T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOMETRİUMDA PERİ-İMPLANTASYON DÖNEMİNDE HİSTON MODİFİKASYON ENZİMLERİNİN VE KROMATİN YENİDEN MODELLEME FAKTÖRLERİNİN mRNA PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI: KOYUN MODELİ

Çağlayan ÖZEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Tülin ÇORA

KONYA – 2020

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDOMETRİUMDA PERİ-İMPLANTASYON DÖNEMİNDE HİSTON MODİFİKASYON ENZİMLERİNİN VE KROMATİN YENİDEN MODELLEME FAKTÖRLERİNİN mRNA PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI: KOYUN MODELİ

Çağlayan ÖZEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Tülin ÇORA

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından TÜBiTAK-2l40643 proje numarası ile kısmi olarak desteklenmiştir.

KONYA-2020

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgilerinden yararlandığım ve özveri ile eğitimime önemli katkılar sağlayan sayın Hocalarıma ve danışman Hocam Prof. Dr. Tülin ÇORA' ya;

Çalışma bünyesinde kullanılan canlı hayvan modelinden elde edilen doku örneklerinin temini için izin ve desteklerini esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet KÖSE' ye;

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalındaki çalışma arkadaşlarıma;

Yaşamımın her anında sürekli olarak desteklerini hissettiğim değerli annem, babam ve biricik kardeşime;

Hayatıma değer katan ve elinden gelen desteği esirgemeyen eşime;

En samimi duygularım ile teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TÜBİTAK 2l40643 proje numaralı ''Koyunlarda Peri-İmplasyon Döneminde Gebeliğe İlişkin miRNA markırlarının Araştırılması'' başlıklı proje ile Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu tarafından kısmi olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR **V**

ÖZET **VII**

SUMMARY **VIII**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Erken Gebelik Dönemi 2

1.1.1. İmplantasyon süreci 4

1.2. Gen ifadesinin Düzenlenmesi 6

1.2.1. DNA Metilasyonu 9

1.2.2. Histon Asetilasyonu 10

1.2.3. Histon Metilasyonu 10

1.2.4. Histon Fosforilasyonu 11

1.2.5. Histon Ubikutinasyon 11

1.2.6. Histon Demetilasyonu 12

1.2.7. Histon Deasetilasyonu 12

1.2.8. Kromatin Yeniden Modelleme (remodeling) 13

2. GEREÇ VE YÖNTEM **16**

2.1. Saha Çalışması ve Örnekleme 16

2.1.1. Hayvan Materyali 16

2.1.2. Östrus Senkronizasyonu ve Gruplandırma 16

2.1.3. Endometrium Örneklerinin Toplanması 19

2.2. Moleküler Analizler 21

2.2.1. Endometrium Örneklerinden Total RNA İzolasyonu 21

2.2.2. RNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi 21

2.2.3. DNase-I ile Total RNA'dan gDNA'nın Uzaklaştırılması 23

2.2.4. Komplementer DNA Sentezi/Revers Transkripsiyon 23

2.2.5. Oligonükleotid Primer Dizayn ve Sulandırma 24

2.2.6. Referans Gen Seçimi 28

2.2.7. Seri Sulandırmalar ile Primer Etkinliğinin Hesaplanması 28

2.2.8. İstatistik Analizleri 33

3. BULGULAR **34**

3.1. Primer Etkinlik Değerleri 34
3.2. RT-qPZR verilerin Normalizasyonu ve Analizi 36

4. TARTIŞMA 53

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 58

6. KAYNAKLAR 60

7. EKLER 70

EK-A. Etik Kurul Onayı 70
EK-B. Özel İzin Belgesi 71

8. ÖZGEÇMİŞ 72

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACTB	: Actin Beta
ARID1A	: AT Rich Interactive Domain 1A
ASXL1	: Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1
ATF2	: Activating Transcription Factor 2
ATRX	: α-thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked
AURKA	: Aurora kinaz A
C	: Cyclic/siklik/gebe olmayan
CARM1	: Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1
CBX1	: Chromobox Homolog 1
cDNA	: komplementer DNA
CHD1	: Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1
CL	: Corpus Luteum
CpG	: Sitozin fosfat Guanin
ct/cq	: Cycle of treshold
DNA	: Deoksiribo Nükleik asit
DNMT	: DNA metil transferaz
DOT1L	: DOT1-Like Histon H3K79 Metiltransferaz
DZIP3	: DAZ Interacting Zinc Finger Protein 3
EHMT2	: Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2
EP300	: E1A Binding Protein P300
EtBr	: Etidyum Bromür
EZH2	: Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
gDNA	: genomik DNA
HAT	: Histon asetil transferaz
HDAC	: Histon deasetilaz
HKG	: Housekeeping gen
HP1	: Heterokromatin protein 1
IFNτ	: İnterferon tau
KAT2A	: Lysine Acetyltransferase 2A
KDM1A	: Lizin (K)-Spesifik Demetilaz 1A
Lsh	: Lymphoid-specific helicase

MBD	: Methyl-CpG DNA binding domain
MeCP2	: Metil CpG bağlanma proteini 2
mRNA	: mesajcı RNA
MTA1	: Metastasis Associated 1
NCOA1	: Nuclear Receptor Coactivator 1
NSD1	: Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
NuRD	: Nükleozom-remodeling ve histone deasetilaz
P	: Pregnant/Gebe
P4	: Progesteron
PAK1	: P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1
PRMT1	: Protein Arginine Methyltransferase 1
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik asit
RT	: Revers Transkripsiyon
RT-qPZR/qPZR	: Real Time PZR
SDHA	: Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A
USP16	: Ubiquitin Specific Peptidase 16
ZP	: Zona Pellucida

ÖZET

Endometriumda peri-implantasyon döneminde histon modifikasyon enzimlerinin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin mRNA profillerinin araştırılması: koyun modeli

Çağlayan ÖZEL

Danışman: Prof. Dr. Tülin ÇORA

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Doktora Tezi / Konya-2020

Erken gebelik dönemi; gebelik süresince devam edecek olan anne ile yavru arasındaki iletişimin başlaması, annenin gebeliği tanıması ve kabulü, embriyonun ana rahmine tutunumu ve yavru zarlarının şekillenmesi gibi başarılı bir gebeliğin sürdürülebilmesi adına gerekli olan kritik olayları içerir. Gebelik süresince farklılaşmış gen ekspresyonu, östrojen ve progesteron hormonlarının etkisi ile kontrol edilmektedir.

Epigenetik mekanizmalar DNA dizisinde değişim yapmaksızın, hücresel gen ekspresyonlarını düzenlemektedir. Gen ekspresyonu siklik-gebelik endometriumun transformasyonu, farklılaşması, gelişimi, anjiyogenezi, rejenerasyonu ve endometrial yeniden modellenme gibi fizyolojik olaylarla ilişkilendirilir. Ancak, endometriumda epigenetik mekanizmaların rolü henüz tüm hatlarıyla aydınlatılabilmiş değildir. Bu tez çalışması kapsamında koyun model organizması ile oluşturulan gebelik modelinde, peri-implantasyon sürecinde (12. gün; implantasyon öncesi / 16. gün; sıkı fiziksel tutunum / 22. gün; implantasyon sonrası, invazyon şeklinde 3 grup ve kontrol amaçlı siklik karşılıkları ile birlikte toplam 6 grup, her bir grup için n=4) maternal endometriumda epigenetik histon modifikasyon enzimlerinin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin ekspresyon (mRNA) profillerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışma neticesinde profillenen 45 hedef gen ve siklik-gebe olmak üzere 6 farklı grupta istatistiksel olarak anlam ifade eden toplam 67 düzenlenme kaydedilmiştir. Siklusta 12 hedefe ilişkin düzenlenme kaydedilirken, gebe gruplar arasında 38 düzenleme tespit edilmiştir. Siklus-gebe gruplar arasında ise toplam 17 düzenlenme kaydedilmiştir. Araştırılan hedeflerin bir kısmı progesteron bağımsız olarak embriyo ilintili biçimde anlamlı düzenlenmelere dahil olsalar da, katlanmanın çok radikal (2-10 kat) olduğu AURKA, AURKB bu çalışma neticesinde ön plana çıkmıştır. Sonuç olarak çalışma neticesinde elde edilen bulgular, koyun endometriumunda östrus siklusu ve erken gebelik döneminde gen ekspresyonlarını kontrol eden epigenetik mekanizmaların dinamik rollerinin olduğuna işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: Koyun, endometrium, embriyo implantasyonu, epigenetik, histon modifikasyonu, kromatin yeniden modelleme.

SUMMARY

Investigation of mRNA profiles of histone modification enzymes and chromatin remodeling factors in endometrium during peri-implantation stage: sheep model

Caglayan OZEL

Supervisor: Prof. Dr. Tulin CORA

Department of Medical Genetics

PhD Thesis / Konya-2020

The early pregnancy period involves critical events for maintaining a successful pregnancy which leads to communication between mother and offspring, maternal recognition and acceptance of pregnancy, embryo implantation to maternal uterus, and formation of the placenta. Differentiated gene expression during pregnancy is controlled by the effect of estrogen and progesterone hormones.

Epigenetic mechanisms regulate cellular gene expression changes without alteration in the DNA sequence. Gene expression is associated with physiological events such as transformation, differentiation, development, angiogenesis, regeneration, and endometrial remodeling of the cyclic-pregnant endometrium. However, the role of epigenetic mechanisms in the endometrium has not yet been fully elucidated. In this thesis study, our objective was to investigate the expression profiles (mRNA) of epigenetic histone modification enzymes and chromatin remodeling factors in ovine early pregnancy model during the peri-implantation stage (3 experimental groups: day 12; prior to implantation / day 16; firm adhesion / day 22; invasion or post-implantation / compared to corresponding cyclic group as a control; totally 6 groups, n = 4 each group).

As a result of the study, total of 67 gene regulations were recorded, in which 45 target genes were statistically meaningful in 6 different groups in cyclic and pregnant. While arrangements for 12 targets were found in the cycle, 38 regulations were identified among pregnant groups. A total of 17 regulations were recorded between cycle-pregnant groups. Although some of the targets investigated were found to be meaningful arrangements in relation to embryo independently of progesterone, AURKA and AURKB which has 2-10 changes, came to the fore as a result of this study. In conclusion, the findings obtained as a result of the study point to the dynamic roles of epigenetic mechanisms that control gene expressions during the estrous cycle and early pregnancy in ovine endometrium.

Keywords: Sheep, endometrium, embryo implantation, epigenetic, histone modification, chromatin remodeling.

1. GİRİŞ

Gametlerin fertilizasyonunu takiben devam eden ovidukt uterus geçişi, implantasyon öncesi uterus içi mobilize süreci, maternal kabul ve embriyo implantasyon olaylarını kapsayan periyot (yaklaşık olarak ilk 20 gün), koyun model organizması için erken gebelik dönemi olarak bilinmektedir (Spencer ve ark 2004). Gebeliğin oluşumu (establishment of pregnancy); endometrial reseptivite ve embriyo implantasyonu olmak üzere gebelik fizyolojisi çerçevesinde başlıca iki önemli süreci kapsar. Fertilizasyon sonrası maternal kabul ve embriyonun uterusa implantasyonu başarılı bir gebelik için hayati önem arz etmektedir. Türlere özgü birtakım değişikliklerle birlikte erken gebelik döneminde gerçekleşmesi gereken kabul ve implantasyon süreçleri hassas ve kompleks bir sistem dahilinde yürütülmektedir. Maternal kabulün endokrinolojik arka plan dahilinde çeşitli genlerin regülasyonu ile gerçekleştiği yapılan çalışmalar neticesinde bildirilmiştir (Arosh ve ark 2004). Hassas ve sıkı biçimde yönetilen implantasyon süreci gebeliğin kabulüne müteakip başlamakta (türlere özgü birtakım farklılıklarla birlikte) ve aksadığında gebelik kayıplarına varabilen komplikasyonlara neden olabilmektedir.

Başarılı bir gebelik süreci dahilinde gebeliğin oluşumu ve devamlılığının sağlanması esastır. İmplantasyon hataları fertilizasyon sonrası gebelik kayıpların sebepleri arasında önemli bir yere sahiptir. Bu bağlamda embriyo implantasyonu gebeliğin sürdürülebilmesi adına kritik bir süreç olarak ön plana çıkmaktadır. Yapılan fonksiyonel çalışmalar ile embriyo implantasyon süreci dahilinde gerçekleşen fizyolojik olaylar ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Ancak implantasyon fizyolojisini yöneten epigenetik mekanizmalara ilişkin çalışmalar literatürde çok sınırlıdır. Bu çalışma kapsamında histon modifikasyonunda ve kromatin yeniden modellenmesinde görev alan ve literatürde ön plana çıkan bazı moleküllerin, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) ile komplementer DNA (cDNA) / mesajcı RNA (mRNA) seviyesinde araştırılması hedef alınmıştır. Böylece erken dönem gebelik kayıplarına üretilebilecek olası çözüm önerilerine zemin hazırlanması hedeflenmiştir. Çalışmaya konu olan epigenetik unsurların mRNA seviyelerinin peri-implantasyon sürecinde düzenlendikleri hipotezi (H1) çalışma planlanırken varsayılmıştır.

1.1. Erken Gebelik Dönemi

Ovumun fertilizasyonu ile oluşan zigot, gelişim ve farklılaşma adına birtakım kritik süreçlerden geçer. Başarılı bir gebeliğin gerçekleşebilmesi için ovum gelişimini de kapsayan bu süreç erken gebelik döneminde ve sonrasında da devam eder (Li 2002). Oogenez esnasında maternal transkriptlerin depolanması, fertilizasyon ve sonraki döneme ilişkin pronükleus oluşumu, yeni kuşağa aktarılan parental genomların yeniden programlanması, embriyonik genom aktivasyonu kritik basamaklar olarak bu sürece dahildirler. Siklusun ve gebelik döneminin yürütülmesi endokrinolojik değişimlerin hassas dengesi ile gerçekleşir. Gonadotropin uyarımlarına cevaben salınan ovaryan steroidler östrus siklusunun endokrinolojik dinamiklerini yönetirler (Yen ve ark 1975). Ovulasyonu takiben şekillenen Corpus hemorrhagicum'un luteinleşmesi ile gelişen Corpus luteum (CL), progesteron (P4) kaynağı olarak işlev görür (Anderson ve Clarke 2004). P4 bu kritik sürecin yönetiminde etkin rol oynamaktadır. Gebeliğin sürdürülebilmesi için P4 kaynağı olan CL'nin devamlılığı, luteolizin engellenmesi gerekmektedir ancak reprodüktif endokrinoloji adına türlere özgü birtakım farklılıklar bulunmaktadır.

Uterus östrojen ve progesteron etkileri ile regüle edilen bir organdır. Endometrium gebelik şekillendiğinde embriyo ile iletişim sağlayan, uterusun lümen kısmıdır. Siklik dönemde ve gebelikte anatomik yapısı ve fizyolojik fonksiyonları ile üreme sistemi açısından önemi kabul görmüş uterus katmanı olması, çalışma materyali olarak endometriumun kullanılmasını desteklemektedir. Prosgesteron ve östrojen endometriumdaki gen ifadesini etkileyen ana faktörlerdendir. Endometriumda gen ifadesinin düzenlenmesi; gebeliğin maternal kabulü ve embriyonun uterusa implantasyonu sürecinde hayati öneme sahiptir (Salilew-Wondim ve ark 2012). Gebeliğe hazırlık ve embriyoya uygun ortamın hazırlanması için birtakım genler aktive olurken, bazı genler ise baskılanmaktadır. Bu değişimler neticesinde endometrium başarılı bir gebelik sürecine hazırlanmaktadır (Klein ve ark 2011).

Ovaryan steroidler endometriumun değişim sürecini uyaran ana unsurlardır. Endometrium östrojenik etki altında gerçekleşen proliferatif dönemde ve P4 etkisi altında gerçekleşen sekretuar dönemde biyokimyasal, histolojik ve fizyolojik açıdan birbirinden farklılıklar arz etmektedir. Bu farklılıklar oluşurken hücresel düzeyde alınan uyarımlara (örn; P4) yanıtların oluşturulması transkriptomik değişimler

üzerinden gerçekleştirilmektedir. Endometrium erken gebelik döneminde de yeniden modellenir. Bu yeniden modellenme süreci sıkı denetimlerle yürütülen ve dinamik bir yapıya sahip olan hüceresel transkriptomun değişimleri ile ortaya çıkar. Yapılan araştırmalar neticesinde hem östrus siklusunda hem de erken gebelik döneminde endometriumda gen ekspresyonunda günlük değişimler olabildiği açığa çıkarılmıştır (Guzeloglu ve ark 2004, Guzeloglu ve ark 2009, Atli ve ark 2010, Atli ve ark 2011, Atli ve ark 2012, Guzeloglu ve ark 2013).

Mikroarray teknolojisinin keşfi ile diğer alanlarda da olduğu gibi çeşitli memeli türleri üzerinde yapılan araştırmalar ile endometrial transkriptomik değişimler hızla açığa çıkmaya başlamıştır. Domuzlarda yapılan bir çalışmada siklusun ve gebeliğin 15. gününde 589 genin endometriumda farklı davrandığı rapor edilmiştir (Franczak ve ark 2013). Kısraklarda gebeliğin 12. günü ile siklusun 12. günü arasında gerçekleştirilen mikroarray çalışması neticesinde endometriumda 332 genin ekspresyonunun gebelikte artış gösterdiği, 42 genin ekspresyonunun ise gebelikte azaldığı bildirilmiştir (Merkl ve ark 2010). Çeşitli memeli türleri üzerinde gerçekleştirilen siklusta ve erken gebelik döneminde maternal endometriumda ciddi transkriptomik düzenlenmelerin olduğu yönünde bildirimlerin yapıldığı çalışmalar, bahsi geçenlerle de sınırlı değildir (Van Hoeck ve ark 2015, Zhu ve ark 2015, Killeen ve ark 2016). Araştırmalar neticesinde siklus veya erken gebelikte (uterusun yeniden modellenme sürecinde) regüle edildiği rapor edilen genler, birbiri ile ilgili veya bağımsız fizyolojik sistemlerle ilişkili olabilmektedir. Siklusta ve erken gebelikte düzenlendiği rapor edilen bu genlere ilişkin fonkisyonel araştırmalar farklı çalışmalara zemin oluşturmaktadır. Böylece fizyolojik sürece olan katkıları ve önemleri aydınlatılmaktadır. Ancak maternal endometriumda embriyo implantasyon döneminde kimi hayati önem arz eden kimi sistemin devamlılığında minimal rol alan gen ürünlerinden oluşan endometrial transkriptom üzerine çalışmalar yapılarak temel hatları ile ortaya çıkarılmış olsa da, onu regüle eden epigenetik mekanizmalar henüz aydınlatılmış değildir (Merkl ve ark 2010, Franczak ve ark 2013, Van Hoeck ve ark 2015, Zhu ve ark 2015, Killeen ve ark 2016).

Endometrium steroid hormonlara bağımlı olan ve onlara yanıt veren bir uterus katmanıdır. Türlere özgü birtakım farklılıklarla birlikte endometrium östrus siklusunda morfolojik, biyokimyasal, fonksiyonel olarak, proliferasyon, farklılaşma, dokusal bozunum (yenilenme öncesi), kanama ve yenilenme gibi değişikliklere uğrar.

Bu değişiklikler, endometrial traskriptom olarak ortaya çıkan ve başlıca östrojen ve progesteron tarafından düzenlenen bir çok gen tarafından yönetilmektedir (Talbi ve ark 2006). Bu alanda gerçekleştirilen mikroarray temelli ekspresyon çalışmaları endometrial fizyolojinin dinamiklerinin kavranabilmesi adına katkılar sunmaktadır (Mirkin ve ark 2005, Cao ve ark 2007, Shimizu ve ark 2010, Mazur ve ark 2015). Siklusun belirli dönemlerinde spesifik olarak aktivitesinde artış veya azalmalar olan birtakım genlerin belirlenmesi, bu durumun östrojenik veya progestatif etkiden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Shimizu ve ark 2010). Endometriumda gen ekspresyonunun düzenlenmesi, gebeliğin maternal kabulü ve embriyonun uterusa implantasyonu sürecinde hayati öneme sahiptir (Salilew-Wondim ve ark 2012). Aynı zamanda gebeliğe hazırlık ve embriyoya uygun ortamın hazırlanması için birtakım genler aktive olurken, bazı genler ise baskılanmaktadır. Bu değişimler neticesinde endometrium başarılı bir gebelik sürecine hazırlanmaktadır (Klein ve ark 2011).

1.1.1. İmplantasyon süreci

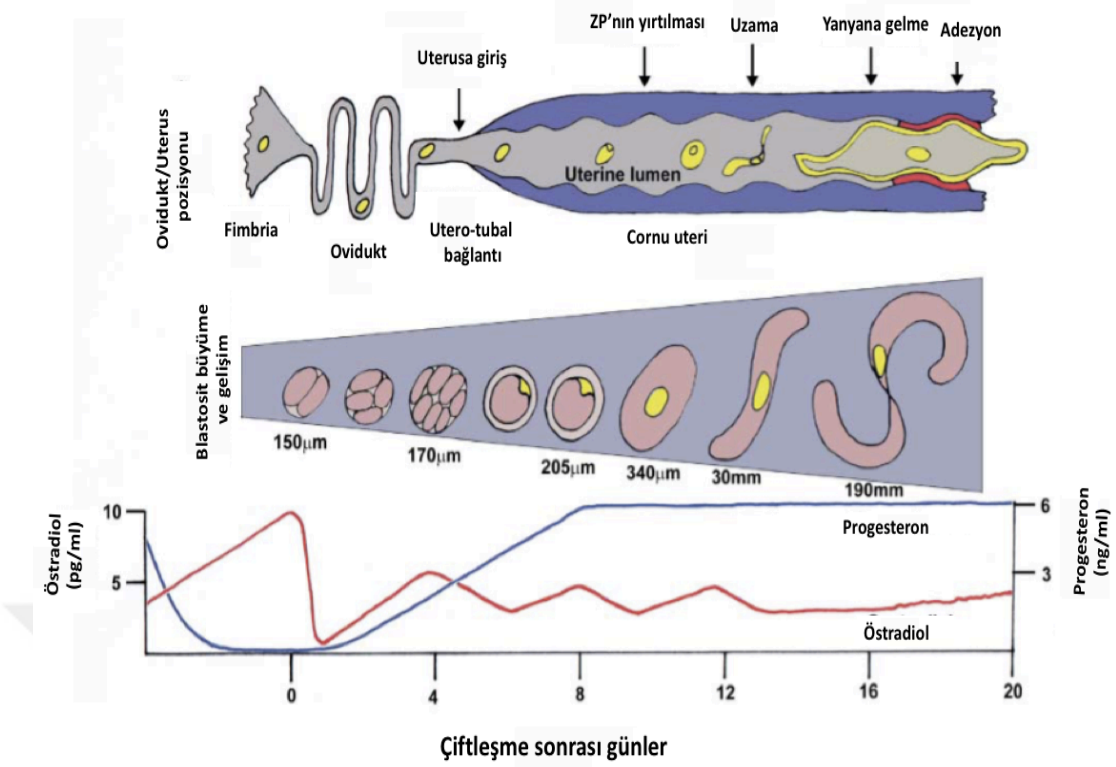
Vivipar organizmalarda gerçekleşen embiyo implantasyonu, konseptusun (embryo/fetus ve ekstra embriyonik membranlar) beslenmesinin ve korunmasının devamlılığını gerektirir. Günümüzde plasentalı memeli türleri arasında implantasyon süreçlerinde kayda değer farklılıklar olduğu bilinmektedir. İmplantasyon ve plasentasyon stratejisindeki bu farklılıklara rağmen başlangıçtaki olayların trofoblast ve maternal endometrium arasında gerçekleşmesi türler arasındaki ortak noktadır (Spencer ve ark 2004). İnsanlarda yapılması planlanan çalışmların örnekleme güçlüğü ve etik sorunlar göz önünde bulundurulduğunda model organizmalar ön plana çıkmaktadır. Koyun türü reprodüksiyon fizyolojisine yönelik araştırmalarda model organizma olarak tercih edilmektedir (Comim ve ark 2015, Davis ve ark 2015, Sawant ve ark 2015, Wei ve ark 2016). Fertilite parametrelerinin diğer (yüksek yapılı) türlere nazaran daha yüksek olması, sevk ve idare kolaylığı ve amaçlanan fizyolojik sürecin (embriyo implantasyonu) koyun dahil olmak üzere diğer bazı evcil memeli türlerinde ve insanda gerçekleşiyor olması (birtakım farklılıklarla birlikte) model organizma seçiminde koyun türünü ön plana çıkarmaktadır. Bu bağlamda planlanan çalışma için model organizma olarak koyun seçilmiştir. Ruminantlarda gebeliğin oluşumu peri-implantasyon periyodunda gerçekleşmekte ve endometrial luteolizin baskılanması ile corpus luteumdan P4 üretiminin devamlılığının sağlanmasını kapsamaktadır.

Uterus ile uzamakta olan konseptusun karşılıklı interaksiyonları embriyo implantasyonu ile sonuçlanmaktadır. Embriyonun anti-luteolitik etkinliği, trofoblastlar tarafından üretilen interferon tau (IFNτ)'nun endometrial epitelde oksitosinin reseptör artışını baskılaması ve böylece luteolitik prostaglandin F2 alfa salınımını bozması ile gerçekleşmektedir. Konseptusun boyuna uzaması IFNτ üretimi için kritik önem arz etmektedir (Farin ve ark 1989, Guillomot vd, 1990, Gray ve ark 2002).

Koyun türü için blastosit aşamasında trofektoderm, hormonal olarak regüle edilen uterin reseptivite (uterine receptivity) başlangıç alanı olarak görülen endometrial epitele tutunum (attach) ve yapışma (adhere) yeteneği kazanmaya başlar. Eğer blastosit gelişimi uterin reseptivite ile senkronize biçimde gerçekleşir ise trofektodermin apikal yüzeyinde adezyon kaskadı başlatılır ve süreç konseptusun implantasyonu ile sonuçlanır (Spencer ve ark 2004).

