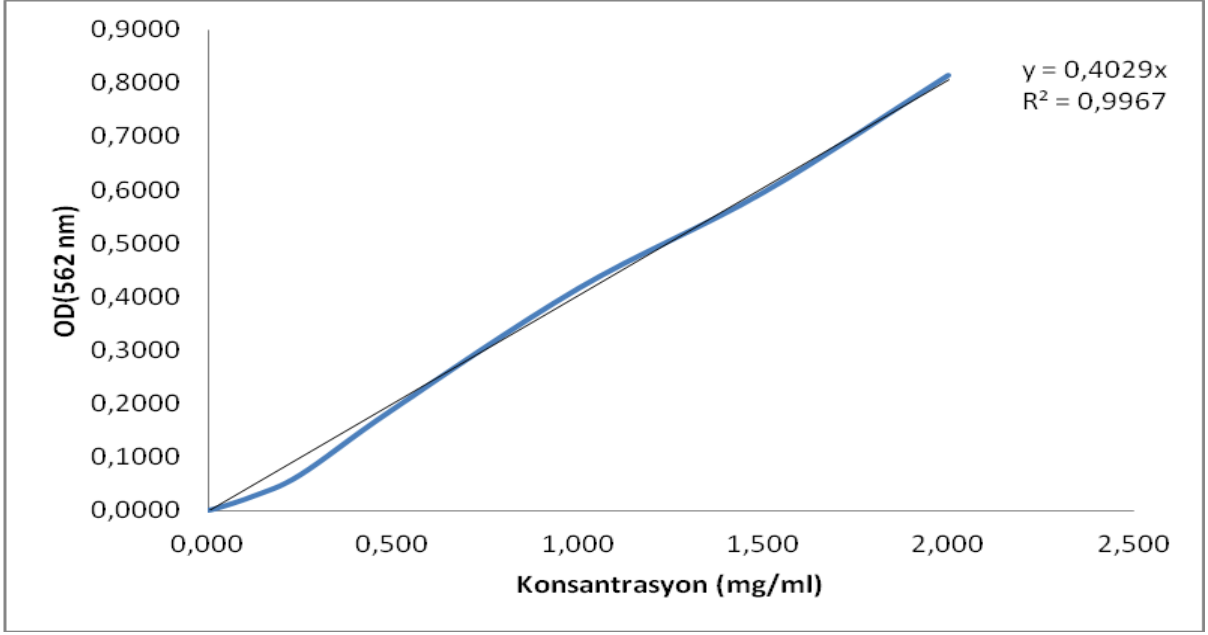
3.2.3. İmmunofloresan Boyama Metodu

Mikrotomda alınan 5 µm kalınlığındaki fetal akciğer kesitleri deparafinizasyondan sonra, alkol serilerinden geçirilerek distile suya alınmışlardır. Daha sonra, %0,05 oranında Tween-20 içeren sodyum sitrat buffer (pH 6) içerisinde 5 dakika kaynatılarak antijen retrieval işlemi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında soğumaya bırakılan kesitler daha sonra 3x5 dakika süreyle TBS (pH 7,6) içerisinde yıkanarak PBS içerisinde hazırlanan %5'lik normal keçi serumu (NGS) solüsyonu (%1 BSA ve %0,01 Tritonx-100) içerisinde oda sıcaklığında 20 dakika süreyle inkübe edilmişlerdir. Bu işlemi takiben, Hey1 (NBP2-16818, Novus, 1/100) ve Skp2 (NB100-91962, Novus, 1/100) rabbit poliklonal primer antikoları ile bir gece +4 °C'de inkübasyona bırakılmışlardır. Eş zamanlı olarak aynı işlemlere tabi tutulan, fakat primer antikor ilave edilmeksizin (primer antikor yerine TBS kullanıldı) boyanan doku kesitleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Primer antikorla inkübasyonu takip eden ertesi sabah tüm kesitler bağlanma göstermeyen primer antikoların uzaklaştırılması amacıyla 3x5 dakika süreyle TBS ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Bu işlemi takip eden tüm işlemler, karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi takiben, kesitler sekonder antikor [Goat anti- rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa-Fluor 488 A11034, Invitrogen] içerisinde bir saat 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. İnkübasyonu takiben kesitler 3x5 dakika süreyle tekrar yıkanarak hücre çekirdeklerini boyamak amacıyla, PBS içerisinde hazırlanmış DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole (200 ng/ml) ile 1-2 dakika muamele edilmişlerdir.

Kesitler 3x5 dakika süreyle tekrar yıkanarak kapatma solüsyonu (Mounting medium, Invitrogen) ile kapatılmış ve mikroskopik inceleme gerçekleştirilmiştir. İmmünofloresans boyama sonuçlarının değerlendirilmesinde flöresan ataçmanlı BX51 (Olympus) araştırma mikroskopu ve DP70 kamera/görüntü analiz sistemi kullanılmıştır.

3.2.4. Western Blot Metodu

Western blot analizleri her grup için üç biyolojik replikasyonda (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Western blot analizlerini gerçekleştirmek amacıyla, -80 °C'de muhafaza edilen fetal akciğer doku örnekleri (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) TissueLyserLT homojenizasyon cihazında (Qiagen) homojenize (3x2 dakika, 50 MHz) edilerek total protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Fetal akciğer dokularını homojenize etmek amacıyla PMSF (fenil metil sülfonil fulorid), orthovanadate ve proteaz inhibitörleri içeren RIPA Lysis tamponu (SantaCruz) kullanılmıştır. Homojenizasyonu takiben, homojenatlar 13,000xg'de 15 dakika süre ile +4 °C' de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatantlar yeni tüplere aktarılmış, bu süpernatantlardan her bir örnek için ayrı ayrı belirli dilüsyonlar hazırlanarak total protein analizleri yapılmıştır. Total protein miktarını belirlemek amacıyla, Smart TM BCA (Bicinchoninic acid/Bisinkoninik asit) Protein Assay kiti (İntron Biyoteknoloji) kullanılmıştır. Standart olarak kit ile birlikte gelen BSA (bovine serum albumin) solüsyonundan (2mg/ml) yararlanılarak her bir gruba ait total protein miktarı, BSA-protein standart eğrisi kullanılarak hesaplanmıştır. Örnek bir BSA-protein standart eğrisi Şekil 11'de sunulmuştur. Geride kalan süpernatantlar küçük miktarlara bölünerek western blot tekniğinde kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.



Şekil 11. BSA-Protein standart eğrisi.

Kontrol ve Deneme gruplarına ait protein örneklerini yüklemek amacıyla öncelikle SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi) jelleri hazırlanmıştır. İlk olarak %12' lik *ayırıcı (separating)* jel hazırlanarak, yükleme tankındaki cam tabakalar arasına dökülmüş ve hava kabarcıklarının giderilmesi amacıyla jel üzerine izopropil alkol ilave edilmiştir. Jelin polimerleşmesini takiben izopropil alkol uzaklaştırılarak, jel distile su ile yıkanmıştır. Watman kağıdı ile seperating jelin üst kısmı kurulandıktan sonra, hazırlanan %5'lik *paketleyici (stacking)* jel hızlı bir şekilde seperating jel üzerine dökülmüş ve kuyucuklu tarak yerleştirilmiştir. Stacking jelin polimerleşmesini takiben kalıplar dikey elektroforez tankı içerisine yerleştirilmiştir. İki cam blok arasına ve jel kasetinin yarısını geçmeyecek şekilde tankın içerisine 1x yürütme tamponu (running buffer) dökülerek tarak çıkarılmıştır.

Proteinlerin seperasyonunda (ayrıştırılması) Biorad elektroforez sisteminden yararlanılmıştır. Kontrol ve Deneme gruplarına ait örneklerin protein miktarları ve yüklenen volümler Tablo 2'de gösterilmiştir. Yüklenecek olan proteinler gerektiği miktarda ependorf tüplere alınarak üzerlerine eşit hacimde 2X Loading dye (Sample Buffer, Laemmli 2× Concentrate, S3401) eklenerek, volüm Lizis buffer (RIPA lysis buffer) ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler vortekslenerek hızlı bir santrifüj işlemine tabi tutulmuşlardır. Santrifüj işlemi takiben 10 dakika süre ile 65°C'de ısıtma tablasında (heating blok) bekletilen örnekler, tekrar hızlı bir santrifüj işlemine tabi tutularak örnekler yüklemeye hazır hale getirilmişlerdir. Tüm örnekler için her bir kuyucuğa 200 µg protein yüklemesi

yapılmıştır. Protein bantlarının büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla, ayrı bir kuyucuğa 3 µl protein belirteci (Pre-stained protein ladder V, GeneAid) yüklenmiştir. Proteinlerin ayrıştırılması amacıyla, yüklenen örneklerin 200 volt, 50 mA'de 60 dakika süreyle koşturulmaları sağlanmıştır.

Tablo 2. Her bir grup için 200 µg protein içeren total hacimler

Gruplar	Örnek Volümü	2x Loading Dye	Lizis Buffer	Total Hacim
Kontrol-R1	4.26 µl	4.26 µl	11.48 µl	20 µl
Kontrol-R2	3.85 µl	3.85 µl	12.3 µl	20 µl
Kontrol-R3	3.91 µl	3.91 µl	12.8 µl	20 µl
Deneme-R1	6.69 µl	6.69 µl	6.62 µl	20 µl
Deneme-R2	6.93 µl	6.93 µl	6.14 µl	20 µl
Deneme-R3	7.03 µl	7.03 µl	5.94 µl	20 µl

Ayrıştırılan proteinlerin jelden nitroselüloz membrana (İmmobilon-P, Millipore) transfer edilerek aktarılması amacıyla BioRad blotlama sisteminden yararlanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle kasetin siyah tarafı aşağı gelecek şekilde, blotlama kasetleri arasına Wattman No#1 kâğıtları yerleştirilmiştir. Kâğıtlar üzerine poliakrilamid jel ve jelin üzerine de nitroselüloz membran konulmuştur. Membran üzerine tekrar Wattman No#1 kâğıtları yerleştirilerek bir rulo yardımıyla hava kabarcıkları giderilmiştir. Uygun bir biçimde kapatılan kasetler blotlama tankına yerleştirilmiş ve bu işlemi takiben, blotlama tankı içerisine bir buz kaseti konularak transfer tamponu (blotting buffer) tank üzerinde işaretli kısma kadar doldurulmuştur. Tankın kapağı kapatılarak bir saat süre ile 100 V ve 350 mA akım uygulanarak jelde bulunan proteinlerin nitroselüloz membranlara aktarılması sağlanmıştır. Transfer işlemi takiben nitroselüloz membranlar, %5'lik süt tozu (Skim Milk Powder, Sigma-Aldrich 70166) içeren bloklama solüsyonunda (skim milk powder içeren TBS pH7,6) oda sıcaklığında bir saat süre ile inkübe edilmişlerdir. Bloklama işlemi ve sonrasında uygulanan tüm işlemler bir çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bloklama işlemi takiben membranlar 3x5 dakika süreyle %0,1 oranında Tween-20 içeren TBS solüsyonu (TBST) ile yıkanarak, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde hazırlanan Hey1 (NBP2-16818, 1:1000) ve Skp2 (NB100-91962, 1:1000) primer antikoları ile bir gece boyunca +4°C'de inkübe edilmişlerdir. Spesifik bağlanma göstermeyen antikoların uzaklaştırılması amacıyla, 3x5 dakika süreyle TBST solüsyonu ile yıkama işleminin takiben membranlar, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde hazırlanan sekonder

antikor (Goat anti-Rabbit IgG-HRP, sc-2004, 1:5000) ile oda sıcaklığında bir saat süre ile inkübe edilmişlerdir. TBST solüsyonu ile tekrar eden bir yıkama işleminin ardından membranlar, kurutma kâğıdına alınarak fazla yıkama solüsyonunun olabildiğince uzaklaştırılması sağlanmıştır. 10- 180 kDa arasında olan tüm protein bantları ve pre-stained protein belirteçlerinin EC3 Görüntüleme Sistemi'nde (EC3 Chemi HR 410 Imaging System, UVP) floresan ışığa göstermelerini sağlamak amacıyla her bir renkli bant WesternSure Pen (Li-Cor) kalemle işaretlenmiştir. Bu işlemin ardından membranlar iki dakika süreyle Enhanced Chemiluminescence solüsyonu (Novex® ECL, Invitrogen ya da Luminata Crescendo, Millipore) ile karanlık bir ortamda muamele edilmişlerdir. Hey1 ve Skp2 antikörlerine bağlanma gösteren spesifik bantlar, EC3 Görüntüleme Sistemi'nde (EC3 Chemi HR 410 Imaging System, UVP) görüntülenmiştir. Görüntüleme işlemini takiben membranlar 3x5 dakika süreyle TBST solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Aynı membranlar, endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin protein düzeylerini belirlemek amacıyla anti- β -aktin (SantaCruz, sc-47778; 1:1000) primer antikoru ile bir gece boyunca +4°C'de inkübe edilmişlerdir. Spesifik bağlanma göstermeyen antikörlerin uzaklaştırılması amacıyla, 3x5 dakika süreyle TBST solüsyonu ile yıkama işleminin takiben membranlar, %5 oranında süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde hazırlanan sekonder antikör (Goat anti-Mouse IgG-HRP, sc-2005, 1:5000) ile oda sıcaklığında bir saat süre ile inkübe edilmişlerdir. TBST solüsyonu ile tekrar eden bir yıkama işleminin ardından membranlar, kurutma kâğıdına alınarak fazla yıkama solüsyonunun olabildiğince uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu işlemleri takiben, β -aktin antikörlerine bağlanma gösteren spesifik bantlar, EC3 Görüntüleme Sistemi'nde (EC3 Chemi HR 410 Imaging System, UVP) görüntülenmiştir. VisionWorks®LS analiz programı (UVP) kullanılarak, gerek hedef proteinler, gerekse beta aktin proteini için maksimum bant yoğunlukları (Imax), hesaplanmıştır. Hey1 ve Skp2 Imax değerleri aynı membranlarda hesaplanan β -aktin Imax değerlerine bölünerek, hedef genler için elde edilen bant yoğunlukları normalize edilmiş ve sonuçlar *arbitrary unit* (a.u.) olarak verilmiştir. Sonuçlar değerlendirilmesinde, her bir grup için elde edilen verilerin ortalamaları kullanılmıştır.

3.2.5. Total RNA İzolasyonu

Tüm gruplara ait fetal akciğer doku örneklerinden total RNA izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla, Trizol solüsyonu ve PureLink RNA izolasyon kiti (Ambion) kullanılmıştır. RNA izolasyonu üretici firmanın önermiş olduğu RNA izolasyon protokolü dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinde olası DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla tüm RNA örnekleri DNase solüsyonu ile (PureLink DNase, Invitrogen) muamele edilmiştir. On-sekiz adet Kontrol grubu, on-sekiz adet Deneme grubuna ait olmak üzere, otuz-altı adet fetal akciğer dokusundan bireysel olarak total RNA elde edilmiştir. İzole edilmiş RNA örneklerinde, total RNA konsantrasyonunu belirlemek için, örnekler 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) içerisinde 1/20 oranında sulandırılmış ve total RNA konsantrasyonu MultiskanGo (Thermo) spektrofotometri cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Total RNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$), " $A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \mu\text{g/ml}$ " denkleminde yararlanılarak hesaplanmıştır. Daha sonra eşit miktarda RNA kullanılarak her grupta altışarlı olmak üzere üçer adet birleştirilmiş (pooled) RNA örnekleri (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3 biyoloji replikasyonları) oluşturulmuştur. Oluşturulan Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3 biyoloji replikasyonlarının miktar ve kaliteleri MultiskanGo (Thermo) spektrofotometri cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Gerek bireysel, gerekse birleştirilmiş (pooled) RNA örnekleri daha sonra kullanılmak üzere $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.6. Real-Time PCR (qRT-PCR)

3.2.6.1. cDNA (komplementer DNA) sentezi

TaqMan ve SYBR Green metotları kullanılarak yapılan qRT-PCR analizleri için total RNA örneklerinden cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) kiti kullanılarak üretici firma tarafından belirtilen protokole bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için 500 ng total RNA kullanılmıştır (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3. Birleştrilmiş (pooled) örneklerde RNA miktarlarının (500 ng) hazırlanması

Gruplar	500 ng RNA (ul)	Nükleaz içermeyen H ₂ O (ul)	Total Hacim (ul)
Kontrol-R1	1,60	18,40	20
Kontrol-R2	1,30	18,70	20
Kontrol-R3	1,11	18,89	20
Deneme-R1	2,45	17,55	20
Deneme-R2	1,69	18,31	20
Deneme-R3	1,54	18,46	20

Tablo 4. Bireysel örneklerde RNA miktarlarının (500 ng) hazırlanması

Gruplar	500 ng RNA (ul)	Nükleaz içermeyen H ₂ O (ul)	Total Hacim (ul)
K1	0,84	19,16	20
K2	1,69	18,31	20
K3	1,05	18,95	20
K4	1,67	18,33	20
K5	1,66	18,34	20
K6	2,76	17,24	20
K7	1,86	18,14	20
K8	1,71	18,29	20
K9	1,48	18,52	20
K10	0,95	19,05	20
K11	1,23	18,77	20
K12	1,39	18,61	20
K13	1,17	18,83	20
K14	1,37	18,63	20
K15	1,13	18,87	20
K16	0,87	19,13	20
K17	2,30	17,70	20
K18	2,19	17,81	20
D1	1,27	18,73	20
D2	1,46	18,54	20
D3	0,88	19,12	20
D4	1,59	18,41	20
D5	0,70	19,30	20
D6	2,06	17,94	20
D7	1,69	18,31	20
D8	0,78	19,22	20
D9	0,74	19,26	20
D10	0,98	19,02	20
D11	1,25	18,75	20
D12	0,89	19,11	20
D13	0,79	19,21	20
D14	0,98	19,02	20
D15	1,39	18,61	20
D16	1,00	19,00	20
D17	1,15	18,85	20
D18	1,01	18,99	20

Tablo 3 ve 4'te belirtilen 20 µl total hacimli RNA örnekleri daha sonra Tablo 5'te belirtilen ve kite ait bileşenlerin belirli oranlarda karıştırılmasıyla 20 µl'lik total volümlerde hazırlanan 2X reverse transkripsiyon master karışımı ile bir araya getirilerek toplam hacim 40 µl olacak şekilde karışımlar oluşturulmuştur. Karışım hızlı bir santrifüjün ardından, PCR cihazına (Veriti, Applied Biosystems) yerleştirilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5. 2X reverse transkripsiyon master karışımının hazırlanması

Bileşenler	Volüm/Reaksiyon (2X)
10XRT Buffer	4 µl
25XdNTP Mix (100mM)	1.6 µl
10X RT Random Primers	4 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	2 µl
Nükleaz- içermeyen H ₂ O	8.4 µl
Total/Reaksiyon	20 µl

cDNA sentezi, üretici firma tarafından belirtilen program (25 °C'de 10 dakika, 37 °C'de 120 dakika, 85 °C'de 5 dakika ve 4 °C'de ∞) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri, real-time PCR analizlerinde kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmişlerdir.

3.2.6.2. TaqMan metodu ile kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) analizi

Birleştirilmiş (pooled) örnekler için her bir gruba ait cDNA örnekleri, TaqMan problemleriyle Tablo 6'da belirtilen miktarlarda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Real-time PCR reaksiyonları, 20 µl toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. Hedef genler (*Hey1* ve *Skp2*) ve referans gen (*β-aktin*) için kullanılan TaqMan problemleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 6. Her bir örnek için qRT-PCR karışımının hazırlanması.

Bileşenler	Volüm/Reaksiyon
Assay (Hey1 veya Skp2)	1 µl
Master mix (2X)	10 µl
RNase içermeyen H ₂ O	7 µl
cDNA örneği	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 7. Birleştirilmiş örneklerde gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde kullanılan TaqMan problemleri.

Gen	Prob Kodu (Applied Biosystems)
β-aktin (ACTB)	Mm00607939_s1
Hey1	Mm00468865_m1
Skp2	Mm00449925_m1

qRT-PCR analizleri, Applied Biosystems StepOne real-time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan termal döngü protokolü Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. TaqMan teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde termal döngü protokolü.

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
AmpErase® uracil-N-glycosylase (UNG) aktivasyonu	50 °C	2 dakika	
AmpliTaq Gold enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Bağlanma/Uzama	60°C	1 dakika	

cDNA ve reverse transkriptase içermeyen (sadece su, No-RT) örnekler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerek Kontrol, gerekse Deneme gruplarında analiz edilen hedef genler (*Hey1* ve *Skp2*) ve referans gen (*β-aktin*) için ortalama Threshold cycle (Ct) değerleri hesaplanmış ve elde edilen Ct değerleri, *β-aktin* geni ile normalizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Gruplar arasındaki farklılıkların hesaplanması amacıyla, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta Ct$ (comparative Ct) metodu kullanılmıştır. Birleştirilmiş (pooled) örneklerde gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri, her bir biyolojik replikasyon

(Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) için ayrı ayrı ve üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Böylece birleştirilmiş (pooled) örneklerde gerek Kontrol gerekse Deneme gruplarında *Hey1* ve *Skp2* genleri için ayrı ayrı toplam dokuz analiz (3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) ve β -*aktin* geni için ise toplam on-sekiz analiz (2 hedef gen x 3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir.

3.2.6.3. SYBR green metodu ile kantitatif real-time PCR (qRT-PCR) analizi

SYBR Green teknolojisi ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde RealAmp™ SYBR qPCR Master mix (2X, High ROX, Katalog no 801-051, GeneAll) kullanılmıştır. qRT-PCR yönteminin uygulanmasında kullanılan reaksiyon karışımı Tablo 9’da belirtilen şekilde hazırlanmıştır. qRT-PCR reaksiyonu 20 µl total hacimde gerçekleştirilmiştir. Hedef genler (*Hey1* ve *Skp2*) ve referans gen (β -*aktin*) için PerlPrimer programı kullanılarak tasarlanan primerlerin spesifiteleri PrimerBLAST (NCBI) ile kontrol edilmiştir. Kullanılan primer dizileri, Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 9. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde her bir örnek için hazırlanan real-time PCR karışımı (1X)

Bileşenler	Volüm/Reaksiyon
SYBR Green Master mix (2X)	10 µl
Forward primer (10pmol)	1 µl
Reverse primer (10pmol)	1 µl
ROX	1 µl
cDNA örneği	1.2 µl
RNase içermeyen H ₂ O	5.8 µl
Total Hacim	20 µl

Tablo 10. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde kullanılan primer dizileri

Gen	Primer dizisi
β -aktin (ACTB)	F- TGTGATGGTGGGAATGGGTC R- GCTCATTGTAGAAGGTGTGGT
Hey1	F- ACGAGACCGAATCAATAACAG R- ACTCCGATAGTCCATAGCCA
Skp2	F- CATAAGATTCTGTCCGAGTG R- GATGGTGTTTGGTAAATGTG

qRT-PCR analizleri, Applied Biosystems StepOnePlus real-time PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kullanılan termal döngü protokolü Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11. SYBR Green teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde termal döngü protokolü

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon + enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Bağlanma/Uzama	60°C	45 saniye	

cDNA ve reverse transkriptase içermeyen (sadece su, No-RT) örnekler negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Gerek Kontrol, gerekse Deneme gruplarında analiz edilen hedef genler (*Hey1* ve *Skp2*) ve referans gen (β -aktin) için ortalama Threshold cycle (Ct) değerleri hesaplanmış ve elde edilen Ct değerleri, β -aktin geni ile normalizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Gruplar arasındaki farklılıkların hesaplanması amacıyla, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta$ Ct (comparative Ct) metodu kullanılmıştır. Birleştirilmiş (pooled) örneklerde gerçekleştirilen qRT-PCR analizleri, her bir biyolojik replikasyon (Kontrol-R1, R2 ve R3 ve Deneme-R1, R2 ve R3) için ayrı ayrı ve üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Böylece birleştirilmiş (pooled) örneklerde gerek Kontrol gerekse Deneme gruplarında *Hey1* ve *Skp2* genleri için ayrı ayrı toplam dokuz analiz (3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) ve β -aktin geni için ise toplam on-sekiz analiz (2 hedef gen x 3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir. Bireysel örneklerde ise, gerek Kontrol gerekse Deneme gruplarında *Hey1* ve *Skp2* genleri için ayrı ayrı toplam elli-dört analiz (18

biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) ve β -aktin geni için ise toplam yüzü-sekiz analiz (2 hedef gen x 3 biyolojik replikasyon x 3 teknik replikasyon) gerçekleştirilmiştir.

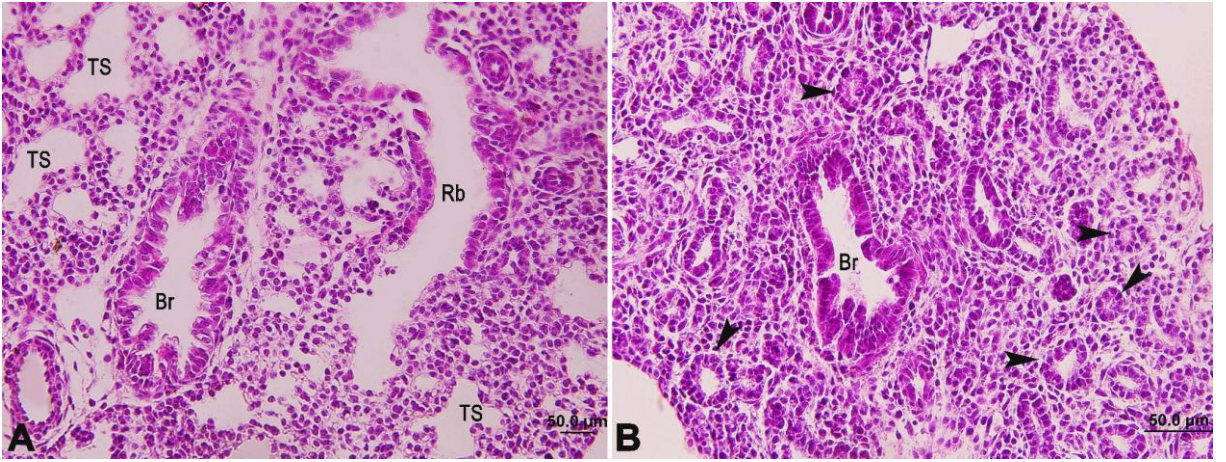
3.2.7. İstatistiksel Analizler

Sonuçlar, ortalama \pm Standart Sapma olarak verilmiştir. İki grup karşılaştırılması için öncelikle normal dağılıma uygunluk testlerinden Kolmogorov-Smirnoff ve Shapiro Willks testleri yapılmıştır. Normal dağılıma uygunluk gösteren verilerde bağımsız t-testi uygulanmıştır. Normal dağılıma uygunluk göstermeyen verilerde ise Mann-Withney-U testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Değişkenler arasındaki korelasyonun ortaya konması amacıyla Pearson korelasyon testi uygulanmıştır. İstatistik analizler için, SPSS paket programı (IBM SPSS İstatistik Programı, Version 21.0. Armonk, NY: IBM) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Fötal Akciğer Dokusunun Genel Histolojik Yapısı

Fötal akciğer dokusunun genel histolojik yapısını ortaya koymak amacıyla Kontrol ve Deneme gruplarına ait doku örneklerinden alınan seri kesitlere hematoksilin/eozin boyama yöntemi uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer dokularının farklı gelişim evrelerinde olduklarını göstermiştir. Histolojik kesitlerin incelenmesi sonucunda akciğer gelişiminin Deneme grubunda psödoglandüler/kanaliküler evrede, Kontrol grubunda ise daha ileri bir gelişim aşaması olan sakküler evrede olduğu saptanmıştır. Sakküler evrede bulunan Kontrol grubuna ait histolojik kesitlerde yaygın olarak bronş, bronşiyol ve terminal sakkuluslara rastlanırken (Şekil 12A), Deneme grubunda, bronş, bronşiyoller görülmekle birlikte terminal sakkulusların yerine ileride alveolleri oluşturacak olan bezsel (psödoglandüler) yapıların var olduğu görülmüştür (Şekil 12B).

