T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LUTEAL REGRESYONDA LİVER X RESEPTÖR YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI

Mustafa HİTİT

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

KONYA-2017

T.C

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LUTEAL REGRESYONDA LİVER X RESEPTÖR YOLAĞININ ARAŞTIRILMASI

Mustafa HİTİT

DOKTORA TEZİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK

Bu tez Selçuk Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı

Koordinatörlüğü tarafından 2013-ÖYP-090 proje

numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ÖNSÖZ

Luteal regresyon; fonksiyonel ve yapısal olarak meydana gelmekte ve prostaglandin F_2 alpha ($PGF_{2\alpha}$) memeli türlerinde luteolizisi başlatmaktadır. Günümüzde, luteolizisin meydana gelmesinde yer alan yolaklar moleküler olarak incelenmiştir.

Ancak, her ne kadar bu yolaklar luteolizisde korpus luteum (KL)'de hücre ölüm mekanizmalarını aydınlatmış olsada, progesteron ön maddesi kolesterolün efluksunu sağlayan Liver X reseptör (LXR) yolağının rolü luteolizisde yeterince araştırılmamıştır.

Bu tez kapsamında iki ayrı çalışma gerçekleştirilmiştir. Birinci çalışmada, gebeliğin erken günleri ve denk gelen doğal luteolizis gününde, ikinci çalışmada ise luteolizis $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenerek KL'de steroidogenez, kolesterol alımı ve LXR yolağında ki genlerin ekspresyon ve protein seviyeleri belirlenmiştir. Çalışmada, $PGF_{2\alpha}$'nın kolesterol efluksundan ziyade kolesterol alımını baskılayarak luteolizise neden olabileceği öngörülmüştür.

Bu tez, Bahri Dağdaş 26.02.2016/48 nolu karar-tarih ile onaylanmış ve Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü tarafından 2013-ÖYP-090 proje numarası ile desteklenmiştir.

Bu tezin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan başta danışmanım Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK ve Prof. Dr. Tülin ÇORA'ya, doktora eğitimi süresince bilimsel yardım ve desteklerini esirgemediklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu tezi, desteklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim eşim Seda HİTİT, annem Ayşe HİTİT ve babam İsmail HİTİT'e ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **vi**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kolesterol 1

1.2. Kolesterol Homeostazisi 2

1.2.1. Kolesterol Sentezi ve Trafiği 2

1.2.2. Kolesterol İnfluksu ve Endosomal Trafik 4

1.2.3. Hücreiçi Kolesterol Transportu 5

1.3. Reverz Kolesterol Transportu 6

1.3.1. Kolesterol Efluksu 6

1.3.2. Liver X Reseptörü 7

1.3.3. LXR Aracılı Transkripsiyonel Regülasyon 9

1.3.4. LXR ve Reverz Kolesterol Transportu 11

1.3.5. ABCA1-aracılı Kolesterol Efluksu 12

1.3.6. ABCG1-aracılı Kolesterol Efluksu 14

1.4. Korpus Luteum 15

1.5. Koyun Östrus Siklusu 16

1.6. Steroidogenez Kolesterol Subsratı 17

1.6.1. Luteal Dokuya Kolesterolün Alımı 18

1.6.2. LDL Kolesterol Alımı 19

1.6.3. HDL Kolesterol Alımı 19

1.6.4. Luteal Steroidogenez 20

1.6.5. Luteal Kolesterol Transportu 21

1.6.6. Kolesterolün Pregnenolona Dönüştürülmesi 22

1.7. Luteal Regresyon/Luteolizis 24

1.7.1. Luteolitik Maddelerin Orijini ve Tanımlanması 25

1.7.2. Hücreiçi $PGF_{2\alpha}$ Sinyalizasyonu 26

1.7.3. $PGF_{2\alpha}$ Erken Luteal Faz Refrakterizmi 27

1.7.4. Fonksiyonel luteolizis 28

1.7.5. Yapısal Luteolizis 31

1.8. Hipotez ve Amaç 33

2. GEREÇ VE YÖNTEM **34**

2.1. Deneysel Model ve Dokuların Toplanması 34

2.1.1. Hayvan Materyali 34

2.1.2. Barındırma ve Beslenme 34
2.1.3. Hayvanların senkronizasyonu....34
2.1.4. Gruplandırma ve senkronizasyon 35
2.1.5. Örneklerin Toplanması 36
2.2. Kantitatif Real Time PZR (qPZR)....37
2.2.1. Total RNA İzolasyonu 37
2.2.2. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi....38
2.2.3. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması 38
2.2.4. Reverz Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu....39
2.2.5. Primer Dizaynı....39
2.2.6. Primer Sulandırılması 42
2.2.7. Housekeeping Gen Seçimi 42
2.2.8. Primer Dilüsyonları ile Primer Etkinliğinin Belirlenmesi....42
2.2.9. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR)....44
2.3. Western Blot Analizi 45
2.3.1. Protein İzolasyonu 45
2.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)....45
2.3.3. SDS-PAGE Elektroforezi....47
2.3.4. SDS-PAGE Jel Boyaması 48
2.3.5. Protein Transferi ve Bloklama....48
2.3.6. Protein İmmünoblotlama....49
2.3.7. İmmünodeteksiyon....49
2.4. İn situ Hibridazyon....50
2.4.1. cDNA dizilerinin oluşturulması....50
2.4.2. Digoksigenin-11-UTP-İşaretli RNA Prob Sentezi....50
2.4.3. Mikrotom Bıçağının Hazırlanması 51
2.4.4. KL Dokularının Disseksiyonu ve Hazırlanması 52
2.4.5. KL Dokularının Agaroza Gömülmesi....52
2.4.6. KL Dokularının Kesitlenmesi....53
2.4.7. Tüp Çemberin Hazırlanması....54
2.4.8. In Situ Hibridizasyon 1. gün....55
2.4.9. In Situ Hibridizasyon 2. Gün....56
2.4.10. In Situ Hibridizasyon 3. Gün....56
2.5. İstatistiksel Analizler 57

3. BULGULAR....58

3.1. Gen Ekspresyon Analizlerinin Sonuçları....58
3.1.1. Primer Etkinlikleri....58
3.1.2. Housekeeping Gen Seçimi ve Optimizasyonu....58
3.1.3. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonunun Analizi....59
3.2. Hedef Genlerin Protein Seviyelerinin Analizi....76
3.3. İn-situ Hibridizasyon Sonuçları....83
4. TARTIŞMA....89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER....103
6. KAYNAKLAR....105
7. EKLER....129
EK A. Etik Kurul Kararı....129
EK B. İzin Belgesi....130
8. ÖZGEÇMİŞ....131

SİMGELER ve KISALTMALAR

3βHSD	3-Beta–hydroxysteroid dehydrogenase
ABCA1	ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1
ABCG1	ATP-binding Cassette sub-family G member 1
ABGC4	ATP-binding Cassette sub-family G member
ACAT	Acyl-CoA cholesterin acyltransferase
ANGPT	Angiopoietin
ApoA-I	Apolipoprotein A1
APOE	Apolipoprotein E
APS	Amonyum persülfat
BAX	BCL2-ilişkili X Protein
BCL-2	B-Hücre lenfoma-2 Protein
BMP	Kemik Morfojenik Protein
cDNA	Komplementer DNA
cFOS	Fos-Proto Onkogen
CIDR	Kontrollü İnternal İlaç Salınım
COX-2	Siklooksijenaz 2
Cq	Cycle Threshold
DAG	Diaçil Gliserol
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDN	Endotelin
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
EP	Prostaglandin E_2 Reseptörü
ER	Endoplazmik Retikulum
ET	Endotelin
FASL	Fas Ligand
FP	Prostaglandin F Reseptör
FSH	Folikül Stimule Edici Hormon
GAPDH	Gliseraldehid Fosfat Dehidrogenaz
GH	Büyüme Hormonu
GNRH	Gonadotropin salınım hormonu
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin

HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-CoA	Hidroksimetilglutaril-CoA Sentaz
HKG	Housekeeping Gen
INFT	İnterferon Tau
ISH	In situ Hibridizasyon
kDa	Kilo-dalton
KEH	Kolesterol Ester Hidrolaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDLR	Düşük Dansiteli Lipoprotein Reseptörü
LH	Luteinleştirici Hormon
LXR	Liver X Reseptörü
LXRE	Liver X Reseptör Elemanı
MMP	Matriks Metalloproteinaz
mRNA	Mesajcı RNA
ORP	Oksiterol İlişkili Bağlanma Proteini
OXT	Oksitosin
OXTR	Oksitosin Reseptörü
P4	Progesteron
P450scc	Kolesterol Yan Zincir Klivaj Enzimi
PA	Plazminojen
PBR	Benzodiazepin Reseptörü
PGE	Prostaglandin E_2 Reseptörü
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin F_2 alpha
PGR	Progesteron Reseptörü
PGT	Prostaglandin Transporter
PKA	Protein Kinaz A
PKC	Protein Kinaz C
PLA_2	Fosfolipaz A_2
PLC	Fosfolipaz C
PTGFR	Prostaglandin F_2 alpha Reseptör
PTGFS	Prostaglandin F Sentaz
RIPK	Reseptör İnteraksiyon Protein Kinaz
RKT	Reverz Kolesterol Transportu

RPL-32	Ribozomal Protein L32
RT	Revers Transkriptaz
RT-qPZR	Real Time PZR
RXR	Retinoid X Reseptör
SCP-2	Sterol Taşıyıcı Protein 2
SHDA	Süksinat Dehidrogenaz Subünit A
SR-BI	Çöpçü reseptör sınıf B tip I
SREB	Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein
StAR	Steroidogenik Akuk Düzenleyici Protein
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TNFα	Tümor Nekroz Faktör alpha
TSPO	Translokator Protein
UTP	Uridine-5'-trifosfat
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YWHAZ	Tirozin 3 Monooksijenaz/Triptofan 5 Monooksijenaz Aktivasyon Protein

ÖZET

T. C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Luteal Regresyonda Liver X reseptör Yolağının Araştırılması

Mustafa HİTİT

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Kolesterol steroid hormonları, safra asidi ve vitamin D'nin öncüsü olan nötral bir lipittir. Liver X reseptörleri kolesterolün reverz taşımında (efluks) önemli rol üstlenir ve makrofaj gibi periferal hücrelerden kolesterolün dışarı atılmasını sağlar. LXR'nin karaciğer ve diğer organlardaki rolü açıklanmış olsada, LXR' nin üreme organlarındaki rolü moleküler düzeyde tam olarak bilinmemektedir. Korpus luteumda (KL) gebelik gerçekleşmemişse progesteron üretimi durur, hücre bütünlüğü kaybolur, doku kitlesi azalarak apoptozis ve otofaji yolakları vasıtasıyla regresyon başlar. Regresyon süresince meydana gelen progesteron azalışında kolesterolün luteal dokudan efluksunun rolü olup olmadığı netlik kazanmamıştır. Bu çalışmanın amacı, kolesterolün reverz olarak tranpsortunun luteal regresyona katkısının araştırılmasıdır.

Bu amaç için iki araştırma yapıldı: 1) Birinci araştırmada, siklik (S12 ve S16-doğal luteolizis) ve gebelik (G12, G16 ve G22) gruplarından, 2) İkinci araştırmada siklusun 12. günde luteolizis $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu ile uyarılıp 1 saat (PG1, n=4), 4 saat (PG4, n=4), 16 saat (PG16, n=4) ve kontrol (n=4) olmak üzere KL doku örnekleri toplandı. LXR yolağı (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, APOE ve APOA1), steroidogenik progesteron sentez yolağı (StAR, 3βHSD ve P450scc) ile kolesterol alım reseptörlerinin (SR-BI ve LDLR) gen ifadeleri mRNA düzeyinde RT-qPZ ve LXR yolağının genlerinin protein seviyesi western blot ile araştırıldı. Ayrıca, *in-situ* hibridizasyon ile StAR (S16 vs G16), SR-BI (S12 vs PG1 vs PG4 vs PG16), LXRα, LXRβ, ABCA1 genlerinin mRNA lokalizasyonları saptandı. Doğal luteolizisde LXRα ve ABCA1 mRNA ekspresyonu değişmezken ($P>0,05$), LXRβ, ABCG1, APOE ve ApoA-1 mRNA ekspresyon seviyesi S16'da S12'ye göre artmıştır ($P<0,05$). Ancak, StAR, 3βHSD, P450scc LDLR ve SR-BI mRNA ekspresyonları azalmıştır ($P<0,05$). $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG1'de S12'ye göre LXRα, ABCA1 ve 3βHSD mRNA ekspresyonu azalırken ($P<0,05$), LXRβ ekspresyonu artmıştır ($P<0,05$). Ancak, StAR, P450scc, LDRL ve SR-BI mRNA ekspresyonları değişmemiştir ($P>0,05$). PG4'de S12'ye göre LXRα, LXRβ, APOE, ApoA-I, LDLR, SR-BI, StAR, P450scc ve 3βHSD mRNA ekspresyonu azalırken ($P<0,05$), ABCA1 ve ABCG1 mRNA ekspresyonu değişmemiştir ($P>0,05$). PG16'da S12'ye göre StAR, P450scc, 3βHSD, LDLR, SR-BI ve ApoA-I azalmış ($P<0,05$), ABCG1 ekspresyonu artmıştır ($P<0,05$). Doğal luteolizis S16'da S12'ye göre LXRβ protein seviyesi artarken ($P<0,05$), diğer genlerin protein seviyesi doğal ve indüklenmiş luteolizis gruplarında değişmemiştir ($P>0,05$). In-situ hibridizasyonda StAR mRNA'sının ifadesi G16'da S16'ya göre daha fazladır ($P<0,05$). SR-BI mRNA'sı PG1'de S12'ye göre değişmezken, PG4 ve PG16'ı luteal doku lokalizasyonlarında azalmıştır ($P<0,05$).

Sonuç olarak, bu öngörüler doğrultusunda, kolesterolün reverz taşınımından ziyade kolesterolün lipoprotein aracılı olarak alımının azalmasının luteal regresyonun sebebi olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Liver X reseptörleri, luteal regresyon, $PGF_{2\alpha}$, gen ekspresyonu, kolesterol

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Liver X Receptor Pathway in Luteal Regression

Mustafa HİTİT

Department of Medical Genetics

PhD THESIS / KONYA-2017

Cholesterol is a key neutral lipid becoming the precursor of steroid hormones, bile acids, and vitamine D. Liver X receptors (LXR) play crucial roles in reverse transport of cholesterol and provides cholesterol efflux out of cells, such as macrophage. Although, the role of LXR in liver and other organs has been well characterized, the certain role has not been revealed in reproductive tract yet. If pregnancy does not occur,"production of proesterone drops, cellular integrity lose, tissue mass decrease" and regression begins through apoptosis and autophagy.The role of cholesterol efflux out of luteal tissues in the decrease of progesterone production during luteal regression procces has not been clarified yet. Objective was to investigate whether mechanism related to the reverse tranport of cholesterol leads to regression of corpus luteum.

For this research, two experiments were planned, 1); ewes were divided into two sub-groups as pregnancy (G12, n=4), (G16, n=4), and 22 (G22, n=4) and cyclic (C12, n=4) and 16 (C16, n=4). In the second study 2) ewes were divided into four sub-groups after injection of $PGF_{2\alpha}$ on the 12^{th} day at the different time interval; control (n=4), 1 hour (n=4), 4 hour (n=4), and 16 hour (n=4), then CL tissues were collected. Gene expression levels of LXR pathway (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, APOE, and APOA1), steriodegenic progesterone synthesis pathway (StAR, 3βHSD, P450scc), and cholesterol uptake receptors (SR-BI, LDLR) were evaluated by RT-qPCR and protein levels of LXR pathway genes were determined by western blot. Also, mRNA localizations of StAR, SR-BI, LXRα, LXRβ and ABCA1 were detected by *in-situ* hybridization. While mRNA expressione of LXRα, and ABCA1 were at steady state levels (P>0,05), expressions of LXRβ, ABCG1, APOE, and ApoA-1 were increased in S16 compared to S12 (P<0,05). However, expressions of StAR, 3βHSD, P450scc LDLR and SR-BI were decreased in S16 (P<0,05). Although, mRNA expressions of LXRα, ABCA1, and 3βHSD mRNA were decreased (P<0,05), LXRβ expression was increased (P<0,05) in PG1 compared to S12 in $PGF_{2\alpha}$-induced luteolysis. However, expressions of StAR, P450scc, LDRL, and SR-BI were at steady state level (P>0,05). While, mRNA expressions of LXRα, LXRβ, APOE, ApoA-I, LDLR, SR-BI, StAR, P450scc, and 3βHSD were decreased, expressions of ABCA1, and ABCG1 were not changed (P>0,05) in PG4 compared to S12. Expressions of StAR, P450scc, 3βHSD, LDLR, SR-BI, and ApoA-I were decreased (P<0,05), while ABCG1 increased (P<0,05) in PG16 compared to S12. Protein level of LXRβ was increased in S16 (P<0,05) compared to S12 while others was at stead state levels in both experimental models. In in-situ hybridization, StAR mRNA was higher in G16 that S16 (P<0,05). SR-BI levels of mRNA was not changed in PG1 and S12 (P<0,05), while decreased in both PG4, and PG16 (P<0,05).

In conclusion, it is suggested that decrease of lipoprotein receptor-mediated cholesterol uptake may be the reason of lutel regression rather than the reverse transport of cholesterol.

Key words: Liver X Receptors, luteal regression, $PGF_{2\alpha}$, gene expression, cholesterol

1. GİRİŞ

1.1. Kolesterol

Safra ve katı anlamına gelen kolesterol "stereol" den oluşmaktadır ve kolesterol safraya yoğunlaşarak safra taşını şekillendirmektedir. Kolesterol ilk defa Francois Poulletier de la Salle tarafından 1769 yılında safra taşlarını gözlemlerken keşfedilmiştir (Magee 1998). Fransız kimyacı M.E. Chevreul 1815'de kolesterolün yapısını ve biyosentetik yolağını belirlemiştir. Daha sonra kolesterol mekanizmasını düzenleyen geri-besleme mekanizması ortaya konulmuştur (Vance ve Van den Bosch 2000). Kolesterol steroid hormonlarının, safra asidinin ve vitamin D'nin prekürsörüdür ve ayrıca hücre zarının vazgeçilmez bir bileşenidir.

Kolesterol membran kütlesinin yaklaşık %20'sini oluşturduğu plazma membranlarının aksine, mitokondride membran kütlesinin yaklaşık %3'ünü oluşturur. Hücre zarında, hidroksil grubu ve zarın fosfolipid kutup başları ile interaksiyona girer. Kolesterol hücre membranına akışkanlık kazandırarak membranın hidrojen ve sodyum iyonlarına geçirgenliğini azaltır (Haines 2001, Ikonen 2008).

Kolesterol biyosentezinin en önemli yeri karaciğerdir ve günlük kolesterol üretiminin % 20-27'si karaciğerde meydana gelir. Kolesterol ayrıca, bağırsaklar, adrenal bezler ve üreme organlarında da sentezlenir. Kolesterol sentezi günlük besin alımı ve karaciğer üretimine bağlı homeostatik mekanizmalar tarafından yönetilir. Hayvansal yağ kaynaklı kolesterolün diyetteki tüketimi fazla olursa, karaciğer endojen olarak daha az sentez yapmaktadır (Ness ve Chambers 2000). Kolesterol sentezinde birincil düzenleyici mekanizma, sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 1 ve 2 (SREBP)'dir (Grosshans ve ark 2006). Bu sterol düzenleyici protein, ökaryotların endoplazmik retikulumundaki (ER) hücreiçi kolesterol miktarını algılayabilmektedir (Espenshade ve Hughes 2007).

Steroid hormonları, 27 karbonlu kolesterol molekülünden üretilirler ve kolesterol steroid hormonlarının sentezi için prekürsör bir moleküldür. *De novo* kolesterol sentezi hücreler için enerji maliyeti oluşturmaktadır. Bundan dolayı lipoproteinler steroidogenez için başlıca kolesterol kaynağıdır.

Kolesterolün hücre homeostazisinde kaçınılmaz önemi olmasına rağmen, anormal seviyedeki kolesterol ateroskleroz ve tip II diyabet gibi hastalıklara neden olmaktadır (Maxfield ve Tabas 2005, Ikonen 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalarda yüksek seviyede kolesterol ve kalp hastalıkları arasında korelasyonun olmadığı bildirilmiştir (Kanter ve ark 2012, Berger ve ark 2015, Ravnskov ve ark 2016). Ayrıca, KL'nin kilo değişikliklerinden etkilenerek üreme fizyolojisi ve fonksiyonunu etkileyebileceği vurgulanmıştır: insan olmayan model olarak *vervet* maymunlarının kullanıldığı çalışmada, kilo kazancı ile birlikte steroidogenik StAR, P450scc, HSD3B2 ve lipoprotein uptake reseptörü LDLR ve SR-BI genlerinin ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Ancak, kolesterol efluksu ile ilişkili ABCA1 ve ABCG1 genlerinin ekspresyonunda değişiklik gözlenmemiştir (Kuokkanen ve ark 2016).

1.2. Kolesterol Homeostazisi

1.2.1. Kolesterol Sentezi ve Trafiği

Memeli hücreleri kolesterolü diyetten veya endojen biyosentez ile elde etmektedir. Kolesterolün diyet yolu ile alımı sınırlıdır ve bu yüzden kolesterolün fizyolojik gereksinimi *de novo* sentez ile tedarik edilmektedir. Ayrıca, bütün dokular kolesterol sentezinde yer alabilmektedir (Spady ve Dietschy 1983, Dietschy ve ark 1993).

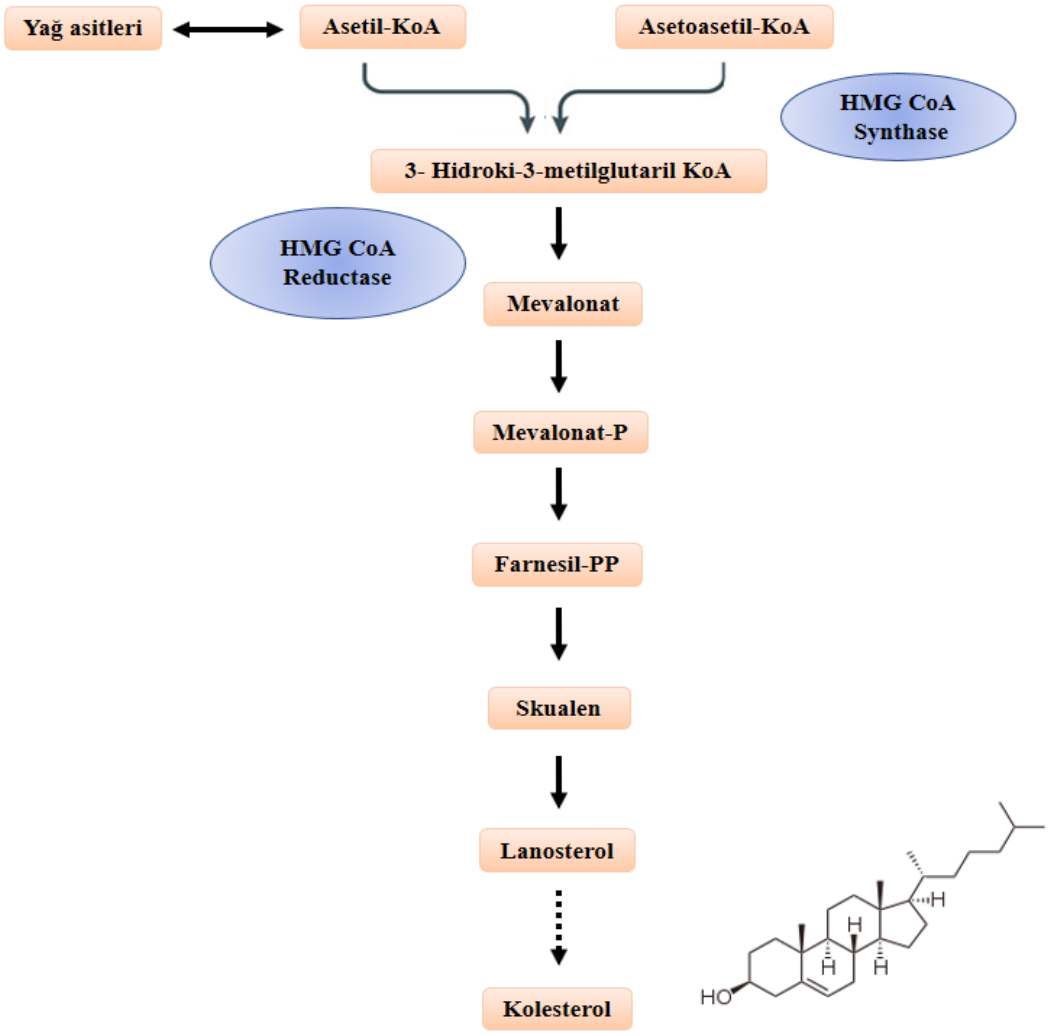
Yolakdaki ilk bileşik, kolesterolün tüm karbon atomlarının türetildiği asetattır. Kolesterol sentezi, bir asetil grubunun bir koenzime bağlandığı organik bir bileşik olan asetil-CoA ile başlatılır. SitoZolde asetil-CoA, hidroksimetilglutaril-CoA'ya (HMG-CoA) dönüştürülürken (Carr ve ark 1980; Lehoux ve Lefebvre 1980), sonraki adımların hepsi düz ER'de meydana gelmektedir. Bu yolağın hız sınırlayıcı enzimi HMG-CoA'nın mevalonik aside dönüşümünü katalizleyen 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktazdır (HMGCR) ve statin gibi kolesterol düşürücü ilaçların hedefinde bulunmaktadır (Jasinska ve ark 2007). HMG-CoA, enzimatik olarak indirgendiği zaman, mevalonatı sentezlemektedir. Bu adımdan itibaren, bütün substratlar sterol olma durumundadır. Mevalonat fosforilasyon yoluyla skualen üretir. Skualen, sırayla, yolakta birincil sterol öncüsü olan lanosterolü sentezlemektedir. Kolesterol sentezini takiben kolesterolün

kendisi, prekürsör lathosterol ve desmosterol fraksiyonları düşük sterol seviyesinin devam ettirilmesi için ER'yi terkederler (Şekil 1.1.).

Yeni sentezlenmiş kolesterolün hücredışı akseptörler tarafından kullanılabilir olması için non-veziküler mekanizmalar aracılığı ile plazma membranına hedeflenirler. Ayrıca, endozom gibi diğer bölgelerede nüfuz etmektedirler (Baumann ve ark 2005). Kolesterolün plazma ve hücreiçi membranlarda aşırı birikiminin engellenmesi için kolesterol açil-CoA açiltransferaz (ACAT) tarafından kolesterol esterlerine (KE) dönüştürülür (Chang ve ark 1997). Kolesterol esterleri sitozilik lipit damlacıkları (Reaven ve ark 1996) olarak depo edilir ve kolesterol ester hidrolaz ile (KEH) serbest bırakılır. Bu kolesterol/kolesterol ester siklusu hızlı olarak meydana gelmekte ve serbest kolesterol diğer hüçreiçi kompartmanlara salınmaktadır (Brown ve ark 1980).

Lipoproteinler, kolesterolün hedef dokulara taşınmasını yönlendiren hücre hedefleme sinyalleri taşımaktadır. Periferik dokular kolesterolün çoğunluğunu endositoz ile LDL'den almaktadır. Karaciğer ve periferik dokular kolesterolü iki yolla elde etmektedir: *de novo* yolakta asetil-CoA sentezi veya endositoz yoluyla kandan elde edilebilir. LDL karaciğerden kolesterolü uzaklaştırırken, yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) kolesterolün fazlasını incebağırsağa safra tuzu olarak atıldığı karaciğere geri döndürür

Kolesterolün bu önemli fonksiyonları kolesterol biyosentetik enzimlerinde meydana gelen genetik bozuklarda vurgulanmıştır (Nwokoro ve ark 2001). Karaciğer ve periferal dokuların aksine, beyinde kolesterolün %95'i *de novo* sentez ile temin edilir (Dietschy ve ark 2001). Periferden beyine kolesterol HDL lipoproteinleri vasıtasıyla küçük miktarlarda taşınmaktadır. Bu lipoproteinler beyin kan bariyerini geçebilmesine ragmen, LDL ve VLDL gibi büyük lipoproteinler geçememektedir. Ayrıca, Alzheimer ve Huntington hastalığının da dahil olduğu nörolojik hastalıklar beyinde kusurlu kolesterol metabolizması ile ilişkilidir (Block ve ark 2010). İlginç şekilde, beyinde yüksek seviye LDL ve düşük seviye HDL'nin Alzheimer'da amiloid birikimini artırdığı bildirilmiştir (Reed ve ark 2014).



Şekil 1.1. Kolesterol Biyosentezi

1.2.2. Kolesterol İnfluksu ve Endosomal Trafik

Hücreler *de novo* kolesterol sentezinin yanısıra, LDL reseptör yolağı aracılığıyla dolaşımdaki kolesterolü plazma proteinlerinden elde etmektedir (Goldstein ve Brown 1982). Kolesterolün dolaşım sisteminde hücreler arasındaki uzak mesafeli transportu, enterositler ve hepatositlerin kolesterol ve kolesterol esterlerini lipoproteinlere paketlenmesi yoluyla yapılmaktadır (Grundy 1983). Kısaca, diyetle alınan kolesterol ince bağırsak enterositleri tarafından emilerek trigliseritler ile birlikte şilomikronlara paketlenir. Şilomikronlar dolaşıma lenf yoluyla ulaşınca, trigliseritler lipoprotein lipazlar tarafından hidrolize edilerek şilomikron kalıntıları hepatositler tarafından alınır. LDL ve diğer

apoliporoteinleri (ApoE/ApoB) içeren lipoproteinlerin alınımı LDL reseptörü vasıtasıyla meydana gelmekte ve reseptör aracılı endositozis olarak bilinmektedir (Brown ve Goldstein 1976). Hücre yüzey reseptörü LDLR'ye bağlanan LDL klatrin kaplı vezikül ile endositoz edilerek kolesterol esterleri endositik kompartmanlara taşınırlar (Brown ve Goldstein 1976).

1.2.3. Hücreiçi Kolesterol Transportu

Kolesterol hücreler boyunca veziküler transport veya non-veziküler durumda membranın parçası gibi hareket ederek taşınırlar (Maxfield ve Wustner 2002). Veziküler taşınım, kolesterol transportu sürecinde önemli rol oynamasına karşın, hücreiçi kolesterol transportunda esas yöntem non-vezikülerdir (Maxfield ve Mondal 2006). Kolesterol suda çözünemediğinden dolayı, non-veziküler taşınım difuze olan taşıyıcı proteinler aracılığı ile yapılmaktadır. Alternatif olarak, non-veziküler transport, kolesterolün bir membrandan diğerine difüze olmasına ihtiyaç duyar (Soccio ve Breslow 2004). Birçok sterol taşıyıcı protein belirlenmiş olmasına rağmen, hücrede kolesterol transportunda sterol taşıyıcı protein (SCP-2), kaveolin, ORP (oksiterol ilişkili bağlanma proteini) ailesi ve (StAR-steroidogenik akut düzenleyici protein) ilişkili lipit transport domain START proteinlerin yer alabileceği gösterilmiştir (Soccio ve Breslow 2003). SCP-2 karaciğer, ince bağırsaklar, adrenal, testis ve ovaryum gibi kolesterol trafiği ve oksidizasyonunda yer alan dokularda bulunduğundan dolayı steroidogenezde rol alabileceği bildirilmiştir (Gallegos ve ark 2001).

Bununla birlikte, kolesterol ve spingolipid ilişkili kaveolin ve diğer proteinlerin kolesterol taşınımında rolü olduğu gösterilmiştir (Martin ve Parton 2005, Parton ve Simons 2007). ORP ailesi üyeleri 25-hidroksikolesterol için sitozolik reseptörler olarak tanımlanmıştır (Kandutsch ve Shown 1981) ve aileden ORP-2'nin kolesterol homeostazisinde ATP bağlayıcı kaset A1 (ABCA1) ve LDLR gibi LXR aracılı hedef genleri regule ettiği gösterilmiştir (Escajadillo ve ark 2016).

Son olarak, START domainlerini içeren protein ailesinin lipidlere bağlandığı ve hücreiçi haberleşmede rol aldığı gösterilmiştir. START domain proteinleri sitoplazmada ve çekirdekte lokalize olarak membrana bağlanır. Bu zamana kadar on-altı memeli

START domain proteini keşfedilmiştir (Soccio ve Breslow 2003, Ponting ve Aravind 1999). Ancak, bu proteinlerin kesin rolü tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, ailenin üyesi olan StAR'ın kolesterolü mitokondri dış membranından iç membranına transfer ettiği bildirilmiştir (Ronen-Fuhrmann 1998, Chaffin ve ark 2000, Stocco 2001).

1.3. Reverz Kolesterol Transportu

1.3.1. Kolesterol Efluksu

Hücreden kolesterolün uzaklaştırılması ve birikiminin engellenmesi kolesterol homeostazisi için zorunludur. Hücreler kolesterolü indirgeyemediğinden dolayı, birikmiş kolesterolün uzaklaştırılması ve tekrar değerlendirilmesi için karaciğere transport edilmesi gerekir. Bu süreç reverz kolesterol transport (RKT) olarak tanımlanmaktadır (Glomset ve Norum 1973). Bundan dolayı, makrofajlardaki kolesterolün reverz transportu ileri sürülmüş ve yeni terapotik hedef olarak tanımlanmıştır (Rosenson ve ark 2012).

Hücresel kolesterolün fazlası difüzyon veya apolipoprotein aracılı olarak elimine edilir (Oram ve Yokoyama 1996, Yokoyama 1998, 2000). Pasif difüzyon süresince kolesterolün uzaklaştırılması; kolesterolün hücre membranı ve HDL arasındaki değişimi ile meydana gelmektedir. Kolesterolün durumu, lipit taşınım aktivitesi, hücredışı akseptörlerin yapısı gibi bileşenler diffüzyona bağlı kolesterol efluks verimliliğini etkilemektedir (Zanotti ve ark 2012). Ayrıca, trigliseritce zengin lipoprotein kalıntıları LDL'ye çevirilir ve LDL reseptör yolağı veya karaciğerde safra asidine dönüştürülerek uzaklaştırılır (Linsel-Nitschke ve Tall 2005).

Diğer pasif yolak ise HDL kolesteril esterin karaciğere taşındığı scavenger (çöpçü) reseptör sınıf B tip 1 (SR-BI) aracılı eflukstur. SR-BI serbest kolesterolün efluksunu uyarmakta ve fosfolipitce zengin akseptörlere kolesterolün akuaz difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. SR-BI, ABC taşıyıcılarından farklı olarak serbest kolesterol yönünden zengin hücre yüzeyinlerine invagine olarak lipit raft alt kümesinde membran kaveolasına lokalize olmaktadır (Rosenson ve ark 2012).

Kolesterolün uzaklaştırılmasında ki diğer mekanizma apoliporotein A-I (ApoA-I) tarafından sağlanır ve diskoidal HDL'nin fosfolipitler ve kolesterol ile birleşmesine neden

olur (Yokoyama 2006). ApoA-I'in plazma membranında fosfolipitler ve kolesterol ile kompleks oluşturduğu savunulmuş ve bu sürece ABCA1'in aracılık ettiği gösterilmiştir (Vaughan ve Oram 2003, Vedhachalam ve ark 2007, Nandi ve ark 2009).

Kolesterolün reverz taşınımında ilk adım ABCA1'in karaciğerde HDL formasyonunu başlatmasıdır (Tall ve ark 2008). Bu bulgu, düşük plazma HDL ile karakterize edilmiş Tanger hastalığı ile günyüzüne çıkmış ve ABCA1 geninde haritalandırılmıştır (Brooks-Wilson ve ark 1999). Yine LXR bağımlı kolesterol efluksunda ApoA1, ApoC1 ve ApoE'nin karaciğere taşınan kolesterolün HDL'ye bağlanmasında önemi bildirilmiştir (Rader ve Hovingh 2014). ABCA1 ve ATP bağlayıcı kaset G-1 (ABCG1)' in yanısıra, ABCG1/ABCG4 heterodimerlerinin sinerjik olarak HDL ile kolesterol efluksuna aracılık etmektedir (Gelissen ve ark 2006, Vaughan ve Oram 2006). Ayrıca, RKT oluşumuna ABCG1'in eşlik ettiği hücredışı matriks-ilişkili kolesterol mikrodomainleride katılmaktadır (Freeman ve ark 2013).

Makrofajlardan kolesterolün reverz transportunda apoliporotein E' nin (ApoE) rolü bulunmaktadır (Zanotti ve ark 2011a, b). ApoE birçok hücre tipinde farklılaşma, sitokin varlığı ve lipit zenginleşmesine bağlı olarak küçük bir uyarıda, makrofajlar da dahil birçok hücre tipi tarafından sentezlenebilen 34-kDa' lık bir proteindir. ApoE ABCA1- bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla kolesterol salınımını uyarmaktadır. Ayrıca, ApoE LXR'nin enhansırında bulunan LXRE'ler ile doğrudan aktive olarak yukarı yönde düzenlenmektedir (Laffitte ve ark 2001). Ancak, başka bir çalışmada, ApoE'nin sistemik overekspresyonunun RKT'ye katkısı bulunmadığı gösterilmiştir (Annema ve ark 2012). Prostat kanser hücrelerinde ApoE genindeki genetik polimorfizmin kolesterol homeostazisini bozduğu bildirilmiştir (Ifere ve ark 2013).

1.3.2. Liver X Reseptörü

Liver X reseptörleri (LXR), LXRα (NR1H3) ve LXRb (NR1H2), ligandla aktive olan nükleer reseptör süper ailesine aittir (Janowski ve ark 1996) ve enerji metabolizması (Korach-Andre ve ark 2011) insülin sinyalizasyonu (Grefhorst ve ark 2005) ve kolesterol (Zhao ve Dahlman-Wright 2010; Hong ve Tontonoz 2014) ile ilgili yolaklarda rol aldığı bildirilmiştir. LXRα başlangıçta bilinen fizyolojik ligandları olmayan yetim bir nükleer

reseptör olarak, sıçan karaciğeri cDNA kütüphanesinden izole edilmiştir (Apfel ve ark 1994). LXRβ isoformu ise cDNA kütüphanelerinden karakterize edilmiştir (Shinar ve ark 1994, Song ve ark 1994, Teboul ve ark. 1995). İnsan LXRα geni 11p11.2 kromozomu üzerinde bulunurken, LXRβ geni kromozom 19q13.3 üzerinde bulunmaktadır. LXRα ekspresyonu, karaciğer, ince bağırsak, böbrek, makrofaj ve yağ dokusu gibi metabolik olarak aktif dokularda baskın olmasına karşın, LXRβ gelişmekte olan beyinde (Fan ve ark 2008) yüksek seviyelerde eksprese olmaktadır. İnsan LXRα ve LXRβ geni sırasıyla 447 ve 460 amino asiten oluşmaktadır; DNA ve ligand bağlama domaininde yaklaşık % 77 amino asit benzerliğine sahiptir (Zhao ve Dahlman-Wright 2010, Pannu ve ark 2013). Bununla birlikte, insan ve rat LXRα'sı % 80 amino asit sekans benzerliğine sahiptir (Lee ve Xie 2008). Ayrıca, LXR nükleer reseptör 9-cis retinoik asit (Retionid X reseptörü, RXR) ile heterodimer oluşturmaktadır (Peet ve ark 1998).

Ligandın yokluğunda, LXR'nin transkripsiyonel aktivitasyonu ko-represör tarafından inhibe edilmektedir. LXR'ye oksiterol veya RXR'nin bağlanması ko-represörün salımını sağlar ve böylece ko-aktivatörün interaksiyonu ile hedef genlerin aktivasyonu sağlanır (Peet ve ark 1998, Lobaccaro ve ark 2001, El-Hajjaji ve ark 2011). Ayrıca, LXRα ve LXRβ aktivasyonu protein kinaz A (PKA) tarafından da transkripsionel olarak modüle edilmektedir (Morello ve ark 2005).

Oksiteroller, nükleer reseptör LXR' nin ligandıdır (Janowski ve ark 1996, Janowski ve ark 1999, Lehmann ve ark 1997, Peet ve ark 1998). LXR ağırlıklı olarak hücre kolesterol seviyesi ile koordineli bir şekilde artar ve oksiterollerin bağlanması ile aktifleşmektedir (Peet ve ark 1998). Bundan dolayı LXR kritik bir *kolesterol sensörü* olarak görev yapmaktadır. Ayrıca, kolesterol transport yolağı ve oksiterol üretimine bağlı olarak fonksiyon görür (Pannu ve ark 2013). Oksikolesterol bazı durumlarda kolesterolün yerine hücre membranının yapısına katılabilmektedir. Bu özelliği ile plazma membranına girerler ve membran stabilitesini etkileyebilirler (Guardiola ve ark 1996).

LXRα ve LXRβ nükleer hormon reseptörü süper ailesi üyesidir ve steroidal ve non-steroidal ligandlara bağlanırlar (Edwards ve ark 2002, Francis ve ark 2003). Bağlı ligand olmadığı durumlarda, LXR-RXR heterodimeri ko-represör ile birlikte hedef gen kompleksinin promotoruna bağlı şekilde kalırlar ve böylece hedef gen aktivasyonunu

baskılar (Svensson ve ark 2003). Birçok LXR'ın hedeflerinin düzenleyici bölgelerinde DR4 response elementi varlığı bulunmaktadır ve DNA'ya bağlanmasında fonksiyonel rol oynamaktadır (Quack ve ark 2002, Boergesen ve ark 2012).

LXR sterol homeostazisinin kontrolünde rolü ilk olarak, yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen LXR *knockout* farelerde kolesterol esterlerinin karaciğerde birikmesi ile doğrulanmıştır (Laffitte ve ark 2003, Bradley ve ark 2008). LXR' ın makrofaj RKT'sinde ilk aşama periferal hücrelerden kolesterolün dışarı transportudur. Bu süreç, ABCA1 proteini tarafından kontrol edilir. Fosfolipid ve kolesterol ile kompleks oluşturan ApoA-I hücre yüzeyi ve plazma membranında ABCA1 proteinin tarafından tanınır (Vaughan ve Oram 2003, Nandi ve ark 2009). Daha sonra ise kolesterol akseptör proteinlerini indükler (APOE, ApoA-I). Bunlardan ABCG1 kolesterolün HDL'ye transferini sağlar. Ayrıca, ABCG1 ekspresyonu serbest kolesterol havuzunun atılmasını artırmaktadır (Sankaranarayanan ve ark 2009).

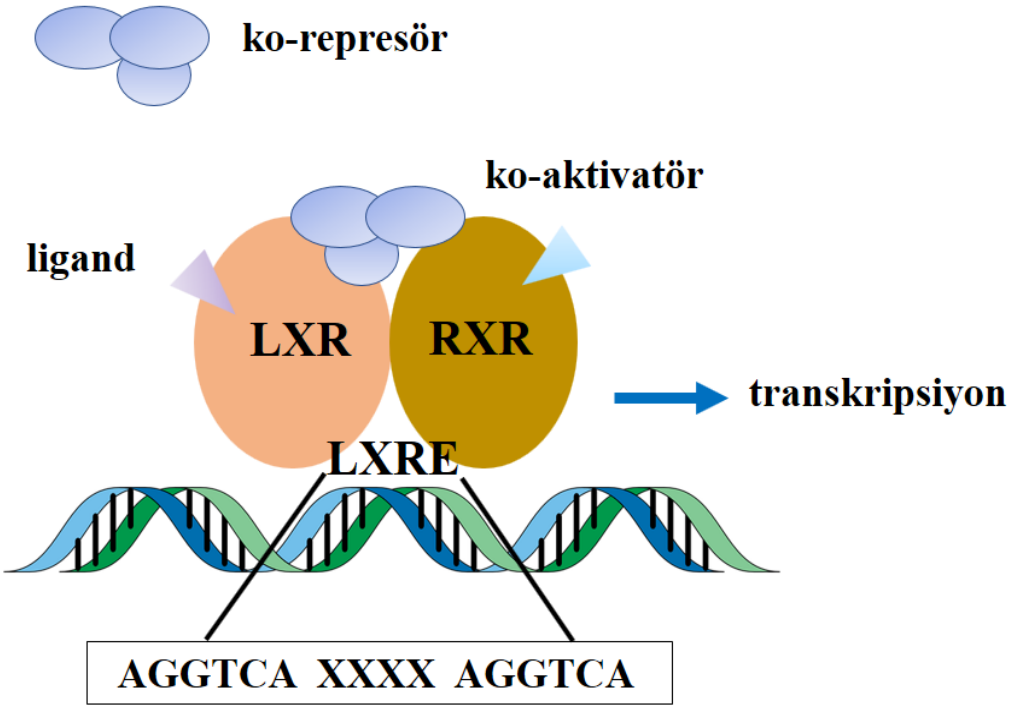
Farmasötik endüstrisi tarafından LXR'ler metabolizma düzenleyici potansiyel ilaç hedefleri olarak düşünülmüş ve biyomedikal araştırmalarda yaygın olarak kullanılan sentetik LXR ligandları geliştirilmiştir (Schultz ve ark 2000, Collins ve ark 2002, Theofilopoulos ve ark 2013). LXR ligandı ile muamele edilen MCF-7 meme kanseri ve melanoma hücrelerinde tümör büyümesi suprese edilmiştir (El Roz ve ark 2013, Pencheva ve ark 2014). Ayrıca, LXR agonistleri fare ksenograft tümör gelişiminin yanısıra prostat, meme, ovaryum ve kolorektal kanser hücrelerinde tümör hücre proliferasyonunu azaltmaktadır (Bovenga ve ark 2015, Lin ve Gustafsson 2015, Youlin ve ark 2017). Bununla birlikte, LXR kolesterol homeostazisinde kardiyoprotektif ve immunsupresif bir rol oynamaktadır (Hong ve Tontonoz, 2014, Kappus ve ark 2014). Aynı zamanda, LXR kardiyopatolojik bozuklarda ve meme kanserinde terapotik hedef olarak ortaya çıkmaktadır (Cannon ve ark 2016, Wu ve ark 2016, Ma ve ark 2017).

1.3.3. LXR Aracılı Transkripsiyonel Regülasyon

LXR'ler, hedef genlerde ilişkili DNA dizilerine bağlanarak hedef genleri etkinleştirir. LXR'ler, RXR izoformları ile heterodimer olarak konsensüs elemanlarına (LXR yanıt elemanları, LXRE) bağlanmaktadır (Makishima 2006). LXRE, dört nükleotid

(DR-4) ile ayrılmış AGGTCA konsensüs dizisinin iki tekrarından (DR) oluşmaktadır (Chawla ve ark 2001). Birçok LXR'nin hedeflerinin düzenleyici bölgelerinde DR4 response elementi varlığı bulunmaktadır (Şekil 1.2.) ve DNA'ya bağlanmasında fonksiyonel rol oynamaktadır (Quack ve ark 2002, Boergesen ve ark 2012).

LXR' ler hedef genlerin ekspresyonunu promotör bölgelerindeki LXRE'ler aracılığıyla düzenlemektedir (Verreault ve ark 2006; Cha ve Repa 2007). LXRE'lerin, ABCG1 hedef geninin intronlarında mevcut olduğu bildirilmiştir (Kennedy ve ark 2001, Sabol ve ark 2005). Bununla birlikte her iki LXR'nin ABCA1 ve ABCG1 ekspresyonunu kontrol edebildiği gösterilmiştir (Kennedy ve ark 2001, Quinet ve ark 2006). Başka bir çalışmada, LXR'nin gen ekspresyonunu negatif LXR DNA yanıt elamanları aracılığıyla baskılayarak düzenleyebileceğide bildirilmiştir (Wang ve ark 2008).



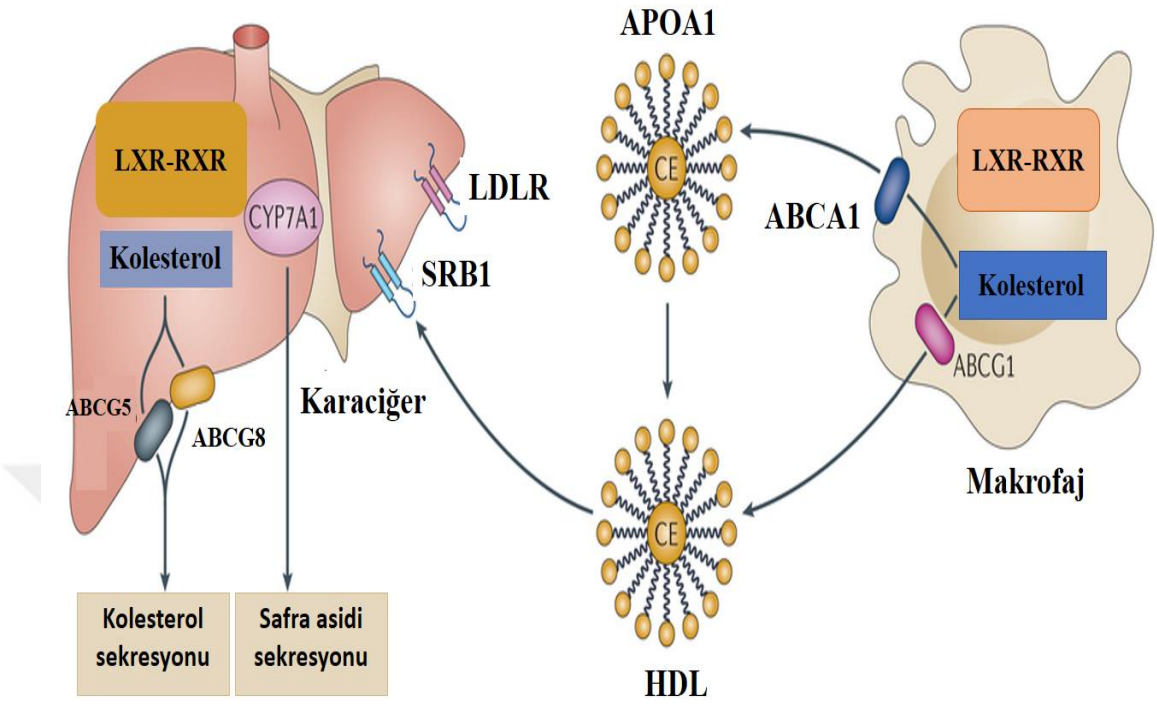
Şekil 1.2. LXR transkripsiyonel regülasyon

1.3.4. LXR ve Reverz Kolesterol Transportu

RKT, birikmiş kolesterolün periferik dokulardan karaciğere taşındığı ve ardından safra salgısı olarak dışkı yoluyla atıldığı yolağı tanımlamaktadır. LXR ABCA1, ABCG1, APOE ve PLTP' yi içeren birkaç genin ekspresyonunu düzenleyerek RKT'de kritik bir rol oynamaktadır (Şekil 1.3.). LXR aktivasyonu periferik dokulardan kolesterolün efluksunu artırır ve antiaterojenik etkiye sahiptir (Joseph ve ark. 2002b, Levin ve ark 2005, Naik ve ark 2006, Lee ve Tontonoz 2015).

Hücrelerde fazla kolesterol oksisteroller olarak birikir ve LXR, hücreleri kolesterolün aşırı yükünden koruyan genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir. Bundan dolayı, LXR' ler kolesterol sensörleri gibi işlev görmektedir. LXR aktivasyonu bağırsakta safra asidi sentezi ve metabolizması/atılımı, reverz kolesterol transportu (RKT), kolesterol biyosentezi ve kolesterol emilim/boşaltımını düzenlemektedir. Ayrıca, LXR'ler hücrelerarasında biriken kolesterolden hücreleri korumaktadır (Korach-André ve ark 2011a, 2011b).