Oviduktta gerçekleşen fertilizasyon sonrası morula evresindeki embriyo uterusa giriş yapar (4. gün). Gebeliğin 6. gününde blastosit şekillenir ve 8-9. günlerde zona pellucida (ZP) açılır/yırtılır. Blastosit sferik formdan tubüler forma dönüşür (11.gün). On iki ile on altıncı günler arasında uzama dönemi başlar ve filamentöz bir konseptus oluşur. Konseptusun uzaması; yan yana gelme, geçici tutunum (12-15. günler) ve sıkı adezyonu (16. gün) içeren implantasyonun başlamasına işaret eder (Spencer ve ark 2004).

İmplantasyon süreci konu edinilen türe özgü doğası ile farklılıklar arz edebilmektedir. Koyun türü için embriyo implantasyonu ve öncesi hazırlık süreçleri beş başlık altında sınıflandırılmıştır; zona pellucida'nın yırtılması (shedding of zona pellucida), ön temas ve blastosit oryantasyonu (precontact and blastocyst orientation), yan yana gelme (apposition), yapışma (adhesion), endometrial invazyon (endometrial invasion). Endometriuma fiziksel olarak sıkı tutunum gebeliğin 16. gününde başlar, 22. günde invazyon tamamlanmaktır (Boshier, 1969, Guillomot ve ark 1981). Embriyonun ana rahmine implantasyonu böylece gerçekleşmiş olur.



Şekil 1.1. Koyunda fertilizasyon sonrası (erken gebelik döneminde) gerçekleşen olaylar (Spencer ve ark 2004).

1.2. Gen ifadesinin Düzenlenmesi

Gen ifadesi çeşitli mekanizmaların kontrolünde yürütülmektedir. Bu mekanizmalardan biri olan kromatinin yapısal modifikasyonları gen ifadesinin düzenlemesine ilişkin büyük rol üstlenmektedir (Grimaldi ve ark 2012). Ayrıca gen ifadesi birtakım mikro RNA ve long non-coding RNA molekülleri ile transkripsiyon sonrası düzenlenmektedir. Bu süreç gen ifadesinin post transkripsiyonel düzenlemesi olarak bilinmektedir (Tang ve ark 2012). Epigenetik mekanizmaların bir kısmı gen ifadesinin kontrolüne yönelik transkripsiyon öncesi süreçte işlev görürler. Bu mekanizma için hedef, gen ürünleri olan mRNA'lardan ziyade üzerinde gen bölgelerini de bulunduran kromatinin kendisidir (Strome ve ark 2015).

Gen ifadesi ve translasyon yüksek düzeyde dinamizme sahiptir ve fizyolojik sinyallere anlık yanıtların oluşumuna imkan verir. Alınan sinyallere ilişkin hücrede aktive edilen yolakların niteliğine bağlı olarak spesifik genlerin transkripsiyonları gerçekleşir. Gen ekspresyonu hücrelere gelen çeşitli sinyaller ve çevresel uyaranların etkileri altında muazzam bir denge ile yürütülmektedir. Bir fizyolojik tabloya ilişkin gerekli olan transkriptomun üretimi çeşitli mekanizmaların kontrolü altında gerçekleşir. Gen ekspresyonunun regülasyonunda epigenetik mekanizmalar kritik

önem arz etmektedir (Holliday 1994). Epigenetik, DNA içeriğinde (miktar) veya baz diziliminde herhangi bir değişim olmaksızın, hücre/organizma fenotiplerinin kalıtılabilir değişimlerini simgeler. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, non-coding RNA etkileşimleri, transkripsiyon faktörleri iletişim ağı epigenetik mekanizmalar içeresinde yer almaktadır (Holliday 2006).

Hücre içerisinde kendisi için ayrılan bölümde sorunsuz bir biçimde lokalize olabilmesi adına DNA, yapı itibari ile paketlenmek durumundadır (Kornberg 1974). Paketlenme yapısı hücre aktivitesine bağlı olarak hücre siklusunda farklılıklar arz etmektedir (Cremer ve ark 1982). Mitotik aktivite başladığında özellikle prometafaz ve metafaz evrelerinde DNA sıkı bir biçimde paketlenerek kromozomları oluşturmaktadır. Paketlenme organizasyonu hücre bölünmesi dışında nispeten daha gevşektir ve kromozom oluşumu söz konusu değildir. DNA elementer ipliği histon proteinlerinin bir araya gelmesi ile oluşan nükleozomlara sarılı haldedir (Luger ve ark 1997, Kornberg ve Lorch 1999). Nükleozomlar Histon 1, 2A, 2B, 3, ve 4 alt birimlerinin iştiraki ile oluşur. Nükleozom oluşumuna katılan histon proteinlerinde H1 dışındakiler ikişerli kompleksler olarak bulunurlar; böylece 9 histonik protein ile nükleozom yapısı şekillenmiş olur (Thomas 1999). Bazı histon proteini varyantları bulunmaktadır ki bu yapılar hücrenin belirli dönemlerinde özel fonksiyonlar için devreye girerler (Li ve Zhu 2015). Nükleozomlar arasında elementer iplik linker DNA olarak işlev görür. Nükleozomlar kıvrımlı bir yapı ile solenoid formasyonuna katılırlar. Solenoid paketlenme yapısı hücrenin bölünme dışı biyolojik aktive gösterdiği dönemlerde (interfaz) DNA'nın aktif bölgelerinde hakimdir (Robinson ve ark 2006). Hücrenin organizmada bulunduğu bölge ve zaman ile ilişkili olarak üstendiği sorumluluklar sebebi ile DNA'nın belirli kısımları daha sıkı paketlenmektedir. Solenoid yapıdaki DNA SAR (Scaffold Attachment Region) bölgeleri aracılığı ile Scaffold protein iskelesi iştirakinde bulunur. Bu esnada loop yapan DNA'yı bir arada tutmak için linked proteinleri görevlidir. Solenoid yapıdaki DNA yay katlanmaları ile kromatin ipliği oluşturur. Kromatin iplik helezonik katlanmalar ile kromatid yapısını meydana getirir, kromatidler bir araya gelerek kromozomları şekillendirir (Prometafaz/Metafaz). DNA'nın aktif çalışacak kısımları daha gevşek halde paketlenirken, pasif kalacak kısımları daha sıkı bir biçimde paketlenmektedir (Cremer ve ark 1982, Kornberg ve Lorch 1991, 1992). Bu paketlenme yapısı gen ekspresyonları için muazzam düzeyde öneme sahiptir.

Paketlenme yapısından ziyade daha dinamik olarak regüle edilen histon modifikasyonları gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır. Bu mekanizma bünyesinde çeşitli enzim sistemleri çalışmaktadır.

Histon modifikasyonları ile DNA'nın paketlenme yapısı değiştirilebilmektedir. Bu durum organizma için zaman ve doku/organ bağımlı olarak değişim göstermektedir. Yaşamın belirli dönemlerinde aktif olan genler, diğer dönemlerde sessizleştirilebilmektedir (Koster ve ark 2015). Organizmada bulunan genlerin bir kısmı bulundukları bölgede ifade olurken, bir kısmı da kapalı konumda (heterokromatin) bulunmaktadır. Sindirim için gerekli enzimleri kodlayan genlerin sindirim sisteminde aktif bir şekilde çalışırken, solunum sisteminde ifadelerinin yapılmaması yine epigenetik mekanizmalar ile yürütülmektedir. Epigenetik mekanizmalar çerçevesinde histon modifikasyonları ve DNA paketlenme yapısı bu süreci yönetmektedir, aksi halde ektopik/heterokronik gen ekspresyonu gerçekleşebilir. Bulundukları bölgede yaşamın belli dönemlerinde aktivite göstermesi gereken genlerin düzenlenmesi için histon modifikasyon enzimleri ve remodeling faktörleri aktif rol oynamaktadırlar (Shchuka ve ark 2015). Kromatin kurulumunda, yeniden modellenmesinde ve modifikasyonlarında görev alan bu moleküller ile ilişkili olarak çeşitli hastalıklar da bildirilmiştir. Bu hastalıkların patogenezleri homeostazın sürdürülebilmesi için gerekli olan transkriptomun fizyolojik sınırlardan uzaklaşması ile ilişkilidir. Bu tablonun altında yatan neden DNA metilasyonları, kromatin kurulumu, modifikasyonu ve yeniden modellenmesindeki sapmalardır. Rett (Methyl CpG Binding Protein 2/MECP2), Rubinstein-Taybi (CREB Binding Protein /CREBBP), Coffin-Lowry (Ribosomal Protein S6 Kinase, 90kDa, Polypeptide 3/ RPS6KA3) sendromları, adı geçen moleküllerle ilişkileri tespit edilmiş olan ve bu duruma örnek teşkil eden patolojilerden sadece bir kaçıdır (Milani ve ark 2015, Kim ve ark 2016a, Labonne ve ark 2016). Henüz kimliklendirilmemiş veya ilişkileri açığa çıkarılamamış hastalık tablolarının da olabileceği ön görülmektedir. Bozuklukları yaşamı tehdit edebilen ve yaşam kalitesini etkileyen bu moleküller çok sayıda olmasına rağmen bir kaç aile dışında belirli bir kısmının fonksiyonları henüz tam manası ile anlaşılamamıştır. Bu tez çalışması kapsamında, diğer fizyolojik sistemlerde önemi nispeten belirtilmiş olan bazı epigenetik moleküller, embriyo implantasyonu döneminde (erken gebelik) ve siklusta (gebelik dışı) mRNA (cDNA) seviyesinde karşılaştırılmıştır.

1.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyon/demetilasyonları, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden modellenmesi transkripsiyon öncesi gen ekspresyonu regülasyon mekanizmaları arasında yer alırlar. DNA metil transferaz (DNMT) ailesi DNA'nın kalıtsal ve de novo metilasyonlarından sorumludur. Bu aile içerisinde DNMT1, DNMT3A, DNMT3B biyolojik önemleri ile araştırmalarda ön plana çıkmaktadırlar. DNMT1 hücrenin var olan metilasyon profilini o hücreden orijin alan yavru hücrelerde devamlılığının sağlanmasında rol alır; replikasyon neticesinde oluşan yeni zincirler üzerinde oluşturulacak metilasyonlardan sorumludur. DNMT3A ve DNMT3B DNA'nın *de novo* metilasyonunda görev alırlar (Lyko ve ark 1999, Okano ve ark 1999). DNMT enzimlerinin aktivitelerinin değişimleri birtakım patolojilerle ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark 2015, Kala ve ark 2015).

Siklusa bağlı olarak endometriumda mRNA seviyesinde yapılan araştırmalarda DNMT ekspresyonlarında siklik değişimlerin gözlenmediği rapor edilmiştir (Yamagata ve ark 2009). Protein seviyeleri araştırılan DNMT ailesi üyelerinden 3A ve 3B siklus boyunca istikrarlı görünse de, DNMT1'in ekspresyonunun desidualize endometriumda azaldığı tespit edilmiştir. Aynı çalışmada DNA metilasyonu ile progesteron reseptör ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyonun bulunduğu da rapor edilmiştir (Ghabreau ve ark 2004). DNMT ekspresyonlarındaki siklik değişimler DNA metilasyonunun siklusa bağlı olarak regülasyonuna işaret etmektedir. Ancak bu bilgi sürpriz değildir, çünkü; proliferasyondan sorumlu genler, farklılaşma yolaklarında görev alan genler gibi siklusa bağlı olarak bir çok genin ifadesi değişmektedir (Houshdaran ve ark 2011). DNA metilasyonunun endometrial kabul sürecine (receptivity) ve desidualizasyona dahil olduğu yapılan araştırmalar neticesinde rapor edilmiştir (Uchida ve ark 2005, 2006, 2007, Rahnama ve ark 2009, Logan ve ark 2010). Özellikle erken gebelik döneminde başarılı bir gebelik süreci adına aktivite gösteren endometrium dokusu üzerinde, DNMT ailesinin implantasyon sürecinde araştırılması, global metilasyon paterni ve endometrial hücrelerin genom aktivitelerini yansıtan belirteçler olarak düşünülerek, çalışma kapsamına dahil edilmiştir.

1.2.2. Histon Asetilasyonu

Histon asetil transferaz (HAT) ailesi, histon modifikasyonları adına histon proteinlerinin lizin amino asitlerine asetil grupları ekleyerek işlev görür. Asetilasyon modifikasyonu histon translasyonu sonrasında gerçekleşir. HAT'lar ökromatin ile ilişkilidirler ve kromatini ulaşılır kılarak, transkripsiyon faktörlerinin etkilişimini kolaylaştırarak artmış transkripsiyonel aktiviteye yol açarlar (Marmorstein ve Roth 2001). Asetil transferaz ailesi nükleer reseptörler gibi non-histon proteinlerini de asetilleyerek gen ekspresyonunu pozitif yönde regüle edebilir (Carrozza ve ark 2003, Glozak ve ark 2005). Diğer kromatin modifiye edici enzimler açısından olduğu gibi endometrium biyolojisine yönelik önemleri henüz net bir şekilde aydınlatılamamış olsa da belirli çalışmalarda araştırılmışlardır. HAT ailesi üyelerinden olan Nuclear Receptor Coactivator 1 (NCOA1 / SRC-1) ekspresyonunun endometriumda siklus boyunca varlığı tespit edilmiş, ayrıca siklusun başlangıç döneminde ekspresyonunda artış olduğu rapor edilmiştir (Wieser ve ark 2002). Bunun yanı sıra immunohistokimyasal boyama ile yapılan bir araştırmada NCOA1 ekspresyonunun endometriumda siklusun luteal fazında östrojen reseptör (ER) α ve progesteron reseptör ekspresyonuna paralel olarak azaldığı bildirilmiştir (Shiozawa ve ark 2003). NCOA1 susturularak gerçekleştirilen araştırmada östrojen ile indüklenen hücre proliferasyonu ve ER ekspresyonunun ortadan kalktığı gözlemlenmiştir (Amita ve ark 2010).

1.2.3. Histon Metilasyonu

Histon metilasyonu epigenetik gen regülasyonunda rol oynamaktadır. Histon metil transferaz (HMT) ailesi histon proteinlerinin post-translasyonel modifikasyonlarında görev alırlar. Bu aile üyeleri nüklezom alt birimlerinden olan H3 ve H4'ün spesifik olarak lizin ve arjinin amino asitlerine metil grupları eklerler (Wood ve Shilatifard 2004). Metil grubunun eklendiği histon proteini ve amino aside ayrıca eklenen metil grubu sayısına bağlı olarak gen ekspresyonu üzerine oluşturulan etki farklılık arz etmektedir. Ayrıca, spesifik histon metilasyonları belirli kromatin remodeling kompleksler için işaretler olarak fonksiyon görmektedir. Örneğin; genlerin promotör bölgesinde yer alan H3 lizin 9 metilasyonu bu genlerin yüksek düzeyde (aşırı) çalışmasını önlemektedir (Chen ve ark 2010). SET domain proteinleri histon metiltransferaz aktivitesi gösterirler (Trievel ve ark 2002, Wood ve Shilatifard 2004).

HMT ailesi üyelerinden DOT1-Like Histon H3K79 Metiltransferaz (DOT1L) ekspresyonun germinal vezikülde ve 1, 2, 4 hücreli embriyo gelişimi boyunca azaldığı ve blastosit aşamasında artışa geçtiği bildirilmiştir (Ooga ve ark 2013).

1.2.4. Histon Fosforilasyonu

Histon fosforilasyonun gen aktivitesinin düzenlemesinde direk ve dolaylı olarak etkili olduğu çeşitli araştırmalar neticesinde rapor edilmiştir (Metzger ve ark 2008, Lau ve Cheung 2011). Transkripsiyonel aktivitenin düzenlenmesi için fosforilasyon diğer histon modifikasyonları ile koordine olarak rol oynayabilmektedir (Lo ve ark 2000, Zhong ve ark 2003). Yapılan bir çalışmada protoonkogen olan c-fos, c-jun ve c-myc genlerinin transkripsiyonel aktivitelerinin Histon 3 fosforilasyonlarıyla regüle edildiği bildirilmiştir (Lau ve Cheung 2011). Histon fosforilasyonu aynı zamanda DNA paketlenmesi ve kromatin kondensasyonunu ile ilişkilendirilmektedir (Wei ve ark 1998, de la Barre ve ark 2000). Aurora kinaz A (AURKA) ekspresyonunun sekratuar faza oranla proliferatif fazda arttığı bildirilmiştir. Ayrıca AURKA'nın endometrial kanserlerin tedavisi için bir hedef niteliği taşıdığı ve paclitaxel ile kombine edilen AURKA inhibitörlerinin tedavi etkinliğini arttırdığı rapor edilmiştir (Umene ve ark 2015).

1.2.5. Histon Ubikutinasyon

Histon post translasyonel modifikasyon işlemlerinden biri olan ubikutinasyon yıllar önce keşfedilen bir mekanizma olmasına rağmen halen hakkındaki bilgiler asetilasyon ve metilasyon kadar netlik kazanmış değildir (Goldknopf ve ark 1975, Cao ve Yan 2012). Histon ubikutinasyonunun gen ekspresyonu üzerine olan etkisi tek yönlü değildir. Belirli durumlarda susturucu faktörlerin kromatine bağlanması için kromatin işaretleri olarak fonksiyon görebilir. Histon ubikutinasyonun diğer yandan farklı mekanizmalar ile gen aktivitesi üzerine trankripsiyonel artışa veya aksine baskılanmaya yol açabildiği bildirilmiştir (Zhang 2003, Laribee ve ark 2007). Ubikutinasyonun histon metilasyonu gibi diğer histon modifikasyonlarının gerçekleşebilmesi adına gerekli olan öncü basamak niteliği taşıyabileceği yapılan çalışmalar neticesinde bildirilmiştir (Dover ve ark 2002, McGinty ve ark 2008).

1.2.6. Histon Demetilasyonu

DNA/histon metilasyonları transkripyonel aktivitenin düzenlenmesine yönelik önemli rol oynarlar. Demetilaz enzimleri içerisinde ilk keşfedilen LSD1'dir ve sonra Lizin (K)-Spesifik Demetilaz 1A (KDM1A) olarak adlandırılmıştır. DNA/histon metilasyonları bir süre geri dönüşümsüz/kalıcı olarak düşünülmüştür. Ancak, demetilaz enzimlerinin keşfi ile birlikte bu varsayım ortadan kalkmıştır (Shi ve ark 2004). Yapılan araştırmaların sonuçları metilasyonların geri dönüşümlü olduğunu desteklemektedir (Cuthbert ve ark 2004). Histon demetilaz enzimlerinin hücresel farklılaşma, ovum gelişimi ve embriyogenez gibi biyolojik süreçlerde kritik roller üstlendikleri bildirilmiştir (Pedersen ve Helin 2010). Farklı fizyolojik sistemlerde araştırılmış olan LSD1, reprodüksiyon açısından etraflıca incelenmemiş olsa da desidualize endometriumda ekspresyonunun (protein) arttığına dair bildirim bulunmaktadır (Guo, 2012). Demetilaz enzim genlerine ilişkin yapılan fonksiyon çalışmasında, farelerde susturulan demetilaz enzimlerinin embriyonik ölümlere sebep olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark 2007).

1.2.7. Histon Deasetilasyonu

Histon deasetilaz ailesi üyeleri, histon proteinlerinin yapısındaki lizin amino asitlerinin amino uçlarında yer alan asetil gruplarını kaldırarak işlev görürler. Deasetilasyon ile DNA'nın paketlenme yapısı değişime uğrar. Asetilasyon neticesinde uzayan kromatin, deasetilasyon ile kısalır. Histon deasetilasyonu ile modifiye edilerek daha sıkı şekilde paketlenmiş olan kromatinin gen aktivitesi üzerine olan etkisi transkripsiyonel baskılanma şeklindedir (Zupkovitz ve ark 2006). Transkripsiyonel aktiviteyi negatif yönde regüle eden histon deasetilaz (HDAC) ailesi üyelerinden HDAC1 ve HDAC3 ekspresyonu siklus boyunca kararlı olarak gözlenmiştir, ancak; HDAC2'nin luteal dönemde arttığı protein seviyesinde yapılan bir araştırma sonucunda bildirilmiştir (Krusche ve ark 2007). Östrojen ve progesteron ile kültür edilmiş endometrial stromal hücrelerde histon deasetilaz inhibitörü kullanılarak, desidualizasyon markırları olan Insulin Like Growth Factor Binding Protein-1 ve prolaktin ekspresyonları değerlendirilmiştir. İnhibitör kullanımı doz bağımlı olarak desidualizasyon markırlarının ekspresyonlarının artışlarını pozitif yönde uyarmıştır (Sakai ve ark 2003). *In vitro* implantasyon assay yapılan başka bir çalışmada histon

deasitalaz inhibitörlerinin gelecekte infertilitenin tedavisinde kullanılabileceklerini bildirilmiştir (Uchida ve ark 2007).

1.2.8. Kromatin Yeniden Modelleme (remodeling)

Methyl-CpG DNA binding domain (MBD) proteinleri

Spesifik olarak DNA üzerindeki metil-CpG'lere bağlanabilen proteinlerdir. Kimliklendirilmiş farklı MBD proteinleri olmalarına rağmen ortak noktaları; korunmuş olarak yapılarında bulanan metil-CpG bağlanma birimidir (domain). Temel epigenetik mekanizma olarak bilinen DNA metilasyonu, bazı durumlar için öncü sinyal niteliği taşıyabilir. MBD proteinleri ile oluşturulan sinyaller, histon deasetilasyonu ve metilasyonu gibi kromatin yapısal değişimlerine yol açarak, üzerinde bulunan gen bölgelerinin ifade düzeylerini tamamen sessiz duruma kadar baskılayabilir (Şekil 2). Bu durumun ortaya çıkmasında repressörler gibi birçok aksesör moleküller de rol oynayabilir (Jones ve ark 1998). Menstrual siklusta araştırılan MBD proteinlerinden MBD1 ve Metil CpG bağlanma proteini 2 (MeCP2)'nin siklusta stabil davranmasına rağmen MBD2 ekspresyonunun proliferatif dönem ile karşılaştırıldığında sekretuar fazda artış gösterdiği rapor edilmiştir (Guo, 2012).

Heterokromatin protein 1 (HP1) homolog (chromobox)

DNA'nın proteinlerle oluşturduğu yapısal temaslar neticesinde kromatin iplik şekillendirilir. Kromatin ipliğin transkripsiyonel aktivitesine göre paketlenme yapısı değişim göstermektedir. HP1 proteinleri heterokromatin formasyonunda görev alırlar. Transkripsiyonel olarak sessiz kalacak DNA bölgelerine bağlanarak, bu bölgelerin sıkı biçimde paketlenmesi için modifikasyon komplekslerine sinyal verirler (Wreggett ve ark1994, Ma ve ark 2014). Östradiol ile indüklenerek yeterli sayıya ulaşan insan endometrial stromal hücreler, cAMP ve medroksiprogesteron asetat ile desidulize edilerek Chromobox Homolog 1 (CBX1) expresyonu araştırılmıştır; 0., 2. ve 4. günlerde stabil bir durum izlediği ve desidulizasyon sonunda 8. günde down regüle olduğu bildirilmiştir (Grimaldi ve ark 2012).

SWI/SNF kompleks bileşenleri

Moleküler biyoloji alanındaki araştırmalar neticesinde SWI/SNF nükleozom remodeling kompleksleri keşfedilmiştir (Stern ve ark 1984). Sonra birbirine alternatif iki mekanizma üzerinden etki gösterebildikleri belirlenmiştir (van Holde ve ark 2003). Gen ekspresyonu üzerine olan etkilerinin tek başlarına değil, kompleks biçimde (diğer moleküllerle birlikte) transkripsiyonel aktivite artışı şeklinde olduğu ortaya çıkmıştır. Traskripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerinin açılmasında işlev gören bu moleküllerin ayrıca ilginç bir biçimde tümör süpresör aktivitelerinin olduğu da rapor edilmiştir (Decristofaro ve ark 2001). Bu etkinin tümör süpresör genlerin baskılayıcılarının negatif regülatörleri olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Yapılarında nükleer reseptör bağlanma motifleri de bulundurabilen (örn; AT Rich Interactive Domain 1A; ARID1A) bu moleküllerin fonksiyonları henüz net olmamasına rağmen kritik süreçlerin yönetimindeki iştirakleri, onlara araştırmalar için hedef niteliği kazandırmaktadır. ARID1A'nın endometriumda progesteron reseptör ekspresyonunu pozitif yönde regüle ettiği ve erken gebelik döneminde endometrial fizyoloji için gerekli olduğu bildirilmiştir (Kim ve ark 2015).

Polycomb grup proteinleri

Hücre tipine özgü durumların oluşmasında ön plana çıkan polycomb grup proteinleri transkripsiyonel sessizleştirme ile ilişkilidir (Entrevan ve ark 2016). Embriyonik dönemde gelişim genlerinin çalışma süreçleri tamamlandıktan sonra sessizleştirilmesi için (heterokronik ekspresyonun önlenmesi) devreye girdikleri bilinmektedir (Ku ve ark 2008). Ayrıca X kromozomu inaktivasyonunda rol aldıkları ve erişkin dönemde ise retinoik asit reseptörleri ve peroxisome proliferator-activated receptor gamma gibi nüklear hormon reseptörleri aracılığı ile transkripsiyonel regülasyona dahil oldukları bildirilmiştir (Cho ve ark 2006). Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1 (ASXL1), Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma için korepresör rolü oynayarak onun adiposit farklılaşmasını indükleyici aktivitesini baskılar (Park ve ark 2011). Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit (EZH2)'nin yeterli kök hücre miktarının sağlanması ve farklılaşması için gerekli olduğu rapor edilmiştir (Rigbolt ve ark 2011). Bunun yanı sıra menstrual siklusta EZH2 ekspresyonunun (endometriumda protein seviyesinde araştırılmıştır) proliferatif dönem sonlarına doğru arttığı rapor edilmiştir (Guo 2012).