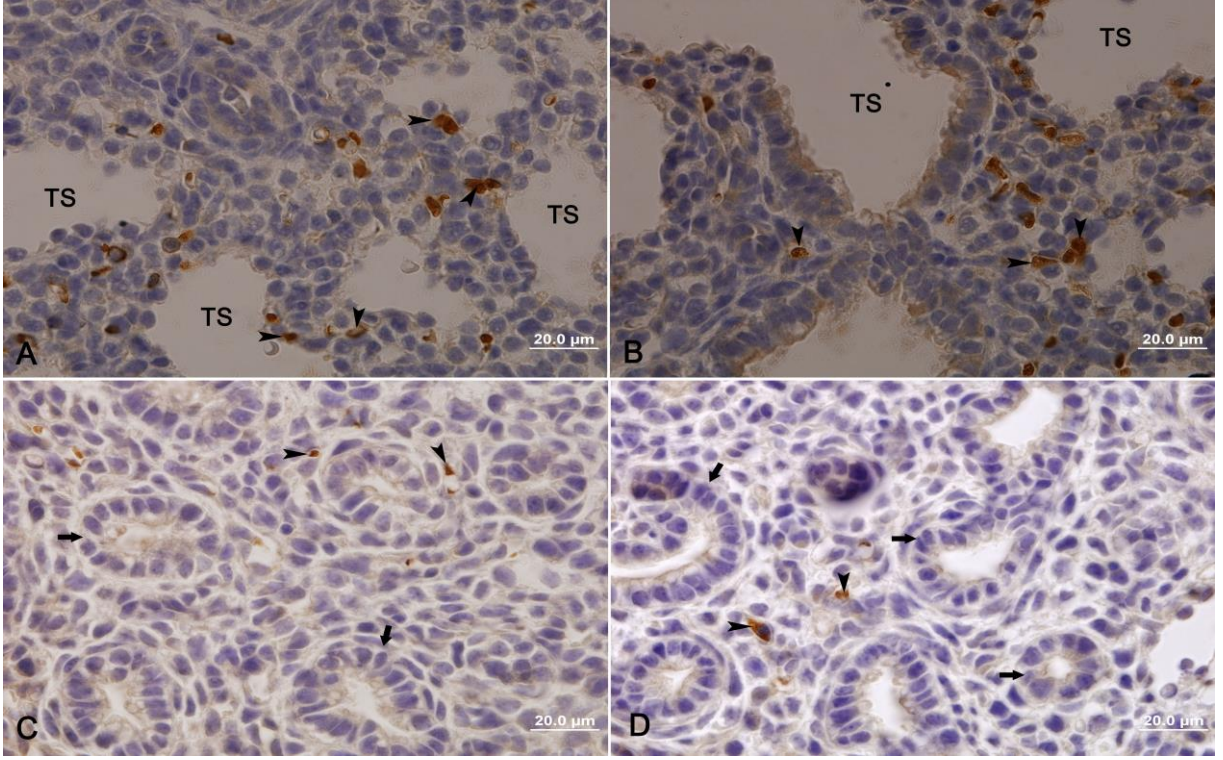


Şekil 12. Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer dokularının genel histolojik görünümü. Kesitler, Hematoksilin/eozin boyama yöntemi ile boyanmıştır. A, Kontrol grubuna ait fötal akciğer dokusunun, B ise Deneme grubuna ait fötal akciğer dokusunun ışık mikroskop görüntüleridir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda akciğer gelişiminin geri kaldığı görülmektedir. Sakküler evrede olan Kontrol grubuna ait kesitlerde bronş (BR), bronşiyol (Br) ve terminal sakkuluslar (TS) yaygın olarak görülmektedir (A). Buna karşın, psödoglandüler/kanaliküler evrede olan Deneme grubunda (B) ise bronş ve

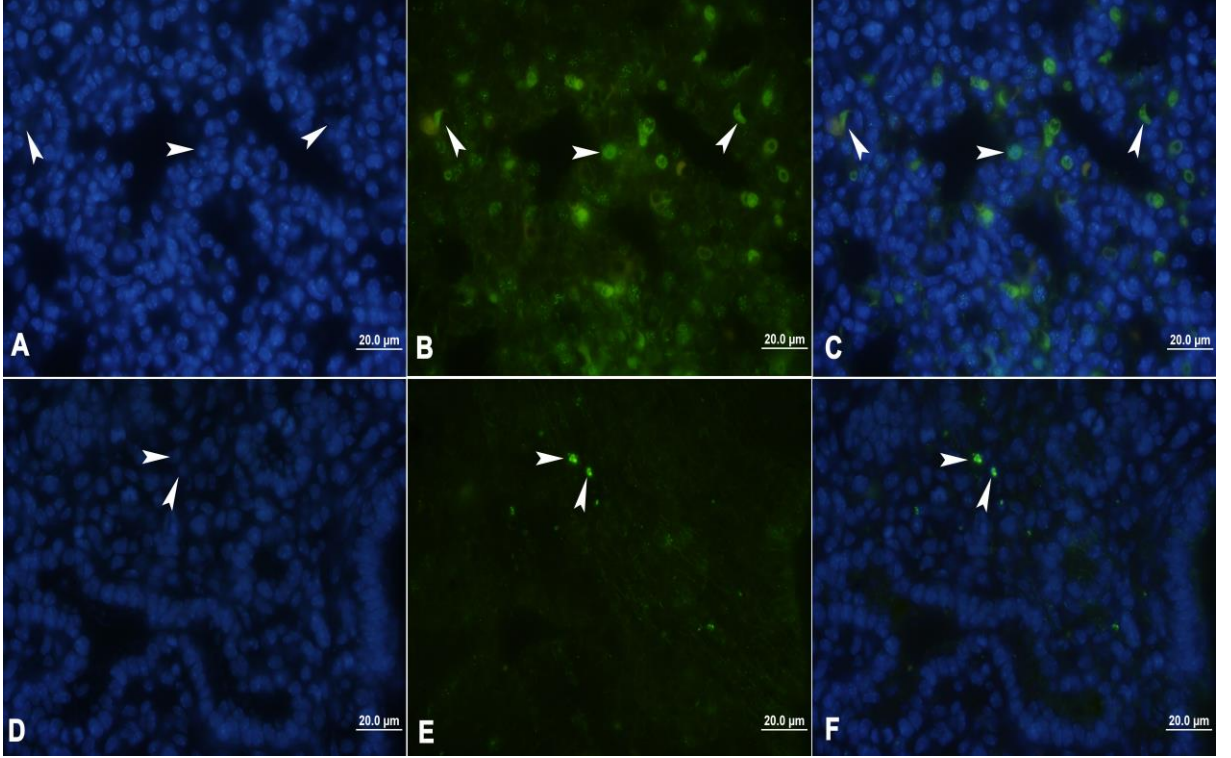
bronşiyoller görülmekle birlikte terminal sakkulusların yerine ileride alveolleri oluşturacak olan bezsel (psödoglandüler) yapıların (ok başları) varlığı dikkat çekmektedir.

4.2. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde İmmunohistokimya ve İmmunofloresan Boyama Yöntemiyle Hey1 ve Skp2 Ekspresyonunun Belirlenmesi

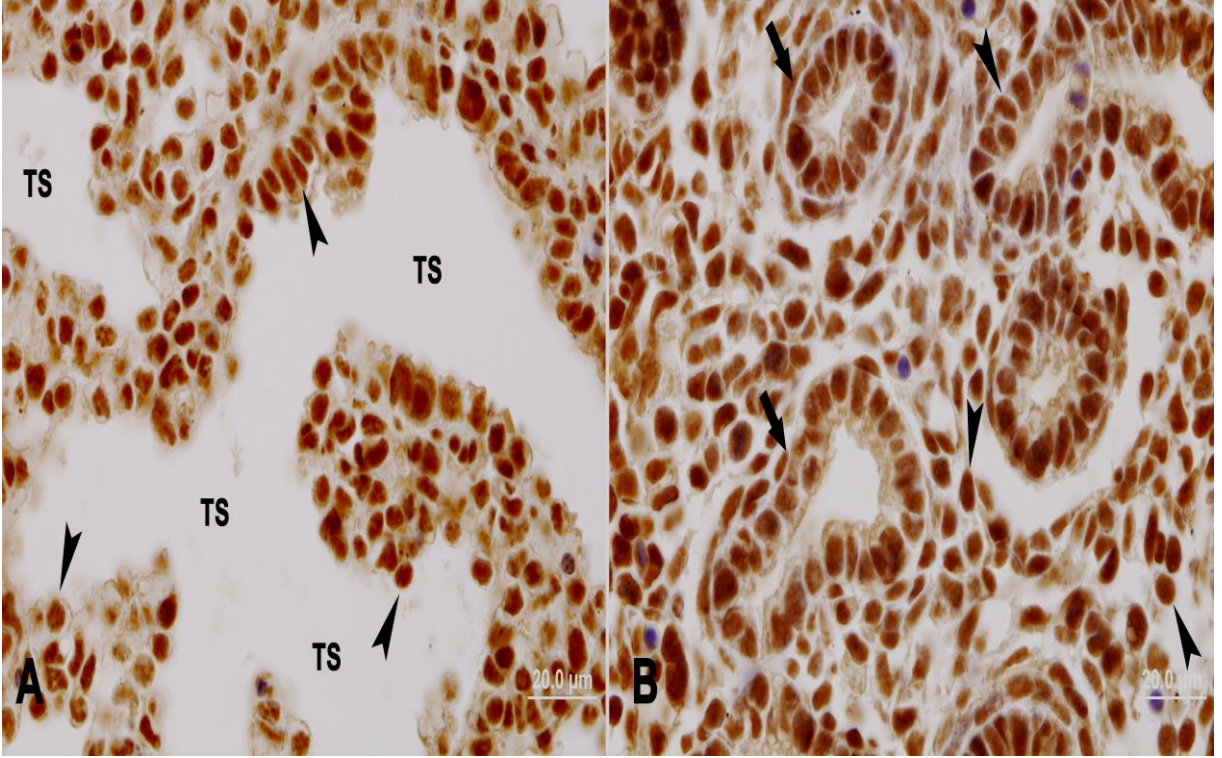
Fötal akciğer doku örneklerinde Hey1 ve Skp2 ekspresyonu gösteren hücreleri belirlemek amacıyla immunohistokimya veya immunofloresan boyama yöntemleri kullanılmıştır. Primer antikor uygulanmadan gerçekleştirilen boyamalarda herhangi bir pozitivite gözlenmemiştir. Gerek immunohistokimya boyama sonuçları (Şekil 13 ve 15), gerekse immunofloresan boyama sonuçları (Şekil 14 ve 16) Kontrol ve Deneme gruplarında *Hey1* ve *Skp2* genlerinin benzer bir ekspresyon profiline sahip olduklarını göstermiştir. Her iki boyama yönteminde de Hey1'in damar duvarında ve spesifik olarak damar endotel hücrelerinde eksprese edildiği (Şekil 13 ve Şekil 14 ok başları) belirlenmiştir. Buna karşın, Skp2 pozitivitesinin yaygın olduğu, Skp2'nin fötal akciğer dokusunda birçok hücrede eksprese edildiği saptanmıştır (Şekil 15 ve Şekil 16 ok başları).



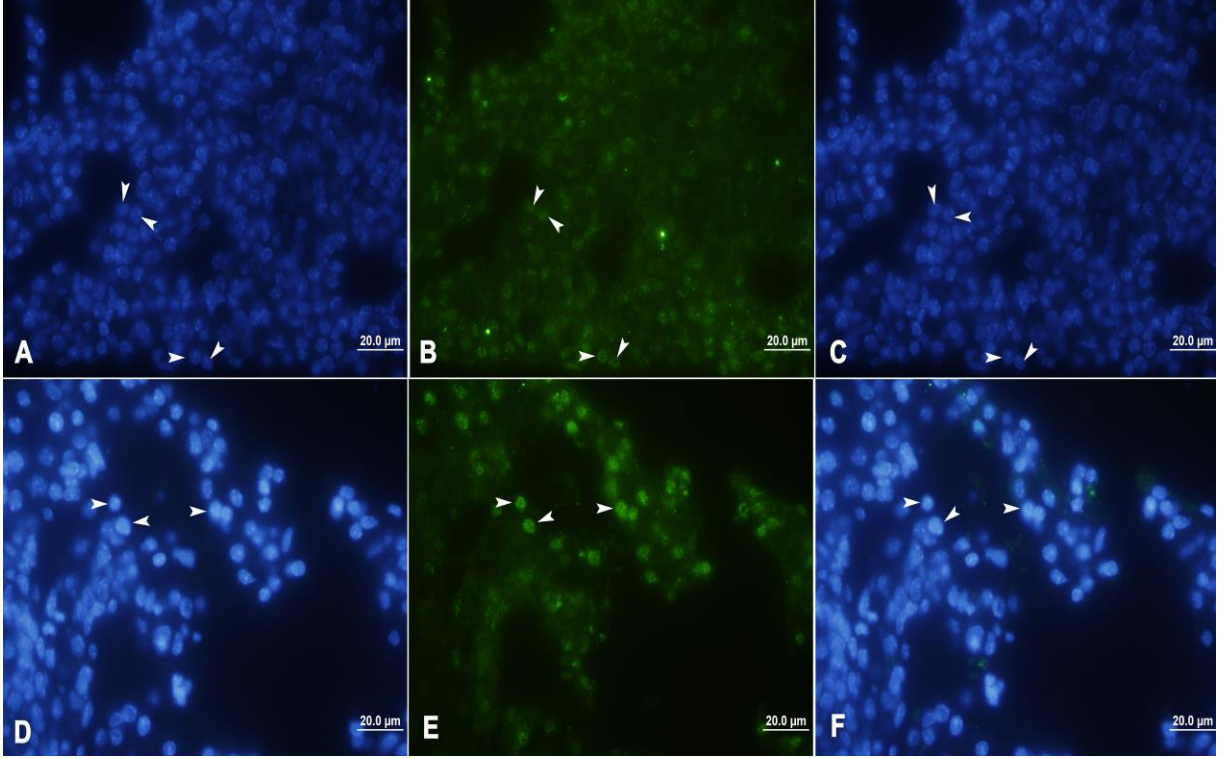
Şekil 13. Fötal akciğer dokularında immunohistokimya boyama yöntemi ile Hey1 ekspresyonunun belirlenmesi. Kesitler, Hey1 primer antikoruna (NBP2-47436, Novus) ile muamele edilmiştir. Hey1-pozitif hücrelerin belirlenmesinde kromojen olarak DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride); çekirdek boyası olarak Harris hematoksilen kullanılmıştır. A,B: Kontrol grubuna ait fötal akciğer dokularında Hey1 pozitif hücreler görülmektedir (ok başları). C,D: Deneme grubuna ait fötal akciğer dokularında Hey1 pozitif hücreler görülmektedir (ok başları). TS, terminal sakkulusları; oklar ise ileride alveolleri oluşturacak olan bezsel (psödoglandüler) yapıları göstermektedir.



Şekil 14. Fötal akciğer dokularında immünofloresan boyama yöntemi ile Hey1 ekspresyonunun belirlenmesi. Kesitler, Hey1 primer antikoru (NBP2-16818, Novus) ile muamele edilmiştir. Hey1 immunpozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A11034, Invitrogen) sekonder antikoru kullanılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyanmıştır. A, D: Sırasıyla, Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer doku örneklerinde DAPI çekirdek boyası ile boyanmış hücre çekirdekleri. B, E: Sırasıyla Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer doku örneklerinde yeşil flöresan ışığa gösteren Hey1-pozitif hücreler (ok başları). C, F: A/B ve D/E görüntülerinin çakıştırılması ile elde edilmiş görüntülerde Hey1 pozitif hücreler (ok başları).



Şekil 15. Fötal akciğer dokularında immunohistokimya boyama yöntemi ile Skp2 ekspresyonunun belirlenmesi. Kesitler, Skp2 primer antikoru (NB100-91962, Novus) ile muamele edilmiştir. Skp2-pozitif hücrelerin belirlenmesinde kromojen olarak DAB (3,3'' diaminobenzidine tetrahydrochloride); çekirdek boyası olarak Harris-hematoksilen kullanılmıştır. A: Kontrol grubuna ait fötal akciğer dokularında Skp2 pozitif hücreler görülmektedir (ok başları). B: Deneme grubuna ait fötal akciğer dokularında Skp2 pozitif hücreleri görülmektedir (ok başları). TS, terminal sakkulus; oklar ise ileride alveolleri oluşturacak olan bezsel (psödoglandüler) yapıları göstermektedir.

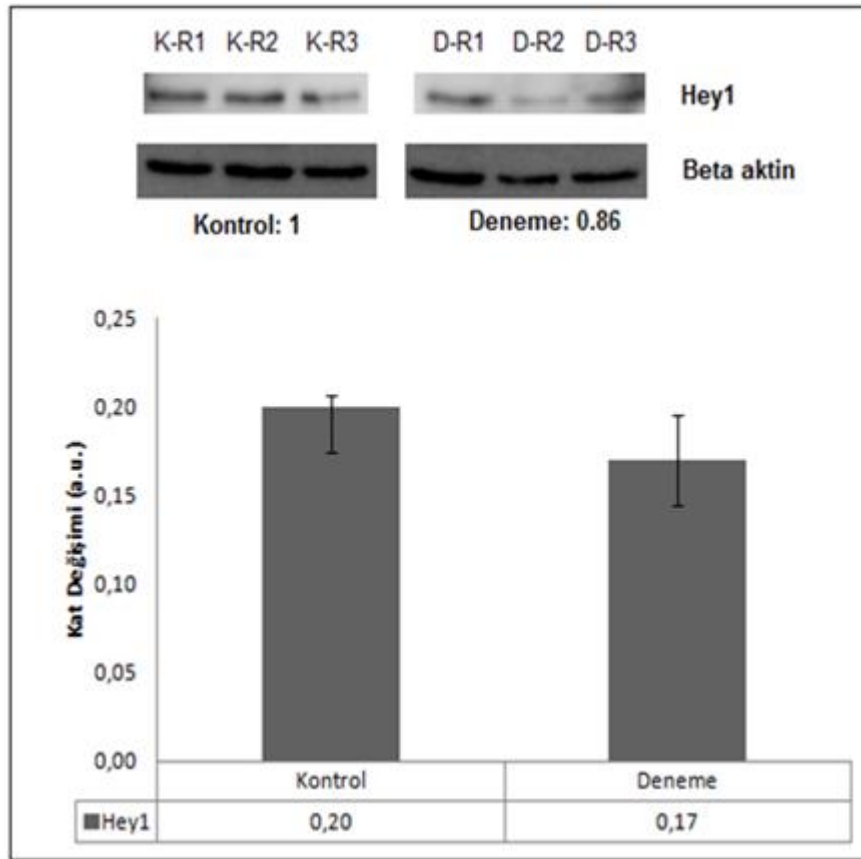


Şekil 16. Fötal akciğer dokularında immünofloresan boyama yöntemi ile Skp2 ekspresyonunun belirlenmesi. Kesitler, Skp2 primer antikoru (NB100-91962, Novus) ile muamele edilmiştir. Skp2 immunpozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 (A11034, Invitrogen) sekonder antikoru kullanılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) ile boyanmıştır. A, D: Sırasıyla, Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer doku örneklerinde DAPI çekirdek boyası ile boyanmış hücre çekirdekleri. B, E: Sırasıyla Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer doku örneklerinde yeşil flöresan ışığa gösteren Skp2-pozitif hücreler (ok başları). C, F: A/D ve B/E görüntülerinin çakıştırılması ile elde edilmiş görüntülerde Skp2 pozitif hücreler (ok başları).

4.3. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Western Blot Tekniğiyle Hey1 ve Skp2 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

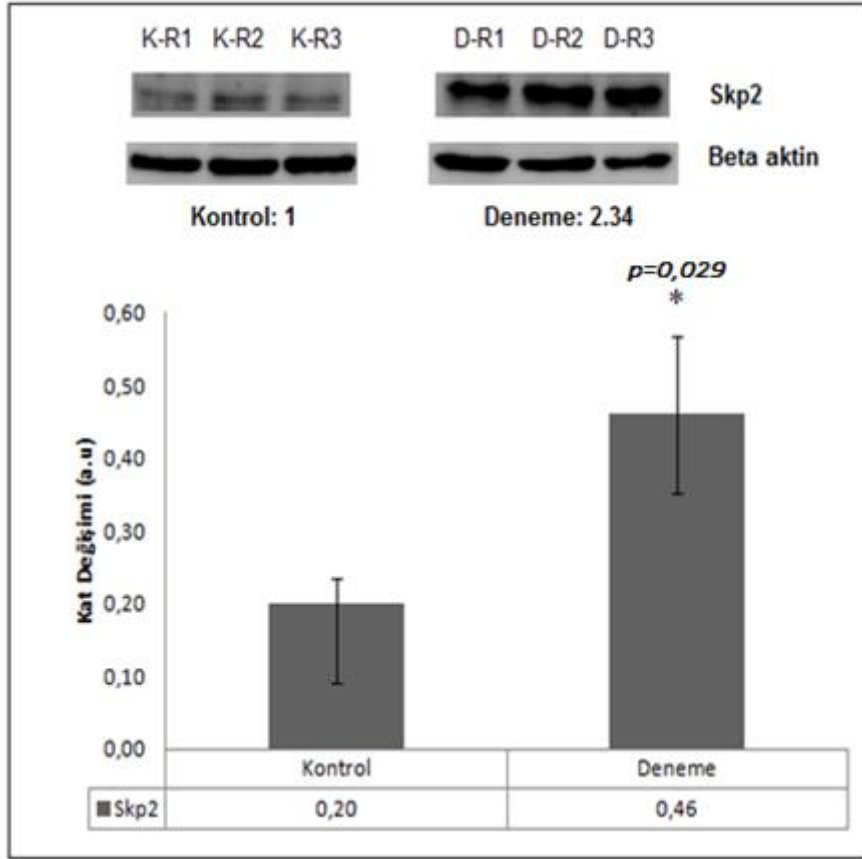
Hey1 ve *Skp2* gen ekspresyonunun protein (translasyonel) düzeyinde semi-kantitatif olarak saptanması amacıyla western blot tekniğinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Kontrol (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) ve Deneme gruplarında (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin proteini için 43kDa; Hey1 için yaklaşık 45 kDa; Skp2 için ise yaklaşık 33 kDa ağırlığında olan bantların varlığını

göstermiştir. Kontrol (Kontrol-R1, Kontrol-R2 ve Kontrol-R3) ve Deneme (Deneme-R1, Deneme-R2 ve Deneme-R3) gruplarına ait normalize edilen ortalama değerler ve standart sapmaları sırasıyla *Hey1* için $0,20 \pm 0,01$ ve $0,17 \pm 0,03$; *Skp2* için ise $0,20 \pm 0,03$ ve $0,46 \pm 0,11$ olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1* protein ekspresyonunun azalmasına rağmen, istatistiksel açıdan Deneme grubu ile Kontrol grubu arasında kantitatif bir fark olmadığını ($p=0,224$, Şekil 17) göstermiştir. Buna karşın, *Skp2* protein ekspresyonunun Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda anlamlı düzeyde arttığı ($p=0,029$, Şekil 18) saptanmıştır.



Şekil 17. Western blot yöntemiyle fetal akciğer doku örneklerinde *Hey1* protein ekspresyonunun belirlenmesi. Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 45 kDa aralığında olan ve *Hey1* proteinine karşılık gelen spesifik bir bandın varlığı görülmektedir. Endojen kontrol olarak kullanılan β -aktinin hem Kontrol, hem de Deneme grubunda eksprese edildiği görülmektedir. Normalizasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar sonucunda, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubununa ait akciğer dokularında *Hey1* proteinine ait ekspresyon düzeyinin 1.17 kat azaldığı görülmektedir. Kontrol ve Deneme grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilen kat değişim sonuçları, tüm biyolojik replikasyonlar için

gerçekleştirilen normalizasyon işlemleri sonrasında elde edilen ortalama kat değişimi değerlerini ifade etmektedir.



Şekil 18. Western blot yöntemiyle fetal akciğer doku örneklerinde Skp2 protein ekspresyonunun belirlenmesi. Western blot işlemi sonrası tüm gruplarda 33 kDa aralığında olan ve Skp2 proteinine karşılık gelen spesifik bir bandın varlığı görülmektedir. Endojen kontrol olarak kullanılan β -aktinin hem kontrol hem de deneme grubunda eksprese edildiği görülmektedir. Normalizasyon işlemi sonrası yapılan hesaplamalar sonucunda, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubununa ait akciğer dokularında Skp2 proteinine ait ekspresyon düzeyinin 2.34 kat arttığı görülmektedir. Kontrol ve Deneme grupları için Arbitrary Unit (a.u.) cinsinden verilen kat değişim sonuçları, tüm biyolojik replikasyonlar için gerçekleştirilen normalizasyon işlemleri sonrasında elde edilen ortalama kat değişimi değerlerini ifade etmektedir.

4.4. Fötal Akciğer Doku Örneklerinden İzole Edilen Total RNA Örneklerinin Kalitesi

Sunulan tez çalışmasında, -80 °C’de muhafaza edilen Kontrol ve Deneme gruplarına ait fötal akciğer doku örneklerinden izole edilen total RNA örneklerinin konsantrasyonunu ve saflığını belirlemek amacıyla spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Kontrol ve Deneme gruplarında bireysel ve birleştirilmiş (pooled) RNA örneklerinde RNA konsantrasyonu ve aynı örneklerle ait A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri Tablo 12 ve 13’te gösterilmiştir. Saf bir RNA örneği için A_{260}/A_{280} değerinin 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) solüsyonu içerisinde 1,9-2,1 arasında olması gerekmektedir. Dolayısıyla, elde edilen değerler RNA örneklerinin saf olduğunu ve örneklerin herhangi bir protein ya da kimyasal madde ile kontaminasyonunun söz konusu olmadığını göstermiştir.

Tablo 12. Kontrol ve Deneme gruplarına ait bireysel RNA örneklerinin A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri.

