



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN FALLOP TÜPLERİNDE WNT SİNYALİ EKSPRESYON PATERNLERİNİN İNCELENMESİ

Naciye ÖZYURT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Gaziantep

2019



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN FALLOP TÜPLERİNDE WNT SİNYALİ EKSPRESYON PATERNLERİNİN İNCELENMESİ

Naciye ÖZYURT
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Gaziantep

2019

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN FALLOP TÜPLERİNDE WNT SİNYALİ EKSPRESYON
PATERNLERİNİN İNCELENMESİ

NACİYE ÖZYURT

Tez Savunma Tarihi: 24.07.2019

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu çalışmanın bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCİERİ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ

.....

Prof. Dr. A. Şahin Sırmalı

.....

Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCİERİ

.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazılması sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

24.07.2019

Naciye ÖZYURT

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi, değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ'ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana emek veren hocalarım, Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Mehmet YÜNCÜ'ye, Sayın Prof. Dr. Serap S. İnalöz Demir'e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TÜRKER'e,

Tezimin revers-transkriptaz kantitatif PCR çalışmalarında bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan Gaziantep Üniversitesi İleri Düzey Eğitim ve Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Sayın Öğr. Gör. Dr. Demet TAŞDEMİR'e, ışık mikroskopik inceleme çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Gaziantep Üniversitesi Patoloji AD öğretim üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Zehra BOZDAĞ'a, çalışmama yaptığı kıymetli katkılarından dolayı Sayın Uzm. Dr. Ali OVAYOLU'na,

Çalışmalarında benimle tecrübelerini paylaşan, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Abu Shameem MD. Saadat KHANDAKAR'a, Sayın Dr. Seçil EROĞLU'na ve Sayın Uzm. Dr. Sinan TEKE'ye,

Tezimin istatistik değerlendirmesini yapan Sayın Öğr. Gör. Tanyeli GÜNEYLİĞİL KAZAZ'a,

Maddi ve manevi anlamda bana destek olan kıymetli aileme ve her daim benimle olan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu proje Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (BAPYB) tarafından (BAP No: TF.YLT.1838) desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGE ve KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ.....	xii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
FALLOP TÜPÜ (TUBA UTERİNA)	7
2.1. Fallop Tüpü Anatomisi	7
2.1.1. Damarlanma ve lenfatik drenaj	8
2.1.1.1. Arterler	8
2.1.1.2. Venler	9
2.1.1.3. Lenfatik drenaj	9
2.1.2. İnnervasyon	9
2.2. Fallop Tüpü Embriyolojisi	9
2.3. Fallop Tüpü Histolojisi	11
2.3.1. Silli hücreler	13
2.3.2. Sekretuar hücreler	14
2.3.3. İnsan fallop tüpünde transport.....	15
2.3.4. İnsan fallop tüpü morfolojisinde sıklık değişiklikler	15
2.3.4.1. Reseptör miktarı	16
2.3.4.2. Mitotik indeks ve hipertrofi.....	16
2.3.4.3. Yalancı çok katlılaşma	17
2.3.4.4. Nükleus	17
2.3.4.5. Lenfositler	17
2.3.4.6. Kubbeler	17
2.3.4.7. Diğer organeller	17
2.3.5. Fallop tüpü kök hücreleri	18

2.3.5.1. Fallop tüpü epitelyal kök hücreleri.....	18
2.3.5.2. Fallop tüpü mezenkimal kök hücreleri.....	21
2.4. Wnt Sinyalizasyonu	23
2.4.1. Kanonik Wnt sinyal mekanizması	24
2.4.1.1. β -katenin.....	25
2.4.1.2. Wnt proteinlerinin salgılanması	28
2.4.1.3. Wnt reseptörleri ve sitoplazmada Wnt sinyalizasyonu	32
2.4.1.4. Nükleustaki kanonik Wnt sinyalizasyonu ve β -katenin/TCF kompleksi üzerine etki gösteren regülatörler.....	34
2.4.1.5. Kök hücrelerde Wnt sinyal yollarına bakış	35
2.4.1.6. Dişi üreme sisteminde Wnt sinyalizasyonu	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	40
3.1. Dokuların Eldesi	40
3.2. Örneklerin Hazırlanması	40
3.3. Revers Transkripsiyon ve Gerçek-Zamanlı (Real-Time) PCR Çalışması.....	43
3.3.1. Lizis tamponunun hazırlanması	44
3.3.2. Yıkama tamponu I ve II'nin hazırlanması.....	44
3.3.3. Proteinaz K'nin hazırlanması	44
3.3.4. Doku homojenizasyon protokolü ve proteinaz K uygulanması	44
3.3.5. Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak RNA izolasyon protokolü	44
3.3.6. RNA ölçümü	45
3.3.7. RNA'dan komplementer DNA eldesi	46
3.3.8. Primer tasarımı	47
3.3.9. Kantitatif PCR işlemi	48
3.4. Histopatolojik İnceleme	50
3.4.1. Işık mikroskobu için dokuların hazırlanması	50
3.4.2. Kesitlerin alınması ve boyanması	50
3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler	51
3.6. İstatistiksel Analizler.....	52
4. BULGULAR.....	54
4.1. Işık Mikroskobu Bulguları	54
4.2. İmmünohistokimya Bulguları	59
4.3. RNA Spektrofotometrik Ölçüm Bulguları	64
4.4. Revers Transkriptaz Kantitatif PCR Bulguları.....	64

5. TARTIŞMA ve SONUÇ	71
6. KAYNAKÇA.....	76
EKLER.....	98
ÖZGEÇMİŞ	100



SİMGE ve KISALTMALAR

°C: Santigrat derece

μL: Mikrolitre

μm: Mikrometre

3D: Three dimensional/Üç boyutlu

ACTB: β-aktin

AMH: Anti-Müllerian hormon

APC: Adenomatous polyposis coli/Adenomatöz polipozis koli

BCL9-2: B-cell lymphoma 9-like protein/B-hücreli lenfoma 9-benzeri protein

bç: Baz çifti

BrdU: 5-bromo-2-deoksiüridin

BRG1: Brahma-related gene 1/Brahma-ilgili gen 1

CCND1: Cyclin D1/Siklin D1

CD: Cluster of differentiation/Başkalaşım kümesi

cDNA: Complementary DNA/Komplementer DNA

CK1α: Casein kinaz 1α/Kazein kinaz 1α

CK2: Casein kinase 2/Kazein kinaz 2

c-kit: KIT proto-onkogen receptor tirozin kinaz

cm: santimetre

CRD: Cysteine-rich domain/Sistein-zengin alan

Ct: Cycle threshold/Eşik döngüsü

DAB: 3,3'-Diaminobenzidine

Dishevelled: Dvl ya da Dsh

DNA: Deoksiribo nükleik asit

dNTP: Deoxynucleoside triphosphate

E₂: Östradiol

ECM: Extracellular matrix/Ekstraselüler matriks

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EGF: Epidermal growth factor/Epidermal büyüme faktörü

Emx2: Empty spiracles homeobox 2

EPCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule/Epitelyal hücre adezyon molekülü

ER: Endoplazmik retikulum

ERK: Extracellular signal-regulated kinase/Ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz

ER α : Estrogen receptor α /Östrojen reseptörü α

Evi: Evenness

fosfo- γ H2A.X: γ -fosforillenmiş histon 2A.X

Frizzled: Fz

FTESC: Fallopian tube epithelium stem-like cells/Fallop tüpü epitelyal kök-benzeri hücreleri

g: gravity/yer çekimi kuvveti

GSK-3B β : Glikojen sentaz kinaz-3 β

H2B-GFP: Histon 2B-Green Fluorescent Protein

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

H-E: Hematoksilen – Eozin

HLA: Human leukocyte antigen/İnsan lökosit antijeni

HOX: Homeobox hox

HSPG: Heparin sülfat proteoglikanları

IGF-I: Insulin-like growth factor 1/İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1

ITGA6: İntegrin α -6

LDL: Low density lipoprotein/Düşük yoğunluklu lipoprotein

LEF1: Lymphoid enhancer-binding factor 1/Lenfoid güçlendirici bağlayıcı faktör 1

Lim1: LIM homeobox 1

LRP: LDL-related protein/LDL ilişkili protein

M: Molarite

MIS: Müllerian inhibiting substance/Müllerian inhibe edici madde

MKH: Mezenkimal kök hücre

mL: Mililitre

mm: Milimetre

mM: Milimolarite

mRNA: Messenger RNA/Haberci RNA

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NES: Nuclear export sequence/Nükleer dış-aktarım sekansı

NLS: Nuclear localization sequence/Nükleer lokalizasyon sekansı

NRT: Neurotaktin

Olfm-1: Olfactomedin-1

P: Prolin

p53: Tümör protein p53

p63: Tümör protein p63

PAEP: Progesterone-associated endometrial protein/Progesterona-bağlı endometriyal protein

PAX: Paired box/Eşleştirilmiş kutu

PBS: Phosphate-buffered saline/Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PKC: Protein kinase C/Protein kinaz C

PKHY: Planar hücre kutuplaşma yolağı

Por: Porcupine

PP2A: Protein phosphatase/Protein fosfataz 2

PR: Progesterone receptor/Progesteron reseptörü

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction/Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

RGS: Regulatory of G-protein signaling/G-protein sinyalinin düzenleyicisi

RNA: Ribonükleik asit

ROR α : Retinoic-acid-receptor-related orphan receptor α /Retinoik-asit-reseptör-ilişkili artık reseptör α

rpm: Rotations Per Minute/Dakikadaki Devir Sayısı

RYK: Related to receptor tyrosine kinase/Reseptör tirozin kinaz ile ilişkili

S: Serin

SFRP: Secreted frizzled-related protein/Salgılanmış frizzled ilişkili protein

TCF: T cell-specific transcription factor/T hücrelerine özgü transkripsiyon faktörü

TERT: Telomerase reverse transcriptase/Telomeraz ters transkriptaz

TLE: Transducin-like enhancer of split/Bölünmüş transdüsün benzeri arttırıcı

TUBB4: Tubulin β 4/ β -tübülin 4

VEGF: Vascular endothelial growth factor/Vasküler endotelyal büyüme faktörü

Wg: Wingless

WIF: Wnt inhibitory factor/Wnt inhibe edici faktör

Wls: Wntless

β -Trcp: β -transducin repeats-containing proteins/ β -transdüsün tekrarı-içeren protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1: Dişi üreme sistemi.....	7
Şekil 2. 2: Fallop tüpü histolojisi.....	11
Şekil 2. 3: Fallop tüpü plikalarının mukozası ve lamina propriası.....	12
Şekil 2. 4: Kanonik Wnt sinyalizasyon mekanizması	25
Şekil 2. 5: Wnt sekresyonu, modifikasyonu ve kısa menzilli sinyal aktivitesinin modeli	30
Şekil 4. 1: Bölgeler arası RNA konsantrasyon ortalamalarının karşılaştırılması.....	64
Şekil 4. 2: ACTB geninin ekspresyon grafiği	65
Şekil 4. 3: Bölgeler arası ACTB Ct değerleri ortalamalarının karşılaştırılması.....	65
Şekil 4. 4: Wnt ligandlarının toplam ortalama ekspresyon seviyelerini gösteren grafik	66
Şekil 4. 5: Wnt genleri için bölgeler arası karşılaştırma grafiği.....	68
Şekil 4. 6: Wnt3a ligandı için bölgeler arası karşılaştırma grafiği	69

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 3. 1: Hastalara ait bilgiler	40
Tablo 3. 2: RNA izolasyon kit içeriği (50 preparat için)	43
Tablo 3. 3: Revers transkripsiyon ana karışımı içeriği	46
Tablo 3. 4: Revers-Transkripsiyon işlemini gerçekleştirmek için termal döngüleyici protokolü.....	47
Tablo 3. 5: Kullanılan Wnt genleri ve ACTB geninin primer dizi bilgileri	47
Tablo 3. 6: qPCR kit bileşenleri.....	48
Tablo 3. 7: Wnt genleri ve ACTB geninin ekspresyon düzeyinin ölçüleceği qPCR reaksiyon karışımının içerikleri	48
Tablo 3. 8: qPCR işlemini gerçekleştirmek için cihaz protokolü	49
Tablo 3. 9: Doku takibi cihazının protokolü.....	50
Tablo 3. 10: H-E protokolü.....	51
Tablo 4. 1: RNA konsantrasyonları için bölgeler arasındaki P değerleri	64
Tablo 4. 2: Wnt ligandlarının fallop tüpünün farklı bölgelerinde $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ortalamaları ve standart sapmaları	66
Tablo 4. 3: Wnt3a ligandı için bölgeler arasındaki p değerleri.....	69
Tablo 4. 4: Wnt transkriptleri için farklı bölgelerdeki p değerleri.....	69
Tablo 4. 5: Ampulla bölgesi için Wnt transkriptlerinin çoklu karşılaştırma tablosu.....	70
Tablo 4. 6: Fimbrialar için Wnt transkriptlerinin çoklu karşılaştırma tablosu	70

RESİMLER DİZİNİ

Resim 3. 1: Fallop tüpünün görünümü.....	41
Resim 3. 2: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpünün istmusunun görünümü	42
Resim 3. 3: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpünün ampullasının görünümü	42
Resim 3. 4: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpü fimbrialarının görünümü	43
Resim 3. 5: Mikro-hacim spektrofotometre cihazında ölçüm için kullanılan plate ve mikro-hacim spektrofotometre cihazı.....	46
Resim 3. 6: Kantitatif PCR cihazı ve ölçümlerin yapıldığı bilgisayar sistemi.....	49
Resim 4. 1: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x100)...	54
Resim 4. 2: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x200)...	55
Resim 4. 3: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x400)...	55
Resim 4. 4: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x100)	56
Resim 4. 5: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x200)	56
Resim 4. 6: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x400)	57
Resim 4. 7: Fallop tüpü fimbrialarının normal histolojik görünümü (H-E, x100).....	57
Resim 4. 8: Fallop tüpü fimbrialarının normal histolojik görünümü (H-E, x200).....	58
Resim 4. 9: Fallop tüpünün fimbrialarının normal histolojik görünümü (H-E, x400)...	58
Resim 4. 10: Wnt3a antikorunun pozitif kontrol boyaması (prostat, x200).....	59
Resim 4. 11: Prostat dokusunda negatif kontrol boyaması (x200)	60
Resim 4. 12: Fallop tüpünün istmus bölgesi (Wnt3a, x200).....	60
Resim 4. 13: Fallop tüpünün istmus bölgesi (Wnt3a, x400).....	61
Resim 4. 14: Fallop tüpünün ampulla bölgesi (Wnt3a, x200)	61
Resim 4. 15: Fallop tüpünün ampulla bölgesi (Wnt3a, x400)	62
Resim 4. 16: Fallop tüpü fimbriaları (Wnt3a, x200).....	62
Resim 4. 17: Fallop tüpü fimbriaları (Wnt3a, x400).....	63

ÖZET

İNSAN FALLOP TÜPLERİNDE WNT SİNYALİ EKSPRESYON PATERNLERİNİN İNCELENMESİ

Naciye ÖZYURT

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nuray BOSTANCIERİ

Temmuz 2019, 117 sayfa

Fallop tüpü, uterus ve ovaryumlar arasında uzanan, dört farklı anatomik bölümde incelenen bir çift tüptür. Her bir anatomik bölgenin farklı yapısal özelliklere ve hücre dağılımlarına sahip olduğu bilinmektedir. Gelişimsel olayların, kök hücrelerin ve hücre davranışının kontrolünde önemli olan Wnt sinyal yolağı ligandları fallop tüplerinden fizyolojik ve patolojik koşullar altında salgılanmaktadır. Bu çalışmada insan fallop tüplerinin farklı anatomik bölgelerinde, kanonik Wnt yolağı ligandlarının kantitatif analizinin yapılması ve Wnt3a ligandının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi ile bu farklı bölgelerin patolojilerden etkilenmediğinin gösterilmesi için ışık mikroskopik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 5 hastadan sekretuar fazda alınan unilateral fallop tüpü dokuları proksimal, distal ve ampullar olmak üzere üç bölgeye ayrılarak incelenmiştir. Reverse transkriptaz kantitatif PCR yöntemi ile 8 farklı kanonik Wnt yolağı ligandının 7 tanesinin ekspresyonu fallop tüplerinde saptanmıştır. Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt8b, Wnt10a ve Wnt10b ligandları fimbrialarda daha yüksek ekspresyon seviyesi gösterirken Wnt3a ekspresyonunun proksimal kısımda distal ve ampullar kısımlara göre anlamlı derecede daha düşük ekspresyon gösterdiği ortaya koyulmuştur. Wnt3a ligandı immünohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde tüp epiteli ve lamina propriasında yoğun bir şekilde lokalize olduğu gözlenmiştir. Çalışma ile sekretuar fazda baskılanan Wnt ligandlarının varlığının fallop tüplerinde gösterilmesi bu yolağın tüp homeostazında önemini göstermektedir. Ayrıca Wnt ligandlarının fallop tüplerinde köklülüğü koruyucu faktörler olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Fallop tüpü, Hücre davranışı, İnsan, qPCR, Wnt sinyalizasyonu

ABSTRACT

EXAMINATION OF EXPRESSION PATTERNS OF WNT SIGNALLING IN THE HUMAN FALLOPIAN TUBES

Naciye ÖZYURT

Master of Science Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor: Asis. Prof. Dr. Nuray BOSTANCIERI

July 2019, 117 pages

The fallopian tubes are a pair of tubes that are examined in four different anatomical sections, extending between the uterus and ovaries. Each anatomical region is known to have different structural features and cell distributions. Wnt signaling pathway ligands, which are important in the control of developmental events, stem cells and cell behavior, are released from the fallopian tubes under physiological and pathological conditions. In this study, it was aimed to perform quantitative analysis of canonical Wnt pathway ligands in different anatomical regions of human fallopian tubes, immunohistochemical evaluation of Wnt3a ligand and to show that these different regions were not affected by pathologies to examine light microscopically. For this purpose, unilateral fallopian tube tissues taken from 5 patients in secretory phase were divided into three regions as proximal, distal and ampullary. The reverse transcriptase quantitative PCR method revealed the expression of 7 of 8 different canonical Wnt pathway ligands in fallopian tubes. Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt8b, Wnt10a, and Wnt10b ligands showed higher expression levels in fimbriae, whereas Wnt3a expression was significantly lower in the proximal portion than in the distal and ampullar portions. When Wnt3a ligand was evaluated immunohistochemically, it was observed to be intensely localized in tube epithelium and lamina propria. The presence of Wnt ligands suppressed in secretory phase by fallopian tubes shows the importance of this pathway in tube homeostasis. Also it has been shown that Wnt ligands can be considered as protective factors of stemness in fallopian tubes.