Nükleozom-remodeling ve histone deasetilaz (NuRD) kompleks bileşenleri

Transkripsiyonel koregülatör olan Metastasis Associated 1 (MTA1), hem koaktivatör hem de korepresör olarak işlev görebilmektedir. Histon deasetilaz kompleksinin bir parçası olarak transkripsiyon regülasyonunda görev alabilmektedir. BRCA1, ESR1, TFF1 ve CDKN1A gibi genlerin transkripsiyonel korepresörü iken, BCAS3, PAX5 ve SUMO2 genlerinin koaktivatörü olarak rol oynar (Balasenthil ve ark 2007, Molli ve ark 2008). WNT1 geni ekspresyonunu sitümüle eder. Bu etki WNT1 korepresörü olan SIX3'ün ekspresyonunu inhibe etmesinden ileri gelmektedir (Kumar ve ark 2010). Proinflamatuar sitokin yolağında, DNA tamir mekanizmalarının düzenlenmesinde, tümorogenez, invazyon ve metastaz yolaklarında rol oynayan MTA1, Estrogen Receptor 1/alpha (ESR1)'nın epigenetik regülasyonundan da sorumludur (Li ve ark 2009, Kang ve ark 2014). Endometrial MTA1 ekpspresyonunun proliferatif fazda daha yüksek olduğu immunohistokimya ile araştırılarak gösterilmiştir (Balasenthil ve ark 2006).

Kromodomain / helikaz / DNA-binding domain (CHD) proteinleri

ATP-bağımlı kromatin-remodeling faktörü olan Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 (CHD1), HAT kompleksi olan SAGA için substrat tanıma fonksiyonu üstlenir ve ayrıca RNA polimeraz II'nin regülasyonunda rol oynar. Daha spesifik olarak RNA polimeraz I'in transkripsiyonunun terminasyon basamağında gereklidir (Sims ve ark 2007). Transkripsiyonel regülasyon ve kromatin remodeling süreçlerine dahil olan α-thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked (ATRX) ve lymphoid-specific helicase (Lsh) aynı zamanda ATP bağımlı kromatin yeniden modelleme ve DNA helikaz aktivitesi gösteren proteinler nükleozomal DNA'yı açarak, DNMT, HDAC ve HMT'ların DNA'ya ulaşabilirliğini arttırılar böylece DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını kolaylaştırırlar (Li 2002). ATRX proteinin cinsiyet gelişminde kritik rol aldığı, dişi ve erkek gonad gelişimi ve vertebralıların erkeklerinde testis farklılaşması ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Huyhn ve ark 2011).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Saha Çalışması ve Örnekleme

2.1.1. Hayvan Materyali

Saha çalışmaları Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırmalar Enstitüsü'nde (Konya) gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamına 2-5 yaş döneminde olan, en az bir doğum yapmış, veteriner hekimler tarafından klinik olarak sağlıklı oldukları tespit edilmiş, iyi düzeyde vücut kondisyon skoruna sahip 42 baş Orta Anadolu Merinosu (Konya Merinosu) ırkı koyun ve 3 baş ergin koçtan oluşan hayvan materyali dahil edilmiştir. Çalışmadaki hayvan materyali enstitü bünyesinde yer alan yarı açık ağıllarda ve özel bireysel bölmelerde barındırılarak, enstitüde uygulanan mevcut besleme şartlarına tabi tutulmuştur.

2.1.2. Östrus Senkronizasyonu ve Gruplandırma

Çalışmada gebe ve siklik grupların her birinde 4 baş koyunun sağlanabilmesi amacıyla gebe gruplar için 8, siklik gruplar için 6 baş koyunun, östrüslerinin senkronizasyonu planlanarak toplam 42 baş koyuna senkronizasyon uygulaması yapılmıştır. Bu amaç doğrultusunda toplam 42 baş koyun üç enjeksiyon grubuna ayrılarak, ml'sinde 250 µg kloprostenole eşdeğer 263 µg kloprostenol sodyum içeren sentetik prostaglandin $F_{2\alpha}$ analoğu (PGS, Alke, İstanbul, Türkiye) 11 gün ara ile iki kez kas içi enjekte edilerek, siklusları senkronize edilmiştir. Aralarında 11 gün bulunan enjeksiyonların ilk uygulamaları, ikinci grup için birinci gruptan 4 gün, üçüncü grup için 10 gün sonra yapılmıştır (12., 16. ve 22. örnekleme günlerinin oluşturulması amaçlanarak). İkinci enjeksiyon sonrası 16. günden başlayarak günde 3 defa 30 dakika boyunca göbek bölgesi kapatılarak aşım yapması engellenmiş arama koçları kullanılarak östrus tespitleri gerçekleştirilmiştir. Arama koçu atladığında hareketsiz kalma kriterine uyularak, bu eylemin en az iki defa gerçekleşmesi neticesinde östrus gösteren koyunlar tespit edilerek, bireysel bölmelere alınmıştır (0. gün). İkinci enjeksiyon sonrası arama koçları ile hemen tespitler yapılmamış bir siklus süresi (16 gün) beklenmiştir. Böylece hormonal olarak indüklenen östruslar pas geçilmiş devam eden süreçteki ilk doğal östrusta deneysel model grupları oluşturulmaya başlanmıştır.



Şekil 2.1. Arama koçu kullanılarak östrus tespiti.

Spencer ve ark (2004), Bazer ve ark (2008), Arianmanesh ve ark (2011)'nın belirttiği gibi; pre-implantasyon (P12. gün), implantasyon (P16. gün) ve post-implantasyon (P22. gün) grupları gebe (P) ve siklik (C) karşılıkları olmak üzere her grupta 4 baş koyun olacak şekilde 6 grup oluşturulmuştur. Gruplar; P12, C12, P16, C16, P22 ve C22 olarak adlandırılımıştır. Östrus tespitleri yapılarak bireysel bölmelere alınmış olan koyunlardan gebelik gruplarına dahil edilenler ergin koçlarla elde aşım (tabi tohumlama) yöntemiyle çiftleştirilmiştir (senkronizasyon sonrası indüklenmiş olan östrustan sonraki ilk doğal östrus gününde / 0. gün). Enstitünün önceki yıllara ait elde aşım kayıtlarından yararlanılarak fertilitesi yüksek olan damızlık koçlar çiftleştirme (elde aşım) için kullanılmıştır. Çiftleşme günü 0. gün olarak kabul edilmiştir. Aynı şekilde siklus (gebelik negatif grup) gruptaki koyunlarda senkronizasyonu takiben indüklenen östrustan sonraki ilk doğal östrus arama koçu ile tespit edilerek, 0. gün olarak kabul edilmiştir.



Şekil 2.2. Gebe gruplarındaki koyunlarda elde sıfat/aşım (tabi tohumlama).

C16 ve C22 gruplarındaki koyunlarda fizyolojik süreç gereği 15. günde başlayacak doğal luteolizi ve dolayısıyla yeni östrus oluşumunu engellemek amacıyla östrus sonrası 13. günde intravajinal yolla 300 mg progesteron emdirilmiş silikon (CIDR-G devices, Eazi-Breed CIDR, 300 mg progesterone, Pharmacia Animal Health, Australia) uygulaması yapılmıştır. Silikonlar kesim zamanına kadar vajina içerisinde tutularak, araştırmada progesteron etkisi bütün gruplar için eşitlenmiş ve araştırılan farklılıkların tamamen embriyo/gebelik kaynaklı olması sağlanmıştır.



Şekil 2.3. C16 ve C22 gruplarındaki koyunlara progesteron emdirilmiş silikon uygulaması.

2.1.3. Endometrium Örneklerinin Toplanması

Koyunların kesim sırası oluşturulurken doğal östrus zamanı referans alınmıştır. Sabah östrus gösterenler sabah, öğleden sonra östrüs gösteren koyunlar ise öğleden sonra kesilmiştir. Koyunlar klasik yöntemle kesildikten sonra palaska kullanılarak arka bacaklarından askıya alınmış ve symphisis pelvis hizasından başlayarak linea alba hattından gerçekleştirilen düşey ensizyon aracılığı ile pelvis ve karın boşluğu ortaya çıkarılmıştır. Ensizyon laterale doğru genişletilerek reprodüktif organlar ligamentleri aracılığıyla asılı şekilde görünür hale getirilmiştir. Serviks uterinin sert kıvamından yararlanılarak vajina ile birleştiği kısımdan ayrılmış, ovaryum ve uterusun asıcı bağları kesilerek üreme organları elde edilmiştir. İpsilateral kornunun iç bükey kısmındaki ligamentum lata uteri uzantıları disseke edilerek kendi üzerine yaptığı kıvrımlar açılmıştır. İnterkornual ligament kesilerek kornu uterinin düz bir hale gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra kornu uteri ovidukt tarafındaki ucundan başlayarak ligamentum lata uterinin bağlı olduğu kısımdan longitudinal olarak açılmıştır. Dişli pens ve makas yardımı ile kornunun orta kısmından endometrium örnekleri toplanarak cryo tüplere alınmış, sıvı azot içerisine dondurulan doku örnekleri -80^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Siklik gruptaki koyunlarda aktif korpus luteum tespit edilmiş olan ipsilateral kornu uteriden, gebe gruptaki koyunlarda ise embriyonun bulunduğu kornu uteriden örnekleme yapılmıştır. Bu tez çalışması kapsamındaki çalışmalar için 20/06/2016 tarihli başvuru ile etik kurul onayı ve izin belgesi ilgili makamlara başvurarak alınmıştır (Bkz. EK-A ve EK-B).



Şekil 2.4. Endometrium örneklerinin toplanması.

2.2. Moleküler Analizler

2.2.1. Endometrium Örneklerinden Total RNA İzolasyonu

Endometrium doku örneklerinden ~ 50 mg alınarak, homojenizasyon tüpüne aktarılmıştır, tüpe 1 ml TRI-Reagent (Sigma-Aldrich, ABD) eklenerek, 16 000 rpm 5 sn süre ile homojenize edilmiştir. Ependorf tüpe aktarılan 1ml içerik üzerine 200 µl kloroform eklenerek vorteks yardımı ile karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dk bekletilen örnekler soğutmalı santrifüjde (+4ºC) 12000 g devir hızında 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Tüpte oluşan süpernatant kısım başka bir ependorf tüpe (nükleaz free) alt kısımda yer alan fazlara temas edilmeksizin aktarılmıştır. Yaklaşık 500 µl süpernatant üzerine 500 µl 2-propanol ilave edilerek, karışım alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkubasyon tamamlandıktan sonra soğutmalı santrifüjde (+4ºC) 12000 g devir hızında 10 dk süre ile santrifüj edilerek, RNA içeriğinin tüpün dip kısmında pelet halinde çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıkdan sonra 3 kez (sırası ile %70, %70 ve %95) soğuk (-20ºC) etanol ile yıkama işlemi, +4˚C'de 7500 g devir hızında 5'er dk süre ile santrifüj edilerek gerçekleştirilmiştir. RNA peleti doğal kurutma yöntemi ile kurutularak, 50 µl steril Dietilpirokarbonat ile muamele edilmiş çift distile su (DEPC-ddH_2O) içerisinde çözdürülmüştür.

2.2.2. RNA Miktar ve Kalitesinin Belirlenmesi

Nanodrop spektrofotometre ölçümü

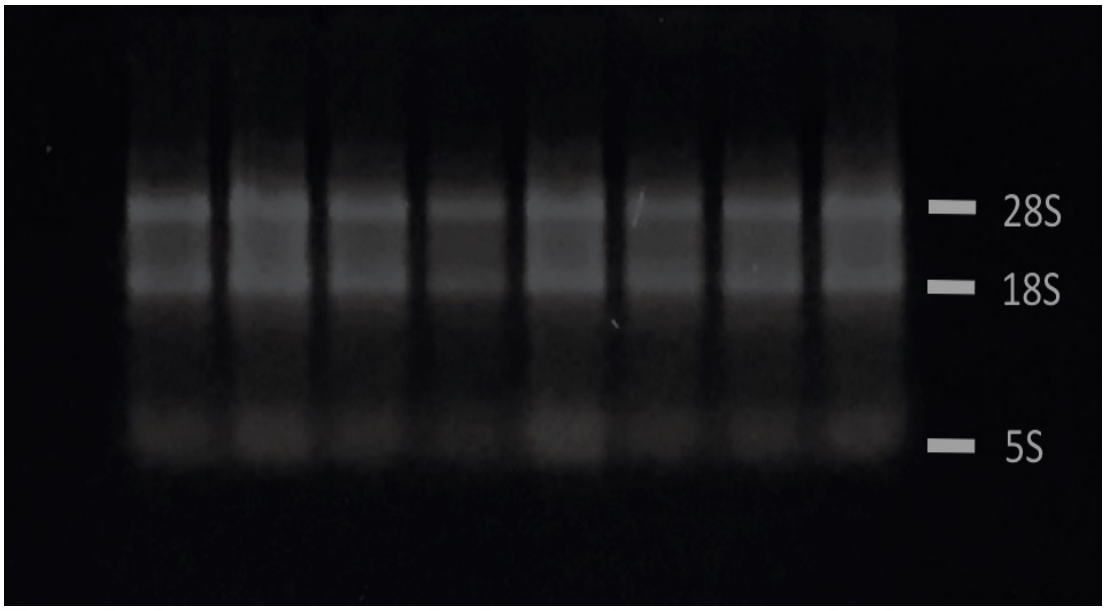
Total RNA miktar ve kalitesi nanodrop spektrofotometre ile tespit edilerek kayıt altına alınmıştır (Tablo 2.1.). RNA peletlerinin çözdürüldüğü DEPC-ddH_2O ölçümlerde blank olarak kullanılmıştır. Ölçümler spektrofotometre RNA okunma moduna alınarak; 2 µl RNA örneği nükleaz içermeyen pipet ucu ile cihazın okuma haznesine yerleştirilerek ölçümler gerçekleştirilmiştir. RNA miktarı ng/µl şeklinde belirlenmiştir. İzolasyon esnasındaki olası fenol, protein ve genomik (g) DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirilmiştir. Nanodrop spektrofometre ile konsantrasyonları belirlenen total RNA örneklerine DEPC-ddH_2O ilaveleri ile 125ng/µl olacak şekilde konsantrasyon eşitleme işlemi uygulanmıştır.

Tablo 2.1. Nanodrop spektrofotometre ölçüm değerleri.

Örnek No	Grup	Konsantrasyon (ng/µl)	260/280	260/230
1	C12	273	1,9	2,25
2	C12	221	1,91	2,32
3	C12	256	1,87	2,3
4	C12	305	1,91	2,24
5	P12	228	1,88	2,27
6	P12	275	1,89	2,28
7	P12	268	1,89	2,27
8	P12	309	1,9	2,28
9	C16	243	1,89	2,28
10	C16	256	1,9	2,24
11	C16	280	1,89	2,06
12	C16	272	1,92	2,31
13	P16	236	1,9	2,18
14	P16	300	1,89	2,23
15	P16	310	1,88	2,21
16	P16	265	1,92	2,07
17	C22	265	1,91	2,35
18	C22	288	1,88	2,25
19	C22	268	1,9	2,24
20	C22	303	1,9	2,21
21	P22	292	1,88	1,96
22	P22	233	1,88	2,17
23	P22	287	1,89	2,3
24	P22	247	1,91	2,3

Agaroz jel elektroforezi

RNA kalitesinin değerlendirmesi amacıyla 1µg RNA örneği 8µl hacim içerisinde hazırlanmıştır, üzerine 2 µl 5X yükleme boyası ilave edilerek % 1'lik agaroz jelde elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Etidyum Bromür (EtBr) ile muamele edilen agaroz jel UV-translüminatör üzerinde görüntülenerek, (5S, 18S, 28S) RNA bantlarının kalitesi değerlendirilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Bazı örneklere ait total RNA agaroz jel görüntüsü.

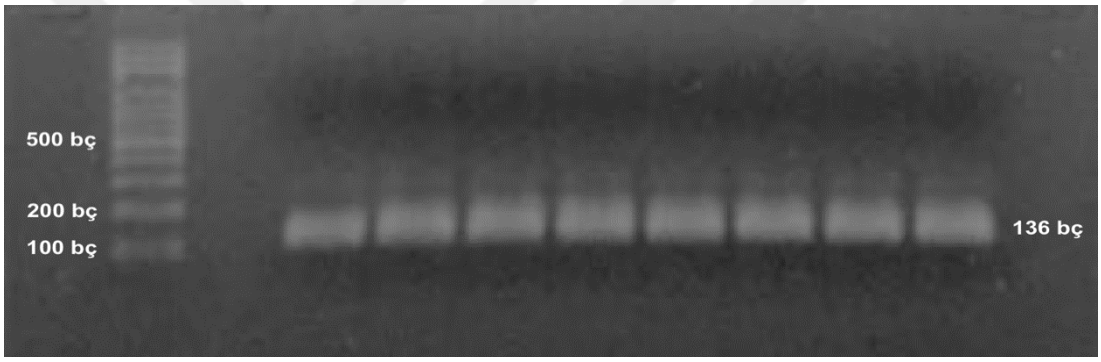
2.2.3. DNase-I ile Total RNA'dan gDNA'nın Uzaklaştırılması

Total RNA izolasyonu esnasındaki muhtemel genomik DNA (gDNA) kontaminasyonlarına yönelik DNase-I enzim reaksiyonu üretici firmanın protokolüne göre uygulanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kullanılan DNase I, RNase-free (#EN0521 Thermo Fisher Scientific, ABD) protokolüne göre 1 µg/8µl total RNA üzerine 1 µl DNase-I reaksiyon tamponu ve 1 µl DNase-I enzimi ilave edilerek 37ºC'de 30 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında (inkübasyon süresi sona erdiğinde) 1 µl 50 mM ETDA ilave edilmiş ve 65ºC'de 10 dk inkübe edilerek DNase-I aktivitesinin durdurulması sağlanmıştır. Böylece olası gDNA kalıntıları ortadan kaldırılmıştır. DNAse-I enzim reaksiyonu tamamlandığında işlem başarısının değerlendirilmesi amacı ile DNase-I reaksiyon ürünleri (RNA örnekleri) ACTB (aktin beta) primerleri ile touchdown PZR protokolü kullanılarak yükseltgenmiştir. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezi sonrası UV-translüminatör ile değerlendirilmiş ve ACTB bantları gözlenmeyen örneklerin gDNA kalıntısı içermedikleri kaydedilmiştir.

2.2.4. Komplementer DNA Sentezi/Revers Transkripsiyon

Komplementer DNA (cDNA) sentezi için RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (#K1622 Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Kalıp olarak 1 µg/11 µl DNase-I ile muamele edilmiş total RNA kullanılarak revers transkripsiyon (RT)

gerçekleştirilmiştir. Üretici firma protokolü gereği; 1 µl oligo dT ve 1 µl random hekzamer primer miksi 1 µg/11 µl total RNA üzerine ilave edilerek, bağlanma için 65˚C'de 5 dk inkübe edilmiştir. Primer bağlanma basamağı sonrasında, 8 µl RT reaksiyon karışımı (4 µl 5X reaksiyon tamponu, 2 µl dNTP, 1 µl ribolock RNase inhibitörü, 1 µl revers transkriptaz enzimi) ilave edilerek 25°C'de 5 dk ve 42°C'de 60 dk inkübasyon neticesinde cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Son basamak olarak reaksiyonun sonlandırılması, revers transkriptaz enzim aktivitesinin durdurulması amacı ile 70˚C'de 10 dk inkubasyon gerçekleştirilmiştir. RT reaksiyonunun başarı ve kalitesinin değerlendirilmesi için ACTB primerleri ile sentezlenen cDNA örneklerinin kalıp olarak kullanıldığı touchdown PZR gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri %2'lik agaroz jel (EtBr) elektroforezi sonrası UV-translüminatör ile görüntülenmiştir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. cDNA ile ACTB primerleri primerleri kullanılarak PZR sonucu elde edilen amplikonların agaroz jel görüntüsü (temsili).

2.2.5. Oligonükleotid Primer Dizayn ve Sulandırma

Çalışma kapsamındaki genlerin mRNA dizi bilgileri Gen Bankası ''https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/'' aracılığı ile temin edilmiştir. Elde edilen mRNA dizi bilgileri ile Integrated DNA Technologies PrimerQuest Tool ''https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index'' ve Primer BLAST ''https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/'' online tasarım araçları kullanılarak oligonüklotid primer dizaynları gerçekleştirilmiştir. Wang ve Seed (2007)'in belirttiği kriterler göz önünde bulundurularak primerlerin kendi arasında ve çapraz dimer yapmamasına dikkat edilmiştir. Dizayn edilen oligonükleotid primerlerin yükseltgenmesi hedeflenen bölge dışında koyun türü için bilinen transkriptom içerisinde farklı bir bölgeyi yükseltgeme ihtimali gen bankası primer BLAST algoritması ''https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/'' ile ekarte edilmiştir.

Hedef dizi ile eşleşme oranı yine primer BLAST algoritması aracılığı ile doğrulanmıştır. Dizayn edilen oligonükleotid PZR primerleri kontrol işlemleri sonrası kayıt altına alınmıştır (Tablo 2.2.). MOPC purifikasyon derecesinde ve 30 nMol olarak sipariş edilen primer setleri (Macrogen Oligo, Güney Kore) liyofilize pelet içeren tüpler halinde teslim alınmıştır. DEPC-ddH_2O ile 50 pMol/µl olacak şekilde primer ana stokları hazırlanmıştır. İleri (Forward: F) ve geri (Reverse: R) primer ana stoklarından eşit hacimlerde karıştırılarak 25 µM primer çalışma stokları oluşturulmuştur.

Tablo 2.2. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlere ait bilgiler.

Hedef (simge)	Nükleotid Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bç)
DNMT1_F	5'- AAGTGGTGAGGATTGCAGAG -3'	100
DNMT1_R	5'- TTCTCCATCAGACTTGCTTCTC -3'	
DNMT3A_F	5'- AGAAGGAGACCAACATCGAATC -3'	147
DNMT3A_R	5'- TGCGCTTGCTGATGTAGTAG -3'	
DNMT3B_F	5'- GGAAAGATCAAGGGTTTCTCCT -3'	119
DNMT3B_R	5'- GAGAACTTGCCATCACCAAAC -3'	
NCOA1_F	5'- CTTGTTCAGGGAGGTGGATTAG-3'	125
NCOA1_R	5'- GTAGGCGAAGGAGAAGAATAAGG-3'	
ATF2_F	5'- GGAATCTCGACCACAGTCATT-3'	109
ATF2_R	5'- TCTTCGACGACCAGTTGTATTT-3'	
HAT1_F	5'- ATTATATTGCTGGGAGCCTGTC-3'	96
HAT1_R	5'- CCTCAACATCATCTGCCTCTAC-3'	
KAT2A_F	5'- CGTGTCGGAGGATGAGATTAAC-3'	115
KAT2A_R	5'- GAGGTAGAAATAGACCTGCTTGG-3'	
KAT2B_F	5'- GAGTGAGCGCCTCAAGAATAG-3'	117
KAT2B_R	5'- CACCTGTAGTACTCGCTTTCAG-3'	
KAT8_F	5'- TTCTGCCTCCCAGACAATATG-3'	101
KAT8_R	5'- GGGTCACCTTCACCTCTATAAC-3'	
KAT6A_F	5'- TCTTCTCCCGAGGGTACTTT-3'	105
KAT6A_R	5'- CTGAGTCTTCGTCATCGTCTTC-3'	
KAT6B_F	5'- AAGGAAGAACACCCAAGAGAAG -3'	121
KAT6B_R	5'- GGTCAACACCACAGTCCATTA -3'	
CARM1_F	5'- AGAAGGAGATTTGCACAGGATAG-3'	125
CARM1_R	5'- ACAGCCACACGGTCATTATAG-3'	
DOT1L_F	5'- CACCTCACAGCCCATTCTAC -3'	117
DOT1L_R	5'- CTTCGTGTATGCCAGGAACT -3'	
EHMT2_F	5'- AAATTGGGAACCTGGAGATGG-3'	133
EHMT2_R	5'- AGCATGCGGATCACTTCTATG-3'	
PRMT1_F	5'- GAGGACATGACGTCCAAAGAT-3'	119
PRMT1_R	5'- CGGTTGTGAAACATGGAGTTG-3'	
EP300_F	5'- GGACTTGGCAATACTAGCTCTC-3'	143
EP300_R	5'- TGGGTCGGCATCTGATTTAC-3'	
NSD1_F	5'- AGGAGTCGACGGGACATATAA-3'	128
NSD1_R	5'- TGTATGGTGGTGGCTTCTTATC-3'	
AURKA_F	5'- GGATGCACGACGAGAAAGT-3'	108
AURKA_R	5'- TTCTGTAGGTCTCCTGGTATGT-3'	
AURKB_F	5'- CGCACAATGAGAAGGTGGA -3'	143
AURKB_R	5'- CACAGAAGGAGGGAACTTTAGG -3'	
AURKC_F	5'- GCTCTCATTGCCTCTTCCATAG-3'	138
AURKC_R	5'- CTTTCTGGCTACGAAGGTTAGG-3'	
PAK1_F	5'- AAAGACGCTGGAACCCTAAA-3'	97
PAK1_R	5'- CAGGTAAGATGGCTCGGTAAA-3'	
DZIP3_F	5'- CACTGCCTCCAATCCATCTT-3'	116
DZIP3_R	5'- AGGAACAGTGAGTATGGGTCTA-3'	
USP16_F	5'- TGCACACGCAGACAATACA-3'	106
USP16_R	5'- CTGGAGGAGCGAGAGAAATTAG-3'	
KDM1A_F	5'- GTCCACCGAGTTCACAGTTATT-3'	113
KDM1A_R	5'- GAGCCTATGATGATGACCTTTCC-3'	

Tablo 2.2 (Devam). Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerlere ait bilgiler.