İnsan primer makrofajlarında LXRα knockdown'u kolesterol efluksunu bozmasına karşın, LXRβ'nın bu etki altında ABCA1 ve ABCG1 gibi LXR hedef genlerinde herhangi bir etkisi olmadığı ve bundan dolayı kolesterol efluksunu etkilemediği bildirilmiştir (Ishibashi ve ark 2013). Hayvan modellerinde LXR agonistlerinin RKT'de rol oynayarak aterosikloruzu azalttığı bildirilmiştir (Terasaka ve ark 2003, Bischoff ve ark 2010).



Şekil 1.3. Kolesterol Reverz Transportu (Hong ve Tontonoz 2014).

1.3.5. ABCA1-aracılı Kolesterol Efluksu

ABCA1 lipitleri transport etmek için enerji kaynağı olarak ATP'yi kullanan ABC taşıyıcı süper ailesi üyesi olan 2261 amino asit ve 50 ekzondan oluşan integral membran proteinidir (Santamarina-Fojo ve ark 2000). ABC taşıyıcıları Walker A ve Walker B olarak bilinen iki korunmuş peptid motifi içermektedir ve nükleotid bağlanma domaini varlığı ile karakterize edilir. Aktif ABC taşıyıcı için minimum gereksinim iki nükleotit ve altı heliks transmembran domainidir (Oram and Lawn 2001). ABCA1'in sahip olduğu LXRE dizisinden dolayı LXR agonisti T0901317 (Repa ve ark 2000) tarafından farmakolojik olarak indüklendiği bulundu (Costet ve ark 2000). Ayrıca LXRE'nin varlığı ABCA1 geninin birinci intronunda karakterize edilmiştir (Singaraja ve ark 2001).

ABCA1, fosfolipidlerin ve kolesterolün HDL partikülünü stabilize eden apo-A1 gibi lipid zayıf apolipoproteinlere nakledilmesine aracılık eder ve bu nedenle RKT' nin ilk basamağından sorumludur. Bundan dolayı, ABCA1 HDL biyogenezinin önemli bir regülatörüdür ve fazla kolesterolün uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Vedhachalam ve ark.

(2007) küçük bir ApoA-I havuzunun ABCA1'e bağlandığını ve net fosfolipid translokasyonunu uyararak membran gerginliğini artırdığını bildirmiştir (Vedhachalam ve ark 2007).

ABCA1 hücresel seviyede plazma membranı, hücrelerarası kompartmanlar, golgi kompleksi ve geç endozom/lizozomlarda lokalize olmaktadır. Bu lokasyonlar arasında bulunan hücrelerarası kolesterol akışı geç endozom veya lizozomlardan plazma membranına trans golgi kompleksi ile sağlanmaktadır (Boadu ve Francis 2006). ABCA1 aracılı olarak taşınım, lipitlerin hücre membranından lipit bağımsız veya lipitten fakir apoliproteinler tarafından hücrelerarası akseptörlere taşınmasıdır. Böylece, ApoA-I interaksiyonu ve takip eden kolesterol efluksu kolaylaşır. ABCA1 tarafından meydana getirilen kolesterol havuzları ABCA1 aracılı lipit salınımı için spesifik substrattırlar, bu yüzden lipit yoksun ve fakir apoliproteinler ile seçici interaksiyonu sağlar (Landry ve ark 2006).

ABCA1 aracılı kolesterol efluksu protein seviyesi ile ilişkilidir ve sırasıyla transkripsyionel veya postranskripsiyonel olarak düzenlenmektedir (Ramirez ve ark 2011). ABCA1 gen ekspresyonu öncelikli olarak LXR/RXR uyarımı ile indüklenmekte ve hücrelerde kolesterol birikimiyle stimule edilmektedir (Larrede ve ark 2009). Son zamanlarda, ABCA1 gen ekspresyonunun regülasyonunda mikroRNA'nın rolü ortaya koyulmuştur (Ramirez ve ark 2011, Rayner ve ark 2011, Sun ve ark 2012, Hou ve ark 2017). miR-148a'nın ABCA1 hepatik ekspresyonunu ve dolaşımdaki *in vivo* HDL-C seviyesini regüle ettiği bulunmuştur (Goedeke ve ark 2015).

Bazı çalışmalarda ABCA1 ekspresyonunun düzenlenmesine bağlı olarak kolesterol homeostazisi değişmiştir: ABCA1' in makrofajlarda knockout'u serbest ve esterlenmiş kolesterolün artmasına neden olarak artmış inflamatuvar yanıta yol açtığı gösterilmiştir (Zhu ve ark 2008). ABCA1 beyinde kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda ABCA1 santral sinir sisteminin ApoE'ye kolesterol efluksunu kolaylaştırdığı gösterilmiştir (Hirsch-Reinshagen ve ark 2004).

Son zamanlarda, kanser hücrelerinde yapılan araştırmalarda kolesterolün reverz transportunun önemi araştırılmıştır. Oral skuamoz kanser hücrelerinde LXR ligandının

ABCA1'i yukarı yönde düzenleyerek kolesterol efluksunu artırdığı ve böylece proliferasyonu azalttığı bildirilmiştir (Kaneko ve ark 2015). Kolon kanserinde miR-183' ün ABCA1 genini inhibe ederek kolesterol birikimine neden olduğu gösterilmiştir (Bi ve ark 2016).

1.3.6. ABCG1-aracılı Kolesterol Efluksu

ABCG1 ATP'yi kullanan ABC proteinidir ve N-terminalinde altı transmembrana sahip nükleotid bağlanma domaini bulunmaktadır. İnsan ABCG1 21q22.3 üzerinde lokazile olmuştur ve 678 aminoasitten oluşmaktadır (Chen ve ark 1996). Birçok farklı hücrede alternatif splaysinge bağlı çeşitli ABCG1 transkriptleri saptanmıştır (Schmitz ve ark 2001). ABCG1 aracılı efluksun esas özelliği HDL ve LDL ile interaksiyondur. Böylece kolesterol ve toksik oksiterol makrofajlardan uzaklaştırılır (Vaughan and Oram 2005, Fitzgerald ve ark 2010).

Yüksek miktarda yağ ve kolesterol içeren diyetle beslenen ABCG1 knockout farelerde, makrofajlar ve karaciğerde önemli miktarda kolesterol ve lipidler biriktidiğinden dolayı ABCGl'in kolesterol efluksunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Kennedy ve ark 2005). ABCG1, kolesterolü lipid zayıf apolipoproteinlere taşıyan ABCA1'in aksine, kolesterolü, HDL gibi fosfolipid içeren akseptörlere taşımaktadır. ABCA1, lipitce fakir partiküllerin lipidasyonunu teşvik eder ve ABCG1 aracılı kolesterol efluksu için akseptör üretir (Gelissen ve ark 2006). Ayrıca, ABCG1 kolesterol efluksunu ApoE zenginleştirilmiş partiküllere yönlendirerek katkı sağlamaktadır (Huang ve ark 2001).

Makrofajlarda ABCA1 ve ABCG1'in dışında birçok kolesterol duyarlı ABC taşıyıcı tanımlanmış olmasına rağmen, köpük hücre formasyonu ve kolesterol tersine taşınımında potansiyel rolü daha fazla araştırma gerektirmektedir (Fu ve ark 2013). ABCG1 seviyesi post-translasyonel mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir (Tarling ve Edwards 2012).

1.4. Korpus Luteum

Korpus luteum (KL), ovülasyon sonrasında rezidüel foliküler duvar hücrelerinden (granulosa ve teka hücreleri) şekillenen geçici bir endokrin bezdir (Niswender ve ark 2000). KL, ilk defa 1573 yılında Coiter tarafından "sarı sıvı" ile dolu boşluklar olarak tanımlamıştır ve daha sonra Marcello Malpighi bu boşlukları korpus luteum "sarı cisimler" olarak isimlendirmiştir (Short 1977, McCracken ve ark 1999). Regnier de Graaf tarafından 1600'lü yılların sonlarında KL tanımlanmış ve iki yüzyıl sonra, Prenant, KL'nin gebeliği düzenleyen maddeleri üreten bir bez görevi görebileceğini önermiştir (Jocelyn ve Setchell 1972). Bu gözlem 1900'lerin başında çeşitli gruplar tarafından doğrulanmış ve biyolojik olarak aktif madde progesteron kristalleştirilmiş ve 1934 yılında dört bağımsız grup tarafından aynı anda karakterize edilmiştir (Allen 1974, McCracken ve ark 1999). KL östrüs siklusunun düzenlenmesinde ve insan, primat, ruminant, rodent, kanin ve kedi dahil olmak üzere çoğu memelide gebeliğin oluşumu ve sürdürülmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Bu işlev, büyük oranda KL'nin sentezlediği başlıca steroid olan progesteron tarafından gerçekleştirilir. Genel olarak, KL'nin siklus döngüsü boyunca üç fazı vardır: oluşum, idame, regresyon ve dördüncü potansiyel evre: gebelik sırasında sağ kalım ve sürekli fonksiyon. KL'nin büyüme ve gelişimi luteinize hormon (LH), büyüme hormonu (GH), prolaktin ve östradiol (E2) kontrolü altındadır (Niswender ve ark 2000). Ayrıca, KL tarafından üretilen steroidler, protein hormonlar, eikosanoidler ve sitokinler KL oluşumunda rol oynamaktadır (Reynolds ve Redmer 1999, Berisha ve Schams 2005). KL yaşam döngüsünün her aşaması, birbirinden farklı düzenleyici ve sinyalizasyon olaylarına sahiptir.

Olgun KL, büyük ve küçük luteal hücrelerden oluşmaktadır: Büyük luteal hücreler granuloza kökenli olup çok az LH reseptörüne sahiptir. Bundan dolayı LH'a yanıt oluşturamazlar. Ancak, $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerine sahip olduklarından dolayı $PGF_{2\alpha}$'nın luteolitik yanıtına cevap oluşturabilirler. Küçük luteal hücreler teka orijinli olup progesteron üretimine LH reseptörleri ile yanıt vermektedir.

Postovulatör folikülden vaskülarize KL'ye geçiş yapan hücreler yapısal yeniden düzenlemelere maruz kalmaktadır. KL tam işlevsel olduğunda, boyutuna bağlı olarak KL'ye verilen kan miktarı diğer tüm organlara göre oldukça fazladır. Bağışıklık

hücrelerinden salınan faktörler doku yenilenmesine ve yeni kan damar gelişimine katkıda bulunur.

Gebelik şekillenmediğinde, KL regrese olmakta ve bir sonraki üreme siklusu başlamaktadır. KL siklusu memeli vücudundaki herhangi bir doku yapısının en kısa ömrüne sahiptir. KL'nin kadınlarda işlevi iki hafta sonra sona ererken, rodentlerde bu süre daha kısadır. Lüteolizis süreci progesteron üretiminde belirgin bir azalma ve yoğun doku modellemesi ile ilişkili olup, steroidogenik hücrelerin ve kan tedariğinin kaybolmasına neden olur. Gebelik oluşursa, gelişmekte olan konseptustan (embriyo ve buna bağlı membranlar) salınan bir hormon, KL yapısını, fonksiyonunu ve kan tedariğini devam ettirir. Lüteolizin engellenmesi KL'nin gebeliği desteklemesini sağlar: kadınlarda bu hormon hCG'dir. İneklerde ve koyunlarda bu faktör, uterus $PGF_{2\alpha}$ üretimini önleyecek olan interferon tau'dur (IFNT) ve muhtemelen KL üzerinde doğrudan etki etmektedir.

1.5. Koyun Östrus Siklusu

Koyun östrus siklus uzunluğu yaklaşık 17 gündür ve östrus, metöstrus, diöstrus ve pröstrustan oluşmaktadır. Östrus siklusu, dişinin çiftleşmeyi kabul ettiği ve ovulasyonun gerçekleştiği dönem olup 24 ila 36 saat sürmektedir. Metöstrus, östrusun bitmesiyle KL oluşumunun başladığı dönemdir ve yaklaşık üç gün sürmektedir. Diöstrus KL'nin tam olarak fonksiyonel olduğu ve progesteron miktarı artşının tespit edildiği dönemdir. Diöstrus KL'nin regrese olduğu 16-17 günlerde sona ermektedir. Proöstrus süresince KL regrese olmuş ve progesteron miktarı düşmüştür.

Koyunlarda, endometriyumun 8-10. günler arasında sürekli progesteron maruziyetine uğraması 11-13. günler arasında luminal ve yüzeysel glandular epitelde progesteron reseptörlerinin (PGR) downregule olmasına neden olur. Dolayısıyla, 13. günden sonra östrojen reseptörünün (ESR1) hızlı bir artışı meydana gelir ve bunu 14. günden itibaren oksitosin reseptör (OXTR) artışı takip etmektedir. Östrus siklusunun 13-14. gününden sonra hipofizin arka lobundan pulsatil olarak salınan oksitosin (OT) endometriyal OXTR reseptörleri üzerine etki ederek 14-16 günler arasında endometriyal LE ve sGE'den luteotilik $PGF_{2\alpha}$ pulsların salınmasını indükler. Endometriyumda östrojen ve oksitosin siklooksijenaz-2'nin (COX-2) artışına neden olarak (Kuehl ve ark 1976,

Wlodawer ve ark 1976) fosfolipaz A2 (PLA2) aktivasyonuyla koyunlarda luteolizis süresince $PGF_{2\alpha}$'nın artmasına neden olur (McCracken 2005). Luteal oksitosin hipofiz arka lobundan salınacak olan oksitosine ilave bir kaynak olarak fonksiyon görür ve luteolizis süresince endometriyumun luteotilik $PGF_{2\alpha}$ pulslarını çoğaltır (Spencer ve ark 2004; McCracken 2005). Son olarak, 6-8 saat aralıklarla meydana gelen $PGF_{2\alpha}$ pulsları kırk-sekiz saatte içinde KL'nin tam regresyonuna olanak sağlar (Chan ve ark 1998).

Ruminantlarda, konseptusun trofoektoderm mononükler hücreleri gebeliğin 10. ve 21-25 günleri olmak üzere 14-16. günlerinde maksimal seviyede gebeliğin tanı sinyali olan IFNT sentezleyerek salgılamaktadır (Zarco ve ark 1988, Spencer ve ark 2004). IFNT parakrin olarak endometriyal luminal ve glandular epitel üzerine etkiyerek ESR-1 gen transkripsiyonunu baskılar. Böylece, IFNT gebeliğin anne tarafından tanındığı zamanda dolaylı yoldan OXTR ekspresyonunu suprese eder ve $PGF_{2\alpha}$'nın pulsatik olarak salınımını engeller (Wilson ve ark 1972, McCracken ve ark 1999, Wang ve ark 2004).

1.6. Steroidogenez Kolesterol Subsratı

Steroidogenez: 1) kolesterolün kolesterol esteri formunda saklanması için eksojen (lipoproteinler) ve endojen (de novo sentez) kaynaklardan kazanımı, 2) kolesterolün dış mitokondri membranından iç mitokondri membranına transportu, 3) mitokondri iç membranında kolesterolden pregnenolonun katalizlenmesi, 4) pregnenolonun mitokondriden ER'ye efluksu sağlanarak steroin hormonun üretimi aşamalarından oluşmaktadır.

Esterlenmemiş kolesterol *de novo* steroidogenez için önemli bir subsrattır ve erken KL oluşumu sırasında hızlı pogesteron üretimi için esterlenmemiş kolesterole ihtiyaç duyulur. Steroidogenez için gerekli olan kolesterol; HMG CoA sentetaz/redüktaz yolağı vasıtasıyla asetattan *de novo* sentez, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) ile eksojen plazmadan, ayrıca hali hazırda bulunan hücreiçi depolardan farklı yollardan elde edilebilir (Miller ve ark 2011). Lipid damlacıklarında depolanan kolesterol esterleri steroidogenik yolak için kolayca bulunabilen kaynak olarak hizmet etmektedir ve hormon sensitif lipaz (kolesterol ester hidrolaz) tarafından serbest

kolesterolden faydalanmak için ester grubunun uzaklaştırılması luteinizasyonda artmaktadır (Tuckey ve ark 1980).

De novo kolesterol sentezi enerji harcanması bakımından hücreler için maliyetlidir ve bu nedenle hücreiçi depolar tükendiğinde önemli olmaktadır. Plazmadan gelen lipoproteinler steroidogenez için ana kolesterol kaynağıdır. Düşük dansiteli lipoproteinler büyük memeliler için başlıca sterol kaynağıdır (Grummer ve Carrol 1988) ve HDL ise rodentler için başlıca kolesterol kaynağıdır (Khan ve ark 1985). HDL ile gelen kolesterol esterleri hücreye SR-BI yoluyla girmektedir. LDL yüzey reseptörüne (LDLR) bağlanır ve kompleks internalize olarak lizozomlarda kolesterolün LDL partiküllerinden serbest bırakılması sağlanır. Eksternal kaynaklardan alınan kolesterol kolesterol esterleri olarak depolanır ve steroidogenik yolağa taşınır.

Ovaryum hücrelerinde veziküler ve non-veziküler transport mekanizmalarının çok az kısmı aydınlatılmıştır (Miller ve ark 2011). Çok az sayıda kolesterol transport proteininin kolesterolü sitoplazmadan dış mitokondri membranına taşıdığı varsayılmıştır. Ancak, bu proteinlerin katkısı da bireysel olarak açık değil ve tartışmalıdır. Nonspesifik kolesterol transportırları, sterol taşıyıcı 2 (SCP2) ve spesifik StAR-ilişkili lipit transfer (START) domain proteinleri bu rolü üstlenmektedir (Clark ve ark 2012).

1.6.1. Luteal Dokuya Kolesterolün Alımı

Kolesterol dolaşımdaki lipoproteinler tarafından hücre içine alınır (Brown ve Goldstein 1979, Glass ve ark. 1983) ve bundan dolayı luteal hücrelerde major kolesterol kaynağı lipoproteinlerdir (Gwynne ve Strauss 1982). Luteal hücreler endositozis yolağını kullanarak kolesterolce-düşük yoğunluklu lipoproteinleri (LDL) LDL-reseptörü (LDL-R) vasıtasıyla veya yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterolü SR-BI yolağı ile seçici olarak alabilmektedir (Şekil 1.4.) (Azhar ve Reaven 2002). HDL ve LDL insan (Ragoobir ve ark 2002) ve rat (Menon ve ark 1985) luteal hücrelerinde progesteron üretimini uyarmaktadır.

1.6.2. LDL Kolesterol Alımı

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin hücre içine alımı, kolesterolün hücrelere temin edilmesinde önemli bir yöntemdir. LDL, lipid bileşeni kolesterol, trigliserid ve apolipoprotein içeren bir plazma lipoprotein parçacığıdır. Hücresel kolesterol alımının bir başka yolu, apolipoprotein-B (Apo-B) veya apolipoprotein-E'nin (ApoE) LDL reseptörü (LDLR) tarafından klatrin kaplı vezikül çukurcuk ile endositik olarak gerçekleşir: lipoprotein vezikül çukurcukta internalize edilir ve vezikülün degrade edilebilmesi için lizozomlara yönlendirilir, ardından serbest kolesterol salınarak steroid molekülü ve diğer metabolitlere dönüştürüldüğü mitokondriye taşınmaktadır. Bundan dolayı hiperkolesterolemide LDL mutasyonlarına bağlı olarak bazı otozomal resesif geçiş gösteren hastalıklar tanımlanmıştır (Garcia ve ark 2001, Mishra ve ark 2002). Ayrıca, $LDLR^{-/-}$ knockout farelerin normal farelere oranla daha az ovulasyon gösterdikleri ve bundan dolayı fertilitelerinin düşük olduğu belirtilmiştir (Guo ve ark 2015).

LDL'nin luteal steroidogenez için kolesterol kaynağı olarak hizmet edip etmemesi türe bağlıdır (Brannian ve Stouffer 1993). Özellikle, insan luteal hücreleri steroid sentezi için kolesterol kaynağı olarak LDL ve luteinize granuloza hücrelerde HDL'ye gereksinim duymaktadır (Azhar ve ark 1998). Hormonel olarak, LDLR ve SR-BI reseptör ekspresyonu gonadotropin uyarımı ve kolesterol deplesyonuna bağlı olarak artmaktadır (Lopez ve McLean 1999, Sekar ve Veldhuis 2004). Rodent ovaryumunda, luteinleştirici hormonun (LH) SR-BI ve HDL ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Chen ve Menon 1994). *Resus makak* granuloza hücrelerinde, ovulasyon indükleyici folikül stimule edici hormonu (FSH) uyarımını takiben hCG uyarıcı FSH SR-BI ve LDLR reseptör ekspresyonunda hızlı bir artışa sebep olmaktadır (Cherian-Shaw ve ark 2009).

1.6.3. HDL Kolesterol Alımı

SR-BI kolesterol esterlerinin seçici olarak alımına aracılık eder ve kolesterol bağımlı hücrelerde SR-BI plazma HDL kolesterol düzeyini ve depolanmasını düzenlemektedir. Ayrıca, SR-BI kolesterolden steroid hormon üreten steroidogenik hücrelerde yüksek oranda eksprese olmaktadır (Azhar ve ark 1998, Li ve ark 1998). SR-BI, HDL' nin iki ana protein bileşeni ApoAI veya ApoAII'in internalizasyonuna gerek

duymadan kolesterol esterlerini hücrelere getirmektedir (Sparrow ve Pittman 1990; Johnson ve ark 1991; Connelly ve ark 2003). Sığır KL'si östrus siklusu ve gebelik süresince başlıca HDL komponenti olan ApoA-I sentezlemektedir (NdikumMoffor ve ark 1997) . Ayrıca, insanlarda APOA1'in KL'de P4 ve PGE2 üretimini uyardığı bildirilmiştir (Chandras ve ark 2004). Scavenger (çöpçü) reseptör sınıf B tip 1 (SR-BI) 82 kDa'lık hücre yüzey integral membran glikoproteini olarak karakterize edilmiş ilk HDL reseptörüdür (Calvo ve Vega 1993, Acton ve ark. 1994). SR-BI'in ovaryum, adrenal bez, karaciğer, dalak ve plasentada ekspresyon seviyesi yüksektir (Acton ve ark 1996, Landschulz ve ark 1996, Cao ve ark 1997). SR-BI post-transkripsiyonel/post-translasyonel mekanizmalarla düzenlenebilmektedir (Hu ve ark 2012, 2013). SR-BI geni, çoğu küçük (204 bp'den daha düşük) olan 13 ekzon içermektedir (Cao ve ark 1997). Hamster, fare, sıçan ve insan sekansları (Rajapaksha ve ark 1997) büyük benzerlik taşımaktadır. SR-BI luteal hücre yüzeyinde immuno-lokalizasyon olarak mikrovilliler ve mikrovillar kanallarda gösterilmiştir; bu, mikrovilliler ve mikrovillar kanallar steroidogenik hücrelere lipoprotein kolesterolünün seçici alımı için hücre yüzeyi kompartmanı olarak işlev görmektedir (Reaven ve ark 1998). Ayrıca, membran sentezi için gerekli olan kolesterol kaynağı lipoprotein taşınımı embriyo gelişimi ve ekstraembriyonik dokularda steroid üretimi için önemlidir (Hatzopoulos ve ark 1998). İnsan granuloza hücrelerinde RNA interferans teknolojisi ile susturulan SR-BI'in düşük progesteron sekresyonu ile korele olduğu bulunmuştur (Kolmakova ve ark 2010). Ayrıca, tek nokta mutasyonundan kaynaklanan SR-BI yetersizliğinin kadınlarda infertilite problemlerinin aydınlatılmasında rolü olabileceği belirtilmiştir (Christianson ve Yates 2012).

1.6.4. Luteal Steroidogenez

Progesteron sekresyonunda steroidogenik yolak ana faktörler arasında yer almaktadır (Stocco ve Clark 1996, Stocco 2008, LaVoie ve King 2009). *De novo* steroidogenez için sadece teka hücre katmanının kolesterolden yararlandığı ovaryum folikülünün aksine, KL'de granuloza ve teka hücrelerinden köken alan hücrelerde bu yeteneğe sahiptir. Steroidogenez kapasitesinin artması KL tarafından daha fazla progesteron üretimine olanak tanımaktadır. Özellikle foliküler granuloza hücrelerinin luteinizasyonu ve progesteron sentezine olanak sağlayan genler ve ilişkili proteinler bu

artışa eşlik etmektedir. Bu proteinler, kolesterolü mitokondri iç membranına taşıyan steroidogenik akut düzenleyici protein (StAR), kolesterolün pregnenolona katalizleyen sitokrom p450 yan-zincir kesim kompleksi enzimi (P450scc) ve pregnenolonun progesterona çevirimini katalizleyen 3-beta-hidroksisteroid dehidrogesterondan (3βHSD) oluşmaktadır.

Ayrıca, bazı türlerde KL tarafından östradiol üretilebilmektedir. Gebelik sırasında implantasyon için uterusun astarlanması ve konseptusun gelişiminin sürdürülmesi için yüksek miktarda kolesterol üretimine ihtiyaç vardır. Fare, rat, domuz, keçi ve sığır KL progesteronun üretimine tüm gebelik süresince gerek duyarken, primat, insan ve koyun plasentanın yeterince steroid üretebildiği erken gebelik süresince gerek duymaktadır (Magness 1998, McCracken ve ark 1999). Ayrıca, serbest kolesterolün deplesyonundan sonra, kolesterol esterleri steroidogenez için kullanılır. Lipidden yoksun şartlarda lipoprotein konsantrasyonun azalması luteal hücreleri alternatif yolaklara yönlendirir ve asetatdan optimum seviye kolesterol sağlanır (Lopez ve McLean 1999).

Luteinizasyon süresince granuloza hücreleri *de novo* steroidogenez için protein sistemini upregule ederek muazzam yetenek kazanmaktadır; kolesterol substratının mitokondriye taşınmasını sağlar, daha sonra P450scc proteinin ifadesinin artmasıyla kolesterol, ilk steroid hormon olan pregnenolona dönüştürülür (LaVoie ve King 2009). P450scc enzimi kolesterolün pregnenolona dönüşümünü belirleyen ilk enzimatik kontrol noktasıdır ve P450scc adrenodoksin ve adrenodoksin redüktaz ile kompleks oluşturarak kolesterol dönüşümünün tam olarak gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Artmış pregnenolonun progresterona dönüşümü için 3βHSD miktarının foliküler seviyenin üstüne çıkması gerekmektedir (Şekil 1.4.). Kolesterolün dış mitokondri membranından P450scc'nin bulunduğu iç membrana transferi *de novo* steroidogenez için genel hız-kısıtlayıcı adım olarak kabul edilmektedir. Ovaryum folikülleri ve luteal hücrelerde bu görev StAR proteini tarafından gerçekleştirilir (Stocco ve Clark 1996, Stocco 2008).

1.6.5. Luteal Kolesterol Transportu

Progesteron sentezinde ilk aşama hormon biyosentezinde hız kısıtlayıcı adım olan kolesterolün sitoplazmadan mitokondri iç membranına transportudur. Bu transport süreci

akut olarak ikincil mesajcılar tarafından sağlanmaktadır. Kolesterolün iç mitokondri membranına transportta üç esansiyel protein yer almaktadır. Bu proteinler StAR, daha önceleri periferal tip benzodiazepin reseptörü (PBR) olarak bilinen translokatör protein (TSPO) (Papadopoulos ve ark 2006) ve PBR'nin doğal ligandı olan endozepindir.

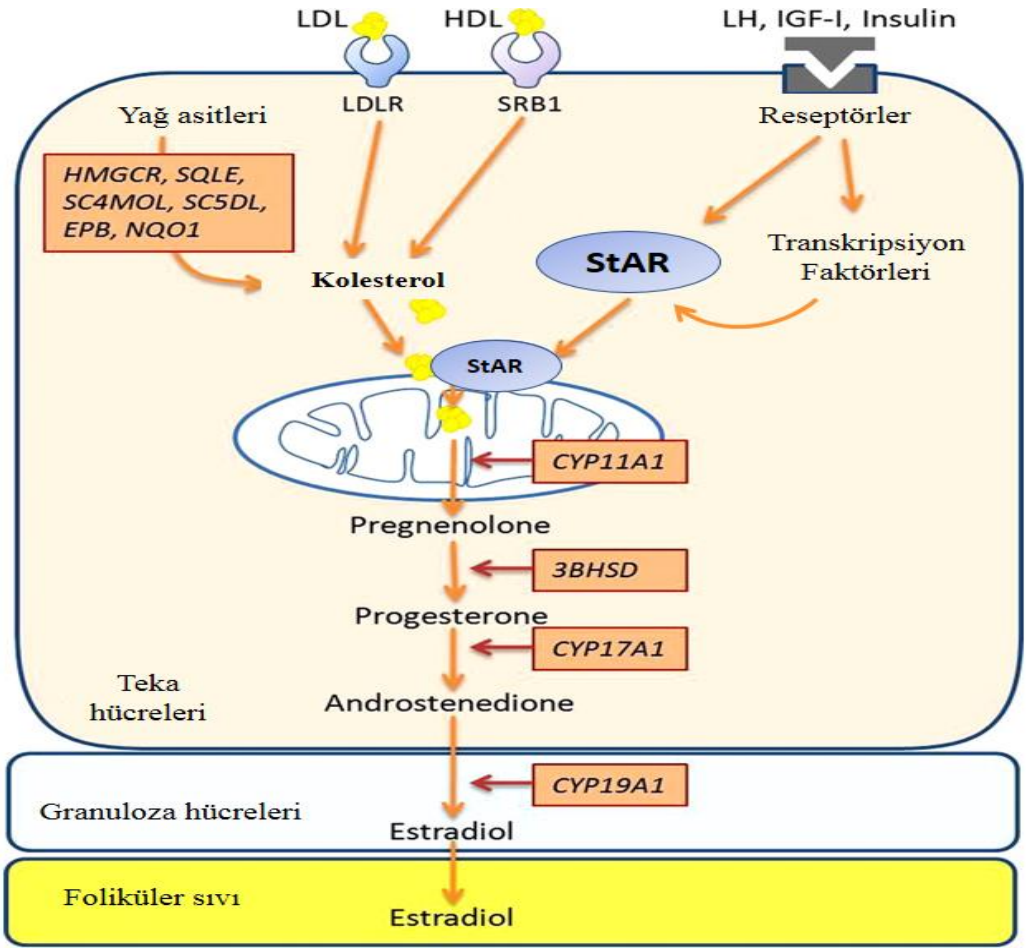
StAR 37 kilodaltonluk (kDa) protein olarak sentezlenir ve mitokondri hedefleyici diziye sahiptir (Stocco ve Sodeman 1991, Clark ve ark 1994). StAR üzerinde "sterol bağlayıcı cep" varlığı, bir molekül kolesterolü mitokondri dış membranı ile temas halinde tutmaktadır (Miller ve Auchus 2011). StAR, dış zarla temas etmeyi bıraktığında, kolesterol taşınması kesilir (Stocco 2000). StAR, TSPO'nun yardımı olmadan kolesterolü taşımayı başaramaz. (Jefcoate ve Artemenko 2004). Ayrıca, StAR'ın, iç mitokondri membranı içine aktarılması TSPO'ya bağlıdır (Rone ve ark 2009).

StAR PKA ve PKC fosforilasyon bölgelerine sahiptir (Juengel ve Niswender 1999). StAR'ın PKA aracılı olarak fosforilasyonu kolesterol transportunu stimule etmesine karşın, PKC tarafından fosforilasyonu bu süreci inhibe eder. Sterol bağlayıcı protein de kolesterolün mitokondriye transportunda rol oynamaktadır (Ikonen 1997). Sığır granuloza hücrelerinde StAR mRNA seviyesi çok düşük olmasına rağmen, erken KL, orta ve mid-siklusta ise maksimum seviyededir (Hartung ve ark 1995). StAR ekspresyonu periovulatör folikülün teka interna ve KL'nin luteinize granuloza ve teka hücrelerine sınırlıdır (Kiriakidou ve ark 1996). PBR proteini steroid üreten hücrelerin mitokondri membranlarında mevcuttur ve ayrıca kolesterolün mitokodri dış membranından iç membranına transportta rol oynamaktadır (Papadopoulos ve Brown 1995). StAR sitozolde kolesterole bağlanır ve direkt olarak veya PBR vasıtasıyla kolesterolü mitokondri iç membranına transport eder (Kallen ve ark 1998).

1.6.6. Kolesterolün Pregnenolona Dönüştürülmesi

Progesteron üretiminde ikinci aşama, iç mitokondriyal membranda bulunan kolesterolün P450scc enzimi ile katalize edilerek pregnenolona dönüştürülmesi ve daha sonra düz endoplazmik retikulumda bulunan 3βHSD ile katalize edilen progesteronun elde edilmesidir. Sitokrom P450scc (mitokondri iç membran proteini) kolesterolün ilk steroid olan pregnenolona dönüşümünü katalizler (Lambeth ve Pember 1983; Miller

1998). Pregnenolon daha sonra 3β-HSD/Δ^5, Δ^4 izomeraz tarafından biyolojik olarak ilk defa aktif hormon progesterona dönüştürüldüğü düz endoplazmik retikuluma taşınır (Hanukoglu 1992 Cherradi ve ark 1997). Sığırlarda luteal gelişim süresince StAR ve P450scc ekspresyonu seviyesi kademeli bir artış gösterir (8-12. günler arası) ve mid-luteal fazda plato seviyesine ulaşır (Hartung ve ark 1995). Bufalolarda, P450scc, StAR ve 3βHSD mRNA seviyesi olgun KL'de artmasına rağmen regresyon süresince azalmıştır (Kumar ve ark 2012). Sığırlarda yapılan başka bir çalışmada, KL kavitesi ve serumdan ölçülen progesteron ve kolesterol miktarının negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Buna göre, I. aşamadan (1-4. gün) başlayarak II. aşamada (5-10. gün) progesteron miktarı artmış ve III. aşama'da (11-17. gün) en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Ancak, IV. aşamada (18-20. gün) progesteron miktarı en az seviyeye ulaşmıştır. Progesteron ile negatif korelasyon gösteren kolesterol miktarı ise I. aşamada en yüksek seviyede iken II. ve III. aşamalarda azalarak birbirleri ile yakın seviyededir ve IV. aşamada kolesterol miktarı minimum seviyeye inmiştir (Rizzo ve ark 2016). Ayrıca, P450scc transgenik knockout farelerde düzen progesteron sekresyonu ve implantasyon bozuklukları gözlenmiştir (Chien ve ark 2013).



Şekil 1.4. Kolesterol alım ve steroidogenik yolak (Walsh ve ark 2012).

1.7. Luteal Regresyon/Luteolizis

Östrus siklusu süresince ruminantlarda ve diğer türlerde luteal regresyon uterus venası ve ovaryum arteri arasındaki akım vasıtasıyla uterustan KL'ye ulaşan $PGF_{2\alpha}$'nın episodik olarak serbest bırakılmasıyla uyarılmaktadır. Luteolizis embriyonun varlığında engellenir ve sadece siklik hayvanlarda meydana gelmektedir (Hansel ve Hickey 1988, Spencer ve Bazer 2004). Luteolitik özelliklerinden dolayı, $PGF_{2\alpha}$ ve analogları rutin olarak KL regresyonunu ve östrusun senkronizasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır ve bu nedenle, ovulasyonun senkronize edilmesinde temel protokoldür (Hansel ve Convey 1983, Auletta 1988, Weem ve ark 2006). Luteal regresyon, steroidogenik fonksiyon kaybı (fonksiyonel luteoliz) ve bunun ardından KL'nin (yapısal lüteoliz) involüsyonu olarak tanımlanmaktadır (Sugino ve Okuda 2007).

$PGF_{2\alpha}$'nın endojen veya dışardan uygulanması, KL'nin geri döndürülemez ölümüne yol açan olay kaskadını başlatır. Bu süreç boyunca KL, steroidogenik kapasitesi, vaskülarizasyonu, ECM yenilenmesi ve hücre yaşayabilirliği bakımından önemli değişikliklere maruz kalarak, bağ dokudan oluşan korpus albicans dokusunu oluşturur (Meidan ve ark 1999, Miyamoto ve ark 2010). Lüteolizis sürekli devam eden bir süreç olmakla birlikte, işlevsel ve yapısal luteoliz arasında zamansal ve mekanik özellikleri açısından farklılıklar bulunmaktadır. Fonksiyonel regresyon, progesteron üretiminin hızla azaldığı (birkaç saat içinde) bir fazdır (Hansel ve Convey 1983, Schams ve ark 2004, Miyamoto ve ark 2010). İkinci ve daha uzun olan yapısal gerileme fazı boyunca, KL boyutu küçülür, ECM bileşimi değişir ve hücre bütünlüğü kaybolur; bu aşamada çeşitli luteal hücre tipleri apoptozise uğramaktadır.

Son yıllarda, birçok fonksiyonel genomik çalışma, $PGF_{2\alpha}$'nın altta yatan mekanizmasını aydınlatarak eski kavramları büyük ölçüde aydınlığa kavuşturmuştur (Mondal ve ark 2011, Shah ve ark 2014). $PGF_{2\alpha}$ doğrudan $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerini (PTGFR) ifade eden luteal steroidogenik ve endotel hücrelerinde veya dolaylı olarak PTGFR' den yoksun bağışık hücreler üzerinde etkindir. Çalışmalar, uterin veya eksojen $PGF_{2\alpha}$ tarafından üretilen faktörlerin steroid üretiminin azalmasından apoptotik hücre ölümüne kadar olan çeşitli süreçlere aracılık ettiğini ortaya koymaktadır.

1.7.1. Luteolitik Maddelerin Orijini ve Tanımlanması

Birçok türün gebe olmayan uterusu, KL'nin siklik regresyonunda yer almaktadır (Melampy ve Anderson 1968). Örneğin, histerektomi koyun ve kobay KL'nin ömrünü uzatmaktadır (Wiltbank ve Casida 1956). Histerektomi yapılmış hayvanlara endometriyal doku graftı luteal fonksiyonu sona erdirir (Melampy ve Anderson 1968). Ayrıca, ovaryum uterus kornusundan cerrahi olarak ayrıldığında veya uterus yokluğunda KL gerilememektedir (Moor ve ark 1970). Bu nedenle, uterusun luteolitik etkisi lokal bir olaydır. Uterustan ekstrakte edilen düşük moleküler ağırlıklı maddenin luteolitik etkisi olduğu ve luteal regresyonu kontrol eden belirgin vena konsriktif özelliği bulunmuştur (Pharriss ve Wyngarden 1969, Lukaszewska ve Hansel 1970). McCracken ve ark (1999) vasküler anastomoz ile transplante edilen koyunlarda ovaryuma $PGF_{2\alpha}$ infüzyonunun tam olarak luteal regresyonu indüklediğini bildirmiştir (McCracken ve ark 1970, 1973).

Atli ve ark (2012) doğal luteoliz sırasında ortaya çıkan $PGF_{2\alpha}$'nın fizyolojik konsantrasyonunu ve pulsatil salınımını taklit etmek için, $PGF_{2\alpha}$'nın çoklu düşük dozlu pulsları kullanmıştır. Sonuç olarak, birinci doz $PGF_{2\alpha}$ luteal mRNA seviyesine etki yapmasına rağmen, ikinci ve takip eden dozların luteolizis ile ilişkili genleri oldukça etkilemiştir (Atli ve ark 2012). Ayrıca, koyunlarda luteal regresyonu indüklemek için belirli bir frekans da birkaç $PGF_{2\alpha}$ pulsuna ihtiyaç vardır (Mondal ve ark 2011).

Ruminantlarda luteolizis sırasında $PGF_{2\alpha}$ pulslarının uterusdan ovaryuma taşınımı prostaglandin taşıyıcı (PGT) mekanizmalar tarafından düzenlendiği bulmuştur. PGT proteininin farmakolojik inhibisyonu, $PGF_{2\alpha}$ pulslarının endometriyuma erişmesini önlemiş ve fonksiyonel bir KL'nin idame ettirilmesini sağlamıştır (Lee ve ark 2010).

KL ayrıca, $PGF_{2\alpha}$ sentezi de yapabilmektedir; KL, prostaglandin H2'yi (PGH2) $PGF_{2\alpha}$'ya dönüştüren spesifik $PGF_{2\alpha}$ sentezleyicilerinin (PTGFS-AKR1B1 ve PTGFS-AKR1C3) yanı sıra prostaglandin sentezi için hız sınırlayıcı enzim olan prostaglandinendoperoksit sentaz-2'yi (PTGS2 veya COX-2) içermektedir (Arosh ve ark 2004). Ancak, luteolizis sırasında meydana gelen upregülasyon koyun ve sığırlarda birbirinden tutarsızdır (Hayashi ve ark 2003, Wiltbank ve Ottobre 2003) ve ayrıca, luteolizis sırasında luteal $PGF_{2\alpha}$'nın biyosentezinin uterus $PGF_{2\alpha}$'sı ile birlikte yükselmesinin KL regresyonuna katkısı bilinmemektedir. Özet olarak, ruminantlarda ve diğer türlerde luteal regresyon KL'ye uterus venası ve ovaryum arteri arasındaki ters akım ile ulaşan uterusun episodik $PGF_{2\alpha}$'sı ile sağlanmaktadır (McCracken ve ark 1973, 2012).

1.7.2. Hücreiçi $PGF_{2\alpha}$ Sinyalizasyonu

Biyosentezden sonra, PG'ler prostaglandin transportırları (PGT) ile hücrelerden hızlıca salınır ve otokrin, parakrin veya endokrin tarzda G-protein bağlı reseptörler (GPCR) vasıtasıyla fonksiyon görürler. Bu reseptörler yedi transmembrana sahiptir ve farklı G proteinlerine bağlanırlar (Abramovitz ve ark 1994, Sakamoto ve ark 1994, Graves ve ark 1995, Narumiya ve FitzGerald 2001). $PGF_{2\alpha}$ ve PGE2, FP ve EP (EP1, EP2, EP3 ve EP4) reseptörleri vasıtasıyla biyolojik sinyal kaskadlarını aktive eder (Narumiya ve FitzGerald 2001, Jabbour ve Sales 2004). $PGF_{2\alpha}$, büyük steroidogenik luteal hücrelere lokalize olan spesifik reseptörlere bağlanarak etki eder (Fitz ve ark 1982, Jeungel ve ark

1996). Yüksek afiniteli reseptörlere bağlanan $PGF_{2\alpha}$ stimüle edici G (Miwa ve ark 1990) proteini vasıtasıyla membrana bağlı fosfolipaz C'nin (PLC) (Berridge ve Irvine 1984) aktivasyonunu başlatır. PLC, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfatın inositol 1,4,5-trisfosfata (IP3) (Davis ve ark 1996) ve 1,2-diasilgliserol'e (DAG) hidrolize olmasını katalize eder (Berridge ve Irvine 1984). Sitozolde IP3'ün konsantrasyonun artması endoplazmik retikulumdan sitoplazmik kompartmana Ca^{+}'nın serbest bırakılmasına neden olur (Berridge ve Irvine 1984). Artan serbest Ca^{+} ve DAG (plazma zarına lokalize) Ca^{+} bağımlı protein kinazın (PKC) katalitik aktivitesini uyarmaktadır (Nishuzika 1996).

Büyük luteal hücrelerde $PGF_{2\alpha}$'nın anti-steroidogenik etkilerinin çoğuna PKC'nin aracılık ettiği düşünülmektedir (Wiltbank ve ark 1990; McGuire ve ark 1994). Ayrıca, büyük luteal hücrelerde PKC' nin aktivasyonunun, steroidogenezis (Wiltbank ve ark 1990, McGuire ve ark 1994), kolesterol kullanılabilirliği (Behrman ve ark 1971) ve ekstraselüler matriks (Niswender ve Nett 2005) devamlılığında yer alan hücresel proteinlerin post-translasyonel modifikasyonuna neden olduğu düşünülmektedir.

1.7.3. $PGF_{2\alpha}$ Erken Luteal Faz Refrakterizmi

Sığır KL'si, östrus siklusunun 5. gününden önce $PGF_{2\alpha}$'nın luteolitik etkilerine yanıt (veya refrakterdir) verememektedir (Braun ve ark 1988, Tsai ve Wiltbank 1998; Levy ve ark 2000, Wenzinger ve Bleul 2012). Ayrıca, bu refraktör dönem maymunlar ve yalancı gebe ratlarda da görülmektedir (Wright ve ark 1980, Summers ve ark 1985). $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenen luteolizisde erken KL direncinin daha iyi anlaşılması için yapılan çalışmada, $PGF_{2\alpha}$-yanıt oluşturan (11. gün) ve refraktör (4.gün) KL'de $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan sonraki 4 ve 24. saatlerde gen ekspresyonu patternleri 11. günde farklılaşmakta ve bu gen aileleri genel olarak angiogenezis, immünite ve apoptosiz ile ilişkilidir. Ancak, 4. günde gen transkriptinin %25'i regüle olmasına rağmen KL regresyona uğramamaktadır (Mundal ve ark 2011). Bununla birlikte c-FOS'un sığır ve domuz KL'sinde luteolitik kazanımın oluşumunda önemli olduğu gösterilmiştir (Atli ve ark 2012; Diaz ve ark 2013). Ayrıca c-FOS protein seviyesinin siklik 16. günde arttığı bildirilmiştir (Lee ve ark 2016). Keçilere östrus siklusunun erken günlerinde (2, 3 ve 4. gün) uygulan iki luteolitik dozdaki $PGF_{2\alpha}$'nın erken KL regresyonuna neden olduğu bulunmuştur (Romano ve ark 2017)

1.7.4. Fonksiyonel luteolizis

PGF2α'nın luteal hücrelere etkisi

$PGF_{2\alpha}$ pulsları ve luteolitik bolus dozlarına cevaben luteal progesteron miktarının hızlı azalışı, steroidogenik luteal hücrelerdeki $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerinin (FP, PTGFR) varlığı $PGF_{2\alpha}$'nın doğrudan steroidogenik hücreler üzerine olan anti- steroidogenik etkisini göstermektedir. Birçok çalışma, PGF2α ve progesteron sentezi arasındaki mümkün olabilecek bağlantıyı araştırmıştır. Bunlar arasında; LH reseptör aktivasyonunda (Garverick ve ark 1985), protein kinaz C (PKC) ikincil mesajcı sisteminde (Wiltbank ve ark 1990; Niswender ve ark 2000) ve sığır luteal hücrelerinde lipoprotein indüklenmiş progesteron üretiminin azalmasında (Pate ve Nephew 1988, Grusenmeyer ve Pate 1992) $PGF_{2\alpha}$'nın rolü ileri sürülmüştür. Bunun aksine, $PGF_{2\alpha}$'nın progesteron üretimini artırdığını bildiren çalışmalarda rapor edilmiştir (Girsh ve ark 1995; Mamluk ve ark 1999).

Progesteronun $PGF_{2\alpha}$'ya bağlı inhibisyonu için endotel hücrelerinin varlığı kritiktir. Sığır luteal hücreleri PTGFR eksprese etmektedir. Ayrıca, KL'nin (küçük ve büyük steroidogenik ve endotel hücreleri) fonksiyonel olarak önemli üç hücre tipi PTGFR'ye sahiptir (Mamluk ve ark 1999).

$PGF_{2\alpha}$' nın luteal endotelyal hücrelere etkisi

KL'nin optimal formasyonu, gelişimi ve işlevi için yeterli kan temini gereklidir. Aslında, KL gelişimine yoğun anjiyogenez eşlik eder ve bunun sonucunda ovaryum içinde ve dışında biyolojik efektörlerin ulaşımına yardım ederek kılcal damarların oluşumu ile sonuçlanır (Wulff ve ark 2000, Robinson ve ark 2009, Miyamoto ve ark 2010). Bu kılcal damarları astarlayan endotel hücreleri KL içindeki hücrelerin yarısını kapsamaktadır (Zheng ve ark 1993). Luteal endotel hücreler $PGF_{2\alpha}$ reseptörlerine sahiptir (Mamluk ve ark 1998) ve $PGF_{2\alpha}$ endotelyal hücreleri dejenere ederek kapillar yoğunluğun azalmasına neden olur (Paavola 1979). Endotel katmanı stratejik konumu nedeniyle sayısız fiziksel ve biyokimyasal sinyalleri bir organın içinde entegre edebilir. Endotel hücreleri, endotelin-1 (EDN1), anjiyopoietin (ANGPT) ve eNOS (NOS3) gibi vasoaktif bileşiklerin upregülasyonuyla kan akışını, kan basıncını ve oksijen gerilimindeki değişimlerini

algılamaktadır (Zheng ve ark 1993, Inagami ve ark 1995). ET-1 ve ANGII' in luteal steroidogenezi azaltarak luteolitik yolak ve vasküler regresyon için vazokatif bir faktör olabileceği öne sürülmüştür (Miyamato ve ark 2010).

$PGF_{2\alpha}$'nın endotelin-1 üzerine etkisi

Endotelyum başlıca ET-1 kaynağıdır (Kisanuki ve ark 2001) ve bu nedenle $PGF_{2\alpha}$ etkisi altında luteal hücreler ET-1'i serbest bırakır (Girsh ve ark 1996). Ayrıca, yüksek vaskülariteye sahip KL'de ET-1 üretmektedir (Girsh ve ark 1996, Goede ve ark 1998). Sığır KL'sinde ET-1 mRNA'sı 18. günde 5. ve 10. günlerine kıyasla en yüksek seviyede bulunmaktadır (Girsh ve ark 1996, Ohtani ve ark 1998). Regrese KL'de yüksek ET-1 seviyesi, $PGF_{2\alpha}$'nın ET-1 ekspresyonunu indükleyebildiğini önermektedir. Mid-siklus sırasında koyun ve düvelere $PGF_{2\alpha}$'nın luteolitik dozunun *in vivo* uygulanması, ET-1'in ekspresyonunu belirgin bir şekilde arttırmıştır (Ohtani ve ark 1998, Hinckley ve Milvae 2001). Luteolitik $PGF_{2\alpha}$ uygulamasının ardından ET-1 artışına progesteron üretiminin azalışı eşlik etmiştir (Ohtani ve ark 1998). Ayrıca, *in vitro* çalışmalarda, ET-1'in steroidogenik luteal hücrelere inhibitör etkisi gösterilmiştir (Ohtani ve ark 1998, Hinckley ve Milvae 2001).

$PGF_{2\alpha}$'nın endotelyal–immün hücrelere etkisi

Luteolizisde immün hücrelerin ve ilgili sinyal moleküllerinin (sitokinlerin) rolü olabileceği gösterilmiştir (Penny ve ark 1999). Endotel hücreleri önemli bağışıklık fonksiyonlarına sahiptir: doğal ve adaptif immüniteye aktif olarak katılmaktadırlar (Mai ve ark 2013). Transkriptom analizlerinden elde edilen gen ifadesi verileri, $PGF_{2\alpha}$ uygulamasını takiben KL'de birçok immün hücre tipinin infüzyonu ve aktivasyonunu göstermiştir (Mondal ve ark 2011, Smith ve Meidan 2014).

Luetolizis sırasında lökositler KL'ye sızmaktadır (Meidan ve ark 2000, Minegishi ve ark 2002). Spontan ve $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis sırasında regrese olan KL'de gözlenen makrofaj sayısı yaklaşık olarak eşit bulunmuştur (Penny ve ark 1999). Makrofaj gibi eozinofiller, regrese KL'de tanımlanmamış olup kemotaksik faktöre yanıt olarak serum progesteron seviyesinin azalmasından öncesinde birikirler (Murdoch 1987). Ancak,

eozinofiller $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisin meydana gelmesi için şart değildirler (Murdoch ve Steadman 1991). $PGF_{2\alpha}$ ile muamele edilen midluteal evredeki koyun KL' sinde kemoatraktan protein-1 mRNA'sı indüklenmiştir (Haworth ve ark 1998, Tsai ve Wiltbank 1998). Ayrıca, sığırlarda $PGF_{2\alpha}$-indüklenmiş luteal regresyon sırasında MCP-1 seviyesi artmıştır (Townson 2006). Makrofajlar tarafından üretilen tümör nekröz faktörü (TNF-α) bazal progesteron seviyesini inhibe eder ve $PGF_{2\alpha}$ sekreyonunu uyarır (Fairchild-Benyo ve Pate 1992). İmmün hücreler ve sitokinler $PGF_{2\alpha}$ sentezi, steroidogenez ve fagositozu düzenleyerek luteolizisde yer almaktadır.