Key Words: Cell behavior, Human, Fallopian Tube, qPCR, Wnt signalling

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Fallop tüpü uterus ve ovaryumlar arasında uzanan bir çift tüptür. Fallop tüpü oositi ovaryumdan uterusu taşıır, fertilizasyon ve zigotun morula evresine geçişı sırasında gerekli ortamı sağlar [1]. Anatomik olarak insan fallop tüpleri dört ayrı bölüme ayrılmıştır; intramural parça, istmus, ampulla ve infundibulum/fimbria [2]. Fallop tüpü hem epitelyal yenilenme için projenitörlere sahip olup [3] hem de mezenkimal kök hücreleri (MKH) içeren bir organdır [4].

Fallop tüpü tıbbi teşhis açısından, dişı üreme kanalının en az erişilebilir kısmıdır. Tüp histolojisi ve patolojisi ile ilgili mevcut bilgiler, genellikle histerektominin bir parçası olarak salpinjektomi hastalarından gelmektedir [5]. Fallop tüpünün genital sistemdeki işlevine ek olarak, seröz ovaryan kanser başlangıcında esas doku olduğunun anlaşılmasıyla bu organ ile ilgili daha fazla çalışma yapma gerekliliği doğmuştur [6].

Wnt sinyal yolağı sayısız gelişimsel olayı kontrol etmesinin yanı sıra kök hücre kontrolünde de önemlidir. Aynı zamanda uygunsuz ekspresyonu kanser başlangıcını tetikleyen bir proto-onkogendir [7]. Wnt sinyallerinin mitojenik uyarım, hücre geleceğinin belirlenmesi ve farklılaşmayı içeren etkileri vardır [8]. Wnt sinyalleri hücrede bilinen üç yolağı etkinleştirir, Wnt/ β -katenin yolağı (kanonik Wnt yolağı), planar hücre kutuplaşma yolağı (PHKY), Wnt/kalsiyum yolağı [9].

Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu hem erken embriyogenez hem de yetişkin yaşamında dişı üreme sistemini etkiler. Embriyonel hayatta Wnt4 ve Wnt9b, paramezonefrik kanalların embriyonel büyümesi için önemlidir [10, 11]. Wnt5a ve Wnt7a, paramezonefrik kanallardan köken alan yapılar olan vajinanın üst kısmı, serviks, uterus ve fallop tüplerinin doğru organizasyonunda oluşmasında rol oynar [12, 13].

Yetişkinlerde, Wnt/ β -katenin sinyali, proliferasyon (Wnt/ β -katenin sinyali açık) ve farklılaşma (Wnt/ β -katenin sinyali kapalı) arasındaki ince dengenin korunmasında merkezi bir işleve sahiptir [14]. Menstrual siklus sırasında östrojen-indüklü proliferasyon ve progesteron indüklü farklılaşma arasındaki dengeyi sağlamada ve menstrual siklusun regülasyonunda Wnt sinyalizasyonun rolü hakkında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [15, 16]

Menstrual siklusun proliferatif fazında, endometriyumda nükleer β -katenin boyanması gözlenir [17]. Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun inhibisyonu, östradiol (E2) indüklü proliferasyonun inhibe olması ile korele olabilir [14]. Östrojen-indüklü endometrial proliferasyon, bir Wnt/ β -katenin inhibitörü ile etkili bir şekilde inhibe edilmektedir [18]. Başka bir çalışmada doğru β -katenin ekspresyonun uterin fonksiyon için hayati olduğu gösterilmiştir. Progesteron, menstrual siklus sırasında E2'nin proliferatif etkisini giderir, bu etki E2-indüklü Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun inhibisyonu ile elde edilebilir [19]. Progesteronun Wnt inhibe edici etkisi muhtemelen, endometrial homeostazisin sağlanmasında ve kaybında, tümör oluşumunda ve malignansi progresyonunda hız sınırlayıcı bir basamak olarak rol oynar [14].

Wnt3a'nın foliküler gelişimde ve steroid üretiminde rol aldığı fare ve sıçanların ovaryumlarında tespit edilmiştir [20, 21]. Farelerde, sağlıklı preantral ve antral foliküllerde Wnt2 ekspresyonu, kumulus hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde gözlenmiştir [22]. Wnt4 ekspresyonu sıçan ve fare granüloza hücrelerinde [23] ve fare kumulus-oosit kompleksinde [24] folikül gelişim süreci boyunca bulunmuştur. Fare granüloza hücrelerinde hedefli Wnt4 delesyonu, daha küçük ovaryumlar ve antral folikülleri daha az sağlıklı olan subfertil dişilerle sonuçlanmıştır [25]. Wnt4'e ek olarak, overde Wnt5a, Wnt6 ve Wnt9a gibi diğer Wnt genleri için cinsiyete özgü ekspresyon gözlenmiştir [26].

Wnt ligandlarına benzer şekilde, Fz reseptörlerinin ovaryumun foliküler olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyon sırasında belirli aşamalarda eksprese edildiği gösterilmiştir [23, 27].

Çeşitli çalışmalar fallop tüpünün patolojisi ile ilişkili Wnt sinyalizasyonundaki değişiklikler bildirmiştir. Örneğin, β -katenin sinyalizasyonunun aktivasyonu, ektopik gebelik [28, 29] ve endometriozise [30] katkıda bulunan bir faktör olarak ilişkilendirilmiştir. Artmış Wnt sinyali, enfeksiyona karşı bir mukozal yanıt olup [31], bu parakrin yolunun fallop tüpünde homeostasisinde rol oynadığını teyit eder.

Kodithuwakku ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Wnt sinyalinin aktivasyonunun, Olfactomedin-1 (Olfm-1) ekspresyonunu aşağı düzenlediği ve tubal ektopik gebeliğe öncülük ettiği hipotezini çalışmışlardır [28]. Olfm-1'in çeşitli hücresel fonksiyonları

düzenleyen kanonik Wnt-sinyal yolağını modüle eden bir moleküldür [32]. Mikroarray verileri, Olfm-1 transkriptinin, implantasyon penceresi sırasında endometriyumda aşağı regüle edildiğini göstermiştir [33-35]. Çalışma sonucunda, Wnt-aktivasyonunun Olfm-1 ekspresyonunu bastırdığı ve bu durumun insanlarda ektopik gebeliğe yol açan fallop tüpüne implante olan embriyo için elverişli bir mikro-ortamı oluşturacağı sonucuna varılmıştır [28].

Yapılan başka bir araştırmada, β -katenin protein ekspresyonunun ektopik gebelik ve enflamasyonlu tubal dokularda %100 pozitif olduğunu ve boyanma yoğunluğunun gebe olmayan tubal dokularda olduğundan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koyulmuştur. Bunun aksine, E-kadherin ekspresyonu muhtemelen artmış Wnt sinyalizasyonunun bir sonucu olarak, ektopik gebe fallop tüpleri içinde indirgenmiştir [29]. Enflamasyon ve ektopik gebelik gelişimi bağlantılı olduğu araştırma sonuçlarına dayanarak [36] Wnt aktivasyonunun ve indüklenen enflamasyonun tüpte implantasyona katkıda bulunduğu tahmin edilebilir bir sonuçtur. Araştırmacılar tüm bu değişikliklerin embriyoların ektopik olarak fallop tüpüne implante olmasına olanak sağlayan ortamı yaratabileceği sonucuna varmıştır [29].

Wnt disregülasyonu dolayısıyla ortaya çıkan patolojilerin yok edilmesi için Wnt sinyal yolağı hedef alınabilir. Yapılan bir çalışmada, T hücrelerine-özgü transkripsiyon faktörü (*T cell-specific transcription factor* – TCF)/ β -katenin kompleksi oluşumunu engelleyen bir molekülün hücre proliferasyonu migrasyonu ve invazyonu üzerinde etkileri, endometrial ve endometriyotik epitelyal ve stromal hücrelerde değerlendirilmiştir. Endometriyotik lezyon gelişiminde yer aldığı bilinen hücresel mekanizmaların, Wnt/ β -katenin yolağının hedef alınmasıyla inhibe edilebileceği gösterilmiştir [30].

Yapılan bir çalışmada, insan fallop tüplerinden elde edilen tek bir epitelyal kök hücrenin, in vitro, silli ve sekretuar hücreleri içeren farklılaşmış organoidleri meydana getirebildiği gösterilmiştir. Organoidlerin sürekli büyüme ve farklılaşması hem Wnt hem de Notch parakrin sinyalizasyonuna bağlıdır. Köklülüğü teşvik edici genlerin azalması, farklılaşmayı artırmakta ve bu duruma düşük proliferasyon eşlik etmektedir. Wnt3a proteininin fallop tüpü organoid kültürlerinin köklülüğünü sağlaması bu çalışma ile gösterilmiştir [37].

Başka bir çalışmada Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun, ovidakt epitel gelişimi ve farklılaşmasındaki rolünü araştırmak için, fare ovidaktındaki farklı Wnt yolağı bileşenlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Bir Wnt raportör fare modeli kullanarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun postnatal ovidaktal epitel olgunlaşması ve farklılaşması sırasında aktif olduğu gösterilmiştir. Tamamen farklılaşmış fare ovidaktlarındaki farklı Wnt yolağı bileşenlerinin ekspresyon analizleri, bu yolağın puberte sonrası ovidaktal epitelyal homeostazda yer alabileceğini de teyit etmektedir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının, yetişkinlikte sekretuar hücrelerin kendini-yenilemesi ve farklılaşmasını düzenleyerek, ovidakt epitel hücre homeostazının korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir [38].

Yapılan literatür taramasında; farklı kök hücre popülasyonlarına sahip olmasına rağmen insan fallop tüplerinde eksprese olan Wnt ligandlarının analizi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Aynı zamanda moleküler ve klinik bulgulara dayanarak, yüksek dereceli seröz ovaryum karsinomasının önemli bir bölümünün ovaryum yüzey epitelinden ziyade fallop tüpü fimbrialarından kaynaklandığı kabul edilmektedir. Dolayısıyla fallop tüpü homeostazı ile ilgili düzenleyici mekanizmaları aydınlatmak önemli hale gelmiştir.

Bu araştırmada fallop tüpünün farklı bölgeleri arasında eksprese edilen kanonik Wnt sinyal yolağı ligandlarının revers transkriptaz kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (*quantitative real polymerase chain reaction* – qPCR) yöntemi ile belirlenmesi, fallop tüpünün farklı bölgeleri arasında Wnt3a için immünreaktivite değerlendirmesi yapılması ve fallop tüpünün histolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

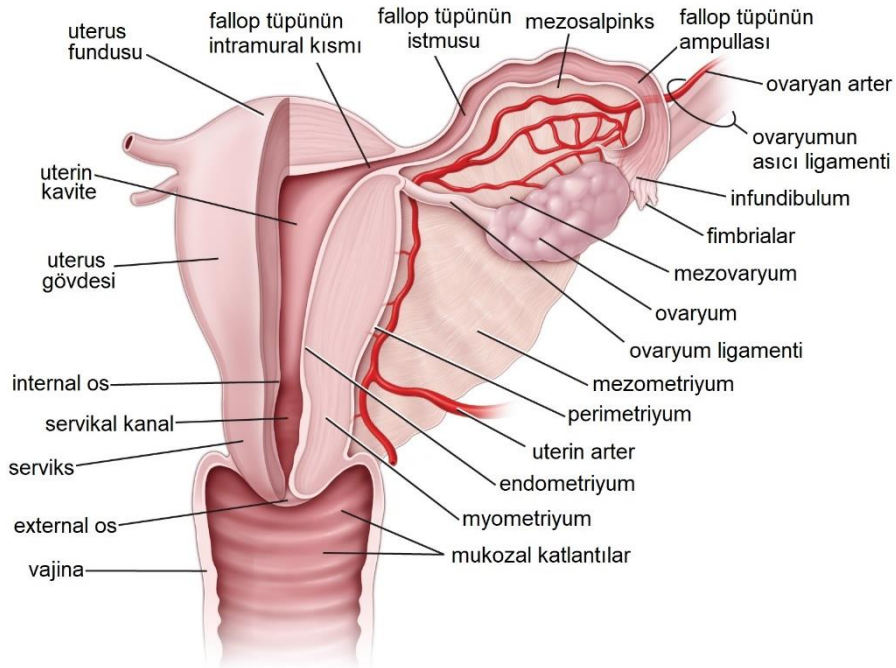
2. GENEL BİLGİLER

FALLOP TÜPÜ (TUBA UTERİNA)

İtalyan hekim ve anatomist Gabriele Falloppio, insan yumurta kanalının (*oviduct*) ilk detaylı ve doğru açıklamasını 1561'de sunarak bu organı ve "Uteri Tuba" olarak belirlemiştir [39]. Bu organ zamanla bu araştırmacının ismiyle anılmaya başlanmıştır [40].

2.1. Fallop Tüpü Anatomisi

Fallop tüpleri ovumu ovaryumdan uterusu taşırlar, fertilizasyon ve zigotun morula evresine kadarki gelişimi için gerekli ortamı sağlarlar [1]. Fallop tüpü ovaryumların anteriounda yerleştirilmiş bir organdır. Tüp medialde, bu bölgeye karşılık gelen ovaryum bölgesinden uterin fundusun posterosüperior kısmındaki başlangıcına kadar uzanır [40]. Tüpler yaklaşık 10 cm uzunluğunda olup 7-14 cm arasında değişen uzunluklarda olabilir [41]. Her bir tüp kendisine önemli miktarda hareketlilik sağlayan bağlar ve mezenterler ile desteklenir [42]. Ekstrauterin seyri boyunca tüp, peritoneal bir kat olan broad ligamentin üst sınırı yani mezosalpinks boyunca uzanır [40]. Tüp lateral ve süperior şekilde konumlanmıştır [43].



Şekil 2. 1: Dişi üreme sistemi [1]

Her bir tüp farklı olarak düzenlenmiş epitelyal hücreler ile döşeli dört ana parça içerir: intramural parça, istmus, ampulla ve infundibulum [2]. İntramural parça; 0,7 mm genişliğinde, 1 cm uzunlukta olup miyometrium ile devamlılık gösterir [43]. İntramural parça, lateralde, 1-5 mm genişlikte [43] 3-6 cm uzunlukta [44]; yuvarlak ve musküler yapıda olan, istmus ile devam eder [43]. İstmus ise lateralde, maksimum 1 cm genişliğe sahip olup [43], hilal şekilli [44], tüpün en geniş parçası olan ampulla ile devamlılık gösterir [43]. Ampulla 7-8 cm uzunluğunda [44], ince bir duvara sahip olup luminal yüzeyinde katlanmış kıvrımları vardır. Genellikle, fertilizasyonun gerçekleştiği yer ampullanın lümeni olup [43] çoğunlukla ampullanın istmus ile bağlantı yerinde gerçekleşmektedir [1]. Ampulla, abdominal ostiumda trampet şekilli [43], yaklaşık 1-2 cm uzunlukta olan infundibulumu açılır [44]. İnfundibulum uçlarına bağlı olan, 1 mm genişliğinde [44] yaklaşık 25 adet mukozal parmak benzeri uzantılar olan fimbrialar [40], iç çevreden tüpün kas duvarının ötesine uzanır. Bunlardan bir tanesi olan, ovaryan fimbria diğerlerinden daha uzun ve daha derin oluklu olup genellikle ovaryumun tubal kutbuna uzanır.

Ovulasyon esnasında, lamina propriada bulunan damarların konjesyonu [43] ve mukozal hipertrofi [42] sonucunda fimbrialar şişer ve uzar [43] bunun sonucunda fallop tüpleri genişler ve hareketlenir [42]. Bu esnada infundibulum ovaryuma yakın bir şekilde uzanır [42] ve rüptürün olacağı ovaryum yüzeyinin üzerinde yer alır [1]. Bu durum ovulasyon ile atılan sekonder oositin tüpe taşınmasını destekler. Fimbrianın süpürücü kas kasılmaları ve tüpte bulunan silli hücrelerin siliyer aktiviteleri ile oosit infundibulumu girer böylece oositin peritoneal kaviteye geçişi önlenmiş olur, oosit ampullaya doğru hareket eder [42]. Bu mekanizmalar salınan oositin yakalanmasını sağlar [43]. Oosit peristaltik kasılmalarla fallop tüpü boyunca taşınır [1].

2.1.1. Damarlanma ve lenfatik drenaj

2.1.1.1. Arterler

Fallop tüplerinin kan desteği ovaryan ve uterin arterlerden kaynaklanır. Tüpün lateral üçte biri ovaryum arterinden beslenir. Tüpün medial üçte ikisine ise kan desteği uterin arter tarafından sağlanır [43]. Uterus arterinin tubal dalları, ovaryan arterin tubal dalları ile anastomozlaşmak için, mezosalpinksi, uterus boynuzunda lateral olarak geçer [40].

2.1.1.2. Venler

Venöz drenaj, mezosalpinkste bulunan uterin ve ovaryan venlerin tubal dallarının anastomozlaşması ile sağlanır ve arteriyal destek ile paralellik gösterir [40]. Fallop tüpünün lateral üçte ikisinin venöz drenajı pampiniform pleksus yoluyla ovaryum venlerine doğrudur; bunlar, sağ tarafta inferior vena kava ve sol tarafta renal vene açılır. Tüpün medial üçte ikisi, uterus pleksusundan internal iliak vene drene olur [43].

2.1.1.3. Lenfatik drenaj

Tubal lenfatikler genellikle ovaryum ve uterus damarlarına drene olur [40]. Lenf drenajı ovaryum damarları yoluyla para-aortik nodlara ve uterin damarlar ile internal iliyak zincire bağlıdır. Lenfin, round ligament yoluyla inguinal nodlara erişmesi mümkündür [43].

2.1.2. İnnervasyon

Fallop tüpü temel olarak ovaryan ve uterin arterler ile dağıtılan otonomik fibriller ile innervedir. Tüpün çoğunluğu çift sempatik ve parasempatik desteğe sahiptir. Preganglionik parasempatik sinirler vagustan köken alır, tüpün lateral yarısını innerve eder. Pelvik splanik sinirler ise tüpün medial yarısını innerve etmektedir. Preganglionik sempatik destek intermediolateral kolonun, onuncu torasikten ikinci lumbar spinal segmentinde olan nöronlarından türetilir; postganglionik sempatik fibriller büyük olasılıkla süperior hipogastrik pleksustan, süperior hipogastrik ve hipogastrik sinirlerden türetilir [43].