Örnek No	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	$[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$	Konsantrasyon (ug/ml)
K1	0,2965	0,1380	0,0036	2,15	2,18	595
K2	0,1479	0,0681	0,0000	2,17	2,17	296
K3	0,2370	0,1095	-0,0006	2,16	2,16	474
K4	0,1498	0,0690	-0,0007	2,17	2,16	299,5
K5	0,1510	0,0692	-0,0017	2,18	2,15	302
K6	0,0906	0,0433	0,0013	2,09	2,13	181
K7	0,1344	0,062	-0,0002	2,17	2,16	269
K8	0,1461	0,0673	-0,0001	2,17	2,17	292
K9	0,1687	0,0772	-0,0011	2,19	1,17	337,5
K10	0,263	0,1189	-0,0015	2,21	2,2	525
K11	0,2041	0,0929	-0,0015	2,2	2,18	408
K12	0,18	0,0826	-0,0002	2,18	2,18	360
K13	0,2137	0,1	0,0034	2,14	2,18	427,5
K14	0,1829	0,0904	0,011	2,02	2,16	366
K15	0,2215	0,1046	0,0057	2,12	2,18	443
K16	0,2885	0,1372	0,0084	2,1	2,17	575
K17	0,1084	0,0504	0,002	2,15	2,2	217
K18	0,1143	0,0518	0,0001	2,21	2,21	228,5

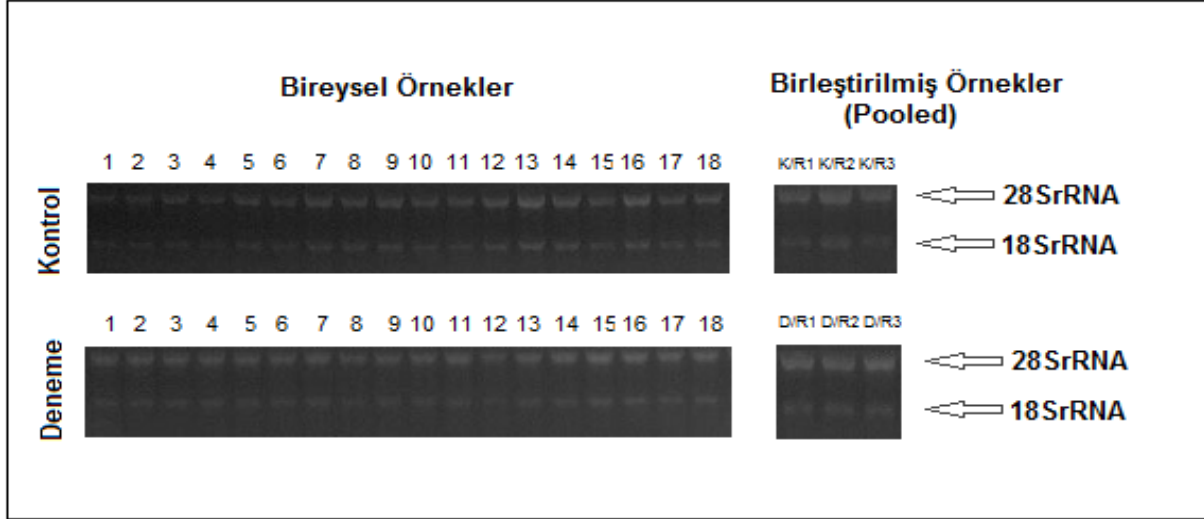
D1	0,1964	0,0963	0,006	2,04	2,11	393
D2	0,1708	0,0848	0,0056	2,01	2,09	341,5
D3	0,285	0,1412	0,0052	2,02	2,06	570
D4	0,1507	0,0824	0,009	1,9	2,01	313,5
D5	0,3548	0,1723	0,0078	2,06	2,11	710
D6	0,1260	0,0663	0,011	1,9	2,08	252
D7	0,1478	0,0737	0,0039	2,01	2,06	295,5
D8	0,3217	0,1557	0,0066	2,07	2,11	645
D9	0,3396	0,1697	0,0162	2	2,11	680
D10	0,2556	0,1212	0,0024	2,11	2,13	510
D11	0,2007	0,0971	0,005	2,07	2,12	401,5
D12	0,2809	0,1335	0,0031	2,1	2,13	560
D13	0,3162	0,1501	0,0033	2,11	2,13	630
D14	0,2544	0,1305	0,0047	1,95	1,98	510
D15	0,1794	0,0881	0,0029	2,04	2,07	359
D16	0,2489	0,1181	0,0038	2,11	2,14	498
D17	0,218	0,1076	0,0022	2,03	2,05	436
D18	0,2469	0,1172	0,0031	2,11	2,14	494

Tablo 13. Kontrol ve Deneme gruplarına ait birleştirilmiş (pooled) RNA örneklerinin A_{260} , A_{280} , A_{260}/A_{280} ve $[(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})]$ değerleri.

Örnek No	A_{260}	A_{280}	A_{320}	A_{260}/A_{280}	$[A_{260} - A_{280}/$ $A_{280} - A_{320}]$	Konsantrasyon ($\mu\text{g/ml}$)
Kontrol-R1	0,1713	0,0822	0,0065	2,08	2,18	342,5
Kontrol-R1	0,1719	0,0795	0,0007	2,16	2,17	344
Kontrol-R1	0,1604	0,0748	0,0023	2,14	2,18	321
Deneme-R1	0,1426	0,0683	-0,0012	2,09	2,07	285
Deneme-R2	0,2481	0,121	0,0055	2,05	2,1	496
Deneme-R3	0,2172	0,1046	0,0002	2,08	2,08	434,5

Bu şekilde saflığı belirlenen RNA örneklerinde, RNA bütünlüğünü test etmek amacıyla 1 μg total RNA, Redsafe nükleik asit boyası içeren %1'lik denature agaroz jelde koşurulmuştur. analiz edilen tüm örneklerde 28S ve 18S rRNA bandlarında herhangi bir smear'in bulunmadığı ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında olduğu tespit

edilmiştir (Şekil 19). Elde edilen sonuçlar doku örneklerinin alınması ve saklanmasından, total RNA izolasyonuna kadar geçen tüm süreç boyunca örneklerin RNase enzimi ile kontaminasyonu ve yıkımlanmasının söz konusu olmadığını ve buna bağlı olarak RNA bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir.



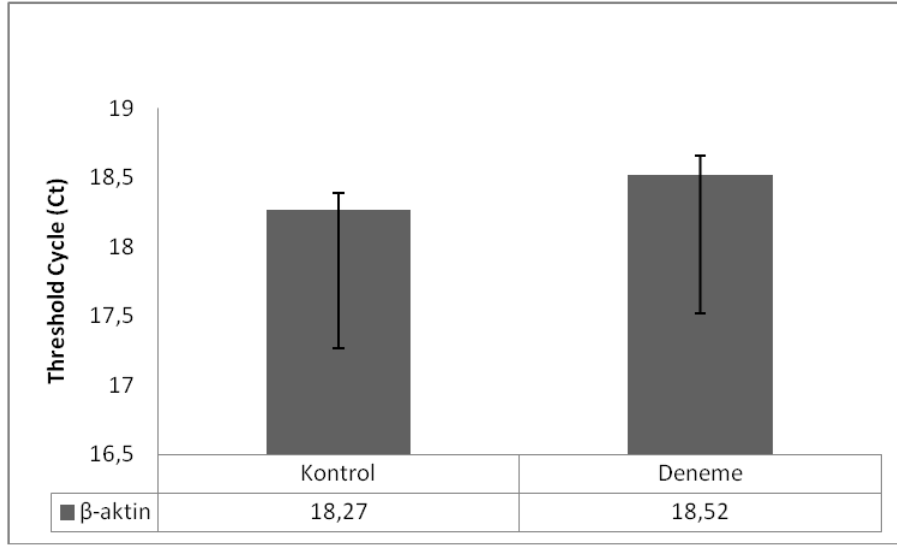
Şekil 19. Total RNA örneklerinde 28S ve 18S rRNA bandlarının agaroz jelde görüntüsü. Kontrol ve Deneme gruplarına ait bireysel ve birleştirilmiş (pooled) örneklerden 1 µg total RNA, %1'lik denature agaroz jelde koşturulmuştur. 28S ve 18S rRNA bandlarında herhangi bir smear'in oluşmamış olması ve 28S/18S rRNA oranının yaklaşık olarak 2:1 oranında bulunması incelenen tüm örneklerde total RNA bütünlüğünün korunduğunu göstermektedir.

4.5. Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Real-Time PCR Tekniğiyle *Hey1* ve *Skp2* Ekspresyonlarının Belirlenmesi

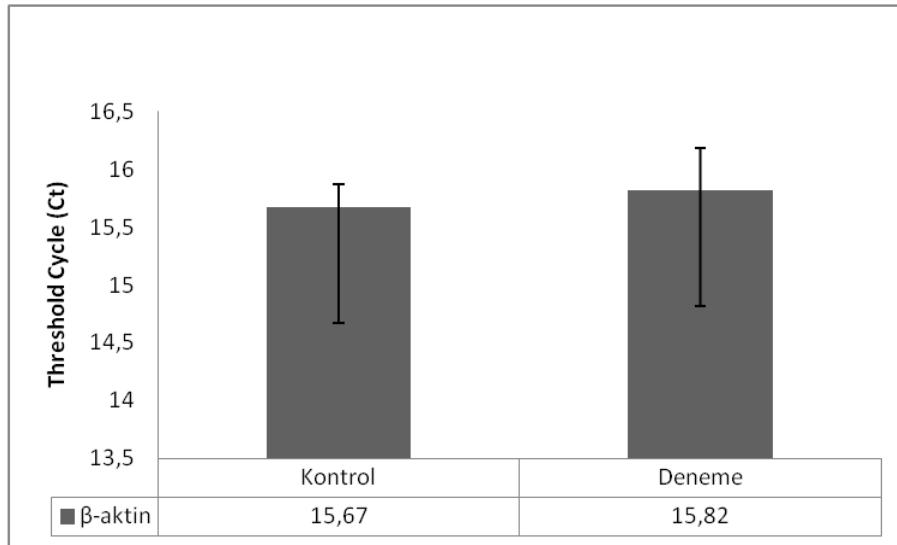
qRT-PCR analizleri, *Hey1*, *Skp2* ve β -*aktin* genleri için birleştirilmiş (pooled) örneklerde hem TaqMan, hemde SYBR Green metodları ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalara ek olarak, *Hey1* ve *Skp2* genlerine yönelik bireysel ekspresyon farklılıklarını ortaya koymak amacıyla bireysel örneklerde SYBR Green metodu kullanılarak qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

TaqMan ve SYBR Green metodları ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde β -*aktin* generine ait Ct değerleri Şekil 20, 21 ve 22'de sunulmuştur. Gerek TaqMan, gerekse SYBR Green metodları ile elde edilen sonuçlar, Kontrol ve Deneme gruplarında endojen kontrol

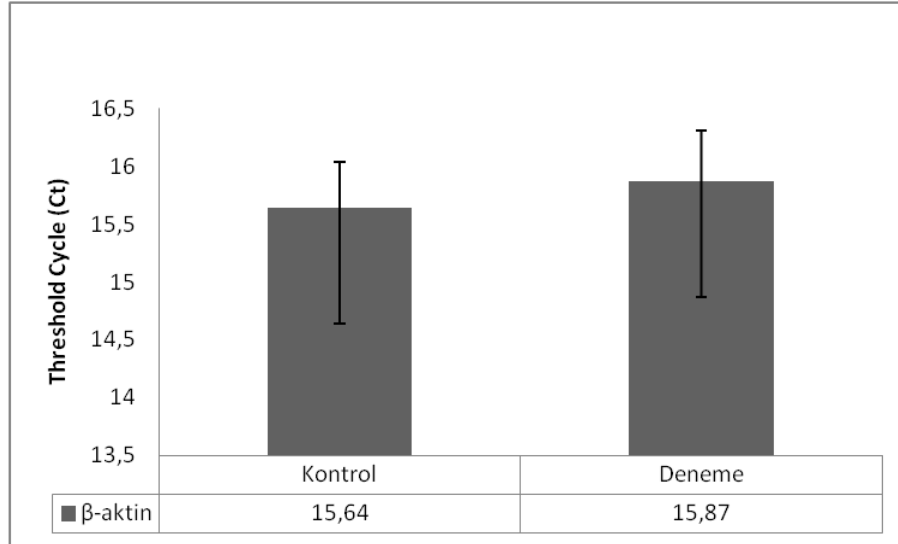
olarak kullanılan β -aktin genine ait Ct değerlerinin, hem birleştirilmiş (pooled) (Şekil 20, 21), hem de bireysel örneklerde (Şekil 22) birbirlerine çok yakın olduğunu göstermiştir.



Şekil 20. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen Real-time PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında birleştirilmiş (pooled) örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.

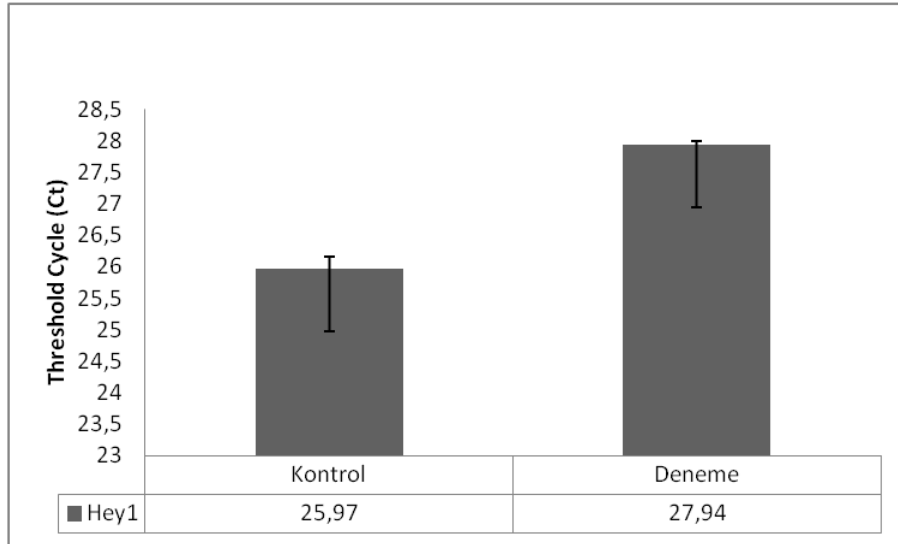


Şekil 21. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında birleştirilmiş (pooled) örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.

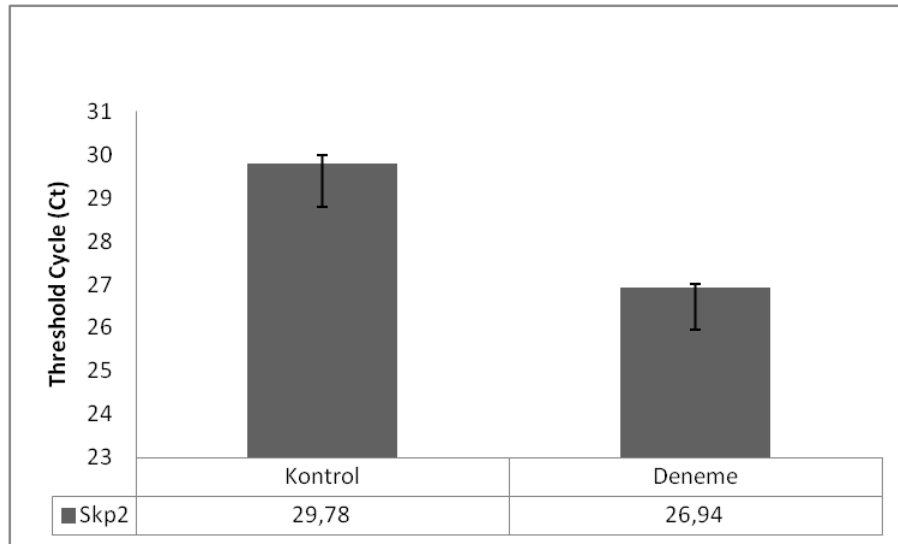


Şekil 22. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Kontrol ve Deneme gruplarında bireysel örneklerde β -aktin geni için ortalama Ct değerleri.

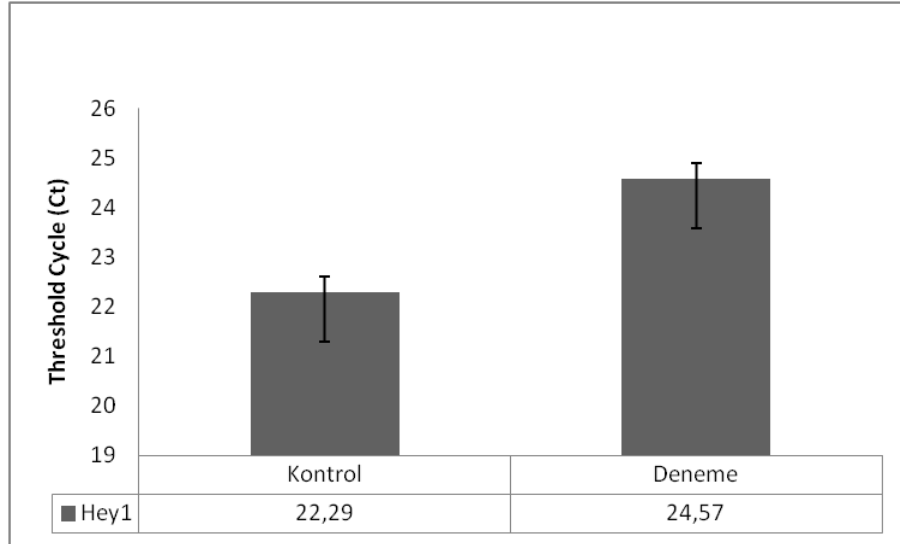
TaqMan metodu kullanılarak birleştirilmiş (pooled) örneklerde *Hey1* ve *Skp2* genlerine ait ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde, Kontrol ve Deneme gruplarında elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları *Hey1* geni için $25,97 \pm 0,19$ ve $27,94 \pm 0,06$; *Skp2* geni için ise $29,78 \pm 0,21$ ve $26,94 \pm 0,07$ olarak belirlenmiştir (Şekil 23 ve 24). Birleştirilmiş (pooled) örneklerde SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde Kontrol ve Deneme gruplarında elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları *Hey1* geni için $22,29 \pm 0,31$ ve $24,57 \pm 0,32$; *Skp2* geni için ise $33,25 \pm 0,88$ ve $29,99 \pm 0,82$ olarak belirlenmiştir (Şekil 25 ve 26). Bireysel örneklerde SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinde Kontrol ve Deneme gruplarında elde edilen ortalama Ct değerleri ve standart sapmaları *Hey1* geni için $22,29 \pm 0,47$ ve $24,48 \pm 0,46$; *Skp2* geni için ise $32,12 \pm 3,30$ ve $29,43 \pm 1,90$ olarak belirlenmiştir (Şekil 27 ve 28).



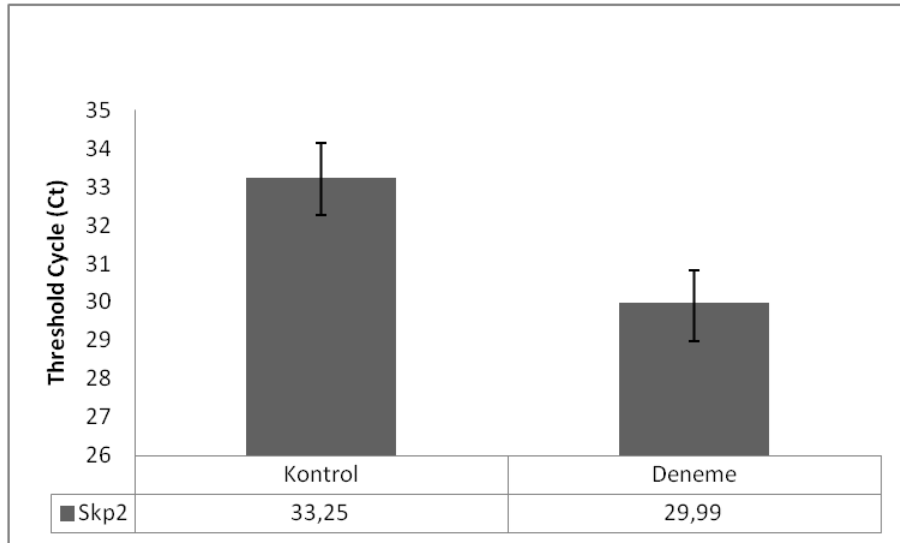
Şekil 23. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Deneme ve Kontrol gruplarında Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.



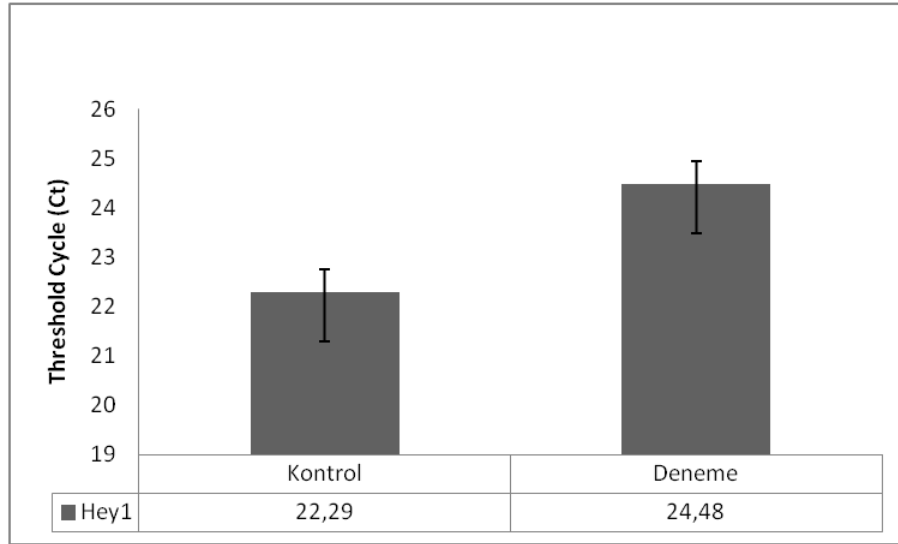
Şekil 24. TaqMan metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen Deneme ve Kontrol gruplarında Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.



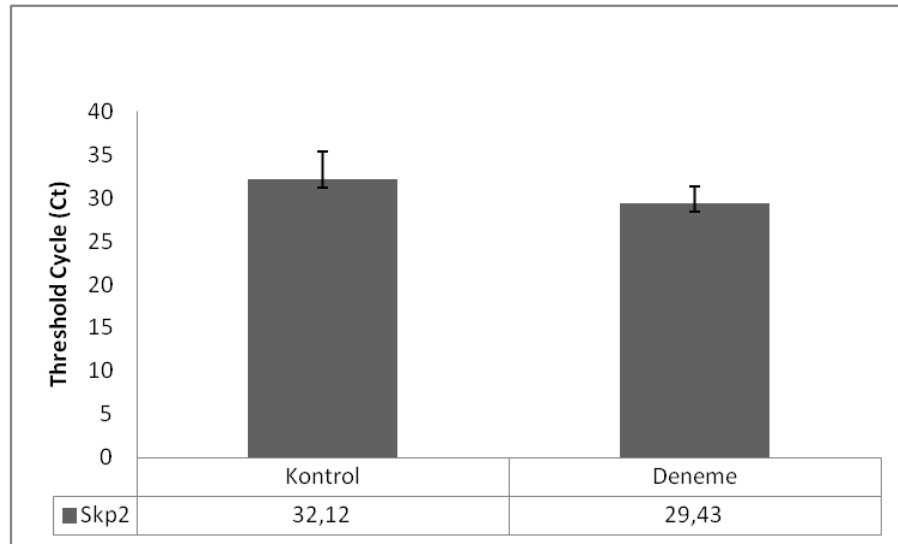
Şekil 25. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.



Şekil 26. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.

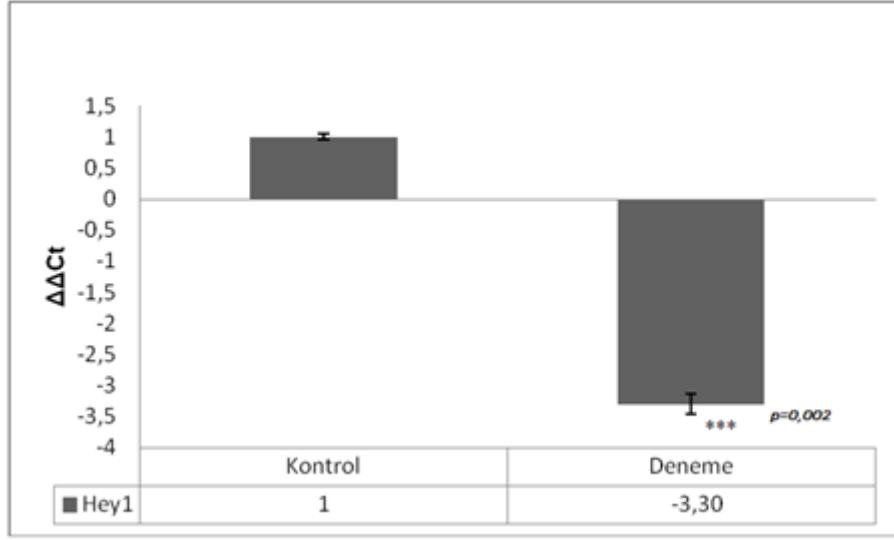


Şekil 27. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen bireysel örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Hey1 geni için ortalama Ct değerleri.

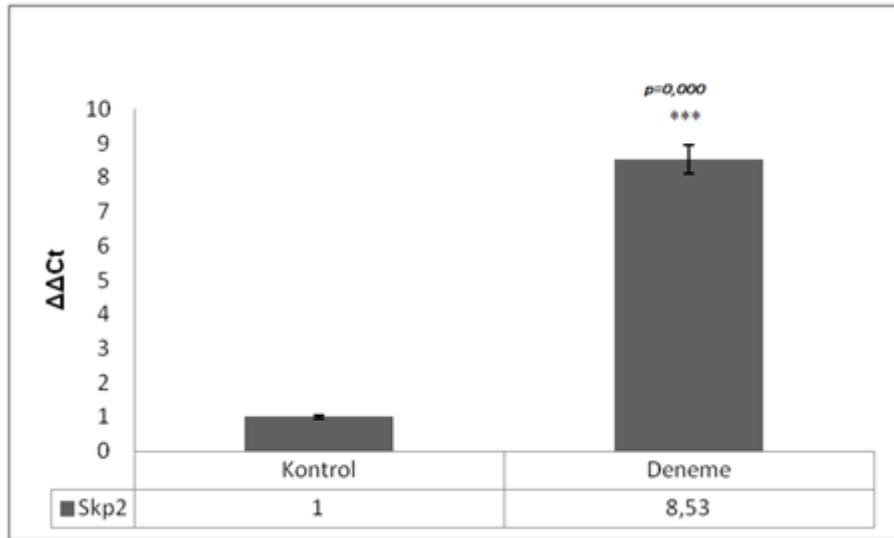


Şekil 28. SYBR Green metodu ile gerçekleştirilen qRT-PCR analizlerinden elde edilen bireysel örneklerde Deneme ve Kontrol gruplarına ait Skp2 geni için ortalama Ct değerleri.

Birleştirilmiş (pooled) örneklerde TaqMan metodu ile elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda Hey1'e ait mRNA düzeyinin 3,30 ($p=0,002$) kat azaldığını; Skp2'ye ait mRNA düzeyinin ise 8,53 ($p=0,000$) kat arttığını göstermiştir. Kontrol ve Deneme grubu arasında hesaplanan *Hey1* ve *Skp2* genlerine ait kat değişim değerleri Şekil 29 ve 30'da gösterilmiştir.