$PGF_{2\alpha}$'nın kan damarları üzerine etkisi

Luteal regresyon, kan damarları, endotel hücre morfolojisi ve işlevinde derin ve dinamik değişiklikler meydana getirmektedir. Doğal olarak ortaya çıkan ve $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenen luteolizde progesteron konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik belirginleşmeden önce luteal kan akışında akut bir artış vardır. Önceki çalışmalar $PGF_{2\alpha}$' nın eNOS'u uyardığını göstermiştir (Shirasunave ark 2008). Bununla birlikte, bu artış geçicidir ve kısa süre sonra kan akışı $PGF_{2\alpha}$ sonrası 8 saatten itibaren azalmaktadır (Miyamoto ve ark 2005). Koyunlarda $PGF_{2\alpha}$ uygulanması, progesteron salınımının azalmasına paralel olarak KL kan akışını azaltmıştır (Niswender ve ark 1973; Nett ve ark 1976; El-Sherry ve ark 2013). Luteal vaskülatür ile ilgili diğer durum: $PGF_{2\alpha}$, anjiyogenezis regülasyonunda başlıca faktörlerin ekspresyonunu modifiye etmektedir (Neuvians ve ark 2004, Vonnahme ve ark 2006, Shirasuna ve ark 2010, Zalman ve ark 2012) ve bu faktörler yüksek oranda luteal aşamaya bağlıdır (Zalman ve ark 2012). Ayrıca, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis de lenfatik sistemin de luteolisiz de rol alabileceği gösterilmiştir (Nitta ve ark 2013, Abe ve ark 2014).

Kan damarı büyümesi ve stabilizasyonunun desteklenmesi KL'ye besin maddesi ve hormon tedariğini arttıracak, böylece KL'nin hayatta kalmasını sağlayacak ve lüteoliz için direnç kazanmasına katkıda bulunacaktır**.**

1.7.5. Yapısal Luteolizis

Progesteron miktarının azalmasının ardından $PGF_{2\alpha}$ yapısal luteolizis süresince morfolojik değişiklikleri indüklemektedir (Sugino ve Okuda 2007). $PGF_{2\alpha}$, reseptörleri vasıtasıyla büyük luteal hücreler üzerine etki eder ve PKC'yı aktive eden oksitosin sekresyonunu stimule eder ve böylece küçük luteal hücrelerde steroidogenezi baskılar. PGF2α büyük luteal hücrelerde COX-2'yi artırarak luteal $PGF_{2\alpha}$ sekresyonunu artırır. Luteal $PGF_{2\alpha}$ apoptotik hücre ölümüne neden olan sinyal yolaklarını aktive eder (Sawyer ve ark 1990, Juengel ve ark 1993, Zheng ve ark 1994).

Ekstraselüler matriksin yeniden (ECM) düzenlenmesi ve morfolojik değişiklikler

Ovaryumun uygun büyüklüğünü sürdürebilmesi için yapısal regresyondan sonra dokunun yoğun olarak yeniden biçimlenmesine ihtiyaç duymaktadır. Bazı türlerde, luteoliz sırasında gen ekspresyon uyarımı ve matriks degrade edici proteinlerin aktivitesi ortaya çıkarılmıştır. Matrix metalloproteazlar (MMP), inhibitörleri (Ricke ve ark 2002, Towle ve ark 2002, Goldman ve Shalev 2004, Riberio ve ark 2006, Kliem ve ark 2007) ve plazminojen etkinleştirici sistem (PA) luteolizisde artmıştır (Liu ve ark 2003). Birçok MMP ve PA üyesi, tPA saatler içinde artmıştır (Rcike ve ark 2002).

$PGF_{2\alpha}$, dikkate değer bir dizi morfolojik değişikliklere neden olmaktadır. Mid-luteal fazda KL'yi kaplayan steroidogenik luteal hücrelerin oranı $PGF_{2\alpha}$ ile muamele edilen koyunlarda 24 saat içinde azalmaktadır (Braden ve ark 1988). Steroidogenik luteal hücrelerde, hücrelerin steroidogenik kapasitesi bu kadar zamana kadar belirgin bir şekilde azalmış olsa da, $PGF_{2\alpha}$'ya maruz kaldıktan 24-36 saat sonra morfolojik değişiklikler belirginleşmez (Sawyer ve ark 1990).

Apoptozis

Birçok çalışma, programlı hücre ölümünün (apoptoz) yapısal luteoliz sırasında meydana geldiğini göstermiştir. Sığırlarda, DNA yıkımlanması, doğal olarak regrese olan KL'de ve ayrıca $PGF_{2\alpha}$ verilmesinden 24 ve 48 saat sonra gözlemlenmiştir (Jeungel ve ark 1993). $PGF_{2\alpha}$ ineklerde (Davies ve Rueda 2002, Yadav ve ark 2002; Hou ve ark 2008), koyunlarda (Romero ve ark 2013), domuzlarda (Diaz ve ark 2013), rodentlerde

(Carambula ve ark 2002, Slot ve ark 2006) ve primatlarda (Yadav ve ark 2005, Peluffo ve ark 2009) hücre sağ kalımı ve apoptozis ile ilişkili bir çok proteini düzenlemektedir. KL' deki apoptozis hem ekstrinsik (ölüm ligandı) hem de intrinsik (mitokondriyal) yolaklarla başlatılır. $PGF_{2\alpha}$ uygulamasından kısa bir süre sonra (30 dakika ila 12 saat arasında başlayarak) Fas ligandı, Fas, tümör nekroz faktörü-α (TNFA), TNFARI, interferon-gama ve ekstrinsik yolağının pek çok faktörü belirgin şekilde upregule olmaktadır. (Taniguchi ve ark 2002, Przygrodzka ve ark 2015). Koyunlarda luteolizisin meydana geldiği siklik 16. günde Bcl-2 ve Bcl-XL protein seviyesi artarken Bax ve Bad seviyesi ise gebelik 16. günde artmıştır (Lee ve ark 2016). Ayrıca, intrinsik yolağın tümör protein 53 (p53), Bax ve Bcl-XL faktörleri çoğunlukla $PGF_{2\alpha}$'dan 24-48 saat sonra upregüle olmaktadır (Kliem ve ark 2009, Przygrodzka ve ark 2015).

Kaspazlar, apoptozun önemli mediatörleridir. Kaspaz-3, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması için gereklidir. Ayrıca, kaspaz-3, ekstrinsik ve intrinsik yolaktaki apoptotik hücrelerde aktive edilmiş bir proteazdır (Parish ve ark 2013). Kaspaz-3 rat (Yang ve ark 2015), at siklik korpora luteası (Ferreia-Dias ve ark 2007), sığır (Skarzynski ve ark 2005, Aboelenain ve ark 2015) ve koyunlarda (Rueda ve ark 1999, Lee ve ark 2016) luteoliz sırasında aktive olmaktadır. Pro-ve anti-apoptotik sağ kalım faktörleri (Lee ve ark 2016) arasındaki denge $PGF_{2\alpha}$' ya maruz kalan KL' nin kaderini belirlemektedir. Son zamanlarda, kaspazdan bağımsız programlı nekrozisin KL regresyonunda önemli rol oynayabileceği gösterilmiştir; programlı ölüm mekanizmasının parçası olan reseptör interaksiyon protein kinaz 1 ve 3 (RIPK1-3) ekspresyonunun spontan ve $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş regresyon süresince arttığı bildirilmiştir (Hojo ve ark 2016).

Ayrıca, otofajinin de KL regresyonundan rol alabileceği gösterilmiştir (Choi ve ark 2011, 2014). Sığır KL'sinde otofaji ilişkili LC3α, LC3β, Atg3 ve Atg7 genlerinin ve LC3-II proteinin ekspresyonu regresyon süresince artmıştır (Aboelenain ve ark 2015).

1.8. Hipotez ve Amaç

LXR'lerin karaciğer ve diğer organlardaki rolü açıklanmış olsa da üreme sisteminde nasıl bir rol aldığı kesinliğe kavuşmamıştır ve bu konuda sınırlı veri bulunmaktadır. LXR'nin foliküler maturasyon sürecinin bütün aşamalarında eksprese olduğu bildirilmiştir (Mouzat ve ark 2009). Ayrıca, insan luteinize granuloza hücrelerinde yapılan çalışmada, LXR agonist ile uyarım sonucunda progesteron üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Buna paralel olarak steroidogenezde yer alan StAR, P450scc ile 3βHSD gibi steroidogenik enzimlerin ekspresyon seviyesinin azaldığı ve steroidogenez prekürsörü olan kolesterolün efluxunun arttığı bulunmuştur (Drouineaud ve ark 2007). Primatlarda yapılan bir çalışmada ise Drouinead ve ark'nın (2007) bulgularını doğrular şekilde; kolesterol alımının azalarak, efluksun arttığı kanıtlanmıştır (Bogan ve ark 2012). Son olarak, koyunlarda da spontan $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenmiş luteolizis sırasında kolesterol alımınının azalarak kolesterol efluxun arttığı gösterilmiştir (Seto ve Bogan 2015). Ancak, başka bir çalışmada ise $PGF_{2\alpha}$' nın LXR agonistini antagonize ettiği ve ABCA1 promotör aktivitesinin yanı sıra ABCA1 transkripsiyonunu baskıladığı bildirilmiştir (Zhuang ve ark 2013). Son olarak Horihata ve ark (2016) kolesterol efluks transportırlarının doğrudan luteolizisde rol alamayacağını ifade etmişlerdir.

KL regresyonu sürecinde meydana gelen luteolizis sırasında progesteronun azalmasına sebep olarak kolesterol homoestazisinin fizyolojik olarak düzenlenmesi sebep olarak gösterilmektedir. Bu öngörüler doğrultusunda, in vivo şartlarda doğal ve $PGF_{2\alpha}$ ile mimiklenen lüteolizis modelinde LXR aracılı olarak luteal hücrelerde kolesterolün uzaklaştırılmasının lutelolizis mekanizmasındaki rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, luteal kolesterol homeostazisine katkıda bulunan steroidogenez yolağı (StAR, 3βHSD ve P450scc) ve kolesterol alım reseptörlerinin (SR-BI ve LDLR) etkisini belirleyerek, doğal ve indüklenmiş luteolizisde LXR yolağının (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, APOE ve APOA1) olası rolü değerlendirerek luteolizis/regresyonda alternatif yolaklarının belirlenmesine katkı sağlamaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Deneysel Model ve Dokuların Toplanması

2.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada veteriner hekim kontrolünden geçmiş, sağlık sorunu olmayan, 2-5 yaşında, en az bir doğum yapmış, kilo ve vücut kondisyon skorları birbirine yakın olan, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiş 36 adet Anadolu Merinosu koyun kullanılmıştır.

2.1.2. Barındırma ve Beslenme

Koyunlar üreme sezonu içerisinde (Ağustos-Eylül) Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü çiftliğinde bulunan yarı açık ağıllarda barındırıldı. Koyunlar günlük ihtiyaçlarını karşılayan rasyonlar ile rutin besleme şartlarına tabi tutuldu.

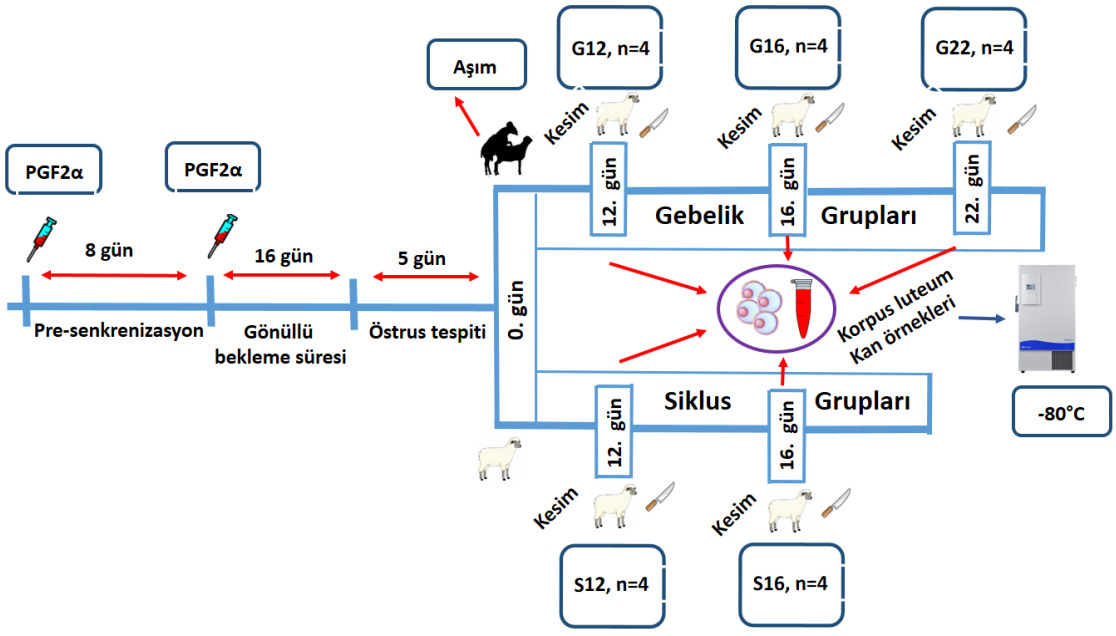
2.1.3. Hayvanların senkronizasyonu

Birinci araştırmada, koyunlara 11 gün ara ile iki kez $PGF_{2\alpha}$ (125 mcg d-kloprostenol, Minoprost, Provet, Türkiye) enjeksiyonu ile presenkronizasyon uygulandı. İkinci $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu sonrası östrüs tespiti yapıldı. Östrüstan sonra 16. günden itibaren 5 gün boyunca arama koçları ile yeniden östrus gösteren koyunlar tespit edildi. Gebelik grubunda yer alan koyunlar östrus sonrası ilk doğal östrusta fertil koçlarla çiftleştirildi.

İkinci araştırmadaki koyunlara intravaginal yolla progesteron emdirilmiş silikon (Eazi-Breed, 0,33 g progesteron, CIDR, ABD) 8 gün süreyle uygulandı. CIDR çıkarılmadan 24 saat önce superovulasyon amacı ile 1000 IU dozunda PMSG (Folligon, MSD Animal Health, 1000 IU) yapıldı. CIDR çıkarılırken tüm hayvanlara tek doz kas içi $PGF_{2\alpha}$ (125 mcg, PGS, Alke, Türkiye) enjeksiyonu yapıldı ve östrüs tespitine başlandı. Ovulasyonu uyarmak amacı ile CIDR çıkarıldıktan 50 saat sonra koryonik gonadotropin (Chorulon, MSD Animal Health, 1500 IU, Hollanda) 1500 IU dozunda uygulandı. Östrüs tespiti amacı ile arama koçu kullanılarak takip eden östrüs 0. gün olarak kabul edildi.

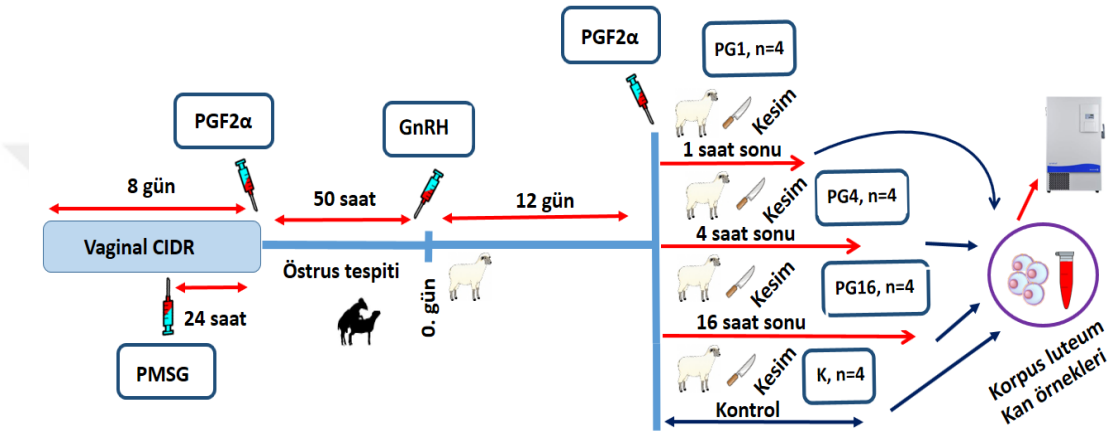
2.1.4. Gruplandırma ve senkronizasyon

Çalışma için 2 araştırma yapılması planlandı. Birinci araştırma Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Bu amaç için birinci araştırmadaki KL dokuları, TUBİTAK-214O643 numaralı ve "Koyunlarda peri-implantasyon döneminde gebeliğe ilişkin miRNA markırlarının araştırılması" başlıklı çalışması kapsamında 29.01.2016-47 etik kurul başvurusundan özel izinle alındı. Koyunlar Siklus (S) ve Gebe (G) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her grupta 4 baş koyun olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Buna göre Siklus grubundaki koyunlar presenkronizasyonu takiben belirlenen östrustan sonraki ilk doğal östrusta arama koçu ile tespit edilerek 0. gün olarak kabul edilmiş ve takip eden siklik 12. gün (S12, n=4) ve 16. gün (S16, n=4) olarak çalışmaya dâhil edilerek çalışmada mid-luteal ve doğal luteolizis günleri temin edildi. Aynı şekilde, gebelik gruplarına dâhil edilen koyunlarda presenkronizasyonu takiben belirlenen östrüstan sonraki ilk doğal östrüsta fertil olduğu bilinen ergin koçlarla elde aşım yöntemiyle çiftleştirilerek, çiftleşme günü 0. gün olarak kabul edildi ve takip eden gebelik 12. gün (G12, n=4), 16. gün (G16, n=4) ve gebelik 22. gün (G22, n=4) olarak çalışmaya dahil edildi (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Birinci araştırma çalışma grupları.

İkinci araştırmada, ilk doğal östrus arama koçu ile tespit edilerek 0. gün olarak kabul edildi ve siklusun 12. gününde koyunlara $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu uygulandı ve 1 saat (PG1, n=4), 4 saat (PG4, n=4) ve 16 saat (PG16, n=4) sonra kesim yapılarak KL dokuları toplandı. $PGF_{2\alpha}$ uygulanmayan bir grup kontrol (K, n=4) olarak kullanıldı (Şekil 2.2.).

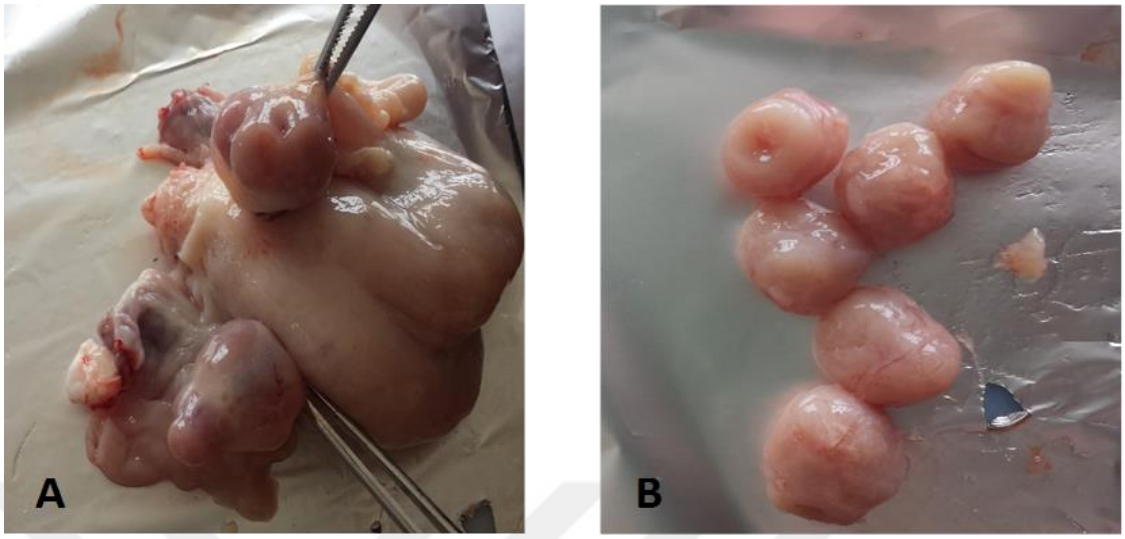


Şekil 2.2. İkinci araştırma çalışma grupları.

2.1.5. Örneklerin Toplanması

Birinci araştırmada koyunlar belirtilen günlerde enstitü mezbahasında kesilerek 15-20 dakika içerisinde ovaryum, ovidukt, uterus, serviks, vagina bağlantılarından ayrıldı ve ovaryumlarda KL'ler tespit edilerek, uygun şekilde disekte edildi (Şekil 2.3.). Cryo-tüplere doku örnekleri toplandı ve sıvı azot içerisinde dondurulup -80 ºC'de muhafaza edildi.

İkinci araştırmada koyunlar siklusun 12. gününde $PGF_{2\alpha}$ uygulamalarını takiben kesildi ve yukarıda belirtilen şekilde KL dokuları toplandı (Şekil 2.3.). Kan örnekleri +4ºC'de 10 dakika 4000 g'de iki kez santrifüj edilmiş ve plazma örnekleri otomatik pipet yardımıyla eppondorf tüplere aktarılarak -20 ºC'de saklandı.



Şekil 2.3. KL dokusunun ovaryum bağlantılarından diseke edilerek toplanması, A: Uterus ve ovaryum bağlantıları, B: KL dokuları.

2.2. Kantitatif Real Time PZR (qPZR)

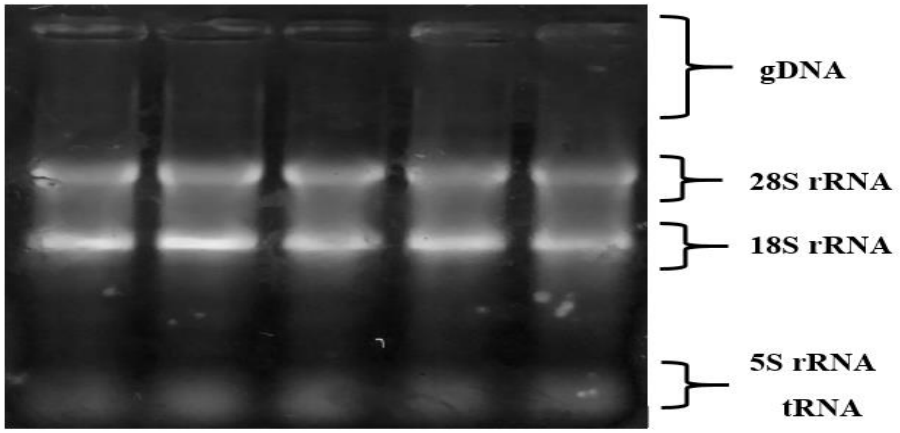
2.2.1. Total RNA İzolasyonu

Toplam 50 mg KL örneği bistürü ile parçalanarak, 1 ml TRIzol (ThermoFisher Scientific, TRIzol® Reagent, ABD) içerisinde mekanik homojenizator (Heidolph homogenizers, SilentCrusher, Almanya) yardımı ile homojenize edildi. Ependorf tüpe alınan 1000 µl süspansiyon üzerine 200 µl kloroform eklenerek vorteksle karıştırıldı. Oda ısısında 8-10 dakika bekletilen örnekler +4˚C soğutmalı santrifüjde (Hettich 320/320R, Almanya) 13000 g hızda 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısım başka bir ependorf tüpe fazlar bozulmadan ayrıldı. 350-400 µl süpernatant üzerine 500 µl isopropanol eklenerek, karışım alt üst edilerek karıştırıldıktan sonra 10 dakika oda ısısında bekletildi, daha sonra soğutmalı santrifüjde 13000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek RNA peleti dipte çöktürüldü. Süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 3 defa (sırası ile %70, %70 ve %95) soğuk etanol ile yıkama işlemi, +4˚C'de 7500g hızda 5'er dakika yapıldı. RNA peleti yeterince kurutulduktan sonra 50-100 µl steril DEPC-ddH_2O (dietil-pirokarbonatlı çift distile su) içerisinde çözdürüldü.

2.2.2. RNA Kalitesi ve Miktarının Belirlenmesi

Total RNA örneklerinin miktarı ve kalitesi Colibri Microvolume (Titertek-Berthold, Almanya) spektrofotometre kullanılarak belirlendi. Fenol, protein ve genomik (g) DNA kontaminasyonlarını belirlemek için A260/A280 ve A260/A230 oranları değerlendirildi. Oranları A260/A280 için 2±0,1 ve A260/A230 için 1,8-2,2 arasında olan RNA örnekleri cDNA (complementary DNA) yapımında kullanıldı.

RNA örneklerinin kalitesinin belirlenmesi amacıyla 1µg/10µl konsantrasyonundaki RNA üzerine 6X yükleme boyasından 2µl konularak %1'lik agaroz jel elektroforez sonrası Ethidium Bromür (EtBr) ile boyanan RNA bantlarının kalitesi UV-translüminatör görüntüleme sisteminde kontrol edildi. RNA jelinde 28S ve 18S rRNA (ribozomal ribonükleik asit) moleküler ağırlığa sahip RNA bantları ve yükleme kuyucuklarında gDNA (genomik DNA) varlığı gözlendi (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Temsili RNA agaroz jel görüntüsü.

2.2.3. Genomik DNA'nın Uzaklaştırılması

Spektrofotometrik ölçümleri yapılan RNA'ların konsantrasyonları 1 µg/10µl olacak şekilde DEPC-ddH_2O kullanılarak eşitlendi. Olası gDNA kontaminasyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla DNAse-I enzim reaksiyonu üretici firmanın (Thermo Scientific, DNase, RNase-Free, K2981) protokolüne göre uygulandı. Bu protokole göre 1 µg/20 µl total RNA üzerine 1 µl DNAse-I reaksiyon karışımı ve 1 µl DNAse-I enzimi

konularak +37˚C'de 30 dakika bekletildi. Enzimatik reaksiyon durdurulması için 1 µl EDTA ilavesi ile +65˚C'de 10 dakika inkübe edildi.

2.2.4. Reverz Transkripsiyon (RT) Reaksiyonu

gDNA'nın uzaklaştırılmasının ardından 1 µg/10 µl total RNA'dan tek zincir cDNA üretimi (Thermo Scientific, RevertAid Transcriptase, K1622, ABD) ticari kit kullanılarak gerçekleştirdi. Buna göre 1 µl OligodT ve 1 µl Random hekzamer 1 µg/ 10 µl total RNA üzerine ilave edildi. Thermal Cycler (Bio-Rad MyCycler PCR, ABD) kullanarak +70°C'de 5 dakika bekletildikten sonra 4 µl 5X cDNA reaksiyon karışımı, 1 µl RNAse inhibitörü, 2 µl dNTP ilave edilerek +25°C thermal cycler'da 5 dakika bekletildi. Daha sonra 1 µl revers transkriptaz enzimi ilave edilerek önce +25°C'de 10 dakika sonra +37°C'de 60 dakika thermal cycler'da inkübe edildi. Son olarak, reaksiyon +70°C 10 dakika bekletilerek sonlandırıldı.

2.2.5. Primer Dizaynı

Çalışmada kullanılan genlerin mRNA dizi bilgileri Gen Bankası (http://www. ncbi. nlm. nih. gov) üzerinden elde edildi. İlgili genin mRNA sekansları IDT (http://eu. idtdna. com/home/home. aspx) programı ile dizayn edildi (Çizelge 2.1.). Primer dizaynı için Wang ve Seed'in (2007) belirlediği kriterler göz önüne alındı. Primerlerin sekans bilgileri ve çoğaltılacak bölge Gen Bankasındaki BLAST programı ile kontrol edildi.

Çizelge 2.1. Primerlerin gen isimleri, simgeleri, dizileri ve ürün boyutları (bç).

Gen İsmi	Simgesi	Primer Dizisi	bç
Steroidogenic acute regulatory protein	StAR-F	GGACGAGGTGCTGAGTAAAG	105
	StAR-R	CGCTCCACAAGCTCTTCATA	
Hydroxy-delta-5-steroiddehydrogenase, 3 beta-and steroid delta-isomerase 1	3βHSD -F	AATCCGGGTGCTAGACAAAG	106
	3βHSD -R	CTCATCCAGAATGTCTCCTTCC	
Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1	P450scc-F	GATGGCTCCAGAGGCAATAA	91
	P450scc-R	CTGCTTGATGCGCTTGTG	
Low-density lipoprotein receptor	LDLR-F	CCGAAGTTCGTCTGTGACTTG	115
	LDLR-R	GGATGCACATGGAGCTGTT	
Scavenger receptor class B, member 1	SR-BI-F	CCGTGCTGGGCATTATCA	101
	SR-BI -R	CATGTTGAAAGACAGGCTGTTG	
Liver X Receptor Alpha	LXRα-F	ACCAGCTCCAGGTAGAGAG	103
	LXRα-R	AGCATCCTTGGGAACATCAG	
Liver X Receptor Beta	LXRβ-F	TTCTTCCGCCGAAGTGTG	132
	LXRβ-R	CCCTGCCTCCTTGCATTT	
ATP Binding Cassette Subfamily A Member 1	ABCA1-F	GGATGGATGGTAAAGGTTCCTAC	133
	ABCA1-R	GGCAGGACAATCTGAGCAA	
ATP-binding cassette sub-family G member 1	ABCG1-F	TGGGAACGAAGCCAAGAAG	112
	ABCG1-R	CATCTCCAGAGGAAATGTGAGG	
Apolipoprotein E	APOE-F	GGCTTTCTCTTGCTCCTT	113
	APOE-R	ACATGGATTTGATTGACA	
Apolipoprotein A1	ApoA-I-F	GCTGGCCATTGAGGTCACCCAC	103
	ApoA-I-R	GCTGCCAGAAATGCCGAGCCT	

Proto-oncogene c-Fos	c-FOS-F	CCCGGGAATACATCTACATGC	168
	c-FOS-R	GCTCGCAGTCATACTTGACCC	

2.2.6. Primer Sulandırılması

Liyofilize primerler 3000 g hızında 3'er dakika santrifüj edildi ve 50 pMol/ µl konsantrasyonunda olacak şekilde nükleaz-free su içerisinde çözdürüldü. Her bir genin forward ve reverz primerinden alt stoklar hazırlanarak -20°C'de muhafaza edildi.

2.2.7. Housekeeping Gen Seçimi

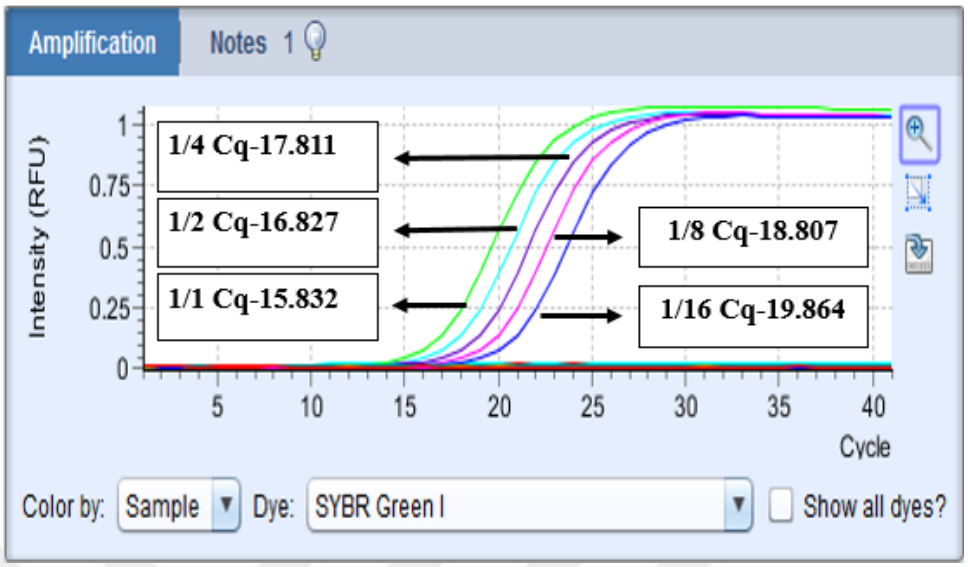
KL dokusu housekeeping gen (HKG) seçimi için kullanılacak olan primerlerin RPL32 (ribozomal protein L32), SDHA (süksinat dehidrogenaz subünit A) ve YWHAZ (tirozin 3-monooksijenaz/triptofan 5-monooksijenaz aktivasyon protein), GAPDH (gliseraldehid fosfat dehidrogenaz), dizileri gen bankası üzerinden alındı (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Primer dizileri ve ürün boyutları (bç).

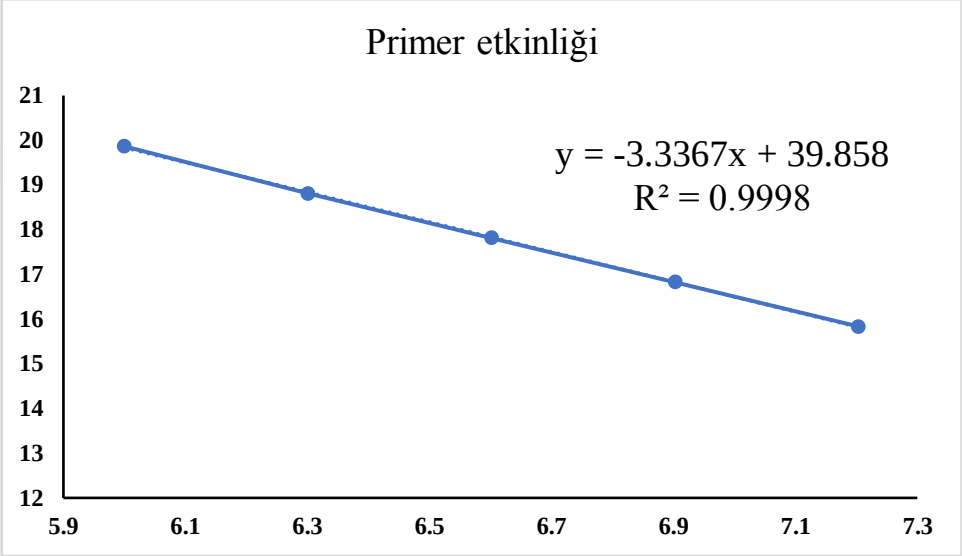
	Primer Dizisi	**bç**
RPL32-F	GGCACCAGTCAGACCGATATG	75
RPL32-R	TGCGCACCCTATTGTCAATG	
SDHA-F	CATCCACTACATGACGGAGCA	90
SDHA-R	ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	
YWHAZ-F	TGTAGGAGCCCGTAGGTCATCT	102
YWHAZ-R	TTCTCTCTGTATTCTCGAGCCATCT	
GAPDH-F	TCCATGACCACTTTGGCATCGT	80
GAPDH-R	GTCTTCTGGGTGGCAGTGA	

2.2.8. Primer Dilüsyonları ile Primer Etkinliğinin Belirlenmesi

KL örneklerinden cDNA'dan havuz oluşturularak 1/1, 1/2, 1/4, 1/8 ve 1/16 dilusyonlarında sulandırıldı. Her primer için RT-qPZR (Roche, The LightCycler® Nano Instrument, Almanya) yapıldı (Şekil 2.5.). Dilüsyonların Cycle-Logaritmik konsantrasyon okuma değerleri grafiği çizilerek, gözlenen noktaların lineer bir doğru oluşturmaya en çok yaklaştığı bölgedeki beşerli noktalardan grup oluşturuldu. Grafikteki noktalara eşit uzaklıkta bulunan doğru denklemlerinden eğimleri bulundu ve $10^{-(1/Eğim)}$ formülü ile primer etkinliği (primer efficiency) değerleri hesaplandı (Şekil 2.6.).



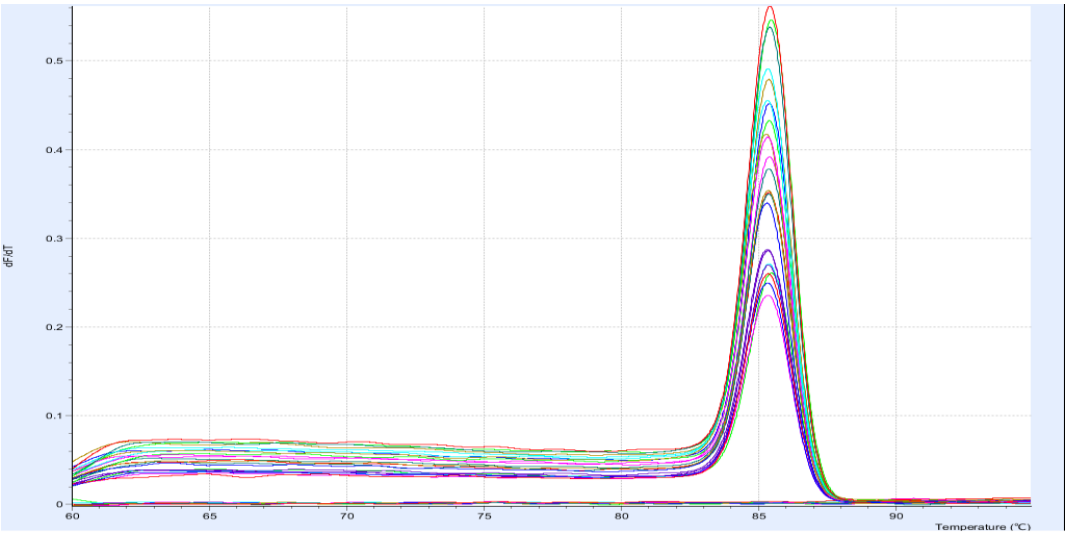
Şekil 2.5. Temsili primer dilüsyonu ve Cq (cycle threshold) grafiği.



Şekil 2.6. Temsili primer etkinliği grafiği ve denklemi.

2.2.9. Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPZR)

cDNA'lardan ilgili gen primerleri kullanılarak araştırılacak genler RT-qPZR'da (Roche, The LightCycler® Nano Instrument, Almanta) çoğaltıldı. Doğal ve indüklenmiş luteolizis grupları ve gebe dönemdeki gen anlatımı farklılıklarının belirlenmesi amaçlandı. İnterkalasyon ajan olarak çift iplikçikli DNA' ya bağlanabilen SyberGreen kullanıldı. Reaksiyon SyberGreen içeren 2X olan master miksten (BioRad, iTaq™ universal SYBR® Green, ABD) 1X olacak şekilde; 5 µl miks, 5 pMol forward primer, 5 pMol reverz primer, 2 µl cDNA ve toplam hacim 10µl olacak şekilde steril DEPC-dH_2O ile tamamlandı. Reaksiyon steril 8'li RT-qPZR stripleri içinde gerçekleştirildi. Reaksiyonun ısı profili +95°C'de 5 dakika, 45 döngü (95° C'de 15 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye) olacak şekilde ayarlandı. Optik ölçümler her siklusun 60°C'deki bağlanma ısısının hemen bitiminde, uzama safhasında cihaz tarafından otomatik olarak yapıldı. Daha sonra 60°C'den 95°C'ye kadar saniyede 0,1°C olacak şekilde kademeli olarak ısıtıldı ve bu ısılar içerisindeki her 1°C artışta optik ölçümler yapılarak erime eğrisi (melting curve) analizi gerçekleştirildi (Şekil 2.7.). RT-qPZR'de optik analiz sonucu elde edilen veriler Cq olarak kayıt edildi. Negatif kontrol olarak cDNA yerine aynı miktarda ddH_2O içeren miks kullanıldı.



Şekil 2.7. Temsili erime eğrisi grafiği.

2.3. Western Blot Analizi

2.3.1. Protein İzolasyonu

Western blot çalışması için kullanılacak proteinler, KL dokularından lizis tamponu ticari kit (Fermentas, ProteoJET^{TM} Mammalian Cell Lysis Reagent, #K0301, ABD) kullanılarak izole edildi (Çizelge 2.3.). Protein izolasyonları yapılacak olan KL örnekleri buz üzerine alındı ve aşağıdaki verildiği gibi izolasyon karışım hazırlandı.

Çizelge 2.3. Protein izolasyon karışımı

Solüsyon	**Miktar**
Mammalian Cell Lysis Reagent (1X)	1,0 mL
Protease Inhibitor Cocktail	1,0 µL
Toplam hacim	**1,001 mL**

KL dokuları 2 ml soğuk PBS solüsyonu eklenerek yıkandı. Daha sonra, dokular mekanik olarak lizis çözeltisi ile birlikte homojenizatör (Heidolph homogenizers, SilentCrusher, Almanya) yardımı ile küçük parçalara ayrıldı. 4000 x g'de 15 dakika +4ºC santrifüj işlemleri gerçekleştirilip süpernatant yeni bir eppendorf içine aktarıldı. Daha sonra tekrar 4000 x g'de 15 dakika +4ºC santrifüj işlemleri gerçekleştirilip, süpernatant ayrı bir tüpe aktarılarak -80ºC'de muhafaza edildi.

2.3.2. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

SDS-PAGE analizlerinde kullanılacak olan jeller 10x10 cm'lik cam kalıpları kullanılarak hazırlanmıştır. Separating (ayırma) ve stacking (yükleme) olmak üzere iki ayrı jel karışımı hazırlandı. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yüzdeleri ayarlanan ayırma jeli için protokoller aşağıdaki gibidir (Çizelge 2.4- 2.5).

Çizelge 2.4. Seperating jel solüsyon ve miktarları.

Solüsyon	**Akrilamidin farklı jel yüzdeleri için miktarlar (ml)**		
	%10	%12	%13
H2O	6.25	5.25	4.75
%30'luk akrilamid solüsyonu/ %0.8'lik bisakrilamid	5.00	6.00	6.50
Tris-Cl/SDS (4x) ph: 8,8	3.75	3.75	3.75
%10 Amonyum persülfat	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.01	0.01	0.01

Separating (Ayırma) Jeli

Çizelge 2.5. Stacking jel solüsyon ve miktarları.

Solüsyon	%4'lük akrilamid jeli için miktarlar (ml)
H2O	3.05
%30'luk akrilamid solüsyonu/ %0.8'lik bisakrilamid	0.65
Tris-Cl/SDS (4x) ph: 6,8	1.25
%10 Amonyum persülfat	0.025
TEMED	0.005

Stacking (Yükleme) Jeli

Ayırıcı jel bileşenleri TEMED (Sigma-Aldirch, T9281, Almanya) ve APS (MP Biomedicals, 02193988, ABD) hariç sırasıyla 10 ml'lik tüplere eklendi ve karıştırıcıda 2 dakika beklemeye bırakıldı. TEMED ve APS akrilamid ve bis-acrilamid arasında polimerizasyonu başlattığı için jel dökülmeden hemen önce eklenerek jel kasetinin ¾'lük kısmına hızlı bir şekilde döküldü. Ardından üst kısımda oluşan hava kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla bir miktar butanol eklendi. 15 dakika beklendi ve sonrasında kurutma kağıdı ile üst kısımdaki alkol geri alındı. Daha sonra yürütme jeline yine aynı şekilde TEMED ve APS hariç sırasıyla eklendi. TEMED ve APS de eklenerek jel karışımı kasetin üst kısmında kalan ¼'lük bölüme döküldü. Kasete taraklar takılarak kuyucukların oluşması sağlandı.

2.3.3. SDS-PAGE Elektroforezi

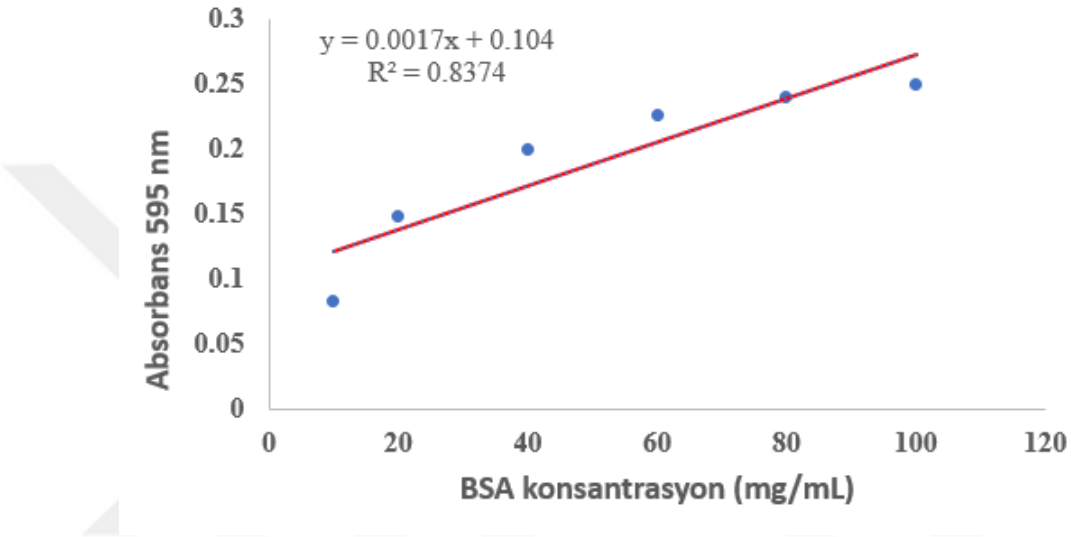
Yükleme tamponu olan 2x lammeli tamponu aşağıdaki gibi hazırlandı ve herbir örnek ile birlikte eşit hacimde kullanıldı (Çizelge 2.6.).

Çizelge 2.6. Laemmli tamponu karışım ve miktarları.

Madde	**Miktar (ml)**
0,5 M Tris-HCl (ph: 6,8)	4,4
Gliserol	4,4
%20 SDS	2,2
%1 Bromophenol Blue	0,5
2-mercapto-etanol	0,5

Karışım vortekslendi ve -20^{o}C'de muhafaza edildi. Her gruptan izole edilen proteinler sepektrofometre (Eppendorf BioPhotometer Spectrophotometer, Almanya) cihazında konsantrasyonları ölçüldü. Daha sonra BSA dilüsyonları kullanılarak hazırlanan standarda göre örneklerin konsantrasyon miktarları eşitlendi (Şekil 2.8.). Her protein örneğine eşit miktarda laemmli buffer eklendi ve vorteks yapıldıktan sonra 5 dakika 65^{o}C'de inkübe edildi.

Herbir KL örneğinden 25 µg total protein %4-12 gradiyant SDS-PAGE mini jeline yüklendi ve 80 V'de 30 dakika ve 120 V' de 1 saat yürütüldü. Kullanılan elektroforez tamponu şu şekilde hazırlandı (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 1 gr SDS ve 1 litreye tamamlamak için dH_2O ilave edildi. Protein marker olarak 5 ul Color protein standardı (New England, BioLabs, #P7712S, ABD) kullanıldı.



Şekil 2.8. BSA dilüsyon ve absorbans grafiği.

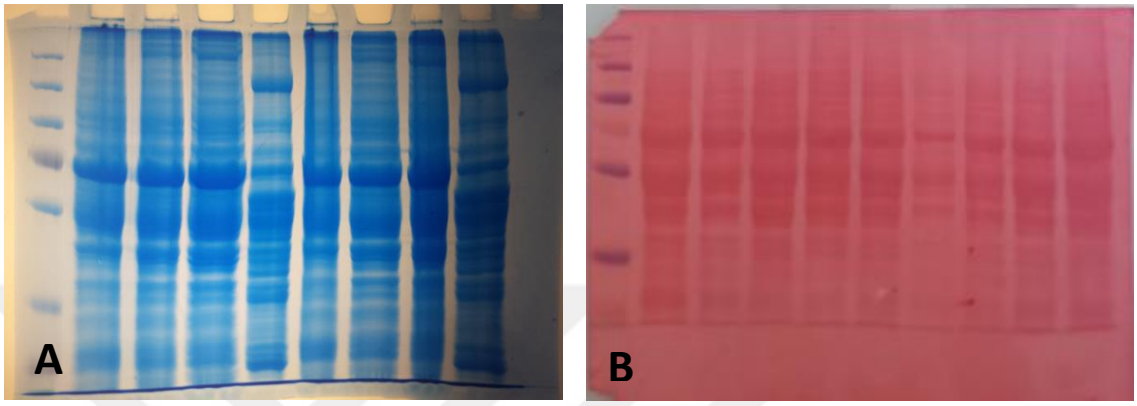
2.3.4. SDS-PAGE Jel Boyaması

SDS-PAGE cam kalıplarından çıkarılarak dH_2O içinde 10 dk süre ile yıkandı ve 1x Coomassie Brilliant Blue (%50 metanol, %10 glasial asetik asit, % 0.1 Coomassie Brilliant Blue R-250) solüsyonunda 2 saat boyunca boyanmaya bırakıldı. Jel dH_2O' da 10 dakika yıkandı ve ardından yıkama solüsyonunda (metanol-glasiyal asetik asit-dH_2O 4:1:5) boya uzaklaşıncaya kadar yıkama yapıldı (Şekil 2.9.)

2.3.5. Protein Transferi ve Bloklama

Cam kalıplar arasından çıkarılan jel Trans-Blot^{R} Turbo^{TM} Transfer sistemi (Bio-Rad Laboratories, Inc., #170-4155, ABD) kullanılarak 1,0 A elektrik akımı, 25 volt'da 30 dk süresince transfer tamponunda (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 4 ml %10'luk SDS 1 litre içinde) PVDF membrana (BioRad, Immun-Blot®, #1620177, ABD) protein transferi gerçekleştirildi (Şekil 2.9.). PVDF membranı 1x TBS-T (10xTBS: 30 g Tris, 88 gr NaCl,

1 ml Tween-20, 950 ml dH_2O, PH 7,6) solüsyonunda 3 kez 10'er dakika yıkandıktan sonra %5'lik yağsız süt (BioRad, Non Fat Dry Milk, ABD) solüsyonunda (5 gr yağsız süt tozu, 50 ml TBS-T) solüsyonu içinde 55 rpm ajitasyonda yaklaşık 2 saat boyunca bloklandı.



Şekil 2.9. A) SDS-PAGE jelde KL örneklerinin yürütülmesi, B) Protein transferi ardından, membranın Ponceau-S ile boyanması.

2.3.6. Protein İmmünoblotlama

Birincil antikorlar (Anti-LXR beta [Abcam, 28479], Anti-LXR alfa [Abcam, 176323], ABC1 [Santacruz-58219], Anti-ABCG1 [LSBio, C313008] ve housekeeping antikoru (β-Actin, [Santacruz, 1615] son konsantrasyonu 1:1000 (1 ug/ml) ve ikincil antikorlar donkey anti-rabbit IgG (Abcam-6802) 1:10000 (0,1 ug/ml) ve goat anti-mouse IgG (Santacruz -2005) 1:10000 (0,04 ug/ml) oranında bloklama solüsyonunda (%5'lik yağsız sütte) sulandırıldı.

PVDF membranı 1x TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkandı ve 1 ug/ml birincil antikor solüsyonunda 50 rpm ajitasyonda gece boyunca +4ºC'de inkübasyona bırakıldı. Diğer gün birincil antikor solüsyonu uzaklaştırılarak membran 3 kez 10'ar dakika TBS-T ile yıkandı. 0,1 ug/ml konsantrasyonlu ikincil antikor solüsyonu içinde 2 saat boyunca 50 rpm ajitasyonda ve oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

2.3.7. İmmünodeteksiyon

Hedef proteinin saptanması için BioRad Clarity Western Blot Substrat kemilüminesans (Peroksidaz, Luminol ensahnsır #170-5060, ABD) solüsyonu kullanıldı.