2.2. Fallop Tüpü Embriyolojisi

Gelişimin 5-6. haftalarında, genital sistem farklılaşmamış safhadadır. Mezonefrik kanallar (Wolffian kanalı) erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli bir yere sahipken, paramezonefrik kanallar ise (Müllerian kanal) dişi üreme sisteminin gelişiminde rol oynamaktadır [45].

Genetik cinsiyete bakılmaksızın, çift halindeki paramezonefrik kanallar, embriyonik yaşamın altıncı haftasından başlayarak hem kadınlarda hem de erkeklerde bir çift halindeki ürogenital kabartıların anterolateral yüzeyinde gelişir [46-48]. Paramezonefrik kanallar, gonadların ve mezonefrik kanalların lateralinde gelişirler ve mezonefrozların (primordiyal böbrek) lateral yüzeylerinde, mezotelin longitudinal invaginasyonlarından

oluşurlar. İnvaginasyonların kenarları birbirleriyle kaynaşır ve paramezonefrik kanallar meydana gelirler [45]. Paramezonefrik kanalın luminal epitel tabakasını çevreleyen mezenkim de peritondan köken almaktadır. Kanallar, kraniyal olarak periton boşluğuna açılır. Çift halindeki kanalların her biri kaudal olarak ürogenital kabartının hemen lateralinde büyümekte ve bir rehber olarak mezonefrik kanalı kullanmaktadır [40].

Paramezonefrik kanallar, embriyonun gelecekteki pelvik bölgesine ulaşınca kadar, mezonefrik kanallara paralel olarak kaudal yöne doğru uzanırlar. Pelvik bölgeye ulaştıklarında, mezonefrik kanalları ventralde çaprazlarlar [45]. Embriyonik hayatın sekizinci haftasında, her iki paramezonefrik kanalın kaudal uçları birbiriyle kaynaşırlar ve bir septum ile ayrı halde bulunan [40] Y şekilli, uterovaginal primordiyumu oluştururlar. Uterovaginal primordiyum, adından da anlaşılacağı gibi, uterusu ve vajinanın superior kısmını yapar [45]. Dolayısıyla paramezonefrik kanalda başlangıçta tanımlanabilen 3 kısım vardır: (i) abdominal kaviteye açılan kraniyal vertikal parça, (ii) mezonefrik kanallara çapraz şekilde geçen horizontal kısım, (iii) karşı taraftaki eşleniğiyle birleşen vertikal kısım [49].

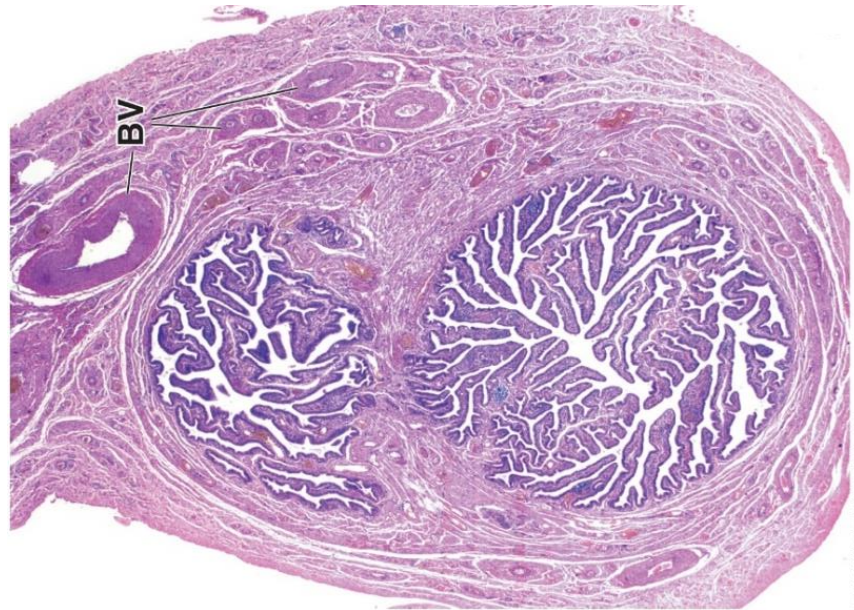
Tüm bu gelişmeler, eğer embriyo erkeğe testis gelişiminden önce hem kadın hem de erkek fetüslerde gerçekleşir. Testis, Müllerian inhibe edici madde (*Müllerian inhibiting substance* – MIS) ya da anti-Müllerian hormon (AMH) olarak da bilinen madde salgılamaya başlar. Dişi embriyolarda MIS yokluğunda, paramezonefrik kanallar fallop tüpleri, uterus ve vajinal duvar oluşturmak için pasif olarak gelişirler. Bununla paralel olarak, testosteron yokluğundan dolayı, mezonefrik kanallar geriler [40]. Dişi cinsiyet gelişimi ovaryumların ya da hormonların varlığına bağlı değildir. Daha sonra, maternal ovaryumlar ve plasenta tarafından üretilen östrojen, fallop tüplerinin, uterusun ve vajinanın superior kısmının gelişimini uyarır [45]. Dişi fetüslerde, paramezonefrik kanalın ilk iki kısmı (periton boşluğuna açılan kranial uzunlamasına segment ve mezonefrik kanalı kesen enine kısım) fallop tüpünü oluşturur. Birinci bölümün en kraniyal ucu fimbrial sonlanmayı oluşturur ve paramezonefrik kanalın en kaudal segmenti (kaynaşmış bölüm) uterusu oluşturur. Paramezonefrik kanalın ikinci kısmı (mezonefrik kanalı kesen transvers segment) büyümesi sırasında, ürogenital kabartılar transvers pelvik bir kat oluşturur. Paramezonefrik kanalın kaudal segmentinin füzyonundan sonra transvers pelvik katlantı, kaynaşmış paramezonefrik kanalın pelvik yan çeperinden lateral

olarak uzanır. Bu pelvik katlantı, fallop tüpünün bağlı olduğu broad ligamenti oluşturur [40].

Gebelik boyunca, her bir tüpte altı ila sekiz arasında olmak üzere fimbria sayıları artar. Bu sayı doğumdan sonra da artmaya devam etmektedir. Paramezonefrik kanalın embriyolojik gelişiminde Wnt ailesini, LIM homeobox 1 (Lim1), Paired box 2 (Pax2) ve empty spiracles homeobox 2 (Emx2) 'yi içeren önemli genler bulunur [50]. Buna ek olarak, homeobox hox (HOX) gen ailesi de bu anatomik yapının gelişimi için özellikle önemlidir [50-52].

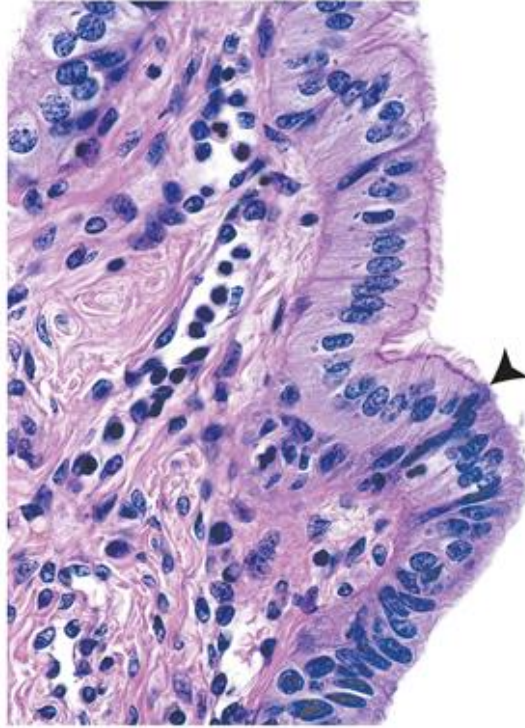
2.3. Fallop Tüpü Histolojisi

Fallop tüpünün duvarı üç tabakadan oluşmakta olup, duvarı diğer lümenli iç organların duvarına benzemektedir (**Şekil 2.2**). Dış kısımda seroza tabakasından [1], ortada düz kas duvarı (muskularis veya miyosalpinks) tabakasından [40] ve en içte mukozal bir tabakadan (endosalpinks) oluşmaktadır. Bununla birlikte submukozası yoktur. Seroza tabakası ya da periton, fallop tüpünün en dışındaki tabakadır. Mezotelyum ile ince bir bağ dokusundan oluşmaktadır [1]. Tüpün kontraktilliği epiteli çevreleyen muskularis tabakası tarafından sağlanmaktadır [5]. Muskularis tabakası, uzunluğunun çoğunda nispi olarak kalın bir iç sirküler tabakadan ve daha ince bir dış longitudinal tabakadan oluşmaktadır. İç ve dış kas tabakaları arasında bulunan sınır genellikle belirsizdir [1].



Şekil 2. 2: Fallop tüpü histolojisi, BV (*blood vessels – kan damarları*) [1]

Mukoza, fallop tüplerinin en iç kısmıdır [1]. Luminal epitelyal döşeme ve içsi veya oval stromal hücreler içeren kısıtlı bir lamina propriadan oluşur [40]. Mukoza fallop tüpünün uzunluğu boyunca lümenine uzanan longitudinal, birincil plikalar (katlantılar) sergiler [43]. Ampulla ve infundibulumda tubal mukozanın ikincil plikaları da vardır, bu da tüpün bu segmentlerinin yüzey alanlarını önemli ölçüde artırır [53]. Ampulla bölgesinde karmaşıklıklaşıp sayıca artan plikalar, istmusa doğru gittikçe küçülür [1] ve intramural parçada sığ çıkıntılar haline gelir [43]. Işık mikroskobu ile fallop tüpü, tek katlı küboidal ya da prizmatik epitele sahip görünmekte olup farklı yükseklikte hücre toplulukları nedeniyle sık sık pseudostratifiye şekilde görülebilir [54]. Tüp epitelinin morfolojik ve fonksiyonel bütünlüğü, optimal fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için gerekli olan eşsiz bir mikro ortamın geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. İnsan fallop tüpü hücrelerinin kullanıldığı bir ko-kültür çalışmasında embriyo morfolojisi, implantasyon oranları ve gebelik başarısının etkilenmesini gösteren yeni bir analiz ile kanıtlandığı gibi epitel bütünlüğü başarılı bir implantasyon için gereklidir [55].



Şekil 2. 3: Fallop tüpü plikalarının mukozası ve lamina propriası [1]

Fallop tüpü plikalarının stroması, postmenopozal dönemde daha fibrotik olma eğilimindedir. Lümen uterustan ovaryum uçlarına doğru genişlediğinden, mukozanın yapısal karmaşıklığı önemli derecede artar [40].

İntramural parça, minimal bir dalgalanma ile çoğunlukla düz mukoza içerir. Endometriyal boşluk ve tubal ostiyumun birleşme yerindeki en proksimal kısmında endometriyum ile kaplanmıştır. Tubal ostiyumdan uzakta, intramural parçanın mukozası, tüpün distal bölümleri için daha tipik olan, fakat silli hücrelerin daha az sayıda olduğu bir epitelyal örtüyle döşenmiştir. İstmus, intramural parçadan biraz daha fazla kıvrımlar göstermekte olup aynı zamanda sınırlı miktarda küntleşmiş plika içerir. Ampullada plikalar yaprak benzeri ve narindir, hem ikincil hem de üçüncül dallar gözlemlenebilir. İnfundibulum ve fimbrial uç plikalar ile döşeli oluşu nedeniyle ampullaya benzemektedir. Farklı olarak, fimbrial uçtaki plikalar esasen ekzofitiktir ve altında uzanan düz kas duvarı bulunmamaktadır. Farklı bir fimbria olan, ovaryan fimbria, tubal ostium'dan ovaryumun bir kutbuna kadar uzanır, ovum alımında rol alır ve ovaryumların fimbrialar ile ilişkisinde fimbriaların yeniden düzenlenmesinde rol alıyor gibi görünmektedir [40].

Epitel nadiren intraepitelyal lenfositleri [43] ve bazal yerleşimli kök hücreleri de içermektedir [3]. Tüpte bulunan epitelyal hücreler, tek bir hücre tipinin farklı fonksiyonel evrelerini temsil etmektedirler [1]. Tüpte, silli hücreler distalde sekretuar hücreler proksimalde baskındır. Lamina propria vasküler bağ dokusu desteği ve lenfatik drenaj için damarlanmayı sağlar [43].

2.3.1. Silli hücreler

Silli hücrelerin oranı istmustan fimbrialara doğru gittikçe dramatik bir biçimde artar [56, 57]. Silli hücreler özellikle infundibulumda sayıca fazladır. Sil hareketleri uterusu yönelmiştir [1]. Sillerin birincil görevi gametleri ve embriyoyu tüp içerisinde taşımaktır [41]. Siliyer aktivite, hormonal ve nöronal uyarılardan etkilenir [54]. Sillerin vuruş oranı östrojen ve progesteron seviyeleri ile kontrol edilir. Sil aktivitesi ovulasyon esnasında en yüksek seviyeye ulaşmaktadır [41].

Silli hücreler yoğun diziler oluşturdıkları infundibulum fimbrialarının epitelyal yüzeyinde en belirgin halde gözlenirler. Çok sayıda silli hücre ampullada da gözlenebilir. Bununla birlikte, birçok türde, tüpün bu kısmında sekretuar hücreler silli hücreler ile yaklaşık eşit sayıda bulunmaktadır. Genel olarak silli hücreler en az miktarda istmusta gözlenmektedir [58]. Aynı zamanda, silli hücreler uterotubal bağlantı yüzeyinde [59-61] ve intramural kısımda bulunabilirler [62].

Silli hücrelerdeki değişiklikler ovaryan hormonların etkisi ile gerçekleşmektedir [63]. Östrojen tarafından büyüme teşvik edilirken [58] progesteron uygulanması östrojenin

etkisini antogonize eder [64]. Tüpün farklı bölgelerinde, gonadal hormonlara olan duyarlılık değişebilir [65].

Ovaryan siklus boyunca, siliyer vuruş sıklığındaki değişiklikler konusunda çelişen raporlar bulunmaktadır. Tavşanlarda ovidakta siliyer vuruş hızı, ovumun tüplere doğru hareket zamanı ile ilişkili olarak, birleşme sonrası 2. ve 3. günlerde %20 oranında artmaktadır [66]. Critoph ve Dennis, ovulasyondan sonra insan istmus ve ampullasında, siliyer ritim sıklığında belirgin bir artış saptamışlardır [67]. Aksine Westrom ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sillerin vuruş frekanslarında döngüsel ve anatomik değişiklikler saptayamamıştır [68]. Analog kontrast artışı tekniğini kullanan bir araştırma, sekretuar fazda tüpün fimbriyal bölümünün siliyer vuruş frekansında bir artış bulunduğunu göstermiştir [69]. Bu sonuç, ovaryan siklusta siliyer vuruş hızındaki varyasyonu göstermekte olup Critoph ve Dennis'in bulgularını doğrulamaktadır [54]. Bununla birlikte, ovulasyon zamanında, sillerin vuruşları senkronize haldedir ve insanlarda uterusu doğru yönelmiştir [70]. Bu durum sillerin, oositi fertilizasyon alanına taşınmasındaki rolünü göstermektedir [58].

2.3.2. Sekretuar hücreler

Sekretuar hücreler salgı hücreleridir [1], sil içermezler ve daha koyu boyanırlar [42]. Sekretuar hücreler, yüksek memelilerde özellikle fallop tüplerinin ampullaları boyunca yoğun bir dağılım gösterirler [58]. Foliküler fazda sekretuar hücrelerin nükleusları tüp lümenine doğru çıkıntı yapar ve nükleusun apikal kısmı daha fazla yuvarlaklaşır [53]. Silli hücrelere göre apikal kısımları lümene daha fazla uzandığı için çivi hücreleri (*peg cells*) olarak da adlandırılırlar [43]. Bu hücrelerce üretilen, tüp mukozasını çevreleyen salgının hem oosit hem de sperm için besleyici ve koruyucu işlevleri vardır. Ayrıca salgıları, spermlerin oositi fertilize etme yeteneğini elde edebilmeleri için gerekli olan, spermi aktive eden kapasitasyon faktörlerini içerir [42].

Sekretuar hücrelerin sitolojisi, epitelyal yükseklik ve ovulasyon zamanı civarında maksimuma ulaşan sekretuar aktivite ile menstrual siklus boyunca değişir [58, 71]. Kadınlarda foliküler faz esnasında, bu hücreler iyi gelişmiş ve eşit dağılmış mikrovilluslara sahiptir [71]. Bu hücreler yüksek miktarda endoplazmik retikulum (ER) içerirler. Sitoplazmalarında salgısal materyal biriktirilir ve olası bir fertilizasyon durumu

için oosit ve embriyonun beslenmesi amacıyla lümene salınır [41]. Sekretuar hücre fenotipinin sil gelişimini önemli oranda ilerlettiği düşünülmektedir [37].

2.3.3. İnsan fallop tüpünde transport

Tubal transport, spermin ovum ve embriyo ile zıt yönde yürütülmesine izin veren ve tubal lümen içinde fertilizasyon ve embriyogenezi destekleyen, tam zamanlı bir süreçtir. Tubal taşınma, tubal kas sisteminin kasılması, siliyer aktivite ve tubal sekresyonların akışından etkilenir [72]. Bununla birlikte, spermatozoonların hareketi çok daha hızlıdır ve intrinsik motiliteye bağlanamaz. Ancak spermatozoonların ve oositin tüpün karşı uçlarından taşınma mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ovum uterin kaviteye geçmeden önce yaklaşık 3 gün fallop tüpünde kalır. Tubal transport sisteminin bütünlüğünü değiştirebilen enflamasyon, intrauterin araçların kullanımı, cerrahi manipülasyon, tüp ligasyonu gibi durumlar ektopik gebelik nedeni olabilmektedir. Ektopik gebeliklerin büyük çoğunluğu (%98) fallop tüplerinde gerçekleşmektedir [1].