Hedef	Nükleotid Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bç)
KDM5B_F	5'- TGATAGTGGCTGGAATCTGAAC-3'	117
KDM5B_R	5'- GAGAAGCACATTCCCACATAGA-3'	
KDM5C_F	5'- CCACGCTTGAGGCCATAAT-3'	118
KDM5C_R	5'- ATCTCGTCCACATCAGCAATC-3'	
KDM4A_F	5'- CGCAAGATAGCCAACAGTGATA-3'	122
KDM4A_R	5'- CCATTCACATCTGCACCATAGA-3'	
KDM6B_F	5'- CATATTATGCTCCAGGGACACC-3'	149
KDM6B_R	5'- ACTGTCATGCTCTGACTCGTA-3'	
HDAC1_F	5'- GTGAGGACTGTCCGGTATTTG-3'	104
HDAC1_R	5'- GATGTCCGTCTGCTGCTTATTA-3'	
HDAC2_F	5'- GAGAGGACTGTCCAGTGTTTG-3'	119
HDAC2_R	5'- AGCCCAGTTAACAGCCATATC-3'	
HDAC3_F	5'- CTCGGGTGCTCTACATTGATATT-3'	119
HDAC3_R	5'- AGGGAAGAAGTAGTTTCCGTATTT-3'	
HDAC4_F	5'- GGTCGATGGAGAAGGTCATTG-3'	114
HDAC4_R	5'- CTTCCTCGTTCTCACACTTCTG-3'	
HDAC5_F	5'- CATCGCGGAGAATGGCTTTA-3'	115
HDAC5_R	5'- AGACGTGTAGAGGCTGAACT-3'	
HDAC6_F	5'- GGAAGAGAAGGAGGAAGAGAAAC-3'	146
HDAC6_R	5'- GCATCTCAGGGTGGTAGTTATC-3'	
HDAC7_F	5'- CTCTGTGAGCCTTCTCTCTTTC-3'	113
HDAC7_R	5'- CCATGTCTTCCATCCACTCTC-3'	
MeCP2_F	5'- CTGACTTCACCTGTTCCTTCTC-3'	117
MeCP2_R	5'- CATCACCTTCTCCTGCTTAGTG-3'	
MBD1_F	5'- GTTGGACCTCAGAAGAGTGAAG -3'	121
MBD1_R	5'- AGCTGATTCCACAGTTCTCAC -3'	
MBD2_F	5'- CGAGTTCAGCAAGTACGTAAGA-3'	109
MBD2_R	5'- CGTCATCTCCACTGTCCATTT-3'	
CBX1_F	5'- GCCTTCTTCCCGATAGTGTT-3'	124
CBX1_R	5'- CCTAACCCATCTCCCTTCTTTC-3'	
ARID1A_F	5'- GAGGAGGAAGAGGAGGAAGTAA-3'	133
ARID1A_R	5'- TCTGCACGATCTTTACTGGAAG-3'	
ASXL1_F	5'- TGACAGCAGGTTAAGGAAGAAG-3'	121
ASXL1_R	5'- GAGGTACAAGATAAGGCAGGAAG-3'	
EZH2_F	5'- CGGTGTCAAACGCCAATAAAG-3'	123
EZH2_R	5'- GGCACAGAAGTTGTCGTAGTAG-3'	
MTA1_F	5'- TTCAGCAAGACTTCCTTCCC-3'	135
MTA1_R	5'- AAACTTGCTTCAACTTGCTCTC-3'	
ATRX_F	5'- GGTCAGAGTGTTGCAGTAGAG-3'	106
ATRX_R	5'- CGGCAGTGTTAGTAGGTTCAT-3'	
Lsh_F	5'- TAGCAGATGAAATGGGATTGGG -3'	127
Lsh_R	5'- GCCATCCAGTTAGGAAGTGTAG -3'	
CHD1_F	5'- GGACGAAGCACATCGATTAAAG-3'	101
CHD1_R	5'- GCAGAGGAGTTCCAGTGATAAG-3'	

F: forward, R: reverse, bç: baz çifti.

2.2.6. Referans Gen Seçimi

Daha evvel gerçekleştirilen bir çalışmada erken gebelik döneminde koyun endometriumunda Tablo 2.3.'de verilen 6 aday housekeeping gen (HKG) arasından SDHA (Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A) en stabil referans gen olarak belirlenmiştir (Kiyma ve ark 2016). Bu çalışma kapsamında hedef genlerin normalizasyonu için SDHA referans gen olarak kullanılmıştır.

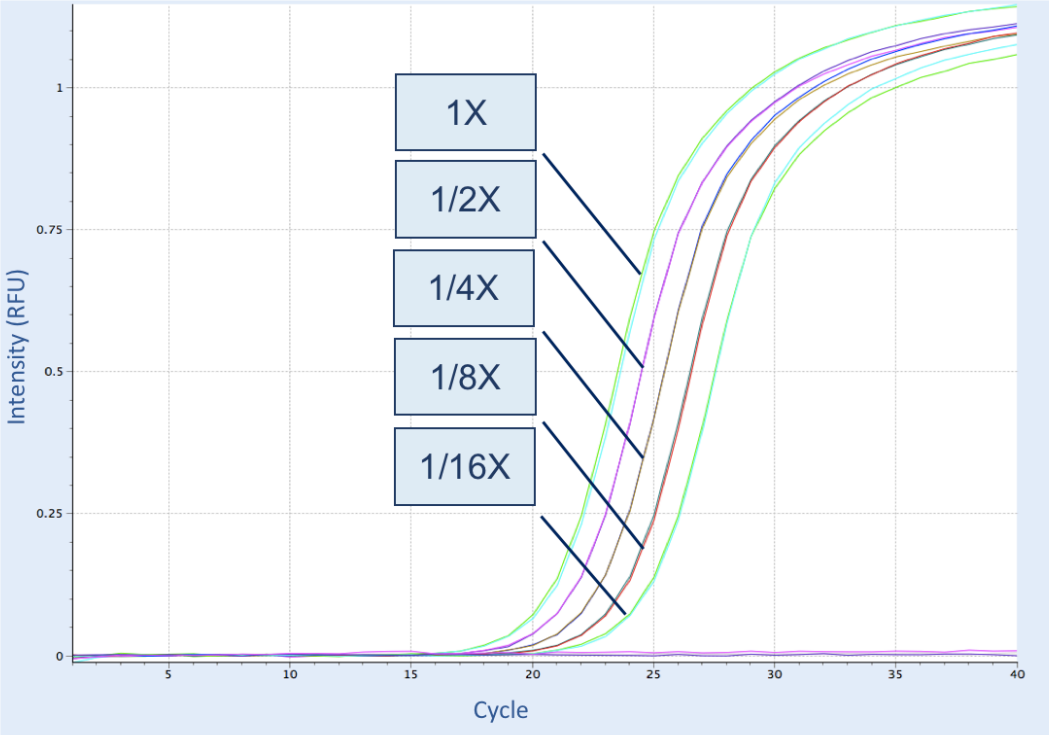
Tablo 2.3. HKG oligonükleotid primerlerine ait bilgiler.

HKG	Nükleotid Dizisi	Ürün Büyüklüğü (bç)
ACTB_F	5'- GGACCTGACGGACTACCTCATG-3'	136
ACTB_R	5'- GGCCATCTCCTGCTCGAAGT-3'	
GAPDH_F	5'- TCCATGACCACTTTGGCATCGT-3'	80
GAPDH_R	5'- GTCTTCTGGGTGGCAGTGA-3'	
HPRT1_F	5'- AGGTGTTTATTCCTCATGGAGTAATTATG-3'	79
HPRT1_R	5'- GGCCTCCCATCTCCTTCATC-3'	
RPL32_F	5'- GGCACCAGTCAGACCGATATG-3'	75
RPL32_R	5'- TGCGCACCCTATTGTCAATG-3'	
SDHA_F	5'- CATCCACTACATGACGGAGCA-3'	90
SDHA_R	5'- ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA-3'	
YWHAZ_F	5'- TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT-3'	102
YWHAZ_R	5'- TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT-3'	

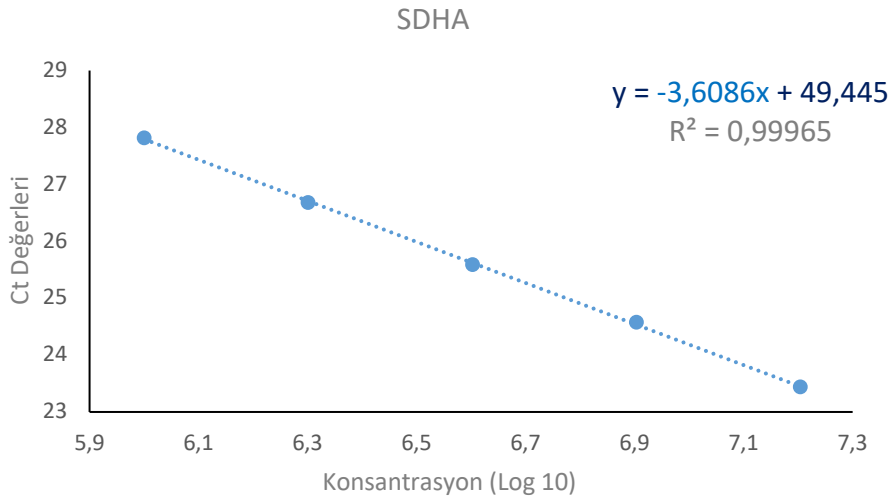
F: forward, R: reverse, bç: baz çifti.

2.2.7. Seri Sulandırmalar ile Primer Etkinliğinin Hesaplanması

Gerçekleştirilen revers transkripsiyon neticesinde elde edilen cDNA örneklerinin her birinden eşit hacimde alınarak cDNA havuzu oluşturulmuştur (1X konsantrasyon). Oluşturulan 1X cDNA havuzu DEPC-ddH_2O ile her defasında ½ olacak şekilde seri sulandırılarak 1X, 1/2X, 1/4X, 1/8X ve 1/16X konsantrasyonlarda cDNA havuzları hazırlanmıştır. Elde edilen 5 seri konsantrasyondaki cDNA havuzlarından gerçekleştirilen Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR/qPZR) neticesinde okunan cycle of treshold (ct/cq) değerleri kaydedilmiştir (Şekil 2.7.). Kaydedilen ct değerlerinden dağılım grafiği çizilerek doğrunun denklemi elde edilmiştir (Şekil 2.8.). Böylece $E=10^{-1/EĞİM}$ formulüne doğrunun eğimi yerleştirilerek primer etkinlikleri (E) hesaplanmıştır.



Şekil 2.7. Primer etkinliği hesaplama için cDNA havuzu 5 seri konsantrasyondan elde edilen qPZR amplifikasyon eğrisi grafiği (temsili).



Şekil 2.8. Primer etkinliğinin hesaplaması için ct değerlerinden çizilen dağılım grafiği ve doğru denklemi (temsili).

Real time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPZR/qPZR)

Peri-implantasyon döneminde hedeflenen genlerin ekspresyon düzeylerinin saptanabilmesi ve olası farklılıkların değerlendirilebilmesi amacı ile her bir örnek için elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak qPZR gerçekleştirilmiştir. Bu amaç doğrultusunda dizaynları gerçekleştirilen spesifik oligonükleotid primerler hedeflenen genlerin amplifikasyonu için kullanılmıştır. İnterkalasyon ajanı SybrGreen floresan indikatör olarak tercih edilmiştir. RT-qPZR deney protokolü 5 µl 2X SyberGreen karışımı (#1725271 SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix, Bio Rad ABD), 0,1 µl primer karışımı çalışma stoğu final hacimde 250 nM ileri primer, 250 nM geri primer), 2 µl cDNA ve toplam hacim 10 µl olacak biçimde 2,9 µl steril ddH_2O şeklinde gerçekleştirilmiştir. Böylece başlangıçta 2X konsantrasyonda olan SyberGreen karışımı 10 µl toplam reaksiyon hacmi ile 1X konsantrasyona indirgenmiştir. Bir örnek için belirtilen reaksiyon protokolü cDNA içermeksizin örnek sayısı kadar qPZR karışımı şeklinde hazırlanmış ve örnek başına pay edilerek çalışılmıştır. RT-qPZR karışımı ve cDNA örnekleri ile hedeflenen reaksiyon hazırlanırken cDNA içermeyen onun yerine aynı hacimde steril ddH_2O içeren negatif kontrol kullanılmıştır.

Reaksiyonlar Light Cyler Nano (Roche, Almanya) ve Light Cyler 480 (Roche, Almanya) cihazları ile steril nükleaz içermeyen 8 kuyucuklu qPZR strip (#PCR-0208-CP-C Axygen, ABD) ve 96 kuyucuklu qPZR plate (#PCR-96-LC480-WAxygen, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-qPZR deney profili 98°C'de 2 dakika, 40 döngü (95°C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye) biçimde gerçekleştirilmiştir. Işıma yapan SyberGreen miktarının tespiti cihazın hassas ccd (charge coupled device) kameraları ile otomatik her siklusun 72°C'deki uzama basamağının ardından yapılmıştır. Tamamlanan 40 döngü amplifikasyon sonrası 60°C'den 95°C'ye kadar saniyede 0,1°C olacak biçimde kademeli ısıtma yapılarak her 1°C artış için ccd araçlı optik ölçümler ile melting curve (erime eğrisi) analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.9.). Gerçekleştirilen qPZR reaksiyon verileri Cq (Cycle of quantification) olarak kayıt edilmiştir. RT-qPZR ürünleri %2'lik agaroz jel (EtBr) elektroforezi sonrası UV-translüminatör ile görüntülenmiştir (Şekil 2.10.).

RT-qPZR ile araştırılan hedef genler

-DNA metiltransferaz ailesi (Yamagata ve ark 2009): DNMT1, DNMT3A, DNMT3B.

Histon modifiye ediciler (modifiers)

-Histon asetiltransferaz (HAT) ailesi: Nuclear Receptor Coactivator 1; NCOA1 (Qin ve ark 2015), Activating Transcription Factor 2/Histone Acetyltransferase ATF2; ATF2 (Gohin ve ark 2014), Histone Acetyltransferase 1; HAT1 (Huan ve ark 2015), K(Lysine) Acetyltransferase 2A; KAT2A (Jefferson ve ark 2013), K(Lysine) Acetyltransferase 2B; KAT2B (Ravnskjaer ve ark 2013), K(Lysine) Acetyltransferase 8; KAT8 (Zhang ve ark 2013), K(Lysine) Acetyltransferase 6A; KAT6A (Sheikh ve ark 2014), K(Lysine) Acetyltransferase 6B; KAT6B (Yang 2015).

-HMT ailesi: Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1/Protein Arginine N-Methyltransferase 4; CARM1/PRMT4 (Hosseini ve ark 2015), DOT1-Like Histone H3K79 Methyltransferase; DOT1L (Vlaming ve Leeuwen 2016), Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase 2; EHMT2 (Auclair ve ark 2016), Protein Arginine Methyltransferase 1; PRMT1 (Morales ve ark 2015).

-SET domain proteinleri (Histon Metiltransferaz Aktivitesi): E1A Binding Protein P300/Histone Acetyltransferase P300; EP300 (He ve ark 2014), Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1; NSD1 (Skrzypczak ve ark 2013).

-Histon fosforilasyon gen ailesi: Aurora Kinase A; AURKA (Kim ve ark 2016b), Aurora Kinase B; AURKB (Mallm ve Rippe 2015), Aurora Kinase C; AURKC (Avo Santos ve ark 2011), P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1; PAK1(Wang ve ark 2013).

-Histon ubikutinasyon gen ailesi: DAZ Interacting Zinc Finger Protein 3; DZIP3 (Daishi ve ark 2015), Ubiquitin Specific Peptidase 16; USP16 (Shanbhag ve ark 2010).

-DNA/Histon demetilaz ailesi: Lysine (K)-Specific Demethylase 1A; KDM1A (Metzger ve ark 2016), Lysine (K)-Specific Demethylase 5B; KDM5B (Zhou ve ark 2016), Lysine (K)-Specific Demethylase 5C; KDM5C (Rondinelli ve ark 2015), Lysine (K)-Specific Demethylase 4A; KDM4A (Qiu ve ark 2015), Lysine (K)-Specific Demethylase 6B; KDM6B (Shpargel ve ark 2014).

-Histon deasetilaz ailesi: Histone Deacetylase 1; HDAC1 ve Histone Deacetylase 2; HDAC2 (Pengpeng ve ark 2012), Histone Deacetylase 3; HDAC3 (Lee ve ark 2015), Histone Deacetylase 4; HDAC4 (Sailaja ve ark 2012), Histone Deacetylase 5; HDAC5 (Martin ve ark 2009), Histone Deacetylase 6; HDAC6 (Li ve ark 2013), Histone Deacetylase 7; HDAC7 (Shakespear ve ark 2013).

Kromatin yeniden modelleme (remodeling) faktörleri

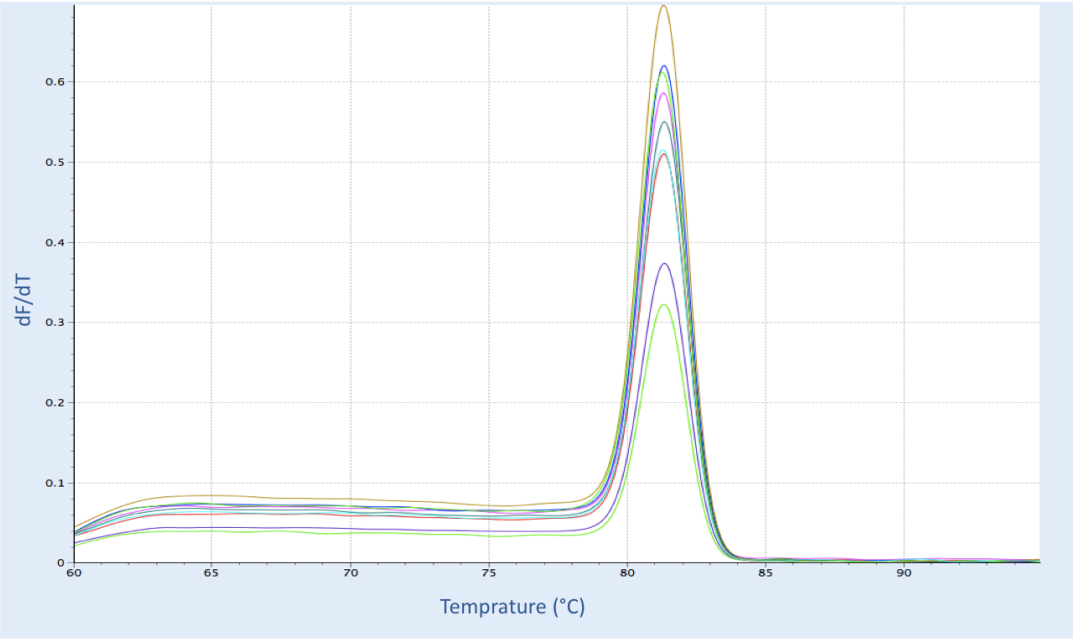
-Methyl-CpG DNA binding domain (MBD) proteinleri: Methyl CpG Binding Protein 2; MeCP2 (Zhang ve ark 2015), Methyl-CpG Binding Domain Protein 1; MBD1 (Xu ve ark 2013), Methyl-CpG Binding Domain Protein 2; MBD2 (Weaver ve ark 2014).
-Heterokromatin protein 1 (HP1) homolog (Chromobox): Chromobox Homolog 1; CBX1 (Ma ve ark 2014).

-SWI/SNF kompleks bileşeni: AT Rich Interactive Domain 1A (SWI-Like); ARID1A (Sun ve ark 2016).

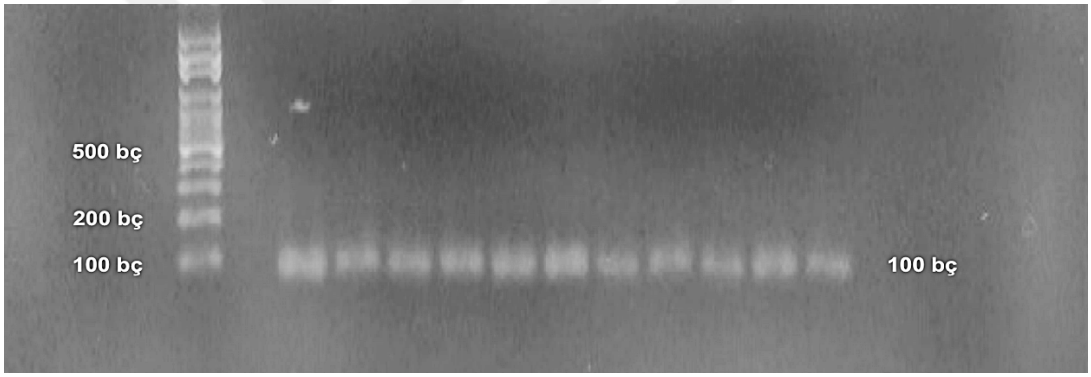
-Polycomb grup proteinleri: Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1; ASXL1 (Park ve ark 2014), Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit; EZH2 (Wei ve ark 2015).

-Nükleozom-Remodeling ve histone deasetilaz (NuRD) kompleks bileşeni: Metastasis Associated 1; MTA1 (Su ve ark 2016).

-Kromodomain / helikaz / DNA-binding domain (CHD) proteinleri: α-thalassaemia/mental retardation syndrome, X-linked; ATRX (Huh ve ark 2016), lymphoid-specific helicase; Lsh (Termanis ve ark 2016), Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1; CHD1 (Zhang ve ark 2016).



Şekil 2.9. RT-qPZR erime eğrisi grafiği (temsili).



Şekil 2.10. RT-qPZR ürünlerinin (DNMT1, 100 bç) agaroz jel görüntüsü (temsili).

2.2.8. İstatistik Analizleri

RT-qPZR verileri housekeeping genler arasından seçilen SDHA referans geni (Kiyma ve ark 2016) ile $2^{-\Delta C'_T}$ ($\Delta C'_T = C'_{T\ Hedef} - C'_{T\ Referans}$) metodu kullanılarak normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Normalize edilen veriler üzerinden Minitab (versiyon 14) yazılımı kullanılarak tanımlayıcı istatistikler belirlenmiştir ve normal dağılım gösterdiği tespit edilen verilere SPSS (versiyon 21) yazılımı ile t testi uygulanarak değerlendirilmiştir ($p<0,05$).

3. BULGULAR

3.1. Primer Etkinlik Değerleri

Hazırlanan 5 seri konsantrasyondaki cDNA havuzlarından gerçekleştirilen qPZR neticesinde okunan cq değerlerinden dağılım grafiği çizilerek doğru denklemi elde edilmiştir. Çalışma kapsamındaki referans ve hedef genlere ilişkin primer etkinlikleri (E), $E=10^{-1/EĞİM}$ formulüne doğru denkleminden elde edilen eğim yerleştirilerek hesaplanmıştır (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Doğru denklemleri ve primer etkinlik değerleri.

Hedef	Denklem	R^2	E
SDHA	y = -3,6086x + 49,445	0,99965	1,892848168
DNMT1	y = -3,6155x + 50,802	0,99817	1,890544557
DNMT3A	y = -3,4697x + 51,622	0,99948	1,941821723
DNMT3B	y = -3,9942x + 61,187	0,98146	1,779766494
NCOA1	y = -3,5661x + 50,925	0,99932	1,907297257
ATF2	y = -3,3651x + 49,241	0,99846	1,982293647
HAT1	y = -3,3817x + 50,494	0,99885	1,975646587
KAT2A	y = -3,395x + 50,034	0,99846	1,970383718
KAT2B	y = -3,8468x + 52,597	0,9925	1,819517879
KAT8	y = -3,5146x + 53,769	0,96321	1,925428518
KAT6A	y = -3,4133x + 49,607	0,99828	1,96323194
KAT6B	y = -3,6824x + 51,741	0,98747	1,868796555
CARM1	y = -3,9082x + 53,27	0,99641	1,802487529
DOT1L	y = -3,433x + 47,563	0,99669	1,955646777
EHMT2	y = -3,4116x + 49,528	0,99834	1,96389199
PRMT1	y = -3,9514x + 52,784	0,99859	1,790914528
EP300	y = -4,1823x + 53,983	0,99615	1,734214791
NSD1	y = -3,3518x + 48,513	0,99569	1,987683153
AURKA	y = -3,2954x + 53,166	0,98781	2,011190915
AURKB	y = -3,2538x + 49,91	0,99177	2,029237898
AURKC	y = -3,3718x + 53,344	0,99229	1,97960023
PAK1	y = -3,2937x + 49,889	0,99806	2,011916359
DZIP3	y = -3,2356x + 51,204	0,99891	2,037331447
USP16	y = -3,41x + 50,274	0,99956	1,964514017
KDM1A	y = -3,4x + 49,301	0,99988	1,968419447
KDM5B	y = -3,3734x + 48,257	0,99758	1,978959149
KDM5C	y = -3,5661x + 50,442	0,99731	1,907297257
KDM4A	y = -3,4x + 50,19	0,99983	1,968419447
KDM6B	y = -3,297x + 48,791	0,99958	2,010509066
HDAC1	y = -3,5013x + 49,968	0,99797	1,930226184
HDAC2	y = -3,3053x + 49,057	0,99938	2,006986256
HDAC3	y = -3,2356x + 49,025	0,9961	2,037331447
HDAC4	y = -3,5678x + 52,124	0,99183	1,906710549
HDAC5	y = -3,5727x + 51,832	0,99741	1,905023579
HDAC6	y = -3,4797x + 51,64	0,99726	1,938121932
HDAC7	y = -3,3668x + 49,222	0,99702	1,981608881
MeCP2	y = -3,4432x + 51,464	0,99522	1,951764926
MBD1	y = -3,3397x + 46,169	0,99951	1,989724176
MBD2	y = -3,4448x + 49,328	0,99824	1,951158791
ARID1A	y = -3,4083x + 48,642	0,99687	1,965175778
ASXL1	y = -4,0694x + 55,279	0,99867	1,760907212
EZH2	y = -3,2987x + 52,09	0,9855	2,009785579
MTA1	y = -3,4432x + 49,507	0,99981	1,951764926
ATRX	y = -4,1524x + 54,804	0,99985	1,741103479
Lsh	y = -3,4713x + 50,983	0,96877	1,941227849
CHD1	y = -4,0843x + 55,307	0,99783	1,757276078

R^2 : Denklem başarısını değerlendirme katsayısı, E: primer etkinlik değeri.