İkincil antikor solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 10'ar dakika 1x TBS-T solüsyonu içinde yıkandı ve ardından substrat solüsyonu (1.8 ml : 1.8 ml) ile ajitasyonda oda ısısında 5 dakika boyunca muamele edilerek tarama (Licor C-DiGit® Blot Scanner, ABD) cihazında görüntüsü alındı.

2.4. İn situ Hibridazyon

2.4.1. cDNA dizilerinin oluşturulması

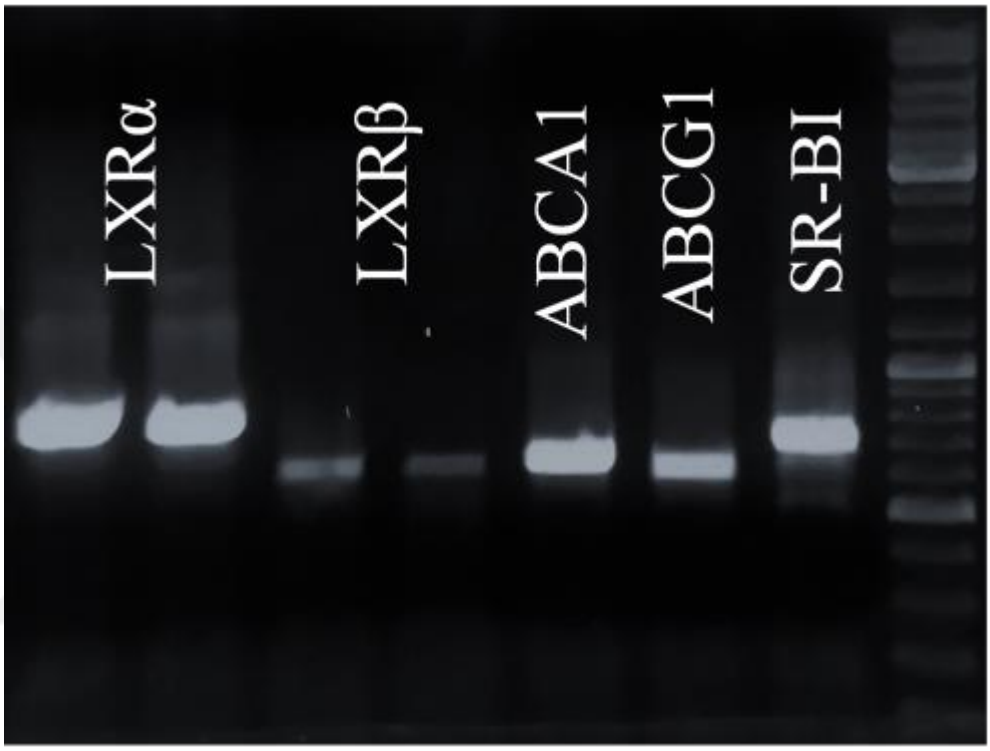
cDNA referans gen sekansı Entrez Gen (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez) ile belirlendi. cDNA sekansının 3' bölgesine PZR primerleri Primer3 programı (http://frodo.wi.mit.edu/primer3/) kullanılarak dizayn edildi. DNA sekans spesifitesi MegaBLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=10090) ile doğrulandı. RNA probunun oluşturulması için öncelikle KL RNA havuzundan yukarıdaki protokol takip edilerek cDNA sentezi yapılmıştır. Daha sonra, 50µl PZR miksi hazırlandı ve 94°C 2dk ardından, 40 siklus 94°C'de 30sn, 57°C'de 30sn, 72°C 1 dk yükseltgendi ve 72°C 10dk uzama yaparak PZR (ThermoFisher Scientific, Veriti® 96-Well Thermal Cycler, ABD) işlemi sonlandırıldı.

2.4.2. Digoksigenin-11-UTP-İşaretli RNA Prob Sentezi

PZR ürününün işaretli RNA probuna transkripsiyonu için**,** PZR ürünü agaroz jelde yürütüldü ve uygun büyüklüğe ulaşınca jelden ilgili gen ürünü jel ekstraksiyon kiti (Qiagen, QIAquick® Gel Extraction Kit, ABD) ile saflaştırıldı. Ardından ürün konsantrasyonu nanodrop (ThermoFisher Scientific, NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, ABD) ile ölçüldü.

40 µl transkripsiyon reaksiyon miksi, 400ng PZR ürünü, 1X digoksin 11-UTP (Roche, Digoxigenin-11-UTP, ABD), 1X transkripsiyon tamponu, 5U RNase inhibitörü (Roche, Protecter RNase Inhibitor, Almanya), 80U T7 RNA polimeraz (Roche, T7 RNA polimerase, ABD) ve nükleaz-free su ile yaklaşık 3-4 saat süresince her 30dk'da bir ajite edilmek üzere 37ºC'de inkube edildi.

İnkübasyonun ardından RNA probları saflaştırıldı (Qiagen, RNeasy, ABD) ve spektrofotometrik ölçüm ile konsantrasyonları 4-20 µg arasında olan problar % 1,5 non-denatüre agaroz jelde tespit edildi (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. İlgili RNA problarının jel görüntüsü

2.4.3. Mikrotom Bıçağının Hazırlanması

Agaroz (Sigma-Aldirch, A9539, Almanya) 62°C'de mikrodalgada çözdürüldü ve fosfat tamponlu salin (PBS) içinde % 4 düşük eriyikli agaroz çözeltisi hazırlandı. Agaroz kalıbı olarak kullanılacak polistiren halka 12 mm çapındaki kültür plakasından (Merck-Millipore, Millicell®, Almanya) çıkaraldı ve polistiren halka kalıbı hazırlandı. Halkalar her kullanımdan önce gece boyunca RNaz inhibitör (Roche, Protecter RNase Inhibitor, Almanya) solüsyonu içinde bekletildi. Pürüzsüz bir kesme yüzeyi sağlamak için, mikrotom bıçağı yüzeyi çözücülerle yıkandı (%100 konsantrasyon; eter, ksilen, kloroform, metanol ve MilliQ su) ve bıçak yapıştırıcı ile mikrotoma tutturuldu (Şekil 2.11.).



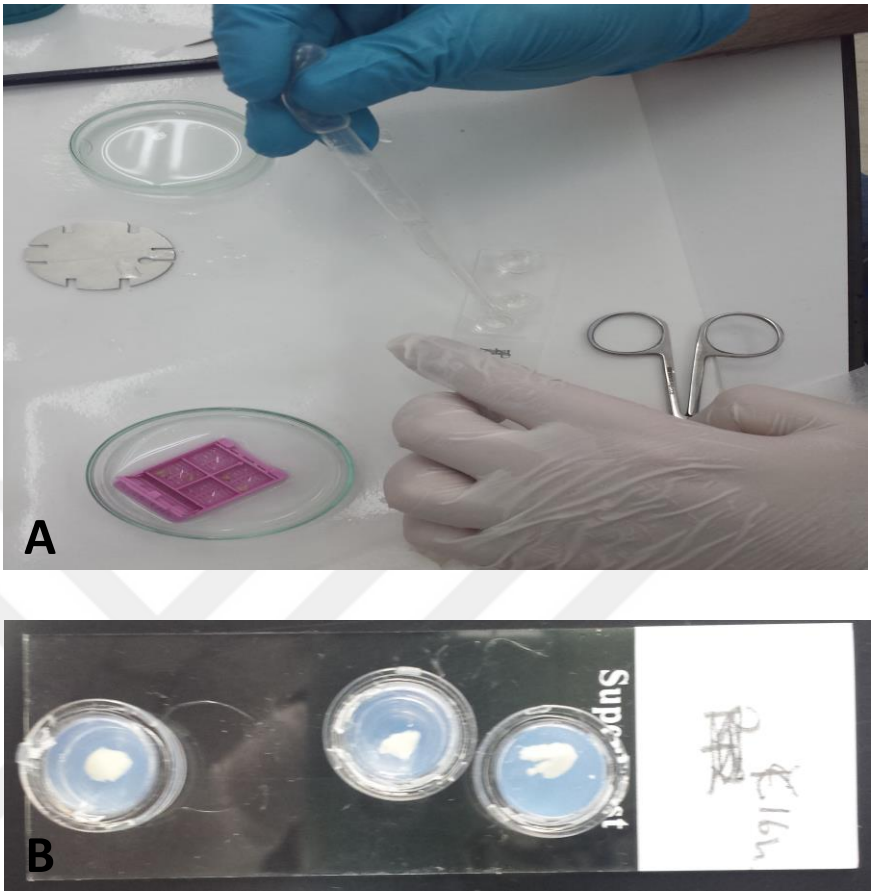
Şekil 2.11. Mikrotom bıçağı, tavla ve havuzunun hazırlanması

2.4.4. KL Dokularının Disseksiyonu ve Hazırlanması

Ovaryumdan diseke edilen KL dokuları PBS içeren %4'lük paraformaldehid (Affymetrix, 19943, ABD) fiksatif içerisinde bir gece 4°C boyunca bekletildi. KL dokuları 10 dk 25°C sıcaklıkta metanol/PBSTw (0.1% Tween™ 20 and 0.2mM sodium azid) içerisinde sıralı seri yıkamalar (1:3, 1:1, 3:1 hacim/hacim) ile dehidre edildi. Ardından dokular –20°C'de bir gece bekletildi. Dokuların kesitlenmesi için 10 dk 25°C sıcaklıkta metanol/PBSTw içerisinde sıralı seri yıkamalar (3:1, 1:1, 1:3 hacim/hacim) ile rehidre edildi.

2.4.5. KL Dokularının Agaroza Gömülmesi

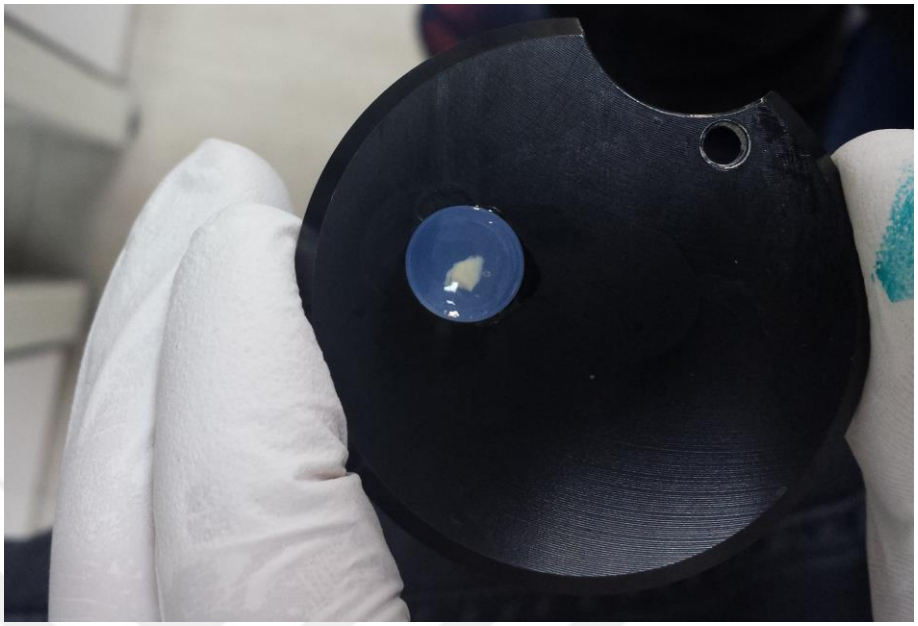
Polisistren halka kalıp düz bir mikroskop slaydı üzerine yerleştirilerek 62°C'de bekletilen agaroz ile doldurulduu ve 2 dk soğutuldu. KL dokuları PBSTw içerisinden çıkarılarak emici bir mendil ile kurulandı. Forsep yardımıyla KL dokuları agaroz içine gömüldü ve oriyantasyonu dokunun yarısı aşağıda ve yukarıda olacak şekilde ayarlandı. Ardından agaroz katılaşıncaya kadar 4°C inkube edildi (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. A; Polisistren kalıp içerisine agaroz jelin dökülmesi,
B; Agaroz jeline KL kesitinin gömülmesi

2.4.6. KL Dokularının Kesitlenmesi

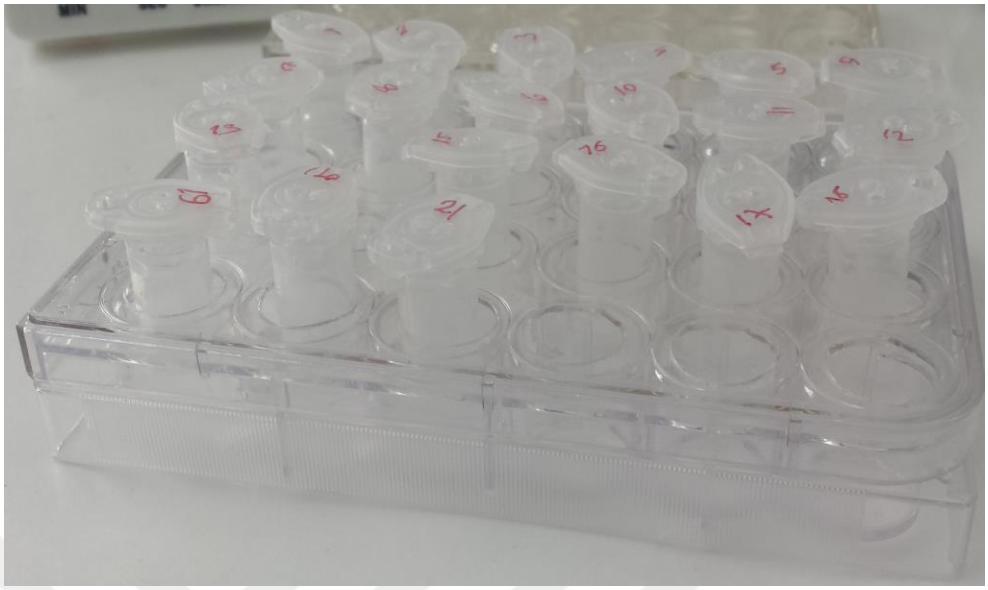
KL dokularının kesitlenmesi için ilgili mikrotom bıçağı 35° açı ile titreşimli mikrotoma (Leica, VT1000S, Almanya) takıldı ve bıçağın alt tarafındaki bölüm PBS ile doldularak, buz aküleri ile sıcaklık istenilen şartlarda tutuldu. Daha sonra katı hale gelen agaroz halka kalıptan çıkarıldı ve kesitlenecek kısımın oriyantasyonu sağlanarak yapıştırı ile tavlaya tutturuldu. Agaroz halkada kesitlenecek doku bölümü mikrotom (Leica, VT1000S, Almanya) yardımı ile 50µm kalınlıkta olacak şekilde düz hale getirilinceye kadar kesildi. Kesitlenen KL dokuları pens yardımı ile 0.5mL PBSTw içeren 6-kuyucuklu kültür plate'lerine bırakıldı. Herbir doku kesiti etrafında kalan agaroz ve debris pens yardımı ile temizlendi. Son olarak, kesitler 4°C PBSTw içinde saklandı (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Agaroz jel içerisine gömülmüş KL dokusunun mikrotom tavlası üzerindeki pozisyonu

2.4.7. Tüp Çemberin Hazırlanması

Eppendorf tüpler 100µL çizgisi hizasından kesildi. Kesilen tüplerin kenarları yumuşak oluncaya kadar ısıtıldı ve 0.5 cm^2'lik polyester kesilen kısıma yapıştırıldı. Ardından kesilen çember etrafında ki fazla plastik kalıntıları uzaklaştırıldı ve tüpün kapağına 18 gauge iğne ile iki delik açıldı. Yıkamalar ve ISH protokolün gerçekleştirilmesi için 6-kuyucuklu kültür plate'lerin kapaklarına 12mm çapında her bir kuyucuk için delik açıldı (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14. Plate içine yerleştirilmiş tüpler

2.4.8. In Situ Hibridizasyon 1. gün

Prehibridizasyon solüsyonu (50% formamid, 5x SSC [salin sodyum sitrat], 1% Bloklama ajanı, 10µg/mL tRNA, 10µg/mL heparin) 60.5°C'ye kadar ısıtıldı ve hibridizasyon çemberleri çeşme suyu ile ıslatılarak nemlenmesi sağlandı. 6-kuyucuklu kültür plate'lerine 2mL PBSTw koyularak tüp çemberler kuyucuk plate'in kapağına yerleştirildi ve doku kesitleri tüp çemberler içine transfer edildi. Doku kesitleri 30dk 25°C'de 6%'lık H_2O_2 içinde orbital çalkalyıcı üzerinde inkube edildi ve kuyucuk başına 2mL PBSTw ile 4 x 5dk olacak şekilde yıkandı. Dokulardan proteinlerin uzaklaştırılması için 5µg/mL proteinaz içeren PBSTw ile 12 dk 25°C'de inkube edildi. Dokular, 20dk 25°C'de %4 paraformaldehid (Affymetrix, 19943, ABD) ve % 0.2 glutaraldehid içeren PBS içinde post-fiksasyona tabi tutuldu ve ardından 2 x 5dk yıkandı. Prehibdirizasyon solüsyonundan 2mL koyularak 1saat 60.5°C'de hibridizasyon çemberinde inkube olması sağlandı. Son olarak prehibridizasyon solüsyonuna herbir RNA probundan 0.65µl eklenerek bir gece pre-hibridizasyon fırınına (VWR®, Amerika) bırakıldı.

2.4.9. In Situ Hibridizasyon 2. Gün

Bir gece prehibridizasyon işleminin ardından, KL doku kesitleri solüsyon 1 (%50 formamid, 5x SSC, 1% SDS) ile 3 X 30dk 60.5°C'de hibridizasyon çemberinde yıkandı. Daha sonra doku kesitleri tekrar 1 X 10dk 60.5°C'de solüsyon 1/ solüsyon 2 (1:1) ile yıkandı. Kesitler solüsyon 2 (10mM Tris-HCL pH 7.5, 0.5M NaCl, %0.1 Tween™ 20, 0.2mM sodyum azid) ile 4 X 10dk yıkandı ve yine 1 X 10dk 37°C'de 0.25µg/mL RNase içeren solüsyon 2 ile yıkandı. Sonra doku kesitleri 1 X 10dk 25°C'de solüsyon 3 (2x SSC, %50 formamid) ile yıkandı ve tekrar solüsyon 3 ile 2 X 1 saat 60.5°C'de hibridizasyon çemberinde yıkandı. Kesitler 3 X 10 dk 25°C'de yıkandı ve 2 saat 25°C'de doku bloklama tamponunda (TB, 1X TBS, %10 koyun serumu, % 1bloklama ajanı, %1 BSA, %0.1 Tween™ 20) bloklandı. Dokular inkübasyondayken herbir 200µL antikor absorbsiyon tamponu için 1.1µL anti-DIG (Roche, Anti-Digoxigenin, Almanya) antikoru kuyucuklara eklendi. Antikor absorbsiyon tamponu ve antikor 2 saat 4°C'de inkube edildi ve 10,000 rpm 1dk santrifüje edildi. Antikor absorbsiyon tamponu (1xTBS, %5 koyun serumu, %1 bloklama ajanı, %1 BSA, 6mg/mL embriyo tozu) uzaklaştırıldı ve 2 mL antikor dilüsyon tamponu (1xTBS, %5 koyun serumu, %1 bloklama ajanı %1 BSA, %0, 1 Tween™ 20, 0.2mM sodyum azid) eklendi. Son olarak doku bloklama tamponuda uzaklaştırılarak antikor içeren antikor dilüsyon tamponu ile bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.4.10. In Situ Hibridizasyon 3. Gün

Antikor dilüsyon tamponu ve antikor kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Doku kesitleri 8 X 10 dk 25°C'de TBSTw ile yıkandı. Doku kesitleri tüp çemberin içinden çıkarılarak içinde TBSTw olan petri kaplarına transfer edildi ve debris kalıntıları pens yardımıyla uzaklaştırıldı. Ardından, dokular tekrar mikrosantrifüj tüpüne transfer edilerek 1mL NTMT (100mM Tris-HCL pH 9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl2, 0.2mM sodyum azid) içinde 1 X 10 dk yıkandı. NTMT uzaklaştırıldı ve %50'si NTMT (2mM levamizol) ve kromojonik substrat %50 BM (Roche, BM purple, Almanya) purple olan 1 mL' lik karışım tüpler içine eklendi ve tüpler ışık almayacak şekilde kaplanarak 25°C'de inkube edildi. Mor renk değişimi gözlendi ve kesitler 2 X 5 dk 25°C'de 1mL tüp içerisinde 2mM levamisol (Sigma, L9756-5G, Almanya) içeren NTMT ile yıkandı. Bir gece inkübasyonun ardından, kesitler 1mL %3' lük H2O2 içeren PBSTw 30dk 25°C'de beyazlatıldı. Doku

kesitleri 1 mL PBSTw ile 1 X 10dk yıkandı ve post fikzasyon işlemi %4 paraformaldehid (Affymetrix, 19943, ABD) içeren 1 mL PBS ile yapıldı. Son olarak, doku kesittleri lamel üzerine tutturularak mikroskop (Nikon, Eclipse E80iMelville, ABD) ile görüntülendi (Şekil 2.15.).



Şekil 2.15. KL doku kesitlerinin lamel üzerinde görüntüsü

2.5. İstatistiksel Analizler

Çalışmadaki RT-qPZR analizinde, housekeeping seçimi için GeNorm ve NormFinder metodları kullanıldı. Luteolizis grupları YWHAZ ve gebelik gruları ise GAPDH normalize edildi. İstatistiksel analizlerde IBM-SPSS (ver.21) programı kullanıldı edildi. Gruplar arası farklılıklar ANOVA ve Tukey's testi ile değerlendirildi. $P<0,05$ değeri istatiski açıdan önem sınırı olarak kabul edildi.

Housekeeping ve hedef genlere ait proteinler arasında en fazla protein alanına sahip olan değer diğer örneklerin değerlerine bölünerek hedef protein housekeeping proteine normalize edildi. Son olarak, grupların hedef proteinleri housekeeping proteine bölünerek protein miktarları Image Studio™ Lite (ver 5.0) ile ölçülerek protein miktarı belirlendi. $P<0,05$ değeri istatiski açıdan önem sınırı olarak kabul edildi.

Luteal hücrelerdeki mRNA sinyal yoğunluğu Grabinski ve ark (2015) tarafından yapıldığı gibi Fiji ImageJ programı kullanılarak yapıldı ve Gruplar arası farklılıklar ANOVA ve Tukey's testi ile değerlendirildi. $P<0,05$ değeri istatiski açıdan önem sınırı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Gen Ekspresyon Analizlerinin Sonuçları

3.1.1. Primer Etkinlikleri

Herbir genin primer dilüsyonundan RT-qPZR ile elde edilen Cq değerleri kullanılarak primerlerin etkinliği $10^{-(1/Eğim)}$ formülü ile hesaplandı (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Primer etkinliklerinin denklemleri ve değerleri.

	FORMÜL	Eğim	E
StAR	$10^{-(1/-3,528)}$	-3,528	1,92064
HSD3B1	$10^{-(1/-3,3367)}$	-3,3367	1,99387
P450scc	$10^{-(1/-3,4838)}$	-3,4838	1,99387
LDLR	$10^{-(1/-3,5962)}$	-3,5962	1,89702
SR-BI	$10^{-(1/-3,5649)}$	-3,5649	1,90771
LXRα	$10^{-(1/-3,3686)}$	-3,3686	1,98088
LXRβ	$10^{-(1/-3,2636)}$	-3,2636	2,02493
ABCA1	$10^{-(1/-3,3332)}$	-3,3332	1,99532
ABCG1	$10^{-(1/-3,4489)}$	-3,4489	1,94961
APOE	$10^{-(1/-2,9478)}$	-2,9478	2,18392
ApoA-I	$10^{-(1/-3,5704)}$	-3,5704	1,90581
c-FOS	$10^{-(1/-3,507)}$	-3,507	1,92816

*__Eğim__ ; Lineer denklemin eğimi (y=**m**x+b), **E**; primer etkinliği.

3.1.2. Housekeeping Gen Seçimi ve Optimizasyonu

Doğal ve $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizise ait RT-qPZR verileri geNorm programında analiz edildiğinde bütün genlerin M değeri 1,5'den az olarak bulundu.

Çalışmada bütün genlerin referens gen olarak kullanılabilir olmasına rağmen YWHAZ'nin en iyi M değerine sahip olduğu görüldü (M=0,756). Normfinder'a göre değerlendirildiğinde de en iyi referans gen YWHAZ olarak bulundu. Ancak, gebe KL'de Normfinder'a göre en iyi referans gen GAPDH olduğu belirlendi. (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. geNorm ve Normfinder ile HKG'lerin değerlendirilmesi.

	GAPDH	**RPL32**	**SDHA**	**YWHAZ**
geNorm M değerleri (Luteolizis)	0,770	0,875	1,087	0,756
Normfinder Stabilite Değerleri (Luteolizis)	0,372	0,346	0,411	0,249
Normfinder Stabilite Değerleri (Gebe KL)	0,108	0,51	0,703	0,288

3.1.3. Hedef Genlerin mRNA Ekspresyonunun Analizi

Uygun housekeeping gen seçimi yapıldıktan sonra, RT-qPZR'de yapılan analizlerde gen ekspresyon miktarları relative expression (nıspi ifade) yöntemi kullanıllarak belirlendi. Sonuçlar IBM-SPSS (ver.21) programı ile analiz edildi.

Birinci araştırmada, doğal luteolizis (S12 vs S16) ve erken gebelikde (S12 vs P12, S16 vs P16, P12 vs P16 vs P22) yer alan steroidogenik (StAR, P450scc, 3βHSD), lipoprotein kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) ve LXR yolağı (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) genlerinin ekspresyonları araştırıldı.

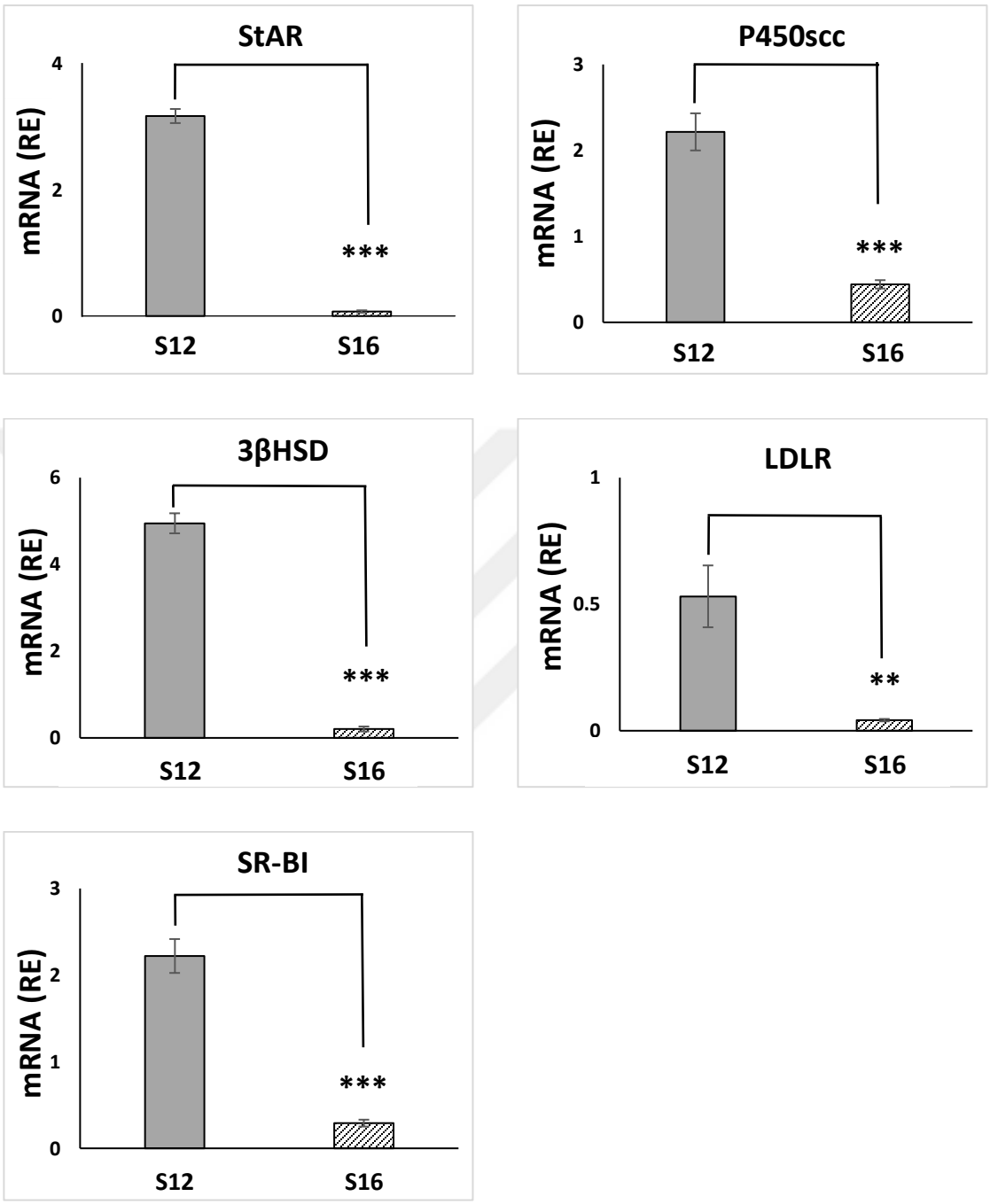
Buna göre; steroidogenik yolakta, kolesterolü mitokondriye taşıyan StAR'ın ekspresyonu doğal luteolizisde (S16) mid-luteal (S12) güne oranla önemli derecede azaldığı bulundu ($P<0,05$) (Çizelge 3.3.). Aynı şekilde luteolizisle birlikte kolesterolü pregnenolona dönüştüren P450scc ekspresyonu luteolizisle birlikte anlamlı şekilde azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.3.). Son olarak pregnenolonu progestesterona dönüştüren 3βHSD enzim ekpresyonu doğal luteolizis gününde (S16) mid-luteal güne (S12) kıyasla

istatistiksel olarak azalmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.3.). Kolesterolün luteal lipoproteinler ile alımını sağlayan yolakta; endositotik LDLR ekspresyonu doğal luteolizisde (S16) mid-luteal (S12) güne anlamlı derecede azalmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.3.). Bununla birlikte kolesterolün seçici olarak alımını sağlayan diğer bir reseptör SR-BI ekspresyonuda doğal luteolizisde (S16) mid-luteal (S12) güne göre azalmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.3.), (Şekil 3.1.). Kolesterolün efluksunu sağlayan yolakta; LXRα ekspresyonu S16. günde S12. güne göre istatistiksel olarak değişmezken (P>0,05) (Çizelge 3.3.), LXRβ'nın ekspresyonu doğal luteolizisde (S16) mid-luteal güne göre önemlli derecede artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.3.). Kolesterolün reverz transportunu sağlayan ABCA1 ekspresyonu S16. günde S12. güne göre değişmemiştir (P>0,05). Ancak, ABCG1, APOE ve ApoA-I ekspresyonu S16. günde anlamlı derecede artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.3.), (Şekil 3.2.).

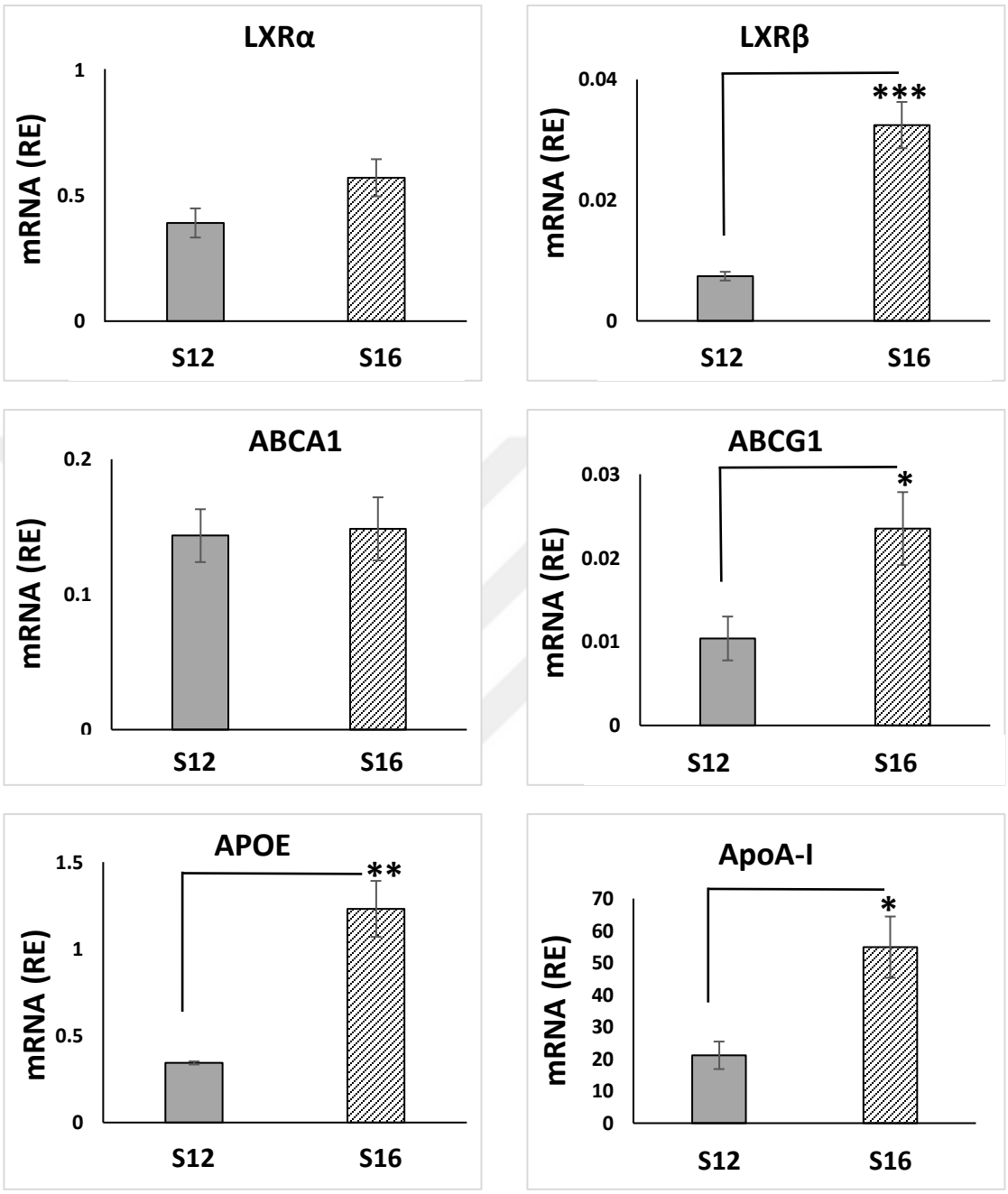
Gebelik 12. (G12) günde S12. güne göre StAR ve P450scc ekspresyonu değişmezken (P>0,05) (Çizelge 3.4.), 3βHSD ekspresyonu artma eğilimindedir (P=0,064). LDLR ekspresyonunun S12 ve G12. günlerde değişmediği bulundu (P>0.05) (Çizelge 3.4.). Ancak SR-BI ekspresyonu G12. günde S12'ye göre artma eğilimindedir (P=0.064) (Çizelge 3.4.), (Şekil 3.3.). LXR yolağında; LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, APOE ve ApoA-I genlerinin ekspresyonu G12. günde S12'ye göre değişmemiştir (P>0,05) (Çizelge 3.4.), (Şekil 3.4.)

Gebeliğin ilerlemesi ile birlikte steroidogenik yolaktaki StAR, P450scc ve 3βHSD ekspresyonları G16. günde S16. güne kıyasla önemli derecede artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.5.). Kolesterol uptake yolağındaki LDLR ve SR-BI lipoprotein reseptörlerinin gen ekspresyonu G16. günde S16' ya göre anlamlı derecede artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.5.), (Şekil 3.5.). LXR yolağında; LXRα, ABCA1, ABCG1 ve genlerinin ekspresyonu G16. günde S16'ye göre değişmemiştir (P>0,05) (Şekil 3.6.). Ancak, LXRβ (P=0,95) ve APOE'nin (P=0,99) ekspresyonu G16'da artma eğilimindedir (Çizelge 3.5.), (Şekil 3.6.). ApoA-I ekspresyonu G16. günde S16'ya göre önemli derecede azalmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.5.).

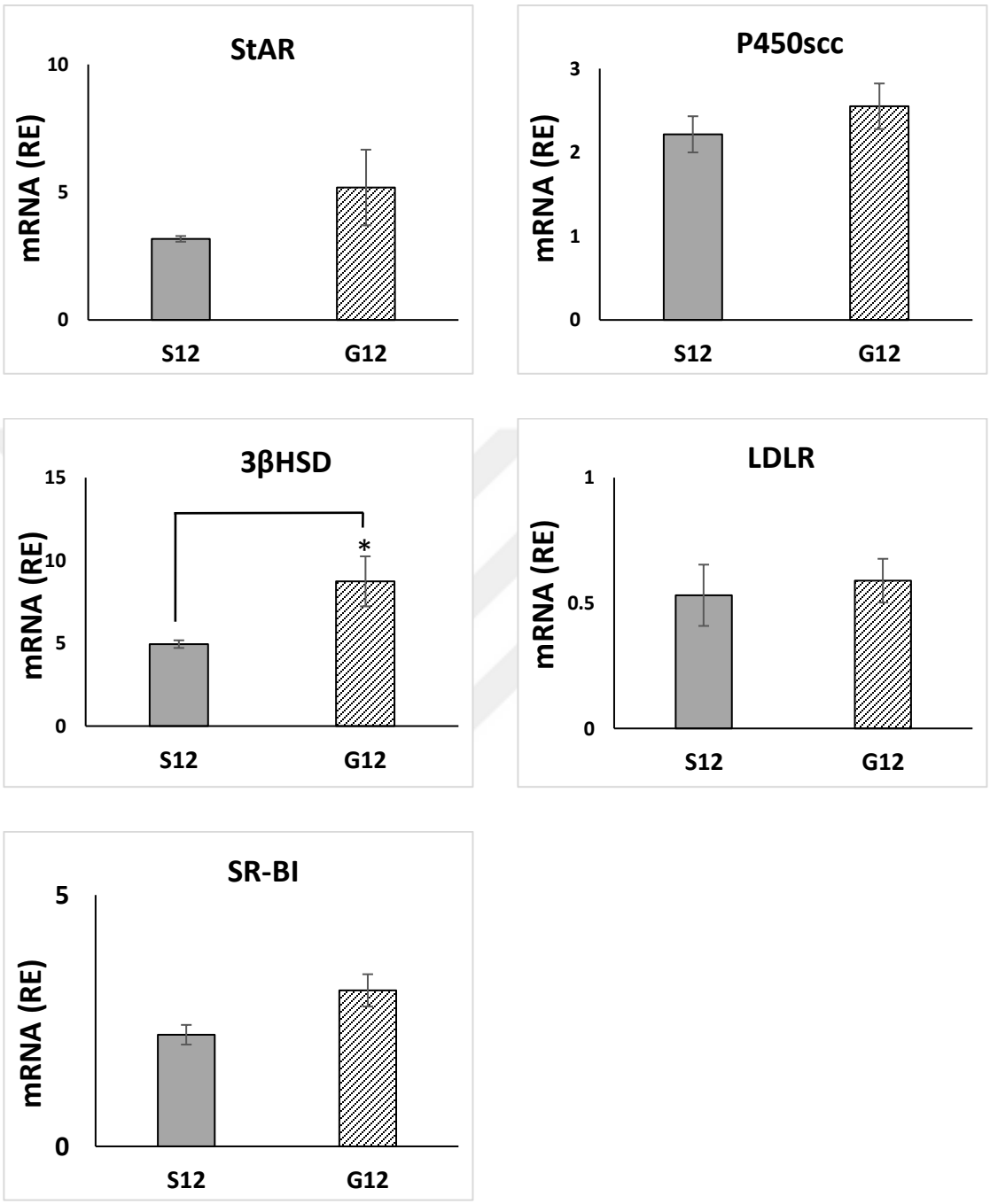
Gebelik günleri arasında StAR, P450scc ve 3βHSD ekspresyonu G16. ve G22. günlerde G12'ye oranla önemli derecede artmıştır (Çizelge 3.6.) (P<0,05). Ancak, G16 ve G22. günler arasında anlamlı bir ekspresyon değişikliği bulunmamıştır (P>0,05) (Çizelge 3.6.). LDLR ekspresyonu G16. günde G12'ye oranla artma eğiliminde olmasına rağmen (P=0,083), G22. günde G12'ye göre anlamlı derecede artmıştır (Çizelge 3.6.) (P<0,05). Ayrıca, G22. günde G16. güne göre artma eğilimindedir (P=0,077) (Çizelge 3.6.). SR-BI ekspresyonu G16. günde G12 gebelik gününe göre artmıştır (Çizelge 3.6.) (P<0,05). Ancak, G22. günde G16 ve G12'ye kıyasla ekspresyon değişikliği gözlenmemiştir (P>0,05) (Çizelge 3.6.), (Şekil 3.7.). LXRα ekspresyonunun G16. günde G12'ye kıyasla artma eğiliminde olmasına rağmen (P=0,079), G22. günde G12'ye kıyasla anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır (P>0,05) (Çizelge 3.6.). Aynı şekilde G22 ve G16. günler arasında da LXRα ekspresyonu değişmemiştir (P>0,05). LXRβ ekspresyonu G22. günde G12. güne göre önemli derecede artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.6.). Ancak, G22. ve G16 günler arasında önemli bir farklılık yoktur (P>0,05). Bununla birlikte, G16. günde G12' ye kıyasla artma eğiliminde bulunmuştur (P=0,080). ABCA1, ABCG1 ve ApoA-I ekpsresyonunda gebelik günleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (P>0,05) (Çizelge 3.6.). APOE ekspresyonu G22 ve G16. günlerde G12' ye kıyasla önemli derecede artmıştır (P<0,05). Ancak G16 ve G22 günler arasında istatiski bir fark bulunmamıştır (P>0,05) (Çizelge 3.6.), (Şekil 3.8.).



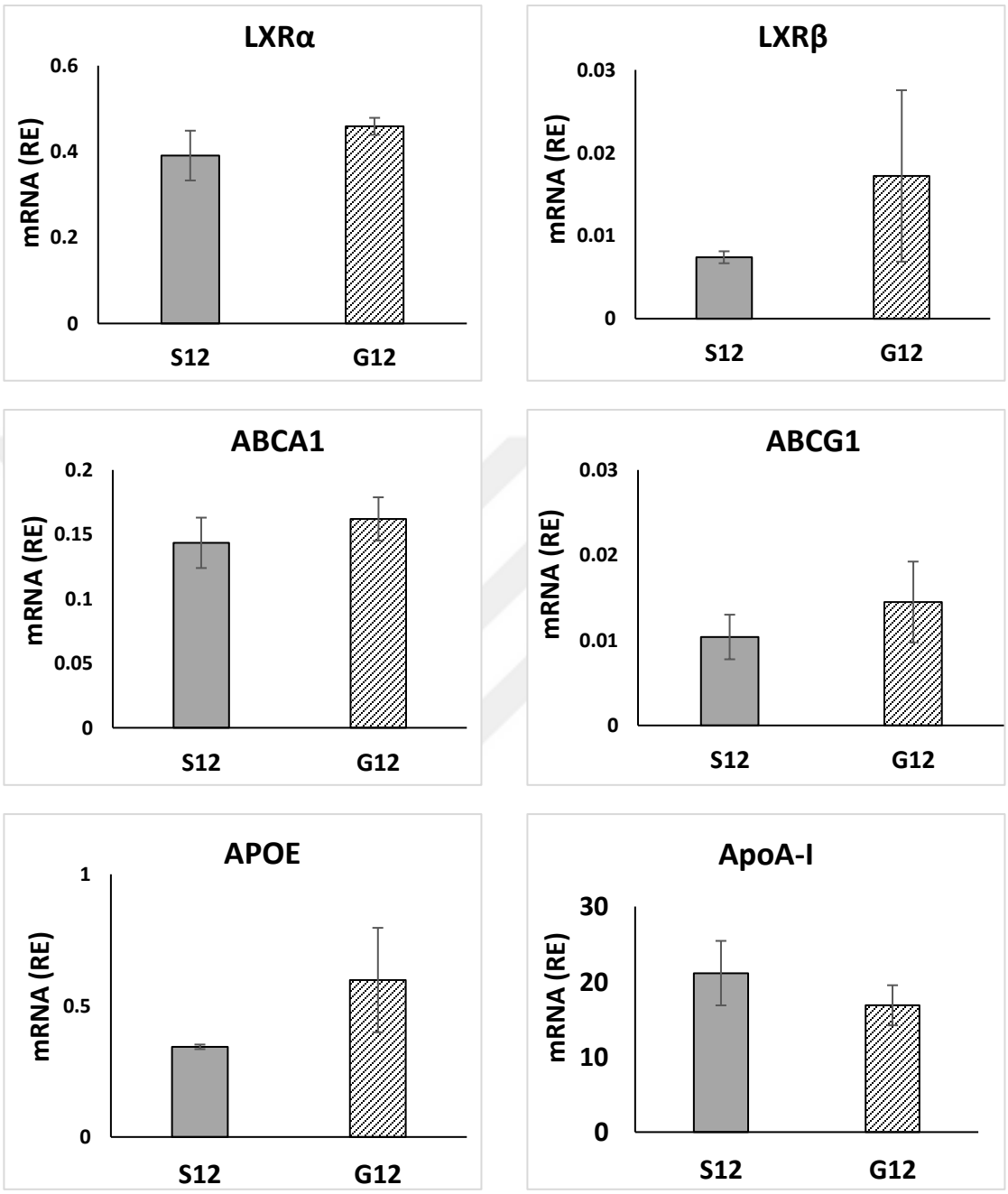
Şekil 3.1. Steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) ve doğal luteolizis (S16) günler arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, S16: Siklik 16. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, ***: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,001).



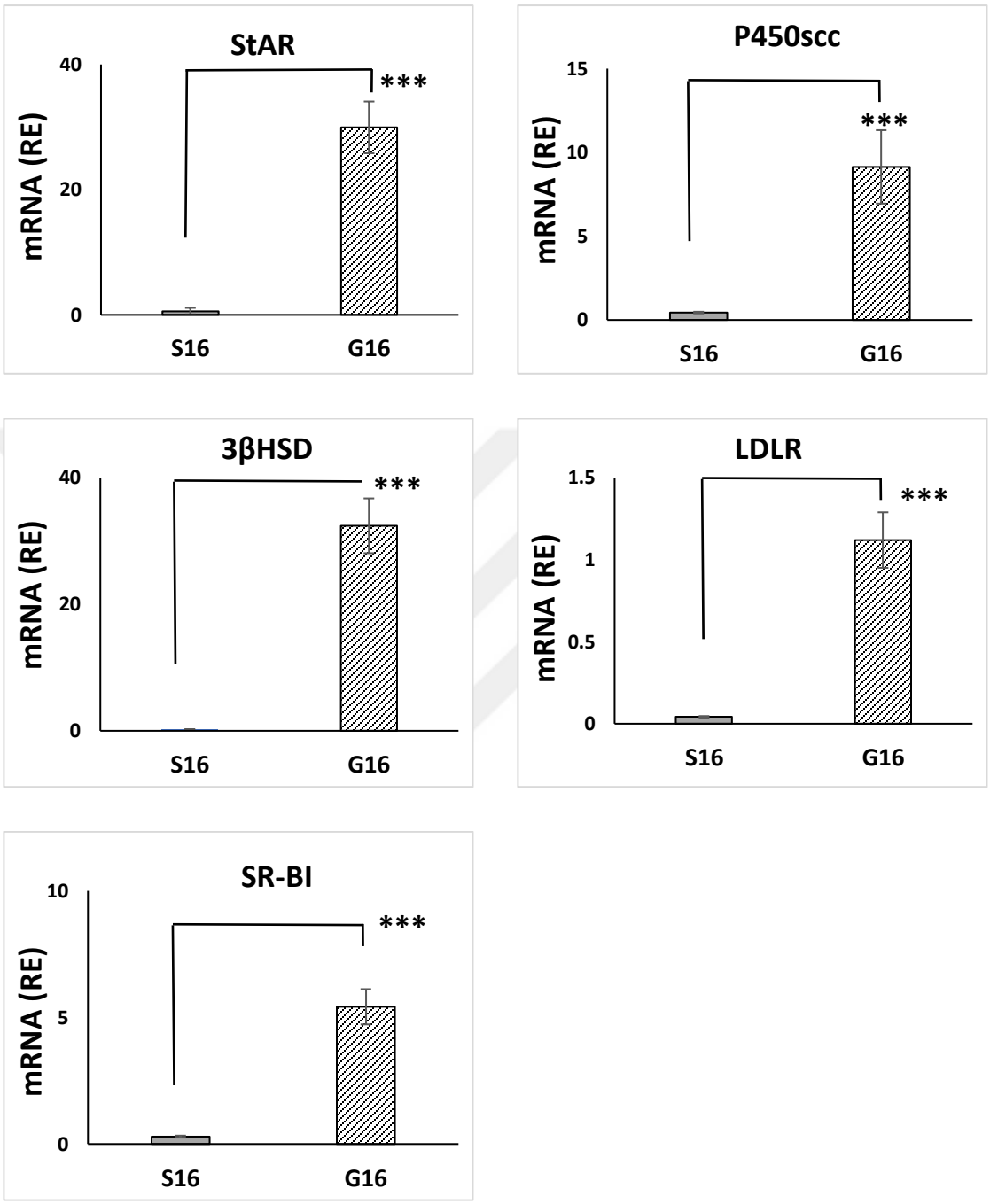
Şekil 3.2. LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) ve doğal luteolizis (S16) günler arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, S16: Siklik 16. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, ***: (P<0,001), **: (P<0,01), *: (P<0,05) İstatistiki açıdan önemlidir.