2.3.4. İnsan fallop tüpü morfolojisinde siklik değişiklikler

Fallop tüpleri erkek ve dişi gamet canlılığının sağlanması, fertilizasyon ve erken embriyo gelişiminin yanı sıra embriyonun uterusu taşınımının korunması için gerekli olan benzersiz ortamı sağlayabilmek amacıyla, hücre büyümesi ve rejenerasyon dahil olmak üzere, menstrual siklus boyunca dinamik endokrin kaynaklı değişiklikler yapma kapasitesine sahiptir [54].

Fallop tüpünde bulunan hücrelerin aktiviteleri menstrual siklusun aşaması ve yaşa göre değişir [43]. Kadınlarda tubal döngünün ilk tanımlanması 1928 yılında yapılmıştır [73]. İnsan tubal epitelyumunda döngüsel bir mitotik aktivite varyasyonu bulunmaktadır [64]. Ovaryan hormonlar tubal epitelyal yapı ve sil ekspresyonunu etkiler. Yani dişi üreme sisteminin geri kalanıyla ortak olarak fallop tüpü, östrojen ve progesteron etkisi altında döngüsel değişimlere uğrar [74]. Östrojen tubal epitelyumun mitotik aktivitesini etkilerken progesteron bu etkiyi kısmen inhibe eder [64].

Fallop tüpünün hormonal çevreye tepki vermesi ile gerçekleşen homeostazideki değişiklikler, fallop tüpü mukozal örneklerindeki gen ekspresyonu verileri ile desteklenmektedir. Foliküler ile luteal faz arasında belirgin farklar bulunmaktadır [75]. Tüp epitelinin, ovulasyonla ilişkili pro-inflamatuar ortama maruz kalması sonucu, çift zincir DNA kırıklarında artış, in vivo bir fare modelinde, fosfo- γ H2A.X ile işaretlenerek

gösterilmiştir [76]. İnsan fallop tüpü izolatlarının ex vivo folikül sıvısına maruz bırakılması, enflamasyon ile ilişkili genler ile DNA onarım bileşenlerinin ekspresyonunu artırmıştır. Özellikle, premalignant lezyonların gelişiminde önemli bir adım olduğu düşünülen, dikkate değer bir tümör protein p53 (p53) birikimi tubal hücrelerin nükleuslarında gözlenmiştir [77].

2.3.4.1. Reseptör miktarı

Östradiol (E₂) ve progesteron reseptörleri fallop tüpü epitelinde tanımlanmış ve bu reseptörlerin ekspresyonunun ovaryan siklusun evresine göre değiştiği gösterilmiştir [78]. Tubal E₂ reseptörleri, siklus ortasında maksimum iken progesteron reseptörleri ise geç dönem boyunca, hatta geç luteal fazda da mevcuttur [79].

2.3.4.2. Mitotik indeks ve hipertrofi

Hem fimbrialar hem de ampullada mitotik indeks foliküler fazda luteal faza göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Donnez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada progesteron alan kadınlarda mitotik indeksin çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu kadınlarda progesteron uygulanmasının operasyondan 1 ay önce durdurulması halinde, mitotik aktivitede önemli bir artış bulunmuştur. Bu durum progesteronun, östrojen sistemde bulunsada dahi, östrojen tarafından kontrol edilen mitotik aktiviteyi bloke edilebildiğini göstermiştir [64].

Silli ve sekretuar hücreler hormon seviyelerinin değişimine yanıt olarak siklik bir şekilde foliküler fazda hipertrofiye, luteal fazda ise atrofiye uğrarlar [1]. Ovulasyon zamanında epitel 30 µm yüksekliğe ulaşır ve menstruasyonun başlamasından hemen önce uzunluğu yarıya düşer. Siklus sonuna doğru ve postmenapozal dönemde silli hücrelerin sayısı ve aynı zamanda epitel yüksekliği azalır [1]. Menstrual siklus sırasında silizasyon ve desilizasyon sürecine ve progesteronun desilizasyon üzerine etkisine ilişkin gözlemler, östrojenin fallop tüpündeki siliogenezin ana promotörü olduğunu düşündürmektedir [64]. Ovulasyondan önce gözlemlenen maksimum yükseklik maksimum salgı aktivitesi ile uyumludur [53]. Ovulasyondan sonra, sekretuar aktivitenin kaybına karşılık gelen önemli bir azalma gözlenmektedir [64].

2.3.4.3. Yalancı çok katlılaşma

Tüp epitelinde çok katlılaşma derecesi foliküler fazda artarken ve ovulasyondan hemen önce maksimuma ulaşır. Buna karşılık luteal fazda, daha basit bir görünüme sahip tek katlı epitel bulunmaktadır [57].

2.3.4.4. Nükleus

Fallop tüpünde menstrual siklusun farklı aşamalarında, silli hücrelerin nükleuslarının şekil, boyut veya pozisyonunda sistematik değişiklikler gözlenmediği bildirilmiştir [57]. Bununla birlikte foliküler fazda sekretuar hücrelerin nükleusları uzar. Nükleusun uzun eksenli hücre uzun eksenine paralel olarak yerleşir, nükleus hücrenin apikal kısmında daha fazla yuvarlaklaşır [53].

2.3.4.5. Lenfositler

Menstrual siklusun farklı aşamalarında, fallop tüpü epitelinde intraepitelyal lenfosit sayısında belirgin değişiklikler bulunmamaktadır. Ancak postmenapozal dönemde, küçük agregatlar halinde toplanan fakat gerçek lenfoid foliküller oluşturmeyen önemli ölçüde daha fazla sayıda lenfosit bulunduğu gözlenmiştir [57].

2.3.4.6. Kubbeler

Sekretuar hücrelerin üzerinde bulunan yüzey kubbelerinin boyutu ve şekli, menstrual siklus sırasında belirgin şekilde değişmektedir. Bu durum genel olarak hücre yüzey aktivitesi ile ilişkilidir. Foliküler faz sırasında kubbeler belirgindir ve düzensiz şekillidirler. Pre-ovulatuvar fazdan hemen önce, yüzey aktivitesi, bazıları bitişik sillerden daha yüksek ve neredeyse altta uzanan hücrelerden ayrı gözlenen düzensiz çıkıntılarla en üst seviyeye ulaşır. Ovulasyon süresi boyunca yüzey aktivitesinin ani artışının ardından, erken/orta luteal fazda düz/hafif kubbeli bir görünüm ve dekapitasyonsuz sekresyonla hücre yüzeyi aktivitesi nispeten sessiz kalmaktadır [57].

2.3.4.7. Diğer organeller

Döngünün farklı aşamalarında diğer sitoplazmik organellerin sayısında kayda değer bir değişiklik saptanmamıştır, ancak lipid içeren bileşik lizozomların geç luteal fazda ve postmenopozal durumda belirgin olduğu belirtilmiştir. Menopoz sonrası endosalpingeal epitelyal hücreler yüzey sekretuar aktivitesi hakkında çok az belirti gösterirken,

sitoplazmik organellerin hala devam eden hücresel metabolik aktivitesini gösteren ribozomlar, Golgi alanları ve glikojen içerdiği gözlemlenmiştir [57].

2.3.5. Fallop tüpü kök hücreleri

İnsan fallop tüplerinde, hasarlı farklılaşmış hücrelerin yerini alabilen dokuya özgü kök hücrelerin nişlerinin tanımlanması başarılı bir üreme sonucu için gerekli olan, erkek ve dişi gamet canlılığı, fertilizasyon, erken embriyo gelişimi ve uterusu taşınım için gereken ortamı sağlamaya katkıda bulunabilir [4].

2.3.5.1. Fallop tüpü epitelyal kök hücreleri

Fallop tüpü ovaryum yakınında bulunur ve her ay ovulasyon sırasında tüpün distal ucu inflamatuvar faktörlere maruz kalır [76]. Bu nedenle bu epitel tabakasında; doku hasarları, onarım ve yeniden modellenme döngüleri oluşabilir. Fallop tüpünün tekrarlayan ovulasyon döngülerinde gördüğü zarar dolayısıyla normal üreme fonksiyonunu yeniden kurmak için rejeneratif bir etkinlikle donatılması gerekmektedir. Bu nedenle hasar gören hücrelerin yenilenmesi için fallop tüpünde yetişkin epitelyal kök hücre rezervuarının bulunması şarttır [3].

Bir çalışmada kök benzeri epitel hücreleri, insan fallop tüplerinde tanımlanmıştır [3] ve başka çalışmalarda ise fare ovidaktlarında uzun vadeli etiket-tutma (*label-retaining*) deneylerine dayanarak, iki farklı kök benzeri fimbrial hücre popülasyonu tanımlanmıştır [80, 81]. Etiket-tutma deneyleri karışık bir hücre popülasyonunda kök hücreleri tespit etmek için; bunların nispi olarak düşük olan bölünme hızlarından yararlanılarak yapılır. Bir tür kısa muamele-takip (*pulse-chase*) deneyi olan bu yaklaşımda, daha önce yapılan çalışmalarda, hücreler 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) gibi bir etiketlenmiş DNA prekürsörüne kısa bir süre maruz bırakılır ve sonra hangi hücrelerin işaretlendiğine bakılırdı. Bu deneylerde BrdU muamelesinden sonra bölünmeyen hücreler hiç etiketlenmez ve hızla bölünen hücreler BrdU etiketini etiketlenmemiş normal hücreler gibi görünecek şekilde seyreltirler. Öte yandan, potansiyel kök hücreler yavaş bölünme esnasında BrdU'ü içine alacaklardır ve bu hücreler nispeten daha ender bölündükleri için BrdU etiketini diğer hücrelerin çoğundan daha uzun bir süre koruyacaklardır. Bu onları etiket-tutucu hücreler (*label-retaining cells*) olarak belirleyecektir [7]. Ancak BrdU tarafından yapılan DNA etiketlemesi hücre bölünmesine bağlıdır ve kendi başına hücre döngüsü aktivasyonuna ve etiketin ilerleyici seyreltmesini tetikleyebilen sessiz kök

hücreler için genotoksik bir hasara yol açabilir [82]. Farelerde, uzun vadeli etiket-tutma deneylerine dayanarak tanımlanan çalışmalarda, mutajenik olmayan ve hücre döngüsünden bağımsız bir yaklaşım, yani histon 2B-green fluorescent protein (yeşil floresan protein) (H2B-GFP) ile in vivo kısa muamale-takip kullanılmıştır. Bu hücreler fenotipik olarak KIT proto-onkogen reseptor tirozin kinaz c-kit pozitif [80] ve negatif [81] ekspresyonu ile ayırt edilmişlerdir.

c-kit⁻ etiket-tutucu hücrelerin gösterildiği çalışmada tüpün distalindeki epitel hücrelerinin arasında yoğunlaşmış, H2B-GFP molekülünü tutabilen hücrelerin bir alt kümesinin güçlü klonojenik potansiyeli ve in vitro uzun vadeli sferoidleri oluşturma ve koruma kapasiteleri gösterilmiştir [81].

c-kit⁻ etiket-tutucu hücreler kültürde, östrojen reseptörü α (*Estrogen receptor α* - ER α) ya da progesteron reseptörlerini (*Progestogen receptor* - PR) eksprese etmeyip aynı zamanda kendini yenileyen organoidler oluşturmuşlardır. Bu organoidler, mukozanın daha kompleks yapılarını meydana getirebilmiştir. Organoidlerin, gerçek distal (ER α ⁺PR⁻) ve proksimal (ER α ⁺PR⁺) ovidakttaki gibi olgun epitel hücrelerini içerdikleri gözlenmiştir. Dikkat çekici bir şekilde organoidlerin, olgun endometriyumun bir işareti olan progesterona-bağlı endometriyal proteini (*Progestogen-associated endometrial protein* - PAEP, ayrıca glikodelin olarak da bilinir) eksprese ettikleri gösterilmiştir [81]. Bu durum, fimbrial etiket-tutucu hücrelerin ex vivo olarak önemli derecede esneklik gösterdiğini düşündürmektedir [83]. Bu çalışma, tüpün progenitör hücrelerinin gerçekten in vitro çoğalma ve farklılaşma potansiyeline sahip olduklarını göstermektedir [5].

c-kit⁺ hücrelerin gösterildiği çalışmada; yine H2B-GFP molekülü transgenik farelerde dişi üreme kanalı boyunca, doğal endometriyal rejenerasyonun olduğu dönemlerde ve mekanik olarak endometriyal rejenerasyonun oluşturulması ile etiket-tutucu hücreleri tanımlamak için kullanılmıştır. Transgenik farelere paramezonefrik kanal gelişimi ve postnatal uterus olgunlaşmasını kapsayacak şekilde kısa-muamele uygulanmıştır. Çalışmada, endometriyumda, endoservikal transizyonel zonda ve özellikle distal kısmı olmak üzere ovidakta yoğunlaşan etiket-tutucu hücreler gözlenmiştir. Üç haftalık etiket takibinin ardından, parlak epitelyal etiket-tutucu hücreler distal ovidakta konsantre halde gözlenirken, proksimal ovidakta çoğunluğu sönük olan çok az etiket-tutucu hücrenin varlığı gösterilmiştir [80].

Bu çalışmada ovidakta bulunan epitelyal etiket-tutucu hücrelerin ER α 'yı eksprese etmedikleri bulunmuştur. Aynı zamanda proksimal kısımdaki etiket-tutucu hücrelerde PR ekspresyonu bulunmasına rağmen distaldeki hücrelerin PR ekspresyonu göstermedikleri gözlenmiştir [80]. Bununla birlikte distal ovidakta bulunan etiket-tutucu hücreler Janzen ve arkadaşlarının deney bulgularında ER α ve PR'ünü eksprese eden hücrelerle aynı lokalizasyona sahiptir [84]. Bu hücreler kök hücre markerları olan c-kit ve tümör protein p63 (p63) ekspresyonları değerlendirilerek karakterize edilmiştir. p63; serviks, vajina, deri ve prostat dahil olmak üzere, çok katlı epitellerin bazal hücrelerinde eksprese edilen bir transkripsiyon faktörüdür ve bu dokular için kök progenitör hücre markerı olarak görev yapmaktadır [85]. Ancak p63 ekspresyonu ovidakta tespit edilmemiştir. Distal ovidakta bulunan etiket-tutucu hücrelerin birçoğunun c-kit'i eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu veriler distal ovidakta bulunan etiket-tutucu hücrelerin kök hücre marker ekspresyonuna ve ER α ve PR'nün eksikliğine bağlı olarak az farklılaştığını göstermektedir. Bununla birlikte, bu hücreler endometriyal dökülme ve proliferasyon sırasında endometriyal re-epitelizasyona katkıda bulunmamaktadır; bu da distal ovidaktaki etiket-tutucu hücrelerin kısa süreli olarak, hücre popülasyonunu yeniden oluşturacak kök ya da progenitör hücreler olarak hareket etmediğini göstermektedir [80]. 2012 yılında Paik ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insanlarda, fallop tüpü epitelyumu kök benzeri hücreleri (*fallopian tube epithelium stem-like cells* – FTESC), silli hücre markerı tubulin $\beta 4$ (TUBB4)⁻, sekretuar hücre markerı paired box 8 (PAX8)⁻, CD44⁺ bazal yerleşimli hücreler olarak tanımlamıştır. Bazal yerleşimli farklılaşmamış hücrelerin; epitelyal hücre adezyon molekülü (*Epithelial cell adhesion molecule* - EPCAM), CD44 ve integrin α -6 (ITGA6), hücre yüzey antijenleri eksprese ettikleri gösterilmiştir. Bu fallop tüpü epitelyal alt popülasyonunun, farklılaşmış silli ve sekretuar hücreler ile bazal olarak lokalize CD44⁺ epitel hücrelerini içeren in vitro organoidler üretebildiği gösterilmiştir [3].

Fallop tüpü ve uterus, gelişimleri esnasında, parametonefrik kanaldan köken almaktadır [86]. Parametonefrik kanal epitelyumu, sölomik epitelin bir türevidir olup, fallop tüpü ve endometrial epitel hücrelerinin her ikisini de vermektedir [87, 88]. Aynı araştırma laboratuvarında daha önce yapılan, yayınlanmamış bir çalışmada fare uterus epitelyal rejeneratif hücrelerin bazal membranla ilişkili olup CD44 ile işaretlenebildiği gösterilmiştir. Araştırmacılar, fallop tüpü ve endometriyum ortak embriyolojik orijini

paylaştığı için, fallop tüpünde CD44 molekülünü eksprese eden hücreleri aramışlardır. Fallop tüpünün bazal membranını işaretlemek için ITGA6 kullanılmıştır. Seyrek olarak bulunan, tubal sekresyona katkısı olmayan ve silleri bulunmayan bazale yerleşmiş CD44 pozitif hücreler fallop tüpü epitel tabakasında tanımlanmıştır. Bu hücrelerin TUBB4 ve PAX8'i eksprese etmedikleri gösterilmiştir. Dolayısıyla FTESC'nin; EPCAM, CD44 ve ITGA6 ekspresyonuna dayalı olarak izole edilebileceği sonucuna ulaşılmıştır [3].

Fallop tüpü uzun lümenli bir yapıdır ve epitelyal hücrelerin kompozisyonu, uterusla komşu proksimal kısımdan distal fimbria sonuna kadar farklılık göstermesi beklenebilir. Paik ve arkadaşları fallop tüpü epiteli kök hücrelerinin tüp uzunluğu boyunca farklı dağılım gösterip göstermediğini araştırmışlardır. FTESC'nin tüp boyunca yerleştiğini, ancak distal fimbria ucunda daha yoğun olduğunu göstermişlerdir. FTESC'nin tüpün distal bölgesinde yoğunlaşmasının tamir için biyolojik bir adaptasyon olabileceği düşünülmüştür. Çünkü bu fallop tüpü kısmının ovulasyonla aylık bazda hasar görme riski daha fazladır [3].

2.3.5.2. Fallop tüpü mezenkimal kök hücreleri

Yetişkin MKH'ler, tipik olarak farklılaşmamış multipotent hücreler olarak tanımlanır. Birkaç farklı hücre soyuna farklılaşma potansiyeli ve kendini yenileme kapasitesine sahiptirler [89]. Fonksiyonel olarak heterojen olmasına rağmen MKH populasyonları, kemik iliği, iskelet kası, akciğer, adipoz doku, dental pulpa, plasenta ve umbilikal kord gibi farklı dokulardan izole edilmiş olup benzer bir hücre yüzey reseptörü ekspresyonu sunarlar [90-98]. Bununla birlikte, yetişkin kök hücrelerin, marker ekspresyonlarından ziyade fonksiyonel özellikleri tarafından tanımlandıkları bilinmektedir [99]. Aynı zamanda rejeneratif tıp için kök hücrelerin kullanılma olasılığı, özellikle non-invaziv prosedürler yoluyla multipotent kök hücrelerin elde edilmesi için en iyi kaynakları bulmak üzere yeni bir araştırma alanı açmıştır [4].