3.2. RT-qPZR verilerin Normalizasyonu ve Analizi

RT-qPZR neticesinde elde edilen ct verileri $2^{-\Delta C'_T}$ ($\Delta C'_T = C'_{T\ Hedef} - C'_{T\ Referans}$) metodu kullanılarak SDHA referans geni ile normalize edilmiştir (Livak ve Schmittgen 2001). Normalize edilen veriler (Tablo 3.2.) üzerinden Minitab (versiyon14) yazılımı kullanılarak tanımlayıcı istatistikler belirlenmiştir (Tablo 3.3-3.8) ve normal dağılım gösterdiği tespit edilen verilere SPSS (versiyon 21) yazılımı ile bağımsız t testi uygulanarak değerlendirilmiştir ($p<0,05$). Gruplar arası gen ekspresyon değişimleri rölatif ekspresyon yüzdeleri olarak belirtilmiştir (Tablo 3.9-3.17). CBX1 çok düşük düzey ekspresyon sebebi ile değerlendirilememiştir. Gruplar arası ekspresyon değişimlerinden istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıklar Şekil 3.1.'de özetlenmiştir.

Tablo 3.2. Ct değerlerinin normalizasyonu (temsili).

Örnek No	Grup	SDHA (ct)	DNMT1 (ct)	DNMT1 Normalize Veri
1	C12	24,46	25,46	0,5
2	C12	24,74	25,83	0,469761375
3	C12	24,9	25,495	0,662044455
4	C12	24,72	25,4	0,624165274
5	P12	24,61	25,13	0,697371833
6	P12	24,56	25,295	0,600818025
7	P12	25,32	25,765	0,734584317
8	P12	24,82	25,455	0,643940815
9	C16	24,26	24,995	0,600818025
10	C16	24,46	25,495	0,48801588
11	C16	25,67	26,1	0,742261785
12	C16	25,23	25,99	0,590496331
13	P16	24,7	25,115	0,750019495
14	P16	24,23	24,71	0,716977624
15	P16	24,58	24,92	0,790041312
16	P16	24,57	25,11	0,687770909
17	C22	24,28	25,245	0,512278412
18	C22	24,85	25,51	0,632878297
19	C22	24,63	25,08	0,732042848
20	C22	24,78	25,245	0,724471077
21	P22	23,86	24,64	0,582366793
22	P22	24,12	24,64	0,697371833
23	P22	24,34	24,935	0,662044455
24	P22	24,81	24,96	0,901250463

Tablo 3.3. Siklus 12. gün (C12) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,564	0,0467	0,0935
DNMT3A	0,5667	0,0438	0,0876
DNMT3B	0,03345	0,00431	0,00862
NCOA1	0,5362	0,0335	0,0671
ATF2	0,8541	0,0488	0,0977
HAT1	0,3238	0,0214	0,0428
KAT2A	0,45697	0,00401	0,00801
KAT2B	0,9335	0,0755	0,151
KAT8	0,0749	0,0145	0,029
KAT6A	0,8414	0,0429	0,0859
KAT6B	0,6396	0,0685	0,137
CARM1	0,8107	0,0784	0,1568
DOT1L	0,5701	0,0405	0,0809
EHMT2	0,8235	0,0507	0,1013
PRMT1	1,61	0,101	0,201
EP300	1,8756	0,0758	0,1517
NSD1	1,0432	0,0885	0,1771
AURKA	0,01823	0,00285	0,00571
AURKB	0,003575	0,000558	0,001116
AURKC	0,004482	0,000709	0,001417
PAK1	0,3464	0,0243	0,0486
DZIP3	0,1153	0,0128	0,0255
USP16	0,5138	0,0553	0,1105
KDM1A	1,0448	0,054	0,108
KDM5B	2,0906	0,0989	0,1978
KDM5C	0,9258	0,0544	0,1087
KDM4A	0,5324	0,0272	0,0544
KDM6B	0,8966	0,0547	0,1094
HDAC1	0,9245	0,0263	0,0527
HDAC2	0,77932	0,00889	0,01778
HDAC3	0,5222	0,0337	0,0674
HDAC4	0,26664	0,00977	0,01954
HDAC5	0,4434	0,0394	0,0788
HDAC6	0,3157	0,0265	0,053
HDAC7	0,6368	0,0971	0,1941
MeCP2	0,2928	0,0375	0,0749
MBD1	0,975	0,102	0,203
MBD2	1,0583	0,0533	0,1065
ARID1A	1,613	0,125	0,25
ASXL1	0,4427	0,0334	0,0669
EZH2	0,05555	0,00299	0,00597
MTA1	1,0869	0,058	0,116
ATRX	0,987	0,222	0,444
Lsh	0,04461	0,00447	0,00893
CHD1	0,4519	0,0347	0,0695

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.4. Gebelik 12. gün (P12) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,6692	0,0294	0,0588
DNMT3A	0,6074	0,048	0,0959
DNMT3B	0,04307	0,00598	0,01195
NCOA1	0,6086	0,013	0,0261
ATF2	0,8686	0,0855	0,1711
HAT1	0,3729	0,016	0,032
KAT2A	0,5591	0,0231	0,0462
KAT2B	0,9552	0,0244	0,0489
KAT8	0,07566	0,00476	0,00952
KAT6A	0,8444	0,0267	0,0535
KAT6B	0,806	0,11	0,221
CARM1	0,943	0,0398	0,0796
DOT1L	0,5891	0,047	0,0939
EHMT2	0,9105	0,0479	0,0958
PRMT1	1,752	0,0631	0,1261
EP300	2,125	0,051	0,102
NSD1	1,1603	0,067	0,1339
AURKA	0,02587	0,00417	0,00835
AURKB	0,019	0,011	0,022
AURKC	0,00836	0,00186	0,00372
PAK1	0,3273	0,0129	0,0258
DZIP3	0,1636	0,0398	0,0797
USP16	0,5647	0,0964	0,1928
KDM1A	1,048	0,00619	0,0124
KDM5B	2,2883	0,0361	0,0721
KDM5C	1,0413	0,0476	0,0952
KDM4A	0,5806	0,0221	0,0442
KDM6B	1,0149	0,0886	0,1772
HDAC1	1,0294	0,0452	0,0905
HDAC2	0,802	0,0284	0,0569
HDAC3	0,5737	0,0449	0,0898
HDAC4	0,295	0,0221	0,0442
HDAC5	0,4434	0,0394	0,0788
HDAC6	0,353	0,0149	0,0297
HDAC7	0,7773	0,077	0,154
MeCP2	0,347	0,0406	0,0812
MBD1	1,11	0,121	0,242
MBD2	1,2514	0,049	0,0981
ARID1A	1,6828	0,0333	0,0667
ASXL1	0,5157	0,0332	0,0664
EZH2	0,07234	0,00566	0,01133
MTA1	1,1746	0,0808	0,1617
ATRX	0,95	0,255	0,51
Lsh	0,0596	0,016	0,032
CHD1	0,563	0,106	0,213

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.5. Siklus 16. gün (C16) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,6054	0,0522	0,1045
DNMT3A	0,5583	0,0203	0,0406
DNMT3B	0,04233	0,00478	0,00956
NCOA1	0,4408	0,0378	0,0756
ATF2	0,7905	0,0408	0,0817
HAT1	0,3681	0,0262	0,0525
KAT2A	0,5422	0,0639	0,1277
KAT2B	0,655	0,0584	0,1167
KAT8	0,05907	0,00428	0,00856
KAT6A	0,7441	0,069	0,1379
KAT6B	0,747	0,134	0,268
CARM1	0,823	0,103	0,205
DOT1L	0,5961	0,0602	0,1204
EHMT2	0,8626	0,0438	0,0876
PRMT1	1,504	0,208	0,417
EP300	1,663	0,122	0,244
NSD1	1,395	0,127	0,253
AURKA	0,017766	0,000756	0,001511
AURKB	0,0124	0,00235	0,00469
AURKC	0,00909	0,00181	0,00363
PAK1	0,3631	0,0172	0,0344
DZIP3	0,1558	0,0216	0,0433
USP16	0,5995	0,0682	0,1364
KDM1A	0,8637	0,0655	0,1309
KDM5B	1,743	0,143	0,286
KDM5C	0,9026	0,068	0,136
KDM4A	0,5877	0,0527	0,1054
KDM6B	0,897	0,123	0,246
HDAC1	0,9317	0,0684	0,1368
HDAC2	0,808	0,108	0,216
HDAC3	0,6026	0,059	0,1181
HDAC4	0,416	0,146	0,292
HDAC5	0,4137	0,0696	0,1392
HDAC6	0,3042	0,0137	0,0274
HDAC7	1,08	0,157	0,313
MeCP2	0,2893	0,0325	0,065
MBD1	0,9353	0,0543	0,1087
MBD2	1,14	0,137	0,275
ARID1A	1,634	0,121	0,243
ASXL1	0,48	0,0736	0,1472
EZH2	0,0571	0,00702	0,01405
MTA1	1,199	0,204	0,408
ATRX	1,321	0,121	0,241
Lsh	0,0703	0,0128	0,0255
CHD1	0,4366	0,04	0,08

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.6. Gebelik 16. gün (P16) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,7362	0,022	0,044
DNMT3A	0,4082	0,0419	0,0838
DNMT3B	0,04874	0,00638	0,01276
NCOA1	0,5758	0,0747	0,1494
ATF2	0,81	0,0893	0,1785
HAT1	0,3166	0,0255	0,051
KAT2A	0,5622	0,0635	0,127
KAT2B	0,579	0,105	0,21
KAT8	0,05937	0,00732	0,01465
KAT6A	0,6986	0,0442	0,0884
KAT6B	0,625	0,0751	0,1501
CARM1	0,64	0,107	0,215
DOT1L	0,7184	0,0302	0,0604
EHMT2	0,8017	0,0472	0,0944
PRMT1	1,234	0,139	0,278
EP300	1,827	0,158	0,316
NSD1	1,031	0,0927	0,1855
AURKA	0,02857	0,00432	0,00864
AURKB	0,02532	0,00891	0,01781
AURKC	0,00947	0,00118	0,00236
PAK1	0,412	0,0164	0,0328
DZIP3	0,0836	0,023	0,046
USP16	0,6277	0,0614	0,1228
KDM1A	1,0578	0,0653	0,1305
KDM5B	1,758	0,144	0,288
KDM5C	0,9158	0,0742	0,1484
KDM4A	0,4974	0,0584	0,1168
KDM6B	0,9086	0,0702	0,1404
HDAC1	0,9922	0,0627	0,1254
HDAC2	0,5578	0,0507	0,1014
HDAC3	0,4623	0,028	0,0559
HDAC4	0,2296	0,0274	0,0549
HDAC5	0,3258	0,0412	0,0825
HDAC6	0,2963	0,019	0,038
HDAC7	0,832	0,104	0,208
MeCP2	0,2442	0,0393	0,0787
MBD1	1,1109	0,0801	0,1602
MBD2	1,5643	0,088	0,176
ARID1A	1,394	0,105	0,211
ASXL1	0,5741	0,0471	0,0943
EZH2	0,08282	0,00923	0,01847
MTA1	0,9322	0,0544	0,1088
ATRX	1,217	0,143	0,285
Lsh	0,0814	0,0213	0,0425
CHD1	0,845	0,183	0,367

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.7. Siklus 22. gün (C22) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,6504	0,0513	0,1025
DNMT3A	0,4931	0,0518	0,1037
DNMT3B	0,03643	0,00373	0,00745
NCOA1	0,3808	0,0235	0,0471
ATF2	0,6035	0,0616	0,1232
HAT1	0,2986	0,0209	0,0417
KAT2A	0,4967	0,0219	0,0438
KAT2B	0,5947	0,0265	0,0529
KAT8	0,05258	0,00148	0,00297
KAT6A	0,6804	0,0453	0,0907
KAT6B	0,5506	0,0483	0,0966
CARM1	0,6452	0,0434	0,0869
DOT1L	0,6782	0,0469	0,0938
EHMT2	0,7063	0,0958	0,1916
PRMT1	1,4274	0,0982	0,1965
EP300	1,589	0,111	0,221
NSD1	1,2303	0,0944	0,1888
AURKA	0,0184	0,00126	0,00251
AURKB	0,02099	0,00368	0,00736
AURKC	0,00674	0,00119	0,00238
PAK1	0,314	0,0206	0,0411
DZIP3	0,0973	0,014	0,028
USP16	0,4692	0,0317	0,0634
KDM1A	0,7284	0,0638	0,1277
KDM5B	1,673	0,11	0,219
KDM5C	0,8474	0,0437	0,0874
KDM4A	0,5054	0,0375	0,0751
KDM6B	0,8478	0,0877	0,1753
HDAC1	0,9112	0,0186	0,0372
HDAC2	0,7422	0,0865	0,1729
HDAC3	0,4767	0,0496	0,0991
HDAC4	0,3269	0,0164	0,0329
HDAC5	0,3148	0,0272	0,0543
HDAC6	0,2643	0,0278	0,0555
HDAC7	0,9811	0,088	0,176
MeCP2	0,2114	0,0229	0,0457
MBD1	0,939	0,11	0,219
MBD2	0,9729	0,0352	0,0704
ARID1A	1,822	0,186	0,372
ASXL1	0,3984	0,0303	0,0607
EZH2	0,06266	0,00789	0,01577
MTA1	1,0288	0,0619	0,1239
ATRX	1,0337	0,0788	0,1576
Lsh	0,05907	0,00679	0,01359
CHD1	0,4173	0,0514	0,1028

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.8. Gebelik 22. gün (P22) grubu hedef genlere ilişkin normalize edilen Ct verilerine ait tanımlayıcı istatistik değerleri.

Hedef	Ortalama	SH	St Sapma
DNMT1	0,7108	0,0679	0,1358
DNMT3A	0,3274	0,0242	0,0484
DNMT3B	0,04428	0,00282	0,00564
NCOA1	0,5121	0,0423	0,0846
ATF2	0,6269	0,0484	0,0969
HAT1	0,3527	0,0251	0,0502
KAT2A	0,536	0,0452	0,0904
KAT2B	0,5191	0,0782	0,1564
KAT8	0,0619	0,014	0,028
KAT6A	0,6411	0,0743	0,1485
KAT6B	0,4994	0,0645	0,1291
CARM1	0,6399	0,0528	0,1056
DOT1L	0,6027	0,0804	0,1607
EHMT2	0,757	0,0469	0,0937
PRMT1	1,2085	0,0812	0,1625
EP300	1,682	0,135	0,27
NSD1	1,17	0,101	0,201
AURKA	0,08107	0,00414	0,00829
AURKB	0,2163	0,0248	0,0495
AURKC	0,0144	0,00385	0,0077
PAK1	0,461	0,038	0,076
DZIP3	0,05373	0,00992	0,01984
USP16	0,4799	0,033	0,0661
KDM1A	0,742	0,0497	0,0994
KDM5B	1,243	0,133	0,266
KDM5C	0,849	0,0865	0,173
KDM4A	0,5173	0,034	0,0681
KDM6B	0,766	0,108	0,216
HDAC1	1,0462	0,0915	0,1829
HDAC2	0,633	0,0535	0,107
HDAC3	0,3014	0,0553	0,1107
HDAC4	0,2635	0,0475	0,0949
HDAC5	0,3148	0,0272	0,0543
HDAC6	0,2664	0,0171	0,0342
HDAC7	0,916	0,12	0,24
MeCP2	0,1804	0,0268	0,0537
MBD1	1,0133	0,0981	0,1962
MBD2	1,441	0,145	0,289
ARID1A	1,626	0,21	0,419
ASXL1	0,5068	0,0458	0,0916
EZH2	0,1055	0,0239	0,0477
MTA1	0,817	0,104	0,208
ATRX	0,986	0,107	0,215
Lsh	0,1537	0,0155	0,031
CHD1	0,503	0,138	0,275

SH: Standart hata, St Sapma: Standart sapma, grup içi birey sayısı (n): 4.

Tablo 3.9. Siklus 12. güne nazaran gebelik 12. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P12/C12).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	18,65023379	0,05522	NS
DNMT3A	7,182634607	0,06494	NS
DNMT3B	28,73458505	0,00737	NS
NCOA1	13,50306005	0,03597	NS
ATF2	1,698731729	0,09849	NS
HAT1	15,16304611	0,02671	NS
KAT2A	22,36075707	0,02343	*
KAT2B	2,329758059	0,07937	NS
KAT8	1,039658114	0,01524	NS
KAT6A	0,350128215	0,05057	NS
KAT6B	26,02575764	0,12983	NS
CARM1	16,31082771	0,08795	NS
DOT1L	3,327220427	0,06199	NS
EHMT2	10,56956626	0,06971	NS
PRMT1	8,801831231	0,11873	NS
EP300	13,29600871	0,09139	*
NSD1	11,23204224	0,11100	NS
AURKA	41,89865418	0,00506	NS
AURKB	432,6009924	0,01099	NS
AURKC	86,58484072	0,00199	NS
PAK1	-5,522171152	0,02752	NS
DZIP3	41,9032833	0,04184	NS
USP16	9,907216024	0,11109	NS
KDM1A	0,301990774	0,05438	NS
KDM5B	9,459910739	0,10527	NS
KDM5C	12,47835323	0,07224	NS
KDM4A	9,048849931	0,03503	NS
KDM6B	13,19860537	0,10413	NS
HDAC1	11,3444213	0,05234	NS
HDAC2	2,906027609	0,02979	NS
HDAC3	9,862259549	0,05616	NS
HDAC4	10,65484567	0,02418	NS
HDAC5	10,54103217	0,04734	NS
HDAC6	11,7934067	0,03037	NS
HDAC7	22,06439767	0,12390	NS
MeCP2	18,49429842	0,05524	NS
MBD1	13,89924783	0,15813	NS
MBD2	18,24549082	0,07240	*
ARID1A	4,336786513	0,12939	NS
ASXL1	16,4959783	0,04713	NS
EZH2	30,22978334	0,00640	*
MTA1	8,072750811	0,09950	NS
ATRX	-3,741119372	0,33824	NS
Lsh	33,58335073	0,01660	NS
CHD1	24,5278368	0,11190	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.

Tablo 3.10. Siklus 16. güne nazaran gebelik 16. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P16/C16).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	21,6063364	0,05668	NS
DNMT3A	-26,8823374	0,04656	*
DNMT3B	15,14045445	0,00797	NS
NCOA1	30,61850253	0,08371	NS
ATF2	2,473920373	0,09815	NS
HAT1	-13,99315248	0,03658	NS
KAT2A	3,690682274	0,09005	NS
KAT2B	-11,56109339	0,11992	NS
KAT8	0,494853591	0,00848	NS
KAT6A	-6,119124431	0,08191	NS
KAT6B	-16,35752041	0,15374	NS
CARM1	-22,25269062	0,14864	NS
DOT1L	20,51897025	0,06732	NS
EHMT2	-7,065500125	0,06439	NS
PRMT1	-17,99462191	0,25059	NS
EP300	9,862238397	0,19956	NS
NSD1	-26,07725808	0,15697	NS
AURKA	60,82965262	0,00439	*
AURKB	104,2257113	0,00921	NS
AURKC	4,121002763	0,00217	NS
PAK1	13,47812962	0,02376	NS
DZIP3	-46,33575113	0,03157	NS
USP16	4,700992677	0,09178	NS
KDM1A	22,47717647	0,09244	NS
KDM5B	0,859688407	0,20314	NS
KDM5C	1,458361597	0,10062	NS
KDM4A	-15,36607364	0,07866	NS
KDM6B	1,249754762	0,14156	NS
HDAC1	6,493285217	0,09278	NS
HDAC2	-30,96669591	0,11942	NS
HDAC3	-23,27847358	0,06533	NS
HDAC4	-44,82562834	0,14832	NS
HDAC5	-21,24093286	0,08092	NS
HDAC6	-2,617774238	0,02343	NS
HDAC7	-22,91762612	0,18796	NS
MeCP2	-15,58748607	0,05103	NS
MBD1	18,77247743	0,09678	NS
MBD2	37,16543274	0,16320	*
ARID1A	-14,68850958	0,16086	NS
ASXL1	19,59073441	0,08738	NS
EZH2	45,04256107	0,01160	NS
MTA1	-22,26167503	0,21125	NS
ATRX	-7,857461189	0,18674	NS
Lsh	15,71008859	0,02480	NS
CHD1	93,53461819	0,18766	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *p < 0,05.

Tablo 3.11. Siklus 22. güne nazaran gebelik 22. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P22/C22).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	9,277227768	0,08508	NS
DNMT3A	-33,60311365	0,05723	*
DNMT3B	21,56503852	0,00467	NS
NCOA1	34,4789079	0,04842	*
ATF2	3,866033549	0,07836	NS
HAT1	18,13433704	0,03263	NS
KAT2A	7,916853441	0,05024	NS
KAT2B	-12,70910733	0,08255	NS
KAT8	17,68327952	0,01410	NS
KAT6A	-5,782528774	0,08701	NS
KAT6B	-9,308138871	0,08061	NS
CARM1	-0,82799878	0,06839	NS
DOT1L	-11,12355509	0,09306	NS
EHMT2	7,173246238	0,10663	NS
PRMT1	-15,33765474	0,12747	NS
EP300	5,838062709	0,17470	NS
NSD1	-4,937258143	0,13806	NS
AURKA	340,6039424	0,00433	*
AURKB	930,1463326	0,02503	*
AURKC	113,8558924	0,00403	NS
PAK1	46,79163186	0,04320	*
DZIP3	-44,7865556	0,01716	*
USP16	2,282628744	0,04579	NS
KDM1A	1,866730482	0,08090	NS
KDM5B	-25,67458804	0,17249	*
KDM5C	0,188729736	0,09690	NS
KDM4A	2,356865807	0,05067	NS
KDM6B	-9,670515185	0,13924	NS
HDAC1	14,81418367	0,09334	NS
HDAC2	-14,71635044	0,10168	NS
HDAC3	-36,77948252	0,07430	NS
HDAC4	-19,39976392	0,05021	NS
HDAC5	-35,48760804	0,03183	*
HDAC6	0,796773253	0,03259	NS
HDAC7	-6,644661669	0,14882	NS
MeCP2	-14,67382124	0,03525	NS
MBD1	7,921541454	0,14711	NS
MBD2	48,14401725	0,14882	*
ARID1A	-10,7764387	0,28005	NS
ASXL1	27,20869772	0,05494	NS
EZH2	68,40046305	0,02513	NS
MTA1	-20,54684775	0,12098	NS
ATRX	-4,598396028	0,13327	NS
Lsh	160,2228422	0,01693	*
CHD1	20,52734057	0,14689	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.

Tablo 3.12. Siklus 12. güne nazaran siklus 16. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% C16/C12).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	7,341446733	0,07010	NS
DNMT3A	-1,47774198	0,04827	NS
DNMT3B	26,55068364	0,00644	NS
NCOA1	-17,78191985	0,05053	NS
ATF2	-7,451642083	0,06366	NS
HAT1	13,67984184	0,03385	NS
KAT2A	18,64792257	0,06400	NS
KAT2B	-29,83256327	0,09545	*
KAT8	-21,10511259	0,01510	NS
KAT6A	-11,56783718	0,08123	NS
KAT6B	16,82174424	0,15064	NS
CARM1	1,489020129	0,12921	NS
DOT1L	4,55588774	0,07251	NS
EHMT2	4,74915309	0,06696	NS
PRMT1	-6,571382522	0,23139	NS
EP300	-11,34640339	0,14359	NS
NSD1	33,69957395	0,15453	NS
AURKA	-2,552453264	0,00295	NS
AURKB	246,8837595	0,00241	*
AURKC	102,8297666	0,00195	NS
PAK1	4,823996563	0,02978	NS
DZIP3	35,13420257	0,02513	NS
USP16	16,68750752	0,08779	NS
KDM1A	-17,33699871	0,08487	NS
KDM5B	-16,60420305	0,17394	NS
KDM5C	-2,498385762	0,08704	NS
KDM4A	10,3749233	0,05931	NS
KDM6B	0,087022501	0,13455	NS
HDAC1	0,772841873	0,07327	NS
HDAC2	3,68629814	0,10848	NS
HDAC3	15,3932723	0,06799	NS
HDAC4	56,06492256	0,14608	NS
HDAC5	-6,70000398	0,08000	NS
HDAC6	-3,640127969	0,02983	NS
HDAC7	69,53730581	0,18416	NS
MeCP2	-1,197109186	0,04960	NS
MBD1	-4,04047358	0,11522	NS
MBD2	7,767412088	0,14740	NS
ARID1A	1,305060958	0,17432	NS
ASXL1	8,438555962	0,08082	NS
EZH2	2,789813524	0,00763	NS
MTA1	10,33243325	0,21221	NS
ATRX	33,83691995	0,25270	NS
Lsh	57,70291406	0,01351	NS
CHD1	-3,389137068	0,05298	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *p < 0,05.

Tablo 3.13. Siklus 12. güne nazaran siklus 22. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% C22/C12).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	15,32375698	0,06937	NS
DNMT3A	-12,97365721	0,06787	NS
DNMT3B	8,887550718	0,00570	NS
NCOA1	-28,9794266	0,04098	*
ATF2	-29,33722333	0,07861	*
HAT1	-7,774605571	0,02987	NS
KAT2A	8,686723045	0,02228	NS
KAT2B	-36,288813	0,08002	*
KAT8	-29,78441574	0,01456	NS
KAT6A	-19,13717053	0,06243	*
KAT6B	-13,91131686	0,08382	NS
CARM1	-20,41315906	0,08965	NS
DOT1L	18,95259509	0,06195	NS
EHMT2	-14,22929359	0,10835	NS
PRMT1	-11,35837483	0,14060	NS
EP300	-15,28472651	0,13422	NS
NSD1	17,93712423	0,12943	NS
AURKA	0,928167663	0,00312	NS
AURKB	487,2576229	0,00372	*
AURKC	50,26783643	0,00139	NS
PAK1	-9,338937148	0,03185	NS
DZIP3	-15,59309882	0,01895	NS
USP16	-8,68115198	0,06371	NS
KDM1A	-30,27874864	0,08363	*
KDM5B	-19,9772969	0,14772	*
KDM5C	-8,461956778	0,06974	NS
KDM4A	-5,081391962	0,04635	NS
KDM6B	-5,442513699	0,10333	NS
HDAC1	-1,4344993	0,03223	NS
HDAC2	-4,760100881	0,08692	NS
HDAC3	-8,723600294	0,05995	NS
HDAC4	22,58881843	0,01911	*
HDAC5	-29,01228522	0,04786	*
HDAC6	-16,30068375	0,03837	NS
HDAC7	54,08044245	0,13100	*
MeCP2	-27,79601462	0,04389	NS
MBD1	-3,676196941	0,14946	NS
MBD2	-8,071258662	0,06384	NS
ARID1A	12,96849777	0,22392	NS
ASXL1	-9,997434102	0,04514	NS
EZH2	12,80003455	0,00843	NS
MTA1	-5,34187987	0,08486	NS
ATRX	4,713905581	0,23561	NS
Lsh	32,41896269	0,00813	NS
CHD1	-7,645246823	0,06205	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.