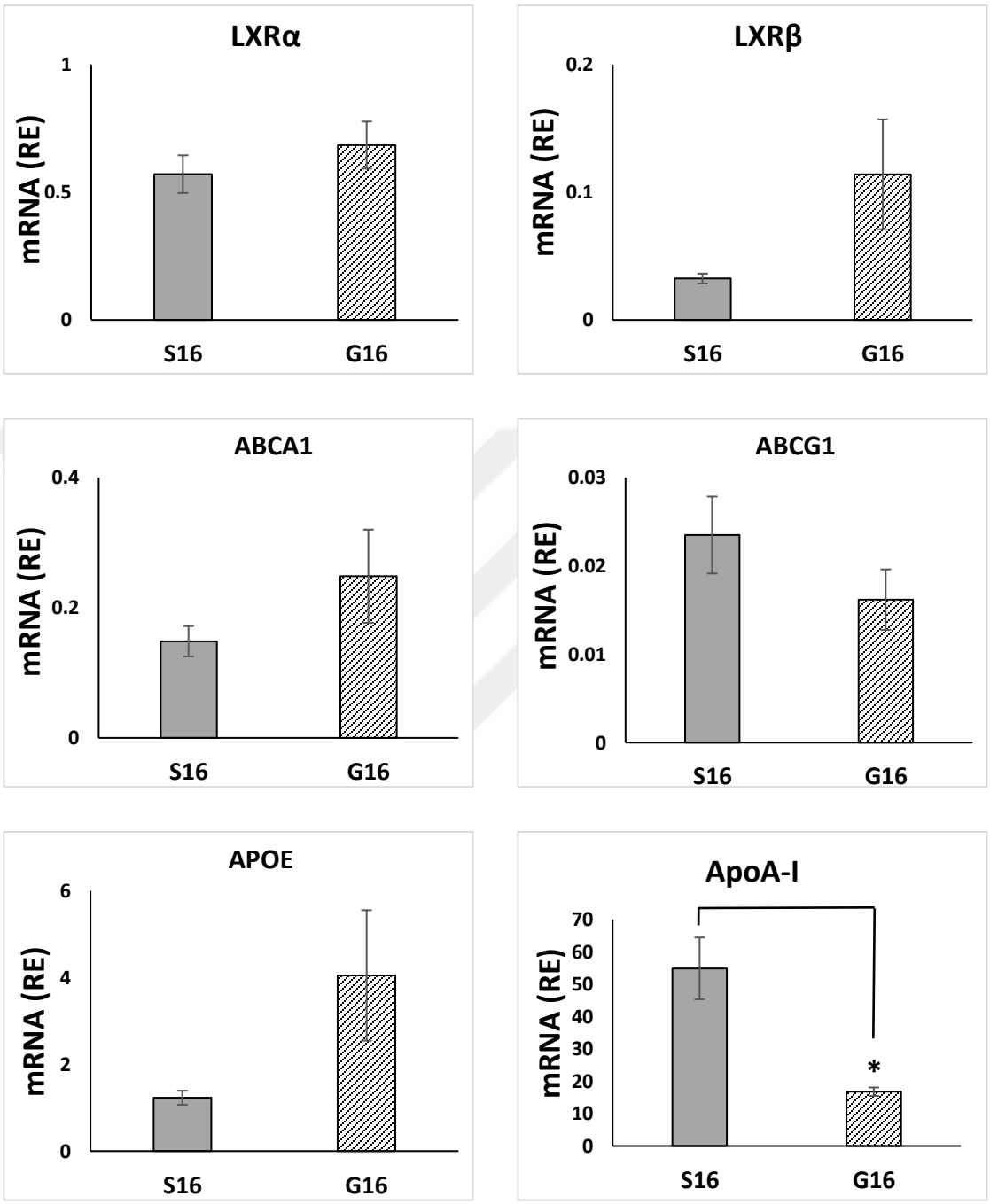
Şekil 3.3. Steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) ve gebelik (G12) günler arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, G12: Gebelik 12. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı. *: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,05)



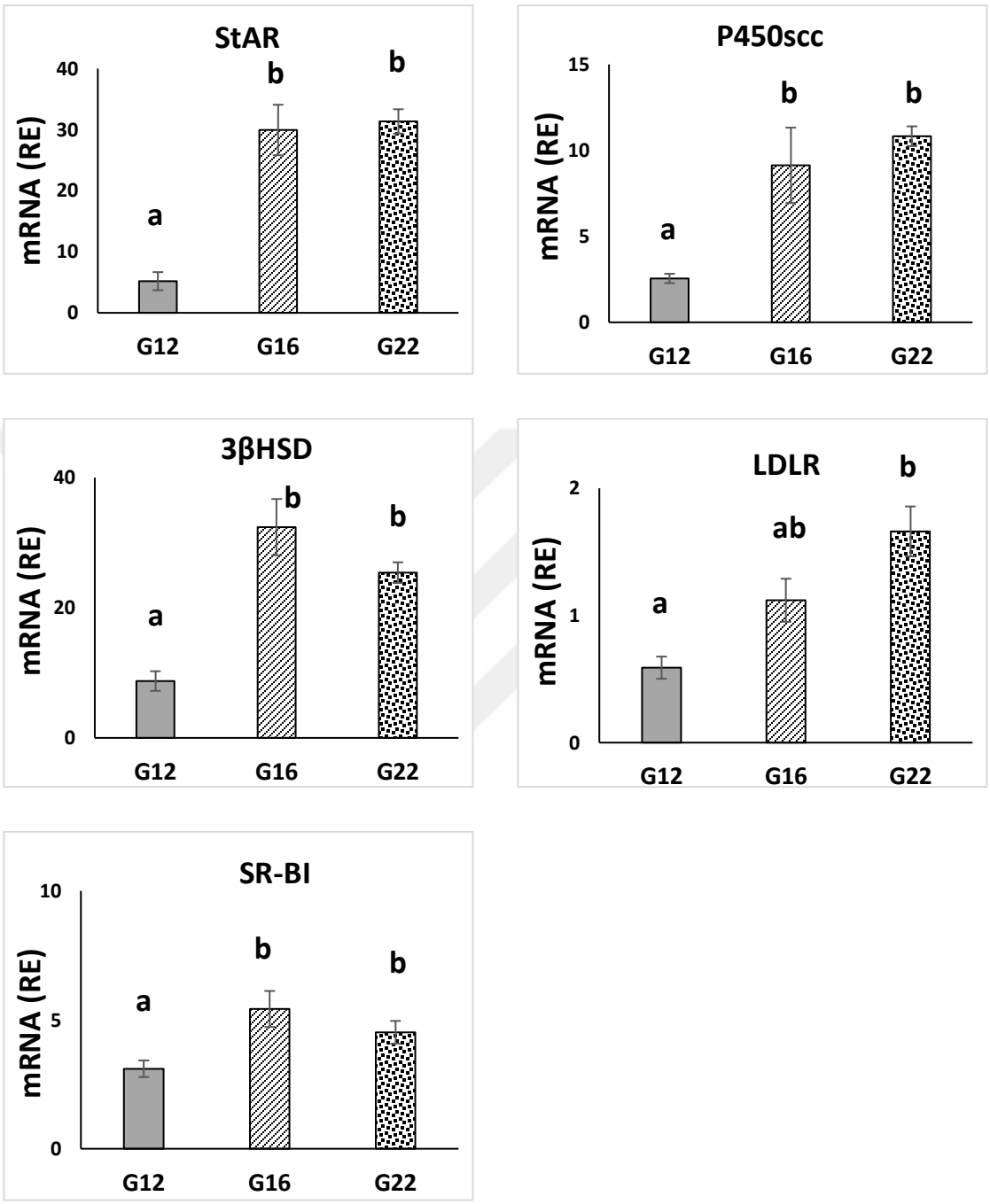
Şekil 3.4. LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) ve gebelik (G12) günler arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, G12: Gebelik 12. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı.



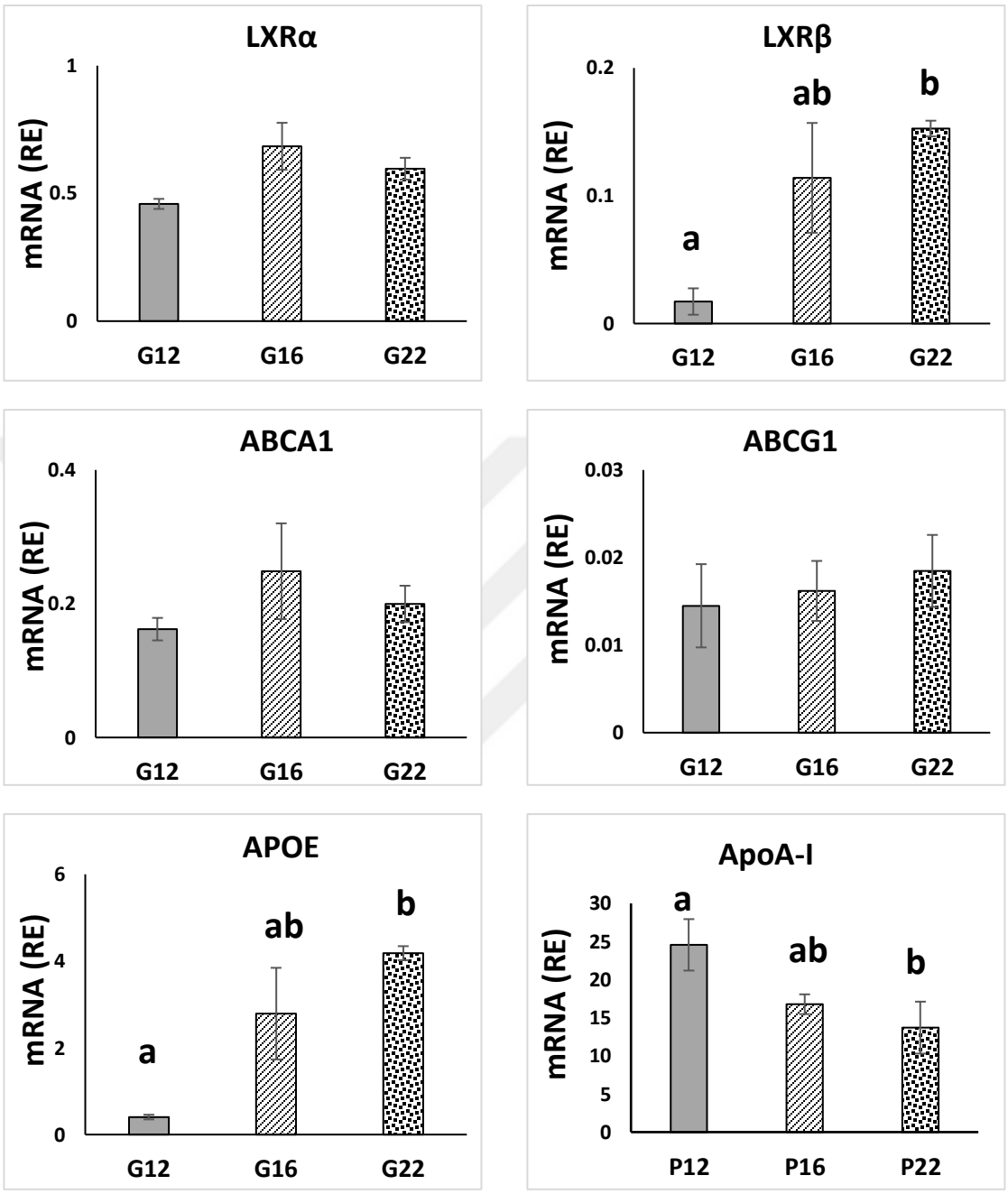
Şekil 3.5. Steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının siklik (S16) ve gebelik (G16) günler arasında nıspi değişim miktarı. S16: Siklik 16, G16: Gebelik 16. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı. ***: İstatistiki açıdan önemlidir.



Şekil 3.6. LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının siklik (S16) ve gebelik (G16) günler arasında nıspi değişim miktarı. S16: Siklik 16, G16: Gebelik 16. gün, RE: Nıspi ekspresyon miktarı.



Şekil 3.7. Steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının gebelik (G12, G16, G22) günleri arasında nıspi değişim miktarı. G12: Gebelik 12, G16: Gebelik 16. gün, G22: Gebelik 22. RE: Nıspi ekspresyon miktarı. [a, b]: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,05)



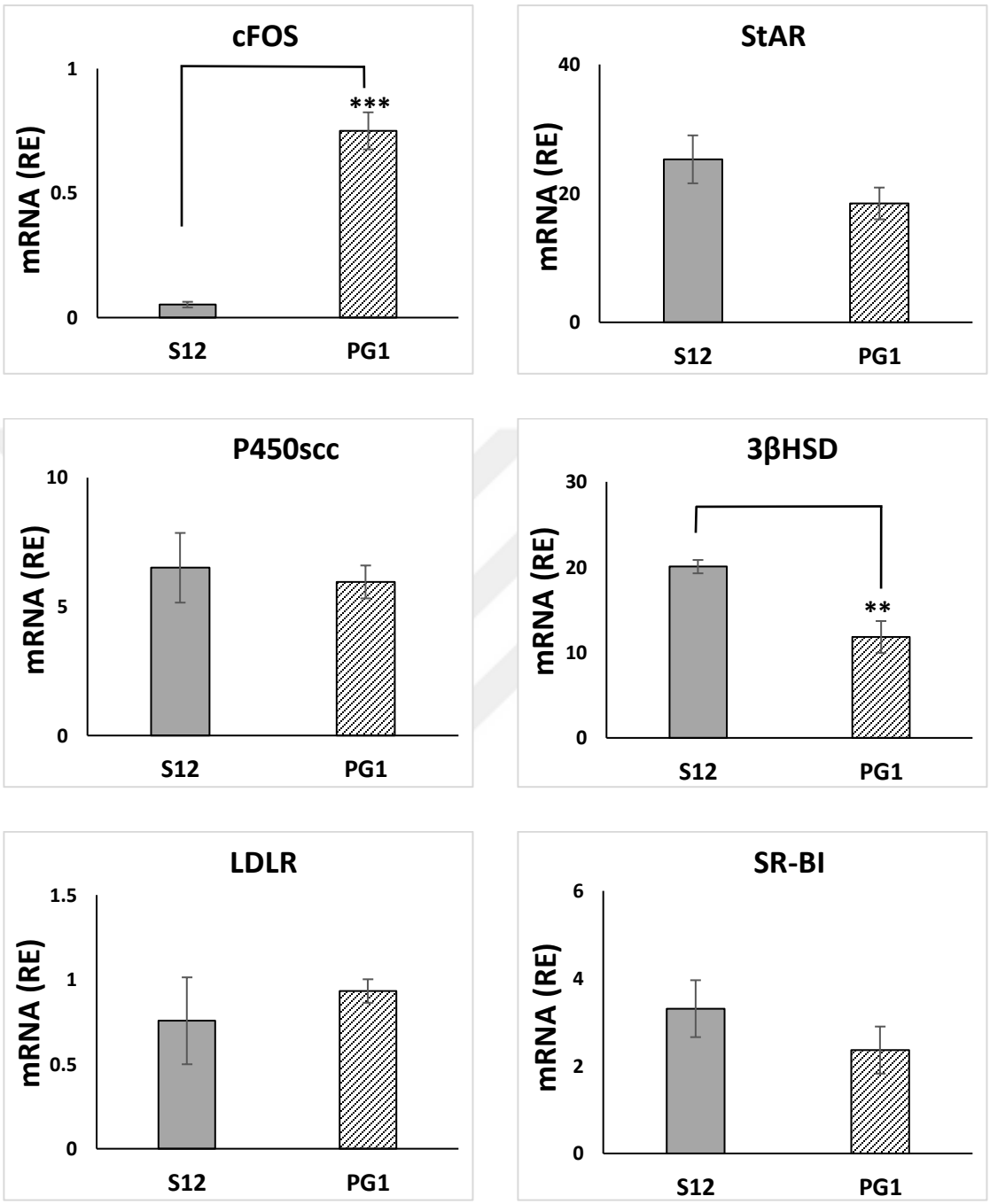
Şekil 3.8. LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının gebelik (G12, G16, G22) günler arasında nıspi değişim miktarı. G12: Gebelik 12, G16: Gebelik 16. gün, Gebelik 22, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, [a, b]: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,05).

İkinci araştırmada, $PGF_{2\alpha}$ indüklemiş luteolizis bir saat (S12 vs PG1), dört saat (S12 vs PG4) ve on-altıncı saatlerde (S12 vs PG16) aktivatör protein-1 (AP-1) komponenti, cFOS, steroidogenik (StAR, P450scc, 3βHSD), lipoprotein kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) ve LXR yolağı (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) genlerinin ekspresyonları araştırıldı.

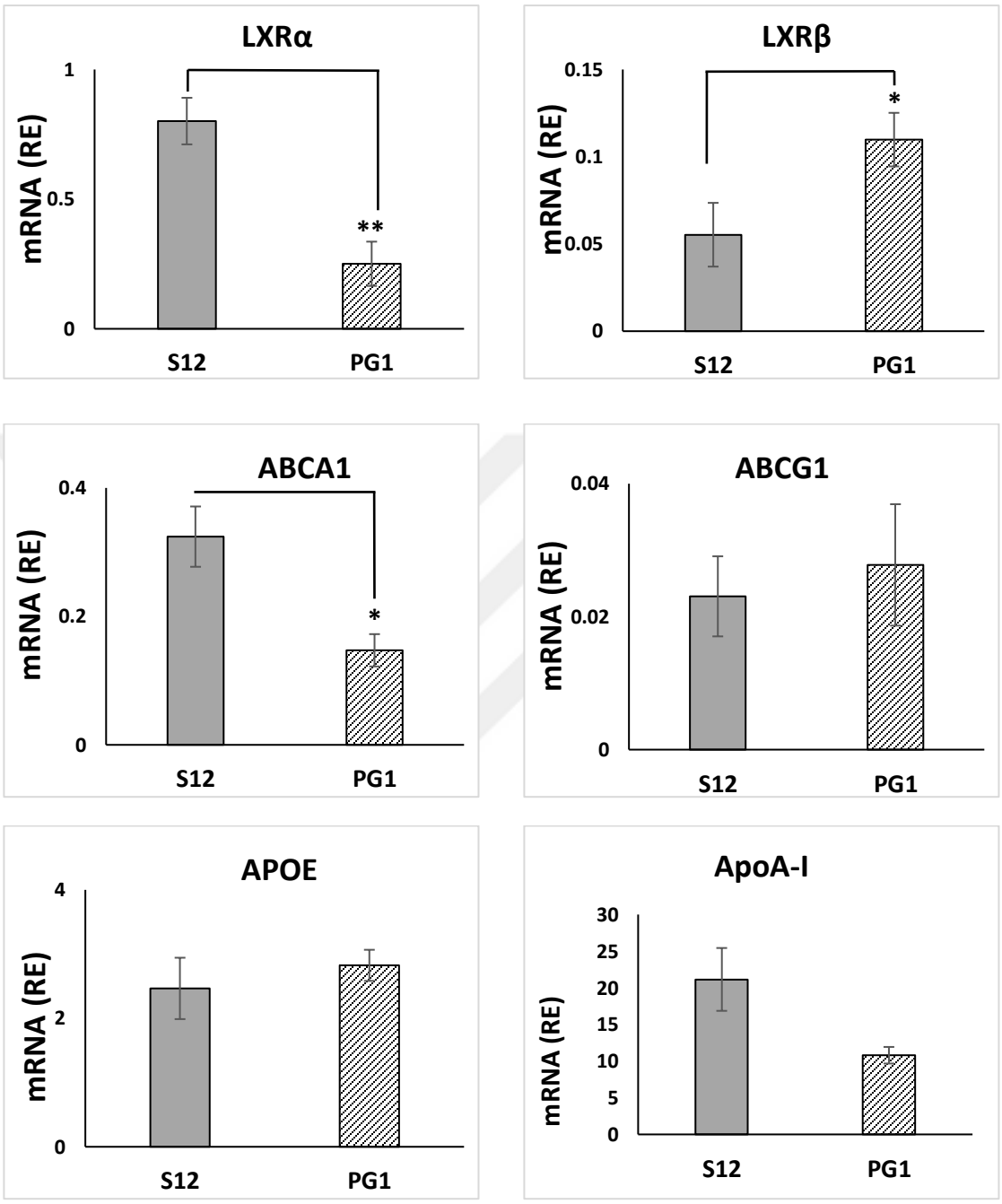
Buna göre; $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde cFOS ekspresyonu PG1'de S12'ye oranla önemli derecede artmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.7.). Steroidogenik yolaktaki StAR ve P450scc ekspresyonu PG1'de S12'ye kıyasla değişmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 3.7.).. Ancak, 3βHSD ekspresyonu PG1'de S12 ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.7.). Bununla birlikte, lipoprotein reseptörü LDLR ve SR-BI ekspresyonu PG1'de S12'ye kıyasla değişmemiştir ($P>0.05$) (Çizelge 3.7.), (Şekil 3.9.). LXRα ve ABCA1 ekspresyonu PG1'de S12'ye göre anlamlı derecede azalmasına karşın ($P<0,05$) (Çizelge 3.7.), LXRβ ekpsresyonu PG1'de artmış olarak bulundu ($P<0,05$) (Çizelge 3.7.). Ancak, ABCG1 ve APOE genlerinin ekspresyonları PG1'de S12'ye kıyasla değişmemiştir ($P>0,05$) (Çizelge 3.7.), (Şekil 3.10.). ApoA-I ekspresyonu PG1'de S12'ye göre azalma eğilimindedir ($P=0,091$).

cFOS ekspresyonu PG4 ve PG16'da S12'ye göre önemli derecede artmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). Bununla birlikte, PG4'deki cFOS ekspresyon miktarı PG16'dan anlamlı olarak daha fazladır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). StAR ve P450scc ekspresyonu PG4 ve PG16'da S12'ye kıyasla önemli derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). 3βHSD ekpsresyonu her iki PG4 ve P16 günlerinde anlamlı derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). Ayrıca, 3βHSD ekspresyon miktarı P16'da PG4'e daha azdır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). LDLR ve SR-BI ekspresyonu PG4 ve PG16'da S12'ye oranla önemli derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.) ve ayrıca, LDLR ekspresyonu PG16'da PG4'e göre daha azdır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). Ancak, SR-BI ekspresyonu PG4 ve PG16 arasında değişmemektedir ($P>0,05$) (Çizelge 3.8.), (Şekil 3.11.). LXRα ekspresyonu indüklenmiş luteolizis PG4'de S12'ye göre anlamlı derecede azalmıştır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). Ayrıca, PG4'de LXRα ekspresyonu PG16'ya göre daha azdır ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). LXRβ ekspresyonu PG4'de S12'ye göre azalma eğiliminde ($P=0.091$) bulunmasına karşın, PG4'de PG16'ya göre daha az olarak bulundu ($P<0,05$) (Çizelge 3.8.). ABCA1

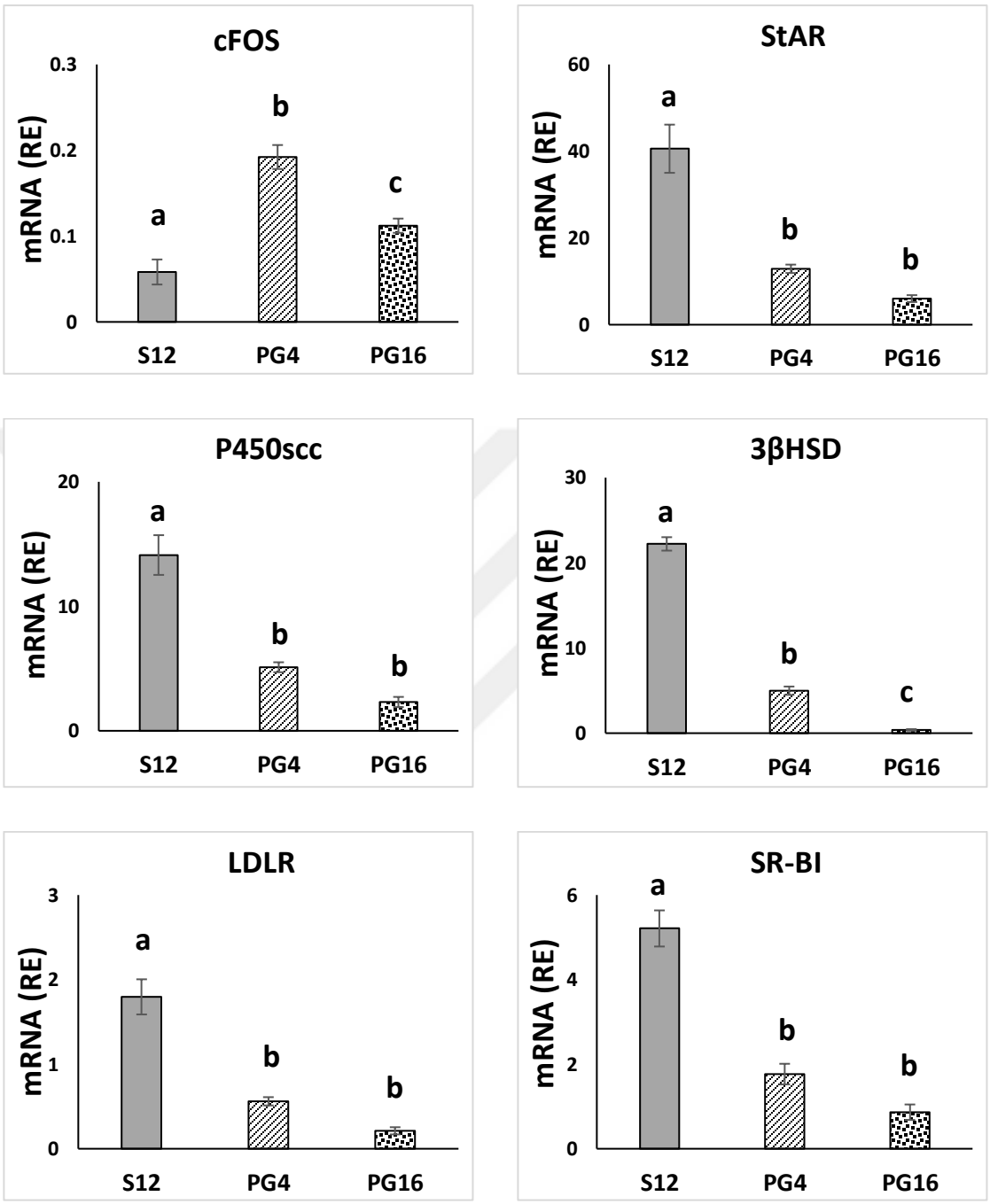
ekspresyonu S12, PG4 ve PG16 grupları arasında değişmemiştir (P>0.05). ABCG1 ekspresyonu PG16'da PG4'e kıyasla anlamlı olarak artmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.8.). APOE ekspresyonu PG4'de S12'ye göre daha az olarak bulundu (P<0,05) ApoA-I ekspresyonu PG4 ve PG16'da S12'ye göre anlamlı derecede azalmıştır (P<0,05) (Çizelge 3.8.), (Şekil 3.12.).



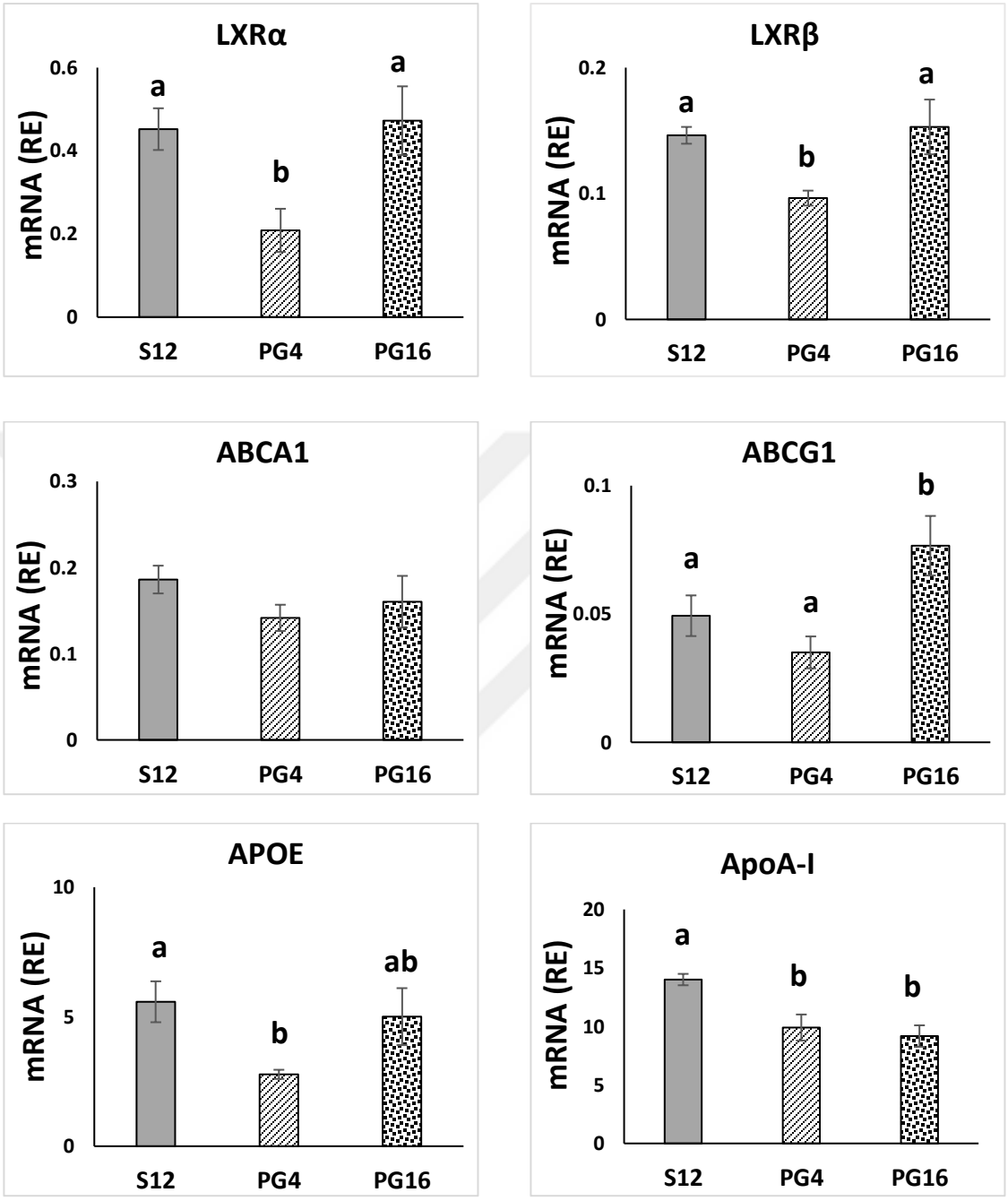
Şekil 3.9. Aktivatör protein-1 komponenti (cFOS), steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) gün ve luteolitiz (PG1) grubu arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG1: Bir saat prostaglandin, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, ***: (P<0,001), **: (P<0,01) İstatistiki açıdan önemlidir.



Şekil 3.10. Aktivatör protein-1 (cFOS) ve LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) gün ve luteolitiz (PG1) grubu arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG1: Bir saat prostaglandin, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, **: (P<0,01), *: (P<0,05) İstatistiki açıdan önemlidir.



Şekil 3.11. Aktivatör protein-1 komponenti (cFOS), steroidogenik (StAR, P450scc, 3BHSD) ve kolesterol uptake (LDLR ve SR-BI) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) gün ve indüklenmiş luteolitiz (PG4, PG16) grubu arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG4-PG16: Dört ve on-altı saat prostaglandin, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, $^{a, b,c}$: İstatistiki açıdan önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.12. LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1, ApoA-I, APOE) yolağındaki genlerin ekspresyonlarının mid-luteal (S12) gün ve indüklenmiş luteolitiz (PG4, PG16) grubu arasında nıspi değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG4-PG16: Dört ve on-altı saat prostaglandin, RE: Nıspi ekspresyon miktarı, [a, b]: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,05).

3.2. Hedef Genlerin Protein Seviyelerinin Analizi

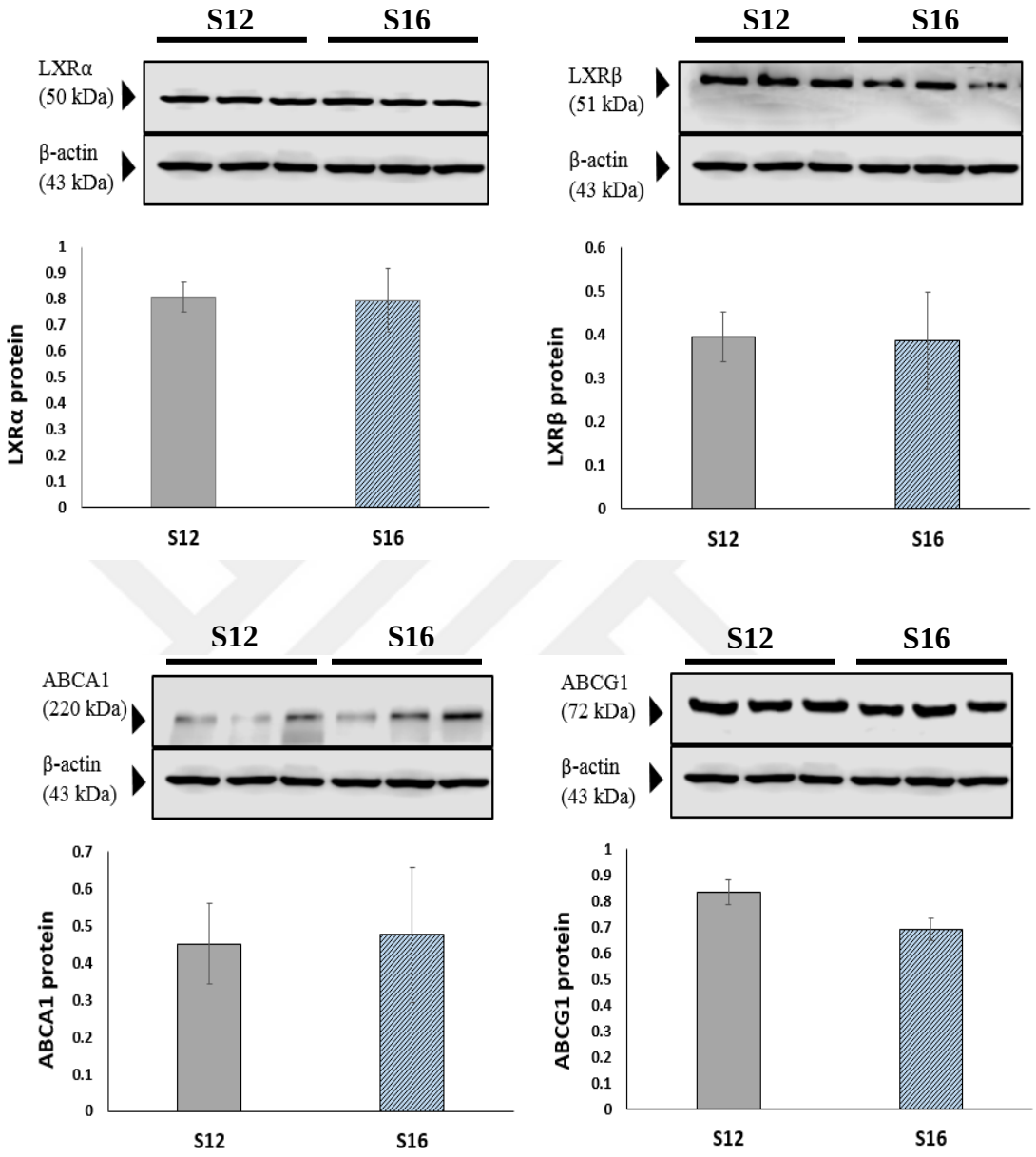
Protein seviyesinde gruplar arası farklılık western blot tekniği ile belirlendi. Membran üzerinde örneğe ait protein bantlarının alanı Image Studio™ Lite (ver 5.0) ile ölçülerek protein miktarı belirlendi. Housekeeping ve hedef genlere ait proteinler arasında en fazla protein alanına sahip olan değer diğer örneklerin değerlerine bölünerek hedef protein houseekeeping proteine normalize edildi. Son olarak, grupların hedef proteinleri housekeeping proteine bölünerek protein miktarları belirlendi ve sonuçlar IBM-SPSS (ver.21) programı ile analiz edildi.

Birinci araştırmada, doğal luteolizis (S12 vs S16) ve erken gebelikde (S16 vs P16, ve P12 vs P16 vs P22) yer alan LXR yolağındaki (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) genlerinin protein seviyeleri western blot yöntemi ile araştırıldı.

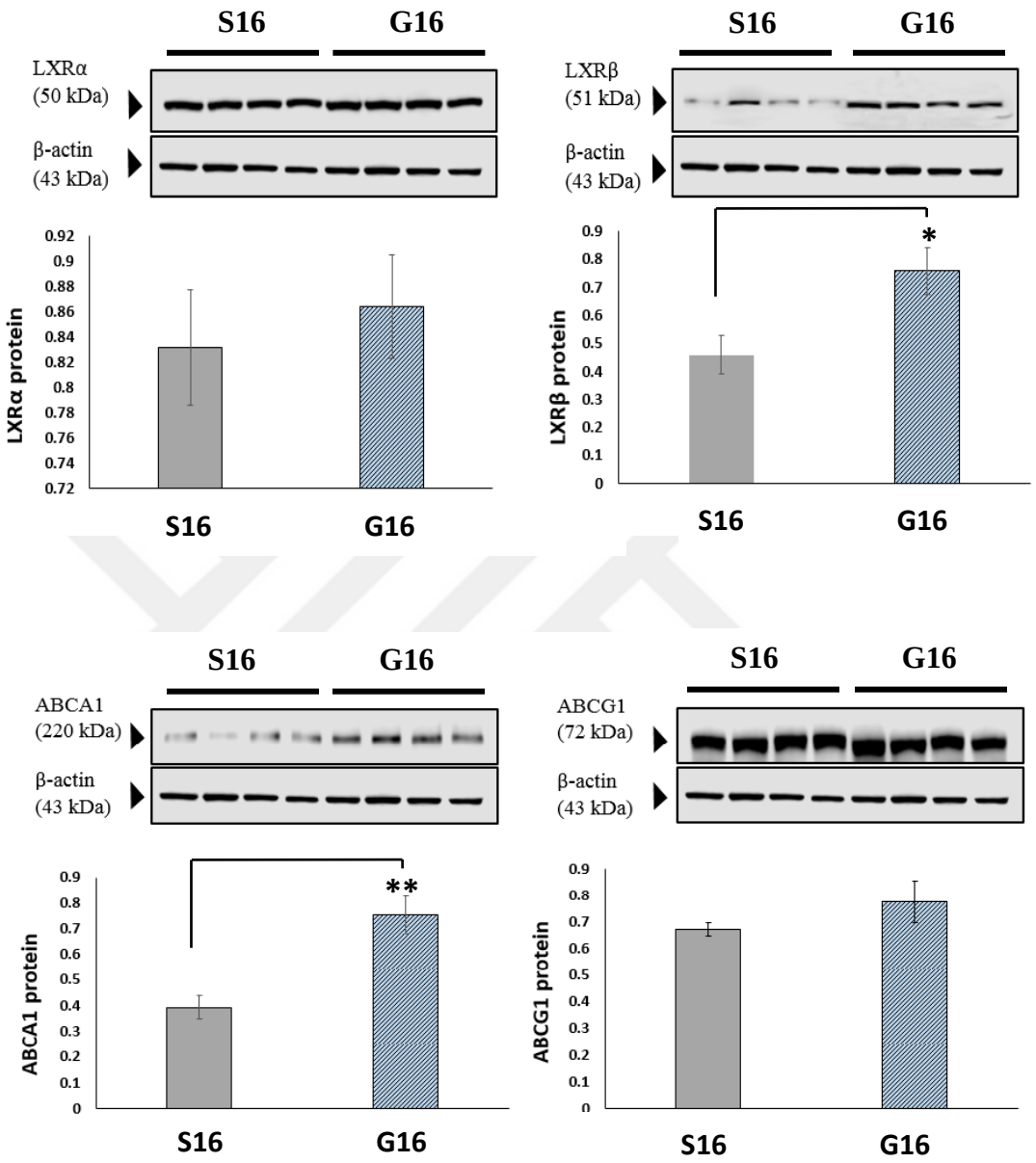
Buna göre; LXRα protein seviyesi S16 luteolizis gününde S12. güne göre azalmasına rağmen bu azalış anlamlı olarak bulunmadı (P>0.05). LXRβ ve ABCA1 protein seviyesi S12 ve S16. günler arasında değişmemiştir (P>0.05). Ancak ABCG1 seviyesi S16. günde azalma eğiliminde olduğu bulundu (P=0,081) (Şekil 3.13.).

LXRα ve ABCG1 protein seviyesi gebelik G16. günde S16. güne kıyasla değişmemektedir (P>0,05). Ancak LXRβ protein seviyesi gebelik G16. günde S16. güne göre önemli derecede arttığı bulundu (P=0,033). Ayrıca, ABCA1 protein seviyesininde gebelik G16. günde S16. güne göre önemli derecede arttığı bulundu (P=0,006) (Şekil 3.14.).

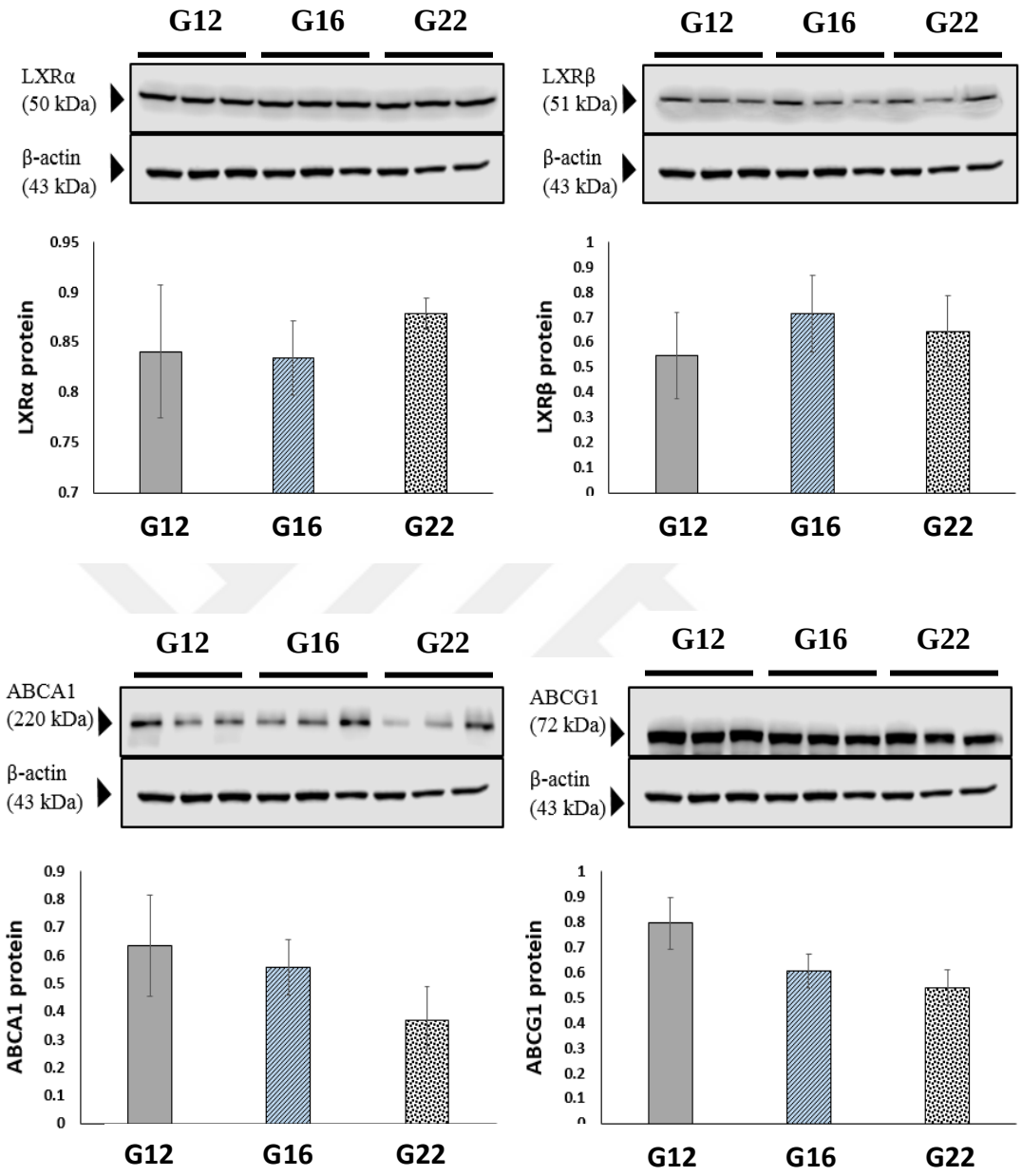
Gebelik günleri arasında (G12, G16, G22) LXRα'nın protein seviyesinin değişmediği bulundu (P>0.05). Ancak, LXRβ'nın protein seviyesi G16. ve G22. günlerde G12'ye göre artmış olarak bulunsa da istatistiksel olarak bu artış anlamı olarak bulunmadı (P>0.05). ABCA1 ve ABCG1'in protein seviyesi gebelik G16 ve G22. günde G12. güne kıyasla azalmasına rağmen bu azalış anlamı olarak tespit edilemedi (P>0.05). Ayrıca, ABCA1 ve ABCG1'nin protein seviyesi gebelik G16 ve G22. günler arasında değişmemiştir (P>0.05) (Şekil 3.15.).



Şekil 3.13. Western Blot ile LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) yolağındaki genlerin mid-luteal (S12) gün ve luteolitik gün (S16) grubu arasında protein değişim miktarı. S12: Siklik 12, S16: Siklik 16, kDa (kilodalton): Protein moleküler ağırlığı.



Şekil 3.14. Western Blot ile LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) yolağındaki genlerin siklik (S16) gün ve gebelik gün (G16) grubu arasında protein değişim miktarı. S12: Siklik 12, G16: Gebelik 16, kDa (kilodalton): Protein moleküler ağırlığı.

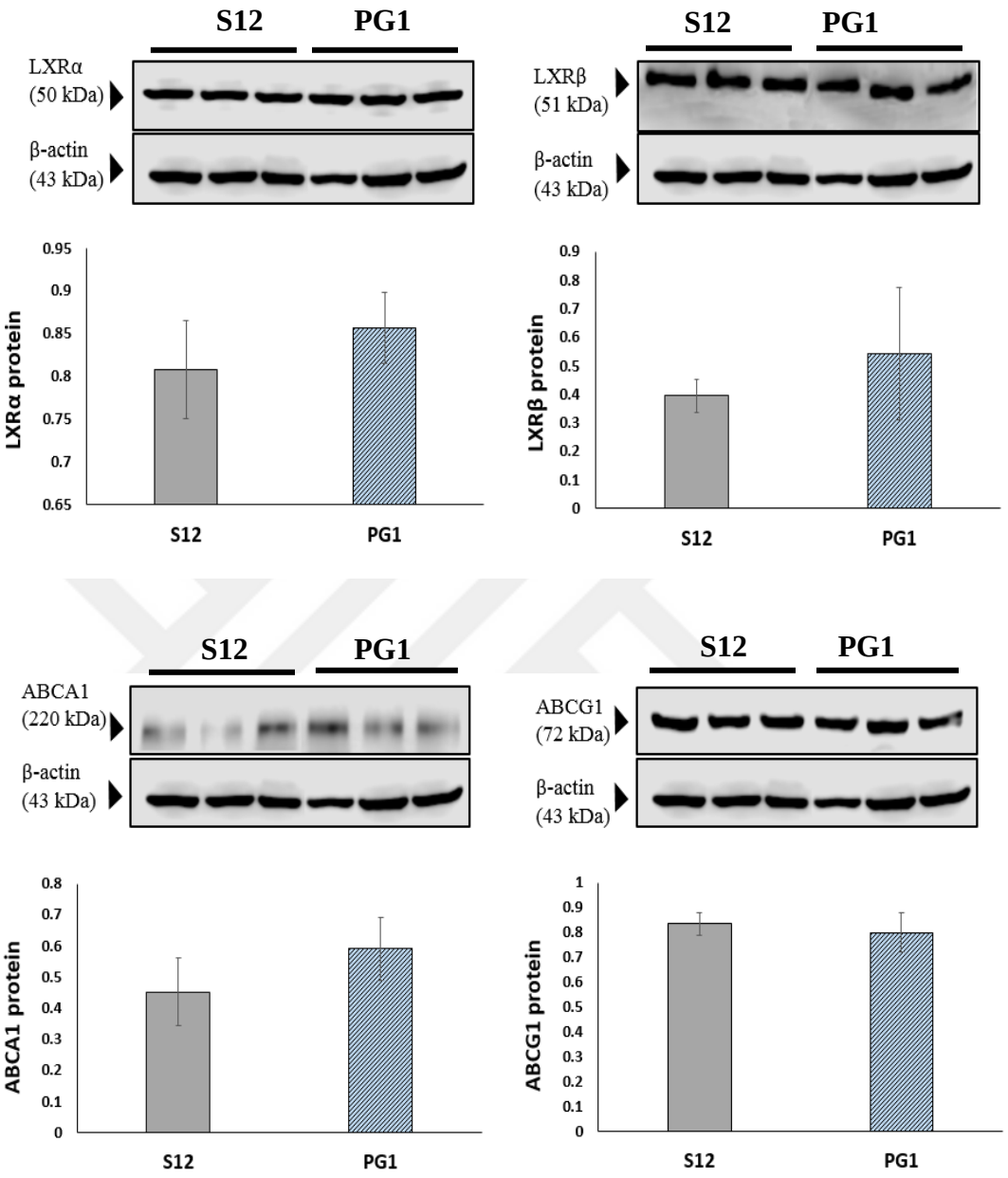


Şekil 3.15. Western Blot ile LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) yolağındaki genlerin gebelik günleri (G12 vs G16 vs G22) arasında protein miktarı değişim. G12: Gebelik 12, 16, 22, kDa (kilodalton): Protein moleküler ağırlığı.

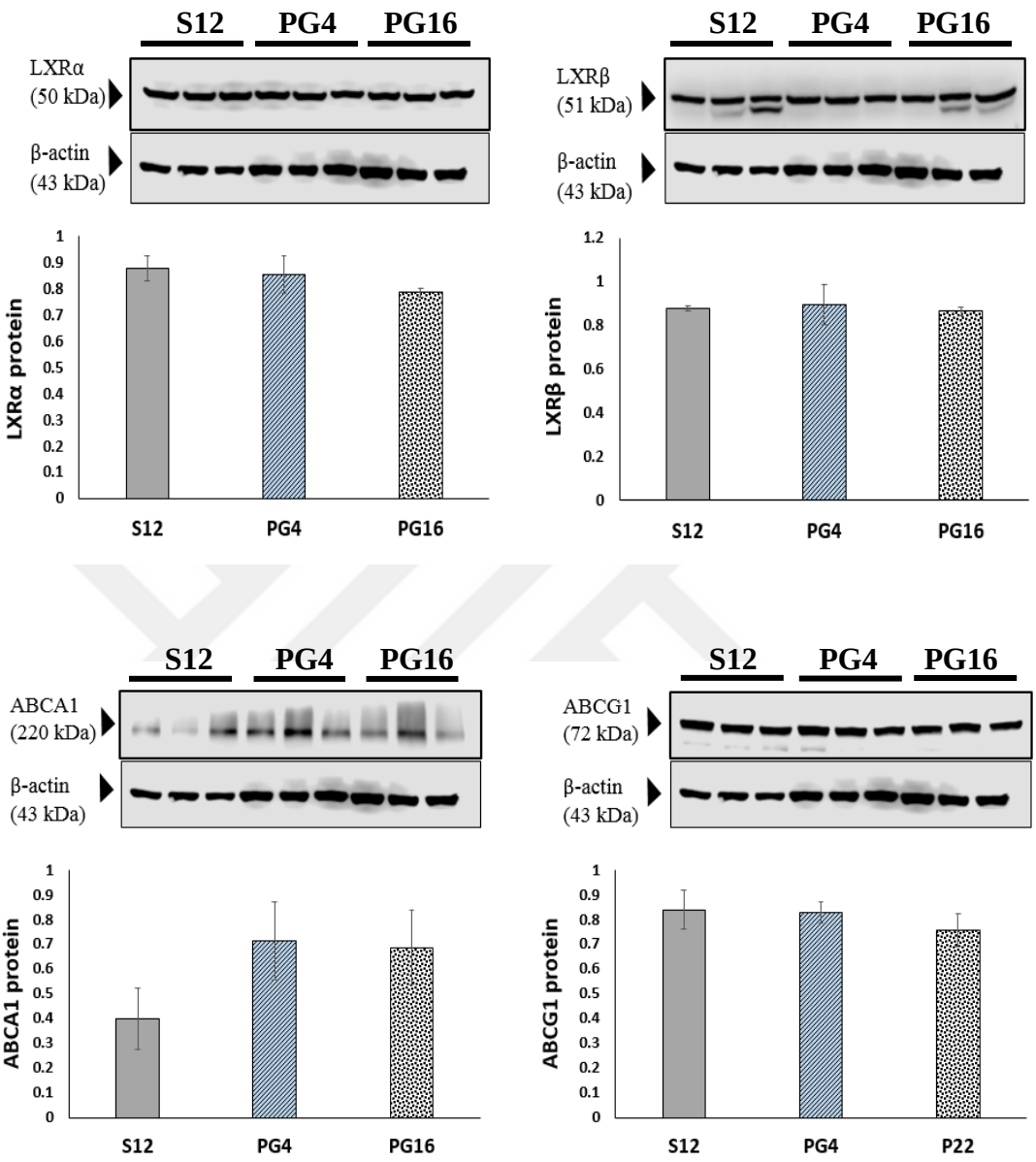
İkinci araştırmada, $PGF_{2\alpha}$ indüklemiş luteolizis bir saat (S12 vs PG1), dört saat ve on-altıncı saatlerde (S12 vs PG4 vs PG16) LXR yolağı (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) genlerinin protein seviyeleri western blot yöntemi ile araştırıldı.