MKH'ler başlangıçta kemik iliği prekürsörleri olarak tanımlansa da yeni kanıtlar doku bakım ve rejenerasyonunda bu hücrelerin muhtemelen önemli bir rol oynadığını göstermekte ve MKH'lerin neredeyse tüm organlarda bulunduğu düşünülmektedir [100-104]. Yapılan çalışmalarda, insan uterus endometriyumunda ve menstrual kanda MKH'ler bulunmuş ve bu hücrelerin in vivo rejenerasyonu destekleyebilecekleri gösterilmiştir [105-111].

Cerrahi uygulamalardan sonra atılan insan doku parçaları, önemli kök hücre kaynaklarını temsil edebilir ve kullanımları etik problemler ortaya çıkarmaz. Umbilikal kord, dental pulpa, adipoz doku ve menstrual kan gibi biyolojik atıklardan elde edilen MKH'lerin kas, yağ, kemik ve kıkırdak hücre soylarına farklılaşabildikleri gösterilmiştir [95, 98, 112-114]. Yapılan bir çalışmada insan fallop tüpü MKH'lerinin izolasyonu, in vitro genişlemesi ile kas, yağ, kıkırdak ve kemiğe farklılaşması ilk kez gösterilmiştir [4]. Üreme fonksiyonunun bozulmasını önlemek için insan fallop tüpü ortamında homeostazın gerekliliği, bu dokuda mevcut olan MKH nişlerinin bu süreçten sorumlu olabileceğini düşündürmektedir [115, 116]. Bununla birlikte insan fallop tüpü MKH'lerinin üremede rol oynayabileceği spekülasyonu açıklığa kavuşturulamamaktadır. İnsan fallop tüpünden köken alan, yüzeye yapışabilen tüm hücrelerdeki adezyon belirteçlerinin (CD29, CD44, CD90) ve diğer MKH belirteçlerinin (CD13, CD73, SH2, SH3 ve SH4) ekspresyonlarının yüksek seviyeleri, insan fallop tüpü kök hücrelerinin mezenkimal doğasını doğrulamıştır. Ek olarak bu hücrelerin hematopoetik soy markerları (CD34, CD38, CD45, CD117 ve CD133), endotelyal marker CD31 ve monosit markeri CD14'ü eksprese etmedikleri gösterilmiştir. İzole edilen hücreler aynı zamanda Human Leukocyte Antigen-sınıf I (HLA-ABC) için pozitif iken Human Leukocyte Antigen-sınıf II (HLA-DR) için negatiftir [4].

Çalışmada insan fallop tüpü MKH'leri, in vitro olarak miyojenik, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik soylara farklılaştırılmıştır. Bu sonuçlar izole edilen hücrelerin mezenkimal doğasını ve multipotensi özelliğini doğrulamaktadır [4].

Wolff ve arkadaşları yaptıkları çalışmada endometriyal stromal hücrelerin alt populasyonunun in vitro kondrojenik farklılaşmasını indükleyerek endometriyal multipotent hücrelerin varlığını göstermişlerdir. Bununla birlikte myometriyum, fallop tüpü ve uterosakral ligamentler gibi endometriyal olmayan jinekolojik dokular kontrol olarak kullanıldığında kondrogenez gösterilememiştir [117]. Bu durum endometriyum ile karşılaştırıldığında yaşam boyu yenilenme yüklerinin daha az olması nedeniyle bu dokularda daha az progenitör kök hücre olabileceğini düşündürmektedir ya da çalışmada kullanılan farklılaşma tahlili bu dokular için uygun değildir. Jazedje ve arkadaşlarının, fallop tüpü MKH'lerinden miyojenik, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşmanın göstermesindeki başarıya dayanarak [4], Wolff ve arkadaşları tarafından

bildirilen fallop tüpü dokusunda kondrogenezin gösterilememesinin progenitör kök hücre konsantrasyonundan ziyade metodolojik konular ile ilişkilendirilmesi gerektiği söylenebilir.

2.4. Wnt Sinyalizasyonu

Wnt ailesi proteinleri, sistein açısından zengin glikoproteinler olup [118], insanda 19 üyeden oluşan karmaşık bir sinyal molekülü ailesidir [9]. Wnt proteinleri, embriyonik indüksiyon, hücre polaritesi oluşumu ve hücre kaderinin spesifikasyonu gibi çeşitli süreçleri etkileyen geniş bir protein ligandları ailesidir [8]. Wnt sinyalizasyonunun hücreler üzerindeki etkisi otokrin ve/veya parakrin biçimde olur. Her Wnt tipinin birbirinden farklı etkisi olmakla birlikte ortak etkileri de vardır. İlk Wnt geni, Roel Nusse ve Harold Varmus tarafından virüslerle enfekte olan fare meme tümöründe Int-1 geninin etkinlik kazanmasıyla bulunmuştur [119]. Wnt ismi *Drosophila melanogaster*'de bölümlenme-kutuplaşma genleriyle ilişkili olan Wingless (Wg) geni ile fare Int-1 geninin karışımından doğmuştur. Wnt geninin en iyi tanımlandığı canlı *Drosophila*'dır; ancak Wnt genleri *Caenorhabditis elegans*'tan insana kadar çok geniş bir yelpazedeki canlıların tümünde bulunmakta olup [7] bütün metazoa hayvanlarda korunmuşlardır [120]. Wnt ligandları, türler arasında %20 ila %85 özdeşlik içerir ve 23-24 aralıklı spesifik sistein kalıntıları içeren, neredeyse aynı primer sekansına sahip olmaları ile tanımlanmışlardır [121, 122]. İlk kez *Drosophila*'da kanat gelişimindeki etkisi gösterilmiş, daha sonra gövdenin bölümlenmesindeki etkileri ortaya çıkarılmıştır [9]. Wnt yolagındaki mutasyonlar, insan doğum defektleri, kanser ve diğer hastalıklar ile bağlantılıdır [123].

Memelilerde Wnt'nin en önemli etkisi gastrülasyonla ortaya çıkar. Organların ilk taslakları ortaya çıktıkça Wnt yolları etkinlik kazanarak hücrelerin çoğalması ile organ ve dokuların normal oranlara erişmelerini sağlar. Gelişimin ilerleyen evrelerindeyse hücre farklılaşması ve kutuplaşması süreçlerinde rol oynar [9].

Memelilerde Wnt sinyalizasyonunun karmaşıklığı ve spesifitesi, kısmen, sekresyon için bir N-terminal sinyal peptidi içeren yaklaşık 350-400 aminoasitlik 19 Wnt ligandı ile elde edilir [120]. Wnt proteinleri, palmitoilasyon (sistein'e palmitoik asidin takılması) gösteren proteinlerdir. Molekülün amino ucunda yağ asitleri bağlıdır ve bu sayede hücre zarına tutunurlar [9]. Wnt proteinleri, kısa ve uzun mesafeli sinyalizasyonun her ikisi için

kapasiteye sahip morfogenerler olarak işlev görebilir [124]. Wnt, uygunsuz ekspresyonu kanserin başlamasını tetikleyen normal bir hücre gen olup, bir proto-onkogendir [7].

Wnt proteinleri hücrede bilinen üç yolağı etkinleştirirler. i) Wnt/ β -katenin yolağı, kanonik Wnt yolağı olarak da bilinir; ii) Planar hücre kutuplaşma yolağı (PHKY), gelişmekte olan epitel tabakalarının embriyoda doğru ekseninde kutuplaşmasını sağlar ve Rho ailesi GTPaz'lar tarafından kontrol edilir; iii) Wnt/kalsiyum yolağı, hücre içinde kalsiyum iyonu artışını uyarır. Wnt proteinleri bu üç yolakta da önce Frizzled (Fz ya da Frz) ailesinden olan hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanır. Fz ailesi reseptörleri G proteine kenetli reseptörlerdir. Wnt bağlandığında etkinlik kazanan Fz reseptörleri bir yapısal protein olan Dishevelled (memelilerde Dvl; *Drosophila*'da Dsh) proteinini kendine yaklaştırır ve onu uyarır. Bu durum sinyal yolağının aşağı doğru etkinlik kazanmasını sağlar [9].

2.4.1. Kanonik Wnt sinyal mekanizması

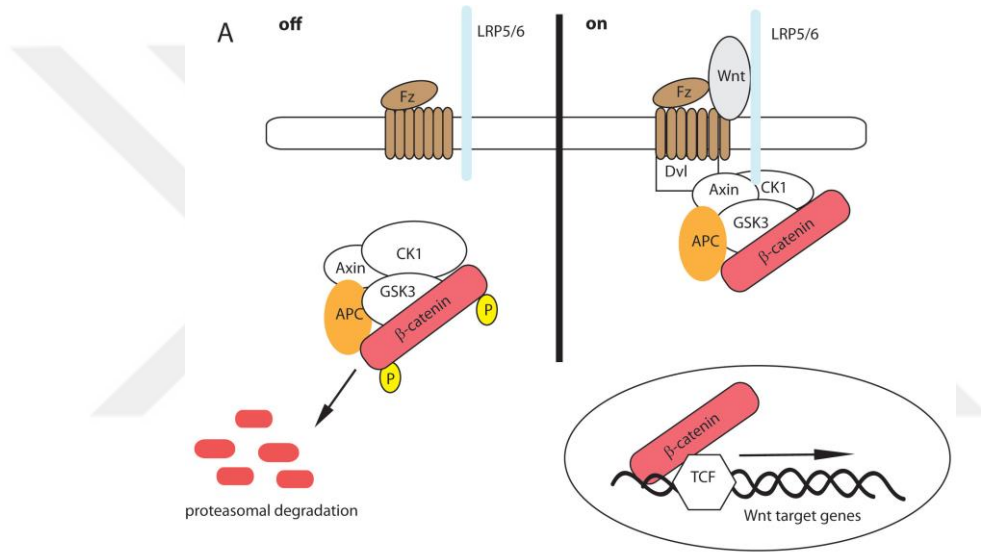
Kritik ve en çok çalışılan Wnt yolağı, kanonik Wnt sinyalizasyonu olup, anahtar gelişimsel gen ekspresyon programlarını kontrol eden transkripsiyonel ko-aktivatör β -katenin miktarını düzenleyerek işlev gösterir [120]. Kanonik Wnt sinyalinin aktivasyonu hücre proliferasyonunu indükler [8, 125, 126].

Wnt sinyalizasyonu hücrelerin yüzeyinden serbest bırakılan veya sunulan Wnt proteinlerinin, Fz ve düşük yoğunluklu lipoprotein (*low density lipoprotein* - LDL) ilişkili protein (*LDL-related protein* - LRP) reseptör kompleksine bağlanması ile hedef hücreler üzerinde etki eder. Bu reseptörler, Dvl, glikojen sentaz kinaz- 3β (*glycogen synthase kinase 3 β* - GSK- 3β), kazein kinaz 1α (*casein kinase 1 α* - CK1 α), Axin, adenomatöz polipozis koli (*adenomatous polyposis coli* - APC) ve transkripsiyon regülatörü olan β -katenin dahil olmak üzere çeşitli hücre içi proteinler ile bir sinyali taşırlar [8].

Sitozolik β -katenin fosforilasyonu/degradasyonu ve bu mekanizmanın Wnt tarafından regülasyonu, Wnt sinyalizasyonu için gereklidir [120]. Sitoplazmik β -katenin seviyeleri normal olarak CK1 α /GSK- 3β /APC/Axin içeren bir kompleks tarafından kontrol edilen ve fazla β -katenin'in proteozom aracılı bozulması yoluyla düşük tutulur. Hücreler Wnt sinyallerini aldığında, bozulma yolu inhibe olur ve sonuç olarak β -katenin sitoplazmada ve nükleusta birikir. Nükleer β -katenin, transkripsiyonu etkilemek için lenfoid

güçlendirici bağlayıcı faktör 1 (*lymphoid enhancer-binding factor* - LEF)/TCF gibi transkripsiyon faktörleri ile etkileşir (**Şekil 2.4**). Wnt hedeflerinin büyük bir kısmı, Wnt sinyal yolağının kendisinde tanımlanmış olup Wnt sinyalizasyonu esnasında geri-besleme kontrolü sağlarlar [8].

Kanonik Wnt stimülasyonuna cevap olarak hücrelerde morfolojik değişiklikler gözlenmektedir. Bu sürece muhtemelen aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi eşlik etmektedir. Wnt3a'ya yanıt olarak hücre iskeleti değişiklikleri epitel hücrelerinde görülmüştür [127].



Şekil 2. 4: Kanonik Wnt sinyalizasyon mekanizması [5]

2.4.1.1. β-katenin

Kanonik Wnt sinyalizasyonunun merkezinde çok işlevli bir protein olan β-katenin'in proteolitik bir etkiyle yıkımı söz konusudur [9]. β-katenin'in, Wnt sinyalizasyonunun yanı sıra hücre-hücre bağlantılarında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir [128-130]. Epitel hücrelerinde β-katenin moleküllerinin çoğu hücre-hücre yapışma birimlerinde görevlidir [9]. β-katenin formları, zardaki α-katenin ve E-kadherin ile birleşerek adherens bağlantıları oluşturmaktadır [131]. β-katenin bu birimlerde kadherin moleküllerini hücre içindeki aktin iskeletine tutundurur, yani aracı proteindir. Buna karşın gerek epitel gerekse epitel olmayan hücrelerde kadherin molekülleriyle ilişkisi olmayan β-katenin proteinleri sitoplazmada hızla parçalanırlar [9]. E-kadherin'in kaybı, hücre

bağlantılarında katenin-kadherin eşleşmesinin bozulmasına yol açarak, serbest β -katenin ve TCF aracılıklı gen ekspresyonunun artışına neden olur [132].

BCL9-2'nin (*B-cell lymphoma 9-like protein*); fosforile edilmiş β -katenin ile etkileşime girerek, β -katenin nükleer lokalizasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle, BCL9-2 ile etkileşim, β -katenin'in bağlantı ve transkripsiyonel fonksiyonları arasında geçiş görevini sağlamaktadır [133]. BCL9-2'ye benzer şekilde epidermal büyüme faktörü (*epidermal growth factor* - EGF) kaynaklı, ekstraselüler sinyal-düzenleyici kinaz/kazein kinaz 2 (*extracellular signal-regulated kinase/casein kinase 2* - ERK-CK2) aktivasyonunun β -katenin fosforilasyonuna yol açtığını, daha sonra α -katenin ile β -katenin arasında bağlantı oluşumunu engellemesi sonucunda β -katenin aracılıklı transkripsiyonun aktivasyonuna ve tümör hücresi istilasına yol açtığını gösterilmiştir [134].

Bununla birlikte, vasküler endotelial büyüme faktörünün (*vascular endothelial growth factor* – VEGF) etkisi ile adherens bağlantı komplekslerinin bozulduğu ve VEGF ile indüklenen vasküler geçirgenliğe neden olduğu gösterilmiştir [135]. Yukarıda tarif edilen çalışmalarda gösterildiği gibi, β -katenin'in membrandan sitoplazma veya nükleusa translokasyonu, sırayla β -katenin transkripsiyonel aktivitesini arttıran başka sinyal yolları ile düzenlenebilir [131].

β -katenin'e ek olarak Wnt yolağının diğer bileşenleri de TCF aracılı ekspresyon için gereklidir. Bu bileşenler hücre tipine özgü olabilir. Bu nedenle, kanonik Wnt sinyal yolunun aktivasyonuna cevap hücre fenotipine göre GSK-3 β inhibisyonu, β -katenin'in arttırılmış seviyeleri/veya aktivitesi ya da her ikisi şeklinde olabilir. Bu, gen ekspresyonunu ve/veya hücre adezyonunu, hücre düzenini düzenlemede aracı olan mekanizmaları, doku mimarisini ve kanser progresyonunu değiştirebilir [136].

2.4.1.1.A. β -katenin'in etkisizleştirilmesi

Sitoplazmadaki β -katenin'in etkisinin ortadan kaldırılması parçalama kompleksi adı verilen bir grup protein tarafından gerçekleştirilir. Bu gruba bağlanan β -katenin çekirdekten uzak tutularak parçalanır. Parçalama kompleksi 4 farklı protein içerir; serin/treonin kinazlar CK1 α ve GSK-3 β ile tüm yapıyı bir arada tutarak çatı görevi gören proteinler olan Axin ve APC [9].

İskele proteini Axin, GSK-3 β , CK1 α ve β -katenin ile etkileşime girmek için farklı domainler kullanır. CK1 α tarafından serin 33'ün fosforilasyonunun ardından treonin 41, serin 37 ve serin 45'in GSK-3 β tarafından fosforilasyonu ve sonucunda β -katenin fosforilasyonu gerçekleşmiş olur [137]. β -katenin'in serin 33 ve serin 37'den fosforilasyonu E3 ubiquitin ligaz β -transdusin tekrarı-içeren protein (*β -transducin repeats-containing protein - β -Trcp*) için bağlanma bölgesi yaratarak, β -katenin'in ubiquitinasyonu ve degradasyonuna önderlik eder [120]. β -katenin parçalanmak üzere ubiquitin molekülü tarafından işaretlenmiş olur ve proteozom komplekslerinde parçalanır [9]. β -katenin ve çevreleyen bu serin ve treonin kalıntılarının mutasyonları sıklıkla kanserlerde gözlenir, oluşan mutant β -katenin, fosforilasyon ve degradasyondan kaçır. Axin aynı zamanda; kendisini β -katenin'e bağlayan, büyük, multifonksiyonel, iskele proteini APC ile etkileşen RGS (*Regulatory of G-protein signaling - G-protein sinyalinin düzenleyicisi*) domainini içerir [120]. Bu temel Axin kompleksinin bileşenleri [137], β -katenin fosforilasyonu ve degradasyonunu sağlama ortak amacını paylaşmaktadır. Aslında hem APC hem de Axin tümör-baskılayıcı genlerdir ve APC mutasyonları kolorektal kanserlerde özellikle yaygındır [120].