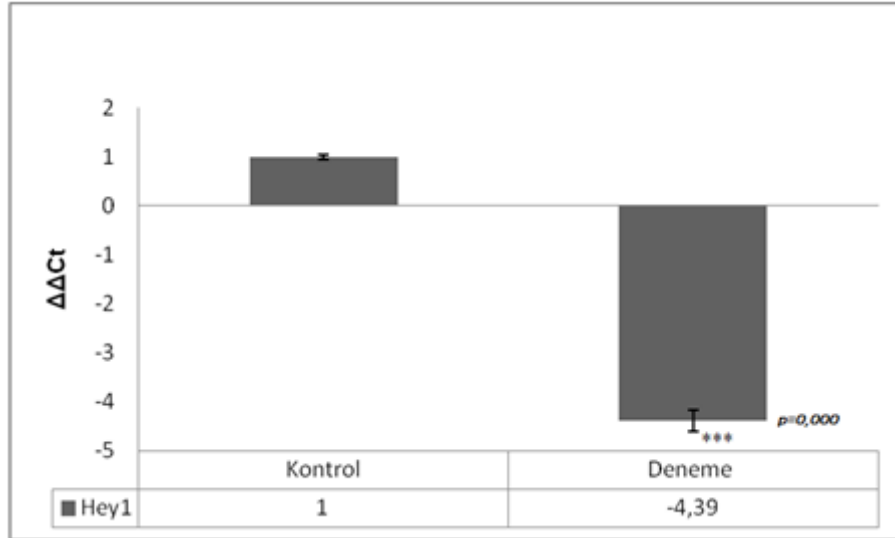
Şekil 29. TaqMan metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta C_t$ metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu “1” olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.



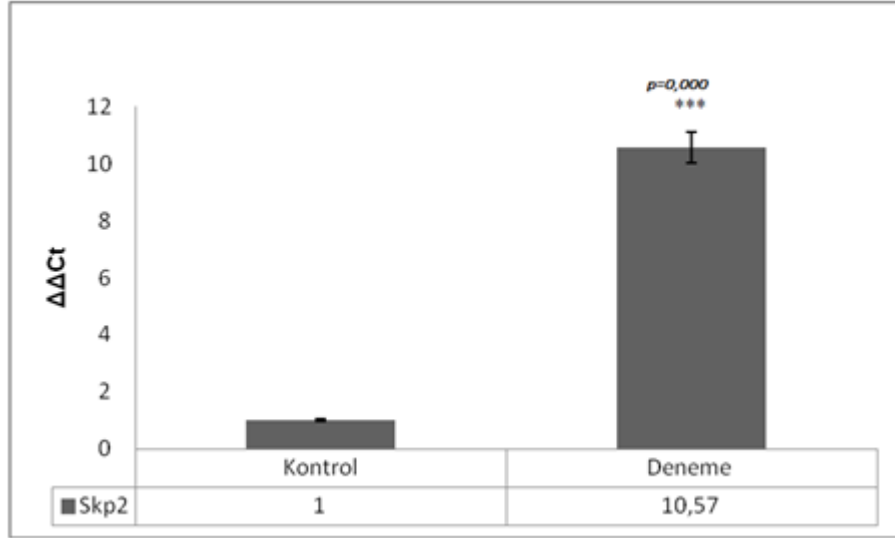
Şekil 30. TaqMan metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir.

Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta Ct$ metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu ‘1’ olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

Birleştirilmiş (pooled) örneklerde SYBR Green metodu ile elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda Hey1’e ait mRNA düzeyinin 4,39 kat azaldığını ($p=0,000$) ve Skp2’ye ait mRNA düzeyinin 10,57 kat arttığını ($p=0,000$) göstermiştir. Kontrol ve Deneme grubu arasında hesaplanan *Hey1* ve *Skp2* genlerine ait kat değişim değerleri Şekil 31 ve 32’te gösterilmiştir.

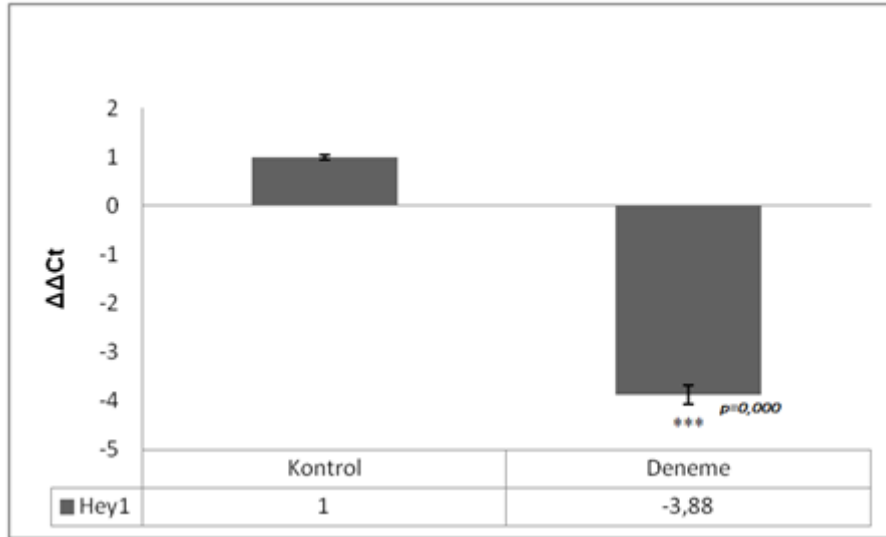


Şekil 31. SYBR Green metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta Ct$ metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu ‘1’ olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

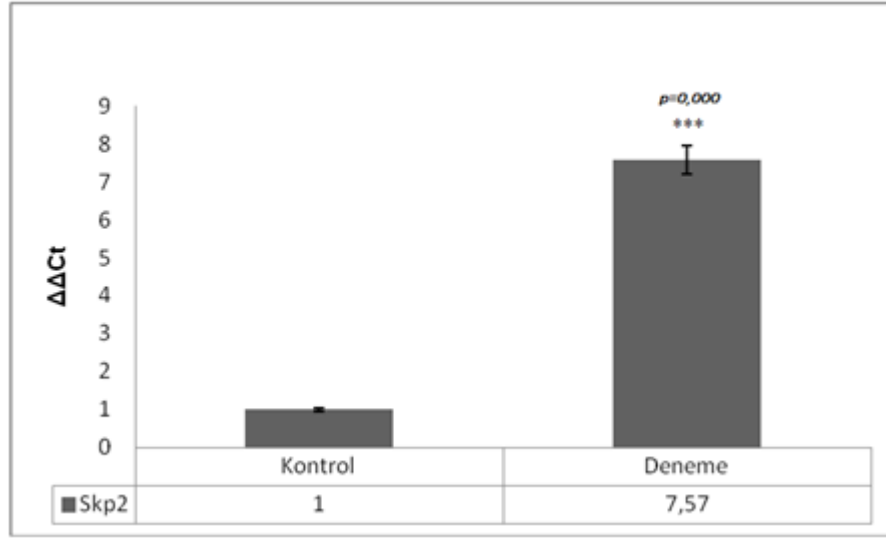


Şekil 32. SYBR Green metoduna göre birleştirilmiş (pooled) örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta Ct$ metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu “1” olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

Bireysel örneklerde SYBR Green metodu ile elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda Hey1’e ait mRNA düzeyinin 3,88 kat azaldığını ($p=0,000$) ve Skp2’ye ait mRNA düzeyinin 7,57 kat arttığını ($p=0,000$) göstermiştir. Kontrol ve Deneme grubu arasında hesaplanan Hey1 ve Skp2 genlerine ait kat değişim değerleri Şekil 33 ve 34’te gösterilmiştir.



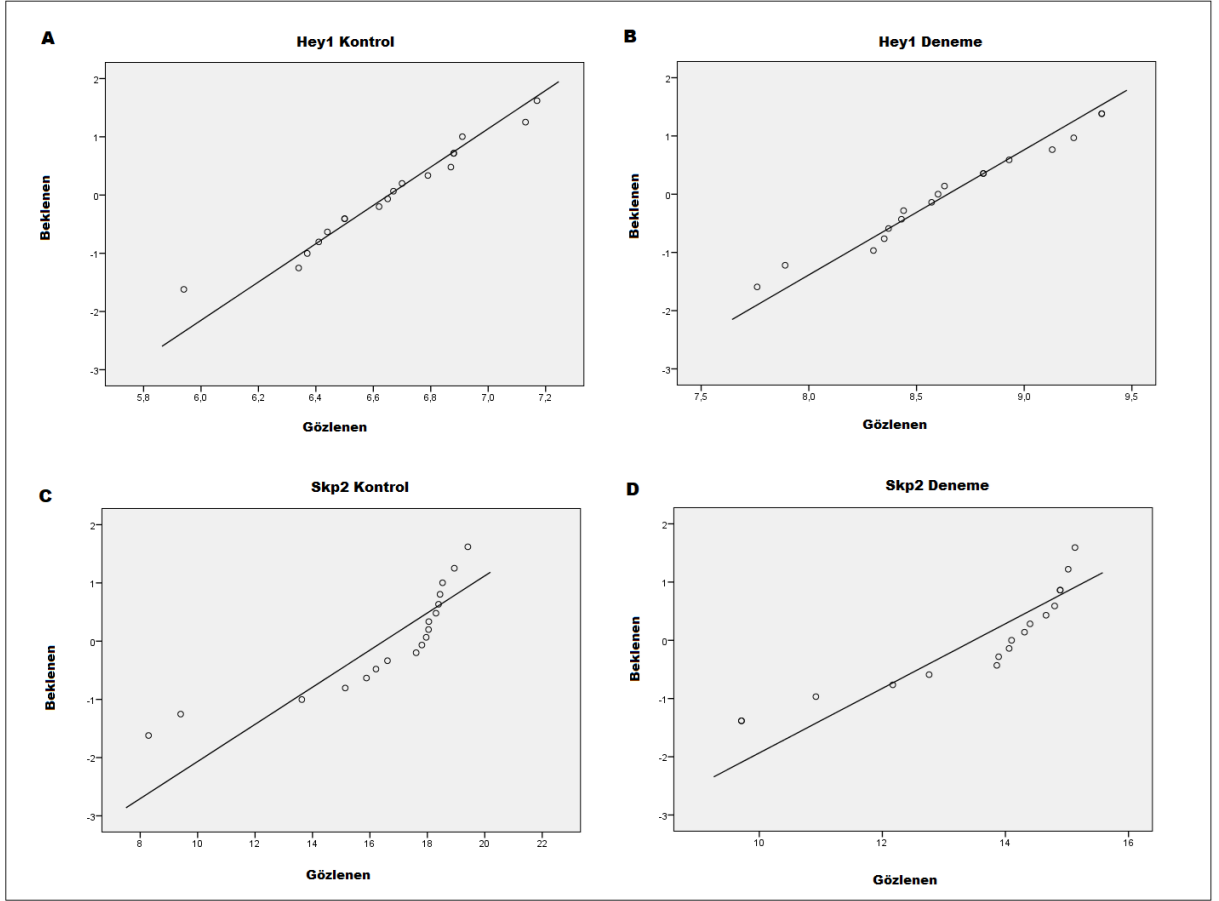
Şekil 33. SYBR Green metoduna göre bireysel örneklerde Deneme grubuna ait Hey1 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta C_t$ metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu ‘1’ olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.



Şekil 34. SYBR Green metoduna göre bireysel örneklerde Deneme grubuna ait Skp2 geninin Kontrol grubuna göre kat değişim değerleri. Kontrol ve Deneme grubuna ait Ct değerleri endojen kontrol olarak kullanılan β -aktin geni ile normalize edilmiştir. Normalizasyon işlemi sonrası gruplar arası kat değişim değerlerinin hesaplanması, Livak ve Schmittgen (2001) tarafından geliştirilen $\Delta\Delta$ Ct metodu ile yapılmıştır. Kat değişim değeri Kontrol grubu ‘1’ olarak kabul edildiğinde Deneme grubundaki kat değişimini ifade etmektedir. Kat değişim değeri, <1 değerleri, Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin azaldığını, >1 değerleri ise Kontrol grubuna göre ekspresyon seviyesinin arttığını göstermektedir.

4.6. Bireysel Fötal Akciğer Doku Örneklerinde Hey1 ve Skp2 Ekspresyonlarının Belirlenmesi

Hey1 ve *Skp2* genlerinin ekspresyonu açısından bireysel farklılıkları ortaya koyabilmek amacıyla bireysel örneklerde SYBR Green metodu ile qRT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaca yönelik olarak Kontrol grubunda 18 adet, Dememe grubunda 18 adet olmak üzere toplam 36 adet örnek analiz edilmiştir. Ancak, Dememe grubunda bir örnekte (D11) β -aktin, *Hey1*, ve *Skp2* genlerine ait Ct değerlerinin anormal olduğu saptanmıştır. Bu durum dikkate alınarak, bu örnek analizlere dahil edilmemiştir. Kontrol ve Deneme gruplarında *Hey1* ve *Skp2* genlerine ait Δ Ct değerlerinin dağılım grafikleri Şekil 35'te gösterilmiştir.



Şekil 35. SYBR Green metoduna göre Kontrol ve Deneme gruplarında Hey1 ve Skp2 genlerine ait bireysel ΔC_t dağılım grafikleri. A, Kontrol grubuna ait bireylerin Hey1 ΔC_t dağılım grafiklerini; B, Deneme grubuna ait bireylerin Hey1 ΔC_t değerlerinin dağılım grafiklerini; C, Kontrol grubuna ait bireylerin Skp2 ΔC_t dağılım grafiklerini; D, Deneme grubuna ait bireylerin Skp2 ΔC_t dağılım grafiklerini göstermektedir.

Hey1 ve *Skp2* genlerine ait bireysel $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin, 1120259 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında kullanılan her bir örneğe ait fötüs ağırlıkları ile ilişkisini belirlemek amacıyla Pearson korelasyon analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, *Hey1* için korelasyon katsayısının (r) = 0,784 ($p=0,000$); *Skp2* için ise r değerinin 0,133 ($p=0,446$) olduğunu göstermiştir. Korelasyon katsayısı, tek başına örneklem sayısının büyüklüğünden etkilenen bir veridir. Pearson analizinde kullanılan fötüs sayısının göreceli olarak düşük ($n=18$) olması göz önünde bulundurularak elde edilen korelasyon katsayılarının karesi (r^2) alınmıştır. Bu şekilde *coefficient of determination* (sonuçları açıklama katsayısı) elde edilmiştir. *Hey1* geni için açıklama kat sayısının (r^2) = 0,62 olduğu saptanmış olup bu durum *Hey1* mRNA ekspresyon düzeyinin % 62 oranında azalan fötüs ağırlıklarından kaynaklanmış olduğunu ifade

etmektedir. *Skp2* için elde edilen açıklama katsayısı ise 0,018 olarak belirlenmiştir. Bu durum azalan fötüs ağırlıklıklarının *Skp2* mRNA ekspresyon düzeyini ancak % 1,8 oranında etkilediğini göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, *Hey1* mRNA ekspresyon düzeyinin fötüs ağırlıklarının azalması ile pozitif yönde orta düzeyde bir korelasyon gösterdiği (0,62); *Skp2* mRNA ekspresyon düzeyi ile fötüs ağırlıkları arasında çok zayıf (0,018) bir ilişki bulunduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bir sağlık sorunu olarak infertilitenin dñnya genelinde, 48.5 milyondan fazla çifti etkilediği (Agarwal ve ark, 2015; Kumar ve Singh, 2015; Kellesarian ve ark, 2016), ÜYTE yöntemleri uygulanarak dñnyaya gelen bebek sayısının ise 8 milyondan fazla olduğu (ESHRE, 2018) tahmin edilmektedir. Gelişmiş ÷lkelerde ÜYTE uygulanarak doğan bebeklerin, normal doğum sonucu dñnyaya gelen bebeklerin %1-4'üne karşılık geldiği bildirilmektedir (Kondapalli ve Perales-Puchalt, 2013). Bütün bu rakamlar, sorunun yaygınlığını ve ÜYTE uygulamalarına olan gereksinimi ortaya koymasından önem taşımaktadır. Bununla birlikte, ÜYTE uygulamaları sonucunda doğan bebeklerin sağlık durumları ile ilgili duyulan endişelerin artışı, ÜYTE uygulamalarının sağlık üzerine olan etkilerinin araştırılmasını da gerekli kılmaktadır (Sutcliffe ve Ludwig, 2007).

Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalardan elde edilen veriler, normal gebelik sonucu dñnyaya gelen bebekler ile kıyaslandığında, ÜYTE uygulaması sonucu doğan bebeklerin daha fazla sağlık riski taşıdıklarını göstermektedir (Shevell ve ark, 2005; Klemetti ve ark, 2006; Basatemur ve ark, 2008; Hediger ve ark, 2013). Nitekim ÜYTE uygulamaları sonucu gerçekleşen gebeliklerde, düşük doğum ağırlığı, konjenital anomaliler, perinatal mortalite ve gebelik ile ilgili diğer komplikasyonların görülme riskinin, normal gebeliklere oranla daha fazla olduğunu gösteren pek çok veri bulunmaktadır (Shih ve ark, 2008; Fernando ve ark, 2012). Ayrıca, otizm spektrum bozukluğu (Autism spectrum disorder, Fountain ve ark, 2015), astım (Carson ve ark, 2013), Beckwith-Wiedemann sendromu, Prader-Willi sendromu ve Angelman sendromu gibi genetik anomaliler (Debaun ve ark, 2003; Weksberg ve ark, 2003; Ludwig ve ark, 2005), kanser (Källén ve ark, 2010), serebral palsi (Strömberg ve ark, 2002) ve epilepsi (Sun ve ark, 2007) gibi hastalıkların, normal bireyler ile kıyaslandığında, ÜYTE uygulamaları sonucu doğan çocuklarda daha fazla rastlandığı bildirilmiştir. Ayrıca, erken (gebeliğin 37. haftasından önce) doğum olasılığını da arttıran ÜYTE uygulamaları sonucu doğan bebeklerde solunum yolu enfeksiyonlarına karşı duyarlılığın arttığı belirtilmektedir (Koivurova ve ark, 2002). İlk kez Barker (2007) tarafından ortaya atılan ve Barker hipotezi olarak bilinen bir hipoteze göre, düşük doğum ağırlığına sahip bireylerde erişkin dönemde Tip2 diyabet, hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi sağlık problemlerinin görülme riskinin, normal yetişkin bireylere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, ÜYTE

ile ilişkilendirilen bütün bu komplikasyonlar içerisinde düşük doğum ağırlığının en yaygın ve en önemli komplikasyonlardan birisi olarak değerlendirilmesi gerekmektedir.

ÜYTE uygulanarak elde edilen gebeliklerin sonucunda doğan bebeklerin hastalıklara karşı daha duyarlı olmalarının altında yatan nedenler tam olarak bilinmemekle birlikte, *in vitro* ortamda gerçekleştirilen ÜYTE işlemlerinin bu süreçte önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir (Shih ve ark, 2008; Katari ve ark, 2009). ÜYTE uygulamalarında, süperovülasyonu sağlamak amacıyla çeşitli hormonların kullanımı, gamet ya da embriyoların *in vitro* ortamda manipülasyonu, *in vitro* embriyo kültürü, gamet ya da embriyoların dondurulup/çözdürülmesi vb. birçok işlemin gamet ya da embriyolara zarar verebileceği ve embriyoların gelişim potansiyelini azaltacağı ortaya konulmuştur (Lu ve ark, 2013). Bütün bunlar arasında, embriyo kültürü sırasında kullanılan vasatlar, embriyoların maruz kaldıkları oksijen konsantrasyonu, ısı, ışık ve kullanılan vasatın pH'sı gibi çevresel ve fiziksel pek çok faktör sadece embriyonal gelişim üzerine değil, aynı zamanda fetal gelişim üzerine de etki edebilmektedir (Gardner ve Lane, 2004; Wale ve Gardner, 2016).

Normal (*in vivo*) koşullarda embriyoların ovidukt ve uterus içerisinde maruz kaldıkları oksijen konsantrasyonu türe bağlı olarak %2-8 arasında değişmektedir (Fischer ve Bavister, 1993). *In vitro* embriyo kültürünün hava içerisinde %5 CO₂'li inkübatör koşullarında gerçekleştirilmesi durumunda embriyolar atmosferik oksijen konsantrasyonuna (yaklaşık olarak %20-21) maruz kalmaktadırlar. İmplantasyon öncesi dönemde atmosferik oksijen konsantrasyonuna maruz bırakılan embriyolarda gen ekspresyonunun değiştiği (Harvey ve ark, 2004), blastosist gelişiminin etkilendiği ve hücre sayılarının azaldığı ve embriyoda metabolik faaliyetlerin aksadığı bilinmektedir (Karagenç ve ark, 2004; Wale ve Gardner, 2016). Dolayısıyla, *in vitro* embriyo kültür işleminin zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilmesi, oksidatif strese bağlı olarak embriyonal ve fetal gelişimi olumsuz yönde etkilediği bilinen bir embriyo kültür modeli olarak değerlendirilmektedir. Söz konusu model kullanılarak Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülen "Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi" isimli TÜBİTAK projesinden (Proje no: 112O259) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fütuslarda vücut ağırlıklarının azaldığını, akciğer gelişiminin geri kaldığını ve doğal bağışıklık sisteminin en önemli unsurlarından birisini oluşturan Toll-benzeri reseptörlerin ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Aynı şekilde "Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda toll-benzeri reseptör

(TLR)-9 ekspresyonu üzerine etkisi” (VTF17018) isimli yüksek lisans tez projesinden elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen yetişkin farelerin akciğer dokularında TLR9 transkript düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Yine “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin solunum sisteminde epitel hücre sayıları üzerine etkisi” isimli BAP projesinden (VTF15057) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslar ve yetişkin farelerin trakeya ve akciğer dokularında bazal, silli, Clara, nöroendokrin, TipI ve TipII pönomosit hücre sayılarının *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinden etkilenebileceğini göstermektedir. Aynı şekilde, “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” isimli yüksek lisans tez projesinden (VTF14028) elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fare fötuslarına ait trakeya dokularında bir bazal hücre belirteci olarak kullanılan p63 ekspresyonunun arttığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen veriler, ovaryan stimülasyon ve/veya implantasyon öncesi ortaya çıkan embriyonal strese bağlı olarak immün sistemin, akciğer gelişiminin ve akciğer dokusunda hücre dinamiklerini etkileyebildiğini ortaya koymaktadır. Bütün bu çalışmaların devamı niteliğinde olan sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler, atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültür işleminin fötüs gelişiminin programlanmasını (*fetal programming*) nasıl etkilediği konusunda önemli bazı ipuçları sunmaktadır.

Sunulan tez çalışmasında hematoksilin-eozin boyama yöntemi kullanılarak akciğer gelişimi histolojik olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler, Kontrol grubuna ait bireylerde akciğer gelişiminin sakkuler evrede olduğunu, Deneme grubuna ait bireylerde ise akciğer gelişiminin Warburton ve ark (2010)’nın E14.5 -E16.5 için tanımladıkları psödoglandüler/kanaliküler gelişim evresine karşılık geldiğini göstermiştir. Bu veriler, 1120259 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında elde edilen verileri doğrular niteliktedir. Deneme grubunda saptanan akciğer gelişim geriliği ile düşük fötüs ağırlığı, süperovulasyon amacıyla çeşitli hormonların kullanımı ve atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen embriyo kültür işlemine bağlı olarak implantasyon öncesi dönemde oluşan embriyonik stres arasındaki neden sonuç ilişkilerinin daha kapsamlı olarak incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak Deneme grubunda gözlenen fetal akciğer gelişim geriliğinin, yetişkin dönemde olası patolojik sonuçlarının araştırılması gerekmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasının temelini oluşturan 112O259 nolu TÜBİTAK projesinde, fetal akciğer dokusunun histolojik yapısının değerlendirilmesinin yanı sıra, çeşitli genlerin ve proteinlerin ekspresyon düzeylerini belirlemek amacıyla mikroarray, qRT-PCR, western blot ve immünohistokiyasal/immünofloresans yöntemlerinden yararlanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda gerçekleştirilen mikro-array analizleri ile yaklaşık 45.000 adet genin ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Elde edilen mikro-array analizleri sonuçları Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda Notch sinyal yolağı ile indüklenen *Inpp5k*, *Pik3R1*, *Cdkn1a*, *Fhl1*, *Stat3*, *Nfkbia*, *Rbpjl*, ve *Hey1* genlerinin ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığını; *Cdk2*, *Hat1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyon düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığını ortaya koymuştur. Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonlarına ilişkin, 112O259 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında elde edilen mikro-array sonuçlarını doğrulamak amacıyla sunulan tez çalışmasında qRT-PCR yönteminden yararlanılmıştır. Ayrıca, immünohistokimya/immünofloresan ve western blot yöntemleri kullanılarak söz konusu genlerin ekspresyon profilleri belirlenmiştir.

Hey1 geni çeşitli nöral dokularda [hipokampus, amigdala (corpus amygdaloideum), substansiya nigra, pineal bez], endotel hücrelerinde ve beyin tümörlerinde (Kato M ve Kato M 2007) eksprese edilmektedir. Hücre döngüsünün pozitif bir regülatörü olan *Skp2* (Osoegawa ve ark, 2004) geni ise, S, G2 ve M evrelerinde bulunan hücreler tarafından eksprese (Qiu ve ark 2015) edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında, fetal akciğer dokusunda *Hey1* ve *Skp2* ekspresyon profillerini belirlemek amacıyla, *Hey1* ve *Skp2* primer antikoları kullanılarak immunohistokimya ve immunofloresan boyama tekniklerinden yararlanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, *Hey1* ve *Skp2*'nin ekspresyon profillerinin, Kontrol ve Deneme gruplarına ait fetal akciğer doku örneklerinde benzer olduklarını göstermiştir. Gerek immunohistokimya, gerekse immunofloresan boyamalardan elde edilen sonuçlar, fetal akciğer dokusunda *Hey1*'in damar duvarını çevreleyen endotel hücrelerinde eksprese edildiğini göstermiştir. *Skp2*'nin ise, daha yaygın bir ekspresyon profiline sahip olduğu saptanmıştır. Sunulan tez çalışmasında, immunofloresan/immunohistokimya analizlerine ek olarak, Deneme ve Kontrol grupları arasında *Hey1* ve *Skp2* ekspresyon protein düzeylerinin farklı olup olmadığını test etmek amacıyla western blot tekniğinden yararlanılmıştır. Fetal akciğer doku örneklerinde *Hey1* ve *Skp2* protein ekspresyon düzeyinin semi-kantitatif olarak saptanması amacıyla gerçekleştirilen western blot analizlerinden elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1* proteinine ait ekspresyon düzeyinin istatistiki olarak anlamlı olmasa da ($p=0,224$) 1.17 kat azaldığını, *Skp2* proteinine ait

ekspresyon düzeyinin ise 2,34 ($p=0,029$) kat arttığını göstermektedir. Sunulan tez çalışmasında, Deneme ve Kontrol grupları arasında *Hey1* ve *Skp2* gen ekspresyon düzeylerinin farklı olup olmadığını test etmek amacıyla immunofloresan/immunohistokimya ve western çalışmalarına ek olarak, qRT-PCR tekniğinden de yararlanılmıştır. Birleştirilmiş (pooled) örneklerde TaqMan metodu kullanılarak elde edilen qRT-PCR sonuçları, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1*'e ait mRNA düzeyinin 3,30 kat azaldığını ($p=0,002$), *Skp2*'ye ait mRNA düzeyinin ise 8,53 kat arttığını ($p=0,000$) göstermiştir. Birleştirilmiş (pooled) örneklerde SYBR Green metodu kullanılarak elde edilen qRT-PCR sonuçları, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1*'e ait mRNA düzeyinin 4,39 kat azaldığını ($p=0,000$) ve *Skp2*'ye ait mRNA düzeyinin 10,57 kat arttığı ($p=0,000$) göstermiştir. Bireyler arasında varyasyonları belirleyebilmek amacıyla, bireysel örneklerde SYBR Green metodu kullanılarak elde edilen qRT-PCR sonuçları, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1*'e ait mRNA düzeyinin 3,88 kat azaldığını ($p=0,000$) ve *Skp2*'ye ait mRNA düzeyinin 7,57 kat arttığını ($p=0,000$) göstermiştir. Dolayısıyla, gerek birleştirilmiş örneklerde, gerekse bireysel örneklerde iki farklı qRT-PCR yöntemi ile elde edilen sonuçlar birbirlerini doğrular niteliktedir. Ancak elde edilen kat farkları incelendiğinde SYBR Green metodu ile elde edilen kat farklarının daha yüksek olduğu (TaqMan: *Hey1*, 3.30; *Skp2* 8.53; SYBR Green: *Hey1*, 4.39; *Skp2*, 10,57) görülmektedir. Bu farklılıkların muhtemelen TaqMan metodunun SYBR Green metoduna göre daha spesifik olmasından ya da kullanılan kimyasalların her iki yöntemde birbirlerinden farklı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Sonuç olarak, gerek TaqMan gerekse SYBR Green metodunda hem birleştirilmiş, hem de bireysel örneklerde, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda *Hey1*'in down-regüle, *Skp2*'nin ise up-regüle olduğu ortaya konmuştur. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasından elde edilen qRT-PCR sonuçları, *Hey1* ve *Skp2* genlerinin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonuna ilişkin olarak 1120259 numaralı TÜBİTAK projesinde elde edilen mikro-array verilerini doğrular niteliktedir. Yapmış olduğumuz literatür araştırmalarında, farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin fetal akciğer dokusunda *Hey1* ve *Skp2*'nin ekspresyon düzeyleri ve ekspresyon profilleri üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye ulaşılamamıştır. Dolayısıyla sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler özgün bir değer taşımakta olup, konuyla ilgili olarak ileride yapılabilecek çalışmalar için önemli bir referans niteliği taşıyacağı düşünülmektedir.