Tablo 3.14. Siklus 16. güne nazaran siklus 22. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% C22/C16).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	7,43637289	0,07319	NS
DNMT3A	-11,66834323	0,05568	NS
DNMT3B	-13,95735875	0,00606	NS
NCOA1	-13,61927539	0,04453	NS
ATF2	-23,64772508	0,07390	*
HAT1	-18,87269287	0,03352	NS
KAT2A	-8,395595395	0,06753	NS
KAT2B	-9,201205055	0,06408	NS
KAT8	-11,00109707	0,00453	NS
KAT6A	-8,559480066	0,08253	NS
KAT6B	-26,30765471	0,14260	NS
CARM1	-21,5808362	0,11150	NS
DOT1L	13,76938942	0,07630	NS
EHMT2	-18,11799534	0,10532	NS
PRMT1	-5,123689551	0,23037	NS
EP300	-4,442372631	0,16471	NS
NSD1	-11,78945396	0,15797	NS
AURKA	3,571789177	0,00147	NS
AURKB	69,29521974	0,00437	NS
AURKC	-25,91430787	0,00217	NS
PAK1	-13,51115601	0,02681	NS
DZIP3	-37,53846208	0,02577	NS
USP16	-21,74068162	0,07523	NS
KDM1A	-15,65603684	0,09143	NS
KDM5B	-4,044680871	0,18031	NS
KDM5C	-6,116381828	0,08080	NS
KDM4A	-14,00346637	0,06471	NS
KDM6B	-5,524728443	0,15098	NS
HDAC1	-2,190412746	0,07086	NS
HDAC2	-8,146109151	0,13844	NS
HDAC3	-20,89972155	0,07709	NS
HDAC4	-21,45011421	0,14668	NS
HDAC5	-23,91455755	0,07472	NS
HDAC6	-13,13882586	0,03096	NS
HDAC7	-9,117086816	0,17954	NS
MeCP2	-26,92118137	0,03974	NS
MBD1	0,379614878	0,12234	NS
MBD2	-14,69708741	0,14188	NS
ARID1A	11,51318276	0,22197	NS
ASXL1	-17,00132384	0,07958	NS
EZH2	9,738534081	0,01056	NS
MTA1	-14,20644198	0,21332	NS
ATRX	-21,76007516	0,14411	NS
Lsh	-16,03264691	0,01445	NS
CHD1	-4,405415318	0,06515	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.

Tablo 3.15. Gebelik 12. güne nazaran gebelik 16. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P16/P12).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	10,0157974	0,03673	NS
DNMT3A	-32,79025799	0,06368	*
DNMT3B	13,18716892	0,00874	NS
NCOA1	-5,384026596	0,07582	NS
ATF2	-6,746201269	0,12362	NS
HAT1	-15,10084915	0,03009	NS
KAT2A	0,544360267	0,06755	NS
KAT2B	-39,35750947	0,10756	*
KAT8	-21,5305128	0,00874	NS
KAT6A	-17,26877662	0,05166	*
KAT6B	-22,46616452	0,13341	NS
CARM1	-32,16024335	0,11460	*
DOT1L	21,95206522	0,05583	NS
EHMT2	-11,95759843	0,06725	NS
PRMT1	-29,58161628	0,15281	*
EP300	-14,03331259	0,16600	NS
NSD1	-11,1457553	0,11438	NS
AURKA	10,44822927	0,00601	NS
AURKB	33,01248691	0,01414	NS
AURKC	13,1862514	0,00220	NS
PAK1	25,9050003	0,02086	*
DZIP3	-48,89564703	0,04600	NS
USP16	11,16010679	0,11427	NS
KDM1A	0,93848506	0,06556	NS
KDM5B	-23,15657817	0,14864	*
KDM5C	-12,05104138	0,08813	NS
KDM4A	-14,33689455	0,06243	NS
KDM6B	-10,47781507	0,11305	NS
HDAC1	-3,617703821	0,07732	NS
HDAC2	-30,44326056	0,05815	*
HDAC3	-19,41593022	0,05290	NS
HDAC4	-22,18339841	0,03525	NS
HDAC5	-33,52494991	0,04888	*
HDAC6	-16,06178674	0,02412	NS
HDAC7	7,061012404	0,12948	NS
MeCP2	-29,61517551	0,05653	NS
MBD1	0,065197127	0,14525	NS
MBD2	25,01080263	0,10075	*
ARID1A	-17,167415	0,11058	*
ASXL1	11,31926385	0,05766	NS
EZH2	14,48147592	0,01083	NS
MTA1	-20,63625209	0,09743	*
ATRX	28,11361934	0,29227	NS
Lsh	36,60248869	0,02661	NS
CHD1	50,14752486	0,21197	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.

Tablo 3.16. Gebelik 12. güne nazaran gebelik 22. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P22/P12).

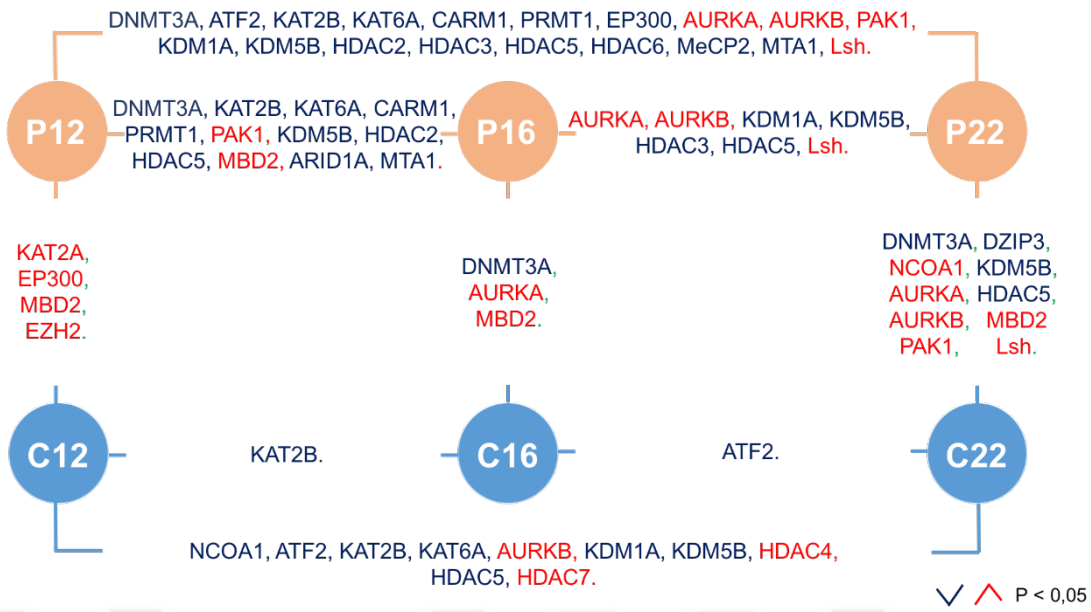
Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	6,213532466	0,07400	NS
DNMT3A	-46,08941819	0,05372	*
DNMT3B	2,823334477	0,00661	NS
NCOA1	-15,85452282	0,04427	NS
ATF2	-27,83132879	0,09829	*
HAT1	-5,395122855	0,02976	NS
KAT2A	-4,143048453	0,05076	NS
KAT2B	-45,65211048	0,08192	*
KAT8	-18,21824832	0,01481	NS
KAT6A	-24,07890808	0,07894	*
KAT6B	-38,04803841	0,12778	NS
CARM1	-32,14057159	0,06614	*
DOT1L	2,316540794	0,09308	NS
EHMT2	-16,8638772	0,06702	NS
PRMT1	-31,02498562	0,10285	*
EP300	-20,86128602	0,14442	*
NSD1	0,79313632	0,12095	NS
AURKA	213,3880926	0,00588	*
AURKB	1035,862109	0,02709	*
AURKC	72,23083145	0,00428	NS
PAK1	40,86146479	0,04011	*
DZIP3	-67,15794281	0,04106	NS
USP16	-15,01620942	0,10188	NS
KDM1A	-29,1910772	0,05008	*
KDM5B	-45,66302554	0,13789	*
KDM5C	-18,46359758	0,09872	NS
KDM4A	-10,90624769	0,04058	NS
KDM6B	-24,5456338	0,13984	NS
HDAC1	1,637040892	0,10204	NS
HDAC2	-21,06967522	0,06059	*
HDAC3	-47,47476297	0,07127	*
HDAC4	-10,70713943	0,05236	NS
HDAC5	-58,57115507	0,03105	*
HDAC6	-24,53382315	0,02264	*
HDAC7	17,84133711	0,14261	NS
MeCP2	-48,00686408	0,04866	*
MBD1	-8,731501716	0,15591	NS
MBD2	15,17304337	0,15268	NS
ARID1A	-3,395034272	0,21220	NS
ASXL1	-1,720991861	0,05658	NS
EZH2	45,86201069	0,02452	NS
MTA1	-30,40904415	0,13166	*
ATRX	3,781328906	0,27687	NS
Lsh	157,9545928	0,02227	*
CHD1	-10,61217254	0,17391	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *p < 0,05.

Tablo 3.17. Gebelik 16. güne nazaran gebelik 22. günde hedef genlerin ekspresyon değişimleri (% P22/P16).

Hedef	RE (%)	SH	Sig
DNMT1	-3,456108142	0,07137	NS
DNMT3A	-19,78754836	0,04841	NS
DNMT3B	-9,156368646	0,00698	NS
NCOA1	-11,06630926	0,08584	NS
ATF2	-22,61047572	0,10155	NS
HAT1	11,43206522	0,03577	NS
KAT2A	-4,662030479	0,07793	NS
KAT2B	-10,3798524	0,13072	NS
KAT8	4,221085921	0,01582	NS
KAT6A	-8,231633934	0,08643	NS
KAT6B	-20,0968697	0,09899	NS
CARM1	0,028997398	0,11975	NS
DOT1L	-16,10101837	0,08585	NS
EHMT2	-5,572631696	0,06652	NS
PRMT1	-2,049705291	0,16117	NS
EP300	-7,942580587	0,20788	NS
NSD1	13,4364899	0,13691	NS
AURKA	183,7420705	0,00599	*
AURKB	753,9514864	0,02632	*
AURKC	52,16585877	0,00403	NS
PAK1	11,8791664	0,04138	NS
DZIP3	-35,73530379	0,02504	NS
USP16	-23,54830071	0,06972	NS
KDM1A	-29,84942982	0,08204	*
KDM5B	-29,28871052	0,19623	*
KDM5C	-7,2912247	0,11395	NS
KDM4A	4,004812627	0,06759	NS
KDM6B	-15,714338	0,12897	NS
HDAC1	5,451981247	0,11090	NS
HDAC2	13,47617128	0,07372	NS
HDAC3	-34,81932947	0,06201	*
HDAC4	14,74782853	0,05482	NS
HDAC5	-37,67760254	0,04447	*
HDAC6	-10,09318173	0,02555	NS
HDAC7	10,0693282	0,15887	NS
MeCP2	-26,13019028	0,04762	NS
MBD1	-8,790967384	0,12666	NS
MBD2	-7,869527312	0,16927	NS
ARID1A	16,62676679	0,23459	NS
ASXL1	-11,7142849	0,06572	NS
EZH2	27,4110152	0,02558	NS
MTA1	-12,31392457	0,11729	NS
ATRX	-18,99274297	0,17851	NS
Lsh	88,8359394	0,02633	*
CHD1	-40,466666	0,22923	NS

RE (%): Rölatif ekspresyon (yüzdelik), SH: değişimin standart hatası, Sig: değişimin istatistiksel anlamı, NS: değişim istatistiksel olarak anlamlı değil, *$p < 0,05$.



Şekil 3.1. Gruplar arası ekspresyon değişimlerinden istatistiksel olarak anlamlı olan farklılıklar ($p<0,05$). Gen ekspresyonu artan genler kırmızı, baskılanan genler mavi olarak gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Genetik prensiplerle açıklanamayan biyolojik olayları epigenetik izah etmektedir. Geniş bir bakış açısı ile epigenetik genotip ve fenotip arasındaki köprüdür ve lokusun DNA dizisinde değişiklik olmaksızın ortaya çıkan biyolojik olayları kapsamaktadır. Son epigenetik araştırmalar DNA modifikasyonları ve kromatin yapısını etkileyen proteinler ve histon proteinleri üzerinde yoğunlaşmaktadır. Kromatin kompleksine dahil olan DNA dışı yapılar ve ilgili proteinler hücrenin epigenetik mekanizmalarını şekillendiren önemli adaylardandır (Bersttein ve Allis 2005). Epigenetik modifikasyon paternleri gen aktivitesini ve ekspresyonunu yansıttıkları kadar kromatin yapısını da temsil ederler (Kouzarides 2007). Epigenetik modifikasyonlar, fizyolojik faktörlerin etkisi altında genomun paketlenmesi ve yorumlanması için hayati önem arz etmektedirler (Jenuwein ve Allis 2001). Ayrıca gelişim ve fizyolojik sürecin dışında cereyan eden (patoloji/hastalık) durumun anlaşılabilmesi adına da kritik rol almaktadırlar (Jaenisch ve Bird 2003, Esteller 2008).

Siklus ilintili ve hormonal değişikliklere maruz kalan endometrium pek çok gen tarafından regüle edilmektedir ve bu endometrial transkriptom olarak adlandırılmaktadır (Talbi ve ark. 2006). Endometrial transkriptoma dahil olan spesifik genler açısından, endometriumda ciddi bir regülasyonun varlığı bazı fizyolojik etkileri olan genler açısından ortaya çıkarılmaya başlanmıştır. Endometriumun siklusa bağlı transformasyonu kromatin modifikasyon enzimlerinin ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Munro ve ark 2010, Zelenkon ve ark 2012). Ancak, histon modifikasyon enzimlerinin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin endometriumda erken gebelik fizyolojisine ve embriyo implantasyon sürecine katkıları henüz tüm hatları ile aydınlatılamamıştır. DNA ve histon metilasyonu, histon asetilasyonu, fosforilasyonu ve diğer modifikasyonlar genlerin regülasyonunda tek başına çalışmazlar, ancak; birbirleri ile uyum içerisinde etkileşerek kendi bünyelerindeki homeostazis dahilinde gen regülasyonuna katkı sağlamaktadırlar. Bu duruma ilişkin metil CpG bağlanma proteinlerinin metillenen DNA promotör bölgelerine yerleşerek HDAC ve HMT'nin aktive olmasını sağlayarak DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu arasında bağlantının kurulumunu sağladığı rapor edilmiştir (Nan ve ark 1998). Gen ifadesinin kontrolü adına birbirleri ile hassas bir uyum dahilinde çalışan bu birimler epigenetik denge mekanizmasının zıt veya eş yönlü çalışan yapı taşlarıdır.

CpG metilasyonları memelilerin embriyonik gelişimi, imprinting, X kromozomu inaktivasyonu gibi süreçlerde kritik rol alan epigenetik modifikasyonlardan biridir. Replikasyon sonrası DNA'nın metilasyon paterninin sürdürülmesinde rol alan DNMT1 ekspresyonu siklusa veya gebeliğe bağlı değişimlerden etkilenmemiş olarak izlenmiştir. DNA'nın var olan metilasyon profilinin sürdürülmesinden ziyade *de novo* metilasyonlardan sorumlu olan DNMT3A ekspresyonu siklusun 12-16-22 günlerinde stabil bir seyir izlerken, gebeliğin 16. gününde siklusun aynı gününe oran ile, gebeliğin 22. gününde siklusun aynı gününe oran ile ve gebeliğin 16. gününde 12. gününe oran ile azalmıştır. Bu tablo endometriumda erken gebelik döneminde DNMT3A tarafından yönetilen *de novo* metilasyonların azalma eğiliminde olduğu 16. ve 22. günler açısından gebelik DNMT3A ekspresyonunu aşağı yönde düzenlenmesine sebep olduğu tespit edilmiştir. Bir diğer de novo metilasyon sorumlusu olan DNMT3B ekspresyonunda siklus veya gebeliğe bağlı olarak herhangi bir değişim izlenmemiştir. DNA metilasyonun azalması transkripsiyonel artış ile ilişkililidir. Bu bağlamda erken gebelik döneminde endometrial transkriptomun aktivitesini yükseltmesinde DNA metil transferazlardan bu sorumluluğu DNMT3A'nın üstlendiği düşünülebilir. Siklus endometriumda herhangi bir düzenlemeye girmezken erken gebeliğin seyrinde gebelik ilerledikçe aşağı yönde düzenlenmesi kaydedilmiştir. Her iki grubunda (siklus-gebelik) progesteron etkisi altında olmasına karşın embriyonik varlık DNMT3A ekspresyonunun düzenlenmesinde farklılığın temelini oluşturduğu düşünülmüştür.

Steroid ve nüklear hormon reseptörlerinin transkripsiyonel koaktivatörü olarak rol oynayan NCOA1 siklusun 12. gününe kıyasla 22. gününde ekspresyonu azalmıştır. Gebeliğin 22. gününde siklusun 22. gününe kıyasla ifadesi artmış olarak tespit edilmiştir. H2B ve H2 asetilasyonununda rol oynayan ATF2 ekspresyonu siklusun 22. gününde 12. ve 16. günlerine kıyasla azaldığı, gebeliğin 22. gününde 12. gününe kıyasla azaldığı izlenmiştir. HAT1 ekspresyonunda siklusa veya gebeliğe bağlı olarak herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Transkripsiyonel aktivasyondan sorumlu olan Lizin asetil transferaz 2A ekspresyonu gebeliğin ve siklusun araştırılan günlerine bağlı olarak regülasyon göstermeksizin stabil bir seyir izlediği yalnızca siklusun 12. gününe kıyasla gebeliğin 12. gününde artış gösterdiği anlaşılmıştır. Hücresel büyüme ve farklılaşma yolaklarından sorumlu proteinlerin transkripsiyonel aktivitesinin uyarımında sorumluluk üstlenen KAT2B ekspresyonu siklusun ve

gebeliğin 12. gününe kıyasla 16. ve 22. günlerinde azaldığı tespit edilmiştir. KAT2B ekspresyonu embriyonik varlıktan etkilenmemiş olarak izlenmiştir. Başka bir histon asetilasyon sorumlusu olan KAT8 ekspresyonu gebeliğe ve siklusa bağlı stabil bir seyir izlediği anlaşılmıştır. KAT6A ekspresyonunun siklusun ve gebeliğin 12. günlerine kıyas ile 22. günlerinde ve gebeliğin 16. gününde 12. güne kıyasla azaldığı tespit edilmiştir. KAT6B ekspresyonunun gebeliğin ve siklusun araştırılan günlerinde stabil bir seyir izlediği tespit edilmiştir. Gebeliğin 12. gününe oranla 22. gününde azalma gösteren EP300 ekspresyonu siklusun 12. gününe kıyasla gebeliğin 12. gününde artış gösterdiği kaydedilmiştir.

Histon metil transferaz aktivitesi gösteren CARM1 ekspresyonunun siklusa bağlı olarak herhangi bir düzenlenme göstermezken, gebeliğin 12. gününe kıyas ile 16. ve 22. günlerinde azaldığı izlenmiştir. Histon metil transferaz ailesi üyelerinden DOT1L EHMT2 ekspresyonlarının gebeliğin araştırılan günlerinde ve siklusa bağlı değişimlerden etkilenmeksizin stabil bir seyir izlediği tespit edilmiştir. Protein arjinin metil transferaz 1 ekspresyonu siklusa bağlı gelişen değişimlerden etkilenmemiş ancak gebeliğin 12. gününe kıyasla 16. ve 22. günlerinde azaldığı tespit edilmiştir.

Transkripsiyonel regülatör fonksiyonu gören NSD1 ekspresyonunun araştırılan siklus ve gebelik günlerinde stabil bir seyir izlediği saptanmıştır. Hücre döngüsü ayarlı Aurora Kinaz A ekspresyonunun 12. günde siklus ve gebelik grubu arasında stabil omasına karşın, 16. gün ve 22. günlerde siklus gruplarına nazaran gebelik gruplarında artış gösterdiği anlaşılmıştır. Kromozomal segregasyon ve mikrotubül oluşumunda rol oynayan Aurora Kinaz B ekspresyonunun siklusun ve gebeliğin 12. günlerine nazaran 22. günlerinde arttığı ve gebeliğin 16. gününe nispeten 22. gününde arttığı yine siklusun 12. gününe kıyasla gebeliğin 22. gününde arttığı izlenmiştir. Hücresel hareketlilik, hücre morfolojisi ve hücresel iskeletin yeniden modellenmesi ile ilintili roller üstlenen kromatin yeniden modelleme faktörü P21 Aktif Kinaz 1 ekspresyonu araştırılan siklus günlerinde stabil bir seyir ile karşımıza çıkıyor olmasına karşın gebeliğin 12. gününe kıyas ile 16. ve 22. günlerinde artış gösteriği ve siklusun 22. gününe nispeten gebeliğin 22. gününde artmış olduğu kaydedilmiştir. Bir başka kromatin yeniden modelleme faktörü olan DAZ Interacting Zinc Finger Protein 3 ekspresyonu siklusun 22. gününe nispeten gebeliğin 22. gününde azaldığı, bunun dışında araştırılan gruplar arasında aynı genin ekspresyonunda bir farklılık olmaksızın seyir izlediği tespit edilmiştir. Mitoz esnasında kromatin yeniden modellenme

sürecinde H2A deubikutinasyonunda rol alan USP16 ekspresyonunun araştırılan günler arasında stabil bir seyir izlediği tespit edilmiştir.

Histon deasetilaz bileşenlerinden olan Lizin demetilaz 1A ekspresyonunun siklusun ve gebeliğin 12. gününe nazaran 22. gününde azalmış olmasının yanı sıra gebeliğin 16. gününe kıyasla 22. gününde azaldığı anlaşılmıştır. Histon 3 Lizin 4 demetilasyonunda rol oynayan Lizin demetilaz 5B ekspresyonunun gebelik 12. günden 16. güne ve 22. güne doğru ilerledikçe azalma gösteren bir seyirde olduğu, siklus gruplarında 12. gün baz alındığında 22. günde azalma gösterdiği anlaşılmıştır. Gebelik ve siklus karşılaştırmasında yalnızca 22. günde siklusa göre gebe grupta azalma olduğu tespit edilmiştir. Kromatin yeniden modellenmesi ve transkripsiyonel regülasyon süreçlerine dahil olan Lizin demetilaz 5C, 4A ve 6B ekspresyonlarının araştırılan günlerde stabil bir seyir izlediği tespit edilmiştir.

Ökaryotik gen ekspresyonun regülasyonunda anahtar rol oynayan histon deasetilasyonu birtakım alt ünite komplekslerinden oluşur. Transkripsiyonel baskılanma ilintili olan bu kritik sürece dahil olan ana bileşenler arasında histon deasetilazlar yer almaktadır. Araştırılan diğer HDAC ailesi üyelerinin aksine HDAC1 ekspresyonunun gebeliğin ve siklusun araştırılan günlerinde stabil bir seyirde olduğu kaydedilmiştir. Araştırılan siklus günleri arasında stabil bir seyir izleyen HDAC2 ekspresyonunun, gebeliğin 12. gününe nazaran 16. ve 22. günlerinde azaldığı tespit edilmiştir. Siklus boyunca stabil olan HDAC3 ekspresyon düzeyi, gebeliğin 12. ve 16. günü ile kıyaslandığında 22. günde azalma eğiliminde olduğu anlaşılmıştır. Erken gebelik boyunca stabilitesini koruyan HDAC4 ekspresyonunun siklusun 12. gününe kıyasla 22. gününde artış gösterdiği anlaşılmıştır. HDAC5 ekspresyonunun araştırılan günler arasında epey regülasyona uğradığı anlaşılmıştır; siklusun 12. gününe nazaran 22. gününde, siklusun 22. gününe nazaran gebeliğin 22. gününde, gebeliğin 12. gününe kıyasla 16. ve 22. gününde ve gebeliğin 16. gününe kıyas ile 22. gününde azaldığı tespit edilmiştir. HDAC6 ekspresyon düzeyinin gebeliğin 12. günü ile kıyaslandığında 22. gününde azaldığı kaydedilmiştir. HDAC7 ekspresyonu siklusun 12. günü ile kıyaslandığında 22. gününde arttığı tespit edilmiştir.