β -katenin'e ek olarak, GSK-3 β ve CK1 α aynı zamanda Axin ve APC'yi fosforiller, bu da β -katenin ile Axin ve APC'nin ilişkisinin artmasını sağlar ve dolayısıyla β -katenin'in fosforilasyonu/degradasyonunu hızlandırır [137, 138]. CK1 α /GSK-3 β tarafından fosforilasyon üzerine APC ve Axin aynı β -katenin etkileşim yüzeyine bağlanmak için yarışır. Bu olay APC'nin fosforile edilmiş β -katenin'i ubiquitinizasyon için Axin'den uzaklaştırması ile sonuçlanır. Sonuç olarak APC'nin, Axin'i β -katenin fosforilasyonunun bir sonraki adımına hazırlaması için bir "mandal" olarak görev yaptığı düşünülmüştür [137, 139]. APC'nin aynı zamanda β -katenin nükleer taşınımını desteklediği görülmüştür. APC endojen β -katenin'in nükleer birikimine neden olabilir, ancak bu nükleer β -katenin molekülleri TCF aracılı transkripsiyonun uyarılması için etkisizdir. Dolayısıyla APC, β -katenin hedef genleri için kromatin-ilişkili bir baskılayıcı olarak işlev görebilir [140].

Değişmiş Wnt sinyalizasyonunun bir sonucu olarak GSK-3 β inhibisyonu, epitelyal-mezenkimal geçiş ve tümör oluşumuna yol açan hücre çoğalmasında öneme sahiptir [136].

2.4.1.2. Wnt proteinlerinin salgılanması

Wnt'ler fonksiyonel özelliklerden ziyade amino asit dizisi ile tanımlanırlar [121, 141]. Bütün Wnt'lerin ortak özellikleri arasında, sekresyon için bir sinyal dizisi, yüksek oranda yüklü birçok amino asit kalıntıları ve birçok glikozilasyon bölgesi bulunur [8]. Wnt proteinleri yüksek düzeyde korunmuş [142] 22 sistein kalıntısının karakteristik dağılımını gösterir [8] ve bununla birlikte bir sinyal dizisini içerirler [142].

Salgılanmış aktif Wnt moleküllerinin çözündürülmesindeki zorluklar, Wnt saflaştırmaya yönelik girişimleri engellemiş ve dolayısıyla bu büyüme faktörü ailesinin biyokimyasal karakterizasyonunun ortaya konmasında sorunlar ortaya çıkmıştır. Wnt ligandlarının birincil amino asit dizisi, bunların çözünür olması gerektiğini göstermekte iken salgılanan Wnt proteinleri hidrofobik karakter göstermektedir. Bu proteinlerin çoğunlukla hücre membranları ve ekstraselüler matriks (*extracellular matrix* - ECM) ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Wnt'nin çözünmez doğası, bu proteinlerin, palmitoillenmiş ve başlangıçta primer amino asit dizisinden tahmin edilenden daha hidrofobik olduğu keşfiyle açıklanmıştır [143]. Kütle spektroskopisi, Wnt proteinlerinin, protein ailesi içindeki korunan ilk sistein kalıntısı, sistein 77 üzerine ve proteinin ortasında bir serin üzerinde bir palmitatın eklenmesi ile lipid modifikasyonuna uğradığını ortaya koymuştur [144]. Palmitoilasyon korunmuş bir sistein kalıntısı üzerinde bulunması bu durumun bütün Wnt'lerin bu değişikliği taşıdığını gösterir. Mutant analizi, bu sisteinin fonksiyonu sağlayabilmek için gerekli olduğunu ve Wnt'ye enzim açıl protein tioesteraz uygulanmasının, hidrofobik veya aktif olmayan bir form ile sonuçlandığını gösterilmiştir. [143]. 2. tanımlanan lipid modifikasyonu, serin 209'a palmitat eklenmesidir ve bunun mutasyonu ER Wnt3a birikimine ve sekresyon hatalarına yol açmaktadır [144]. Palmitatın sinyalizasyon için kritik olduğuna dair kanıtlar sağlanmıştır [143].

Palmitatı Wnt'ye ekleyen enzimlerin, *Drosophila*'daki porcupine (Por) [145] ve *Caenorhabditis elegans*'ta mom-1 olarak adlandırılan genler tarafından kodlanması muhtemeldir [146]. Bu genler Wnt sinyalini alan hücreler yerine Wnt ligandını üreten hücreler için gereklidir. Por geni ve membrana-bağlı açıl transferazlar arasındaki sekans benzerliği sonucu enzimlerin ER membranında bulunduğu ve çeşitli substratları açile ettiği fark edilmiştir [147]. Bu nedenle Por'un Wnt'ye palmitat transferini katalize eden bir enzimi kodlaması mümkündür. Bu düşünce ile tutarlı olarak, Wg hidrofobiktir [148].

Wg membranlarla ilişki kurabilir, fakat O-açıl transferaz aktivitesi biyokimyasal olarak inhibe edildiğinde ya da Por genetik olarak elimine edildiğinde hem hidrofobiklik hem de membran lokalizasyonu kaybolur. Bu veriler, Por'in hem Wnt lipidasyonu hem de membran hedeflemesinin kilit bir düzenleyicisi olduğu hipotezini desteklemektedir [8].

Palmitoilasyonun Wnt sinyali için gerekli olduğu gösterilse de lipid modifikasyonunun kesin rolü belirsizliğini korumaktadır. Olası bir işlev, Wnt'lerin zarın belirli alanlarına hedeflenmesidir. Ek olarak, Wnt proteinlerinin palmitoilasyonu, glikozilasyonları için gerekli olabilir. N-bağlı glikozilasyon sırasında palmitoilasyon için önerilen bu rol aynı zamanda, hücreler arasındaki Wnt'nin taşınmasına da yardımcı olabilir, çünkü glikozilasyon, Wnt'ye yanıt veren hücrelerin yüzeyinde mevcut olan heparin sülfat proteoglikanları (HSPG'ler) ile Wnt etkileşimlerini arttırabilir. Alternatif olarak, palmitat parçası, Wnt proteinlerini sürekli sinyalizasyon için potansiyel olarak membrana bağlayabilir. Kök hücre biyolojisinde, Wnt'ler ve membran arasındaki etkileşimlerin, hücre konfigürasyonlarına yakın hücrede olduğu düşünülen nişlerin, kök hücre kaderini nasıl kontrol ettiğini anlamada büyük önemi vardır [142].

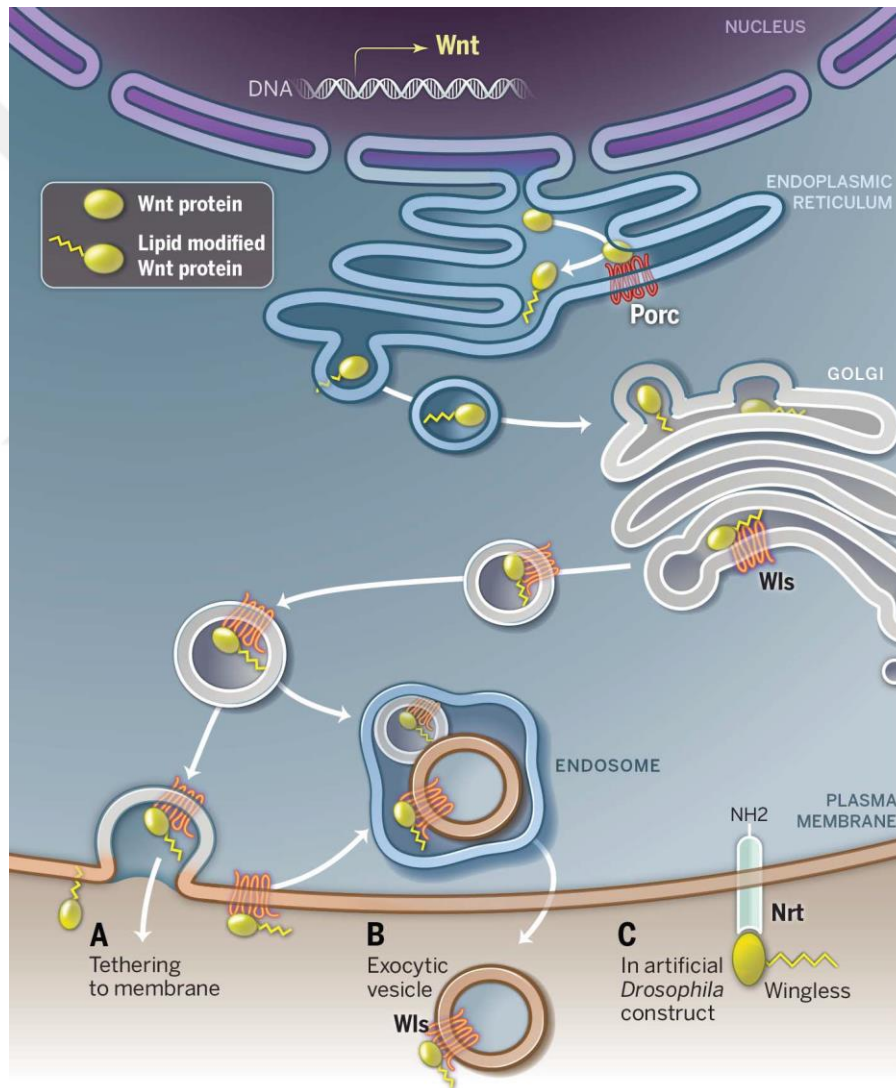
Her ne kadar palmitoilasyon Wnt sinyaline entegre olsa da kesin işlevi bilinmemektedir. *Drosophila*'da Wg'nin aşırı ifadesi, Por fonksiyonuna olan ihtiyacı kısmen ortadan kaldırabilir [149] ve benzer şekilde, palmitoilasyon bölgesinden yoksun olan Wnt mutant gen yapıları, hücrelerde aşırı eksprese edildiğinde zayıf da olsa bir sinyal üretebilir [143]. Bu gözlemler için uygun bir açıklama, lipid parçasının Wnt'yi zarlara hedeflediği ancak yokluğunun yüksek protein konsantrasyonları ile aşılabileceğidir [8].

Genetik çalışmalar, Wnt'nin üretiminin ardından salınmasını teşvik etmek için sekretuar yolda ihtiyaç duyulacak Wntless (Wls)/Evenness (Evi) çok-geçişli transmembran proteinlerini belirlemiştir [150]. Wls/Evi'nin yokluğu Wnt'nin hücre yüzeyine taşınmasını inhibe eder [151].

2.4.1.2.A. Wnt proteinlerinin hücreler arasında taşınması

Wnt'ler, uzaktaki hücreler üzerinde etki edebilen, konsantrasyona bağlı uzun mesafeli morfogenetik sinyaller olarak işlev görmektedir [152-153]. Bu, palmitoillenmiş Wnt moleküllerinin aktif olarak taşınıp taşınmadığını, Wnt'lerin hücrelerden nasıl salındığını ve Wnt'nin uzun mesafeler boyunca nasıl hareket ettiklerini sorularını doğurmuştur.

Drosophila kanadına ait imajinal disklerde, hücre dışına vezikül-bazlı taşınmanın mevcut olduğu öne sürülmüştür [155]. Lipoprotein partikülleri olarak adlandırılan lipid taşınması için gerekli olan büyük moleküller, Wnt gibi lipid modifiye proteinlerin taşınmasında rol oynamaktadır. Önceden eksozom benzeri parçacıklar olduğu düşünülen, “argosom” olarak adlandırılan bu yapıların artık eksojen olarak türetilmiş lipoproteinler olduğu düşünülmektedir [156]. Wnt ligandları ayrıca, sinyalleri taşıyan hücrelerden uzak Wnt ve diğer büyüme faktörlerini taşıyabilen uzun, ince filopodiyal uzantılar olan sitonemler (*cytonemes*) tarafından da taşınabilmektedir [157].



Şekil 2. 5: Wnt sekresyonu, modifikasyonu ve kısa menzilli sinyal aktivitesinin modeli [158]

Palmitoillenmiş proteinlerin, hücrelerin ekstraselüler kısmında lipoprotein parçacıkları ile ilişkili olduğu bir model önerilmiştir. Wnt proteinlerinin bir hücreden diğerine taşınmasında lipoproteinlerin gerekliliği, bir *Drosophila* lipoproteini olan Lipophorin'in baskılanması ile kanat diskindeki Wg sinyalizasyonunun daralması ile gösterilmiştir [156].

Wnt proteinleri salgılandıktan sonra, bir dizi bağlayıcı molekül aktivitelerini modüle edebilir. Ortaya çıkan kanıtlar, HSPG'lerin Wnt'nin taşınmasında veya stabilizasyonunda rol oynadığını göstermektedir. *Drosophila*'da, bir HSPG olan Dally'nin yokluğu, [159, 160], ve HSPG'yi modifiye eden enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar [161, 162] kanatsız mutantlara benzer fenotipler üretir. HSPG'lerin, Wnt proteinlerini stabilize edebileceği, sunumunda veya hücreler arasındaki hareketinde yardımcı olabileceği düşünülmüştür [8].

Homolog rekombinasyon kullanarak, araştırmacılar *Drosophila*'da, endojen Wg genini, tip 2 transmembran protein Neurotakin ve Wg (NRT-Wg) içeren bir füzyon proteinini eksprese eden bir gen ile değiştirmiştir [154]. Ancak üretildiği hücrelerin yüzeyine bağlandığından NRT-Wg'nin endositoz ile alınması mümkün değildir. Kanıtlar, NRT-Wg'nin bir hücreden diğerine geçmediğini göstermektedir [163].

Salgılanan Wnt'ler ayrıca SFRP (*Secreted frizzled-related protein* – salgılanmış frizzled ilişkili protein) ailesinin üyelerine de bağlanabilir. Bunlar, Wnt reseptörü olan Fz ailesinin ligand bağlama bölgesine benzeyen proteinlerdir [164, 165]. Alternatif olarak, Wnt'ler, Derailed/Ryk (*Related to receptor tyrosine kinase* - reseptör tirozin kinaz ile ilişkili) transmembran Wnt reseptör sınıfının hücre dışı kısmına benzeyen WIF (*Wnt inhibitory factor* – Wnt inhibe edici faktör) proteinlerine bağlanabilir [166]. Genel olarak hem SFRP'ler hem de WIF'lerin hücre dışı Wnt inhibitörleri olarak işlev gördüğü düşünülmektedir [166-172]. Wnt ligandları için reseptör olarak işlev görebilen bilinen Wnt bağlama alanlarına sahip başka proteinler de vardır. Tek geçişli tirozin kinaz Ror2, Fz reseptörlerinden yapısal olarak farklı olsa da diğer Wnt sinyalizasyon formlarında yer alır [173-177]. Bununla birlikte, bu proteinlerin, ekspresyon seviyelerine veya hücresel içeriğe bağlı olarak, Wnt'nin bozulması veya salgılanması ile taşınmasını kolaylaştırarak Wnt sinyalizasyonunu desteklediği kesin bir biçimde söylenmemiştir [171].

2.4.1.3. Wnt reseptörleri ve sitoplazmada Wnt sinyalizasyonu

İki farklı reseptör ailesi Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu için kritiktir: Fz yedi-geçişli transmembran reseptör [8] ile LRP5 veya LRP6 [178]. Memeli genomu, Wnt ve LRP5/6 birlikte fazla eksprese olduğunda β -katenin sinyalini aktive etmek için değişken kapasiteye sahiptir [179] ve Fz üyeleri arasında fonksiyonel olarak çeşitliliğe sahip olan 10 Fz genini barındırır [8].

Bir Wnt sinyalini iletmek için bulunan ilk reseptör yedi-geçişli transmembran protein Fz proteinidir [180]. Fz proteinleri, sistein zengin alan (*Cysteine-rich domain* - CRD) olarak adlandırılan 10 sistein kalıntısından oluşan korunmuş bir motif içeren büyük bir ekstraselüler alan içerir. Çeşitli Fz reseptörlerinin CRD alanlarının, yüksek afinite ile birçok Wnt'ye bağlandığı gösterilmiştir [181, 182]. Sitozolik tarafta Fz'ler, Wnt sinyalinin bilinen bir aracı olan Dvl proteini ile doğrudan etkileşime girebilir [183].

Wnt ligandının bağlanmasını takiben, Fz, kanonik Wnt sinyalini transdüksiyonu için LRP proteinleri ile birlikte bir ortak reseptör kompleksi oluşturmaktadır [184]. LRP5 ve -6 proteinleri, nispeten küçük bir intraselüler alana ve birkaç potansiyel protein etkileşim alanı içeren geniş bir ekstraselüler alana sahiptir [178]. Proteinin hücre dışı kısmını barındırmayan, ancak zar ve hücre içi alanları içeren kesilmiş proteinler, yapısal olarak aktif bir kanonik Wnt sinyali üretirler [185]. İki farklı LRP reseptörü arasında, LRP6 daha baskın bir rol oynamaktadır ve embriyogenez için zorunludur. Ancak LRP5 embriyogenez için gerekli değildir. Bununla birlikte LRP5 kemik homeostazı için kritiktir. Ayrıca bu iki reseptörün birlikte fonksiyonu farelerde gastrulasyonun gerçekleşmesi için gereklidir [178].

Wnt sinyali, Fz ve LRP6'nın (ya da LRP5) her ikisini gerektirir. Wnt-indüklü LRP6'nın aktivasyonu, reseptör aktivasyonundaki temel olaydır [186]. LRP6 ve LRP5'in her ikisi, fonksiyonları için gerekli olan ve hepsi esas β -katenin sinyalizasyonu ile sonuçlanacak şekilde, beş tekrarlı PPPSPxS motifine (P, prolin; S, serin; x, değişken bir kalıntı) sahiptir [186-188]. Bu çift fosforile PPPSPxS motifleri Axin kompleksi için bağlanma yerleridir [186, 188, 189]. Dolayısıyla Wnt stimülasyonu üzerinden LRP proteinleri Axin'i bağlar [190].

Fz işlevi, Wnt-indüklü LRP6 fosforilasyonu için gereklidir ve Fz-LRP ilişkisi LRP6 fosforilasyonunu tetiklemektedir [191]. Fz fonksiyonu, Fz ile doğrudan etkileşebilen sitoplazmik iskele proteini [192] Dvl'e genellikle bağlıdır [193]. Aslında Fz-Dvl etkileşimi ve Dvl fonksiyonu, Wnt-indüklü LRP6 fosforilasyonu için kritiktir [191, 194]. Dvl, Axin ile etkileşime girmelidir [193] ve bu Wg sinyalizasyonu [195] veya aşırı Fz ekspresyonu sırasında plazma membranına Axin alımı için gereklidir. Bir model, Fz-Dvl etkileşiminin; GSK-3 β tarafından, Axin-GSK-3 β kompleksinin LRP6 fosforilasyonunu başlatması için gerekli olduğunu göstermiştir [165].