LXR yolağındaki genlerin (LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1) protein seviyeleri S12. gün ve PG1 arasında anlamlı olarak değişmediği bulundu ($P>0.05$) (Şekil 3.16.).

LXRα protein seviyesinin PG4 ve PG16'da S12'ye göre azalmış olarak bulunmasına rağmen, bu azalış önemli olarak bulunmadı ($P>0.05$). Ayrıca, PG4 ve PG16 arasında da fark bulunmadı ($P>0.05$) LXRβ ve ABCG1 protein seviyesinin PG4, PG16 ve S12. gün arasında değişmediği tespit edildi ($P>0.05$). ABCA1 protein seviyesi PG4 ve PG16'da S12'ye kıyasla fazla olmasına rağmen önemli olarak bulunmadı ($P>0.05$). Ayrıca, ABCA1 protein seviyesi PG4 ve PG16 arasında da anlamlı değişimi tespit edilemedi ($P>0.05$). (Şekil 3.17.).



Şekil 3.16. Western Blot ile LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) yolağındaki genlerin mid-luteal (S12) gün ve indüklenmiş luteolizis (PG1) grubu arasında protein değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG1: Bir saat prostaglandin, kDa (kilodalton): Protein moleküler ağırlığı.



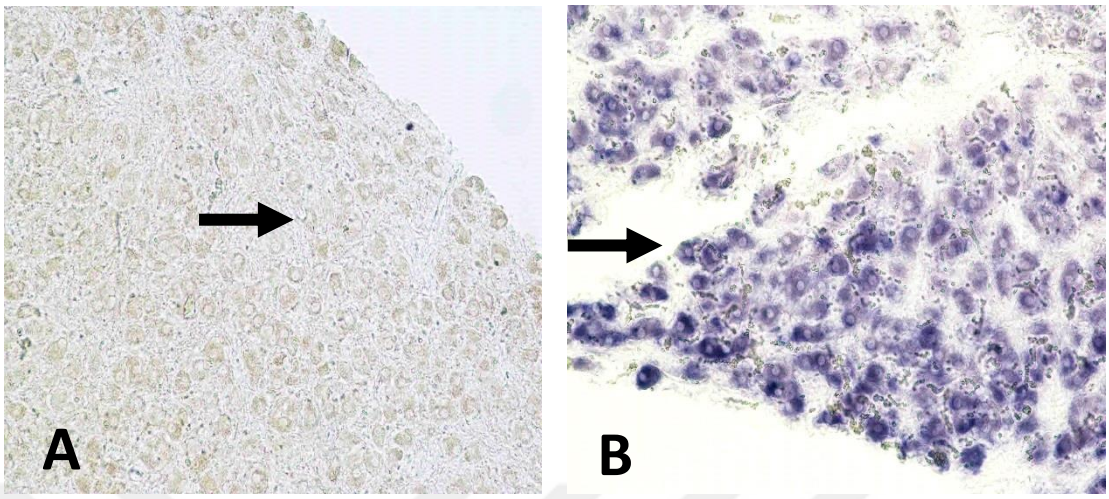
Şekil 3.17. Western Blot ile LXR (LXRα, LXRβ, ABCA1, ABCG1) yolağındaki genlerin mid-luteal (S12) gün, indüklenmiş luteolizis (PG4 ve PG16) grubu arasında protein değişim miktarı. S12: Siklik 12, PG4-PG16: Dört ve on-altı saat prostaglandin, kDa (kilodalton): Protein moleküler ağırlığı.

3.3. İn-situ Hibridizasyon Sonuçları

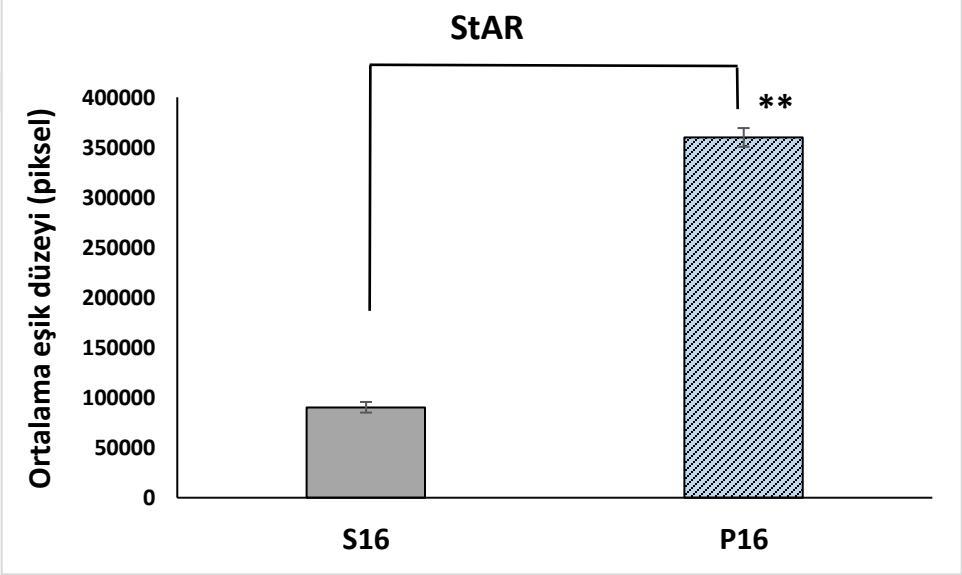
Luteal hücrelerdeki mRNA'ların lokalizasyonu *in-vitro* transkripsiyonel olarak in-situ hibridizasyon yöntemi ile belirlendi. Luteal hücrelerdeki mRNA sinyal yoğunluğu Grabinski ve ark (2015) tarafından yapıldığı şekil örnek alınarak Fiji ImageJ programı kullanılarak yapıldı.

Luteal hücrelerde S16. günde StAR mRNA tespit edilemedi (Şekil 3.18). Ancak, G16. günde gebelik ile birlikte StAR mRNA luteal hücrelere anlamlı derecede lokalize olduğu bulundu (P=0,002) (Şekil 3.19.). SR-BI mRNA'sı S12, PG1, PG4'de luteal hücrelerde tespit edildi. Ancak PG16'da SR-BI mRNA'sını daha az lokalize olduğu tespit edildi (Şekil 3.20.). Bununla birlikte, luteal hücrelerde PG4 (P=0,047) ve PG16'da (P=0,018) S12. güne göre SR-BI mRNA'sı daha az olarak bulundu (Şekil 3.21.).

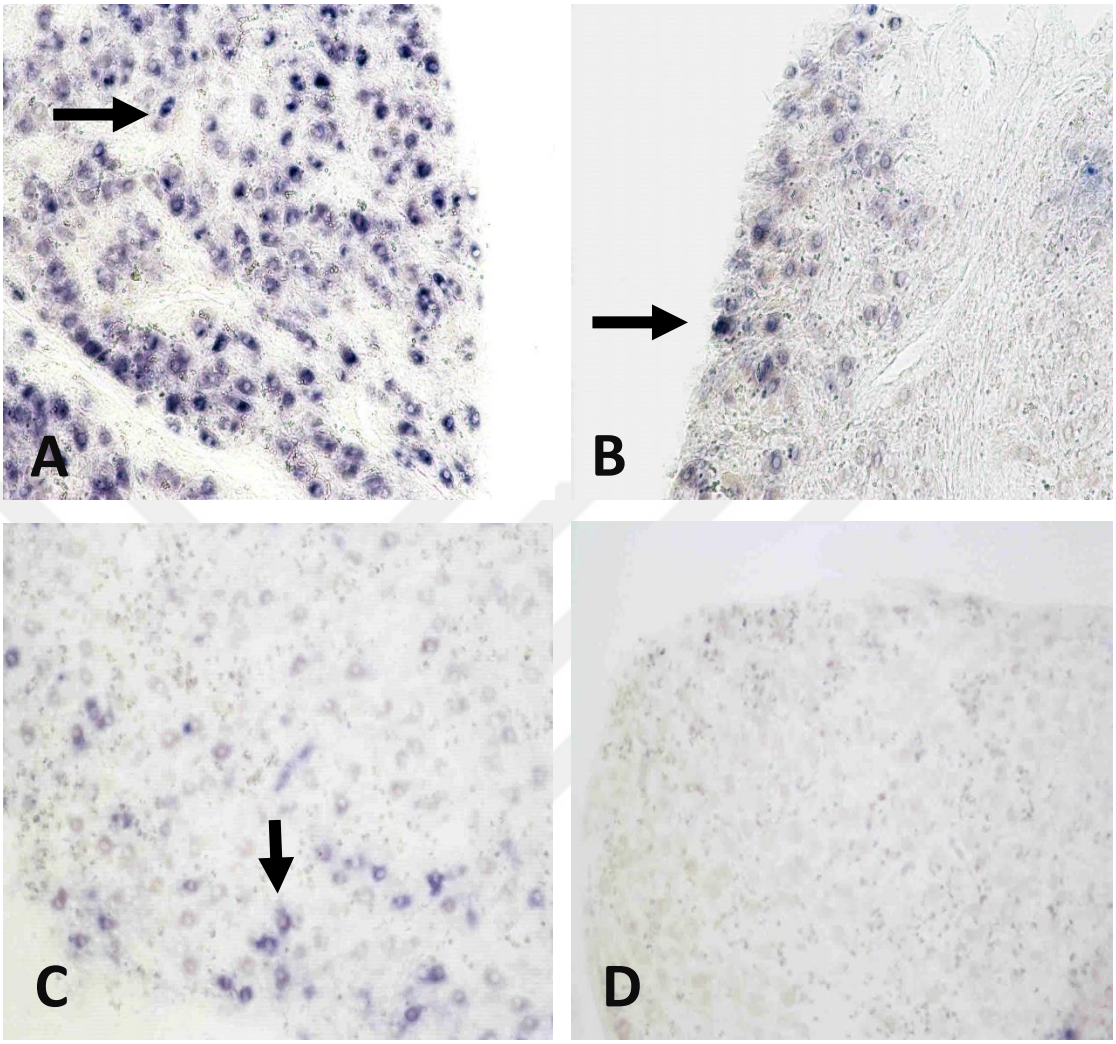
LXRβ mRNA S12. gün ve PG4'de luteal hücrelerde tespit edilmesine rağmen S16. günde tespit edilemedi (Şekil 3. 22.). Ayrıca, luteal hücrelerde LXRα ve PG4'de ABCA1 mRNA'sı tespit edildi (Şekil 3.23). Diğer bazı gruplarda probların teknik olarak çalışmadığı için görüntüler tespit edilemedi.



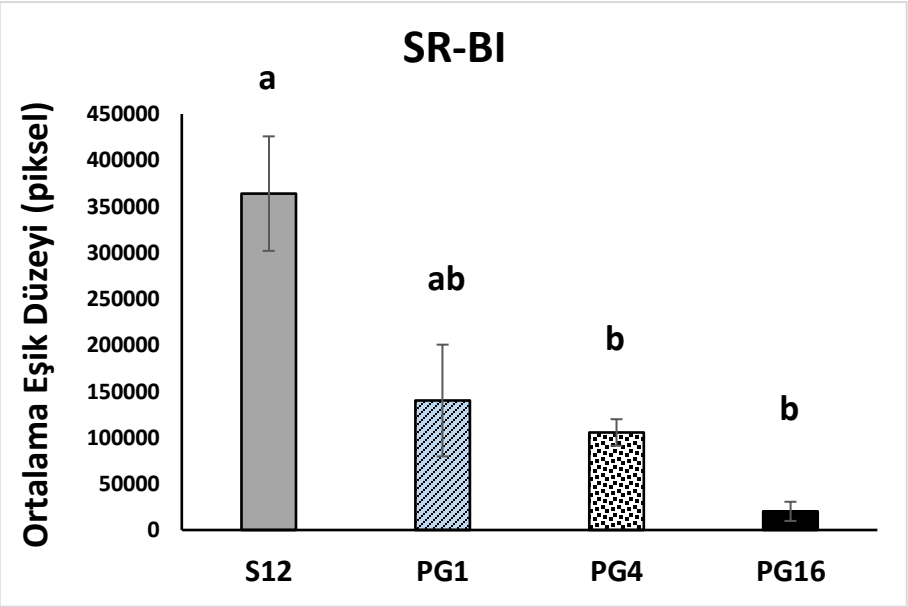
Şekil 3.18. İn situ hibridizasyonda StAR probun boyanması (20X büyütme). A) S16. günde (luteolizis) in situ transkripsiyon, B) G16'da in situ transkripsiyon, S16: Siklik 16, G16: Gebelik 16. gün, Oklar: luteal hücreleri göstermektedir.



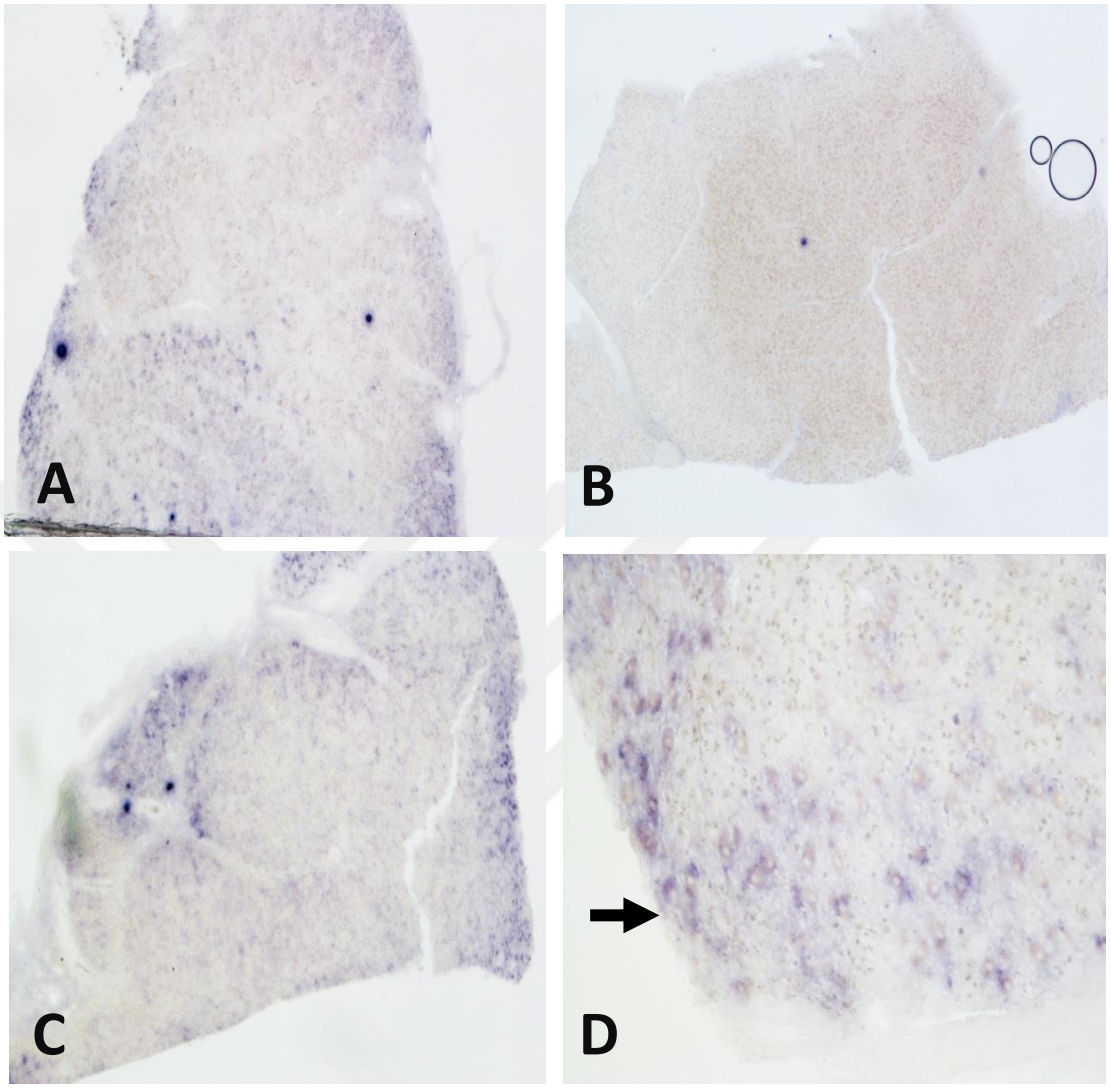
Şekil 3.19. Ortalama eşik düzeyin üzerinde (piksel) StAR probu transkripsiyon miktarı. S16. günde (luteolizis) in situ transkripsiyon, G16'da in situ transkripsiyon, *: İstatistiki açıdan önemlidir (P<0,05).



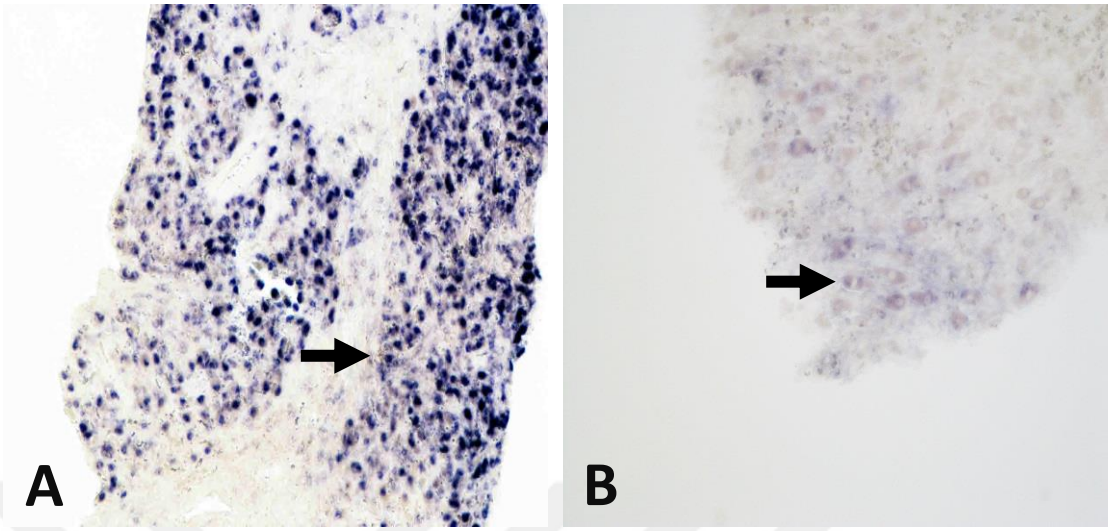
Şekil 3.20. İn situ hibridizasyonda SR-BI probun boyanması (20X büyütme). A) S12. günde (Kontrol) in situ transkripsiyon, B) PG1'de in situ transkripsiyon, C) PG4'de in situ transkripsiyon, D) PG16'da in situ transkripsiyon. S12: Siklik 12, PG1: Bir saat prostaglandin, PG4: Dört saat prostaglandin, PG16: On-altı saat prostaglandin, Oklar: luteal hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.21. Ortalama eşik düzeyin üzerinde (piksel) SR-BI probu transkripsiyon miktarı. S12: Siklik 12, PG1: Bir saat prostaglandin, PG4: Dört saat prostaglandin, PG16: On-altı saat prostaglandin
[a,b]: İstatistiki açıdan önemlidir ($P<0,05$).



Şekil 3.22. İn situ hibridizasyonda LXRβ probun boyanması. A) S12. günde (Kontrol) in situ transkripsiyon (4X büyütme), B) S16'da in situ transkripsiyon (4X büyütme), C) PG4'de in situ transkripsiyon (4X büyütme), D) 20X büyütme in situ transkripsiyon. S12: Siklik 12, S16: Siklik 16 (luteolizis), PG4: Dört saat prostaglandin, Ok: luteal hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.23. İn situ hibridizasyonda probun boyanması. A) LXRα prob transkripsiyonu (10X büyütme), B) PG4'de ABCA1 probu transkripsiyon (20X büyütme). PG4: Dört saat prostaglandin, Oklar: luteal hücreleri göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Memeli hayvanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmaların sonuçları fizyolojik ve patolojik yolakların araştırılmasına önemli katkılar sağlamaktadır. Bilimsel araştırma ve çalışmalarda model organizmalar hücre, doku, organ ve sistem temelinde fonksiyonel tanı yöntemlerin geliştirilmesi ve hastalıkların tedavisine kadar olan süreçte önemli avantajlar sağlamaktadır. Ayrıca, *in vitro* deney modelleri insan vücudunun kompleksliğini tam olarak yansıtmadığı için deneysel hayvan modelleri biyomedikal araştırmalarda sıkça kullanılmaktadır (Calasans-Maia ve ark 2009).

Deney hayvan modeli kullanımında hayvanın türü ve insanlar arasındaki benzerlikler göz önünde bulundurulmalıdır (Henry ve ark 2002). Ayrıca, havyana ait anatomik, fizyolojik ve davranışsal özellikler çalışmalara verisel anlamda olumlu katkılar sağlayacaktır (Johnson ve Besseisen 2002, De Aguilar-Nascimento 2005). Deney hayvanları arasında koyun; kolayca ulaşılabilir olması, hastalık mekanizmalarının moleküler olarak insana benzer oluşu ile (Agerholm 2007) ve hayvan refahı açısından medikal araştırmalar için idealdir (Turner 2007). Ayrıca, pre-klinik denemelerde koyun kullanımı bazı kompleks ve Mendelian kalıtım gösteren genetik hastalıkların patolojisini anlamamızı geliştirmiştir (Rezapour ve ark 2007). Katarakt (Morton ve ark 2013) ve hemofili (Porada ve ark 2010, 2011) gibi kalıtsal hastalıklarda terapilerin test edilmesinde koyun modelleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte, insanlarda görülen bazı nadir genetik (Tay Sachs) hastalıklarda model olarak kullanılmaktadır (Porter ve ark 2011).

Son zamanlarda yapılan çalışmada, koyunun kemik rejenerasyonu ve dental implant uygulamalarında biyomateryallerin değerlendirilmesinde mükemmel bir hayvan modeli olabileceği öngörülmüştür (Sartoretto ve ark 2016). Ayrıca, Huntington hastalığının test edilmesi için koyunun alternatif transgenik model olabileceği vurgulanmıştır (McBride ve ark 2015). Koyunlarda moleküler olarak kistik fibrozis allel (Van der Velden ve ark 2011) modeli geliştirilebileceği ve gen terapilerinin kullanılarak hastalığın etkilerinin hafifletilmesinde koyunun merkezi bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (McLachlan ve ark 2011, Alton ve ark 2013).

Hücre kültür sistemlerinde KL'nin küçük ve büyük luteal hücreleri ve aynı zamanda endotelyal hücreleri arasında hücre-hücre kontağı, gap junction ve sinyal iletişiminde farklılıklar bulunmaktadır (Okuda ve ark 2004, Sen ve ark 2006, Korzekwa ve ark 2008). Ayrıca, $PGF_{2\alpha}$'nın luteolitik etkisi için endotelyal ve immün hücrelerin steroidogenik KL hücreleri ile hücre-hücre kontağı ve interaksiyonu gereklidir. Ginther ve ark (2009) *in vitro* koşullarda $PGF_{2\alpha}$'nın farmakolojik olarak doz bağımlı fizyolojik olmayan etkileri olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, $PGF_{2\alpha}$ ile *in vivo* olarak tetiklenen olaylar *in vitro* olarak taklit edilememektedir (Davis ve Rueda 2002). Heterojen hücre gruplarından oluşan ve endokrin olarak hormonal kontrol altında olan KL'nin fizyolojik şartları sağlayabilmesi için en uygun hayvan modelinin seçimi elzemdir. Ayrıca, östrus siklusunun kolayca senkronize edilerek KL'nin istenen siklik özelliklerde elde edilebilmesi nedeni ile çalışma modeli olarak koyunun seçilmesi uygun bulundu.

Bu çalışma için iki araştırma modeli geliştirildi. Birinci araştırmada erken gebelik günleri (G12, G16 ve G22) ve denk gelen doğal luteolizis (S16) günü çalışmaya dahil edildi (Şekil 2.1.). İkinci araştırmada, koyunların östrus belirtilerini göstermesinin ardından, mid-luteal 12. günde koyunlara luteolitik dozda $PGF_{2\alpha}$ enjekte edildi ve bir, dört ve on-altı saat (PG1, PG4 ve PG16) sonunda KL dokuları toplandı (Şekil 2.2.). Birinci araştırmada, doğal luteolizis günü ve gebelik günlerinde LXR yolağına ait genlerinin ekspresyon ve protein seviyesinin yanısıra, steroidogenik ve kolesterol uptake yolağındaki genlerin ekspresyonu belirlendi.

İkinci araştırmada PG1, PG4 ve PG16 gruplarında LXR, steroidogenik ve kolesterol uptake yolakları değerlendirildi. Bu gruplara mid-luteal 12. günde uygulanan $PGF_{2\alpha}$ ile uyarılan fonksiyonel luteolizisin bu günde değerlendirilmesinin önemli olabileceği bildirilmiştir (Moor ve ark 1970). Ayrıca, koyunlarda $PGF_{2\alpha}$ ilk pik dalgası 12. günde meydana gelmektedir (Goding ve ark 1973). İkinci araştırmaya dahil edilen koyunlardan KL dokuları, ovaryumun uterus bağlantılarından ayrırarak uygun şekilde diseke edildi (Şekil 2.3.). Koyunlarda luteolizis, farklı saatlerde: Towle ve ark (2002) (1, 8, 16 ve 24. saat), Ricke ve ark (2002) (1, 2, 4, 6, 12, 24, ve 48. saat), Seto ve Bogan (2015) (12, 24, 48. saat) $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenmiştir. cFOS ve cJUN $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde gen ekspresyonun erken yanıtına bağlı olarak KL sağkalımı için ekspresyonunu artırmaktadır:

$PGF_{2\alpha}$ ile muamele edilen luteal hücrelerde cFOS ekspresyonu 30 dk içinde artmıştır (Chen ve ark 2001). Aynı şekilde, düşük dozlarda intrauterin $PGF_{2\alpha}$ infüzyon edilen sığırlarda cFOS ekspresyonun artışı gösterilmiştir (Atli ve ark 2012). $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında cFOS eskpresyonu PG1'de S12'ye göre önemli derecede artmıştır. Aynı, şekilde PG4 ve PG16'da cFOS ekspresyonu S12'ye göre yukarı yönde düzenlenmiştir. Bu açıdan, çalışmamızda $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu ile mimiklenen PG1, PG4 ve PG16 gruplarında cFOS ekspresyonunun artışıyla luteolitik fizyolojiyinin mimiklendiği tespit edildi.

Gen ekspresyon farklıklarının değerlendirilmesinde RT-qPZR en güncel teknikler arasında yer almaktadır (Bustin 2002, Pusterla ve ark 2006). RT-qPZR kullanılarak elde edilen gen ekspresyon datalarından yararlanabilmek için, RNA kalitesi, başlangıç materyali, primer dizaynı ve RNA ekstraksiyonu gibi değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır (Ginzinger ve ark 2002). Farklı hücre ve doku örneklerinde gen ekspresyonlarının değerlendirilmesinde değişkenlerin etkisi housekeeping genin (HKG, referans gen) hedef gen normalizasyonuyla giderilmektedir (Dheda ve ark 2004). Bundan dolayı, RT-qPZR metodunda HKG'nin belirlenmesi önemli bir süreçtir (Dheda ve ark 2004, Kayis ve ark 2011, Yigin ve ark 2017). HKG seçiminde; varyasyon ve ikili aritmetik ortalama değerlerinin kombinasyonu ile oluşturulan M değerini kullanan geNorm (geNorm;http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm) ve alt gruplar arasında varyasyon değerini kullanan NormFinder (http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm) programları kullanılmıştır (Vandesompele ve ark 2002, Andersen ve ark 2004).

İki araştırmadaki gen ekspresyon farklıklarının değerlendirilmesi için dört HKG'den en uygun referans seçildi (Çizelge 2.2). Araştırma gruplarında gen ekspresyon farklılıkların değerlendirilmesinde bütün HKG'lerin uygun birer referans gen olabileceği tespit edilmesine rağmen, YWHAZ'ın luteolizis gruplarında, GAPDH'ın ise gebelik grupları arasında en iyi referans gen olabileceği bulundu (Çizelge 3.2.). Ayrıca, RT-qPZR etkinliği çalışmada kullanılacak olan primerin etkinliğine de bağlıdır (Bustin ve ark 2009). Primer optimizasyonunda bağlanma sıcalıklığı göz önünde bulunarak Cq değerleri, siklus sayısı ve erime eğrisi çalışmalara dahil edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Ririe ve ark 1997). Bundan dolayı, RT-qPZR çalışmalarını standardizasyona bağlıyan MIQE

kılavuzuna (Kantitatif RT-qPZR deneylerinin yayınlanmasında miminumum gereklilikler) (Bustin ve ark 2009) çalışma süresince mutabık kalındı. Minimum gerekliliklerin yerine getirilmesinde; RNA izolasyonu Kurar ve ark (2010) tarafından yapıldığı gibi Trizol yöntemi ile gerçekleştirildi. RNA kalitesi (Şekil 2.4.), primer dilusyonu (Şekil 2.5.), primer etkinliği (Şekil 2.6.) ve erime eğrisinin (Şekil 2.7.) belirtilen şartları taşıdığı saptandı.

Çalışmada, ilgili genlerin potein seviyeleri western blot tekniği ile değerlendirildi. Bunun için her iki araştırmadaki gruplardan KL proteini izole edilerek, herbir KL protein örneği SDS-PAGE jelde yürütüldü (Şekil 2.9.A) ve protein bantları belirlendi. Jel üzerinde yürütülen proteinler membran üzerine semi-dry yöntem ile transfer edildi ve transferin gerçekleşip gerçekleşmediği Ponceau-S boyama (Şekil 2.9.B) yöntemi ile doğrulandı. Son olarak, ilgili genlerin proteinleri primer ve sekonder antikorlar ile membran üzerinde blotlandı. Membran üzerinde blotlanan proteinler chemiluminescence yöntem ile tespit edildi (Thorpe ve ark 1985).

Steroidogonez süresince kolesterol kaynağı olarak hücre membranları, kolesterol esterleri ve dolaşımdaki lipoproteinlerden yararlanılmakta ve *de novo* biyosentez yolağı kullanılmaktadır (Diaz ve ark 2002). Luteal hücreler için başlıca kolesterol kaynağı lipoproteinlerdir ve ruminantlar özellikle HDL'yi kullanmaktadır (Grummer ve Carrol 1988, Wiltbank ve ark 1990). Luteinizasyonundan sonra *in vivo* ve *in vitro* şartlarda granuloza hücrelerinde HDL reseptörlerinin önemli derecede arttığı bildirilmiştir (Rajapaksha ve ark 1997, Li ve ark 1998).

LDL' nin luteal steroidogenez için bir kolesterol kaynağı olarak kullanılması türler arasında farklılık gösterir (Brannian and Stouffer 1993). Özellikle, insan luteal hücrelerinde steroid sentezi için kolesterol kaynağı olarak LDL ve luteinize granuloza hücrelerinde ise HDL'ye gereksinim duyulmaktadır (Azhar ve ark 1998). Hormonel olarak, LDLR ve SR-BI ekspresyonu gonadotropin uyarımı ve kolesterol deplesyonuna bağlı olarak artmaktadır (Lopez ve McLean 1999, Sekar ve Veldhuis 2004). Rodent ovaryumunda, LH' nin SR-BI ve HDL ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir (Chen ve Menon 1994). *Rhesus makak* granuloza hücrelerinde, hCG uyarımından 24 saat sonra *in vivo* ve *in vitro* olarak SR-BI ve LDLR ekspresyonunda hızlı bir artış tepit edilmiştir

(Cherian-Shaw ve ark 2009). Sunulan bu çalışmada; LDLR gen ekspresyonunun gebeliğin 22. gününde 12. güne göre fazla olduğu bulunmuştur. Ancak steroidogenik aktivitenin yüksek olduğu 16. günde 12. güne göre fark gözlemlenmemiştir. Bununla birlikte; gebeliğin 16. gününde LDLR ekspresyonunun siklusun 16. gününe göre fazla olduğu bulunmasına rağmen erken gebelik 12. gün ile siklus 12. gün arasında fark bulunamadı. Gebelik ve siklik 12. günde progesteron düzeyleri fizyolojik olarak birbirine benzerdir. Ancak, gebelik günlerinin ilerlemesiyle birlikte progesteron ihtiyacı artmaktadır ve steroidogenik yolağın gen ekspresyonu önemli derecede artmıştır. Bundan dolayı LDLR ekspresyonu 22. günde önemli derecede artmıştır. Ayrıca, LDLR ve SR-BI birbiri ile aynı yönde çalıştığından dolayı, gebelik 16. günde SR-BI ekspresyon artışı kolesterol esterlerinin luteal dokuya alınmasını telafi ederek luteal steroidogenezin sürdürülmesini sağlıyor olabilir

Steroidogenezin aksine, koyunlarda LDLR mRNA seviyesinin $PGF_{2\alpha}$ uyarımından sonra azaldığı bildirilmiştir (Tandeski ve ark 1996). Makak KL'de doğal ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonisti ile indüklenmiş luteolizis sırasında LDLR mRNA seviyesi azalmasına karşın, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis sırasında değişiklik gözlenmemiştir (Bishop ve ark 2011). Aynı şekilde GnRH antagonisti ile indüklenen makaklarda LDLR mRNA seviyesi azalmıştır (John ve ark 2016). Sığır KL'de luteal transkriptomun araştırıldığı çalışmada; 11. günde uygulanan $PGF_{2\alpha}$'dan 24 saat sonra LDLR mRNA'sının refraktör dönem olan ve steroidogenik aktivitenin neredeyse olmadığı 4. güne göre kıyasla azaldığı rapor edilmiştir (Mondal ve ark 2011). Son yıllarda koyunlarda ve sığırlarda yapılan çalışmalarda da luteolizis esnasında LDLR ve SR-BI'in mRNA ve protein ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir: Koyunlarda, regresyon 16. günde LDLR mRNA ekspresyonu azalmıştır. Ancak, regresif sığırlarda LDLR mRNA'sı seviyesi azalmazken protein ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur. Yine bu çalışmada, $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenmiş luteolizisde 12, 24 ve 48. saatlerde LDLR ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Sığırlarda $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde ise 0, 2 ve 4. saatlerde bir azalış gözlemlenmezken 12. saatte LDLR ekspresyonu azalmıştır (Seto ve Bogan 2015, Horihata ve ark 2016). Yine sığırlarda yapılan başka bir çalışmada, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde LDLR ekspresyonunun 2 ve 4. saatlerde azaldığı ancak, SR-BI ekspresyonunun değişmediği bulunmuştur (Bowdridge ve ark 2015). Sunulan bu

çalışmada: doğal luteolizis siklik 16'da siklik 12'ye göre LDLR ekspresyonu önemli derecede azalmıştır. $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG1'de siklik 12'ye göre fark gözlemlenmezken, literatürden farklı olarak PG4'de LDLR ekspresyonun azaldığı bulundu ve aynı ekspresyon azalışı PG16'da devam etti. Koyunlarda indüklenmiş luteolizis sonrasında progesteron miktarının dört saat ve sonrasında önemli derecede azaldığı bildirilmiştir (Rexroad ve Guthrie 1979, Juengel ve ark 1995, Seto ve Bogan 2015). Ruminant türleri arasında kolesterolün luteal dokuya alımında HDL reseptörü önemli rol oynamaktadır. Ancak, fonksiyonel luteolizisden yapısal luteolizise geçiş zamanı tam olarak bilinmediğinden dolayı, çalışmamızda PG4'deki LDLR mRNA ekpsresyonunun baskılanması fonksiyonel luteolizis için önemli bir belirteç olabilir. Ayrıca, literatürden farklı olarak çalışmamızda LDLR ve SR-BI ekspresyonun birbirine korele olarak azalması luteal dokunun luteolizisle birlikte hücre içine kolesterol alımını durdurmaya başladığını düşündürmektedir.

Ovaryumda gelişmekte olan folliküllerin teka ve interstisyel hücrelerinde (Svensson ve ark. 1999, Li ve ark 2001) SR-BI ekspresyonu in situ hibridizasyonla ortaya koyulmuştur (Svensson ve ark 1999, Li ve ark. 2001). Rat ve sığır (Argov ve ark 2004) ovaryum folikülerinin gelişmesiyle birlikte SR-BI transkript seviyesi artmaktadır (Rajapaksha ve ark. 1997). KL oluşumunun geç fazında SR-BI gen ekspresyonunda belirgin bir artış tespit edilmiştir (Johnson ve ark 1998). Aynı zamanda, ratlarda metöstrus sırasında yeni gelişen KL'de steroidogenik yolaktaki SR-BI, StAR, CYP11A1 ve 3β-HSD gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Taketa ve ark 2012). Domuz KL'sinde luteinizasyon sırasında SR-BI ve LDLR ekspresyonu önemli derecede artmıştır (Miranda-Jiménez ve Murphy 2007). Ayrıca, domuz KL'sinde gebelik 14. günde SR-BI ekspresyonunun gebelik 12. güne daha fazla olduğu bulunmuştur (Przygrodzka ve ark 2016). Koyunlarda mid-luteal (8-10. gün) ve sığırlarda mid-luteal (8-12. gün) ve geç (15-17) KL'de SR-BI ekspresyonu önemli derecede artmıştır (Seto ve Bogan 2015; Horihata ve ark 2016). Sunulan bu çalışmada; SR-BI ekspresyonu gebelik 16 ve 22. günde gebelik 12'ye göre önemli derecede artmıştır. Gebelik 16. günde implantasyonun sürdürülmesi için koyunlarda progesteron sentezi artmaktadır (Arianmanesh ve ark 2011, Lee ve ark 2016). Bundan dolayı, luteal dokuda steroidogenez yolağının aktif tutulması için gerekli olan kolesterolün alımı SR-BI ekspresyon artışı ile sağlanmaktadır. Ancak gebelik 16 ve

22. gün arasında bir fark bulunmadı. Steroidogenik aktivitenin arttığı ve kolesterol alınımında ihtiyaç duyulduğu gebelik 16'da siklik 16'ya göre önemli derecede artış vardır. Siklik 16. günde luteolizis meydana gelmektedir ve luteal hücreler kolesterolü progesterona dönüştüremediğinden dolayı luteolizis gününde SR-BI aracılı olarak kolesterol alımı baskılanmış olabilir. Ancak steroidogenik aktivitenin benzer olduğu gebelik 12 ve siklik 12 arasında fark bulunmamıştır.

Ancak regresif KL'de fonksiyonel KL'ye kıyasla SR-BI düzeyi azalmıştır (LaVoie ve ark 1997). Luteal dokuda steroidogenik aktivitenin sürdürülmesi için gerekli olan progesteron üretimi luteolizis ile baskılanmakta ve bu yolaktaki genlerin ekspresyonu azalmaktadır. Bundan dolayı, luteal dokuda StAR kolesterolü mitokondriye taşıyamamaktadır ve bu yüzden luteolizis süresince SR-BI ekspresyonu baskılanıyor olabilir. *Rhesus makak* KL'sinde fonksiyonel regresyon sırasında SR-BI ve LDLR mRNA seviyelerinin azaldığı bildirilmiştir (Bogan ve ark 2009; Bogan ve Hennebold 2010). Benzer şekilde, maymunlarda luteolizis sırasında SR-BI mRNA ekspresyonu azalmıştır (Kunal ve ark 2012). Bufalolarda $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis 3 ve 6. saatte SR-BI ve StAR ekspresyonunda fonksiyonel luteolizis açısından fark gözlemlenmemiştir (Shah ve ark 2014). Koyunlarda spontan luteolizisde (14-16) SR-BI ekspresyonu azalmıştır. Ayrıca, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında da (12, 24 ve 48 saat) SR-BI mRNA ve protein ekspresyonu azalmıştır (Seto ve Bogan 2015). Ancak sığırlarda, regresif KL'de SR-BI mRNA ekspresyonu değişmezken, protein seviyesi azalmıştır. Ayrıca, sığırlardaki bu çalışmanın $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında da (0, 2, 4, 12, 24) SR-BI ekspresyonu değişmemiştir. Ancak protein seviyesi 12. saatten sonra azalmaya başlamıştır (Horihata ve ark 2016). Sunulan bu çalışmada; SR-BI ekspresyonu spontan luteolizisin meydana geldiği siklik 16'da siklik 12'ye göre önemli derecede azalmıştır. $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG1'de SR-BI ekspresyonu değişmemiştir. Ancak, SR-BI ekspresyonu PG4 ve PG16'da önemli derecede azalmıştır. Ayrıca, SR-BI mRNA' sının PG4 ve PG16 luteal hücre lokalizasyonlarında da azaldığı gösterildi. SR-BI mRNA'sının PG1 luteal dokudaki transkripsiyonunun azaldığı istatistiksel olarak belirlenemesede, luteal hücrede lokalizasyonu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde SR-BI ekspresyonunun daha erken saatlerde azaldığı gösterildi.

Bundan dolayı, hem spontan hemde $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında luteal doku kolesterol alımını azaltarak fonksiyonel luteolizise kendini hazırlıyor olabilir.

İnsan ovaryumunda luteal faz süresince StAR ekspresyonu düzenlenmektedir ve KL'nin oluşumu ve sağ kalımı süresince luteal progesteron üretiminde önemli rol oynamaktadır (Devoto ve ark 2002, Kohen ve ark 2003, Sierralta ve ark 2005). Birçok memeli türünde StAR mRNA ve proteini teka hücrelerinde eksprese olmasına rağmen, StAR LH pikinden önce sağlıklı granuloza hücrelerinde anlamlı olarak eksprese olmamaktadır (Bao ve Garverick 1998, Ronen-Fuhrmann 1998, Bonnet ve ark 2008). Sığır granuloza hücrelerinde erken KL'de StAR mRNA seviyesi çok düşük olmasına rağmen, orta ve mid-siklus ile birlikte gebelikte maksimum seviyeye ulaşmaktadır (Hartung ve ark 1995). Ayrıca, dolaşımdaki progesteron seviyesi ve StAR ekspresyonu arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (Yadav ve Medhamurthy 2006). Domuzlarda, erken gebelik P4 artışına bağlı olarak StAR ekspresyonunun gebelik 14. günde 12. güne göre daha fazla olduğu bulunmuştur (Przygrodzka ve ark 2016). Sunulan bu çalışmada; steroidogenik aktivitenin yüksek olduğu gebelik günleri 16 ve 22'de StAR ekspresyonu önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca, embriyonun varlığına bağlı olarak progesteron artışının sürdürülmesi için gebelik 16. günde siklik 16. güne kıyasla StAR ekspresyonu daha fazla artmıştır. Ancak, 12. günde progesteron miktarı değişmediğinden dolayı, çalışmamızda gebelik 12. günde StAR ekspresyonu siklik 12. güne göre değişmemiştir.

Kemik morfojenik proteinleri (BMP), tümör nekröz faktör alfa (TNFα) ve aktivin A gibi faktörlerin StAR ekspresyonuna inhibitor etkisi olabilir (Chen ve ark 1999; Pierre ve ark 2004, Miyoshi ve ark 2006, Chang ve ark 2014). Kadınlarda ve granuloza hücrelerinde bazı BMP'lerin StAR ekspresyonunu ve progesteron üretimini baskılayarak luteolizise neden olduğu bildirilmiştir (Nio-Kobayashi ve ark 2015, Zhang ve ark 2015). $PGF_{2\alpha}$ StAR ekspresyonunu inhibe eder ve luteal regresyonun başlangıcında azalmasını sağlar (Chung ve ark 1998, Sandhoff ve McLean 1999). Koyun ve sığırlarda $PGF_{2\alpha}$ ile muamele edilen luteal hücrelerde StAR mRNA seviyesi azalmıştır (Juengel ve ark 1995, Pescador ve ark 1996). Ayrıca, farklı doz $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizisde de StAR ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Rickets ve ark 2006, Berisha ve ark 2010, Atli ve ark 2012). Sunulan çalışmada; doğal luteolizisde yani siklik16. günde StAR ekspresyonu

siklik 12'ye göre önemli derecede azalmıştır. Aynı şekilde, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG4 ve P16 gruplarında da StAR ekspresyonu azalmıştır. Ancak, $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan bir saat sonra StAR ekspresyonu daha azalmamıştır. Bunun muhtemel sebebi luteal hücrelerin hali hazırda steroidogenik kapasitesini koruyarak fonksiyonel luteolizis için hazır olmaması olabilir. Ancak, luteal dokuda $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan bir saat sonra cFOS ekspresyon artışının gözlenmesi luteal dokunun steroidogenik yolağın aksine regresyona karşı sağ kalım mekanizmasını etkin hale getirmeye çalıştığını akla getirebilir.

Progesteron üretiminde ikinci aşama, iç mitokondriyal membranda bulunan kolesterolün P450scc enzimi ile katalize edilerek pregnenolona dönüştürülmesi ve daha sonra düz endoplazmik retikulumda bulunan 3β-HSD ile katalize edilen progesteronun elde edilmesidir. StAR ve P450scc ekspresyonu sığırlarda luteal gelişim süresince seviyesi kademeli bir artış gösterir (8-12. günler arası) ve mid-luteal fazda plato seviyesine ulaşır (Hartung ve ark 1995). P450scc regülasyonu StAR ile birçok yönden benzerlikler göstermektedir. P450scc mRNA ve proteini ovulatör LH surge'ünden önce foliküler teka ve bazı granuloza hücrelerinde mevcuttur; luteinizasyon süresince P450scc seviyesi artarken, fonksiyonel KL'de seviyesi idame ettirilir ve regresyonla birlikte P450scc seviyesi düşmektedir (King ve LaVoie 2012). Sığırların geç ovulatör folikülünde P450scc mRNA seviyesi geçiçi olarak downregüle olmaktadır (Voss ve Fortune 1993). Rodentlerde gebelik şekillenince P450scc KL'de temel olarak eksprese olmaktadır (Goldring ve ark 1987). StAR' a benzer olarak, LH ve eksojen hCG P450scc mRNA ve protein seviyesini artırmaktadır (King ve LaVoie 2012). Sunulan bu çalışmada; StAR ekspresyonuna benzer şekilde P450scc ekspresyonu gebelik gruplarında (G16 ve G22) artmıştır. Ayrıca, StAR ekspresyonu gebelik 16'da siklik 16'ya göre artmış ve StAR mRNA'sının luteal hücrelerde ki lokalizasyonunda transkripsiyonu siklik 16'ya göre daha fazladır. Ancak, gebelik 12'de siklik 12'ye göre StAR ekspresyonunun değişmediği bulundu.

Ancak, P450scc mRNA seviyesi TNFα, bazı BMP'ler ve luteolitik $PGF_{2\alpha}$ tarafından baskılanmaktadır (Li ve ark 1993, Tian ve ark 1994, Otsuka ve ark 2001). Bufalolarda, P450scc, StAR ve 3βHSD mRNA seviyesi olgun KL'de artmasına rağmen regresyon süresince azalmıştır (Kumar ve ark 2012). Ayrıca, bu genlerin ekspresyon

seviyesi progesteron üretimini de yansıtmaktadır (Mizutani ve ark 2015). Yine farklı doz $PGF_{2\alpha}$ ile indüklenen sığır KL'sinde P450scc ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Atli ve ark 2012). Sunulan bu çalışmada; doğal luteolizis siklik 16. günde siklik 12'ye kıyasla P450scc ekspresyonu azalmıştır. Aynı şekilde, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG4 ve PG16 gruplarında PG1'e göre azalmıştır. Ancak, S12'ye göre PG1'de P450scc ekspresyonunda fark bulunamamıştır.

3βHSD teka hücrelerinin gelişen foliküllerinde ve ovülatör periyottan önce granuloza hücrelerinin büyüyen foliküllerinde eksprese olmaktadır. Ayrıca, fonksiyonel luteal hücrelerde geniş oranda dağılmıştır ve regresyonla birlikte mRNA seviyesi azalır (Patwardhan ve Lanthier 1980). StAR ve P450scc'ye benzer olarak, LH ve eksojen hCG periovulatör periyot süresince granuloza hücrelerinde 3βHSD transkriptinin potansiyel indükleyicisidir (King ve LaVoie 2012). Ancak, hCG ile muamele edilen gebe koyunlarda P4 seviyesi artmasına rağmen 3βHSD ekspresyonunun değişmediği gözlenmiştir. (Coleson ve ark 2015). Domuzlarda erken gebelik sırasında 3βHSD ekspresyonun arttığı bildirilmiştir (Przygrodzka ve ark 2016). BMP ve luteolitik $PGF_{2\alpha}$ 3βHSD mRNA ekspresyonunun inhibitörüdür (Tian ve ark 1994, Otsuka ve ark 2001, Brankin ve ark, Rekawiecki ve ark 2005). Ayrıca, koyunlarda luteolizisin indüklenmesiyle birlikte 3βHSD ekspresyonu bir saat içinde azalmıştır (Hawkins ve ark 1995). Sunulan bu çalışmada: steroidogenik kapasitesinin yüksek olduğu gebelik (G16 ve G22) günlerinde 3βHSD ekspresyonu artmıştır. Gebelik 12'de steroidogenik aktivite siklik 12'ye benzer olmasına rağmen 3βHSD ekspresyonu artmıştır. Bu artışın sebebi, luteal hücrelerin proliferasyonuna bağlı olarak steroidogenik markır 3βHSD ekspresyonunu up-regule etmesi olabilir (Yoshioka ve ark 2013). Yine aynı şekilde, 3βHSD ekspresyonu gebelik 16'da luteolizis günü siklik 16'ya göre oldukça fazladır. Ancak, doğal luteolizis siklik 16. günde steroidogenik kapasitenin azalmasına bağlı olarak 3βHSD ekspresyonuda azalmıştır. Ayrıca, luteolizis indüklenmiş gruplarda da (PG1, PG4 ve PG16) 3βHSD ekspresyonu önemli derecede azalmıştır. Steroidogenik yolağın gebeliğin günlerine bağlı olarak arttığı ve luteolizisle birlikte azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında bu genlerin azalışı tutarlı olarak deney gruplarının hipotezin doğru olarak gerçekleştirilmesini sağlamıştır.

Son zamanlarda farelerde yapılan *in vivo* bir çalışmada, LXR aracılı olarak uyarılan hücre apoptozunda kolesterol eflux proteini ABCA1'in gen ifade seviyesinin düşük olduğu gözlenmiştir (Fond ve ark 2015).

Bu çalışmada, APOE ve ApoA-I ekspresyonları KL dokularında birbirine zıt olarak ifade olmaktadır: APOE ekspresyonu erken KL'den başlayarak regrese KL'ye doğru artmaktadır. Ancak, ApoA-I ekspresyonu ise erken KL'den başlayarak regrese KL'ye doğru azalmaktadır (Bogan ve Hennebold 2010). ApoA-I eksresyonunu gebelik ve siklik dönemlerde tespit etmiştir: Ancak, ApoA-I ekspresyonunun siklik ve regrese dönemlerde değişmediğini bulmuştur. APOE sentezi ve ekspresyonunun ise siklik 2 ve 3. günlerde olduğunu ancak, KL' nin tam olarak geliştiği siklik ve gebelik günlerinde tespit etmemiştir (NdikumMoffor ve ark 1997). Başka bir çalışmada, koyunlarda: ApoA-I KL ekspresyonunun siklik 16. günde siklik 12'ye göre azaldığı bildirilmiştir. Ancak, gebeliğin 16. gününde siklik 16. güne kıyasla ve ayrıca diğer gebelik 20. günün gebelik 16. ve 12. güne kıyasla fazla olduğu gösterilmiştir (Arianmanesh ve ark 2011).