Metil CpG bağlayıcı protein 2 ekspresyon düzeyinin gebeliğin 12. gününe kıyasla 22. gününde azaldığı anlaşılmıştır. Metil CpG bağlayıcı domain protein 1 ekspresyonu araştırma günlerinde stabil olarak karşımıza çıkmasına rağmen Metil

CpG bağlayıcı domain protein 2 ekspresyonunun siklus ve gebelik günleri karşılaştırıldığında ve gebeliğin 12. gününe kıyasla 16. gününde artmış olduğu tespit edilmiştir. Kromatinin yeniden modellenmesinde nükleozomlar bünyesindeki sıkıca sarılı elementer DNA ipliğini gevşetmek için oluşan kompleksin kritik bir bileşeni olan ARID1A ekspresyon düzeyi sadece gebeliğin 12. gününe kıyas ile 16. gününde azalmıştır. ASXL1 ekspresyonunun araştırılan günler açısından stabil bir seyir izlediği tespit edilmiştir. Embriyonik ektoderm gelişim proteini, VAV1 onkoproteini ve X-linked nüklear protein ile ilişkili olan ve hematopoetik ve merkezi sinir sisteminde rol oynayan EZH2 ekspresyonunun siklusun 12. gününe kıyasla gebeliğin 12. gününde artış gösterdiği kaydedilmiştir. Nükleozom yeniden modelleme deasetilaz kompleksinin bir bileşeni olduğu düşünülen MTA1 ekspresyon düzeyi siklus esnasında stabil seyirde olmasına rağmen gebeliğin 12. gününe kıyasla 16. ve 22. gününde azalmış olduğu anlaşılmıştır. Kromozomal segregasyonda rol oynayan ve ATPaz/helikaz domaini ile kromatinin yeniden modellenmesine dahil olan ATRX ekspresyonunun araştırılan günlerde stabilitesini koruduğu anlaşılmıştır. Lenfoid spesifik helikaz ekspresyonunun gebeliğin 12. ve 16. gününe ve siklusun 22. gününe kıyasla gebeliğin 22. gününde arttığı anlaşılmıştır. Kromatin yapısal değişimlerine iştirak eden ATPaz/helikaz domaini içeren CHD1 ekspresyonunun araştırılan günlerde stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında koyun endometriumunda peri-implantasyon döneminde epigenetik histon modifikasyon enzimlerinin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin ekspresyon seviyelerindeki (mRNA) düzenlenmeler araştırılmıştır. Çalışma neticesinde profillenen 45 hedef gen ve siklik-gebe olmak üzere 6 farklı grupta istatistiksel olarak anlam ifade eden toplam 67 düzenlenme kaydedilmiştir. Siklusta 12 hedefe ilişkin düzenlenme kaydedilirken, gebe gruplar arasında 38 düzenlenme tespit edilmiştir. Siklus-gebe gruplar arasında ise toplam 17 düzenlenme kaydedilmiştir. Literatürde ön plana çıkan ve bu çalışma kapsamına dahil edilen histon modifikasyon enzimleri ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin endometriumda siklik süreçte ve gebelikte ciddi düzenlenmelere uğradığı elde edilen bulgular ışığında kaydedilmiştir. İşlevleri gereği değişen ekspresyon seviyeleri ile endometriyal transkriptoma yön veren bu epigenetik unsurların, çalışma planlanırken peri-implantasyon sürecinde düzenlendikleri varsayımı gerçekleştirilen deney düzeneği ile tespit edilerek kabul edilmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bilimsel araştırmalar ile gebelik fizyolojisine dair birtakım detaylar açığa çıkarılabilmiş olsa da gebeliğin kurulumunu ve devamlılığını yöneten süreçler henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (Kitazawa ve ark 2020). Buna rağmen bilhassa progesteron etkisi, gebeliğin devamlılığı için elzem olan ana unsurlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır (Spencer ve ark 2015). Bu bağlamda progesteron etkisi deneysel model ile stabilize edilerek oluşan farklılıkların embriyo/konseptus kaynaklı değişimler olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Günümüzde gelinen nokta itibari ile erken gebelik kayıpları hala kayda değer boyutta engellenebilir olmadığı gibi, etkin kayıp yönetimi algoritmaları da geliştirilebilmiş değildir (Green ve O'Donoghue 2019). Bu süreci sağlıklı yönetebilmek ve kayıpları en aza indirgeyebilmek adına sürecin ve ona dahil olan unsurların karakterizasyonu, sürecin daha iyi anlaşılmasına ve kayıplara yönelik çözüm önerileri geliştirilebilmesine zemin hazırlaması muhtemeldir. Bu bakış açısı ile gerçekleştirilen çalışma neticesinde elde edilen bulgular ışığında siklusun aynı günlerinde herhangi bir regülasyona uğramazken, gebeliğin aynı gününde anlamlı düzenlenmelere tabi olduğu anlaşılan genlerin, bu kritik sürecin yönetiminde diğerlerine nispeten daha kuvvetli adaylar olduğu düşünülmüştür.

Araştırılan toplam hedef 45 gen içerisinden DNMT3A, CARM1, PRMT1, EP300, PAK1, HDAC2, HDAC3, HDAC6, MeCP2 ve MTA1 gibi hedef genler progesteron bağımsız olarak embriyo ile ilintili biçimde anlamlı düzenlenmelere dahil olsalar da değişimin çok daha radikal olduğu AURKA, AURKB bu çalışma neticesinde ön plana çıkmıştır. Her iki hedef embriyo implantasyonu öncesi bir düzenlenmeye tabi olmazken, AURKA ekspresyonu gebeliğin 12. gününe nazaran 22. gününde 2 kattan daha fazla bir artış (% nispi ekspresyon değişimi: 213,39), 16. gününe nazaran 22. gününde iki kata yakın bir artış (% nispi ekspresyon değişimi:183,74) gösterdiği istatistiksel olarak tespit edilmiştir. AURKB ekspresyonunun gebeliğin 12. gününe nazaran 22. gününde 10 kattan daha fazla bir artış (% nispi ekspresyon değişimi: 1035,87), 16. gününe nazaran 22. gününde yedi kattan daha fazla bir artış (% nispi ekspresyon değişimi: 753,95) gösterdiği istatistiksel olarak tespit edilmiştir.

Bahsi geçen biçimde düzenlenme gösteren bu iki hedef genin fonksiyonlarına ilişkin bilgiler sınırlı olmasına karşın, hücre döngüsünün çok kritik bir basamağında rol aldıkları ve kromozomal hizalanma, iğ ipliklerinin organizasyonu, sentromerik tutulum ile gerginliğin sağlanarak, segregasyonun gerçekleştirilmesi sürecinde ana bileşenlerden oldukları literatür bilgisi olarak karşımıza çıkmaktadır (Wheatley ve ark 2004, Kotak ve ark 2016). Erken dönem gebelik kayıplarının önemli bir kısmından (% 50-60) kromozomal segregasyon hatalarının sorumlu olduğu düşünüldüğünde AURKA ve AURKB' nin önemi daha iyi anlaşılacaktır (Kaser 2018). Bu bağlamda ileride yapılacak çalışmalarda oluşturalacak bir başka deney modelinde erken embriyonik kayıp modeli (bilhassa koyun model organizması için gebeliğin 16-22. günleri arasında) üzerinden ilgili hedeflerin ekspresyon kayıpları doğrulanabilir ise bu döneme ilişkin kayıpların azaltılmasını hedefleyerek ilgili gen ekspresyonlarını artırma mekanizmaları araştırılabilir veya eksojen takviyeler düşünülebilir. Böylece beşeri tıbbın önemli sorunlarından biri olan erken dönem gebelik kayıplarının ve beraberindeki ruhsal kayıpların önüne geçilebilmesi adına aynı zamanda veteriner tıbbının önemli sorunları arasında yer alan döl tutmama (bilhassa erken gebelik kayıpları) noktasında kayda değer bir araştırma zemini oluşturulması önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

Amita M, Takahashi T, Tsutsumi S, Ohta T, Takata K, Henmi N, Hara S, Igarashi H, Takahashi K, Kurachi H, 2010. Molecular mechanism of the inhibition of estradiol-induced endometrial epithelial cell proliferation by clomiphene citrate. Endocrinology, 151, 394–405.

Anderson E, Clarke RB, 2004. Steroid receptors and cell cycle in normal mammary epithelium Journal of Mammary Gland. Biology and Neoplasia, 9(1), 3-13.

Arosh JA, Banu SK, Kimmins S, Chapdelaine P, Maclaren LA, Fortier MA, 2004. Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis transport and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. Endocrinology, 145, 5280–5293.

Atli MO, Guzeloglu A, Dinc DA, 2011. Expression of wingless (WNT) genes and their at mRNA levels in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. Animal Reproduction Science, 125, 94-102.

Atli MO, Guzeloglu A, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, 2012. Expression of epidermal growth factor (EGF) and heparin–binding EGF (HB-EGF) mRNA in Mare endometrium. Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi, 18, 463-467.

Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, Guzeloglu A, 2010. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. Animal Reproduction Science, 122, 124-32.

Auclair G, Borgel J, Sanz LA, Vallet J, Guibert S, Dumas M, Cavelier P, Girardot M, Forné T, Feil R, Weber M, 2016. EHMT2 directs DNA methylation for efficient gene silencing in mouse embryos. Genome Research, 26(2), 192-202.

Avo Santos M, van de Werken C, de Vries M, Jahr H, Vromans MJ, Laven J,S, Fauser BC, Kops GJ, Lens SM, Baart EB, 2011. A role for Aurora C in the chromosomal passenger complex during human preimplantation embryo development. Human Reproduction, 26(7), 1868-81.

Balasenthil S, Broaddus RR, Kumar R, 2006. Expression of metastasis-associated protein 1 (MTA1) in benign endometrium and endometrial adenocarcinomas. Human Pathology, 37(6), 656-61.

Balasenthil S, Gururaj AE, Talukder AH, Bagheri-Yarmand R, Arrington T, Haas BJ, Braisted JC, Kim I, Lee NH, Kumar R, 2007. Identification of Pax5 as a target of MTA1 in B-cell lymphomas. Cancer Research, 67(15), 7132-8.

Bernstein E, Allis CD, 2005. RNA meets chromatin. Genes Dev, 19(14), 1635-55.

Boshier DP, 1969. A histological and histochemical examination of implantation and early placentome formation in sheep. Journal of Reproduction and Fertility, 19, 51–61.

Bustin SA, 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, 25, 169-193.

Bustin SA, 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. Journal of Molecular Endocrinology, 29, 23-39.

Cao J, Yan Q, 2012. Histone ubiquitination and deubiquitination in transcription DNA damage response and cancer. Frontiers in Oncology, 2, 26.

Cao W, Mah K, Carroll RS, Slayden OD, Brenner R,M, 2007. Progesterone withdrawal up-regulates fibronectin and integrins during menstruation and repair in the rhesus macaque endometrium. Human Reproduction, 22(12), 3223-31.

Carrozza MJ, Utley RT, Workman JL, Côté J, 2003. The diverse functions of histone acetyltransferase complexes. Cell Trends Genetics, 19(6), 321-9.

Chen F, Kan H, Castranova V, 2010. Methylation of Lysine 9 of Histone H3: Role of Heterochromatin Modulation and Tumorigenesis. In Tollefsbol TO, Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics Boston: Academic Press pp, 149–157.

Chen Z, Liu S, Tian L, Wu M, Ai F, Tang W, Zhao L, Ding J, Zhang L, Tang A, 2015. miR-124 and miR-506 inhibit colorectal cancer progression by targeting DNMT3B and DNMT1. Oncotarget, 6(35), 38139-50.

Cho YS, Kim EJ, Park UH, Sin HS, Um SJ, 2006. Additional sex comb-like 1 (ASXL1) in cooperation with SRC-1 acts as a ligand-dependent coactivator for retinoic acid receptor. The Journal of Biological Chemistry, 281(26), 17588-98.

Comim FV, Hardy K, Robinson J, Franks S, 2015. Disorders of follicle development and steroidogenesis in ovaries of androgenised foetal sheep. Journal of Endocrinology, 225(1), 39-46.

Cremer T, Cremer C, Baumann H, Luedtke EK, Sperling K, Teuber V, Zorn C, 1982. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. Human Genetics, 60, 46–56.

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, Kouzarides T, 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. Cell, 118(5), 545-53.

Daishi I, Hitoshi A, Tatsuharu S, Hirofumi M, Masamichi D, Miki H, Yuko I, Mitsuhiro Y, Takayuki M, Satoshi F, Akihiko O, Takeya N, Takashi I, 2015. Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. Scientific Reports, 5: 16567.

Davis MA Macko AR Steyn LV Anderson MJ Limesand SW, 2015. Fetal adrenal demedullation lowers circulating norepinephrine and attenuates growth restriction but not reduction of endocrine cell mass in an ovine model of intrauterine growth restriction. Nutrients, 7(1), 500-16.

de la Barre AE, Gerson V, Gout S, Creaven M, Allis CD, Dimitrov S, 2000. Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. The EMBO Journal, 19(3), 379-91.

Decristofaro MF, Betz BL, Rorie CJ, Reisman DN, Wang W, Weissman BE, 2001. Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. Journal of Cellular Physiology, 186(1), 136-45.

Dover J, Schneider J, Tawiah-Boateng MA, Wood A, Dean K, Johnston M, Shilatifard A, 2002. Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6. The Journal of Biological Chemistry, 277(32), 28368-71.

Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z, 2006. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. Trends in Genetics, 22, 101-109.

Entrevan M, Schuettengruber B, Cavalli G, 2016. Regulation of Genome Architecture and Function by Polycomb Proteins. Trends in Cell Biology, 26(7):511-525.

Esteller M, 2008. Epigenetics in cancer. N Engl J Med, 358(11), 1148-59.

Farin C,E, Imakawa K, Roberts RM, 1989. In situ localization of mRNA for the interferon ovine trophoblast protein-1 during early embryonic development of the sheep. Molecular Endocrinology, 3, 1099–1107.

Franczak A, Wojciechowicz B, Kotwica G, 2013. Transcriptomic analysis of the porcine endometrium during early pregnancy and the estrous cycle. Reproductive Biology, 13(3), 229-37.

Ghabreau L, Roux JP, Niveleau A, Fontaniere B, Mahe C, Mokni M, Frappart L, 2004. Correlation between the DNA global methylation status and progesterone receptor expression in normal endometrium endometrioid adenocarcinoma and precursors. Virchows Archiv, 445, 129–134.

Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E, 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. Gene, 363, 15-23.

Gohin M, Fournier E, Dufort I, Sirard MA, 2014. Discovery identification and sequence analysis of RNAs selected for very short or long poly A tail in immature bovine oocytes. Molecular Human Reproduction, 20(2), 127-38.

Goldknopf IL, Taylor C,W, Baum RM, Yeoman LC, Olson MO, Prestayko AW, Busch H, 1975. Isolation and characterization of protein A24 a "histone-like" non-histone chromosomal protein. Journal of Biological Chemistry, 250(18), 7182-7.

Gray CA, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE, 2002. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. Reproduction, 124, 289–300.

Green DM, O'Donoghue K, 2019. A review of reproductive outcomes of women with two consecutive miscarriages and no living child. J Obstet Gynaecol, 39(6), 816-821.

Grimaldi G, Christian M, Quenby S, Brosens JJ, 2012. Expression of epigenetic effectors in decidualizing human endometrial stromal cells. Molecular Human Reproduction, 18(9), 451-8.

Guillomot M, Flechon JE, Wintenberger-Torres S, 1981. Conceptus attachment in the ewe: an ultrastructural study. Placenta, 2, 169–182.

Guillomot M, Michel C, Gaye P, Charlier N, Trojan J, Martal J, 1990. Cellular localization of an embryonic interferon ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. Biology of the Cell, 68, 205–211.

Guo SW, 2012. The endometrial epigenome and its response to steroid hormones. Molecular and Cellular Endocrinology, 358(2), 185-96.

Guzeloglu A, Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Handler J, Semacan A, Aslan S, 2013. Expression of enzymes and receptors of leukotriene pathway genes in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. Theriogenology, 80(2), 145-152.

Guzeloglu A, Atli M,O, Kurar E, Semacan A, Aslan S, Kayis SA, Celik S, 2009. Estrogen Receptor (ER)α ERβ and Progesterone Receptor (PR) Expression in Equine Endometrium during Estrous Cycle and Early Pregnancy. Reproduction in Domestic Animals, 44, P205.

Guzeloglu A, Bilby TR, Meikle A, Kamimura S, Kowalski A, Michel F, MacLaren LA, Thatcher W,W, 2004. Pregnancy and bovine somatotropin in nonlactating dairy cows: II, Endometrial gene expression related to maintenance of pregnancy. Journal of Dairy Science, 87(10), 3268-79.

He DM, Wu H, Wu XL, Ding L, Xu L, Li YQ, 2014. The gene expression patterns of BMPR2 EP300 TGFβ2 and TNFAIP3 in B-Lymphoma cells. Cancer Biology and Medicine, 11(3), 202-7.

Holliday R, 1994. Epigenetics: an overview. Developmental Genetics, 15, 453–457.

Holliday R, 2006. Epigenetics: a historical overview. Epigenetics, 1(2), 76–80.

Hosseini SM, Dufort I, Caballero J, Moulavi F, Ghanaei HR, Sirard MA, 2015. Transcriptome profiling of bovine inner cell mass and trophectoderm derived from in vivo generated blastocysts. BMC Developmental Biology, 15(1), 49.

Houshdaran S, Zelenko Z, Tamaresis J, Irwin JC, Giudice L, 2011. Abnormalepigenetic signature in the eutopic endometrium of patients with severe endometriosis. In: The 58th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, SAGE Miami Beach Florida pp, 192A–193A,

Huan Y, Wu Z, Zhang J, Zhu J, Liu Z, Song X, 2015. Epigenetic Modification Agents Improve Gene-Specific Methylation Reprogramming in Porcine Cloned Embryos. PLoS One, 10(6), e0129803.

Huh MS, Ivanochko D, Hashem LE, Curtin M, Delorme M, Goodall E, Yan K, Picketts DJ, 2016. Stalled replication forks within heterochromatin require ATRX for protection. Cell Death & Disease-Nature, 7, e2220.

Huyhn K, Renfree MB, Graves JA, Pask AJ, 2011. ATRX has a critical and conserved role in mammalian sexual differentiation. BMC Developmental Biology, 11, 39.

Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE, 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. Nature, 416(6880), 556-60.

Jaenisch R, Bird A, 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nat Genet, 245-54.

Jefferson WN, Chevalier DM, Phelps JY, Cantor AM, Padilla-Banks E, Newbold RR, Archer TK, Kinyam HK, Williams CJ, 2013. Persistently altered epigenetic marks in the mouse uterus after neonatal estrogen exposure. Molecular Endocrinology, 27(10), 1666-77.

Jenuwein T, Allis CD, 2001. Translating the histone code. Science, 293(5532), 1074-80.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP, 1998. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. Nature Genetics, 19(2), 187-91.

Kala R, Shah HN, Martin SL, Tollefsbol TO, 2015. Epigenetic-based combinatorial resveratrol and pterostilbene alters DNA damage response by affecting SIRT1 and DNMT enzyme expression including SIRT1-dependent γ-H2AX and telomerase regulation in triple-negative breast cancer. BMC Cancer, 15, 672.

Kang HJ, Lee MH, Kang HL, Kim SH, Ahn JR, Na H, Na TY, Kim YN, Seong JK, Lee MO, 2014. Differential regulation of estrogen receptor α expression in breast cancer cells by metastasis-associated protein 1. Cancer Research, 74(5), 1484-94.

Kaser D, 2018. The Status of Genetic Screening in Recurrent Pregnancy Loss. Obstet Gynecol Clin North Am, 45(1), 143-154.

Killeen AP, Diskin MG Morris DG Kenny DA Waters SM, 2016. Endometrial gene expression in high- and low-fertility heifers in the late luteal phase of the estrous cycle and a comparison with midluteal gene expression. Physiological Genomics, 48(4), 306-19.

Kim I, Lee SH, Jeong J, Park JH, Yoo MA, Kim CM, 2016a. Functional Profiling of Human MeCP2 by Automated Data Comparison Analysis and Computerized Expression. Pathway Modeling Healthcare Informatics Research, 22(2),120-8.

Kim SR, Kim KB, Chae YC, Park JW, Seo SB, 2016b. H3S10 phosphorylation-mediated transcriptional regulation by Aurora kinase A. Biochemical and Biophysical Research Communications, 469(1), 22-8.

Kim TH, Yoo JY, Wang Z, Lydon JP, Khatri S, Hawkins SM, Leach RE, Fazleabas AT, Young SL, Lessey BA, Ku BJ, Jeong JW, 2015. ARID1A Is Essential for Endometrial Function during Early Pregnancy. PLoS Genetics, 11(9), e1005537.

Kiyma Z, Kose M, Atli MO, Ozel C, Hitit M, Sen G, Kaya M, Kaya MS, Kurar E, Kayis SA, Guzeloglu A, 2016. Investigation of interferon-tau stimulated genes (ISGs) simultaneously in the endometrium, corpus luteum (CL) and peripheral blood leukocytes (PBLs) in the preluteolytic stage of early pregnancy in ewes. Small Ruminant Research, 140:1-6.

Kitazawa J, Kimura F, Nakamura A, Morimune A, Takahashi A, Takashima A, Amano T, Tsuji S, Kaku S, Kasahara K, Murakami T, 2020. Endometrial Immunity for Embryo Implantation and Pregnancy Establishment. Tohoku J Exp Med, 250(1), 49-60.

Klein C, Troedsson MH, 2011. Maternal recognition of pregnancy in the horse: a mystery still to be solved. Reprod Fertil Dev, 23(8), 952-63.

Kornberg RD, 1974. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science, 184(4139), 868-71.

Kornberg RD, Lorch Y, 1991. Irresistible force meets immovable object: Transcriptionand the nucleosome. Cell, 67, 833–836.

Kornberg RD, Lorch Y, 1992. Chromatin structure and transcription. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 8, 563–587.

Kornberg R,D, Lorch Y, 1999. Twenty-five years of the nucleosome fundamental particle of the eukaryote chromosome Cell 98 285–294.

Koster M,J, Snel B, Timmers HT, 2015. Genesis of chromatin and transcription dynamics in the origin of species. Cell, 161(4) , 724-36.

Kotak S, Afshar K, Busso C, Gönczy P, 2016. Aurora A kinase regulates proper spindle positioning in C, elegans and in human cells. J Cell Sci, 129(15),3015-25.

Kouzarides T, 2007. SnapShot: Histone-modifying enzymes. Cell, 131(4), 822.

Krusche CA, Vloet AJ, Classen-Linke I, von Rango U, Beier HM, Alfer J, 2007. Class I histone deacetylase expression in the human cyclic endometrium and endometrial adenocarcinomas. Human Reproduction 22, 2956–2966.

Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE, 2008. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. PLOS Genetics, 4(10), e1000242.

Kumar R, Balasenthil S, Manavathi B, Rayala SK, Pakala SB, 2010. Metastasis-associated protein 1 and its short form variant stimulates Wnt1 transcription through promoting its derepression from Six3 corepressor. Cancer Research, 70(16), 6649-58.

Labonne JD, Chung MJ, Jones JR, Anand P, Wenzel W, Iacoboni D, Layman LC, Kim HG, 2016. Concomitant partial exon skipping by a unique missense mutation of RPS6KA3 causes Coffin-Lowry syndrome. Gene 575(1):42-7.

Laribee RN, Fuchs SM, Strahl BD, 2007. H2B ubiquitylation in transcriptional control: a FACT-finding mission. Genes & Development, 21(7), 737-43.

Lau PN, Cheung P, 2011. Histone code pathway involving H3 S28 phosphorylation and K27 acetylation activates transcription and antagonizes polycomb silencing. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108(7), 2801-6.

Lee HA, Song MJ, Seok YM, Kang SH, Kim SY, Kim I, 2015. Histone Deacetylase 3 and 4 Complex Stimulates the Transcriptional Activity of the Mineralocorticoid Receptor. PLoS One, 10(8), e0136801.

Li DQ, Divijendra Natha Reddy S, Pakala SB, Wu X, Zhang Y, Rayala SK, Kumar R, 2009. MTA1 coregulator regulates p53 stability and function. The Journal of Biological Chemistry, 284(50), 34545-52.

Li E, 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. Nature Reviews Genetics, 3(9), 662-73.

Li G, Zhu P, 2015. Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. FEBS Letters, 589(20 Pt A), 2893-904.

Li Y, Shin D, Kwon SH, 2013. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. FEBS Journal, 280(3), 775-93.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods, 25(4), 402-8.

Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL, 2000. Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked in vitro and in vivo to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. Molecular Cell, 5(6), 917-26.

Logan PC, Ponnampalam AP, Rahnama F, Lobie PE, Mitchell MD, 2010. The effect of DNA methylation inhibitor 5-Aza-20-deoxycytidine on human endometrial stromal cells. Human Reproduction, 25, 2859–2869.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ, 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. Nature, 389, 251–260.

Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, Mastrangelo MA, Orr-Weaver TL, Jaenisch R, 1999. Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in Drosophila. Nature Genetics, 23(3), 363-6.

Ma RG, Zhang Y, Sun TT, Cheng B, 2014. Epigenetic regulation by polycomb group complexes: focus on roles of CBX proteins. Journal of Zhejiang University SCIENCE, 15(5), 412-28.

Mallm JP, Rippe K, 2015. Aurora Kinase B Regulates Telomerase Activity via a Centromeric RNA in Stem Cells. Cell Reports, 11(10), 1667-78.

Marmorstein R, Roth SY, 2001. Histone acetyltransferases: function structure and catalysis. Current Opinion in Genetics and Development, 11(2), 155-61.

Martin M, Kettmann R, Dequiedt F, 2009. Class IIa histone deacetylases: conducting development and differentiation. The International Journal of Developmental Biology, 53(2-3), 291-301.

Mazur EC, Vasquez YM, Li X, Kommagani R, Jiang L, Chen R, Lanz RB, Kovanci E, Gibbons WE, DeMayo FJ, 2015. Progesterone receptor transcriptome and cistrome in decidualized human endometrial stromal cells. Endocrinology, 156(6), 2239-53.

McGinty RK, Kim J, Chatterjee C, Roeder RG, Muir TW, 2008. Chemically ubiquitylated histone H2B stimulates hDot1L-mediated intranucleosomal methylation. Nature, 453(7196), 812-6.

Merkl M, Ulbrich SE, Otzdorff C, Herbach N, Wanke R, Wolf E, Handler J, Bauersachs S, 2010. Microarray analysis of equine endometrium at days 8 and 12 of pregnancy. Biology of Reproduction, 83(5), 874-86.