Wnt sinyalizasyonunun negatif bir regülatörü olan Axin proteini, LRP6'nın sitoplazmik kuyruğuna bağlanabilir ve bu etkileşim Axin'in β -katenin'den ayrıldığı bir mekanizma sağlar [190]. Etkileşim sonucunda β -katenin'in kaderi değişir; parçalanmak yerine, Wnt-indüklü gen ekspresyonunu yürütmek için birikir.

Wnt sinyalinin aktivasyonu, β -katenin fosforilasyonunu ve dolayısıyla degradasyonunu inhibe eder. β -katenin düzeylerinin yükselmesi, nükleusta β -katenin birikimini [196-198] ve LEF/TCF transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşumunu sağlamaktadır [199-201]. Degradasyon için gerekli olan fosforilasyon alanlarından yoksun olan β -katenin mutant formları Wnt sinyalizasyonuna yanıt vermez ve Wnt hedef genlerini yapısal olarak aktive edebilir [202, 203]. β -katenin ve β -katenin stabilizasyonunu destekleyen APC ve Axin mutasyonları, birçok farklı kanserde bulunur ve bu da, Wnt sinyalizasyonunun birçok neoplazm için ortak bir özellik olduğunu gösterir [204].

Wnt sinyalleri, çeşitli mekanizmalar yoluyla β -katenin stabilitesini düzenleyen sitoplazmik proteinleri etkileyebilir. Bir Wnt sinyalinin alınması, β -katenin stabilizasyonunu teşvik etmek için Axin'i yıkım kompleksinden çıkartarak, Axin'i ya LRP'ye ya da Fz'e bağlı Dvl'e alımını tetikleyebilir [186, 195]. Protein fosfatazlar da β -katenin stabilitesini düzenler. Örneğin PP2A (*Protein phosphatase 2* – Protein fosfataz 2), Wnt bağımlı β -katenin düzeylerinin yükselmesi için gereklidir [205] ve Axin'i bağlayabilir [206], bu durumun GSK-3 β substratlarının defosforilasyonunda işlev görebileceği düşünülmektedir.

Axin/APC, β -katenin yıkım kompleksinde fonksiyonlara sahip olmasının yanı sıra, fonksiyonel bir NLS (*nuclear localization sequence* - nükleer lokalizasyon sekansı) ve

NES (*nuclear export sequence – nükleer dış-aktarım sekansı*) barındırır ve sitoplazma ile nükleus arasında gidip gelir. Akabinde bu moleküller, β -katenin'in dinamik hücre altı dağılımını modüle eder [207-209]. Axin/APC'nin tümör baskılayıcı aktiviteleri, bu düzenleyici fonksiyonlarının yanı sıra β -katenin'i aşağı-düzenleme kabiliyetlerine bağlanabilir [131].

β -katenin, Wnt stimülasyonuna cevap olarak sitoplazmada birikmesinin ardından, kanonik Wnt sinyalizasyonunun gerçekleşebilmesi için birikmiş olan β -katenin'in nükleer lokalizasyonu gereklidir [131].

2.4.1.4. Nükleustaki kanonik Wnt sinyalizasyonu ve β -katenin/TCF kompleksi üzerine etki gösteren regülatörler

Transkripsiyonel aktivatör β -katenin, Wnt uyarımı üzerine stabilize edilir, bunun ardından nükleusa girer, TCF/LEF1'e bağlanır ve Wnt'ye cevap veren hedef genlerin aktivasyonuna aracılık eder. Bu işlemler, hücre dışı sinyalleri nükleusa ileten bir yolağın son aşamaları olduğundan, β -katenin ve β -katenin-TCF kompleksi üzerinde çalışan çok sayıda düzenleyici faktör söz konusudur [131].

Wnt yokluğunda, Wnt hedef genlerinin transkripsiyonu, kromatini susturmak için HDAC'leri toplayan Groucho/TLE (*transducin-like enhancer of split* - bölünmüş transdüsün benzeri arttırıcı) transkripsiyonel ko-represörleri ile ilişkili olan TCF/LEF1'in doğrudan promotöre bağlanmasıyla etkisiz halde tutulur [210-212]. Wnt stimülasyonu üzerine β -katenin, Wnt'ye cevap veren gen ekspresyonunun aktivasyonu için transkripsiyonel bir ko-aktivatör kompleksi oluşumunu destekleyecek şekilde TCF'nin, Groucho/TLE baskılayıcı kompleksi ile etkileşimini önler [120]. Bununla birlikte çeşitli araştırmalar, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun modülasyonu için β -katenin-TCF kompleksi üzerinde çalışan yeni regülatörlerin varlığını bildirmiştir [213-218].

Son zamanlarda, β -katenin-TCF kompleksinin transkripsiyonel kabiliyetini kontrol etmek için yeni moleküller rapor edilmiştir. Yapılan bir çalışmada TERT'in (*telomerase reverse transcriptase* - telomeraz ters transkriptaz) doğrudan bir, SWI/SNF ile ilişkili kromatin yeniden-modelleme proteini BRG1 (*brahma-related gene 1* - brahma ile ilgili gen 1) ile işbirliği yaparak Wnt/ β -katenin sinyalini doğrudan aktive ettiği bir bulgu sunmuşlardır. TERT'nin Wnt hedef gen promotöründe TCF-bağlayıcı elementleri işgal

ettiği ve BRG1, TCF3 ve β -katenin ile bir kompleks oluşturarak hedef gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [219]. Telomeraz aktivitesine sahip olmayan insan ve tavuk TERT'lerinin alternatif splaylı formları Wnt sinyalini ve hücre çoğalmasını yine de aktive edebildiği için enzim aktivitesi ile değil fiziksel etkileşim yoluyla kompleks oluşumunun önemli olduğu önerilmektedir [220]. Hoffmeyer ve arkadaşları, bir fare modelinde Wnt sinyalinin, kök hücreler ve kanser hücrelerinde, β -katenin-Klf4 kompleksinin TERT promotörüne bağlanması yoluyla TERT ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir [221]. Bu sonuçlar, esas olarak Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu ile TERT ekspresyonunun güçlendirilmesi ve bu durumun zıttı ile kök hücrelerin kendini yenilemesi ile kanser hücrelerinin onkogenik potansiyeli arasında mekanik bir bağlantı sağlar [219-222].

Kanonik olmayan Wnt sinyalleri kanonik Wnt/ β -katenin sinyalini inhibe edebilir [223-225]. Lee ve arkadaşları kanonik olmayan Wnt sinyalinin PKC (*protein kinase C* - protein kinaz C) α -aracılı ROR α (*retinoic-acid-receptor-related orphan receptor α* - retinoik asit-reseptör-ilişkili artık reseptör α) fosforilasyonunu uyardığını bulmuşlardır. Fosforile edilmiş ROR α daha sonra Wnt hedef gen promotörlerinde β -katenin ile etkileşime girebilir, böylece β -katenin ile etkileşim için ko-aktivatörlerle rekabeti nedeniyle, β -katenin-TCF kompleksinin polimeraz II ile etkileşimi inhibe olur [224]. Wnt5a/PKC/ROR α eksen, ROR α fosforilasyonunun insan kolorektal kanserlerinde sıklıkla inhibe edilmesinden dolayı Wnt/ β -katenin sinyalini antagonize etmek için klinik olarak uygulanabilir bir yol sunabilir [131].

Wnt sinyalizasyonu sonucu kodlanan proteinlerin genleri, hayatta kalma ve proliferasyon ile ilgili olabileceği gibi (siklin D1 (*cyclin D1* – CCND1) ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1 (*insulin-like growth factor 1* – IGF-I) vb.) migrasyon ve invazyonda merkezi rollere de sahip olan (CD44 gibi) genler olabilir [14]. Wnt hedef genlerinden birisi olan cyclin D1, hücre çoğalması ve hücre döngüsünün merkezi regülatörü olarak rol oynar [226].

2.4.1.5. Kök hücrelerde Wnt sinyal yollarına bakış

Geleneksel olarak Wnt proteinleri kök hücreler için büyüme faktörleri olarak kabul edilir, yani kök hücrelerin hem farklılaşma düzeylerinin korunmasında hem de çoğalmasında etkili bir protein grubudur. Dolayısıyla kök hücre kültürlerinde hayvansal kaynaklı

büyüme faktörlerinin yerine Wnt proteinlerinin kullanımı söz konusu olabilir [142]. Kök hücre sayıları ayrıca Wnt-uygulanan asimetrik kök hücre bölünmeleri tarafından niş içinde sayısal olarak sınırlandırılabilir [158]. *Drosophila* eşey hattı kök hücreleri komşu hub hücrelerinin (testis eşey kök hücrelerinin niş hücreleri) yanında bölünür. Hub hücrelerine en yakın olan oğul hücre bir kök hücre olarak kalırken, distal hücre kaçınılmaz olarak farklılaşır. Bu asimetrik bölünme, Wnt sinyal bileşeni APC tarafından yönlendirilmektedir [227].

Hücre kültüründe lokal bir Wnt kaynağını kullanan deneyler, memelilere kadar uzanan korunmuş bir mekanizmayı gösterir [158]. Lokalize bir Wnt sinyali, bir fare embriyonik kök hücrelerini, sentrozomları hücrenin karşıt uçlarına yerleştirerek, bölünen hücrenin mitotik iğni yönlendirerek asimetrik olarak bölünmek üzere yönlendirebilir. Bu, bir Wnt-proksimal ve Wnt-distal oğul hücre üretir, ikinci hücre sinyalle temastan çıkar. Wnt-proksimal hücrelerinde, Wnt sinyali kök hücre kaderini korurken, distal hücre farklılaşır [228]. Kök hücre bölünmesinin yönlendirilmesi, böylelikle sinyalizasyon sonucunda bölünen hücrenin pozisyonu ve kaderi ile birleştirilir. Bu nedenle, bazı dokularda Wnt sinyalleri, asimetrik bir şekilde niş içindeki kök hücre bölünmelerini yönlendirebilir, kök hücre sayısını sınırlandırabilir ve kök hücrelerin doğru bir şekilde kendi soylarına oranını sağlayabilir [158].

Kök hücre kendini yenileme veya farklı dokularda in vivo soy-spesifik farklılaşmada Wnt rolleri çeşitlidir; bu nedenle, Wnt sinyalleri, in vitro kök hücre gelişimlerinin manipüle edilmesinde pratik kullanım bulmuştur. Wnt, belirli organlarda kök hücrelerde kendini yenilemeyi indüklediği için, bu tür hücrelerin in vitro çoğalmasını sağlar [158]. Örneğin, meme bezi kök hücreleri Wnt proteininin varlığında in vitro genişletilebilir ve transplantasyondan sonra tüm meme organını yeniden oluşturma yeteneklerini korurlar [229].

2.4.1.6. Dişi üreme sisteminde Wnt sinyalizasyonu

Wnt/ β -katenin sinyalizasyonu hem erken embriyogenez hem de yetişkin yaşamında dişi üreme sistemini etkiler. Embriyonel hayatta Wnt4 ve Wnt9b, parametonefrik kanalların embriyonal büyümesi için önemlidir [10, 11]. Wnt5a ve Wnt7a, parametonefrik kanallardan vajinanın üst kısmının, serviks, uterus ve fallop tüplerinin doğru organizasyonunda oluşmasında rol oynar [12, 13].

Yapılan bir çalışmada Wnt4 nakavt fareler kullanılarak, bu molekül için erken ovaryum gelişimi ve erkek üreme sistemi oluşumunun baskılanmasında bir rol ortaya konulmuştur. Bu dişilerde, testis gelişimi ile ilişkili genleri eksprese eden ve azalmış oosit sayısına sahip olan ovaryumlar bulunmuştur [10].

Yetişkinlerde, Wnt/ β -katenin sinyali, proliferasyon (Wnt/ β -katenin sinyali açık) ve farklılaşma (Wnt/ β -katenin sinyali kapalı) arasındaki ince dengenin korunmasında merkezi bir işleve sahiptir [14]. Menstrual siklus sırasında östrojen-indüklü proliferasyon ve progesteron indüklü farklılaşma arasındaki dengeyi sağlamada ve menstrual siklusun regülasyonunda Wnt sinyalizasyonunun rolü hakkında çeşitli çalışmalar bulunmaktadır [15, 16]

Menstrual siklusun proliferatif fazında, endometriyumda nükleer β -katenin boyanması gözlenir [17]. Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun inhibisyonu, E2 indüklü proliferasyonun inhibe olması ile korele olabilir [14]. Östrojen-indüklü endometriyal proliferasyon, Wnt/ β -katenin inhibitörü SFRP2 ile etkili bir şekilde inhibe edilmektedir [18]. Başka bir çalışmada doğru β -katenin ekspresyonunun uterin fonksiyon için hayati olduğu gösterilmiştir. Progesteron, menstrual siklus sırasında E2'nin proliferatif etkisini giderir, bu etki E2-indüklü Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun inhibisyonu ile elde edilebilir [19]. Progesteronun Wnt inhibe edici etkisi muhtemelen, endometriyal homeostazisin sağlanmasında ve kaybında, tümör oluşumunda ve malignansi progresyonunda hız sınırlayıcı bir basamak olarak rol oynar [14].

Wnt3a'nın foliküler gelişimde ve steroid üretiminde rol aldığı fare ve sıçanların ovaryumlarında tespit edilmiştir [20, 21]. Farelerde, sağlıklı preantral ve antral foliküllerde Wnt2 ekspresyonu, kumulus hücrelerinde ve granüloza hücrelerinde gözlenmiştir [22]. Wnt4 ekspresyonu sıçan ve fare granüloza hücrelerinde [23] ve fare kumulus-oosit kompleksinde [24] folikül gelişim süreci boyunca bulunmuştur. Fare granüloza hücrelerinde hedefli Wnt4 delesyonu, daha küçük ovaryumlar ve antral folikülleri daha az sağlıklı olan subfertil dişilerle sonuçlanmıştır [25]. Wnt4'e ek olarak, overde Wnt5a, Wnt6 ve Wnt9a gibi diğer Wnt genleri için cinsiyete özgü ekspresyon gözlenmiştir [26].

Wnt ligandlarına benzer şekilde, Fz reseptörlerinin ovaryumun foliküler olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyon sırasında belirli aşamalarda eksprese edildiği gösterilmiştir [23, 27].

Çeşitli çalışmalar fallop tüpünün patolojisi ile ilişkili Wnt sinyalizasyonundaki değişiklikler bildirmiştir. Örneğin, β -katenin sinyalizasyonunun aktivasyonu, ektopik gebelik [28, 29] ve endometriozise [30] katkıda bulunan bir faktör olarak ilişkilendirilmiştir. Artmış Wnt sinyali, enfeksiyona karşı bir mukozal yanıt olup [31], bu parakrin yolunun fallop tüpünde homeostasisinde rol oynadığını teyit eder.

Kodithuwakku ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Wnt sinyalinin aktivasyonunun, olfactomedin-1 (Olfm-1) ekspresyonunu aşağı düzenlediği ve tubal ektopik gebeliğe öncülük ettiği hipotezini çalışmışlardır [28]. Olfm-1'in çeşitli hücrel fonksiyonları düzenleyen kanonik Wnt-sinyal yolağını modüle eden bir moleküldür [32]. Mikroarray verileri, Olfm-1 transkriptinin, implantasyon penceresi sırasında endometriyumda aşağı regüle edildiğini göstermiştir [33-34]. Çalışma sonucunda, Wnt-aktivasyonunun Olfm-1 ekspresyonunu bastırdığı ve bu durumun insanlarda ektopik gebeliğe yol açan fallop tüpüne implante olan embriyo için elverişli bir mikro-ortamı oluşturacağı sonucuna varılmıştır [28].

Yapılan başka bir araştırmada, β -katenin protein ekspresyonunun ektopik gebelik ve enflamasyonlu tubal dokularda %100 pozitif olduğunu ve boyanma yoğunluğunun gebe olmayan tubal dokularda olduğundan önemli ölçüde daha yüksek olduğunu ortaya koyulmuştur. Bunun aksine, E-kadherin ekspresyonu muhtemelen artmış Wnt sinyalizasyonunun bir sonucu olarak, ektopik gebe fallop tüpleri içinde indirgenmiştir [29]. Enflamasyon ve ektopik gebelik gelişimi bağlantılı olduğu araştırma sonuçlarına dayanarak [36] Wnt aktivasyonunun ve indüklenen enflamasyonun tüpte implantasyona katkıda bulunduğu tahmin edilebilir bir sonuçtur. Araştırmacılar tüm bu değişikliklerin embriyoların ektopik olarak fallop tüpüne implante olmasına olanak sağlayan ortamı yaratabileceği sonucuna varmıştır [29].

Kessler ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, insan fallop tüplerinde yetişkin kök hücrelerin varlığının göstergesi olan, uzun vadeli kararlı 3D organoid kültürlerinin kurulmasını rapor etmişlerdir. Tek bir epitelyal kök hücre, in vitro, silli ve sekretuar

hücreleri içeren farklılaşmış organoidleri meydana getirmiştir. Organoidlerin sürekli büyüme ve farklılaşması hem Wnt hem de Notch parakrin sinyalizasyonuna bağlıdır. Köklülüğü teşvik edici genlerin azalması, farklılaşmayı artırmakta ve bu duruma düşük proliferasyon eşlik etmektedir. Wnt3a proteininin fallop tüpü organoid kültürlerinin köklülüğünü sağlaması bu çalışma ile gösterilmiştir [37].

Başka bir çalışmada Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun, ovidakt epitel gelişimi ve farklılaşmasındaki rolünü araştırmak için, fare ovidaktındaki farklı Wnt yolağı bileşenlerinin ekspresyonu incelenmiştir. Bir Wnt raportör fare modeli kullanarak, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun postnatal ovidaktal epitel olgunlaşması ve farklılaşması sırasında aktif olduğu gösterilmiştir. RNA in situ hibridizasyonu çalışması sonucu, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11 ve Wnt16'nın esas olarak ovidaktal epitel hücrelerinde eksprese edildiği bulunmuştur. Ayrıca, Wnt2b, Wnt4, Wnt5a ve Wnt5b ovidaktal epitelde ve/veya distal ve proksimal ovidaktların stromasında eksprese edilmiştir. Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a ve Wnt10b proteinlerinin fare ovidaktında eksprese edilmediği gözlenmiştir. Tamamen diferansiye fare ovidaktlarındaki farklı Wnt yolağı bileşenlerinin ekspresyon analizleri, bu yolağın puberte sonrası ovidaktal epitelyal homeostazda yer alabileceğini de teyit etmektedir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağının, yetişkinlikte sekretuar hücrelerin kendini-yenilemesi ve farklılaşmasını düzenleyerek, ovidakt epitel hücre homeostazının korunmasında rol oynadığı gösterilmiştir [38].