LXR'lerin karaciğer ve diğer organlardaki rolü açıklanmış olsa da üreme sisteminde nasıl bir rol aldığı kesinliğe kavuşmamıştır ve bu konuda sınırlı veri bulunmaktadır. Gebelik KL dokusunda LXR yolağında bulunan LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 genlerinin ekspresyon ve protein seviyeleri ilk defa tespit edilmiştir ve bu konuda veri bulunmamaktadır. Steroidogenik aktivitenin arttığı gebelik günleri 16 ve 22. günde LXRα, ABCA1, ABCG1, APOE ve ApoA-I'in ekspresyonu gebelik 12'ye göre değişmemiştir. Luteal doku bu gebelik günlerinde kolesterol alımı ve progesteron üretimi için steroidogenik yolağı aktif olarak kullanmaktadır. Bundan dolayı, gebelik luteal dokuları kolesterol efluks yolağını ikinci planda tutarak kolesterolden yararlanmayı ve KL'nin sağ kalım şansını artırıyor olabilir. Ancak, LXRβ ekspresyonu gebelik 22. günde gebelik 12'ye oranla artmıştır. Bu nedenle, gebelik 22. gündeki LXRβ ekspresyon artışı luteal dokuyu kolesterolün aşırı birikiminden koruyor olabilir. Ayrıca Adrenal hücrelerde LXR sinyalizasyonunun adrenal hücreleri kolesterolün aşırı birikiminden koruduğu ve steroidogenik yolağı uyardığı bildirilmiştir (Cummins ve ark 2006). Gebelik 16. günde siklik 16. güne göre LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 ekspresyonu değişmemiştir. Ancak, ABCA1 ve LXRβ protein seviyesi artmıştır. Bu artışın sebebi, LXRβ'nın sürekli

olarak her dokuda ekspresyon artışı göstermesi ve ABCA1 transportırının sterodigenik aktiviteyi dengede tutmaya çalışıyor olabilir.

Nilsson ve ark (2007) LXR agonisti GW3965'in StAR ve P450scc'nin ekspresyonunu azalttığı ve böylece steroidogenik yolağa supresif etki gösterdiğini bulmuştur (Nilsson ve ark 2007). Peri-ovulatör fazdan ovulatör faza geçişin hCG ile indüklendiği makak granuloza hücrelerinde 3 saat içinde azalan LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 mRNA ekspresyonunun progesteron sentezini arttığı bildirilmiştir (Puttabyatappa ve ark 2010). Çalışmamızda gebelik günleri 12, 16, ve 22 arasında LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 protein seviyesinin, mRNA ekspresyon bulguları ile tutarlı şekilde düzenlenmektedir. Gebelik dokuları açısından kolesterol homeostazisinde kolesterol alımı ve steroidogenik aktivite ön planda tutulmaktadır. Literatürde sunulan veriler; kolesterol efluksunun azalarak, kolesterolün ortamda hali hazır tutulduğunu ve bundan dolayı progesteronun arttığını bildirmektedir. Ancak, gebelik luteal dokularında kolesterol efluksu açısından aşağı veya yukarı yönde önemli bir düzenlenme olmaması, LXR ve steroidogenik yolağın birbirinden bağımsız olarak kolesterol homeostazisine katkısı olduğunu akla getirebilir.

İnsan luteinize granuloza hücrelerinde yapılan çalışmada, LXR agonist ile uyarım sonucunda progesteron üretiminin azaldığı gözlenmiştir. Buna paralel olarak steroidogenezde yer alan StAR, P450scc gibi steroidogenik enzimlerin ekspresyon seviyesinin azaldığı ve steroidogenezis prekürsörü olan kolesterolün efluksunun arttığı bulunmuştur. Ancak, bu çalışmada LXR agonistinin 3βHSD ekspresyonunu değiştirmediği ve lipoprotein reseptörleri LDLR ve SR-BI ekspresyonuna etkisi gözlemlenmemiştir (Drouineaud ve ark 2007). Yine aynı şekilde, gebelikle birlikte lipoprotein reseptör aracılı olarak kolesterol alımı artmaktadır. Hatta, çalışmamızda LXR yolağının LDLR ve SR-BI kolesterol alımı açısından farklı bir düzenleme bulunmamaktadır. Bundan dolayı, kolesterol alım veya aktif steroidogenik faliyetlerin gebe KL dokusunda kolesterol birikimi meydana getirmeden düzenlendiği düşünülebilir.

Doğal luteolizis siklik 16'da LXRα ve ABCA1 ekspresyonu siklik 12'ye göre değişmezken, LXRβ, ABCG1, APOE ve ApoA-I ekspresyonu artmıştır. Ancak, LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 protein seviyesi siklik 16'da siklik 12'ye göre değişmemiştir.

Ayrıca, ABCG1 protein seviyesi koyun luteolizisinde ilk defa bu çalışmada gösterilmiştir. Luteolitik 16. günde LXRβ, ABCG1 mRNA ekspresyonu artmasına rağmen, LXRα ve ABCA1 ekspresyonu değişmemiştir ve hatta bu yolağın genlerinin protein seviyeleri iki grup arasında benzerdir Bundan dolayı kolesterol efluksunun ne kadar gerçekleştiği bilinmemektedir. Primatlarda yapılan bir çalışmada ise kolesterol alımının azalarak, efluksun arttığı kanıtlanmıştır: LXRα ve LXRβ mRNA ekspresyon seviyesinin regrese *rhesus makak* KL'sinde arttığını bildirmiştir. Ayrıca, regresyonla birlikte ABCA1 protein seviyesi artarken, ABGC1 protein seviyesi benzerdir (Bogan ve Hennebold 2010). Yine koyunlarda yapılan çalışmada, LXRα mRNA ekspresyon ve protein seviyesi spontan luteolizisde azalırken, LXRβ protein seviyeside azalmıştır. ABCG1 ekspresyon seviyesi değişmezken, ABCA1 ekspresyonu spontan luteolizis süresince artmıştır (Seto ve Bogan 2015). Sığırlarda, ABCA1 mRNA seviyesinin gelişen (5-7. gün) KL'de erken (2-3. gün) KL' ye göre daha fazla olduğunu göstermiştir. Ancak diğer KL günleri arasında (mid-luteal, geç ve regrese KL) fark bulunamamıştır. Ayrıca, ABCG1 ekspresyon seviyesi KL' nin siklik günlerinde değişmemiştir (Horihata ve ark 2016). Bu çalışmada ve diğer çalışmalarda, luteolizis süresince LXR yolağının genlerinin eş zamanlı olarak regule olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu yolağın aktif olarak luteal regresyonda rol alabileceği tartışmalıdır.

$PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis PG1'de LXRα ve ABCA1 ekspresyonu S12'ye göre azalırken, LXRβ ekspresyonu artmıştır. Ancak, ABCG1, APOE ve ApoA-I ekspresyonu değişmemiştir. Birinci saatte, luteal doku LXRα ve ABCA1 ekspresyonunu azaltarak luteal dokunun sağ kalımı için kolesterolün mevcut tutulmasını sağlıyor olabilir. Aynı zamanda $PGF_{2\alpha}$ indüklenmesinin ardından birinci saatte cFOS ekspresyonunun artması luteal hücrenin sağ kalım yanıtını artırmaktadır. Ancak, PG1'de LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 protein seviyesi değişmemiştir. LXRα, LXRβ ve APOE ekspresyonu PG4'de S12'ye göre azalmıştır. LXRα ekspresyonu PG1'e olduğu gibi PG4 grubunda da tutarlı olarak azalmıştır ve hatta LXRβ ekspresyonunun azalışıda buna eşlik etmiştir. Muhtemelen, fonksiyonel luteolizisin engellenmesi için kolesterolün luteal dokudan efluksu engelliyor olabilir. Ancak, PG16 ve S12 arasında LXRα, LXRβ ve APOE ekpresyonu değişmemiştir. ABCG1 ekspresyonu PG16'da S12 ve PG4 e göre artmıştır. Ancak, ApoA-I ekspresyonu PG4 ve PG16'da S12'ye göre azalmıştır. ABCA1

ekspresyonu luteolitik gruplar arasında değişmemiştir. Ayrıca, luteolitik gün ve gruplarda LXRα, LXRβ, ABCA1 ve ABCG1 protein seviyeside değişmemiştir. Çalışmada, luteal doku PG4'de steroidogenik yolağın aktivitesi baskılanmaya başlamıştır ve bu baskılanma PG16'da maksimum seviyeye çıkmıştır. Hatta luteal dokuya kolesterol alımıda baskılanmıştır. Bundan dolayı, KL dokusu PG16'da kolesterol miktarı az olduğu için kolesterolün reverz transportu LXR yolağı tarafından çok az düzenleniyor olabilir. Seto ve Bogan (2015) koyunlarda $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis 12, 24 ve 48. saatlerde; LXRα ve LXRβ ekspresyonunun değişmediğini bulmuştur. ABCG1 ekspresyonunun her iki luteolizis modelinde değişmediğini göstermiştir. Ancak ABCA1 ekspresyonu $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş 28 ve 48. saatlerde artmıştır. ABCA1 protein seviyeside indüklemiş luteolizis 48. saatte artmıştır. Ayrıca, 4. saatten itibaren progesteron seviyesi azalmaya başlamış ve 20. saatten sonra bazal seviyeye doğru inmiştir. Bununla birlikte SR-BI ekspresyonunun azalışı 12. saate gösterilmiştir (Seto ve Boga 2015). Sığırlarda, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis (0, 2, 4, 12, 24) gruplarında, ABCA1 ekspresyon seviyesi 2. saat ve 12. saate arasında azalmıştır. ABCG1 ekspresyon seviyesi KL'nin siklik günlerinde değişmezken, $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş 12. saate artış saptanmıştır (Horihata ve ark 2016). Ayrıca, bu çalışmada LXRα, LXRβ ve ABCA1 genlerinin mRNA'ları luteal dokuda gösterilmiştir. Ancak, mRNA lokalizasyonlarında, çalışma gruplarına bağlı olarak probun etkinliğinden dolayı istatistiksel bir karşılaştırma yapılamadı.

Sunulan bizim çalışmamızda da $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan kısa bir saat sonra fonksiyonel luteolizisin başladığı düşünülmektedir. Bundan dolayı, fonsiyonel luteolizis için belirli saatler kritik önem arz etmektedir ve kolesterol homeostazisi buna göre düzenleniyor olabilir. Çünki, lipoprotein reseptörlerinin ve steroidogenik yolağın ekspresyon seviyesi azalmaktadır. Kolesterol efluksu KL'nin sağ kalımı için önemli olabilir. Ancak, fonksiyonel luteolizise katkısı olmadığı düşünülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak; sunulan çalışmada luteal dokuda bulunan kolesterol homeostazisine katkısı bulunan steroidogenik, kolesterol uptake ve LXR yolağının genlerinin gebelik ve luteolizis günlerinde nasıl düzenlendiği araştırıldı. Steroidogenik yolak tarafından kolesterolden progesteron üretebilmek için kolesterolü luteal dokuya alan lipoprotein reseptörlerinin gebelik günlerinde arttığı ve böylece gebeliğin devam ettirilmesi için progesteron üretimine katkı sağladığı belirlenmiştir.

Hücrelerden kolesterolü reverz olarak taşıyan LXR reseptör yolağının genlerinin gebelik günlerinde genel olarak minor şekilde düzenlendiği düşünülmektedir. Bu yolaktaki ABCA1 protein seviyesinin gebelik 16'da siklik 16'ya göre artmasına karşın, diğer genlerin ekspresyon ve protein seviyeleri önemli şekilde değişmemiştir. Bu bulgu, steroidogenik aktivitenin sürdürülmesi ve KL'nin aşırı kolesterol birikimine maruz kalmasında LXR yolağının kolesterol reverz transportunu uyararak rol olabileceğini gösteriyor olabilir.

Doğal luteolizisin meydana gelmesiyle steroidogenik yeteneğini kaybeden KL'de, kolesterol alımını sağlayan LDLR ve SR-BI ekspresyonları S16. günde S12'ye göre azalmış ve bu azalış progesteron üreten steroidogenik yolak genleri StAR, P450scc ve 3βHSD' de bulunmuştur. LXRβ ve ABCG1 ekspresyon seviyesi S16. günde S12'ye göre artmasına rağmen, LXRα, ABCA1 ekspresyon seviyeleri değişmemiştir. Ayrıca bu genlerin protein seviyeleri doğal luteolizisinden etkilenmemiştir. $PGF_{2\alpha}$ indüklenmiş luteolizis gruplarında, PG1'de steroidogenik yolaktan sadece pregenenolonu progesterona katalizleyen 3βHSD ekspresyonu azalmış ancak lipoprotein reseptörlerinin ekspresyonu değişmemiştir. PG4 ve P16' da lipoprotein reseptörü LDLR ve SR-BI ekspresyonları baskılanmış ve steroidogenik yolağın ekspresyonları oldukça azalmıştır. Ayrıca, SR-BI' nin PG4 ve P16 luteal doku mRNA ekspresyonu in vitro olarakta azalmıştır. İlginç olarak PG1'de LXRα ve ABCA1 mRNA ekspresyonu azalmış ve PG4'de LXRα ekspresyonu azalışa devam etmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara dayanarak hem spontan hemde fonksiyonel luteolizisde meydana gelen progesteronun azalmasında kolesterolün LXR aracılı olarak

reverz taşınımından ziyade lipoprotein reseptör aracılı olarak luteal dokuya alınımın azalmasının luteolizise katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Abe H, Al-zi'abi MO, Sekizawa F, Acosta TJ, Skarzynski DJ, Okuda K, 2014. Lymphatic involvement in the disappearance of steroidogenic cells from the corpus luteum during luteolysis. PLoS One, 20, 9(2), e88953.

Aboelenain M, Kawahara M, Balboula AZ, Montasser Ael-M, Zaabel SM, Okuda K, Takahashi M, 2015. Status of autophagy, lysosome activity and apoptosis during corpus luteum regression in cattle. J Reprod Dev, 61, 3, 229-36.

Abramovitz M, Boie Y, Nguyen T, Rushmore TH, Bayne MA, Metters KM, Slipetz TM, Grygorczyk R, 1994. Cloning and expression of a cDNA for the humanoid FP receptor, J Biol.Chem, 269, 1356–1360.

Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M, 1994. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor, J Biol Chem, 269, 33, 21003-9.

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M, 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high-density lipoprotein receptor, Science 271, 5248, 518-20.

Agerholm JS, 2007. Inherited disorders in Danish cattle, PMIS Suppl, 1–76.

Allen W, 1974. Recollections of my life with progesterone, Gynecol Invest, 5, 142–182.

Alton EW, Baker A, Baker E, Boyd AC, Cheng SH, Coles RL, Collie DD, Davidson H, Davies JC, Gill DR, Gordon C, Griesenbach U, Higgins T, Hyde SC, Innes JA, McCormick D, McGovern M, McLachlan G, Porteous DJ, Pringle I, Scheule RK, Shaw DJ, Smith S, Sumner-Jones SG, Tennant P, Vrettou C, 2013. The safety profile of a cationic lipid-mediated cystic fibrosis gene transfer agent following repeated monthly aerosol administration to sheep, Biomaterials, 34, 10267–10277.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF, 2004. Normalization of realtime quantitative reverse transcription-PCR data, a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets, Cancer Res, 64, 5245–5250.

Annema W, Dikkers A, de Boer JF, Gautier T, Rensen PC, Rader DJ, Tietge UJ, 2012. ApoE promotes hepatic selective uptake but not RCT due to increased ABCA1-mediated cholesterol efflux to plasma, J Lipid Res 53, 5, 929–940.

Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G & Pfahl M, 1994. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormoneresponsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily, Molecular and Cellular Biology 14, 7025–7035.

Argov N, Moallem U, Sklan D, 2004. Lipid transport in the developing bovine follicle: messenger RNA expression increases for selective uptake receptors and decreases for endocytosis receptors. Biol Reprod 71, 479-485.

Arianmanesh M, McIntosh RH, Lea RG, Fowler PA, Al-Gubory KH, 2011. Ovine corpus luteum proteins, with functions including oxidative stress and lipid metabolism, show complex alterations during implantation, J Endocrinol, 210, 47-58.

Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA, 2004. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function, Endocrinology, 145, 5, 2551–60.

Atli, MO, Bender RW, Mehta V, Bastos MR, Luo W, Vezina CM, Wiltbank MC, 2012. Patterns of gene expression in the bovine corpus luteum following repeated intrauterine infusions of low doses of prostaglandin F2alpha. Biol Reprod 86 130.

Auletta FJ, Flint AP, 1988. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, nonhuman primates, and women especially in relation to the time of luteolysis. Endocr Rev, 9, 1, 88–105.

Azhar S, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Reaven E, 1998. Simultaneous induction of an HDL receptor protein (SR-BI) and the selective uptake of HDL-cholesteryl esters in a physiologically relevant steroidogenic cell model, J Lipid Res 39, 1616-1628.

Azhar S, Reaven E, 2002. "Scavenger receptor class BI and selective cholesteryl ester uptake: partners in the regulation of steroidogenesis." Mol Cell Endocrinol 195, 1-2, 1-26.

Bao B, Garverick HA, 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review, J Anim Sci., 76, 1903–21.

Baumann NA, Sullivan DP, Ohvo-Rekila H, Simonot C, Pottekat A, Klaassen Z, Beh CT, Menon AK, 2005. Transport of newly synthesized sterol to the sterol-enriched plasma membrane occurs via nonvesicular equilibration. Biochemistry, 44, 15, 5816–5826.

Behrman HR, Macdonald GJ, Greep RO, 1971. Regulation of ovarian cholesterol esters: evidence for enzymatic sites of prostaglandin- induced loss of corpus luteum function. Lipids 6, 791.

Berger S, Raman G, Vishwanathan R, Jacques PF, Johnson EJ, 2015. Dietary cholesterol and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. Am J Clin Nutr. 102, 2, 276-94.

Berisha B, Schams D, 2005. Ovarian function in ruminants. Domest Anim Endocrinol 29, 305–217.

Berisha, B, HH Meyer, D Schams, 2010. Effect of prostaglandin F2 alpha on local luteotropic and angiogenic factors during induced functional luteolysis in the bovine corpus luteum. Biol Reprod. 82, 940–947.

Berridge M.J., Irvine R.F., 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction Nature (Lond.), 312, 315–321.

Bi DP, Yin CH, Zhang XY, Yang NN, Xu JY., 2016. miR-183 functions as an oncogene by targeting ABCA1 in colon cancer. Oncol Rep. 35, 5, 2873-9.

Bischoff E. D. Daige C. L. Petrowski M. Dedman H. Pattison J. Juliano J. Li A. C. Schulman I. G., 2010. Non-redundant roles for LXRalpha and LXRbeta in atherosclerosis susceptibility in low density lipoprotein receptor knockout mice. J. Lipid Res. 51, 900–906.

Bishop CV, Bogan RL, Hennebold JD, Stouffer RL, 2011. Analysis of microarray data from the macaque corpus luteum; the search for common themes in primate luteal regression. Mol Hum Reprod, 17, 143–51.

Block RC, Dorsey ER, Beck CA, Brenna JT, Shoulson I, 2010. Altered cholesterol and fatty acid metabolism in Huntington disease. J Clin Lipidol 4, 1, 17-23.

Boadu E, Francis GA, 2006. The role of vesicular transport in ABCA1-dependent lipid efflux and its connection with NPC pathways. J Mol Med (Berl), 84, 4, 266–275.

Boergesen M, Pedersen, T.Å., Gross, B., van Heeringen, S.J., Hagenbeek, D., Bindesbøll, C., Caron, S., Lalloyer, F, Steffensen, K.R., Nebb, H.I., Gustafsson, J.Å., Stunnenberg, H.G., Staels, B., Mandrup, S., 2012. "Genome-wide profiling of liver X receptor, retinoid X receptor, and peroxisome proliferator-activated receptor α in mouse liver reveals extensive sharing of binding sites", Molecular Cell Biology, 32, 4, 852-67.

Bogan RL, Hennebold JD, 2010. The reverse cholesterol transport system as a potential mediator of luteolysis in the primate corpus luteum. Reproduction, 139, 163, 176.

Bogan RL, Murphy MJ, Hennebold JD, 2009. Dynamic changes in gene expression that occur during the period of spontaneous functional regression in the rhesus macaque corpus luteum. Endocrinology, 150, 1521, 1529.

Bogan RL, Andrea E, DeBarber AE., Jon D, Hennebold JD, 2012. "Liver X Receptor Modulation of Gene Expression Leading to Prluteolytic Effects in Primate Luteal Cells". Biology of Reproduction, 86, 3, 89.

Bonnet A, Le Cao KA, Sancristobal M, Benne F, Robert-Granie C, Law-So G, 2008. In vivo gene expression in granulosa cells during pig terminal follicular development. Reproduction, 136, 211–24.

Bovenga F, Sabba C, Moschetta A, 2015. Uncoupling Nuclear Receptor LXR and Cholesterol Metabolism in Cancer. Cell metabolism, 21, 517–526.

Bowdridge EC, Goravanahally MP, Inskeep EK, Flores JA, 2015. Activation of Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Is an Additional Mechanism That Participates in Mediating Inhibitory Actions of Prostaglandin F2Alpha in Mature, but Not Developing, Bovine Corpora Lutea, Biol Reprod, 93, 1,7.

Braden T D, Gamboni F, Niswender GD, 1988. Effects of prostaglandin F2a-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod, 39, 245–253, 1988.

Bradley MN, Hon, C, Chen M, Joseph SB, Wilpitz DC, Wang X, Lusis AJ, Collins A, Hseuh WA, Collins JL, Tangirala RK, Tontonoz P, 2007. "Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE", Journal of Clinical Investigation, 117, 8, 2337-46.

Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG, 2005. Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. Domest Anim Endocrinol, 28, 367–79.

Brannian JD, Stouffer RL, 1993. "Native and modified (acetylated) low density lipoprotein-supported steroidogenesis by macaque granulosa cells collected before and after the ovulatory stimulus: correlation with fluorescent lipoprotein uptake." Endocrinology, 132, 2, 591-7.

Braun NS, Heath E, Chenault JR, Shanks RD, Hixon JE, 1988. Effects of prostaglandin F2 alpha on degranulation of bovine luteal cells on days 4 and 12 of the estrous cycle. Am J Vet Res, 49, 4, 516–9.

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Genest J Jr, Hayden MR, 1999. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. Nat Genet, 22, 4, 336–345.

Brown MS, Goldstein JL, 1976. Receptor-mediated control of cholesterol metabolism. Science 191, 4223, 150–154.

Brown MS, Goldstein JL, 1980. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth, J Lipid Res 21, 5, 505–517.

Brown MS, Goldstein JL, 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 4746, 34–47.

Brown MS, JL. Goldstein, 1979. "Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system." Proc Natl Acad Sci U S A, 76, 7, 3330-7.

Brunetti-Pierri N, Corso G, Rossi M, Ferrari P, Balli F, Rivasi F, Annunziata I, Ballabio A, Russo AD, Andria G, Parenti G, 2002. Lathosterolosis, a novel multiple-malformation/mental retardation syndrome due to deficiency of 3beta-hydroxysteroiddelta5- desaturase. Am J Hum Genet 71, 4, 952–958.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, Clin Chem, 55, 611–22.

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

Calasans-Maia MD, Monteiro ML, Ascoli FO, Granjeiro JM, 2009. The rabbit as an animal model for experimental surgery, Acta Cir Bras, 24, 4, 325-28.

Calvo D, Vega MA, 1993. "Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family." J Biol Chem, 268, 25, 18929-35.

Cannon MV, van Gilst WH, de Boer RA, 2016. Emerging role of liver X receptors in cardiac pathophysiology and heart failure, Basic Res Cardiol, 111, 1, 3.

Cao, G., C. K. Garcia, Wyne KL, Schultz RA, Parker KL, Hobbs HH, 1997. "Structure and localization of the human gene encoding SRBI/ CLA-1. Evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1." J Biol Chem 272, 52, 33068-76.

Carambula SF, Matikainen T, Lynch MP, Flavell RA, Goncalves PB, Tilly JL, et al, 2002. Caspase-3 is a pivotal mediator of apoptosis during regression of the ovarian corpus luteum. Endocrinology, 143, 4, 1495–501.

Carr BR, MacDonald PC, Simpson ER., 1980. "The regulation of de novo synthesis of cholesterol in the human fetal adrenal gland by low density lipoprotein and adrenocorticotropin." Endocrinology 107, 4, 1000-6.

Cha JY & Repa JJ, 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. Journal of Biological Chemistry, 282 743–751.

Chaffin, C. L., Dissen G. A., Stouffer RL. et al., 2000. "Hormonal regulation of steroidogenic enzyme expression in granulosa cells during the peri-ovulatory interval in monkeys." Mol Hum Reprod, 6, 1, 11-8.

Chan BS, Satriano JA, Pucci M, Schuster VL, 1998. Mechanism of prostaglandin E2 transport across the plasma membrane of HeLa cells and Xenopus oocytes expressing the prostaglandin transporter "PGT". J Biol Chem, 273, 12, 6689-6697.

Chandras C, Ragoobir J, Barrett GE, Bruckdorfer KR, Grahama A, Abayasekara DRE & Michael AE, 2004. Roles for prostaglandins in the steroidogenic response of human granulosa cells to high-density lipoproteins. Molecular and Cellular Endocrinology, 222 1–8,

Chang HM, Cheng JC, Klausen C, Taylor EL, Leung PC, 2014. Effects of recombinant activins on steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. J Clin Endocrinol Metab, 99, E1922–32.

Chang TY, Chang CC, Cheng D, 1997. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. Annu Rev Biochem 66, 613–638.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM & Mangelsdorf DJ, 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. Science, 294, 1866–1870.

Chen DB, Fong HW, Davis JS, 2001. Induction of c-fos and c-jun messenger ribonucleic acid expression by prostaglandin F2 alpha is mediated by a protein kinase C-dependent extracellular signal-regulated kinase mitogenactivated protein kinase pathway in bovine luteal cells. Endocrinology, 142, 887–895.

Chen H, Rossier C, Lalioti MD, Lynn A, Chakravarti A, Perrin G, et al, 1996. Cloning of the cDNA for a human homologue of the Drosophila white gene and mapping to chromosome 21q22.3. Am J Hum Genet, 59, 66–75.

Chen YJ, Feng Q, Liu YX, 1999. Expression of the steroidogenic acute regulatory protein and luteinizing hormone receptor and their regulation by tumor necrosis factor alpha in rat corpora lutea. Biol Reprod, 60, 419–27.

Chen Z, Menon KM, 1994. Expression of high density lipoproteinbinding protein messenger ribonucleic acid in the rat ovary and its regulation by gonadotropin. Endocrinology, 134, 2360–6.

Cherian-Shaw M, Puttabyatappa M, Greason E, Rodriguez A, VandeVoort CA, Chaffin CL, 2009. Expression of scavenger receptor-BI and low-density lipoprotein receptor and differential use of lipoproteins to support early steroidogenesis in luteinizing macaque granulosa cells. Endocrinology, 50, 957–965.

Cherradi N, Rossier MF, Vallotton MB, Timberg R, Friedberg I, Orly J, Wang XJ, Stocco DM, Capponi AM., 1997. Steroidogenesis in. Sub mitochondrial distribution of three key steroidogenic proteins (steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450scc and 3b-hydroxysteroid dehydrogenase isomerase enzymes) upon stimulation by intracellular calcium in adrenal glomerulosa cells. J Biol Chem, 272, 7899-7.

Chien Y, Cheng WC, Wu MR, Jiang ST, Shen CK, Chung BC, 2013. Misregulated progesterone secretion and impaired pregnancy in Cyp11a1 transgenic mice. Biol Reprod, 89, 4, 91.

Christianson MS, 2012. Yates M Scavenger receptor class B type 1 gene polymorphisms and female fertility. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 19, 115.

Chung PH, Sandhoff TW, McLean MP, 1998. Hormone and prostaglandin F2 alpha regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in human corpora lutea. Endocrine, 8, 153–60.

Clark BJ, Wells J, King SR, Stocco DM, 1994. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR), J Biol Chem, vol. 269 (pg. 28314-28322).

Clark BJ, 2012. The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. J Endocrinol, 212, 257–75.

Coleson MP, Sanchez NS, Ashley AK1, Ross TT, Ashley RL., 2015. Human chorionic gonadotropin increases serum progesterone, number of corpora lutea and angiogenic factors in pregnant sheep. Reproduction, 150, 1, 43-52

Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC, Moore LB, Parks DJ, Wilson JG, Tippin TK, Binz JG et al, 2002. Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. Journal of Medicinal Chemistry, 45, 1963–1966.

Connelly MA, G Kellner-Weibel, Rothblat GH, Williams DL, 2003. "SR-BI-directed HDL-cholesteryl ester hydrolysis." J Lipid Res 44, 2, 331-41.

Costet P, Luo Y, Wang N & Tall AR, 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. Journal of Biological Chemistry, 275, 28240–28245.

Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrancois-Martinez AM, Caira F, et al, 2006. Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. J Clin Invest, 116, 1902–1912.

Davis JS, May JV, Keel BA, 1996. Mechanisms of hormone and growth factor action in the bovine corpus luteum. Theriogenology, 45, 1351–1380.

Davis JS, Rueda BR, 2002. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. Front Biosci, 7, d1949–78.

De Aguilar-Nascimento JE, 2005. Fundamental steps in experimental design for animal studies. Acta Cirargica Brasileira, 20, 1, 1-8.

Devoto L, Vega M, Kohen P, et al, 2002. Molecular regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum throughout the menstrual cycle. J Reprod Immunol, 55, 11–20, 121.

Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. Biotechniques, 37, 112-114, 116, 118-119.

Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC, 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F2alpha production in the CL. Mol Cell Endocrinol, 191, 65–80. doi: 10.1016/S0303-7207(02)00056-4.

Diaz, FJ, W Luo, and MC Wiltbank, 2013. Prostaglandin F2alpha regulation of mRNA for activating protein 1 transcriptional factors in porcine corpora lutea (CL): lack of induction of JUN and JUND in CL without luteolytic capacity. Domest Anim Endocrinol, 44, 98-108.

Dietschy JM, Turley SD, 2001. Cholesterol metabolism in the brain. Curr Opin Lipidol, 12, 2, 105–112.

Dietschy JM, Turley SD, Spady DK, 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low-density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. J Lipid Res, 34, 10, 1637–1659.

Drouineaud, V., Sagot, P., Garrido, C., Logette, E., Deckert, V., Gambert, P., Jimenez, C., Staels B., Lagrost, L., Masson D., 2007. "Inhibition of progesterone production in human luteinized granulosa cells treated with LXR agonists", Molecular Human Reproduction, 13, 6, 373-9.

Edwards PA, Kennedy MA, Mak PA, 2002. "LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis", Vascular Pharmacology, 38, 4, 249-56.

Eimerl S, Orly J, 2002. Regulation of steroidogenic genes by insulin-like growth factor-1 and follicle- stimulating hormone: differential responses of cytochrome p450 side-chain cleavage, steroidogenic acute

regulatory protein, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase in rat granulosa cells. Biol Reprod, 67, 900–10.

El Roz A, Bard JM, Valin S, Huvelin JM, Nazih H, 2013. Macrophage apolipoprotein E and proliferation of MCF-7 breast cancer cells: Role of LXR. Anticancer Res., 33, 3783–3789.

El-Hajjaji, FZ, A Oumeddour, AJ Pommier, A Ouvrier, E Viennois, J Dufour, F Caira, JR Drevet, DH Volle, S Baron, F Saez, JM. Lobaccaro, 2011. Liver X receptors, lipids and their reproductive secrets in the male. Biochim Biophys Acta. 1812, 974–981.

El-Sherry TM, Senosy W, Mahmoud GB, Wasfy SI, 2013. Effect of dinoprost and cloprostenol on serum nitric oxide and corpus luteum blood flow during luteolysis in ewes. Theriogenology, 15, 80, 5, 513-8

Escajadillo T, Wang H, Li L, Li D, Sewer MB, 2016. Oxysterol-related-binding-protein related Protein-2 (ORP2) regulates cortisol biosynthesis and cholesterol homeostasis. Mol Cell Endocrinol. May 15, 427, 73-85.

Espenshade PJ, Hughes, A. L., 2007. Regulation of sterol synthesis in eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 41, 401–427.

Fairchild-Benyo DL, PATE JL, 1992. Tumor necrosis factor α alters bovine luteal cell synthetic capacity and viability. Endocrinology, 130, 854–860.

Fan X, Kim HJ, Bouton D, Warner M & Gustafsson JA, 2008. Expression of liver X receptor beta is essential for formation of superficial cortical layers and migration of later-born neurons. PNAS, 105, 13445–13450.

Ferreira-Dias G, Mateus L, Costa AS, Sola S, Ramalho RM, Castro RE, et al, 2007. Progesterone and caspase-3 activation in equine cyclic corpora lutea. Reprod Domestic Anim, 42, 4, 380–6.

Fitz TA, Mayan M H, Sawyer HR, Niswender GD, 1982. Characterization of two steroidogenic cell types in the ovine corpus luteum. Biol. Reprod, 27, 703–711.

Fitzgerald ML, Mujawar Z, Tamehiro N, 2010. ABC transporters, atherosclerosis and inflammation. Atherosclerosis 211, 361–370.

Fond AM, Lee CS, Schulman, IG, Kiss RS, Ravichandran, K.S., 2015. "Apoptotic cells trigger a membrane-initiated pathway to increase ABCA1", Journal of Clinical Investigation, 125, 7, 2748-58.

Francis, G.A., Fayard, E., Picard F., Auwerx, J., 2003. "Nuclear receptors and the control of metabolism" Annua Review of Physiology, 65, 261-311.

Freeman SR, Jin X, Anzinger JJ, Xu Q, Purushothaman S, Fessler MB, Addadi L, Kruth HS., 2013. ABCG1-mediated generation of extracellular cholesterol microdomains. J Lipid Res 55, 1, 115–127.

Fu Y, Mukhamedova N, Ip S, D'Souza W, Henley KJ, DiTommaso T, Kesani R, Ditiatkovski M, Jones L, Lane RM, Jennings G, Smyth IM, Kile BT, Sviridov D., 2013. ABCA12 regulates ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages and the development of atherosclerosis. Cell Metab 18, 2, 225–238.

Gallegos AM, Atshaves BP, Storey SM, Starodub O, Petrescu AD, Huang H, McIntosh AL, Martin GG, Chao H, Kier AB, Schroeder F, 2001. Gene structure, intracellular localization, and functional roles of sterol carrier protein-2. Prog Lipid Res, 40, 6, 498–563.

Garcia, C. K., K. Wilund, Arca M, Zuliani G, Fellin R, Maioli M, Calandra S, Bertolini S, Cossu F, Grishin N, Barnes R, Cohen JC, Hobbs HH., 2001. "Autosomal recessive hypercholesterolemia caused by mutations in a putative LDL receptor adaptor protein." Science, 292, 5520, 1394-8.

Garverick HA, Smith MF, Elmore RG, Morehouse GL, Agudo LS, Zahler WL, 1985. Changes and interrelationships among luteal LH receptors, adenylate cyclase activity and phosphodiesterase activity during the bovine estrous cycle. J Anim Sci., 61, 1, 216–23.

Gelissen IC, Harris M, Rye KA, Quinn C, Brown AJ, Kockx M, Cartland S, Packianathan M, Kritharides L, Jessup W, 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 3, 534–540.

Ginther OJ, Araujo RR, PalhãoMP, Rodrigues BL & Beg MA, 2009. Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2a for complete physiologic luteolysis in cattle Biology of Reproduction, 80, 641-648.

Ginzinger DG, 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol, 30, 503-512.

Girsh E, Greber Y, Meidan R, 1995. Luteotrophic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. Biol Reprod, 52, 4, 954–62.

Girsh E, Wang W, Mamluk R, Arditi F, Friedman A, Milvae RA, Meidan R, 1996. Regulation of endothelin-1 expression in the bovine corpus luteum: elevation by prostaglandin F 2 alpha. Endocrinology, 137, 12, 5191-5196.

Glass CK, Pittman RC, Keller GA, Steinberg D., 1983. "Tissue sites of degradation of apoprotein A-I in the rat." J Biol Chem, 258, 11, 7161-7.

Glomset JA, Norum KR, 1973. The metabolic role of lecithin: cholesterol acyltransferase: perspectives form pathology. Adv Lipid Res, 11, 1–65.

Goding JR, 1973. The demonstration that PGF2α is the uterine luteolysin in the ewe. In: DENA - MUR R. and NETTER A. Le Corps jaune, 311 -23. Masson et Cie, Paris.

Goede V, Schmidt T, Kimmina S, Kozian D, Augustin HG, 1998. Analysis of blood vessel maturation processes during cyclic ovarian angiogenesis. Lab Invest, 78, 11, 1385–94.

Goedeke L, Rotllan N, Canfran-Duque A. Canfrán-Duque A, Aranda JF, Ramírez CM, Araldi E, Lin CS, Anderson NN, Wagschal A, de Cabo R, Horton JD, Lasunción MA, Näär AM, Suárez Y, Fernández-Hernando C, 2015. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels, Nat. Med., 21, 11, 1280-9.

Goldman S, Shalev E, 2004. MMPS and TIMPS in ovarian physiology and pathophysiology. Front Biosci 9, 2474-2483.

Goldring NB, Durica JM, Lifka J, Hedin L, Ratoosh SL, Miller WL, et al, 1987. Cholesterol sidechain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. Endocrinology, 120, 1942–50.

Goldstein JL, Brown MS, 1982. The LDL receptor defect in familial hypercholesterolemia. Implications for pathogenesis and therapy. Med Clin North Am, 66, 2, 335-362.

Grabinski TM, Kneynsberg A, Manfredsson FP, Kanaan NM., 2015. A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. PLoS One, 20, 10, 3, e0120120.

Graves PE, Pierce KL, Bailey TJ, B. R. Rueda, D. W. Gil, D. F. Woodward, A. J. Yool, P. B. HOYER, J. W. Regan. 1995. Cloning of a receptor for prostaglandin F2a from ovine corpus luteum. Endocrinology, 136, 3430–3436.

Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R, Havekes LM, Romijn JA, Groot PH, Reijngoud DJ & Kuipers F, 2005. Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. American Journal of Physiology, 289, E829–E838.

Grosser O, 1909. Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihaute und der placenta.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P, 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 103, 11821-11827.

Grummer RR, Carroll DJ, 1988. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. J Anim Sci, 66, 3160–73.

Grundy SM, 1983. Absorption and metabolism of dietary cholesterol. Annu Rev Nutr, 3, 71–96.

Grusenmeyer DP, Pate JL, 1992. Localization of prostaglandin F2α inhibition of lipoprotein use by bovine luteal cells, J Reprod Fertil, 94, 311–318.

Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella J, 1996. “Biological effects of oxysterols: current status”, Food and Chemical Toxicology, 34, 2, 193-211.

Guo T, Zhang L, Cheng D, Liu T, An L, Li WP, Zhang C, 2015. Low-density lipoprotein receptor affects the fertility of female mice. Reprod Fertil Dev, 27, 8, 1222-32.

Guo T, Zhang L, Cheng D, Liu T, An L, Li WP, Zhang C, 2015. Low-density lipoprotein receptor affects the fertility of female mice. Reprod Fertil Dev, 27, 8, 1222-32.

Gwynne JT, Strauss JF, 1982. "The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands." Endocr Rev, 3, 3, 299-329.

Haines TH, 2001. Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers?, Prog Lipid Res, 40, 299-324.

Hansel W, Convey EM, 1983. Physiology of the estrous cycle. J Anim Sci, 57, suppl 2, 404–24.

Hansel W, Hickey GJ, 1988. Early pregnancy signals in domestic animals. Ann N Y Acad Sci, 541, 472–84.

Hanukoglu I, 1992. Steroidogenic enzymes. Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. J Steroid Biochem, 43, 779-804.

Hartung S, Rust W, Balvers M, Ivell R, 1995. Molecular cloning and in vivo expression of the bovine steroidogenic acute regulatory protein. Biochem Biophys Res Commun, 215, 646-53.

Hatzopoulos, A. K., A. Rigotti, Rosenberg RD, Krieger M., 1998. "Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis." J Lipid Res 39, 3, 495-508.

Hawkins DE, Belfiore CJ, Kile JP, Niswender GD, 1993. Regulation of messenger ribonucleic acid encoding 3β hydroxysteroid dehydrogenase/δ5-δ4 isomerase in ovine corpus luteum. Biol. Reprod, 48, 1185-1190.

Haworth, J. D., Rollyson, M. K., Silva, P. J., Mcintush, E. W., Niswender. G. D., 1998. Messenger ribonucleic acid encoding monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by the ovine corpus luteum in response to prostaglandin F2a. Biol. Reprod., 58, 169–174.

Hayashi K, Miyamoto A, Konari A, Ohtani M, Fukui Y, 2003. Effect of local interaction of reactive oxygen species with prostaglandin F(2alpha) on the release of progesterone in ovine corpora lutea in vivo. Theriogenology, 59, 5-6, 1335–44.

Heino S, Lusa S, Somerharju P, Ehnholm C, Olkkonen VM, Ikonen E, 2000. Dissecting the role of the Golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 15, 8375–8380.

Henry J, Baker J, Lindsey JR, 2002. Research in Laboratory Animal and Comparative Medicine. In: Laboratory Animal Medicine. Eds: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW, 2nd ed. Amsterdam, Academic Press. p., 1228-1237.

Hinckley ST, Milvae RA, 2001. Endothelin-1 mediates prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the ewe. Biol Reprod, 64, 6, 1619–23.

Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess BL, Bernier L, McIsaac SA, Chan JY, Tansley GH, Cohn JS, Hayden MR, Wellington CL, 2004. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. J Biol Chem 279, 39, 41197–41207.

Hojo T, Siemieniuch MJ, Lukasik K, Piotrowska-Tomala KK, Jonczyk AW, Okuda K, Skarzynski DJ, 2016. Programmed necrosis - a new mechanism of steroidogenic luteal cell death and elimination during luteolysis in cows. Sci Rep. Nov 30, 6, 38211.

Hong C, Tontonoz P, 2014. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. Nat Rev Drug Discov., 13, 6, 433-44.

Horihata K, Yoshioka S, Sano M, Yamamoto Y, Kimura K, Skarzynski D. J., Okuda K., 2016. Expressions of lipoprotein receptors and cholesterol efflux regulatory proteins during luteolysis in bovine corpus luteum. Reproduction, Fertility and Development.

Hou H, Kang Y, Li Y, Zeng Y, Ding G, Shang J, 2017. miR-33a expression sensitizes Lgr5+ HCC-CSCs to doxorubicin via ABCA1. Neoplasma, 64, 1, 81-91.

Hou X, Arvisais EW, Jiang C, Chen DB, Roy SK, Pate JL, et al, 2008. Prostaglandin F2alpha stimulates the expression and secretion of transforming growth factor B1 via induction of the early growth response 1 gene (EGR1) in the bovine corpus luteum. Mol Endocrinol, 22, 2, 403–14.

Hu Z, Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Yun CC, Berlot CH, Kraemer FB, Azhar S., 2013. Regulation of expression and function of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) by Na+/H+ exchanger regulatory factors (NHERFs). J Biol Chem., 288, 16, 11416-35.

Hu Z, Shen WJ, Kraemer FB, Azhar S, 2012. MicroRNAs 125a and 455 repress lipoprotein-supported steroidogenesis by targeting scavenger receptor class B type I in steroidogenic cells. Mol Cell Biol, 32, 5035–5045.

Huang ZH, Lin CY, Oram JF, Mazzone T., 2001. Sterol efflux mediated by endogenous macrophage Apo E expression is independent of ABCA1. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21, 12, 2019–2025.

Ifere GO, Desmond R, Demark-Wahnefried W, Nagy TR, 2013. Apolipoprotein E gene polymorphism influences aggressive behavior in prostate cancer cells by deregulating cholesterol homeostasis. Int J Oncol, 43, 1002–10.

Ikonen E, 2006. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. Physiol Rev, 86, 4, 1237–1261.

Ikonen E, 1997. Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport. Curr Opin Lipidol, 8, 60-4.

Ikonen E, 2008. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. Nat Rev Mol Cell Biol, 9,125–138.

Inagami T, Naruse M, Hoover R, 1995. Endothelium as an endocrine organ. Annu Rev Physiol, 57, 171–89.

Ishibashi M, Filomenko R, Rebe C, Chevriaux A, Varin A, Derangere V et al, 2013. Knock-down of the oxysterol receptor LXRalpha impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXRbeta activation. Biochem Pharmacol, 86, 122–129.

Jabbour HN, Sales KJ, 2004. Prostaglandin receptor signalling and function in human endometrial pathology. Trends Endocrinol Metab, 15, 8, 398-404.

Janowski B.A., Grogan, M.J. Jones, S.A. Wisely, G.B. Kliewer, S.A., Corey, E.J., Mangelsdorf D.J., 1999. "Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRα and LXRβ", Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 266–271.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR & Mangelsdorf DJ, 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. Nature, 383, 728–731.

Jasinska M, Owczarek J, Orszulak-Michalak D, 2007. Statins: a new insight into their mechanisms of action and consequent pleiotropic effects. Pharmacol Rep, 59, 5, 483–499.

Jefcoate C, Artemenko I, 2004. From electron transfer to cholesterol transfer; molecular regulation of steroid synthesis in the mitochondrion. Topics in Current Genetics vol 8, 295-324.

Jiemtaweeboon, S., Shirasuna, K., Nitta., A, Kobayashi, A., Schuberth, H.J., Shimizu, T., Miyamoto, A., 2011. "Evidence that polymorphonuclear neutrophils infiltrate into the developing corpus luteum and promote angiogenesis with interleukin-8 in the cow", Reproduction of Biological Endocrinology, 8, 9, 79.

Jocelyn HD, Setchell BP, 1972. Regnier de Graaf on the human reproductive organs. An annotated translation of Tractatus de Virorum Organis Generationi Inservientibus (1668) and De Mulierub Organis Generationi Inservientibus Tractatus Novus (1962). J Reprod Fertil Suppl, 17, 1–222.

John M, Samji P, Khan HR, Vashistha A, Rudraiah M, 2016. Analysis of Expression of Luteal Genes during Induced Luteolysis and Rescue of Luteal Function in Bonnet Macaques and Pregnant Rats. J Clin Mol Endocrinol, 1, 25.

Johnson PD, Besseisen DG, 2002. Practical aspects of experimental design in animal research. ILAR Journal, 43, 4, 202-206.

Johnson M, Svensson SPA, Helou K, Billig H, Levan G, Carlsson LM, Carlsson B., 1998. "Characterization and chromosomal localization of rat scavenger receptor class B type I, a high-density lipoprotein receptor with a putative leucine zipper domain and peroxisomal targeting sequence." Endocrinology, 139, 1, 72-80.

Johnson, W. J., F. H. Mahlberg, Rothblat GH, Phillips MC., 1991. "Cholesterol transport between cells and highdensity lipoproteins." Biochim Biophys Acta, 1085, 3, 273-98.

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE, Walczak R, Collins JL, Osborne TF & Tontonoz P, 2002. Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. Journal of Biological Chemistry, 277, 11019–11025.

Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF, 1993. Apoptosis during luteal regression in cattle. Endocrinology, 132, 1, 249-254.

Juengel JL, Meberg BM, Turzillo AM, Nett TM, Niswender GD, 1995. Hormonal regulation of messenger ribonucleic acid encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. Endocrinology, 136, 5423–9.

Juengel JL, Niswender GD, 1999. Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. J Reprod Fertil Suppl, 54, 193-205.

Juengel JL, Wiltbank MC, Meberg BM, Niswender GD, 1996. Regulation of steadystate concentrations of messenger ribonucleic acid encoding prostaglandin F2 alpha receptor in ovine corpus luteum. Biol Reprod, 54, 5, 1096-1102.

Jurevics H, Morell P, 1995. Cholesterol for synthesis of myelin is made locally, not imported into brain. J Neurochem 64, 2, 895–901.

Kallen CB, Billheimer JT, Summers SA, Stayrook SE, Lewis M, Strauss JF 3rd, 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. J Biol Chem, 273, 26285-8.

Kandutsch AA, Shown EP, 1981. Assay of oxysterol-binding protein in a mouse fibroblast, cell-free system. Dissociation constant and other properties of the system. J Biol Chem, 256, 24, 13068–13073.

Kaneko T, Kanno C, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, Yaginuma N, Ohkoshi C, Tanaka M, Sugino T, Imura T, Hasegawa H, Chiba H., 2015.The liver X receptor reduces proliferation of human oral cancer cells by promoting cholesterol efflux via up-regulation of ABCA1 expression Oncotarget, 6, 33345 – 33357.

Kanter M, Kris-Etherton P, Fernandez ML, Vickers KC, Katz DL, 2012. Exploring the factors that impact blood cholesterol and heart disease risk: is dietary cholesterol as bad for you as history leads us to believe, Nutr. Rev. 3, 711–717.

Kappus, M.S., Murphy, A.J., Abramowicz, S., Ntonga, V., Welch, C.L., Tall, A.R., and Westerterp, M., 2014. Activation of liver X receptor decreases atherosclerosis in Ldlr $^{(-)/(-)}$ mice in the absence of ATP-binding cassette transporters A1 and G1 in myeloid cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 34, 279-284.

Kayis SA, Atli MO, Kurar E, Bozkaya F, Semacan A, Aslan S, et al, 2011. Rating of putative housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in cyclic and early pregnant equine endometrium. Anim Reprod Sci, 125, 1–4, 124–32.

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldan A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL & Edwards PA, 2005. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. Cell Metabolism, 1, 121–131.

Kennedy MA, Venkateswaran A, Tarr PT, Xenarios I, Kudoh J, Shimizu N & Edwards PA, 2001. Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. Journal of Biological Chemistry, 276, 39438–39447.

Khan I, Belanger A, Chen YD, Gibori G, 1985. Influence of high-density lipoprotein on estradiol stimulation of luteal steroidogenesis. Biol Reprod., 32, 96–104.

Kiriakidou M, McAllister JM, Sugawara T, Strauss JF 3rd, 1996. Expression of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the human ovary. J Clin Endocrinol Metab, 81, 4122-8.

Kisanuki YY, Hammer RE, Miyazaki J, Williams SC, Richardson JA, Yanagisawa M, 2001. Tie2- Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. Dev Biol, 230, 2, 230–42.

Kliem H, Berisha B, Meyer HH, Schams D, 2009. Regulatory changes of apoptotic factors in the bovine corpus luteum after induced luteolysis. Mol Reprod Dev, 76, 3, 220–30.

Kliem H, Welter H, Kraetzl WD, Steffl M, Meyer HH, Schams D, et al, 2007. Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitors during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum. Reproduction, 134, 3, 535–47.

Kohen P, Castro O, Palomino A, Muñoz A, Christenson LK, Sierralta W, Carvallo P, Strauss JF 3rd, Devoto L., 2003. The steroidogenic response and corpus luteum expression of the steroidogenic acute regulatory protein after human chorionic gonadotropin administration at different times in the human luteal phase. J Clin Endocrinol Metab., 88, 7, 3421-30.

Kolmakova A, Wang J, Brogan R, Chaffin C, Rodriguez A, 2010. Deficiency of the scavenger receptor class B type I negatively affects progesterone secretion in human granulosa cells. Endocrinology, 151, 5519– 5527.