Metzger E, Willmann D, McMillan J, Forne I, Metzger P, Gerhardt S, Petroll K, von Maessenhausen A, Urban S, Schott AK, Espejo A, Eberlin A, Wohlwend D, Schüle KM, Schleicher M, Perner S, Bedford MT, Jung M, Dengjel J, Flaig R, Imhof A, Einsle O, Schüle R, 2016. Assembly of methylated KDM1A and CHD1 drives androgen receptor-dependent transcription and translocation. Nature Structural and Molecular Biology, 23(2), 132-9.

Metzger E, Yin N, Wissmann M, Kunowska N, Fischer K, Friedrichs N, Patnaik D, Higgins JM, Potier N, Scheidtmann KH, Buettner R, Schüle R, 2008. Phosphorylation of histone H3 at threonine 11 establishes a novel chromatin mark for transcriptional regulation. Nature Cell Biology, 10(1), 53-60.

Milani D, Manzoni FM, Pezzani L, Ajmone P, Gervasini C, Menni F, Esposito S, 2015. Rubinstein-Taybi syndrome: clinical features genetic basis diagnosis and management. Italian Journal of Pediatrics, 20, 41-4.

Mirkin S, Arslan M, Churikov D, Corica A, Diaz JI, Williams S, Bocca, S, Oehninger S, 2005. In search of candidate genes critically expressed in the human endometrium during the window of implantation. Human Reproduction, 20(8), 2104-17.

Molli PR, Singh RR, Lee SW, Kumar R, 2008. MTA1-mediated transcriptional repression of BRCA1 tumor suppressor gene Oncogene 27(14), 1971-80.

Morales Y, Nitzel DV, Price OM, Gui S, Li J, Qu J, Hevel JM, 2015. Redox Control of Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) Activity. The Journal of Biological Chemistry, 290(24):14915-26.

Munro SK, Farquhar CM, Mitchell MD, Ponnampalam AP, 2010. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. Mol Hum Reprod, 16, 297–310.

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A, 1998. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. Nature, 393(6683),386-9.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E, 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. Cell, 99(3), 247-57.

Ooga M, Suzuki MG, Aoki F, 2013. Involvement of DOT1L in the remodeling of heterochromatin configuration during early preimplantation development in mice. Biology of Reproduction, 89(6), 145.

Park UH, Seong MR, Kim EJ, Hur W, Kim SW, Yoon SK, Um SJ, 2014. Reciprocal regulation of LXRα activity by ASXL1 and ASXL2 in lipogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 443(2), 489-94.

Park UH, Yoon SK, Park T, Kim EJ, Um SJ, 2011. Additional sex comb-like (ASXL) proteins 1 and 2 play opposite roles in adipogenesis via reciprocal regulation of peroxisome proliferator-activated receptor {gamma}. The Journal of Biological Chemistry, 286(2), 1354-63.

Pedersen MT, Helin K, 2010. Histone demethylases in development and disease. Trends in Cell Biology, 20(11), 662-71.

Pengpeng M, Hua P, Rusty LM, Eric NO, Richard MS, 2012. Compensatory functions of histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 regulate transcription and apoptosis during mouse oocyte development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(8), 481–489.

Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schöfer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M, Jenuwein T, 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. Cell, 107(3), 323-37.

Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM, 2006. Real-time polymerase chain reaction: a novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. Journal of Veterinary Internal Medicine, 20, 3-12.

Qin L, Xu Y, Xu Y, Ma G, Liao L, Wu Y, Li Y, Wang X, Wang X, Jiang J, Wang J, Xu J, 2015. NCOA1 promotes angiogenesis in breast tumors by simultaneously enhancing both HIF1α- and AP-1-mediated VEGFa transcription. Oncotarget, 6(27), 23890-904.

Qiu MT Fan Q, Zhu Z, Kwan SY, Chen L, Chen JH, Ying ZL, Zhou Y, Gu W, Wang LH, Cheng WW, Zeng J, Wan XP, Mok S, Wong KK, Bao W, 2015. KDM4B and KDM4A promote endometrial cancer progression by regulating androgen receptor c-myc and p27kip1. Oncotarget, 6(31), 31702-20.

Rahnama F, Thompson B, Steiner M, Shafiei F, Lobie PE, Mitchell MD, 2009. Epigenetic regulation of E-cadherin controls endometrial receptivity. Endocrinology, 150,1466–1472.

Ravnskjaer K, Hogan MF, Lackey D, Tora L, Dent SY, Olefsky J, Montminy M, 2013. Glucagon regulates gluconeogenesis through KAT2B- and WDR5-mediated epigenetic effects Journal of Clinical Investigation 123(10), 4318-28.

Rigbolt KT, Prokhorova TA, Akimov V, Henningsen J, Johansen PT, Kratchmarova I, Kassem M, Mann M, Olsen JV, Blagoev B, 2011. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. Science Signaling, 4(164), rs3.

Robinson PJ, Fairall L, Huynh VA, Rhodes D, 2006. EM measurements define the dimensions of the ‘‘30-nm’’ chromatin fiber: evidence for a compact interdigitated structure. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 6506–6511.

Rondinelli B, Schwerer H, Antonini E, Gaviraghi M, Lupi A, Frenquelli M, Cittaro D, Segalla S, Lemaitre JM, Tonon G, 2015. H3K4me3 demethylation by the histone demethylase KDM5C/JARID1C promotes DNA replication origin firing. Nucleic Acids Research, 43(5), 2560-74.

Sailaja BS, Cohen-Carmon D, Zimmerman G, Soreq H, Meshorer E, 2012. Stress-induced epigenetic transcriptional memory of acetylcholinesterase by HDAC4. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(52), E3687-95.

Sakai N, Maruyama T, Sakurai R, Masuda H, Yamamoto Y, Shimizu A, Kishi I, Asada H, Yamagoe S, Yoshimura Y, 2003. Involvement of histone acetylation in ovarian steroid-induced decidualization of human endometrial stromal cells. The Journal of Biological Chemistry, 278, 16675–16682.

Salilew-Wondim D, Schellander K, Hoelker M, Tesfaye D, 2012. Oviductal endometrial and embryonic gene expression patterns as molecular clues for pregnancy establishment. Animal Reproduction Science, 134(1-2), 9-18.

Sawant OB, Wu G, Washburn SE, 2015. Maternal L-glutamine supplementation prevents prenatal alcohol exposure-induced fetal growth restriction in an ovine model. Amino Acids, 47(6), 1183-92.

Shakespear MR, Hohenhaus DM, Kelly GM, Kamal NA, Gupta P, Labzin LI, Schroder K, Garceau V, Barbero S, Iyer A, Hume DA, Reid RC, Irvine KM, Fairlie DP, Sweet MJ, 2013. Histone deacetylase 7 promotes Toll-like receptor 4-dependent proinflammatory gene expression in macrophages. The Journal of Biological Chemistry, 288(35), 25362-74.

Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA, 2010. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. Cell, 141, 970–981.

Sheikh BN, Downer NL, Kueh AJ, Thomas T, Voss AK, 2014. Excessive versus physiologically relevant levels of retinoic acid in embryonic stem cell differentiation Stem. Cells 32(6), 1451-8.

Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y, 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. Cell, 119(7), 941-53.

Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Miyamoto A, 2010. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. Physiological Genomics, 42A(4), 290-300.

Shiozawa T, Shih HC, Miyamoto T, Feng YZ, Uchikawa J, Itoh K, Konishi I, 2003. Cyclic changes in the expression of steroid receptor coactivators and corepressors in the normal human endometrium. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 88, 871–878.

Shpargel KB, Starmer J, Yee D, Pohlers M, Magnuson T, 2014. KDM6 demethylase independent loss of histone H3 lysine 27 trimethylation during early embryonic development. PLoS Genetics, 10(8), e1004507.

Sims RJ, Millhouse S, Chen CF, Lewis BA, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Manley J,L, Reinberg D, 2007. Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. Molecular Cell, 28(4), 665-76.

Skrzypczak M, Kapka-Skrzypczak L, Cyranka M, Treeck O, Wrobel A, Matosiuk D, 2013. Nuclear estrogen receptors co-activation mechanisms. Current Medicinal Chemistry, 20(27), 3317-38.

Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Chang S, Haudenshield JS, Zheng D, Rao SS, Hartman GL, Ghabrial SA, Korban SS, 2010. Identifying differentially expressed genes in leaves of Glycine tomentella in the presence of the fungal pathogen Phakopsora pachyrhizi. Planta, 232, 1181–1189.

Spencer TE, Forde N, Lonergan P, 2015. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. J Dairy Sci, 99(7), 5941-5950.

Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC, 2004. Implantation mechanisms: insights from the sheep. Reproduction, 128(6), 657-68.

Stern M, Jensen R, Herskowitz I, 1984. Five SWI genes are required for expression of the HO gene in yeast. Journal of Molecular Biology, 178(4), 853-68.

Strome S, Updike D, 2015. Specifying and protecting germ cell fate. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 16 (7) , 406-16.

Su C, Fan M, Lu L, Li P, 2016. Effects of silencing MTA1 gene by RNA interference on invasion and metastasis of endometrial carcinoma. European journal of gynaecological oncology, 37(1), 59-62.

Sun X, Chuang JC, Kanchwala M, Wu L, Celen C, Li L, Liang H, Zhang S, Maples T, Nguyen LH, Wang SC, Signer RA, Sorouri M, Nassour I, Liu X, Xu J, Wu M, Zhao Y, Kuo YC, Wang Z, Xing C, Zhu H, 2016. Suppression of the SWI/SNF Component Arid1a Promotes Mammalian Regeneration Cell. Stem Cell, 18(4), 456-66.

Tachibana M, Sugimoto K, Nozaki M, Ueda J, Ohta T, Ohki M, Fukuda M, Takeda N, Niida H, Kato H, Shinkai Y, 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. Genes and Development, 16(14), 1779-91.

Talbi S, Hamilton AE, Vo KC, Tulac S, Overgaard MT, Dosiou C, Le Shay N, Nezhat CN, Kempson R, Lessey BA, Nayak NR, Giudice LC, 2006. Molecular phenotyping of human endometrium distinguishes menstrual cycle phases and underlying biological processes in normo-ovulatory women. Endocrinology, 147(3),1097-121.

Tamaru H, Selker EU, 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in Neurospora crassa. Nature, 414(6861), 277-83.

Tang Y, Wang Y, Chen L, Pan Y, Weintraub N, 2012. Cross talk between the Notch signaling and noncoding RNA on the fate of stem cells. Progress in Molecular Biology and Translational Science, 111, 175-93.

Termanis A, Torrea N, Culley J, Kerr A, Ramsahoye B, Stancheva I, 2016. The SNF2 family ATPase LSH promotes cell-autonomous de novo DNA methylation in somatic cells. Nucleic Acids Research, 44(16), 7592-604.

Thomas JO, 1999. Histone H1: Location and role. Current Opinion in Cell Biology, 11, 312–317.

Trievel RC, Beach BM, Dirk LM, Houtz RL, Hurley JH, 2002. Structure and catalytic mechanism of a SET domain protein methyltransferase. Cell, 111(1), 91-103.

Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Asada H, Yoshimura Y, 2005. Histone deacetylase inhibitors induce differentiation of human endometrial adenocarcinoma cells through up-regulation of glycodelin. Endocrinology, 146, 5365–5373.

Uchida H, Maruyama T, Nagashima T, Ono M, Masuda H, Arase T, Sugiura I, Onouchi M, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y, 2006. Human endometrial cytodifferentiation by histone deacetylase inhibitors. Human Cell, 19, 38–42.

Uchida H, Maruyama T, Ohta K, Ono M, Arase T, Kagami M, Oda H, Kajitani T, Asada H, Yoshimura Y, 2007. Histone deacetylase inhibitor-induced glycodelin enhances the initial step of implantation. Human Reproduction, 22, 2615–2622.

Umene K, Yanokura M, Banno K, Irie H, Adachi M, Iida M, Nakamura K, Nogami Y, Masuda K, Kobayashi Y, Tominaga E, Aoki D, 2015. Aurora kinase A has a significant role as a therapeutic target and clinical biomarker in endometrial cancer. International Journal of Oncology, 46(4), 1498-506.

Van Hoeck V, Scolari SC, Pugliesi G, Gonella-Diaza AM, Andrade SC, Gasparin GR, Coutinho LL, Binelli M, 2015. Gene expression profiling by high throughput sequencing to determine signatures for the bovine receptive uterus at early gestation. Genomics Data, 5, 94-6.

Van Holde K, Yager T, 2003. Models for chromatin remodeling: a critical comparison. Biochemistry and Cell Biology, 81(3), 169-72.

Vlaming H, van Leeuwen F, 2016. The upstreams and downstreams of H3K79 methylation by DOT1L. Chromosoma, 125(4), 593-605.

Wang B, Ma W, Xu X, Wang C, Zhu Y, An N, An L, Wu Z, Tian J, 2013. Phosphorylation of histone H3 on Ser10 by auto-phosphorylated PAK1 is not essential for chromatin condensation and meiotic progression in porcine oocytes. Journal of Animal Science and Biotechnology, 4(1), 13.

Wang J, Scully K, Zhu X, Cai L, Zhang J, Prefontaine GG, Krones A, Ohgi KA, Zhu P, Garcia-Bassets I, Liu F, Taylor H, Lozach J, Jayes FL, Korach KS, Glass CK, Fu XD, Rosenfeld MG, 2007. Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. Nature, 446(7138), 882-7.

Wang X, Seed B, 2007. Sayfa 93-106. Real Time PCR (1. Basım), Editör: Dorak M,T, New York; Taylor & Francis Group.

Weaver IC, Hellstrom IC, Brown SE, Andrews SD, Dymov S, Diorio J, Zhang TY, Szyf M, Meaney MJ, 2014. The methylated-DNA binding protein MBD2 enhances NGFI-A (egr-1)-mediated transcriptional activation of the glucocorticoid receptor Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B. Biological Sciences, 369, 1652.

Wei FZ, Cao Z, Wang X, Wang H, Cai MY, Li T, Hattori N, Wang D, Du Y, Song B, Cao LL, Shen C, Wang L, Wang H, Yang Y, Xie D, Wang F, Ushijima T, Zhao Y, Zhu W,G, 2015. Epigenetic regulation of autophagy by the methyltransferase EZH2 through an MTOR-dependent pathway. Autophagy, 11(12), 2309-22.

Wei X, Xiaoling Z, Kai M, Rui W, Jing X, Min G, Zhonghong W, Jianhui T, Xinyu Z, Lei A, 2016. Characterization and comparative analyses of transcriptomes for in vivo and in vitro produced peri-implantation conceptuses and endometria from sheep. Journal of Reproduction and Development, 62(3), 279-87.

Wei Y, Mizzen CA, Cook RG, Gorovsky MA, Allis CD, 1998. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in Tetrahymena. Proceedings of the National Academy of Sciences, 95(13), 7480-4.

Wieser F, Schneeberger C, Hudelist G, Singer C, Kurz C, Nagele F, Gruber C, Huber JC, Tschugguel W, 2002. Endometrial nuclear receptor co-factors SRC- 1 and N-CoR are increased in human endometrium during menstruation. Molecular Human Reproduction, 8, 644–650.

Wheatley SP,1. Henzing AJ, Dodson H Khaled W, Earnshaw W,C, 2004. Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo. J Biol Chem, 13;279(7), 5655-60.

Wood A, Shilatifard A, 2004. Posttranslational Modifications of Histones by Methylation. Advances in Protein Chemistry, 67, 201-22.

Wreggett KA, Hill F, James PS, Hutchings A, Butcher GW, Singh PB, 1994. A mammalian homologue of Drosophila heterochromatin protein 1 (HP1) is a component of constitutive heterochromatin. Cytogenetics and Cell Genetics, 66(2), 99-103.

Xu J, Zhu W, Xu W, Yao W, Zhang B, Xu Y, Ji S, Liu C, Long J, Ni Q, Yu X, 2013. Up-regulation of MBD1 promotes pancreatic cancer cell epithelial-mesenchymal transition and invasion by epigenetic down-regulation of E-cadherin. Current Molecular Medicine, 13(3), 387-400.

Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Maekawa R, Taniguchi K, Taketani T, Matsuoka A, Tamura H, Sugino N, 2009. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: down-regulation by progesterone and estrogen. Human Reproduction, 24, 1126–1132.

Yang XJ, 2015. MOZ and MORF acetyltransferases: Molecular interaction animal development and human disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1853(8), 1818-26.

Yen SS, Lasley B, Wang C, Ehara Y, 1975. Steroid modulation of the hypothalamic-pituitary system in the secretion of reproductive hormones. Journal of Steroid Biochemistry, 6(6), 1047-53.

Zelenko Z, Aghajanova L, Irwin JC, Giudice LC, 2012. Nuclear receptor coregulator signaling and chromatin remodeling pathways suggest involvement of the epigenome in the steroid hormone response of endometrium and abnormalities in endometriosis. Reprod Sci, 9(2), 152-62.

Zhang K, Rajput SK, Wang S, Folger JK, Knott JG, Smith GW, 2016. CHD1 regulates deposition of histone variant H3.3 during bovine early embryonic development. biology of reproduction, pii: biolreprod, 94(6),140.

Zhang R, Huang M, Cao Z, Qi J, Qiu Z, Chiang L,Y, 2015. MeCP2 plays an analgesic role in pain transmission through regulating CREB / miR-132 pathway. Molecular Pain, 11, 19.

Zhang S, Liu X, Zhang Y, Cheng Y, Li Y, 2013. RNAi screening identifies KAT8 as a key molecule important for cancer cell survival. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 6(5), 870-7.

Zhang Y, 2003. Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. Genes and Development, 17(22), 2733-40.

Zhong S, Goto H, Inagaki M, Dong Z, 2003. Phosphorylation at serine 28 and acetylation at lysine 9 of histone H3 induced by trichostatin A. Oncogene, 22(34), 5291-7.

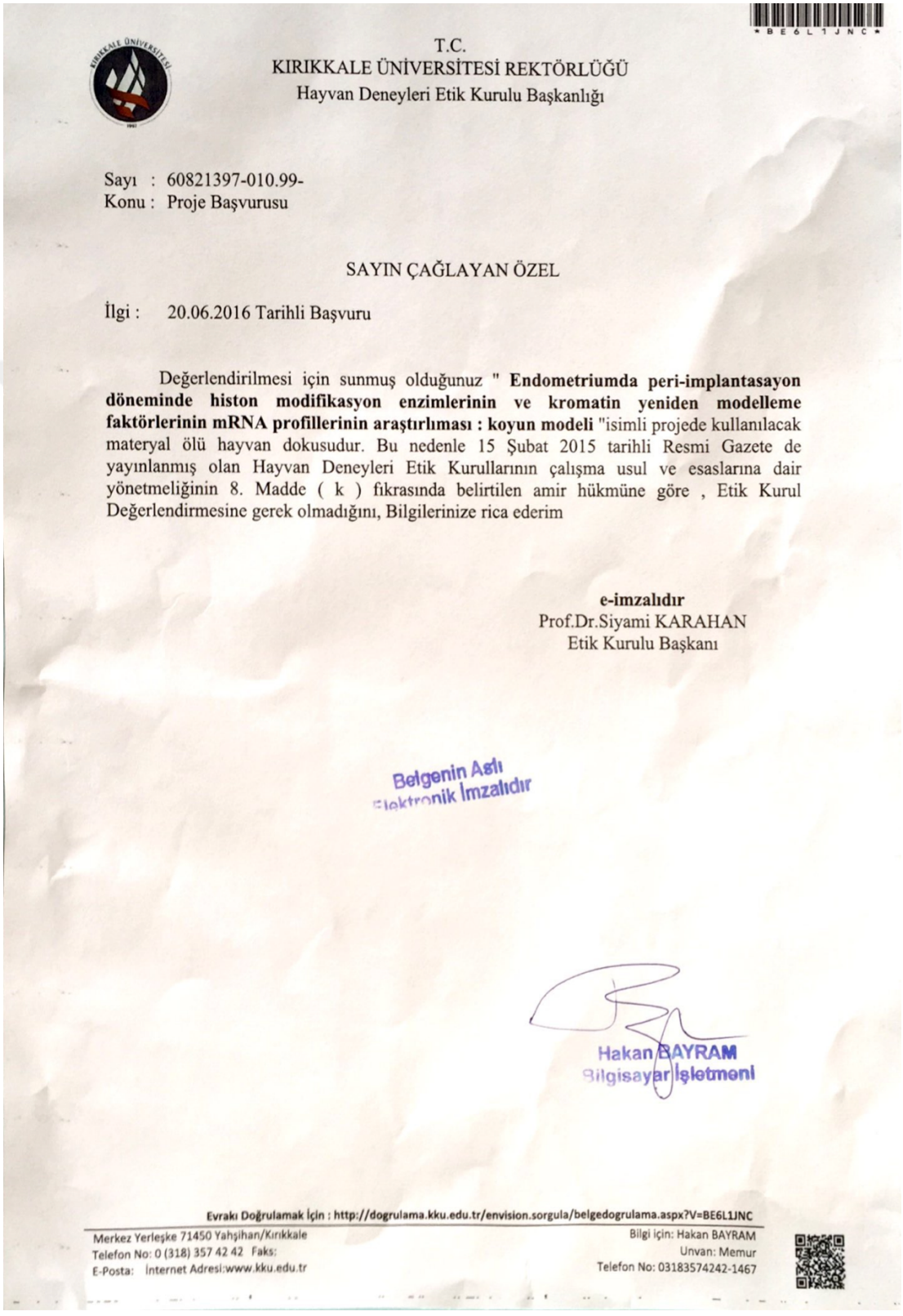
Zhou Q, Obana EA, Radomski KL, Sukumar G, Wynder C, Dalgard CL, Doughty ML, 2016. Inhibition of the histone demethylase Kdm5b promotes neurogenesis and derepresses Reln (reelin) in neural stem cells from the adult subventricular zone of mice. Molecular Biology of the Cell, E15-07-0513.

Zhu J, Zeng X, Peng Q, Zeng S, Zhao H, Shen H, Qiao S, 2015. Maternal N-carbamylglutamate supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival and development through modulation of the endometrial proteome in gilts. Journal of nutrition, 145(10), 2212-20.

Zupkovitz G, Tischler J, Posch M, Sadzak I, Ramsauer K, Egger G, Grausenburger R, Schweifer N, Chiocca S, Decker T, Seiser C, 2006. Negative and positive regulation of gene expression by mouse histone deacetylase 1. Molecular and Cellular Biology, 26(21), 7913-28.

7. EKLER

EK-A. Etik Kurul Onayı



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 60821397-010.99-
Konu : Proje Başvurusu

SAYIN ÇAĞLAYAN ÖZEL

İlgi : 20.06.2016 Tarihli Başvuru

Değerlendirilmesi için sunmuş olduğunuz " **Endometriumda peri-implantasayon döneminde histon modifikasyon enzimlerinin ve kromatin yeniden modelleme faktörlerinin mRNA profillerinin araştırılması : koyun modeli** "isimli projede kullanılacak materyal ölü hayvan dokusudur. Bu nedenle 15 Şubat 2015 tarihli Resmi Gazete de yayınlanmış olan Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının çalışma usul ve esaslarına dair yönetmeliğinin 8. Madde (k) fıkrasında belirtilen amir hükmüne göre , Etik Kurul Değerlendirmesine gerek olmadığını, Bilgilerinize rica ederim

e-imzalıdır
Prof.Dr.Siyami KARAHAN
Etik Kurulu Başkanı

Belgenin Aslı
Elektronik İmzalıdır

Hakan BAYRAM
Bilgisayar İşletmeni

Evrakı Doğrulamak İçin : http://dogrulama.kku.edu.tr/envision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE6L1JNC

Merkez Yerleşke 71450 Yahşihan/Kırıkkale
Telefon No: 0 (318) 357 42 42 Faks:
E-Posta: İnternet Adresi:www.kku.edu.tr

Bilgi için: Hakan BAYRAM
Unvan: Memur
Telefon No: 03183574242-1467

EK-B. Özel İzin Belgesi

İlgili Makama

Yürütücüsü olduğum, TUBİTAK-214O643 numaralı ve "Koyunlarda Peri-İmplantasyon Döneminde Gebeliğe İlişkin miRNA Markırlarının Araştırılması" başlıklı projeye ilişkin 02.09.2014 tarih ve 30 numaralı etik kurul kararına göre kan ve endometriyum örnekleri toplanmıştır. Söz konusu etik kurul kararı aynı Yerel Etik Kurulun 29.01.2016 tarih ve 47 numaralı kararıyla genişletilerek postmortem olarak korpus luteum, hipofiz, hipotolamus, beyaz kan hücreleri ve karaciğer dokuları dahil edilmiştir.

İlgili etik kurul kararlarına göre toplanan doku örneklerinin, eğitim ve bilim amaçlı çalışmalarda Araş. Gör. Mustafa HİTİT, Araş. Gör. Çağlayan ÖZEL ve Prof. Dr. Aydın GÜZELOĞLU' nun kullanmasında tarafımca bir sakınca bulunmamaktadır. 23/02/2016

Yrd. Doç. Dr. Mehmet KÖSE
Öğretim Üyesi
Dicle Üniversitesi

8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Çağlayan ÖZEL

Doğum Yeri : Biga/ÇANAKKALE

Medeni Hali : Evli

Doğum Tarihi : 25/05/1988

E-posta : caglayanozel@gmail.com

Eğitim

İlköğretim : Çeltikçi İÖO, Söke/AYDIN, 2002

Lise : Lüleburgaz Anadolu Lisesi, Lüleburgaz/KIRKLARELİ, 2006.

Lisans ve Yüksek Lisans: Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, ELAZIĞ, 2011.

Doktora : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, 18/02/2013 - halen devam etmektedir.

Yabancı Dil ve Düzeyi

KPDS ingilizce: : 75 (C)

İş Deneyimi

-Ankara Veteriner Tıp Merkezi, Stajyer Veteriner Hekim,07/07/2010 – 07/09/2010.

-Vefa Veteriner kliniği, Veteriner Hekim, 11/06/2011 – 14/10/2011.

-Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Genetiği Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi, 12/08/2012 – 29/09/2016.

Deneyim Alanları

-Çiftlik hayvanları klinik yönetimi, pet hayvanları klinik yönetimi, moleküler biyoloji uygulamaları.