Hey1 ve *Skp2* genlerinin ekspresyonuna ilişkin olarak var olabilecek bireysel farklılıkları ortaya koyabilmek ve söz konusu genlere ait ekspresyon düzeyleri ile fötüs

ağırlıkları arasında bir ilişki olup olmadığını anlamak amacıyla, bireysel örneklerde SYBR Green qRT-PCR yönteminden yararlanılmıştır. Prof. Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülen 1120259 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında elde edilen veriler *in vitro* embriyo kültürü/embriyo transferi sonucunda elde edilen fötüs ağırlıklarının önemli oranda düşük olduğunu ortaya koymuştur. Sunulan tez çalışmasında fötüs ağırlıkları ile *Hey1* ve *Skp2* gen ekspresyon düzeylerinin ilişkili olup olmadığını anlamak amacıyla gerçekleştirilen korelasyon analizlerinde, *Skp2* gen ekspresyonu ile fötal vücut ağırlığı arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. Buna karşın, *Hey1* gen ekspresyonunun ile fötal vücut ağırlığı arasında pozitif yönde orta düzeyde bir ilişki [korelasyon kat sayısı (r) = 0,784; açıklama kat sayısı (r^2)= 0,62/ % 62] saptanmıştır. Literatürde farklı akciğer gelişim evrelerinde *Hey1* ve *Skp2* gen ekspresyon düzeylerine ilişkin yeterince veri olmaması, sunulan tez çalışmasında Deneme grubunda *Hey1* gen ekspresyon düzeylerinde saptanan azalmanın ne oranda azalan fötüs ağırlıklarından kaynaklandığı konusunun yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu veriler ışığında, ÜYTE uygulamalarının istenmeyen bir sonucu olarak ortaya çıkan düşük doğum ağırlılığının akciğer dokusunda *Hey1* ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında, *Hey1* ve *Skp2* protein ekspresyon düzeylerinde saptanan değişimler, qRT-PCR sonuçları ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte western blot ve qRT-PCR yöntemleri ile elde edilen kat değişim değerlerinin bire bir örtüşmediği görülmektedir. Kat değişimlerinde gözlenen bu farklılıkların, western blot yönteminin qRT-PCR yönteminden daha az duyarlı olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. ELISA ya da mass spektrofotometri temelli kantitatif proteomiks analiz yöntemleri gibi daha duyarlı analiz yöntemleri kullanılarak yapılabilecek olan çalışmaların *Hey1* ve *Skp2* protein düzeyleri arasındaki farklılıkların daha ayrıntılı ve doğru bir şekilde ortaya konmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonlarının transkripsiyonel (mRNA) ve translasyonel (protein) düzeylerde kontrol altında tutulduğu bilinmektedir. Bu nedenle iki yöntemde gözlenen kat değişimi farklarının, post-transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarından kaynaklanmış olabileceği de göz ardı edilmemelidir. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasında Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonuna ilişkin olarak saptanan farklılıkların ortaya çıkmasında, mRNA splicing, mRNA poli-adenilasyonu, mRNA stabilitesi, translasyonun başlatılması ve devamı gibi post-transkripsiyonel regülasyon mekanizmalarından herhangi birinin rol oynayıp oynamadığının araştırılması gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında da kullanılan ve *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen farelere ait fötal akciğer dokusunda oksidan/antioksidan dengesinin bozulduğu ve bunun sonucunda fötal akciğer dokularında oksidatif stresin ortaya çıktığı saptanmıştır (112O259 nolu TÜBİTAK, projesi). Oksidatif stres nedeniyle Notch1 mRNA ekspresyonunun arttığı ve buna bağlı olarak *Hey1* mRNA düzeyinin de arttığı bilinmektedir (Boopathy ve ark 2013). Ayrıca, oksidatif stres kardiyovasküler hastalıklarda da önemli rol oynamaktadır. Nitekim, reaktif oksijen ve nitrik oksit (NO[·]) türleri endotel ve vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu ve gücünü etkilemekte ve vasküler inflamasyonu arttırmaktadır (Jeremy ve ark 1999, Taniyama ve ark 2003). Procaccia ve ark (2015), damar yeniden şekillenmesinde (vasküler remodeling) önemli bir rol oynayan 50kDa'lık Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) bağlayıcı proteinin (EBP50) vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna ve gücüne aracılık ettiğini ortaya koymuşlardır. EBP50, FoxO1'i değrede etmek üzere Skp2 proteinini stabilize eder (Procaccia ve ark 2015, Song ve ark 2015). Skp2'nin substratı FoxO1, manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) ve katalaz gibi iki anahtar antioksidan enzimin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür (Yun ve ark 2014). Bu nedenle, EBP50'nin Skp2-FoxO1 aracılı oksidatif stresi düzenlediği varsayılmaktadır (Procaccia ve ark 2015). Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasında, *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonuna ilişkin olarak Kontrol ve Deneme grupları arasında saptanan farklılıkların ortaya çıkmasında oksidatif stresin her hangi bir rolünün olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Hey ailesi bHLH transkripsiyon faktörleri Notch sinyal yolağının direk hedefleri olup, *Hey1* ve *Hey2* embriyonik vasküler gelişim sürecinde önemli bir rol oynamaktadırlar (Fischer ve ark 2004). Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Hey2* ekspresyonunun eş zamanlı olarak ortadan kalkması durumunda, gebeliğin 9. gününden (E9.5) sonra vasklogenenez şekillenememekte ve ağır bir kanama ile birlikte embriyonik ölümler gözlenirken, sadece *Hey1*'den yoksun farelerde önemli bir gelişimsel kusurun oluşmadığı saptanmıştır (Fischer ve ark, 2004). Bu durum, *Hey1* eksikliğinin dengelenmediğini (kompensasyon) ve tek başına yaşamsal öneme sahip olmayabileceğini göstermektedir (Fischer ve ark, 2004). *Hey1* ve *Hey2* ekspresyonunun eş zamanlı olarak ortadan kalkması durumunda, başlangıçta vasklogenenez etkilenmemiş gibi görünse de embriyo ve yolk sac (yumurta sarı kesesi)'da gelişen ana damarların ya küçük oldukları, ya da hiç olmadıkları görülmüştür. Ayrıca benzer vasküler defektler *Jag1* ve *Notch1* knockout farelerde de görülmüştür (Fischer ve ark, 2004). Aynı araştırmacı grubu tarafından geręekleřtirilen daha sonraki çalışmalarda Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *HeyL* ekspresyonunun eş

zamanlı olarak ortadan kalkması durumunda, ciddi kalp malformasyonlarına neden olduğunu göstermişlerdir (Fischer ve ark, 2007). Ayrıca, *Hey1* ve *HeyL* genlerinin atriyoventriküler kanalın endokardiyumunda *Notch1*, *Notch2* ve *Jag1* ile ko-eksprese edildiklerini göstermişlerdir (Fischer ve ark, 2007). Bu veriler dikkate alındığında, sunulan tez çalışmasında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubuna ait fetal akciğer dokularında *Hey1* mRNA ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azalmış olması dikkat çekicidir. Ayrıca, 112O259 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilen mikroarray analizi, *Hey1* ekspresyon düzeyinin azaldığını ancak *Hey2* ve *HeyL* ekspresyon düzeylerinin değişmediğini göstermiştir. Bu bulgular, embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara ait akciğer dokularında *Hey1* ekspresyon düzeyindeki azalmanın sonucunda ortaya çıkabilecek bir kusurun belki de *Hey2* ve *HeyL* genleri aracılığıyla kompanze edilmiş olabileceğini düşündürmektedir. Endotel hücrelerinde *Hey1* ve *Hey2* ekspresyonunun *Notch1*'e bağımlı olmasına rağmen, her iki genin de *Notch1*'den yoksun fare dokusunda hala düşük seviyelerde eksprese edildiği bilinmektedir (Fischer ve ark, 2004). 112O259 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında gerçekleştirilen mikroarray analiz sonuçları, gerek Notch reseptörleri (*Notch1-4*), gerekse Notch ligandlarının (*Jagged1,2* ve *Dll1,3,4*) ekspresyon düzeylerinin değişmediğini göstermiştir. Dolayısıyla bu bulgular, sunulan tez çalışmasında *Hey1* ekspresyon düzeyindeki azalmanın Notch sinyal yolağından bağımsız bir biçimde farklı moleküler/hücrel mekanizmalarla ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim TGF-beta ve BMP sinyal yollarının Notch ile koordineli bir biçimde, anjiyogenez sırasında endotel hücrelerinde *Hey* gen ekspresyonunun belirlenmesinde rol oynayabilmektedir (Beets ve ark, 2013). Sunulan tez çalışmasında *Hey1* gen ekspresyonunda görülen azalmanın TGF-beta ve BMP sinyal yolları ile ilişkili olup olmadığının ileride yapılabilecek çalışmalarda incelenmesi gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Skp2*'nin de ekspresyon düzeyi incelenmiş ve Deneme grubunu oluşturan bireylerde *Skp2* protein ve mRNA ekspresyonlarının önemli düzeyde artmış olduğu saptanmıştır. *p21^{waf1 / cip1}* (*Cdkn1a*), *Skp2*'nin bir substratıdır (Bornstein ve ark, 2003; Wang ve ark, 2011). *Skp2*'nin başka bir substratı olan *p27^{kip1}* (*Cdkn1b*)'nin transkripsiyonel olarak baskılanması, *p27* promoter bölgesinin *Hey2* proteini ile doğrudan etkileşime girmesi sonucunda gerçekleşmektedir (Gridley, 2007). 112O259 nolu TÜBİTAK Projesi kapsamında gerçekleştirilen analizlerde *p21^{waf1 / cip1}* (*Cdkn1a*) transkript düzeyinin azaldığı (mikroarray analizi ve qRT-PCR sonuçları), *p27^{kip1}* (*Cdkn1b*) ve *Hey2*'nin transkript düzeylerinin ise değişmediği (mikroarray

analizi sonuçları) saptanmıştır. Dolayısıyla, Skp2 ile substratları (p21 ve p27) ve Hey1'in Hey2 ilişkileri düşünüldüğünde, sunulan tez çalışmasında *Hey1* ekspresyonunun azalıyor; *Skp2* ekspresyonunun ise artıyor olmasının altında yatan karmaşık mekanizmaların aydınlatılabilmesi için ileride yapılması düşünülen çalışmalarda *Hey2* ve *p27^{kip1}* (*Cdkn1b*) ekspresyon düzeylerinin de araştırılarak, qRT-PCR ile doğrulanması ve *in vitro* embriyo kültürüne bağlı olarak Hey1 ve Skp2 ekspresyonları üzerinde herhangi bir etkilerinin olup olmadığının ortaya konması gerekmektedir.

Skp2, SCF^{Skp2} E3 ubiquitin ligaz kompleksinin F-box komponentini oluşturmaktadır (Nakayama ve ark, 2004). SCF^{Skp2} E3 ubiquitin ligaz kompleksi, değişmez bir adaptör protein (*Skp1*), RING finger proteini (*Rbx1*), Scaffold proteini (*Cullin1*) ve reseptör protein olarak işlev gören değiştirilebilir bir F-box proteini (*Skp2*) olmak üzere dört bileşenden oluşmaktadır (Wang ve ark, 2011; 2012). SCF^{Skp2} E3 ubiquitin ligaz kompleksi, *Skp2* eşliğinde ubiquitinlenen substratların 26S-proteozom aracılığı ile degradasyonunu sağlamaktadır (Wang ve ark, 2011; 2012). 112O259 nolu TÜBİTAK Projesi kapsamında gerçekleştirilen mikroarray analizlerinde, *Skp1*, *Rbx1* ve *Cullin* genlerinin ekspresyon düzeylerinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Ancak, elde edilen sonuçların qRT-PCR ile doğrulanması ve ilgili genlerin sunulan tez çalışmasında *Skp2* up-regülasyonu ile bir ilgilerinin olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

Skp2, bir E3 ubiquitin ligaz olup hücre döngüsü sürecinde son derece önemli bir işleve sahiptir (Huang ve ark, 2017). Normal şartlarda Skp2 hücre döngüsünde G1-S geçişini, p27 (hücre döngüsü inhibitörü) gibi G1 regülatörlerini kontrol altında tutarak düzenlemektedir (Latres ve ark, 2001). Başka bir ifadeyle, bir F-box proteini olan Skp2, memeli hücrelerinde proliferasyonun ana inhibitörü olan p27'nin ubiquitine bağımlı degradasyonuna katkıda bulunarak hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Carrano ve ark, 1999; Sutterluty ve ark, 1999; Tsvetkov ve ark, 1999; Nakayama ve ark, 2000). Skp2 hücre döngüsünün G1 fazında birikmeye başlar ve yoğunluğu S ve G2 fazları boyunca maksimum düzeye ulaşır (Zhang ve ark, 1995; Hara ve ark, 2001; Nakayama ve ark, 2004). Gerek hücre proliferasyonu, gerekse tümör oluşum süreçlerinde hücre döngüsündeki kritik işlevlerinden (Chan ve ark, 2010a) dolayı, *Skp2* ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin önemli bazı sonuçlarının olacağı kabul edilmektedir. Sunulan tez çalışmasında fetal akciğer dokuları hücre proliferasyonunun fazla olduğu bir dönemde (E18.5) izole edilmişlerdir. Tüm bu veriler dikkate alındığında, sunulan tez çalışmasında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda gözlenen *Skp2*

ekspresyonunun önemli derecede artmasının, hücre proliferasyonunu etkileyip etkilemediğinin ya da hücre siklusu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir. Ayrıca, Skp2'nin hedefleri arasında p21 ve p27'nin yanı sıra, p57, p130, Tob1, FOXO1 ve c-Myc gibi substratlar da yer almaktadır (Wang ve ark, 2011; 2012). Skp2'den yoksun farelerde, p21, p27, p57, p130 ve c-Myc gibi hücre döngüsü düzenleyicilerinin ekspresyon düzeylerinin arttığı bilinmektedir (Nakayama ve ark, 2000; Tedesco ve ark, 2002; Bornstein ve ark, 2003; Kamura ve ark, 2003; Yada ve ark, 2004). Bir bütün olarak ele alındığında, 112O259 nolu TÜBİTAK Projesi kapsamında gerçekleştirilen mikroarray analizlerinde, Skp2 substratları olan hücre döngüsü regülatörlerinden *p21* (qRT-PCR ile de doğrulanmıştır) ve *Tob1* transkript düzeylerinin azaldığı; *p27*, *p57*, *p130*, *Tob1*, *FOXO1* ve *c-Myc* transkript düzeylerinin ise değişmediği saptanmıştır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasında Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deneme grubunda Skp2 ekspresyon düzeylerinin arttığı dikkate alındığında ileride yapılması planlanan çalışmalarda *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak Skp2'nin spesifik substratlarından p27, p57, p130, Tob1, FOXO1 ve c-Myc'nin ekspresyon düzeylerine yönelik elde edilen mikroarray sonuçlarının qRT-PCR ile doğrulanması gerekmektedir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara ait akciğer dokularında Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonlarının değiştiğini ortaya koymaktadır. Yukarıda tartışılan tüm durumlardan bağımsız olarak, Kontrol grubu ile kıyaslandığında, Deneme grubuna ait fötusların akciğer dokularında *Hey1* transkript düzeyinde saptanan azalmanın ve *Skp2* transkript düzeyinde saptanan artışın akciğer gelişim geriliğinden kaynaklanmış olabileceği de dikkate alınmalıdır. *Hey1* (Fischer ve Gessler, 2007) ve *Skp2* (Sarmiento ve ark 2005; Dohda ve ark 2007; Del Debbio ve ark 20016; Abad ve ark, 2017) genlerinin, Notch sinyal yolağı hedef genlerinden oldukları bilinmektedir. Ancak, sunulan tez çalışmasında, 112O259 nolu TÜBİTAK Projesi kapsamında gerçekleştirilen mikroarray analizlerinde Notch reseptör ve ligandlarının etkilenmemiş oldukları dikkate alındığında, Kontrol grubu ile kıyaslandığında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara ait akciğer dokularında *Hey1* protein ve mRNA düzeylerinde saptanan azalma ile *Skp2* protein ve mRNA düzeylerinde saptanan artışın, Notch sinyal yolağından bağımsız olarak ortaya çıkmış olabileceği dikkate alınmalıdır. Başka bir ifadeyle, *Hey1* protein ve mRNA düzeylerinde saptanan azalma ve *Skp2* protein ve mRNA düzeylerinde saptanan artışın, özellikle *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi uygulamalarının etkisine bağlı olarak, farklı

moleküler/hücrel mekanizmalarla ortaya çıkmış olabileceği düşünölmektedir. Ayrıca, sunulan tez çalışmasında fötal dönemde Hey1 transkript düzeyinde saptanan azalmanın ve Skp2 transkript düzeyinde saptanan artışın, erişkin dönemde devam edip etmediğinin de incelenmesi gerekmektedir. Yapmış olduğumuz literatür taramalarında konuyla ilgili bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasından elde edilen verilerin konuyla ilgili literatüre özgün ve önemli bir katkı sağladığı düşünölmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Akciğer gelişiminde embriyonik akciğer tomurcuklarının dallanması, vaskülarizasyon, anjiyogenezis ve alveolarizasyon olmak üzere dört önemli süreç rol oynamaktadır. Ayrıca, solunum yolu epitelinin döşeyen hücrelerin sayısı ve oranlarının doğru bir şekilde ortaya çıkması gerekmektedir. Alveolar hücreler ve vasküler endotel hücreler arasındaki bağlantıların bir düzen içinde sağlanması gerekmektedir. Bütün bu süreçlerin işleyişinin herhangi bir şekilde bozulması, erken ölümlere ve solunum yetersizliklerine neden olabilmekte ve birey, kronik astım, kronik bronşit, kistik fibroz, obstrüktif akciğer hastalığı ve kanser gibi solunum yolu hastalıklarına duyarlı hale gelebilmektedir.

Son yıllarda, Notch sinyal yolağının akciğer patolojisini düzenlemesinin yanı sıra, akciğer gelişimini de regüle ettiği kabul edilmektedir. Gelişen akciğer dokusunda, Notch sinyal yolağı öncelikle erken-proksimal hücre kaderinin belirlenmesinde, daha sonra ise solunum yolu epitel hücre farklılaşmasının düzenlenmesinde ve alveolar gelişimin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Sunulan tez çalışması, ÜYTE yöntemlerinden *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi işlemlerinin fetal akciğer dokusunda Notch sinyal yolağı hedef genlerinden *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler, farklı düzeylerde olmakla birlikte *Hey1* ve *Skp2*'nin Kontrol ve Deneme gruplarına ait fetal akciğer dokularında eksprese edildiğini göstermiştir. İmmunohistokimya/immunofloresan analiz sonuçları, *Hey1* ve *Skp2* ekspresyon profillerinin Kontrol ve Deneme gruplarında benzer olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşın, Western blot ve qRT-PCR analizlerinden elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin *Hey1* ve *Skp2* ekspresyon düzeyleri üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Mevcut literatürde, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda *Hey1* ve *Skp2* genlerinin ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair bir bilgiye rastlanmamıştır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasından elde edilen verilerin konu ile ilgili literatüre özgün ve önemli bir katkı sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transfer işlemleri ile elde edilen fütüslara ait akciğer dokusunda *Hey1* ve *Skp2* ekspresyonuna ilişkin olarak saptamış olduğumuz değişimlerin herhangi bir fonksiyonel sonuca neden olup olmadığının araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abad M, Hashimoto H, Zhou H, Morales MG, Chen B, Bassel-Duby R, Olson EN.** Notch inhibition enhances cardiac reprogramming by increasing Mef2c transcriptional activity. *Stem Cell Reports* 2017, 8(3), 548-560.
- Adler SH, Chiffoleau E, Xu L, Dalton NM, Burg JM, Wells AD, Wolfe MS, Turka LA, Pear WS.** Notch signaling augments T cell responsiveness by enhancing CD25 expression. *Journal of Immunology* 2003, 171(6), 2896-903.
- Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR.** A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2015, 13, 37.
- Alukal JP, Lipshultz LI.** Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of in vitro fertilization techniques. *Nature Clinical Practice Urology* 2008, 5, 140-50.
- Amsen D, Antov A, Jankovic D, Sher A, Radtke F, Souabni A, Busslinger M, McCright B, Gridley T, Flavell RA.** Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 2007, 27(1), 89-99.
- Amy RW, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM.** Postnatal growth of the mouse lung. *Journal of Anatomy* 1977, 124, 131-51.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ.** Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 1999, 284, 770-776.
- Bae S, Bessho Y, Hojo M, Kageyama R.** The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development* 2000, 127(13), 2933-2943.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C.** Fetal origins of adult disease: Strength of effects and biological basis. *International Journal of Epidemiology* 2002, 31(6), 1235-1239.
- Barker DJ.** The origins of the developmental origins theory, *Journal of Internal Medicine* 2007, 261,412-417.
- Barsi JC, Rajendra R, Wu JI, Artzt K.** Mind bomb1 is a ubiquitin ligase essential for mouse embryonic development and Notch signaling. *Mechanisms of Development* 2005 122(10),1106-1117.
- Basatemur E, Sutcliffe A.** Follow-up of children born after ART. *Placenta* 2008, 29, 135-140.

- Beets K, Huylebroeck D, Moya IM, Umans L, Zwijsen A.** Robustness in angiogenesis: Notch and BMP shaping waves. *Trends in Genetics* 2013, 29(3), 140-9.
- Ben-Izhak O, Lahav-Baratz S, Meretyk S, Ben-Eliezer S, Sabo E, Dirnfeld M, Cohen S, Ciechanover A.** Inverse relationship between Skp2 ubiquitin ligase and the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 in prostate cancer. *Journal of Urology* 2003, 170, 241-245.
- Bergmann RL, Richter R, Bergmann KE, Dudenhausen JW.** The prevalence of preterm deliveries in Berlin has not changed over 7 years: the impact of multiple births. *Journal of Perinatal Medicine* 2004, 32, 234–239.
- Bessho Y, Miyoshi G, Sakata R, Kageyama R.** Hes7: a bHLH-type repressor gene regulated by Notch and expressed in the presomitic mesoderm. *Genes to Cells* 2001, 6(2), 175-185.
- Bhattacharya J.** Alveolocapillary cross-talk: Giles F. Filley lecture. *Chest* 2005, 128(6), 553S–555S.
- Bloom J, Pagano M.** Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Seminars in Cancer Biology* 2003, 13, 41-47.
- Boopathy AV, Pendergrass KD, Che PL, Yoon YS, Davis ME.** Oxidative stress-induced Notch1 signaling promotes cardiogenic gene expression in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy* 2013, 4(2), 43.
- Borggreffe T, Oswald F.** The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cellular and Molecular Life Science* 2009, 66(10), 1631-1646.
- Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A.** Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *The Journal of Biological Chemistry* 2003, 278, 25752-25757.
- Boyden, EA.** The mode of origin of pulmonary acini and respiratory bronchioles in the fetal lung. *The American Journal of Anatomy* 1974, 141, 317-328.
- Bray SJ.** Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006, 7, 678-689.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israël A.** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell* 2000, 5, 207-216.
- Burri PH.** Fetal and Postnatal Development of the Lung. *Annual Review of Physiology* 1984, 46, 617-628.
- Burri PH.** Structurel Aspects of Postnatal Lung Development-Alveolar Formation and Growth. *Biology of the Neonate* 2006, 89(4), 313-322.

Cardoso WV, Lü J. Regulation of early lung morphogenesis: questions, facts and controversies. *Development* 2006, 133, 1611-1624.

Carlson TR, Yan Y, Wu X, Lam MT, Tang GL, Beverly LJ, Messina LM, Capobianco AJ, Werb Z, Wang R. Endothelial expression of constitutively active Notch4 elicits reversible arteriovenous malformations in adult mice. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America* 2005, 102(28), 9884-9889.

Carrano AC, Eytan E, Hershko A, Pagano M. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nature Cell Biology* 1999, 1, 193-199.

Carson C, Sacker A, Kelly Y, Redshaw M, Kurinczuk JJ, Quigley MA. Asthma in children born after infertility treatment: Findings from the UK Millennium Cohort Study. *Human Reproduction* 2013, 28(2), 471-479.

Ceelen M, van-Weissenbruch MM, Vermeiden JP, van-Leeuwen FE, Delemarre-van de Waal HA. Growth and development of children born after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2008, 90(5), 1662-1673.

Chan CH, Lee SW, Li CF, Wang J, Yang WL, Wu CY, Wu J, Nakayama KI, Kang HY, Huang HY, Hung MC, Pandolfi PP, Lin HK. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nature Cell Biology* 2010b, 12, 457-467.

Chan CH, Lee SW, Wang J, Lin HK. Regulation of Skp2 Expression and Activity and Its Role in Cancer Progression. *The Scientific World Journal*, 2010a, 10, 1001-1015.

Chao CM, El Agha E, Tiozzo C, Minoo P, Bellusci S. A breath of fresh air on the mesenchyme: impact of impaired mesenchymal development on the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Frontiers in Medicine (Lausanne)* 2015, 2, 27.

Cloonan YK, Holt VL, Goldberg J. Male factor infertility: A twin study. *Paediatric and perinatal epidemiology* 2007, 21(3), 229-234.

Cohen B, Shimizu M, Izrailit J, Ng NF, Buchman Y, Pan JG, Dering J, Reedijk M. Cyclin D1 is a direct target of JAG1-mediated Notch signaling in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* 2010, 123(1), 113-124.

Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2001, 280, L823-L838.

- Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B.** Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *The American Journal of Human Genetics* 2002, 71(1), 162-164.
- Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer, MJ.** Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. *Circulation* 1996, 94(12), 3246-3250.
- Çetinkaya F, Gelen SA, Kervancioglu E, Oral E.** Prevalence of asthma and other allergic diseases in children born after in vitro fertilisation. *Allergologia et Immunopathologia* 2009, 37, 11-13.
- D'Souza B, Meloty-Kapella L, Weinmaster G.** Canonical and non-canonical Notch ligands. *Current Topics in Developmental Biology* 2010, 92, 73-129.
- D'Souza B, Miyamoto A, Weinmaster G.** The many facets of Notch ligands. *Oncogene* 2008, 27, 5148-5167.
- Daltveit AK, Vollset SE, Skjaerven R, Irgens LM.** Impact of multiple births and elective deliveries on the trends in low birth weight in Norway, 1967–1995. *American Journal of Epidemiology* 1999, 149, 1128-1133.
- Dang TP, Eichenberger S, Gonzalez A, Olson S, Carbone DP.** Constitutive activation of Notch3 inhibits terminal epithelial differentiation in lungs of transgenic mice. *Oncogene* 2003, 22(13), 1988-1997.
- Davies G, Reid L.** Growth of the alveoli and pulmonary arteries in childhood. *Thorax*. 1970, 25(6), 669-681.
- De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R.** A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 1999, 398, 518-522.
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg, AP.** Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *The American Journal of Human Genetics* 2003, 72(1), 156-160.
- Deftos ML, He YW, Ojala EW, Bevan MJ.** Correlating notch signaling with thymocyte maturation. *Immunity* 1998, 9(6), 777-786.
- Deftos ML, Huang E, Ojala EW, Forbush KA, Bevan MJ.** Notch1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 SP thymocytes. *Immunity* 2000, 13(1), 73-84.

- Del Debbio, C. B., Mir, Q., Parameswaran, S., Mathews, S., Xia, X., Zheng, L., Neville AJ , Ahmad, I.** Notch Signaling Activates Stem Cell Properties of Müller Glia through Transcriptional Regulation and Skp2-mediated Degradation of p27Kip1. *PLoS One*, 2016, 11(3), e0152025.
- DeLisser HM1, Helmke BP, Cao G, Egan PM, Taichman D, Fehrenbach M, Zaman A, Cui Z, Mohan GS, Baldwin HS, Davies PF, Savani RC.** Loss of PECAM-1 function impairs alveolarization. *The Journal of Biological Chemistry* 2006, 31;281(13), 8724-8731.
- DeMello DE, Sawyer D, Galvin N, Reid LM.** Early fetal development of lung vasculature. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1997, 16(5), 568-581.
- Demetrick DJ, Zhang H, Beach DH.** Chromosomal mapping of the genes for the human CDK2/cyclin A-associated proteins p19 (SKP1A and SKP1B) and p45 (SKP2). *Cytogenetics and Cell Genetics*, 1996, 73(1-2), 104-107.
- Doğan G.** Farelerde in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi, *Sağlık Bilimler Enstitüsü, Aydın*, 2014, 57.
- Dohda T, Maljukova A, Liu L, Heyman M, Grandér D, Brodin D, Sangfelt O, Lendahl U.** Notch signaling induces SKP2 expression and promotes reduction of p27Kip1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Experimental Cell Research* 2007, 313(14), 3141-3152.
- Domenga V, Fardoux P, Lacombe P, Monet M, Maciazek J, Krebs LT, Klonjowski B, Berrou E, Mericskay M, Li Z, Tournier-Lasserre E, Gridley T, Joutel A.** Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes and Development* 2004, 18(22), 2730-2735.
- Drobnjak M, Melamed, J, Taneja S, Melzer, K, Wieczorek R, Levinson B, Zeleniuch-Jacquotte A, Polsky D, Ferrara J, Perez-Soler R, Cordon-Cardo C, Pagano M, Osman I.** Altered expression of p27 and Skp2 proteins in prostate cancer of African-American patients. *Clinical Cancer Research* 2003, 9, 2613-2619.
- Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, Costa L, Henrique D, Rossant J.** Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes and Development* 2004, 18(20), 2474-2478.
- Dunnill MS.** Postnatal growth of the lung. *Thorax* 1962, 17, 329-333.

Eblaghie MC, Reedy M, Oliver T, Mishina Y, Hogan BL. Evidence that autocrine signaling through Bmpr1a regulates the proliferation, survival and morphogenetic behavior of distal lung epithelial cells. *Developmental Biology* 2006, 291, 67-82.

Emery JL, Wilcock PF. The postnatal development of the lung. *Acta Anatomica* 1966, 65, 10-29.

Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, Källén B. Hospital care utilization of infants born after IVF. *Human Reproduction* 2002, 17(4), 929-932.

ESHRE. ART fact sheet (February 2018).
file:///C:/Users/User/Downloads/ART%20fact%20sheet_vFebr18_VG%20(1).pdf 2018 (25 October, 2018, date last accessed).

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL. Genomic imprinting: implications for human disease. *The American journal of pathology* 1999, 154(3), 635-647.

Fang TC, Yashiro-Ohtani Y, Del Bianco C, Knoblock DM, Blacklow SC, Pear WS. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 2007, 27(1), 100-110.

Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA. Development of fetuses from in vitro-produced and cloned bovine embryos. *Journal of Animal Science* 2004, 82(13), E53-E62.

Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Gutiérrez-Adán A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction* 2008, 78(4), 761-772.

Fernando D, Halliday JL, Breheny S, Healy DL. Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility* 2012, 97(3), 579-584.

Feuer SK, Rinaudo PF. Physiological, metabolic and transcriptional postnatal phenotypes of in vitro fertilization (IVF) in the mouse. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease* 2017, 8(4), 403-410.

Fischer A, Gessler M. Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(14): 4583-4596.

Fischer A, Gessler M. Hey genes in cardiovascular development. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2003, 13(6), 221-226.

Fischer A, Leimeister C, Winkler C, Schumacher N, Klamt B, Elmasri H, Steidl C, Maier M, Knobloch KP, Amann K, Helisch A, Sendtner M, Gessler M. Hey bHLH

factors in cardiovascular development. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2002, 67, 63-70.

Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes and Development* 2004, 18(8), 901-911.

Fischer A, Steidl C, Wagner TU, Lang E, Jakob PM, Friedl P, Knobloch KP, Gessler M. Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. *Circulation Research* 2007, 100(6), 856-863.

Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993, 99(2), 673-679.

Fountain C, Zhang Y, Kissin DM, Schieve LA, Jamieson DJ, Rice C, Bearman P. Association between assisted reproductive technology conception and autism in California, 1997–2007. *American Journal of Public Health* 2015, 105(5), 963-971.

Frescas D, Pagano M. Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2008, 8, 438-449.

Fronius Martin, Clauss Wolfgang, Althaus Mike. Why do we have to move fluid to be able to breathe? *Frontiers in Physiology*, 2012, 3, 146.

Fryer CJ, White JB, Jones KA. Mastermind recruits CycC: CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and co-ordinate activation with turnover. *Molecular Cell* 2004, 16(4), 509-520.

Fukuchi M, Masuda N, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. Inverse correlation between expression levels of p27 and the ubiquitin ligase subunit Skp2 in early esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 2004, 24, 777-783.

Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, Murphy AJ, Adams NC, Lin HC, Holash J, Thurston G, Yancopoulos GD. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101(45), 15949-15954.

Ganoth D, Bornstein G, Ko TK, Larsen B, Tyers M, Pagano M, Hershko A. The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nature Cell Biology* 2001, 3, 321-324.

Gardner DK, Lane M, Culture of the Mammalian Preimplantation Embryo, ed: Gardner DK, Lane M, Watson AJ. In: A Laboratory Guide To The Mammalian Embryo, *Oxford University Press, New York*, 2004.

Getahun D, Demissie K, Lu SE, Rhoads GG. Sudden infant death syndrome among twin births: United States, 1995–1998. *Journal of Perinatology* 2004, 24, 544-551.

Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCNQ1OT gene. *American journal of human genetics* 2003, 72(5), 1338.

Giritharan G, Talbi S, Donjacour A, Di Sebastiano F, Dobson AT, Rinaudo PF. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction* 2007, 134(1), 63-72.

Gridley T. Notch signaling in the vasculature. *Current Topics in Developmental Biology* 2010, 92, 277-309.

Gridley T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development* 2007, 134(15), 2709-2718.

Gstaiger M, Jordan R, Lim M, Catzavelos C, Mestan J, Slingerland J, Krek W. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001 98, 5043-5048.

Guan AL, He T, Shao YB, Chi YF, Dai HY, Wang Y, Xu L, Yang X, Ding HM, Cai SL. Role of Jagged1-Hey1 Signal in Angiotensin II-induced Impairment of Myocardial Angiogenesis. *Chinese Medical Journal (Engl)* 2017, 130(3), 328-333.

Guibas GV, Moschonis G, Xepapadaki P, Roumpedaki E, Androutsos O, Manios Y, Papadopoulos NG. Conception via in vitro fertilization and delivery by Caesarean section are associated with paediatric asthma incidence. *Clinical and Experimental Allergy* 2013, 43, 1058-1066.

Guibas, GV, Moschonis, G, Xepapadaki P, Roumpedaki E, Androutsos O, Manios Y, Papadopoulos, NG. PD44-In vitro fertilisation is positively associated with prevalence of asthma in childhood. *Clinical and Translational Allergy* 2014, 4, P44

Guo D, Ye J, Dai J, Li L, Chen F, Ma D, Ji C. Notch-1 regulates Akt signaling pathway and the expression of cell cycle regulatory proteins cyclin D1, CDK2 and p21 in T-ALL cell lines. *Leukemia Research* 2009, 33(5), 678-685.

Guseh JS, Bores SA, Stanger BZ, Zhou Q, Anderson WJ, Melton DA, Rajagopal J. Notch signaling promotes airway mucous metaplasia and inhibits alveolar development. *Development* 2009, 136(10), 1751-1759.

Hara T, Kamura T, Nakayama K, Oshikawa K, Hatakeyama S, Nakayama KI. Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 2001, 276, 48937-48943.

Harper, JW. Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Current Biology* 2001, 11, R431-R435.

Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biology of Reproduction* 2004, 71(4), 1108-1119.

Hediger ML, Bell EM, Druschel CM, Louis GMB. Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertility and sterility* 2013, 99(2), 311-317.

Herreman A, Hartmann D, Annaert W, Saftig P, Craessaerts K, Serneels L, Umans L, Schrijvers V, Checler F, Vanderstichele H, Baekelandt V, Dressel R, Cupers P, Huylebroeck D, Zwijsen A, Van Leuven F, De Strooper B. Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(21):11872-11877.

Hozumi K, Negishi N, Tsuchiya I, Abe N, Hirano K, Suzuki D, Yamamoto M, Engel JD, Habu S. Notch signaling is necessary for GATA3 function in the initiation of T cell development. *European Journal of Immunology* 2008, 38(4), 977-985.

Huang T, Yang L, Wang G, Ding G, Peng B, Wen Y, Wang Z. Inhibition of Skp2 sensitizes lung cancer cells to paclitaxel. *Onco Targets and Therapy* 2017, 10, 439-446.

Huppert SS, Le A, Schroeter EH, Mumm JS, Saxena MT, Milner LA, Kopan R. Embryonic lethality in mice homozygous for a processing-deficient allele of Notch1. *Nature* 2000, 405(6789), 966-970.

Hussain M, Xu C, Ahmad M, Yang Y, Lu M, Wu X, Tang L, Wu Ximei. Notch signaling and asthmatic airway remodeling. *Molecular Pharmacology* 2017, 92 (6), 676-693.

Hvidtjørn D, Grove J, Schendel DE, Vaeth M, Ernst E, Nielsen LF, Thorsen P. Cerebral palsy among children born after in vitro fertilization: the role of preterm delivery--a population-based, cohort study. *Pediatrics* 2006, 118 (2), 475-482.

Ilgan MX, Kopan R. SnapShot: notch signaling pathway. *Cell* 2007, 128, 1246.

Imaizumi Y. Perinatal mortality in single and multiple births in Japan, 1980-1991. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 1994, 8, 205-215.

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update* 2015, 21(4), 411-426.

Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: Multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 2003, 194, 237-255.

Iso T, Sartorelli V, Chung G, Shichinohe T, Kedes L, Hamamori Y. HERP, a new primary target of Notch regulated by ligand binding. *Molecular and Cellular Biology* 2001a, 21 (17), 6071-6079.

Iso T, Sartorelli V, Poizat C, Iezzi S, Wu HY, Chung G, Kedes L, Hamamori Y. HERP, a novel heterodimer partner of HES/E(spl) in Notch signaling. *Molecular and Cellular Biology* 2001b, 21(17), 6080-6089.

Ito T, Udaka N, Yazawa T, Okudela K, Hayashi H, Sudo T, Guillemot F, Kageyama R, Kitamura H. Basic helix-loop-helix transcription factors regulate the neuroendocrine differentiation of fetal mouse pulmonary epithelium. *Development* 2000, 127(18), 3913-3921.

Izon DJ, Aster JC, He Y, Weng A, Karnell FG, Patriub V, Xu L, Bakkour S, Rodriguez C, Allman D, Pear WS. Deltex1 redirects lymphoid progenitors to the B cell lineage by antagonizing Notch1. *Immunity* 2002, 16, 231-243.

Jäderberg I, Thomsen SF, Kyvik KO, Skytthe A, Backer V. Atopic diseases in twins born after assisted reproduction. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 2012, 26(2), 140-145.

Jarriault S, Brou C, Logeat F, Schroeter EH, Kopan R, Israel A. Signaling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995, 377, 355–358.

Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular Research*, 1999, 43(3), 580–594.

Jin J, Cardozo T, Lovering RC, Elledge SJ, Pagano M, Harper JW. Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes and Development* 2004, 18, 2573-2580.

Kageyama R, Ohtsuka T. The Notch-Hes pathway in mammalian neural development. *Cell Research* 1999, 9, 179-188

Kalinichenko VV, Gusarova GA, Kim IM, Shin B, Yoder HM, Clark J, Sapozhnikov AM, Whitsett JA, Costa RH. Foxfl1 haploinsufficiency reduces Notch-2 signaling during mouse lung development. *American Journal of Physiology Lung Cell Molecular Physiology* 2004, 286(3), L521-L530.

- Källén AJ, Finnström OO, Lindam AP, Nilsson EM, Nygren KG, Olausson PM.** Cerebral palsy in children born after in vitro fertilization. Is the risk decreasing? *European Journal of Paediatric Neurology* 2010, 14(6), 526-530.
- Källén B, Finnström O, Nygren KG, Olausson PO.** In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods. *Fertility and Sterility* 2005, 84(3), 611-617.
- Källén B, Finnström O, Nygren KG, Otterblad Olausson P.** Asthma in Swedish children conceived by in vitro fertilisation. *Archives of Disease in Childhood* 2013, 98, 92-96.
- Kamel RM.** Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *Journal of Reproduction and Infertility* 2013, 14, 3, 96-109.
- Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama S, Nakayama K, Nakayama KI.** Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(18), 10231-10236.
- Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahceci M.** Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes. *Reproductive Biomedicine Online*. 2004, 9, 409-417.
- Katari S, Turan N, Bibikova M, Erinle O, Chalian R, Foster M, Gaughan JP, Coutifaris C, Sapienza Carmen.** DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. *Human Molecular Genetics*. 2009, 18, 3769-3778.
- Katoh M, Katoh M.** Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent HES1, HES3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent HES1, HES5, HEY1, HEY2, HEYL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *International Journal of Oncology*, 2007, 31, 461-466.
- Kellesarian SV, Yunker M, Malmstrom H, Almas K, Romanos GE, Javed F.** Male infertility and dental health status: A systematic review. *American Journal of Men's Health*. 2016, 12(6), 1976-1984.
- Kitagawa M, Lee SH, McCormick F.** Skp2 suppresses p53-dependent apoptosis by inhibiting p300. *Molecular Cell* 2008, 29, 217-231.
- Klemetti R, Sevón T, Gissler M, Hemminki E.** Health of children born as a result of in vitro fertilization. *Pediatrics* 2006, 118(5), 1819-1827.

- Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Järvelin MR.** Post-neonatal hospitalization and health care costs among IVF children: a 7-year follow-up study. *Human reproduction* 2007, 22(8), 2136-2141.
- Koivurova S, Hartikainen AL, Gissler M, Hemminki E, Sovio U, Järvelin MR.** Neonatal outcome and congenital malformations in children born after in-vitro fertilization. *Human reproduction* 2002, 17(5), 1391-1398.
- Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL.** Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Developmental Biology* 2005, 278(2), 301-309.
- Komarova Y, Malik AB.** Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annual Review of Physiology* 2010,72, 463-493.
- Kondapalli LA, Perales-Puchalt A.** Low birth weight: is it related to assisted reproductive technology or underlying infertility? *Fertility and sterility* 2013, 99(2), 303-310.
- Kong Y, Glickman J, Subramaniam M, Shahsafaie A, Allamneni KP, Aster JC, Sklar J, Sunday ME.** Functional diversity of notch family genes in fetal lung development. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2004, 286(5), L1075-L1083.
- Koo BK, Lim HS, Song R, Yoon MJ, Yoon KJ, Moon JS, Kim YW, Kwon MC, Yoo KW, Kong MP, Lee J, Chitnis AB, Kim CH, Kong YY.** Mind bomb 1 is essential for generating functional Notch ligands to activate Notch. *Development* 2005, 132(15), 3459-3470.
- Koyano-Nakagawa N, Kim J, Anderson D, Kintner C.** Hes6 acts in a positive feedback loop with the neurogenins to promote neuronal differentiation. *Development*, 2000, 127(19), 4203-4216.
- Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T.** Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes and Development* 2004, 18(20), 2469-2473.
- Krebs LT, Xue Y, Norton CR, Shutter JR, Maguire M, Sundberg JP, Gallahan D, Closson V, Kitajewski J, Callahan R, Smith GH, Stark KL, Gridley T.** Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development* 2000, 14(11), 1343-1352.
- Kumar N, Singh AK.** Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2015, 8(4), 191-196.

- Kwinta P, Pietrzyk JJ.** Preterm birth and respiratory disease in later life. *Expert Review of Respiratory Medicine* 2010, 4, 593-604.
- Kwon SM, Alev C, Lee SH, Asahara T.** The molecular basis of Notch signaling: a brief overview. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2012, 727, 1-14.
- Lai, E.C.** Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*, 2004. 131, 965-973.
- Lamar E, Deblandre G, Wettstein D, Gawantka V, Pollet N, Niehrs C, Kintner C.** Nrarp is a novel intracellular component of the Notch signaling pathway. *Genes and Development* 2001, 15, 1885-1899.
- Lane M, Gardner DK.** Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reproduction, Fertility and Development*. 2005, 17(3), 371-378.
- Langston C, Kida K, Reed M, Thurlbeck WM.** Human lung growth in late gestation and in the neonate. *The American Reviews of Respiratory Disease* 1984, 129, 607-613.
- Latres E, Chiarle R, Schulman BA, Pavletich NP, Pellicer A, Inghirami Gi, Pagano M.** Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America* 2001, 98(5), 2515-2520.
- Laudy JAM, Wladimiroff JW.** The Fetal Lung 1: Developmental Aspects. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2000, 16, 284-290.
- Law BJ, Carbonell-Estrany X, Simoes EAF.** An update on respiratory syncytial virus epidemiology: a developed country perspective. *Respiratory medicine* 2002, 96, S1-S7.
- Lee SH, McCormick F.** Downregulation of Skp2 and p27/Kip1 synergistically induces apoptosis in T98G glioblastoma cells. *Journal of Molecular Medicine* 2005, 83(4), 296-307.
- Lee YM, Cleary-Goldman J, D'Alton ME.** The impact of multiple gestations on late preterm (near-term) births. *Clinics in Perinatology* 2006, 33, 777-792.
- Leibel S, Post M.** Endogenous and Exogenous Stem/Progenitor Cells in the Lung and Their Role in the Pathogenesis and Treatment of Pediatric Lung Disease. *Frontiers in Pediatrics* 2016, 4:36.
- Leimeister C, Externbrink A, Klamt B, Gessler M.** Hey genes: A novel subfamily of hairy- and Enhancer of split-related genes specifically expressed during mouse embryogenesis. *Mechanisms of Development* 1999, 85, 173-177.

- Levy F, Hay D, McLaughlin M, Wood C, Waldman I.** Twin sibling differences in parental reports of ADHD, speech, reading and behaviour problems. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 1996, 37, 569-578.
- Li Q, Murphy M, Ross J, Sheehan C, Carlson JA.** Skp2 and p27kip1 expression in melanocytic nevi and melanoma: an inverse relationship. *Journal of Cutaneous Pathology* 2004, 31, 633-642.
- Li T, Ma G, Cai H, Price DL, Wong PC.** Nicastrin is required for assembly of presenilin/gamma-secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of beta-amyloid precursor protein in mammals. *The Journal of Neuroscienc* 2003, 23(8), 3272-3277.
- Limbourg FP, Takeshita K, Radtke F, Bronson RT, Chin MT, Liao JK.** Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. *Circulation* 2005, 111(14), 1826-1832.
- Lin HK, Wang G, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Liu Y, Chan CH, Yang WL, Erdjument-Bromage H, Nakayama KI, Nimer S, Tempst P, Pandolfi PP.** Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB. *Nature Cell Biology* 2009, 11, 420-432.
- Livak KJ, Schmittgen, TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001, 25(4), 402-408.
- Lu YH, Wang N, Jin F.** Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. *Journal of Zhejiang University Science B* 2013, 14(5), 359-371.
- Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B.** Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *Journal of medical genetics* 2005, 42(4), 289-291.
- Lum S, Kirkby J, Welsh L, Marlow N, Hennessy E, Stocks J.** Nature and severity of lung function abnormalities in extremely pre-term children at 11 years of age. *The European Respiratory Journal* 2011, 37, 1199-207.
- Magee BD.** Role of multiple births in very low birth weight and infant mortality. *The Journal of Reproductive Medicine* 2004, 49, 812-816.
- Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM.** Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *Journal of Medical Genetics* 2003, 40, 62-64.

Maier M, Gessler M. Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000, 275, 652-660.

Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Medicine* 2012, 9(12), e1001356.

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT. Respiratory system. *Veterinary Embryology* 2006. Çelik İ ve Öznurlu Y. Solunum Sistemi. *Veteriner Embriyoloji (Çeviri). Medipres Matbaacılık Ltd. Şti.* Eylül 2011, 235-242

McGovern PG, Llorens AJ, Skurnick JH, Weiss G, Goldsmith LT. Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertility and sterility* 2004, 82(6), 1514-1520.

Metzger RJ, Klein OD, Martin GR, Krasnow MA. The branching programme of mouse lung development. *Nature* 2008, 453, 745-750.

Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, Schouten-van Meeteren AY, Boers M, van Leeuwen FE. Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *The Lancet* 2003, 361(9354), 309-310.

Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human Clinically Oriented Embryology. Yıldırım M, Okan İ, Dalçı H (çeviri editörü) İnsan Embriyolojisi. 6. Baskı, İstanbul, *Nobel Tıp Kitabevleri*, 2002.

Morimoto M, Liu Z, Cheng HT, Winters N, Bader D, Kopan R. Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smooth muscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *Journal of Cell Science* 2010, 123(2), 213-224.

Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental Cell* 2010, 18(1), 8-23.

Mund, SI, Stampanoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung. *Developmental Dynamics* 2008, 237, 2108-2116.

Nakagawa O, McFadden DG, Nakagawa M, Yanagisawa H, Hu T, Srivastava D, Olson EN. Members of the HRT family of basic helix-loop-helix proteins act as transcriptional repressors downstream of Notch signaling. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America* 2000. 97(25), 13655-13660.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Matsumoto M, Nakamichi I, Kitagawa K, Shirane M, Tsunematsu R, Tsukiyama T, Ishida N, Kitagawa M, Nakayama KI,

Hatakeyama S. Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *The EMBO Journal* 2000, 19, 2069-2081.

Nakayama K, Nagahama H, Minamishima YA, Miyake S, Ishida N, Hatakeyama S, Kitagawa M, Iemura S, Natsume T, Nakayama KI. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Developmental Cell*. 2004, 6, 661-672.

Nakayama, KI, Nakayama, K. Regulation of the cell cycle by SCF-type ubiquitin ligases. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 2005,16, 323-333.

National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. *Royal College of Obstetricians and Gynaecologists* 2013, s 427. <https://www.nice.org.uk/guidance/cg156/evidence/full-guideline-188539453> (15.05.2019).

Nayak PK, Mahapatra PC, Mallick JJ, Swain S, Mitra S, Sahoo J. Role of diagnostic hystero-laparoscopy in the evaluation of infertility: A retrospective study of 300 patients. *Journal of human reproductive sciences* 2013, 6(1), 32.

Nishimura M, Isaka F, Ishibashi M, Tomita K, Tsuda H, Nakanishi S, Kageyama R. Structure, chromosomal locus, and promoter of mouse Hes2 gene, a homologue of Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genomics* 1998, 49, 69-75.

Nwaru BI, McCleary N, Erkkola M, Kaila M, Virtanen SM, Sheikh A. Assisted reproductive technology and risk of asthma and allergy in the offspring: protocol for a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016, 6(4), e010697.

Ohtsuka T, Ishibashi M, Gradwohl G, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *The EMBO Journal* 1999, 18(8), 2196-2207.

Okochi M, Steiner H, Fukumori A, Tanii H, Tomita T, Tanaka T, Iwatsubo T, Kudo T, Takeda M, Haass C. Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *The European Molecular Biology Organization Journal* 2002, 21, 5408-5416.

Ooki Syuichi. The Effect of an Increase in the Rate of Multiple Births on Low-Birth-Weight and Preterm Deliveries during 1975–2008. *Journal of Epidemiology* 2010, 20(6), 480-488.

Ordentlich P, Lin A, Shen CP, Blaumueller C, Matsuno K, Artavanis-Tsakonas S, Kadesch T. Notch inhibition of E47 supports the existence of a novel signaling pathway. *Molecular and Cellular Biology* 1998, 18(4), 2230-2239.

- Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K.** Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic sperm injection. *American Journal of Human Genetics* 2003, 72, 218-219.
- Osoegawa A, Yoshino I, Tanaka S, Sugio K, Kameyama T, Yamaguchi M, Maehara Y.** Regulation of p27 by S-phase kinase-associated protein 2 is associated with aggressiveness in non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2004, 22(20), 4165-73.
- Oswald F, Liptay S, Adler G, Schmid RM.** NF-kappaB2 is a putative target gene of activated Notch-1 via RBP-Jkappa. *Molecular and Cellular Biology* 1998, 18, 2077-2088.
- Persson PS, Ahren C, Obrant KO.** Aspiration biopsy smear of testis in azoospermia. Cytological versus histological examination. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 1971, 5(1), 22-26.
- Petcherski AG, Kimble J.** LAG-3 is a putative transcriptional activator in the *C. elegans* Notch pathway. *Nature* 2000a, 405(6784), 364-368.
- Petcherski AG, Kimble J.** Mastermind is a putative activator for Notch. *Current Biology* 2000b, 10(13), R471-R473.
- Petterson B, Nelson KB, Watson L, Stanley F.** Twins, triplets, and cerebral palsy in births in Western Australia in the 1980s. *BMJ (Clinical research ed.)* 1993, 307, 1239-1243.
- Post LC, Ternet M, Hogan BL.** Notch/Delta expression in the developing mouse lung. *Mechanisms of Development* 2000, 98(1-2), 95-98.
- Procaccia V, Leslie KL, Malik EZ, Bisello A.** Ebp50 Regulates Oxidative Stress Through Skp2 and Foxo1. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015, 35, A446.
- Qiu L, Lv J, Chen Y, Wang J, Wu R.** Expression of Skp2 and p27kip1 proteins in hypopharyngeal squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Oncology Letters* 2015, 10(6), 3756-3760.
- Que J, Choi M, Ziel JW, Klingensmith J, Hogan BL.** Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. *Differentiation* 2006, 74, 422-437.
- Que J, Luo X, Schwartz RJ, Hogan BL.** Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development* 2009, 136(11), 1899-1907.
- Rangarajan A, Talora C, Okuyama R, Nicolas M, Mammucari C, Oh H, Aster JC, Krishna S, Metzger D, Chambon P, Miele L, Aguet M, Radtke F, Dotto GP.** Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *The EMBO Journal* 2001, 20(13), 3427-3436.

Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development* 2009, 136, 3741-3745.

Reizis B, Leder P. Direct induction of T lymphocyte-specific gene expression by the mammalian Notch signaling pathway. *Genes and Development* 2002, 16(3), 295-300.

Rock JR, Hogan BLM. Epithelial Progenitor Cells in Lung Development, Maintenance, Repair, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011, 27, 493-512.

Rodríguez-Castillo JA, Pérez DB, Ntokou A, Seeger W, Morty RE, Ahlbrecht K. Understanding alveolarization to induce lung regeneration. *Respiratory Research*. 2018, 19(1), 148.

Ronchini C, Capobianco AJ. Induction of cyclin D1 transcription and CDK2 activity by Notch(ic): implication for cell cycle disruption in transformation by Notch(ic). *Molecular and Cellular Biology* 2001, 21(17), 5925-5934.

Sarmiento LM1, Huang H, Limon A, Gordon W, Fernandes J, Tavares MJ, Miele L, Cardoso AA, Classon M, Carlesso N. Notch1 modulates timing of G1-S progression by inducing SKP2 transcription and p27 Kip1 degradation. *The Journal of Experimental Medicine* 2005, 202(1), 157-168.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: a laboratory manual, (2 nd ed). Volume 3, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, ISBN 0-87969-309-6, Newyork, 1989: 213.

Sasai Y, Kageyama R, Tagawa Y, Shigemoto R, Nakanishi S. Two mammalian helix-loop-helix factors structurally related to Drosophila hairy and Enhancer of split. *Genes and Development* 1992, 6(12B), 2620-2634.

Schachtner SK, Wang Y, Scott Baldwin H. Qualitative and quantitative analysis of embryonic pulmonary vessel formation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2000, 22(2), 157-165.

Schieve LA, Peterson HB, Meikle SF, Jeng G, Danel I, Burnett NM, Wilcox LS. Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *Jama* 1999, 282(19), 1832-1838.

Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstetrics and Gynecology* 2004, 103, 154-163.

Schittny JC, Mund SI, Stampanoni M. Evidence and structural mechanism for late lung alveolarization. *American Journal of Physiology, Lung Cellular and Molecular Physiology* 2008, 294, L246-L254.

Schittny JC. Development of the lung. *Cell and Tissue Research* 2017, 367(3), 427-444.

Selkoe DJ, Wolfe MS. Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 2007, 131, 215-221.

Shevell T, Malone FD, Vidaver J, Porter TF, Luthy DA, Comstock CH, Craigo S. Assisted Reproductive Technology and Pregnancy Outcome. *Obstetrics and Gynecology* 2005, 107(4), 953-954.

Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC, Healy DL, Baker HWG. Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Human reproduction* 2008, 23(7), 1644-1653.

Sicignano N, Beydoun HA, Russell H, Jones H Jr, Oehninger S. A descriptive study of asthma in young adults conceived by IVF. *Reproductive Biomedicine Online* 2010, 21, 812-218.

Song GJ, Leslie KL, Barrick S, Mamonova T, Fitzpatrick JM, Drombosky KW, Peyser N, Wang B, Pellegrini M, Bauer PM, Friedman PA, Mierke DF, Bisello A. Phosphorylation of ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 (EBP50) by Akt promotes stability and mitogenic function of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp2). *The Journal of biological chemistry*, 2015, 290(5), 2879-2887.

Spruck C, Strohmaier H, Watson M, Smith, AP, Ryan A, Krek TW, Reed SI. A CDK independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Molecular Cell* 2001, 7, 639-650.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978, 2(8085), 366.

Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *The Lancet* 2002, 359(9305), 461-465.

Sun Y, Vestergaard M, Christensen J, Zhu JL, Bech BH, Olsen J. Epilepsy and febrile seizures in children of treated and untreated subfertile couples. *Human reproduction* 2007, 22(1), 215-220.

Sutcliffe AG, Ludwig M. Outcome of assisted reproduction. *The Lancet* 2007, 370(9584), 351-359.

- Sutterluty H, Chatelain E, Marti A, Wirbelauer C, Senften M, Muller U, Krek W.** p45SKP2 promotes p27Kip1 degradation and induces S phase in quiescent cells. *Nature Cell Biology* 1999, 1, 207-214.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü.** Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezleri Yönetmeliği 2005.
- Taichman DB, Loomes KM, Schachtner SK, Guttentag S, Vu C, Williams P, Oakey RJ, Baldwin HS.** Notch1 and Jagged1 expression by the developing pulmonary vasculature. *Developmental Dynamics* 2002, 225(2), 166-175.
- Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive Oxygen Species in the Vasculature. Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension*. 2003, 42, 1075-1081.
- Tedesco D, Lukas J, Reed SI.** The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes and Development* 2002, 16, 2946-2957.
- Thurlbeck WM.** Postnatal human lung growth. *Thorax* 1982, 37, 564-571.
- Tompkins DH, Besnard V, Lange AW, Wert SE, Keiser AR, Smith AN, Lang R, Whitsett JA.** Sox2 is required for maintenance and differentiation of bronchiolar Clara, ciliated and goblet cells. *Public Library of Science One* 2009, 4(12), e8248.
- Topp M1, Huusom LD, Langhoff-Roos J, Delhumeau C, Hutton JL, Dolk.** Multiple birth and cerebral palsy in Europe: a multicenter study. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2004, 83(6), 548-553.
- Tsao PN, Chen F, Izvolsky KI, Walker J, Kukuruzinska MA, Lu J, Cardoso WV.** Gamma-secretase activation of notch signaling regulates the balance of proximal and distal fates in progenitor cells of the developing lung. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283(43), 29532-29544.
- Tsao PN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso WV.** Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* 2009, 136(13), 2297-2307.
- Tsvetkov LM, Yeh KH, Lee SJ, Sun H, Zhang H.** p27(Kip1) ubiquitination and degradation is regulated by the SCF(Skp2) complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Current Biology* 1999, 9, 661-664.
- Türk neonatoloji derneği yardımcı üreme teknikleri ve çoğul gebelikler çalışma grubu.** Yardımcı Üreme Tekniklerinin neonatal mortalite ve morbidite üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2010, 53, 258-266.

Uyttendaele H, Ho J, Rossant J, Kitajewski J. Vascular patterning defects associated with expression of activated Notch4 in embryonic endothelium. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of America* 2001, 98(10), 5643-5648.

Valdez R, Athens MA, Thompson GH, Bradshaw BS, Stern MP. Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 1994, 37(6), 624-631.

van Tuyl M, Groenman F, Kuliszewski M, Ridsdale R, Wang J, Tibboel D, Post M. Overexpression of lunatic fringe does not affect epithelial cell differentiation in the developing mouse lung. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005, 288, L672–L682

Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction, *Human Reproduction Update* 2016, 22, 1, 2-22.

Wallberg AE, Pedersen K, Lendahl U, Roeder RG. p300 and PCAF act co-operatively to mediate transcriptional activation from chromatin templates by notch intracellular domains in vitro. *Molecular and Cellular Biology* 2002, 22(22), 7812-7819.

Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, Sellers RS, Nakayama K, Nakayama, KI, Cobrinik D, Zhu L. 2010 Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1^{+/-} mice. *Nature Genetics* 2010, 42, 83-88.

Wang Z, Fukushima H, Inuzuka H, Wan L, Liu P, Gao D, Sarkar FH, Wei W. Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. *Frontiers in Oncology* 2012, 1(57), 57.

Wang Z, Gao D, Fukushima H, Inuzuka H, Liu P, Wan L, Sarkar FH, Wei W. Skp2: a novel potential therapeutic target for prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2011, 1825(1), 11-17.

Warburton D, El-Hashash A, Carraro G, Tiozzo C, Sala F, Rogers O, De Langhe S, Kemp PJ, Riccardi D, Torday J, Bellusci S, Shi W, Lubkin SR, Jesudason E. Lung Organogenesis. *Current Topics in Developmental Biology* 2010, 90, 73-158.

Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mechanisms of Development* 2000, 92: 55-81.

Weaver M, Yingling JM, Dunn NR, Bellusci S, Hogan BL. Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* 1999, 126, 4005-4015.

Web_1, 2019. <https://www.qiagen.com/it/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcr-arrays/?catno=PAHS-059Z#geneglobe>. 15.05.2019.

Web_2, 2019. <https://kadinhastdogum-med.ege.edu.tr/tr-6034/tarihce.html>. 15.05.2019.

Web_3, 2019. <http://www.tupbebekmerkezleridernegi.com/tup-bebek-merkezleri/>. 15.05.2019

Weerkamp F, Luis TC, Naber BA, Koster EE, Jeannotte L, van Dongen JJ, Staal FJ. Identification of Notch target genes in uncommitted T-cell progenitors: No direct induction of a T-cell specific gene program. *Leukemia* 2006, 20(11), 1967-1977.

Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith–Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Human Molecular Genetics* 2003, 12, R61-R68.

Weng AP, Millholland JM, Yashiro-Ohtani Y, Arcangeli ML, Lau A, Wai C, Del Bianco C, Rodriguez CG, Sai H, Tobias J, Li Y, Wolfe MS, Shachaf C, Felsher D, Blacklow SC, Pear WS, Aster JC. c-Myc is an important direct target of Notch1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Genes and Development* 2006, 20, 2096-2109.

WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. (5th ed.) 2010, Geneva, World Health Organization.

Wiese C, Heisig J, Gessler M. Hey bHLH factors in cardiovascular development. *Pediatric Cardiology* 2010, 31, 363-370.

Wisborg K, Ingerslev HJ, Henriksen TB. In vitro fertilization and preterm delivery, low birth weight, and admission to the neonatal intensive care unit: a prospective follow-up study. *Fertility and Sterility* 2010, 94(6), 2102-2106.

Wolfe MS, Kopan R. Intramembrane proteolysis: theme and variations. *Science* 2004, 305, 1119-1123.

Wöltje K, Jabs M, Fischer A. Serum induces transcription of Hey1 and Hey2 genes by Alk1 but not Notch signaling in endothelial cells. *PLoS One*. 2015, 10 (3), e0120547.

Xu K, Moghal N, Egan SE. Notch signaling in lung development and disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2012, 727, 89-98.

Xu K, Nieuwenhuis E, Cohen BL, Wang W, Canty AJ, Danska JS, Coultas L, Rossant J, Wu MY, Piscione TD, Nagy A, Gossler A, Hicks GG, Hui CC, Henkelman RM, Yu LX, Sled JG, Gridley T, Egan SE. Lunatic Fringe-mediated Notch signaling is required for lung alveogenesis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 2010, 298(1), L45-L56.

Xue Y, Gao X, Lindsell CE, Norton CR, Chang B, Hicks C, Gendron-Maguire M, Rand EB, Weinmaster G, Gridley T. Embryonic lethality and vascular defects in mice lacking the Notch ligand Jagged1. *Human Molecular Genetics* 1999 8(5), 723-730.

Yada M, Hatakeyama S, Kamura T, Nishiyama M, Tsunematsu R, Imaki H, Ishida N, Okumura F, Nakayama K, Nakayama KI. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *The EMBO Journal*. 2004, 23, 2116-2125.

Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, Takahashi T, Fujisawa T, Inazawa J. Down-regulation of SKP2 induces apoptosis in lung-cancer cells. *Cancer Science*. (2003), 94, 344–349.

Yun H, Park S, Kim MJ, Yang WK, Im DU, Yang KR, Hong J, Choe W, Kang I, Kim SS, Ha J. AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1. *The FEBS Journal*. 2014, 281(19), 4421-38.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology. *Fertility and Sterility* 2009, 92(5), 1520-1524.

Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K, Beach D. p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 1995, 82, 915-925.

EKLER

Ek 1. ÜYTE alanında sağlanan teknolojik ilerlemenin kronolojik bir tarihçesi

Kamel 2013'ten modifiye edilmiştir

- 1978 Dünyanın ilk tüp bebeği Louise Brown'un ve dünyanın ikinci tüp bebeği Courtney Cross'un doğumu
Clomphene Citrate(CC) ile siklusun ilk kez stimülasyonu
- 1979 Dünyanın ilk erkek ve üçüncü tüp bebeği Alastair Mcdonald'ın doğumu
Folikülometri yönteminin kullanılması; Pez ve arkadaşları ilk kez ultrasonu kullanarak foliküler gelişimi tanımlaması
- 1980 Avustralaya'nın ik tüp bebeği Candice Elizabeth Reed'in doğumu
Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction WHO, 1st Edition
Hücre biyopsisi ve PGD
- 1981 Amerika'nın ilk tüp bebeği Elizabeth Jordan Carr'in doğumu
Clomiphene Citrate (CC) ve human Menopausal Gonadotrophin (hMG) kullanımı
LH-SIR (luteinizinghormone-Surge Initiating Rise) kullanımı
- 1982 Almanya, İsveç, Fransa, Avusturya'nın ilk tüp bebeklerinin doğumu
İlk ikiz tüp bebeklerin doğumu
İlk intrauterine insemination (IUI) tekniği kullanılarak dondurulmuş emriyodan elde edilen tüp bebeklerin doğumu
GnRHa (gonadotrophin releasing hormone) kullanımı
- 1983 Suzan Lenz ve Lauritzen JG'nin ultrason kullanılarak transvezikal oosit izolasyonu
Alan Trounson'un bağışçı oosit ve embriyoları ile elde ettiği hamilelik hCG'nin kullanımı (Robert Casper)
Kanada'nın İlk tüp bebeği Robert John Saunders Reid'in doğumu (Victor Gomel)
Dünyanın ilk IVF üçüz bebeklerinin (Jessica, Chenard veAaron) doğumu
-

	(Cristopher Chen)
1984	Laporoskopik olarak GIFT prosedürünün gerçekleştirilmesi (Ricardo Asch) Dünyanın ilk dondurulmuş embriyosu olan Zoe Leyland'ın doğumu (Alan Trounson ve Carls Wood) Dünyanın ilk dördüzlerinin (Sam, Chris, Ben ve Brett) doğumu
1985	Perkütan Epididim Sperm Aspirasyonu (Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration, PESA) ile ilk IVF (Ricardo Asch) Ultrason kullanılarak transvajinal oosit izolasyonu (Matts Wikland) İnsan tubal sıvısı (Human tubal fluids, HTF) kullanımı (Quinn ve Warnes) ESHRE (The European Society of Human Reproduction and Embryology)'nin kuruluşu
1986	Transvajinal oosit izolasyonu (Peter Kemeter ve Wilfried Feichtinger) Oosit bağıışı ile elde edilmiş ilk hamilelik (ZevRosenwaks) ZIFT yönteminin kullanılması (Paul Devroey) Oosit dondurulması (Cristopher Chen) İlk taşıyıcı annenin (Mary Whitehead) Melisa Stern'i doğurması
1987	SUZI tekniğinin kullanılması (Laws-King) Embriyoların çok hızlı (ultrarapid) dondurulması (Alan Trounson) ÜYTE ile ilgili ilk kanunlar (Norveç)
1988	Farelerde erken embriyo biyopsisi (Leeanda Wilton ve Alan Trounson) MESA tekniği kullanılarak elde edilen ilk IVF doğumu (Sherman Silber) İlk taşıyıcı anne aracılığı ile IVF doğumu (Linda Kirkman) Almanya'da gerçekleşen ilk Türk tüp bebeği Dilek Katrancı'nın doğumu
1989	İnsan embriyo biyopsisi (Alan Trounson ve Leeanda Wilton) ÜYTE'de lazer ilk lazer kullanımı (Yona Tadir) Ultrason kullanılarak endometriyal kalınlık çalışması (Yael Gonen) Türkiyenin ilk tüp bebeği Ece Çokar'ın doğumu
1990	İnsan fertilizasyon ve embriyolojine yönelik oluşturulan kurallar çerçevesi-ilk yasalaşma hareketleri (İngiltere) GnRH _a ile LH'nin tetiklenmesi (Yoel Gonen) Zar inceltme (Assisted hatching) tekniğinin kullanımı (Jacques Cohen) PGD ve cinsiyet tayini çalışmaları (Alan Handyside)
1991	Oositleri invitro maturasyonu (IVM) (Kwang Ryul Cha)

	GnRH antogonistlerinin kullanımı (Rene Frydman)
	Zona pellusidanın lazer ile delinmesi (Daniel Palanker)
1992	ICSI ile ilk IVF (Gianpiero Palermo, Andre Van-Steirteghem)
	Rekombinant insan FSH (rh-FSH) kullanımı ile elde edilen ilk IVF gebeliği (Marc Germond)
	Epididimal spermler kullanılarak embriyo dondurulması (Pasquale Patrizio)
1993	TESE ve ICSI kullanımı (Sherman Silber)
	Rekombinant insan FSH (rh-FSH) kullanımı takiben ilk IVF bebeğinin doğumu (Herjan JT Coeling Bennink)
1994	Rekombinant insan LH (rh-LH) kullanımı takiben ilk gebelik (Ernest Loumaye)
	Yüksek oranda saflaştırılmış FSH'nın tanıtımı (Colin Ilowles)
	Agredite edilmiş (ISO 9002:1994) ilk IVF Ünitesi (Midland Fertility Service İngiltere)
1995	IVM+ICSI+Zar inceltme (Assisted hatching) tekniğinden sonra ilk doğum (Frank Barnes)
	Anö ploidi testi (Jacques Cohen)
	Spermatid kullanılarak ICSI uygulaması (Fishel S ve Green S)
	Sitozolik sperm faktörü (Dmitri Dozortsev)
1996	Klonlama (koyun Doly) (Ian Wilmut ve Keith Campbell)
	Dünyanın ilk testiküler spermatid bebekleri (Jan Tesarik ve Simon Fishel)
	Hipo-ozmotik şişme testi (Hypo-osmotic Swelling Test) (Robert Casper)
	Preimplantasyon embriyo fragmentasyonu-embriyo ölümü (Adrea Jurisicova)
	Dondurulmuş testiküler spermler ile ICSI (Manuel Gil-Salom)
1997	Sperm DNA'sında TUNEL tekniğinin kullanılması (Sun Jurisicova ve Robert Casper)
	Falloposkopi ile GIFT tekniğinin uygulanması (Porcu E ve Dal Prato)
1998	Dünyanın ilk sekiziz bebeklerinin doğumu
	Rekombinant FSH (r-FSH)+ GnRH antogonisti kullanılarak elde edilen ilk gebelik (Joseph Itskovitz-Eldor)
	Serumsuz blastosist kültürü (David Gardner)
	İlk Nijeryalı tüp bebeği Hannatu Kupchi'nin doğumu
1999	Olgunlaşmamış oosit izole etmek amacıyla hCG uygulaması (Ri-Cheng Chian)
2000	Blastosist vitrifikasyon (vitrification)'undan sonra ilk başarılı gebelik

	Başarılı ovaryum dokusu tranplantasyonu (Kutluk Oktay ve Güvenç Karlıkaya)
2001	Donmuş embriyonun doğumu (Ri-Cheng Chian) İlk kez klonlanmış 6 hücreli insan embriyosu (Advanced Cell Technology)
2002	PGD için bastosist biyopsisi uygulamasından sonra ilk canlı doğum (Kylie do Boer)
2003	Oosit vitrifikasyon (vitrification)'undan sonra gerçekleşen doğum (Tae-Ki Yoon) Pipelle Curettage kullanılarak IVF implantasyon oranının artırılması (Barash A ve Dekel N)
2004	Ortotopik ovaryum transplantasyonundan sonra ilk doğum (Jacquez Donnez) Tek blastosist transferi (David Gardner) Kök hücre transplantasyonu için ilk HLA preimplantasyonu (Yuri Verlinsky)
2005	Dünyanın en yaşlı annesi Adriana İliescu (Romanya) 66Y+320G İkiz kardeşler arasında ovaryum transplantasyonu (Sherman Silber) İsrailde ovaryum korteks nakli sonrası ilk doğum (Dror Meirow)
2006	Dünyanın en yaşlı annesi Maria del Carmen Bousada (İspanya) 66Y+358G Sağlam insan ovaryumunun ve vasküler pedikülünün dondurularak saklanması (Mohamed Bedaiwy)
2007	Ovaryumun multi-gradyent olarak dondurulması (Pasquale Patrizio) IVM sonrası Blastosistler (Son Weon Young)
2008	Dünyanın en yaşlı anneleri Rajo Devi Lohan ve Omkari Panwar, (Hindistan) 70Y İlk kez BRCA2 geni kusurlu bir kadında gebelik sağlanması (Kudüs Hadassah Tıp Merkezi)
2009	Dünyanın ikinci sekiziz bebeklerinin doğumu (Michael Kamrava) Polar cisimcikten karşılaştırmalı genomik hibridizasyondan sonra ilk doğum (Simon Fishel)
2011	EmbryoScope'un tanıtımı (Unisense Fertilitich, Danimarka) EmbryoScope kullanılarak elde edilen dünyanın ilk ikizleri (Clare and Charlotte, Amerika)
2013	İnsan klonlanması- kök hücre (Shoukhrat Mitalipov) Hızlandırılmış görüntüleme (Time-Lapse Imaging) (Alison Campbell)

Ek 2. Üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri ve tanımları

İntrauterin inseminasyon/Aşılama (IUI): İntrauterin inseminasyon (IUI) işlemi erkeğin spermelerinin rahim içerisine özel ince bir boru ile verilmesidir.

Embriyo transferi (ET): Embriyo transferi, suni yollarla döllenmiş olan embriyonun, kadının rahmine yerleştirilmesi işlemidir.

Tubal embriyo transferi (TET): Tubaya zigot yerine embriyo transfer edilmesi işlemidir.

Zigot intrafallopian transfer (ZIFT): Yumurta ve sperm in vitro döllenmesinden sonra zigotun laparoskopi yoluyla tuba ampullasına verilmesidir.

İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI): Bir sperm in vitro bir mikropipet yardımıyla yumurta hücrenin sitoplazmasına yerleştirilmesi işlemidir.

Gamete intrafallopian transfer (GIFT) : Ovaryumdan aspire edilen yumurta ve hazırlanan spermelerin birlikte laparoskopi yöntemi ile tuba uterinanın ampulla kısmına verilmesi işlemidir.

In vitro fertilizasyon (IVF) : Laboratuvar ortamında yumurta ve sperm in vitro bir araya getirilerek büyütülmesi işlemidir.

Embriyo dondurma: Embriyonun daha sonra kullanılması amacıyla azot gazında dondurulması işlemidir.

Dondurulmuş-çözdürülmüş embriyo transferi (DÇET) : Embriyonun dondurulduktan sonra çözdürülerek transfer edilmesi işlemidir.

Pre-implantasyon genetik tanı (PGT) : Embriyoların transfer edilmeden önce genetik açıdan incelenmesini mümkün kılarak hastalıkli geni ya da kromozomal bozukluğu gebelik oluşmadan önce test ederek sağlıklı embriyoların transfer edilmesi işlemidir.

İn vitro maturasyon (IVM): Kısa süreli ilaç kullanımı sonrası ya da hiç ilaç kullanılmadan, olgunlaşmamış yumurtaların toplanması ve laboratuvar ortamında olgunlaştırılması işlemidir.

Zar inceltme [AH (assisted hatching)]: Embriyonun zarı daha kolay terk etmesi ve rahim duvarına tutunması amacıyla, zona pellusidanın mikroskop altında ve lazer yardımıyla incelterek ya da açarak yapılan işlemidir.

SUZI: Subzonal Inseminasyon: Subzonal enjeksiyon olarak da adlandırılır. Zona pellucida'nın hemen altına tek bir sperm yerleştirme işlemidir.

Azaospermide sperm elde etme teknikler: PESA, MESA, TESA, TESE teknikleridir.

PESA (Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu): Epididimisten ince bir iğne yardımı ile spermeleri çekme yöntemidir.

TESA (Testiküler Sperm Aspirasyonu) : Testislerden dışardan batırılan bir ardımı ile örnek alınmasıdır. Bu yöntemle sperm elde edilemezse TESE'ye geçilir.

TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu): Testis dokusundan küçük parçalar alınarak sperm elde etme yöntemidir.

MESA (Mikrocerrahi ile Epididimisten Sperm Aspirasyonu): Mikro enjeksiyonla epididimisten sperm elde etme işlemidir.

Ek 3. Araştırmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar

Tris-buffered saline (TBS) stok solüsyonu

- 0,2 M Trizma base (Sigma Aldrich), 24,23 g Tris, 1L distile suda çözündürülür.
- 0,1 M HCl (Merck), 8,5 ml konsantre HCl, 1L distile suda çözündürülür.
- % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su, 9 g NaCl, 1L distile suda çözündürülür.

1L TBS (pH 7,6) hazırlamak için, stok solüsyonlardan sırası ile, 250 ml 0,2 M Tris çözeltisi, 375ml 0,1 M HCl çözeltisi ve 375 ml % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su çözeltisinden ilave edilir. Fizyolojik tuzlu su ilavesi yapılırken hacim 800 ml'ye ayarlanır. pH 7,6'ya ayarlandıktan sonra fizyolojik tuzlu su ile kalan hacim 1L'ye tamamlanır.

Phosphate-buffered saline (PBS, pH 7,4) solüsyonu

- 8 g NaCl (Sigma Aldrich)
- 0,2 g KCl (Sigma Aldrich)
- 1,44 g Na₂HPO₄ (Merck)
- 0,24 g KH₂HPO₄ (Merck)

800 ml distile suda çözündürülerek, pH değeri 7,4'e ayarlanır. Elde edilen solüsyonun volümü distile su ile 1L tamamlanır.

% 0,1'lik PBS-Tween-20 (PBT) solüsyonu

- 1ml Tween-20 (Merck)
- 1000 ml PBS

500 µl Tween-20, 1000 ml PBS içerisine eklenerek iyice karışana kadar karıştırılır. Oda sıcaklığında muhafaza edilebilir.

Sodyum Sitrat Buffer

10 mM tri-sodyum sitrat buffer hazırlamak için,

- 2,94 g tri-sodyum sitrat (Merc)
- 1000 ml distile su
- 0,5 ml Tween-20

2,94 g tri-sodyum sitrat, 800 ml distile suda çözdürülerek pH 6'ya ayarlanır. Daha sonra bu çözelti 1L'ye tamamlanır. 0,5 ml tween-20 çözeltiye eklenerek iyice karıştırılır. Oda sıcaklığında 3 ay ya da +4 C°'de daha uzun süre saklanabilir.

% 3'lük H₂O₂ solüsyonu

- 1 ml %30'luk stok H₂O₂ (Merc)
- 9 ml PBS

1ml %30'luk stok H₂O₂ alınarak üzeri PBS ile 10 ml tamamlandı.

3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) Solüsyonu

- 10 mg'lık DAB tableti (Sigma Aldrich)
- 16,6 ml TBS solüsyonu
- 10 µl % 3'lük H₂O₂

DAB tableti karanlık ortamda TBS solüsyonu içerisinde çözdürülerek filtre kağıdından geçirilerek süzdürülür. Oluşturulan çözeltiden 990 µl alınarak ependorf tüplere aktarılır ve -20 C°'de muhafaza edilir. Gerekli olduğu zamanlarda çözdürülür ve kullanmadan önce üzerine 10 µl %3'lük H₂O₂ ilave edilir.