Korach-Andre M, Archer A, Barros RP, Parini P, Gustafsson JA, 2011b. Both liver-X receptor (LXR) isoforms control energy expenditure by regulating brown adipose tissue activity. Proc Natl Acad Sci USA, 108, 403–408.

Korach-Andre M, Archer A, Gabbi C, Barros RP, Pedrelli M, Steffensen KR et al, 2011a. Liver-X Receptors regulate de novo lipogenesis in a tissue specific manner in C57Bl/6 female mice. Am J Physiol Endocrinol Metab, 301, E210, E222.

Korzekwa AJ, Jaroszewski JJ, Woclawek-Potocka I, Bah MM, Skarzynski, D. J., 2008. Luteolytic effect of prostaglandin F2 alpha on bovine corpus luteum depends on cell composition and contact. Reprod. Domest. Anim. 43, 464–472.

Kuehl FA, Jr., Cirillo VJ, Zanetti ME, Beveridge GC, 1976. Ham EA. The effect of estrogen upon cyclic nucleotide and prostaglandin levels in the rat uterus. Adv Prostaglandin Thromboxane Res, 1, 313-323.

Kumar L, Panda RP, Hyder I, Yadav VP, Sastry KV, Sharma GT, et al, 2012. Expression of leptin and its receptor in corpus luteum during estrous cycle in buffalo (Bubalus bubalis). Anim Reprod Sci, 135, 8-17.

Kunal SB, Killivalavan A, Medhamurthy R, 2012. Involvement of Src family of kinases and cAMP phosphodiesterase in the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor-mediated signaling in the corpus luteum of monkey. Reprod Biol Endocrinol, 29, 10-25.

Kuokkanen S, Polotsky AJ, Chosich J, Bradford AP, Jasinska A, Phang T, Santoro N, Appt SE, 2016. Corpus luteum as a novel target of weight changes that contribute to impaired female reproductive physiology and function. Syst Biol Reprod Med., 62, 4, 227-42.

Kurar E, Atli MO, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A, 2010. Comparison of five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. Kafkas Univ Vet Fak Derg. Jan 1, 16, 5, 851-5.

Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ & Tontonoz P, 2001 LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. PNAS, 98, 507–512.

Lambeth JD, Pember SO, 1983. Cytochrome P-450scc-adrenodoxin complex. Reduction properties of the substrate-associated cytochrome and relation of the reduction states of heme and iron-sulfur centers to association of the proteins. J Biol Chem, 258, 5596-602.

Landry YD, Denis M, Nandi S, Bell S, Vaughan AM, Zha X., 2006. ATP-binding cassette transporter A1 expression disrupts raft membrane microdomains through its ATPase-related functions. J Biol Chem , 281, 47, 36091–36101.

Landschulz KT, Pathak RK, Rigotti A, Krieger M, Hobbs HH, 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high-density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. J Clin Invest 98, 984-995.

Larrede S, Quinn CM, Jessup W, Frisdal E, Olivier M, Hsieh V, Kim MJ, Van Eck M, Couvert P, Carrie A, Giral P, Chapman MJ, Guerin M, Le Goff W., 2009. Stimulation of cholesterol efflux by LXR agonists in cholesterol-loaded human macrophages is ABCA1-dependent but ABCG1-independent. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29, 11, 1930–1936.

LaVoie HA, Benoit AM, Garmey JC, Dailey RA, Wright DJ, Veldhuis JD, 1997. Coordinate developmental expression of genes regulating sterol economy and cholesterol side-chain cleavage in the porcine ovary. Biol Reprod, 57, 402–7.

LaVoie HA, King SR, 2009. Transcriptional regulation of steroidogenic genes: STARD1, CYP11A1 and HSD3B. Exp Biol Med (Maywood), 234, 880–907.

LaVoie HA, Whitfi eld NE, Shi B, King SR, Bose HS, Hui YY, 2014. STARD6 is expressed in steroidogenic cells of the ovary and can enhance de novo steroidogenesis. Exp Biol Med (Maywood), 239, 430–435.

Lee J, Banu SK, McCracken JA, Arosh JA., 2016. Early pregnancy modulates survival and apoptosis pathways in the corpus luteum in sheep. Reproduction, 151, 3, 187-202.

Lee J, McCracken JA, Banu SK, Rodriguez R, Nithy TK, Arosh JA, 2010. Transport of prostaglandin F(2alpha) pulses from the uterus to the ovary at the time of luteolysis in ruminants is regulated by prostaglandin transporter-mediated mechanisms. Endocrinology, 151, 7, 3326–35.

Lee JH, Zhou J & Xie W, 2008. PXR and LXR in hepatic steatosis: a new dog and an old dog with new tricks. Molecular Pharmaceutics, 5, 60–66.

Lee SD, Tontonoz, P, 2015. Liver X receptors at the intersection of lipid metabolism and atherogenesis. Atherosclerosis, 242, 29–36.

Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver BB, Oliver JL, Su SS, Sundseth DA, Winegar DE. Blanchard TA. Spencer TM, Willson, 1997. “Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway”, Journal of Biological Chemistry, 272, 3137–3140.

Lehoux JG, Lefebvre A, 1980. "De novo synthesis of corticosteroids in hamster adrenal glands." J Steroid Biochem, 12, 479-85.

Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT, Heyman RA, Tangirala RK & Schulman IG, 2005. Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 25, 135–142.

Levy N, Kobayashi S, Roth Z, Wolfenson D, Miyamoto A, Meidan R, 2000. Administration of prostaglandin F (2 alpha) during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type A receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. Biol Reprod, 63, 2, 377–82.

Li X, Peegel H, and Menon KM, 1998. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. Endocrinology, 139, 3043-3049.

Li XM, Juorio AV, Murphy BD, 1993. Prostaglandins alter the abundance of messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes in cultured porcine granulosa cells. Biol Reprod, 48, 1360–6.

Lin CY, Gustafsson JA, 2015. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics. Nature reviews Cancer, 15, 216–224.

Linsel-Nitschke P, Tall AR, 2005. HDL as a target in the treatment of atherosclerotic cardiovascular disease. Nat Rev Drug Discov, 4, 3, 193–205.

Liu K, Feng Q, Gao HJ, Hu ZY, Zou RJ, Li YC, et al, 2003. Expression and regulation of plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor type-1, and steroidogenic acute regulatory protein in the rhesus monkey corpus luteum. Endocrinology, 144, 8, 3611–7.

Lobaccaro JM, Repa JJ, Lu TT, Caira F, Henry-Berger J, Volle DH, Mangelsdorf DJ, 2001. Regulation of lipid metabolism by the orphan nuclear receptors]. Ann Endocrinol, 62, 3, 239-47.

Lopez, D. and M. P. McLean, 1999. "Sterol regulatory element-binding protein-1a binds to cis elements in the promoter of the rat high density lipoprotein receptor SR-BI gene." Endocrinology, 140, 12, 5669-81.

Lukaszewska JH, Hansel W, 1970. Extraction and partial purifi cation of luteolytic activity from bovine endometrial tissue. Endocrinology, 86, 2, 261–70.

Ma Z, Deng C, Hu W, Zhou J, Fan C, Di S, Liu D, Yang Y, Wang D, 2017. Liver X Receptors and their Agonists: Targeting for Cholesterol Homeostasis and Cardiovascular Diseases. Curr Issues Mol Biol, 22, 41-64.

Magee B, 1998. The story of philosophy. Dorling Kindersley limited ISBN-13. 978-07513-3332-9.

Magness RR, 1998. Maternal cardiovascular and other physiologic responses to the endocrinology of pregnancy. In: Endocrinology of pregnancy. Totowa: Humana Press, p. 507–39.

Mai J, Virtue A, Shen J, Wang H, Yang XF, 2013. An evolving new paradigm: endothelial cells: conditional innate immune cells. J Hematol Oncol, 6, 61.

Makishima S, 2006. Nuclear receptors sense bile acid metabolism: a hormonal action of bile acids. In Functional and Structural Biology on the Lipo-Network, pp 17–35. Eds K Morikawa & S Tate. Kerala: Transworld Research Network.

Mamluk R, Defer N, Hanoune J, Meidan R, 1999. Molecular identifi cation of adenylyl cyclase 3 in bovine corpus luteum and its regulation by prostaglandin F2alpha-induced signaling pathways. Endocrinology, 140, 10, 4601–8.

Martin S, Parton RG, 2005. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. Semin Cell Dev Biol, 16, 2, 163–174.

Maxfield FR, Mondal M, 2006. Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. Biochem Soc Trans 34(Pt 3), 335–339.

Maxfield FR, Tabas I, 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature 438, 7068, 612–621.

Maxfield FR, Wustner D, 2002. Intracellular cholesterol transport. J Clin Invest 110(7):891–898.

McBride, S.D., Perentos, N., and Morton, A.J. 2015. A mobile, high-throughput semi-automated system for testing cognition in large non-primate animal models of Huntington disease. J. Neurosci. Methods pii S0165, 0270, 15, 0031.

McCracken JA, Baird DT, Carlson JC, Goding JR, Barcikowski B, 1973. The role of prostaglandins in luteal regression. J Reprod Fertil Suppl, 18, 133–42.

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC, 1999. Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event. Physiol Rev, 79, 2, 263-323.

McCracken JA, Custer EE, Schreiber DT, Tsang PC, Keator CS, Arosh JA, 2012. A new in vivo model for luteolysis using systemic pulsatile infusions of PGF(2alpha). Prostaglandins other Lipid Mediat, 97, 3-4, 90–6.

McCracken JA, Glew ME, Scaramuzzi RJ, 1970. Corpus luteum regression induced by prostaglandin F2-alpha. J Clin Endocrinol Metab, 30, 4, 544–6.

McCracken JA. Prostaglandins and leukotriences. 2005. In: Conn SMaPM, ed. Endocrinology: Basic and Clinical Principles.2 ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 93-111.

MCguire, WJ., Juengel JL., Niswender GD, 1994. Protein kinase C second messenger system mediates the antisteroidogenic effects of prostaglandin F2a in the ovine corpus luteum in vivo. Biol. Reprod, 51, 800–806.

McLachlan G, Davidson H, Holder E, et al, 2011. Pre-clinical evaluation of three non-viral gene transfer agents for cystic fibrosis after aerosol delivery to the ovine lung. Gene Ther, 18, 996–1005.

Meidan R, Girsh E, Blum O, Aberdam E, 1990. In vitro differentiation of bovine theca and granulosa cells into small and large luteal-like cells: morphological and functional characteristics. Biol Reprod, 43, 6, 913–21.

Meidan R, Milvae RA, Weiss S, Levy N, Friedman A. Intraovarian regulation of luteolysis. J Reprod Fertil Suppl. 1999, 54, 217–28.

Melampy RM, Anderson LL. Role of the uterus in corpus luteum function. J Anim Sci., 1968. 27 suppl 1:77–96.

Menon M., Peegel H. & Menon KM., 1985. Lipoprotein augmentation of human chorionic gonadotropin and prolactin stimulated progesterone synthesis by rat luteal cells. J. Steroid. Biochem, 22, 1, 79-84.

Miller WL and Auchus RJ, 2011. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. Endocrine Reviews, 32, 1, 81.

Miller WL, Bose HS, 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol traffi cking. J Lipid Res, 52, 2111–35.

Miller WL, 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev, 9, 295-318.

Minegishi K, Tanaka M, Nishimura O, et al, 2002. Reactive oxygen species mediate leukocyte-endothelium interactions in prostaglandin F2α-induced luteolysis in rats. Am J Physiol, 283, E1308–15.

Miranda-Jiménez L, Murphy BD, 2007. Lipoprotein receptor expression during luteinization of the ovarian follicle. Am J Physiol Endocrinol Metab. 293, 4, E1053-61.

Mishra SK, Watkins SC, Traub LM, 2002, The autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein interfaces directly with the clathrin-coat machinery. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 25, p. 16099–104.

Miwa M, Tokuda H, Tsushita K, Kotoyori J, Takahashi Y, Ozaki N, Kozawa O, Oiso Y, 1990. Involvement of pertussis-toxin-sensitive GTP-binding protein in prostaglandin F2α-induced phosphoinositide hydrolysis in osteoblast-like cells. Biochem Biophys Res Commun, 171, 1229–1235.

Miyamoto A, Shirasuna K, Shimizu T, Bollwein H, Schams D, 2010. Regulation of corpus luteum development and maintenance: specifi c roles of angiogenesis and action of prostaglandin F2alpha. Soc Reprod Fertil Suppl, 67, 289–304.

Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MP, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, et al, 2005. Blood fl ow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. Domestic Anim Endocrinol, 29, 2, 329–39.

Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, et al, 2006. Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. Biol Reprod, 74, 1073–82.

Mizutani T, Sonoda Y, Minegishi T, Wakabayashi K, Miyamoto K, 1997. Molecular cloning, characterization and cellular distribution of rat steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the ovary. Life Sci, 61, 1497–506.

Mondal M, Schilling B, Folger J, Steibel JP, Buchnick H, Zalman Y, Ireland JJ, Meidan R, Smith GW, 2011. Decipheringthe luteal transcriptome: potential mech-anisms mediating stage-specific luteolyticresponse of the corpus luteum to prosta-glandin F. Physiol Genomics 43, 447–456.

Moor RM, Hay MF, Short RV, Rowson LE, 1970. The corpus luteum of the sheep: effect of uterine removal during luteal regression. J Reprod Fertil, 21, 2, 319–26.

Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, et al. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. J Clin Invest; 115:1913–1922.

Morton JD, Lee HY, McDermott JD, Robertson JJ, Bickerstaffe R, Jones MA, et al, 2005. A macrocyclic calpain inhibitor slows the development of inherited cortical cataracts in a sheep model. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013, 54, 389–95.

Mouzat K, Volat F, Baron S, Alves G, Pommier AJ, Volle DH, Marceau G, DeHaze A, Déchelotte P, Duggavathi R, Caira F, Lobaccaro JM, 2009. "Absence of Nuclear Receptors for Oxysterols Liver X Receptor Induces Ovarian Hyperstimulation Syndrome in Mice", Endocrinology, 150, 7, 3369–3375.

Murdoch W J, 1987. Treatment of sheep with prostaglandin F2a enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. Am. J. Reprod. Immunol, 15, 52–56.

Murdoch WJ, Steadman LE, 1991. Investigations concerning the relationship of ovarian eosinophilia to ovulation and luteal function in the sheep. Am. J. Reprod. Immunol, 25, 81–87.

Murdoch WJ, 1995. "Temporal relationships between stress protein induction, progesterone withdrawal, and apoptosis in corpora lutea of ewes treated with prostaglandin F2α". Journal of Animal Science, 73, 1789–1792.

Naik SU, Wang X, Da Silva JS, Jaye M, Macphee CH, Reilly MP, Billheimer JT, Rothblat GH & Rader DJ, 2006. Pharmacological activation of liver X receptors promotes reverse cholesterol transport in vivo. Circulation, 113 90–97.

Nandi S, Ma L, Denis M, Karwatsky J, Li Z, Jiang XC, Zha X, 2009. ABCA1-mediated cholesterol efflux generates microparticles in addition to HDL through processes governed by membrane rigidity. J Lipid Res, 50, 3, 456–466.

Narumiya S, FitzGerald GA, 2001. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. J Clin Invest, 108, 1, 25-30.

Ndikum-Moffor FM, Simmen RCM, Fields PA, Katoh N, Oikawa S, Buhi WC, Rollyson MK, Chang ST & Fields MJ, 1997 Synthesis and messenger ribonucleic acid expression of apolipoproteins E and A-I by the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. Biology of Reproduction, 56, 745–756. (doi:10.1095/biolreprod56.3.745).

Ness GC, Chambers CM, 2000. "Feedback and hormonal regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: the concept of cholesterol buffering capacity (44508)," Experimental Biology and Medicine, 224, no. 1, pp. 8–19.

Nett, T. M., MCclellan M. C., Niswender G. D. Effects of prostaglandins on the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. Biol. Reprod. 15: 66–78, 1976.

Neuvians TP, Schams D, Berisha B, Pfaffl MW, 2004. Involvement of pro-infl ammatory cytokines, mediators of infl ammation, and basic fi broblast growth factor in prostaglandin F2alphainduced luteolysis in bovine corpus luteum. Biol Reprod, 70, 2, 473–80.

Nilsson M, Stulnig TM, Lin CY, Yeo AL, Nowotny P, Liu ET, Steffensen KR, 2007. Liver X receptors regulate adrenal steroidogenesis and hypothalamic-pituitary-adrenal feedback. Mol Endocrinol, 21, 126–137.

Nio-Kobayashi J, Trendell J, Giakoumelou S, Boswell L, Nicol L, Kudo M, Sakuragi N, Iwanaga T, Duncan WC, 2015. Bone morphogenetic proteins are mediators of luteolysis in the human corpus luteum. Endocrinology. 156, 4, 1494-503.

Nishizuka Y, 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. Science 233, 305–312.

Niswender GD, Juengel JL, Silva PJ, Rollyson MK, McIntush EW, 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. Physiol Rev, 80, 1, 1–29.

Niswender GD, Diekman MA, Nett TM, Akbar AM, 1973. Relative blood flow to the ovaries of cycling and pregnant ewes. Biol. Reprod, 9, 87.

Niswender GD, Nett T M, 2005. "Control of the Mmenstrual cycle and the consequences of fertilization on the life of the corpus luteum", Knobil and Neill Physiology of Reproduction, In: Wassarman P, Neill J, Editor, Elsewier, Academic Press, 489- 525.

Nitta A, Shirasuna K, Nibuno S, Bollwein H, Shimizu T, Miyamoto A, 2013. Downregulation of lymphatic vessel formation factors in PGF2α-induced luteolysis in the cow. J Reprod Dev, 59, 3, 296-30.

Nwokoro NA, Wassif CA, Porter FD, 2001. Genetic disorders of cholesterol biosynthesis in mice and humans. Mol Genet Metab, 74, 1–2, 105–119.

Ohtani M, Kobayashi S, Miyamoto A, Hayashi K, Fukui Y, 1998. Real-time relationships between intraluteal and plasma concentrations of endothelin, oxytocin, and progesterone during prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in the cow. Biol Reprod, 58, 1, 103–8.

Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ, 2004. "Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells", Biology of Reproduction, Biol Reprod, 71, 2065, 2071.

Oram JF, Lawn RM, 2001. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. J Lipid Res, 42, 8, 1173–1179.

Oram JF, Yokoyama S, 1996. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. J Lipid Res 37, 12, 2473–2491.

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S, 2001. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. J Biol Chem, 276, 11387–92.

Paavola LG, 1979. Cellular mechanisms involved in luteolysis. Adv Exp Med Biol, 112, 527-533.

Pannu PS, Allahverdian S, Francis, GA, 2013. Oxysterol generation and liver X receptor-dependent reverse cholesterol transport: not all roads lead to Rome. Molecular and cellular endocrinology 368, 99-107.

Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapère JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M, 2006. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. Trends Pharmacol Sci, 27, 8, 402-9.

Papadopoulos V, Brown AS, 1995. Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the polypeptide diazepam binding inhibitor in steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol, 53, 103-10.

Parrish AB, Freel CD, Kornbluth S, 2013. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. Cold Spring Harbor Perspect Biol, 5, 6.

Parton RG, Simons K, 2007. The multiple faces of caveolae. Nat Rev Mol Cell Biol, 8, 3, 185–194, 67.

Pate JL, Nephew KP, 1988. Effects of in vivo and in vitro administration of prostaglandin F2 alpha on lipoprotein utilization in cultured bovine luteal cells. Biol Reprod, 38, 3, 568–76.

Patwardhan VV, Lanthier A, 1980. Concentration of prostaglandins PGE and PGF, estrone, estradiol, and progesterone in human corpora lutea. Prostaglandins, 20, 963–969.

Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro J-MA, Hammer RE, Mangelsdorf DJ, 1998. Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXRα Cell, 93, 693–704.

Pelletier G, Li S, Luu-The V, Tremblay Y, Belanger A, Labrie F, 2001. Immunoelectron microscopic localization of three key steroidogenic enzymes (cytochrome P450(scc), 3 betahydroxysteroid dehydrogenase and cytochrome P450(c17)) in rat adrenal cortex and gonads. J Endocrinol, 171, 373–83.

Peluffo MC, Young KA, Stouffer RL, 2005. Dynamic expression of caspase-2, -3, -8, and -9 proteins and enzyme activity, but not messenger ribonucleic acid, in the monkey corpus luteum during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab, 90, 4, 2327–35.

Pencheva N, Buss CG, Posada J, Merghoub T, Tavazoie SF, 2014. Broad-spectrum therapeutic suppression of metastatic melanoma through nuclear hormone receptor activation. Cell, 156, 986–1001.

Penny LA, Armstrong D, Bramley TA, Webb R, Collins RA, et al, 1999. Immune cells and cytokine production in the bovine corpus luteum throughout the oestrous cycle and after induced luteolysis. J Reprod Fertil, 115, 87–96.

Pescador N, Stocco DM, Murphy BD, 1999. Growth factor modulation of steroidogenic acute regulatory protein and luteinization in the pig ovary. Biol Reprod, 60, 1453–61.

Pharriss BB, Wyngarden LJ, 1969. The effect of prostaglandin F 2alpha on the progestogen content of ovaries from pseudopregnant rats. Proc Soc Exp Biol Med, 130, 1, 92–4.

Pierre A, Pisselet C, Dupont J, Mandon-Pepin B, Monniaux D, Monget P, et al, 2004. Molecular basis of bone morphogenetic protein-4 inhibitory action on progesterone secretion by ovine granulosa cells. J Mol Endocrinol, 33, 805–17.

Ponting CP, Aravind L, 1999. START: a lipid-binding domain in StAR, HD-ZIP and signalling proteins. Trends Biochem Sci, 24, 4, 130–132.

Porada CD, Sanada C, Kuo CJ, Colletti E, Mandeville W, Hasenau J, et al, 2011. Phenotypic correction of hemophilia A in sheep by postnatal intraperitoneal transplantation of FVIII-expressing MSC. Exp Hematol, 39, 1124–35.

Porada CD, Sanada C, Long CR, Wood JA, Desai J, Frederick N, et al, 2010. Clinical and molecular characterization of a re-established line of sheep exhibiting hemophilia A. J Thromb Haemost, 8, 276–85.

Porter BF, Lewis BC, Edwards JF, Alroy J, Zeng BJ, Torres PA, et al, 2011. Pathology of G(M2) Gangliosidosis in Jacob Sheep. Vet Pathol, 48, 807–13.

Przygrodzka E, Kaczmarek MM, Kaczynski P, Ziecik AJ, 2016. Steroid hormones, prostanoids, and angiogenic systems during rescue of the corpus luteum in pigs, Reproduction, 151, 2, 135-47.

Przygrodzka E, Witek KJ, Kaczmarek MM, Andronowska A, Ziecik AJ, 2015. Expression of factors associated with apoptosis in the porcine corpus luteum throughout the luteal phase of the estrous cycle and early pregnancy: their possible involvement in acquisition of luteolytic sensitivity. Theriogenology, 83, 4, 535-45.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. Theriogenology, 44, 7, 915–23.

Pusterla N, Madigan JE, Leutenegger CM, 2006. Realtime polymerase chain reaction: a novel molecular diagnostic tool for equine infectious diseases. J Vet Intern Med, 20, 3–12.

Puttabyatappa M, Vandevoort CA, Chaffin CL, 2010. hCG-induced down-regulation of PPARgamma and liver X receptors promotes periovulatory progesterone synthesis by macaque granulosa cells. Endocrinology, 151, 5865–72.

Quack M, Frank C, Carlberg C, 2002. "Differential nuclear receptor signalling from DR4-type response elements" Journal of Cell Biochemistry, 86, 3, 601-12.

Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD & Nambi P, 2006. Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. Molecular Pharmacology, 70, 1340–1349.

Rader DJ, Hovingh GK, 2014. HDL and cardiovascular disease. Lancet, 16, 384, 9943, 618-25.

Ragoobir J, Abayasekara DR, Bruckdorfer KR & Michael AE, 2002. Stimulation of progesterone production in human granulosalutein cells by lipoproteins: evidence for cholesterol-independent actions of high-density lipoproteins. Journal of Endocrinology, 173, 103–111.

Rajapaksha W R, McBride M, Robertson L, O'Shaughnessy PJ, 1997. "Sequence of the bovine HDL-receptor (SR-BI) cDNA and changes in receptor mRNA expression during granulosa cell luteinization in vivo and in vitro." Mol Cell Endocrinol, 134, 1, 59-67.

Ramirez CM, Davalos A, Goedeke L, Salerno AG, Warrier N, Cirera-Salinas D, Suárez Y, Fernández-Hernando C, 2011. MicroRNA-758 regulates cholesterol efflux through posttranscriptional repression of ATP-binding cassette transporter A1. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 31, 11, 2707–2714.

Rasmussen MK, Ekstrand B, Zamaratskaia G, 2013. Regulation of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ delta (5)-delta (4) isomerase: a review. Int J Mol Sci, 14, 17926–42.

Ravnskov U, Diamond DM Hama R, Hamazaki T, Hammarskjöld B, Hynes N, Kendrick M, Langsjoen PH, Malhotra A, Mascitelli L, McCully KS, Ogushi Y, Okuyama H, Rosch PJ, Schersten T, Sultan S, Sundberg R, 2016. Lack of an association or an inverse association between low-density-lipoprotein cholesterol and mortality in the elderly: a systematic review. BMJ Open, 12, 6, 6, e010401.

Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, van Gils JM, Rayner AJ, Chang AN, Suarez Y, Fernandez-Hernando C, Fisher EA, Moore KJ, 2011. Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. J Clin Invest, 121, 7, 2921–2931.

Reaven EL, Tsai, Azhar S, 1996. "Intracellular events in the "selective" transport of lipoproteinderived cholesteryl esters." J Biol Chem, 271,27, 16208-17.

Reed B, Villeneuve S, Mack W, DeCarli C, Chui HC, Jagust W, 2014. Associations between serum cholesterol levels and cerebral amyloidosis. JAMA Neurol, 71, 195–200.

Rekawiecki R, Nowik M, Kotwica J, 2005. Stimulatory effect of LH, PGE2 and progesterone on StAR protein, cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage and 3beta hydroxysteroid dehydrogenase gene expression in bovine luteal cells. Lipid Mediat, 78, 169–84.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ, 2000. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. Science, 289, 5484, ,1524–1529.

Reynolds L, Redmer D, 1999. Growth and development of the corpus luteum. J Reprod Fertil Suppl, 54, 181–191.

Rezapour M, Novara G, Meier PA, Holste J, Landgrebe S, Artibani WA, 2007. 3-month preclinical trial to assess the performance of a new TVT-like mesh (TVTx) in a sheep model. Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct, 18, 183–7.

Ribeiro LA, Turba ME, Zannoni A, Bacci ML, Forni M, 2006. Gelatinases, endonuclease and vascular endothelial growth factor during development and regression of swine luteal tissue. BMC Dev Biol, 6, 58.

Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN, 1998. "Molecular mechanisms of ovulation and luteinization", Molecular Cell Endocrinology, 145, 1-2, 47-54.

Ricke WA, Smith GW, Smith MF, 2002. Matrix metalloproteinase expression and activity following prostaglandin F (2 alpha)-induced luteolysis. Biol Reprod, 66, 3, 685–91.

Ricketts BF, Tsang PCW, Milvae RA, KeatorCS, McCracken JA, 2006. Dynamic in vivo levels of cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, and steroid acute regulatory protein (StAR) in the ovine corpus luteum after two luteolytic pulses of PGF2a. Abstract, 88th Annual Meeting of the Endocrine Society, Boston, MA.

Rigotti A, Trigatti B, Babitt J, Penman M, Xu S, Krieger M, 1997. Scavenger receptor BI-- a cell surface receptor for high density lipoprotein. Curr Opin Lipidol, 8, 181-188,

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT, 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem, 245, 154 – 60.

Rizzo A, Stefani AL, Piccinno M, Roncetti M, D'Onghia G, Sciorsci RL, 2016. Dynamics of the progesterone and cholesterol concentrations within the bovine corpus luteum cavity. Res Vet Sci, 109, 56-58.

Robinson RS, Woad KJ, Hammond AJ, Laird M, Hunter MG, Mann GE, 2009. Angiogenesis and vascular function in the ovary. Reproduction, 138, 6, 869–81.

Romano JE, Alkar A, Amstalden M, 2017. Onset of luteolytic action of exogenous prostaglandinF-2α during estrous cycle in goats. Theriogenology, 1, 92, 45-50.

Rone MB, Fan J, Papadopoulos V, 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: Role of protein-protein interactions and implications in disease states. Biochim Biophys Acta, 179, 7, 646-658.

Ronen-Fuhrmann T, Timberg R, King SR, Hales KH, Hales DB, Stocco DM, Orly J, 1998. "Spatio-temporal expression patterns of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) during follicular development in the rat ovary." Endocrinology, 139, 1, 303-15.

Rosenson RS, Brewer HB, Davidson WS, Fayad ZA, Fuster V, Goldstein J, Hellerstein M, Jiang XC, Phillips MC, Rader DJ, Remaley AT, Rothblat GH, Tall AR, Yvan-Charvet L, 2012. Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. Circulation, 125, 15, 1905–1919.

Rueda BR, Hendry IR, Tilly JL, Hamernik DL, 1999. Accumulation of caspase-3 messenger ribonucleic acid and induction of caspase activity in the ovine corpus luteum following prostaglandin F2alpha treatment in vivo. Biol Reprod, 60, 5, 1087–92.

Sabol SL, Brewer HB Jr & Santamarina-Fojo S, 2005. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. Journal of Lipid Research, 46, 2151–2167.

Sakamoto K, Ezashi T, Miwa K, Okuda-Ashitaka E, Houtani T, Sugimoto T, Ito S, Hayaishi O, 1994. Molecular cloning and expression of a cDNA of the bovine prostaglandin F2a receptor. J. Biol. Chem, 269, 3881–3886, 1994.

Sandhoff TW, McLean MP, 1999. Repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by PGF2alpha is modulated by the negative transcription factor DAX-1. Endocrine, 10, 83–91.

Sankaranarayanan S, Oram JF, Asztalos BF, Vaughan AM, Lund-Katz S, Adorni MP, Phillips MC, Rothblat GH, 2009. "Effects of acceptor composition and mechanism of ABCG1-mediated cellular free cholesterol efflux", Journal of Lipid Research, 50, 2, 275-84.

Santamarina-Fojo S, Peterson K, Knapper C, Qiu Y, Freeman L, Cheng JF, Osorio J, Remaley A, Yang XP, Haudenschild C, Prades C, Chimini G, Blackmon E, Francois T, Duverger N, Rubin EM, Rosier M, Denèfle P, Fredrickson DS, Brewer HB Jr, 2000. Complete genomic sequence of the human ABCA1 gene: analysis of the human and mouse ATP-binding cassette A promoter. Proc Natl Acad Sci USA, 97,7987–7992.

Sartoretto SC, Uzeda MJ, Miguel FB, Nascimento JR, Ascoli F, Calasans-Maia MD, 2016. Sheep as an experimental model for biomaterial implant evaluation. Acta Ortop Bras, 24, 5, 262-266.

Sawyer HR, Niswender KD, Braden TD, Niswender GD, 1990. Nuclear changes in ovine luteal cells in response to PGF2 alpha. Domest Anim Endocrinol, 7, 2, 229-237.

Schams D, Berisha B, 2004. Regulation of corpus luteum function in cattle: an overview. Reprod Domestic Anim, 39 4, 241–51.

Schmitz G, Langmann T, Heimerl S, 2001. Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. J Lipid Res, 42, 10, 1513–1520.

Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC, Li L, Schwendner S, Wang S, Thoolen M, Mangelsdorf DJ, Lustig KD, Shan B, 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. Genes Dev, 14, 2831–2838.

Sekar N, Garmey JC, Veldhuis JD, 2000. Mechanisms underlying the steroidogenic synergy of insulin and luteinizing hormone in porcine granulosa cells: joint amplifi cation of pivotal sterol- regulatory genes encoding low-density lipoprotein (LDL) receptor, steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) enzyme. Mol Cell Endocrinol, 159, 25–35.

Sekar N, Veldhuis JD, 2004. Involvement of Sp1 and SREBP-1a in transcriptional activation of the LDL receptor gene by insulin and LH in cultured porcine granulosa-luteal cells. Am J Physiol Endocrinol Metab, 287, 1, E128-35.

Sen A, Wright M, Inskeep EK, Flores JA, 2006. Participationof specific PKC isozymes in the inhibitory effect of ET-1 onprogesterone accumulation in cells isolated from early- andmid-phase corpora lutea. Domest Anim Endocrinol, 31, 284– 299.

Seto NL, Bogan RL, 2015. Decreased Cholesterol Uptake and Increased Liver X Receptor-Mediated Cholesterol Efflux Pathways During Prostaglandin F2 Alpha-Induced and Spontaneous Luteolysis in Sheep. Biol Reprod, 92, 5, 128.

Shah KB, Tripathy S, Suganthi H, Rudraiah M, 2014. Profiling of luteal transcriptome during prostaglandin F2-alpha treatment in buffalo cows: analysis of signaling pathways associated with luteolysis, PLoS One, 9, 8, e104127.

Shinar DM, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Rodan GA & Schmidt A, 1994 NER, a new member of the gene family encoding the human steroid hormone nuclear receptor. Gene, 147, 273–276.

Shirasuna K, Sasahara K, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A, 2010. Prostaglandin F2alpha differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. J Reprod Dev, 56, 4, 428–36.

Shirasuna K, Watanabe S, Asahi T, Wijayagunawardane MP, Sasahara K, Jiang C, Matsui M, Sasaki M, Shimizu T, Davis JS, Miyamoto A, 2008. Prostaglandin F2alpha increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. Reproduction, 135, 4, 527-39.

Sierralta WD, Kohen P, Castro O, Muñoz A, Strauss JF, Devoto L, 2005. Ultrastructural and biochemical evidence for the presence of mature steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in the cytoplasm of human luteal cells. Mol Cell Endocrinol, 242, 1-2, 103-10.

Simons K, Ikonen E, 1997. "Functional rafts in cell membranes", Nature, 387:569–572. Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G. 2007. "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression", Endocrine Reviews, 1,117-49.

Singaraja RR, Bocher V, James ER, Clee SM, Zhang LH, Leavitt BR, Tan B, Brooks-Wilson A, Kwok A, Bissada N, Yang YZ, Liu G, Tafuri SR, Fievet C, Wellington CL, Staels B, Hayden MR, 2001. Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAIdependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1. J Biol Chem, 276, 33969–33979.

Skarzynski DJ, Jaroszewski JJ, Okuda K, 2005. Role of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in luteolysis in cattle. Domestic Anim Endocrinol, 29, 2, 340–6.

Slot KA, Voorendt M, de Boer-Brouwer M, van Vugt HH, Teerds KJ, 2006. Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. J Endocrinol, 188, 2, 179–92.

Smith DW, Lemli L, Opitz JM, 1964. A newly recognized syndrome of multiple congenital anomalies. J Pediatr 64, 210–217.

Smith GW, Meidan R, 2014. Ever-changing cell interactions during the life span of the corpus luteum: relevance to luteal regression. Reprod Biol, 14, 2, 75–82.

Soccio RE, Breslow JL ,2003. StAR-related lipid transfer (START) proteins: mediators of intracellular lipid metabolism. J Biol Chem ,278, 25, 22183–22186.

Soccio RE, Breslow JL, 2004. Intracellular cholesterol transport. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 24, 7, 1150–1160.

Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA & Liao S, 1994. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. PNAS, 91, 10809–10813.

Spady DK, Dietschy JM, 1983. Sterol synthesis in vivo in 18 tissues of the squirrel monkey, guinea pig, rabbit, hamster, and rat. J. Lipid Res. 24: 303-315.

Sparrow CP, Pittman RC, 1990. "Cholesterol esters selectively taken up from highdensity lipoproteins are hydrolyz ed extralysosomally." Biochim Biophys Acta, 1043, 2, 203-10.

Spencer TE, Burghardt RC, Johnson GA, Bazer FW, 2004. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. Anim Reprod Sci, 82-83, 537- 550.

Steffensen KR, Robertson K, Gustafsson JA, Andersen CY, 2006. Reduced fertility and inability of oocytes to resume meiosis in mice deficient of the Lxr genes. Mol Cell Endocrinol, 256, 9–16.

Stocco C, 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. Steroids, 73, 473–87.

Stocco DM, 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. Annu Rev Physiol 63, 193–213.

Stocco DM, 2000. The role of StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. Journal of Endocrinology 164, 247-253.

Stocco DM, Clark BJ, 1996. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. Endocr Rev, 17, 221–44.

Stocco DM, Sodeman TC, 1991. The 30-kDa mitochondrial proteins induced by hormone stimulation in MA-10 mouse Leydig tumor cells are processed from larger precursors. J Biol Chem, 266, 19731-8.

Stocco DM, 2000. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. J Endocrinol, 164, 247–253.

Stocco C, Telleria C, Gibori G, 2007. "The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression", Endocrine Reviews, 1,117-49.

Sugino N, Okuda K, 2007. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. J Reprod Dev, 53, 977–986.

Summers PM, Wennink CJ, Hodges JK, 1985. Cloprostenol-induced luteolysis in the marmoset monkey (Callithrix jacchus). J Reprod Fertil, 73, 1, 133–8.

Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X, 2012. MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. FEBS Lett, 586, 10, 1472–1479.

Svensson PA, Johnson MS, Ling C, Carlsson LM, Billig H, Carlsson B, 1999. "Scavenger receptor class B type I in the rat ovary: possible role in high density lipoprotein cholesterol uptake and in the recognition of apoptotic granulosa cells." Endocrinology, 140, 6, 2494-500.

Swan CL, Agostini MC, Bartlewski PM, Feyles V, Urban RJ, Chedrese PJ, 2002. Effects of progestins on progesterone synthesis in a stable porcine granulosa cell line: control of transcriptional activity of the cytochrome p450 side-chain cleavage gene. Biol Reprod, 66, 959–65.

Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A, 2012. The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions 2012 Nov, 64, 7-8, 775-82.

Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N, 2008. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. Cell Metab, 7,5, 365–375.

Tandeski TR, Juengel JL, Nett TM, Niswender GD, 1996. Regulation of mRNA encoding low density lipoprotein receptor and high density lipoprotein-binding protein in ovine corpora lutea. Reprod Fertil Dev, 8, 1107-1114.

Taniguchi H, Yokomizo Y, Okuda K, 2002. Fas-Fas ligand system mediates luteal cell death in bovine corpus luteum. Biol Reprod, 66, 3, 754–9.

Tarling EJ, Edwards PA, 2012. Dancing with the sterols: critical roles for ABCG1, ABCA1, miRNAs, and nuclear and cell surface receptors in controlling cellular sterol homeostasis. Biochim Biophys Acta, 1821, 386–395.

Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikstrom AC, Pelto-Huikko M & Gustafsson JA, 1995. OR-1 a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. PNAS, 92, 2096–2100.

Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Morikawa Y & Nakai D, 2003. Inaba T T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. FEBS Letters, 536, 6–11.

Theofilopoulos S, Wang Y, Kitambi SS, Sacchetti P, Sousa KM, Bodin K, Kirk J, Salto C, Gustafsson M, Toledo EM, 2012. Brain endogenous liver X receptor ligands selectively promote midbrain neurogenesis. Nat. Chem. Biol, 9, 126–133.

Thorpe GHG, Kricka LJ, Mosely SB, Whitehead TP, 1985. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase-luminol-hydrogen peroxide reaction: Application in luminescence-monitored enzyme immunoassays. Clin. Chem, 31, 1335-1341.

Tian XC, Berndtson AK, Fortune JE, 1994. Changes in levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P450 side-chain cleavage and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in cattle. Biol Reprod, 50, 349–56.

Towle TA, Tsang PC, Milvae RA, Newbury MK, McCracken JA, 2002. Dynamic in vivo changes in tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2, and matrix metalloproteinases 2 and 9, during prostaglandin F(2alpha)-induced luteolysis in sheep. Biol Reprod, 66, 5, 1515–21.

Tsai SJ, Wiltbank MC, 1998. Prostaglandin F2alpha regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. Biol Reprod, 58, 2, 346–52.

Tuckey RC, Stevenson PM, 1980. Cholesteryl esterase and endogenous cholesteryl ester pools in ovaries from maturing and superovulated immature rats. Biochim Biophys Acta, 618, 501–9.

Turner AS, 2007. Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: Strengths and shortcomings. J Shoulder Elbow Surg, 16, 5, 158S-63S.

Van der Velden J, Snibson KJ, 2011. Airway disease: the use of large animal models for drug discovery. Pulm Pharmacol Ther, 24, 525–532.

Vance DE, Van den Bosch H, 2000. Cholesterol in the year. Biochim Biophys Acta, 1529, 1–3, 1–8.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, 3(7), research0034.

Vaughan AM, Oram JF, 2003, ABCA1 redistributes membrane cholesterol independent of apolipoprotein interactions. J Lipid Res 44, 7, 1373–1380.

Vaughan AM, Oram JF, 2006. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. J Lipid Res, 47, 11, 2433–2443.

Vedhachalam C, Duong PT, Nickel M, Nguyen D, Dhanasekaran P, Saito H, Rothblat GH, Lund-Katz S, Phillips MC, 2007. Mechanism of ATP-binding cassette transporter A1-mediated cellular lipid efflux to apolipoprotein A-I and formation of highdensity lipoprotein particles. J Biol Chem, 282, 34, 25123–25130.

Verreault M, Senekeo-Effenberger K, Trottier J, Bonzo JA, Belanger J, Kaeding J, Staels B, Caron P, Tukey RH & Barbier O, 2006. The liver X-receptor alpha controls hepatic expression of the human bile acidglucuronidating UGT1A3 enzyme in human cells and transgenic mice. Hepatology, 44, 368–378.

Vonnahme KA, Redmer DA, Borowczyk E, Bilski JJ, Luther JS, Johnson ML, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, 2006. Vascular composition, apoptosis, and expression of angiogenic factors in the corpus luteum during prostaglandin F2alpha-induced regression in sheep. Reproduction, 131, 6, 1115–26.

Voss AK, Fortune JE, 1993. Levels of messenger ribonucleic acid for cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450 and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenas in bovine preovulatory follicles decrease after the luteinizing hormone surge. Endocrinology, 132, 888–94.

Walsh SW, Mehta JP, McGettigan PA, Browne JA, Forde N, Alibrahim RM, Mulligan FJ, Loftus B, Crowe MA, Matthews D, Diskin M, Mihm M, Evans AC, 2012. Effect of the metabolic environment at key stages of follicle development in cattle: focus on steroid biosynthesis, Physiol Genomics, 44, 9, 504-17.

Wang SZ, Roberts RM, 2004. Interaction of stress-activated protein kinase-interacting protein-1 with the interferon receptor subunit IFNAR2 in uterine endometrium. Endocrinology, 145, 12, 5820-5831.

Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR & Burris TP, 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. Journal of Biological Chemistry, 283, 26332–26339.

Wang X, Seed B, 2007. "High-throughput primer and probe design. In Dorak MT, editor. Real Time PCR, New York; Taylor & Francis Group, 93-106.

Weems CW, Weems YS, Randel RD, 2006. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. Vet J, 171, 2, 206-228.

Wenzinger B, Bleul U, 2012. Effect of a prostaglandin F2α analogue on the cyclic corpus luteum during its refractory period in cows. BMC Vet Res, 14, 8, 220.

Wilson L Jr, Butcher RL, Inskeep EK, 1972. Prostaglandin F2alpha in the uterus of ewes during early pregnancy. Prostaglandins, 1, 6, 479-482.

Wiltbank JN, Casida LE, 1956. Alteration of ovarian activity by hysterectomy. J Anim Sci, 5, 1, 134–40.

Wiltbank MC, Diskin MG, Flores JA, Niswender GD, 1990. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F2 alpha. Biol Reprod, 42, 2, 239–45.

Wiltbank MC, Ottobre JS, 2003. Regulation of intraluteal production of prostaglandins. Reprod Biol Endocrinol, 1, 91.

Wlodawer P, Kindahl H, Hamberg M, 1976. Biosynthesis of prostaglandin F2alpha from arachidonic acid and prostaglandin endoperoxides in the uterus. Biochim Biophys Acta, 431, 3, 603-614.

Wright K, Pang CY, Behrman HR, 1980. Luteal membrane binding of prostaglandin F2 alpha and sensitivity of corpora lutea to prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in pseudopregnant rats. Endocrinology, 106, 5, 1333–7.

Wu Y, Yu DD, Yan DL, Hu Y, Chen D, Liu Y, Zhang HD, Yu SR, Cao HX, Feng JF, 2016. Anticancer Liver X receptor as a drug target for the treatment of breast cancer. Drugs, 27, 5, 373-82.

Wulff C, Wilson H, Largue P, Duncan WC, 2000. Armstrong DG, Fraser HM. Angiogenesis in the human corpus luteum: localization and changes in angiopoietins, tie-2, and vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid. J Clin Endocrinol Metab, 85, 11, 4302–9.

Yadav VK, Lakshmi G, Medhamurthy R, 2005. Prostaglandin F2alpha-mediated activation of apoptotic signaling cascades in the corpus luteum during apoptosis: involvement of caspaseactivated DNase. J Biol Chem, 280, 11, 10357–67.

Yadav VK, Sudhagar RR, Medhamurthy R. Apoptosis during spontaneous and prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the buffalo cow (Bubalus bubalis): involvement of mitogen-activated protein kinases. Biol Reprod. 2002, 67, 3, 752–9.

Yadav VK, Medhamurthy R, 2006. Dynamic changes in mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities in the corpus luteum of the bonnet monkey (Macacaradiata) during development, induced luteolysis, and simulated early pregnancy: a role for p38 MAPK in the regulation of luteal function, Endocrinology 147, 2018-2027.

Yamazaki T, Matsuoka C, Gendou M, Izumi S, Zhao D, Artemenko I, Jefcoate CR, Kominami S, 2006. Mitochondrial processing of bovine adrenal steroidogenic acute regulatory protein, Biochim Biophys Acta, 1764, 1561-1567).

Yang Y, Sun M, Shan Y, Zheng X, Ma H, Ma W, Wang Z, Pei X, Wang Y2, 2015. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptotic pathway is involved in corpus luteum regression in rats. Reprod Sci, 22, 5, 572–84.

Yigin AK, Cora T, Acar H, Kurar E, Kayis SA, Colpan B, Ozturk K, Hitit M, 2017. Selection of reliable reference genes for qRT-PCR analysis on head and neck squamous cell carcinomas. Biomedical Research, 28, 5, 2014-2018.

Yokoyama S, 1998. Apolipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. Biochim Biophys Acta 1392, 1, 1–15.

Yokoyama S, 2000. Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cells and in the body. Biochim Biophys Acta 1529, 1–3, 231–244.

Yokoyama S, 2006. ABCA1 and biogenesis of HDL. J Atheroscler Thromb, 13, 1, 1–15.

Yoshioka S, Abe H, Sakumoto R, Okuda K, 2013. Proliferation of luteal steroidogenic cells in cattle. PLoS One, 8, e84186.

Youlin K, Li Z, Weiyang H, Jian K, Siming L, Xin G, 2017. Liver X receptor activation inhibits PC-3 prostate cancer cells via the beta-catenin pathway. Pathol Res Pract. 213, 3, 267-270.

Zalman Y, Klipper E, Farberov S, Mondal M, Wee G, Folger JK, Smith GW, Meidan R, 2012. Regulation of angiogenesis- related prostaglandin F2alpha-induced genes in the bovine corpus luteum. Biol Reprod, 86, 3, 92.

Zanotti I, Favari E, Bernini F, 2012. Cellular cholesterol efflux pathways: impact on intracellular lipid trafficking and methodological considerations. Curr Pharm Biotechnol, 13, 2, 292–302.

Zanotti I, Maugeais C, Pedrelli M, Gomaraschi M, Salgam P, Calabresi L, Bernini F, Kempen H, 2011. The thienotriazolodiazepine Ro 11-1464 increases plasma apoA-I and promotes reverse cholesterol transport in human apoA-I transgenic mice. Br J Pharmacol, 164, 6, 1642–1651.

Zanotti I, Pedrelli M, Potì F, Stomeo G, Gomaraschi M, Calabresi L, Bernini F, 2011. Macrophage, but not systemic, apolipoprotein E is necessary for macrophage reverse cholesterol transport in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 31, 1, 74–80.

Zarco L, Stabenfeldt GH, Basu S, Bradford GE, Kindahl H. Modification of prostaglandin F-2 alpha synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. J Reprod Fertil. 1988;83(2):527-536.

Zhang H, Klausen C, Zhu H, Chang HM, Leung PC, 2015. BMP4 and BMP7 Suppress StAR and Progesterone Production via ALK3 and SMAD1/5/8-SMAD4 in Human Granulosa-Lutein Cells. Endocrinology, 156, 11, 4269-80.

Zhao C, Dahlman-Wright K, 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. J Endocrinol, 204, 3, 233-40.

Zheng J, Fricke PM, Reynolds LP, Redmer DA, 1994. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. Biol Reprod, 51, 4, 623-632.

Zheng J, Redmer DA, Reynolds LP, 1993. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. Biol Reprod, 49, 6, 1177–89.

Zhu X, Lee JY, Timmins JM, Brown JM, Boudyguina E, Mulya A, Gebre AK, Willingham MC, Hiltbold EM, Mishra N, Maeda N, Parks JS, 2008. Increased cellular free cholesterol in macrophage-specific Abca1 knock-out mice enhances pro-inflammatory response of macrophages. J Biol Chem, 283, 22930–22941.

Zorrilla LM, D'Annibale MA, Swing SE, Gadsby JE, 2013. "Expression of genes associated with apoptosis in the porcine corpus luteum during the oestrous cycle", Reproduction in Domestic Animals, 48, 5, 755-61.

7. EKLER

EK A. Etik Kurul Kararı

T.C.
BAHRİ DAĞDAŞ ULUSLARARASI TARIMSAL ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

Evrak Kayıt : 0636 Geliş Tarihi : 23.02.2016 Karar Tarihi ve Sayısı : 26.02.2016/48
Araştırma Yürütücüsü : Mustafa HİTİT
Araştırmanın Adı : Luteal regresyonda Liver X Reseptör yolağının araştırılması
Hayvan türleri ve sayıları: 34 baş Koyun

Araştırma daha önce yapılmış mı?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmacı / ların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet ☒	Hayır ☐
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet ☐	Hayır ☒
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet ☒	Hayır ☐
Hayvanlara ötanazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet ☐	Hayır ☐
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet ☐	Hayır ☐
Açıklamalar: Dr. Bülent BÜLBÜL projede yer aldığından dolayı toplantıya katılmamıştır.		

Tarafımızdan değerlendirilen bu çalışma **Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Yönergesi**'nde belirtilen ilkelere uygun bulunmuştur.

Nafiz Kürşat AKBULUT
Kurul Başkanı

Dr. Bumin Emre TEKE
Üye

Ali ATİK
Başkan Vekili

Mesut KIRBAŞ
Üye

İbrahim HALICI
Üye

Dr. Bülent BÜLBÜL
Üye

Dr. Mustafa KAN
Üye

Nihal GÖKSU
Üye

Ramazan KILIÇARASLAN
Üye

EK B. 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'in kullanmasında tarafımca bir sakınca bulunmamaktadır. 23/02/2016

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

8. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Bolu'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Bolu'da tamamladıktan sonra 2005 yılında Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazandı. 2010 yıllında Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesinden mezun oldu ve 2011 yılında Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Zootekni ve Hayvan Besleme Bölümü, Genetik Anabilim Dalına ÖYP kapsamında araştırma görevlisi olarak atandı. Dicle Üniversitesinde 1 yıl çalıştıktan sonra 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik anabilim dalında doktora eğitimine başladı. 2012 yılında 35. Madde ile görevlendirildiği Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim dalındaki doktora eğitimine halen devam etmektedir.