Ek 4. Western Blot yönteminde kullanılan solüsyonlar ve Western Blot tekniği

Gerekli malzemeler

- Lower Buffer (Sperating Jel Buffer), pH 8.8

18.15 gr Tris tartılarak, 40 ml deiyonize su içerisinde çözdürüldü. pH 8.8 olacak şekilde 1 Normal HCl (veya saf HCl) ile ayarlanarak üzerine %10'luk SDS'den 4ml eklendi (0,4 g SDS) ve çözelti hacmi deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan buffer +4 C°'de 30 gün boyunca saklanabilir.

- Upper Buffer (Stacking Jel Buffer), pH 6.8

6.05 gr Tris tartılarak 40 ml deiyonize su içinde çözdürüldü. 1M HCl (yada saf HCl) ile pH=6.8'e ayarlanarak üzerine %10'luk SDS'den 4ml eklendi (0,4 g SDS) ve çözelti hacmi deiyonize su ile 100 ml'ye tamamlandı.

Hazırlanan buffer +4 °C'de 30 gün boyunca saklanabilir.

- %10'luk APS (amonyum-persülfat)

0.1 gr toz APS tartılarak üzerine 1 ml deiyonize su eklendi. Hazırlanan çözelti +4 °C'de bir hafta saklanabilir.

- TEMED

Hazır bir solüsyondur, direk olarak kullanılır.

Bufferlar hazırlandıktan sonra jel tankı ayarlandı. Jel tankına jel tarağı konularak sperating jelin konulacağı kısım cam kalemi ile işaretlendi. Daha sonra %10'luk sperating jel hazırlandı.

- Sperating Jel hazırlamak için;

Tablo 1. Sperating jel hazırlamak için kullanılacak malzeme ve miktarları (Sambrook ve ark, 1989).

Çözelti içeriği	Herbir hacim için hazırlanacak miktarlar (ml)							
	5ml	10 ml	15 ml	20 ml	25 ml	30 ml	40 ml	50 ml
%6'lık Jel								
Deiyonize Su	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
Akril-bisakril	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
%10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
%10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,02	0,024	0,032	0,04
%8'lik Jel								
Deiyonize Su	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
Akril-bisakril	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3

1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
%10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
%10Ammonium Persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
%10'luk Jel								
Deiyonize Su	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
Akril-bisakril	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
%10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
%10Ammonium Persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
%12'lik Jel								
Deiyonize Su	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
Akril-bisakril	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
%10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
%10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
%15'lik Jel								
Deiyonize Su	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
Akril-bisakril	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5 MTris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
%10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
%10Ammonium persulfate	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

Hazırlanan sperating jel tanka dökülerek jelin donması beklendi. Bu arada jelin üzerine izopropanol eklenerek hava kabarcıklarının oluşması engellendi. Daha sonra %5'lik Stacking jel hazırlandı.

%5'lik Stacking Jel hazırlamak için;

Tablo 2. Stacking jel hazırlamak için kullanılacak malzeme ve miktarları (Sambrook ve ark, 1989)

Çözelti İçeriği	Herbir hacim için hazırlanacak miktarlar (ml)							
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	6 ml	8 ml	10 ml
Deiyonize Su	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Akril-bisakril	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
%10 SDS	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
%10Amonium persulfate	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Sperating jel donduktan sonra üzerindeki izopropanol alkol Watman No:1 filtre kağıdı ile çekildi. Hemen ardından jelin üst kısmı (stacking jel) döküldü ve tarak yerleştirilerek donması beklendi.

Örneklerin Hazırlanması

- Örnek miktarları önceden hesaplanarak Laemli metoduna göre yükleme için hazır hale getirildi.
- Her örnekten gerekli miktarda alınarak üzeri eşit hacimde 2x Loading dye ile tamamlandı.
- Daha sonra örnekler 10 dakika süre ile 65 °C'de denatüre edildiler.

- Yürütme Tamponunun (Running Buffer, 5 L, 1X) hazırlanması

15,125 g Tris

72 g glisin

50 ml %10'luk SDS

2000 ml distile su içerisinde katı bileşenler çözdürüldü ve üzerine 50 ml %10'luk SDS eklendi. Hazırlanan bu çözelti 5 L tamamlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Oda sıcaklığında uzun süre saklanabilir.

Stacking jeli donduktan sonra aparattan çıkarılarak elektroforezin yapılacağı tanka yerleştirildi. 1X elektroforez running buffer iç ve dış havuzcuklara döküldü. Bundan sonra tarak çıkarıldı ve örnekler kuyucuklara yüklendiler.

- Blotting Buffer (5 L, 1X) hazırlanışı

15,125 g Tris

72 g glisin

1000 ml metanol

12,5 ml %10'luk SDS

2000 ml distile su içerisinde katı bileşenler çözdürüldü ve üzerine 12,5 ml %10'luk SDS ve 1000 ml metanol eklendi. Hazırlanan bu çözelti 5 L tamamlanarak kullanıma hazır hale getirildi. Hazırlanan buffer +4 °C'de muhafaza edilir.

- Örneklerin Yüklenmesi

Denatüre olan örnekler spin-santrifüj edilerek hava kabarcıklarının uzaklaştırılması sağlandı. İlk kuyucuğa Marker, diğer kuyucuklara ise örnekler yüklendi. Daha sonra örnekler 200 V, 50 mA'de 60 dakika yürütüldü.

- Proteinlerin membrana aktarılması

Membran, jel ile aynı boyutta kesilerek aktive olması için metanol içerisinde 5 dakika süre ile bekletildi. Metanol uzaklaştırılarak membran distile suda yıkandı. Blotlama aparatı (sandviçler) içerisinde blotting buffer bulunan bir kap içerisinde konuldu. Hazırlanan sandviçlerin üzerine önce iki adet Watmann kâğıdı bunun üzerine jel, jelin üzerine ise membran koyuldu ve son olarak membran üzerinde iki adet daha Watmann kağıdı koyuldu. Rulo yardımı ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde düzeltildi. Sandviçler kitlenerek transfer cihazına yerleştirildi. Tankın içerisinde ısınmayı engellemek amacı ile bir buz kalıbı yerleştirildi ve blotlama bufferi gerekli hizaya kadar konuldu. Tankın kapağı kapatılarak blotlama işlemi başlatıldı; Blotlama 100 V 350 mA'de 60 dakikada gerçekleştirilmiştir. Bu süre zarfında TBS-T hazırlandı.

- TBS-T hazırlanırken, 100 ml stok (10X) TBS'ten alınarak, 900ml deiyonize su eklendi. 1:1000 Tween-20 eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.
- Bloklama işlemi %5'lik taze hazırlanmış skim milk içinde yapıldı.

- %5'lik skim milk hazırlanması;

5 gr skim milk tartılarak, 100 ml TBS-T içerisinde çözdürüldü.

Süre bittikten sonra cihaz açılarak, membran TBST içeren plastik kap içerisine alındı. Protein bantlarını hızlı bir biçimde tespit edilmesi için Ponceau S boyası ile boyandı (Eğer kromojenik marker ile çalışılmış ise proteinlerin membrana geçip geçmediği zaten anlaşılır bu nedenle Ponceau S boyaması yapmaya gerek yoktur). Protein örnekleri daha sonra TBST ile boya uzaklaştırılana kadar yıkama yapıldı. Bloklama aşamasından itibaren işlemlere devam edildi. Membranlar plastik kap içerisine alınarak üzerlerine skim milk ilave edildi. Daha sonra 1 saat süre ile oda sıcaklığında shakerda inkübasyona bırakıldılar. Bu arada primer antikor hazırlandı. Bunun için %5'lik BSA tartılarak TBST içerisinde çözdürüldü. Primer antikor (β - aktin) 1/1000 oranında BSA solüsyonunda hazırlandı. Süre dolduktan sonra membran 5 dakika süre ile 2-3 kez TBST ile yıkandıktan sonra plastik kaptaki bulunan primer antikor içerisine alındı. 1 gece +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Primer antikor muamelesinden sonra 3 X 5 dakika süreyle TBST'de yıkama yapıldı. Yıkama aşamasından sonra, sekonder antikor ile (anti rabbit ya da anti mouse 1/5000) oda sıcaklığında 1 saat süre ile shakerda inkübasyon yapıldı. Süre dolunca 3 X 5 dakika süreyle TBST'de yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra görüntüleme cihazında HRP konjuge ECL kullanılarak görüntü alınır. Membranın bu madde ile etkileşim süresi kullanılan primer antikora göre değişir. Membranı ECL ile en az bir dakika muamele etmek gerekir. Daha sonra bantların yoğunlukları hem incelenen faktör açısından hem de endojen kontrol için dansimetri programı ile ölçülür. Sonuçlar endojen kontrol ile normalize edilerek hesaplanır.

Ek 5. c-DNA Sentezi ve materyalleri

Dikkat edilecek noktalar; çalışma steril kabinde yapılmalı, +4°C'de çalışılmalı (yada buz üzerinde), steril ve filtreli pipet uçları kullanılarak, mutlaka eldiven kullanılmalıdır. İyi bir cDNA sentezi için yüksek saflıkta RNA ile çalışılmalıdır. RNA spektrofotometrik olarak ölçülerek saflık miktarı kontrol edilir. Ayrıca RNA çalışmaya uygun uzunlukta olmalı ve EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) yada SDS (Sodyumdodesilsülfat) gibi revers transkriptaz enzimini inhibe eden inhibitörleri içermemelidir.

- Gerekli materyaller

Tek zincirli cDNA sentezlemek amacıyla High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti kullanılmıştır. Reaksiyon 40 μ l total volümde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kite ait komponentler

Materyaller	Volüm/Reaksiyon (2X) (µl)
10XRT Buffer	4
25XdNTP Mix (100mM)	1.6
10X RT Random Primers	4
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	2
Nükleaz- free H ₂ O	8.4
Total/Reaksiyon	20

- İlk olarak yukarıdaki tabloda verildiği gibi 2X reverse Transkripsiyon Master Mix (20 µl) hazırlanmıştır.
- Daha sonra 1X'lik karışım elde etmek amacıyla total RNA (20 µl=500 ng), hazırlanan 2X'lik bu karışıma eklenerek total volüm 40 µl olarak çalışılmıştır.
- Karışım hızlı bir santrifüj edildikten sonra, bir Thermal Cycler'da reverse transkripsiyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4. Thermal Cycler koşulları gösterilmiştir.

	1.Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4.Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman (dakika)	10	120	5	∞

- Reaksiyon volümü 40 µl olarak ayarlanmıştır ve reaksiyon başlatılmıştır.
- reaksiyon süresi dolduktan sonra cDNA örnekleri Q-RT Real Time PCR'da kullanılmak üzere, 1/1 oranında nükleaz- free H₂O ile dilüe edildikten sonra -20 °C'de muhafaza edilmişlerdir.

Ek 6. RT- PCR solüsyonları ve materyalleri

- Gerekli Materyaller

Assay (TLR 5 geni)

Master mix (2x)

RNase/DNase free su

c-DNA örneği (sample)

48'lik plate ve plate sealer

Buz ve buzlu kalıplar

Filtreli pipet uçları

RNA pipetleri

Öncelikle çalışma steril kabinde yapılmalı, +4°C'de çalışılmalı (ya da buz üzerinde), steril ve filtreli pipet uçları kullanılmalı, mutlaka eldiven kullanılması gerekir.

Çalışılacak assayler ve endojen kontrolle ile birlikte toplam assay sayısı dikkate alınarak çalışma planlanmalıdır. Bu amaçla her bir assay için ayrı ayrı mixler hazırlanmalıdır. Her bir kuyucukta 20'şer µ'lik total volümler ile çalışılacaktır;

Tablo 5. Bir adet örnek için gerekli volümler

Materyaller	1 örneklilik volüm
Assay (Hey1, Skp2, β-aktin)	1 µl
Master mix (2X)	10 µl
dh ₂ O (DNase/RNase free su)	7 µl
Sample (c-DNA örneği)	2 µl
Total	20 µl

- İlk olarak 500 µl'lik tüpler hazırlandı.
- Assayler eritildikten sonra hızlı bir santrifüj edilerek tekrar buzun üzerine konulmuştur.
- Bu arada yazılan tüplere (mix hazırlama tüpleri), mixleri hazırlamak için her birine ilk önce DNase/RNase free su konulmuştur.
- İkinci olarak her bir tüpe master mix (UNG'li, 50 °C'de 2 dakikalık enzim aktivasyonu) eklenmiştir.

- Her bir assayden ayrı ayrı gerekli miktarlarda alınarak tüplere ilave edilmiştir. Her bir assay eklenince mixler pipete edilerek karışması sağlanmıştır.
- Mixler hazırlandıktan sonra yavaş bir vorteks ve hızlı bir santrifüj yapılarak (1500 rpmde 30 sn kadar) tekrar buzun üzerine alınmışlardır.
- Mixleri plate kuyucuklarına dağıtmak amacıyla, plate bir buz kalıbı üzerine konulan supportter üzerine konuldu ve mixler her bir kuyucuğa 18'er µl olarak dağıtılmışlardır.
- Son olarak da daha önceden hazırladığımız c-DNA örneklerinden 2'şer µl her bir örnek için ayrı ayrı plate konulmuşlardır.
- Daha sonra plate'in üzerini sealer ile düzgün bir biçimde kapatarak, sealerın hatlarını bir metal alet ile iyice belirlenmiştir. Kapandığında emin olduktan sonra, plate santrifüj ile plate hızlı bir santrifüj edilmiştir.
- Q-RT-PCR cihazını çalıştırmak amacıyla önce bilgisayarı açılmıştır, ardından sırası ile cihaz ve programı açılmıştır.
- Step One programını açtığımızda karşımıza çeşitli menüler çıkmaktadır, buradan advanced set up menüsü tıklanmıştır.
- Ardından Experiment properties'den deney adı seçilerek örneklerin özelliklerini yazılmıştır.
- Step-One Instrument (48 well) seçilerek, Quantitation-Comperative CT işaretlenmiştir ve TaqMan Reagents'ı seçilmiştir (SYBR Green ile çalışılıyorsa ayrıca include melt curve'i de seçmek gerekir, fakat burada gerekli değil). Altta yer alan Standart sekmesini tıklanmıştır.
- Daha sonra plate için plate setup'a tıklanarak; Define Targets'dan genlerin isimlerini yazılmıştır. Hemen sonra Add New Sample kısmından örnek isimlerini eklenmiştir.
- View plate layout'dan plate'i tanımlanmıştır. Yani girilen gen isimleri ve örnek isimlerini plate kuyucuklarında tanımlanmıştır.
- Run'a tıklayarak run metoduna bakılmıştır; orada son kısımda okuma almak istenildiği için okuma sekmesini tıklanmıştır, yani aktif hale getirilmiştir.
- Run setup da ayarladıktan sonra cihaza geçilerek plate yerleştirilmiştir ve cihazın kapağı kapatılarak çıt sesi duyulmuştur.
- Run strart tıklanarak, sistem deneyimizi kaydetmiştir (Burada cihazın kalibresi bittiği için deneyi başlatmadan uyarı veriyor, kalibre değil devam etmek istiyor musunuz diye, evete tıklanmıştır) cihaz otomatik olarak kapağını yukarı çekmiştir ve deney başlatılmıştır.

Ek 7. Etik Kurul Raporu



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 30. Kasım. 2016

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2016 Yılı X. Oturumu
Sayı : 64583101/2016/176
Proje Başlığı : Farelerde in-vitro emriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Hey1 ve Skp2 genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi .
Proje Yürütücüsü : Levent KARAGENÇ
Proje Ekibi : Göksel DOĞAN

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötusu kullanılması
İnsan embriyosu ve fötusu dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Başkan

Prof. Dr. Turhan DOST
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Işıl SÖNMEZ
Üye

(Mazeretli)

Prof. Dr. Deniz ÇOBAN
Üye

Prof. Dr. Yücel KOCA
Üye

Yrd. Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN
Üye

Vet. Hek. Seldar AKTAŞ
Üye

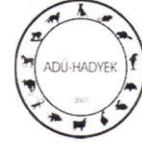
Vet. Hek. Birgül ÜNAL
Üye

Yurdagül ALTINBAŞ
Üye

Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.



T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK
KURULU
(AYDIN ADÜ-HADYEK)



Aydın, 25/12/2018

Sayı: 64583101/2018/0140

Konu: Başvuru Hakkında Bilgilendirme

Sayın, Prof. Dr. Levent KARAGENÇ
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fak.

Kurulumuz'a önceden başvuruda bulunarak onay almış olduğunuz çalışmanız ile ilgili 07.12.2018 tarihli konu başlığı değişikliği talep dilekçeniz 25.12.2018 tarihindeki 2018/XII. Toplantımızda gündeme alınmış ve değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda, " Farelerde in-vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Hey1 ve Skp2 genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi " isimli projenizin " Farelerde in-vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Notch Sinyalyoluğu hedef genlerinden Hey1 ve Skp2 genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi " Olarak değiştirilmesi uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN

ADÜ-HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : DOĞAN Göksel
Uyruk : T.C.
Doğum yeri ve tarihi : Haymana/ANKARA, 1985
Telefon : 0256 247 07 00 / 6133
GSM : 0543 449 98 13
E-mail : g.dogan@adu.edu.tr, gksldogan@hotmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Doktora	ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2019
Y. Lisans	ADÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2014
Y. Lisans	PAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü	2012
Lisans	PAÜ Fen-Edebiyat Fakültesi	2008

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

2015-2018 TÜBİTAK proje bursu (1140743 nolu proje)

2012-2014 TÜBİTAK proje bursu (1120259 nolu proje)

2013-2014 COST proje bursu (1120259 nolu proje)

2014-2018 Başbakanlık doktora bursu

2010-2012 Başbakanlık yüksek lisans bursu

2004-2008 Başbakanlık lisans bursu

İŞ DENEYİMİ

2018- Araştırma Görevlisi, ADÜ Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

AKADEMİK YAYINLAR

MAKALELER

Dogan, N.M., Doganli, G.A., **Dogan, G.** and Bozkaya, O. Characterization of Extracellular Polysaccharides (EPS) Produced by Thermal Bacillus and Determination of Environmental Conditions Affecting Exopolysaccharide Production. International Journal of Environmental Research, 2015 Vol.9; Issue 3; p 1107-1116.

Dogan, NM., Evgen E., Doğanlı Acar, G., **Dogan, G.** The role of different metal and heavy metal ions on chromium reduction by Pseudomonas mendocina DS0601-FX-P22. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry; 2015, 43 (4), 295-300.

Doğan, G., Doğan NM., Doğanlı Acar, G. Effect of Environmental Factors on Biological Reduction of Hexavalent Chromium by Pseudomonas mendocina. Asian Journal Of Chemistry, 2014 Vol. 26 Issue 21, p7359-7363.

Dogan, NM., Kantar C., **Dogan, G.** Effect of chromium and organic acids on microbial growth and exopolymeric substance (EPS) production by Pseudomonas bacteria. CLEAN; Soil,Air, Water; 2014 Vol. 42 Issue 5, p674-681

Doğan G., Acar Doğanlı G., Gürsoy Y., Mercan Doğan N. Antibiotic Susceptibilities and SDS-PAGE Protein Profiles of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Strains Obtained from Denizli Hospital. In ‘‘ Current Progress in Biological Research’’ edited by Marina Silva-Opps, ISBN 978-953-51-1097-2, InTech, April 4, 2013.

PROJELER

2018-2019 Germencik Bilimle Aydınlanıyor, Bilim ve Toplum, Atölye Lideri - 19-20 Ekim 2018-**TÜBİTAK** (118B834, Proje yürütücüleri: Derya Fidan Toprakçı ve Nevzat Angın).

2017-2019 Farelerde *In Vitro* Embriyo Kültürü ve Embriyo Transferinin Fötal Akciğer Dokusunda Notch sinyal yolağı hedef genlerinden Hey1 ve Skp2 genlerinin ekspresyonu üzerine etkisi – **ADÜ-BAP** (VTF-17020), Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Karagenç).

2015-2019 Farelerde sekum mikrobiyotasının yeni nesil dizileme analizi ile incelenmesi – **ADÜ-BAP** (VTF15058 Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Hümeysra Ünsal).

2015-2018 *In vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen erişkin farelerde karaciğer dokusunda glikoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan miRNA'ların incelenmesi- **TÜBİTAK** (114O743, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Karagenç).

2015-2018 Farelerde *In Vitro* Embriyo Kültürü ve Embriyo Transferinin Solunum Sisteminde Epitel Hücre Sayıları Üzerine Etkisi – **ADÜ-BAP** (VTF-15057, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Karagenc).

2012- 2015 Farelerde *In Vitro* Embriyo Kültürü ve Embriyo Transferinin Fötal Akciğer Dokusunda Toll-Benzeri Reseptörlerin (Tlr) Ekspresyonu üzerine etkisi- **TÜBİTAK** ve **COST** projesi (112O259, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Karagenc).

2013- 2014 Influence of prenatal cigarette smoke exposure on proportions of lung epithelial cells in the early postnatal period–**COST Action- Short Term Scientific Mission** (COST-STSM)-Partnering institutions: Dr. Levent Karagenc and Dr. Susanne Krauss-Etschmann (host).

2013- 2014 Farelerde in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin fötal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi- **ADÜ-BAP** (VTF14028, Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Levent Karagenc)

2010-2011 Pseudomonas Cinsi Bakterilerde Hekzavalent Krom İndirgemeye Organik Moleküllerin Etkisi- Pamukkale Üniversitesi, **Pamukkale Üniversitesi Araştırma Fonu**, (2010FBE049 Proje Yürütücüsü, Prof. Dr. Nazime Mercan. Doğan).

BİLDİRİLER

Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Karagenc N, Esmen K, **Doğan G**, Karagenc L. Impact of culture and transfer of embryos in mice: assessment of microarray (May 3-4 2017). “BIG DATA and Advanced Analytics: collection of materials of the third international scientific and practical conference” Minks Belarus.

Doğan G., Złoch M., Kowalkowski T., Hryniewicz K. Synthesis of proteins and exopolysaccharides (EPS) by ectomycorrhizal fungi in the presence of cadmium (Cd) (July 22-28, 2012). “7th International Symbiosis Society Congress” Jagiellonian University, Kraków, Poland.

Doğan G., Złoch M., Kowalkowski T., Hryniewicz K. The effect of cadmium (Cd) on the synthesis of a proteins and exopolysaccharides (EPS) by ectomycorrhizal fungi. (June 3-6, 2012). “Microbiology in the protection of human health and the environment: 46th International Scientific Conference. Page, 46-47. Bydgoszcz, Poland.

Doğan N. M., **Doğan G**. Influence of various organic acids on the reduction of hexavalent chromium mediated by *Pseudomonas mendocina* strain P22 (April 16-18, 2012). “Conference

of A New Vision of the Role of Basic Sciences in Development” College of Applied Sciences, Umm All- Quara University, Makkah, Suudi Arabia.

Acar G., Doğan N. M., Evgen E., **Doğan G.** (12-15 September 2011). Plant secondary metabolites and microorganisms. “International Symposium on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties” Denizli, Turkey, Abstract Book, P-81.

Doğan N. M., **Doğan G.**, Evgen E., Bozbeyozoğlu N., Acar G. (12-15 September 2011). Microbial seconder metabolites. “International Symposium on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties” Denizli, Turkey, Abstract Book, P-98.

Doğan N. M., Mammadov R., Düşen O., **Doğan G.**, Acar G., Evgen E. (12-15 September 2011). In vitro Antibacterial Activity of *Urginea maritima*, *Cyclamen alpinum* (*C. trochopteranthum*), *Cyclamen mirabile* and *Crocus antalyensis*. “International Symposium on Secondary Metabolites Chemical, Biological and Biotechnological Properties” Denizli, Turkey, Abstract Book, P-99.

Doğan N. M., Evgen E., **Doğan G.**, Acar G. 2011. Studies on biological reduction of chromate by *Pseudomonas mendocina* strain PASS3-P18. Current Opinion in Biotechnology, Volume 22, Supplement 1, doi:10.1016/j.copbio.2011.05.212, P-S73.

Acar G., Doğan N. M., Evgen E., **Doğan G.** 2011. Cr(VI) reduction by *Bacillus licheniformis* B22 isolated from Pamukkale thermal region. Current Opinion in Biotechnology, Volume 22, Supplement 1, doi:10.1016/j.copbio.2011.05.200, P-S69-S70.

Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

Karagenc L, **Doğan G**, Sandıkçı M, Çınar Kul B, Karagenc N, Orman MN. Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) yöntemlerine bağlı olarak ortaya çıkan sağlık sorunları. XIV. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya 10-13 Mayıs 2018.

Doğan G, Balgir DT, Öztürk M, Karagenc L. in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin Farelerde fetal ve yetişkin akciğer dokusunda Silli, Clara, Nöroendokrin, TipI ve TipII Pönomosit hücre profilleri üzerine etkisi. XIV. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 10-13 Mayıs 2018.

Öztürk M, Balgir DT, **Doğan G.**, Karagenc L. Farelerde in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferinin yetişkin akciğer dokusunda Toll-benzeri reseptör (TLR) 9 ekspresyonu üzerine etkisi. XIV. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 10-13 Mayıs 2018.

Balgir DT, Öztürk M, **Doğan G.**, Karagenc L. Farelerde in vitro embriyo kültürü ve embriyo

transferinin yetişkin akciğer dokusunda Toll-benzeri reseptör (TLR) 5 ekspresyonu üzerine etkisi. XIV. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye 10-13 Mayıs 2018.

Doğan G., Karagenc L. . “Effect Of *In Vitro* Embryo Culture And Embryo Transfer On The Number Of Basal Cells In The Fetal Mouse Trachea”. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye 30 Nisan-3 Mayıs 2016.

Acar Doğanlı G., Doğan Mercan N., **Doğan G.**, Evgen E. Cr (VI) reduction and determination of optimal conditions affecting chrome reduction by *Lysinibacillus fusiformis* B26 isolated from Pamukkale thermal area (September 3-7, 2013). “21. National Biology Congress” Ege University, İzmir, Turkey, Abstract Book, Page- 279.

Doğan G., Doğan N. M., Evgen E., Acar Doğanlı G. Effect of organic molecules and metals-heavy metals on bacterial chromium reduction by *Pseudomonas mendocina* DS0601-FX-P22 (September 3-7, 2013). “21. National Biology Congress” Ege University, İzmir, Turkey, Abstract Book, Page- 1208.

Doğan G., Zloch M., Kowalkowski T., Hryniewicz K. Secretion of proteins and exopolysaccharides (EPS) by ectomycorrhizal fungus *Cortinarius* sp. growing in the presence of Cd (September 3-7, 2013). “21. National Biology Congress” Ege University, İzmir, Turkey, Abstract Book, Page- 1209

Mercan Doğan N., **Doğan G.**, Bayraktar A., Kaynarca K. Chromium reduction and exopolysaccharide (EPS) production by thermophilic Bacillus strains (*B. stearothermophilus* and *B. licheniformis*) (September 3-7, 2013). “21. National Biology Congress” Ege University, İzmir, Turkey, Abstract Book, Page- 1257.

Doğan G., Evgen E., Acar G., Gürsoy Y., Doğan N. M. (21-25 June 2010). Antibiotic susceptibilities and SDS protein profiles of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains obtained from Denizli State Hospital. “20. National Biology Congress” Pamukkale University, Denizli, Turkey, Abstract Book, Page- 951.