Postnatal gelişimin erken evrelerinde, Wnt sinyal aktivitesi esas olarak hem distal hem de proksimal ovidakt sekretuar hücrelerinde mevcut iken, epitel olgunlaşması ile Wnt sinyalizasyonu hem sekretuar hem de silli hücre tiplerinde belirgin şekilde gözlenmiştir. Spesifik olarak, olgun distal ovidakta Wnt sinyal aktivitesinin, silli hücrelerde sekretuar hücrelere göre daha belirgin olduğu belirtilmiştir. Aksine, proksimal ovidakta silli hücrelere göre daha fazla sekretuar hücrenin Wnt'ye cevap vermekte olduğu bulunmuştur [38].

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Dokuların Eldesi

Fallop tüpleri, Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği ve Cengiz Gökçek Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi'nden elde edilmiştir. Bu çalışma için Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı Değerlendirme Komisyonundan 26/12/2017 tarihinde 2017/423 karar no ile izin alınmıştır. Çalışmada, 28-42 yaş arasında 5 hastadan sekretuar fazda unilateral fallop tüpü dokuları alınmıştır (**Tablo 3.1**). Örneklerin alındığı hastalar, örnek alımından önce çalışma hakkında bilgilendirilip onayları alınmış ve onam formları araştırmacı tarafından imzalatılmıştır.

Tablo 3. 1: Hastalara ait bilgiler

Hastalar	Yaş	Operasyon Nedeni	Siklus Fazı
1. Hasta	28	Kontraseptif amaçlı salpenjektomi	Sekretuar faz
2. Hasta	42	Kontraseptif amaçlı salpenjektomi	Sekretuar faz
3. Hasta	38	Kontraseptif amaçlı salpenjektomi	Sekretuar faz
4. Hasta	41	Kontraseptif amaçlı salpenjektomi	Sekretuar faz
5. Hasta	28	Kontraseptif amaçlı salpenjektomi	Sekretuar faz

3.2. Örneklerin Hazırlanması

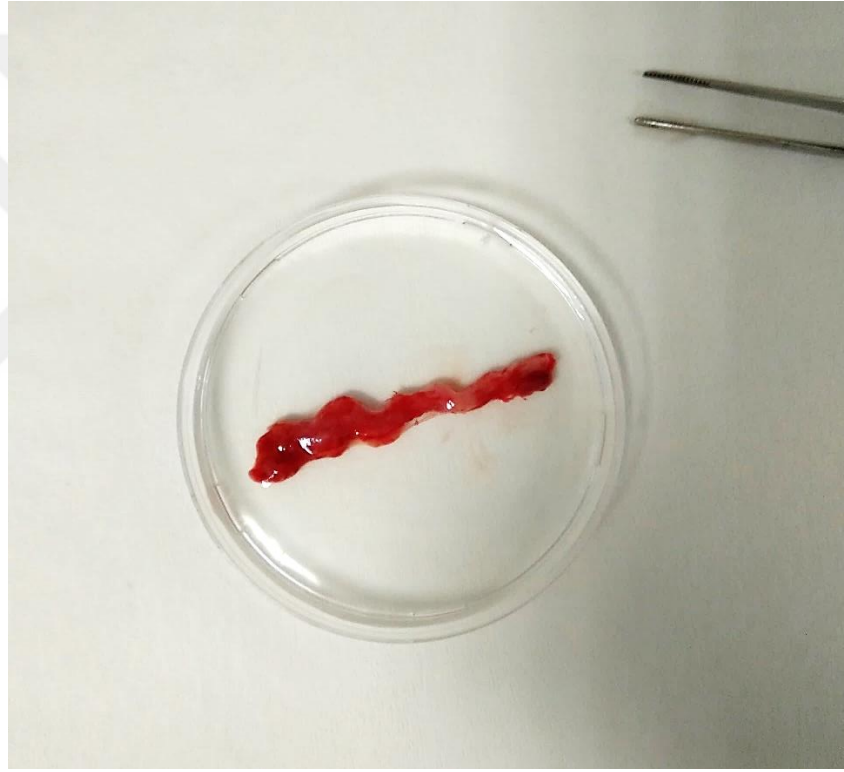
Çalışmada, kullanılan fallop tüpleri, reproduktif dönemdeki salpenjektomi hastalarından (n=5) elde edilmiştir. Anatomik olarak patolojilerden etkilenmeyen fallop tüpleri kullanılmıştır.

Her bir fallop tüpü 3 bölgeye ayrılmıştır.

1. Bölge: Distal bölge (istmus)

2. Bölge: Ampullar bölge (ampulla)
3. Bölge: Proksimal bölge (infundibulum ve fimbrialar)

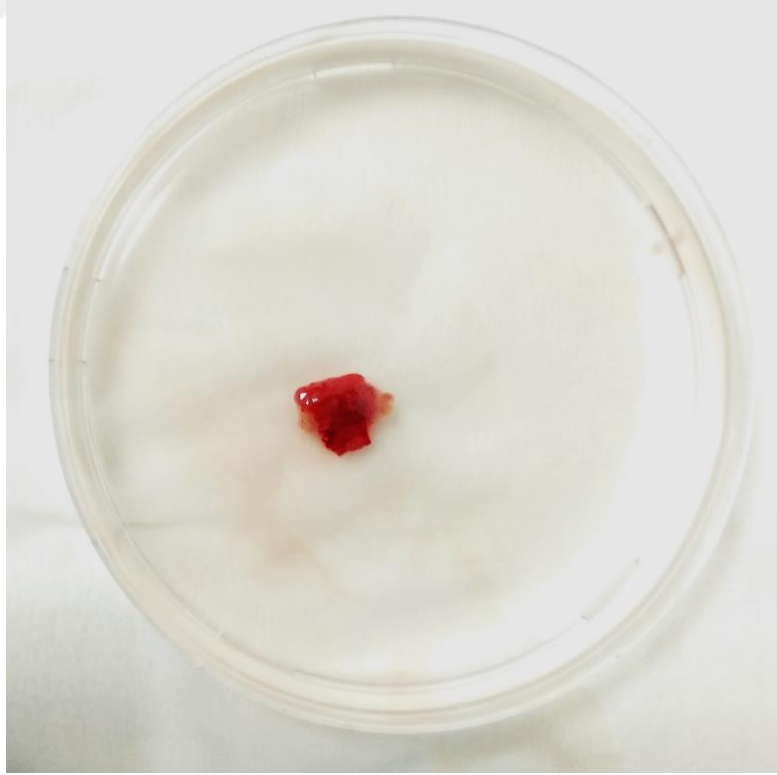
Elde edilen dokular, içerisinde soğuk PBS çözeltisi bulunan 15 mL falkon tüplere konularak çalışma yapılacak laboratuvara buz üzerinde taşınmıştır. Sonrasında fallop tüpleri buz üzerinde anatomik bölgelerine göre ayrılmıştır (**Resim 3.1, Resim 3.2, Resim 3.3, Resim 3.4**). Bu bölgeler ise ikiye bölünerek bir kısmı %10 formalin çözeltisine alınırken yaklaşık 20-30 mg'ı ise kanı uzaklaştırmak amacıyla soğuk PBS ile yıkandı. PBS ile yıkanan fallop tüpü dokuları -80 °C'de muhafaza edildi.



Resim 3. 1: Fallop tüpünün görünümü



Resim 3. 2: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpünün istmusunun görünümü



Resim 3. 3: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpünün ampullasının görünümü



Resim 3. 4: Bölgelerine göre ayrılan fallop tüpü fimbrialarının görünümü

3.3. Revers Transkripsiyon ve Gerçek-Zamanlı (Real-Time) PCR Çalışması

Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İDEAL laboratuvarında revers transkripsiyon ve real time PCR çalışmaları yapılmıştır. Her bir fallop tüpü bölgesi (yaklaşık 20 mg) 300 μ L lizis tamponu ile birlikte T25 digital ULTRA TURRAX (IKA) homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizasyonun ardından RNA izolasyon kiti, GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, LOT: 00720496) (**Tablo 3.2**) prosedürüne uygun şekilde RNA saflaştırma basamakları uygulandı.

Tablo 3. 2: RNA izolasyon kit içeriği (50 preparat için)

Bileşen	Hacim&Sayı
Lizis tamponu	40 mL
Yıkama Tamponu I	40 mL
Yıkama Tamponu II	23 mL
RNaz içermeyen su	30 mL
Proteinaz K	600 μ L
Saflaştırma kolonları (toplama tüpleri ile)	50 adet

Toplama Tüpleri (2 mL)	50 adet
Toplama Tüpleri (1,5 mL)	50 adet

3.3.1. Lizis tamponunun hazırlanması

Lizis tamponunun her 1 mL'si için, 20 µL 14,3 M β-merkaptoetanol eklendi.

3.3.2. Yıkama tamponu I ve II'nin hazırlanması

Yıkama tamponu I'in ilk hazırlanışı esnasında 10 mL %96-100'lük etanol ve yıkama tamponu II'nin ilk hazırlanışı esnasında 39 mL %96-100'lük etanol, tampon çözeltileri üzerine eklendi.

3.3.3. Proteinaz K'nin hazırlanması

Her bir RNA izolasyon işlemi için, 10 µL proteinaz K 590 µL Tris-EDTA (10 mM Tris HCl, pH=8,0, 1 mM EDTA) tamponunda çözündürülerek kullanıldı.

3.3.4. Doku homojenizasyon protokolü ve proteinaz K uygulanması

1. Doku parçaları 2 mL'lik yuvarlak tabanlı tüplere alındı.
2. Doku parçasının üzerine 300 µL soğuk lizis tamponu eklendi.
3. İçerisinde doku ve lizis tamponu bulunan tüp buz içerisinde iken homojenizatör probu tüpün içine girecek şekilde homojenizatör yüksekliği ayarlandı.
4. Homojenizatörün maksimum hızında 30'ar saniyelik üç tekrar ile homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi.
5. Homojenat üzerine 600 µL proteinaz K çözeltisi eklendi. Karışıma pipetaj yapıldıktan sonra 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Lizat oda sıcaklığında yaklaşık 11.5000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant başka bir tüpe aktarıldı.

3.3.5. Dokudan saflaştırma kolonu kullanılarak RNA izolasyon protokolü

1. Süpernatanta 450 µL %96-100 etanol eklendi.
2. Etanol eklenmesinin ardından oluşabilecek görünür çökeltilerin dağılması için tüp çalkalandı.
3. Saflaştırma kolonuna örneğin 700 µL'si aktarıldı.

4. Oda sıcaklığında 12.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve saflaştırma kolonu aynı toplama tüpü içerisine yeniden takıldı.
5. Tüm örnek işlenene kadar adım 3 ve 4 tekrarlandı.
6. Saflaştırma kolonu yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne takıldı. Kolon üzerine 700 µL yıkama tamponu I eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı.
7. Saflaştırma kolonuna, 600 µL yıkama tamponu II eklendi. 1 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve saflaştırma kolonu aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
8. Saflaştırma kolonuna, 250 µL yıkama tamponu II eklendi. 2 dakika boyunca 12.000 g'de santrifüj edildi. Toplama tüpünde biriken sıvı uzaklaştırıldı ve saflaştırma kolonu aynı toplama tüpüne yerleştirildi.
9. Tutunmuş RNA ve membranı kurutmak için 1 dakika boyunca maksimum hızda saflaştırma kolonu santrifüjlendi. 2 mL'lik toplama tüpü atıldı ve saflaştırma kolonu 1,5 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirildi.
10. 25 µL RNaz-içermeyen su saflaştırma kolonunun merkezine eklendi. Saflaştırma kolonu oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 12.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. 25 µL RNaz içermeyen su saflaştırma kolonunun merkezine eklendi. Saflaştırma kolonu 1 dakika 12.000 g'de santrifüj edildi.

3.3.6. RNA ölçümü

Toplama tüpüne aktarılmış olan RNA'nın miktar ve kalitesini belirlemek için spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Multiskan® GO (Thermo Scientific) mikro-hacim spektrofotometrede izole edilen RNA'ların saflık derecesi ve konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.



Resim 3. 5: Mikro-hacim spektrofotometre cihazında ölçüm için kullanılan plate ve mikro-hacim spektrofotometre cihazı

3.3.7. RNA'dan komplementer DNA eldesi

İzole edilen RNA'nın komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesi için High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fischer Scientific, LOT: 00709629) kullanıldı. İşlemler kit protokolünün önerdiği şekilde uygulandı.

3.3.7.1. Revers transkripsiyon kit protokolü

1. Buz üzerinde kalıp RNA ve kit bileşenleri çözündürüldü.
2. Tablo 3.3'e göre revers transkripsiyon ana karışımı buz üzerinde hazırlandı.

Tablo 3. 3: Revers transkripsiyon ana karışımı içeriği

Bileşen	Hacim (µl)
10x RT tamponu	2
25x dNTP karışımı (100 mM)	0,8
10x RT random primerleri	2
MultiScribe™ Revers Transkriptaz	1
Nükleaz içermeyen su	4,2
Total Hacim	10

3. Tek bir reaksiyon için hacim 20 µL'ye ayarlandı. 10 µL RT ana karışımının üzerine 10 µL RNA örneği eklendi. Karıştırmak için iki defa aşağı yukarı pipetaj yapıldı ve tüpün kapağı kapatıldı.
4. Hava kabarcıklarını yok etmek ve içeriği döndürmek için tüp kısaca santrifjlendi.

5. Tablo 3.4'e göre termal döngüleyici protokolü uygulandı.

Tablo 3. 4: Revers-Transkripsiyon işlemini gerçekleştirmek için termal döngüleyici protokolü

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

6. Elde edilen cDNA'lar qPCR işlemine kadar -20°C'de saklandı.

3.3.8. Primer tasarımı

Çalışmada kullanılacak Wnt primerlerini tasarlamak için *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından yararlanıldı. Wnt genlerinin mRNA dizi bilgileri NCBI veri tabanının, "Nucleotide" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ara yüzü kullanılarak elde edildi. Primer tasarımı için "Primer 3" (<http://primer3.ut.ee/>) veri tabanı kullanıldı. Tasarlanan primerler "Primer Blast" (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) veri tabanı aracılığıyla kontrol edildi. Referans gen olarak β -actin (ACTB) geni kullanıldı.

Tablo 3. 5: Kullanılan Wnt genleri ve ACTB geninin primer dizi bilgileri

Gen	Erişim Numarası		Dizi	Uzunluk	Amplikon
Wnt1	NM_005430	L	CGGCGTTTATCTTCGCTATC	20 baz	244 bç
		R	GCCTCGTTGTTGTGAAGGTT	20 baz	
Wnt2	NM_003391	L	GCAGATTCCTCGACTACTTCG	20 baz	150 bç
		R	GCAGATTCCTCGACTACTTCG	20 baz	
Wnt3	NM_030753	L	ACGAGAACTCCCCCAACTTT	20 baz	225 bç
		R	GCACGTCGTAGATGCGAATA	20 baz	
Wnt3a	NM_033131	L	CAAGATTGGCATCCAGGAGT	20 baz	173 bç
		R	ATGAGCGTGTCCTGCAAAG	20 baz	
Wnt8a	NM_001300938 (Varyant 1)	L	TGCAAGTTCCAGTTTGCTTG	20 baz 20 baz	200 bç
	NM_001300939 (Varyant 2)				
	NM_058244 (Varyant 3)	R	CCATTGTTTGACCCATCACA		
Wnt8b	NM_003393	L	CCATGAACCTGCACAACAAC	20 baz	174 bç

		R	TGAGTGCTGCGTGGTACTTC	20 baz	
Wnt10a	NM_025216	L	ATGCCAACACAGTGTGCCTA	20 baz	
		R	GGATCTTGTGCGAGTCTCC	20 baz	183 bç
Wnt10b	NM_003394	L	AAGTGTCATGGCACATCAGG	20 baz	
		R	GGGTCTCGCTCACAGAAGTC	20 baz	224 bç
ACTB	NM_001101	L	AGAAAATCTGGCACCACACC	20 baz	
		R	TAGCACAGCCTGGATAGCAA	20 baz	173 bç

3.3.9. Kantitatif PCR işlemi

qPCR reaksiyonu, DNA bağlayan boyaların kullanımı ile amplifikasyonun eş zamanlı olarak takibine olanak sağlamaktadır. Bu amaçla; Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a, Wnt10b ve ACTB ekspresyon analizi için Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (**Tablo 3.6**) (Thermo Scientific, LOT: 00657897) kullanıldı.

Tablo 3. 6: qPCR kit bileşenleri

Bileşen	Hacim
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix	2x1,25 mL
Nükleaz içermeyen su	2x1,25 mL

3.3.9.1. qPCR ön karışımının hazırlanması

1. Ana karışım hazırlanırken kullanılacak tüm bileşenlerin buz üzerinde erimesi beklenildi. Çözülmeden sonra bileşenler kısaca santrifüjlendi.
2. qPCR işlemi için cDNA hariç Tablo 3.7’de verilen bileşenler eklenerek, reaksiyon ana karışımı hazırlandı.

Tablo 3. 7: Wnt genleri ve ACTB geninin ekspresyon düzeyinin ölçüleceği qPCR reaksiyon karışımının içerikleri

Bileşen	Hacim (µl)
SYBR green	12,5
Forward primer (10 µM)	1
Reverse primer (10 µM)	1
RNaz/DNaz içermeyen su	9,5
Total	24

Hazırlanan karışım 24 µl olacak şekilde uygun tüpe aktarıldı ve her örneğe ait 1 µl cDNA, qPCR ön karışımı içeren tüplere eklendi. Bileşenler buz üzerinde yavaşça karıştırıldı ve Rotor Gene Q (QIAGEN) (Resim 3.6) cihazına yüklendi. Bilgisayarda uygun reaksiyon koşulları ayarlanarak (Tablo 3.8) cihaz çalıştırıldı.



Resim 3. 6: Kantitatif PCR cihazı ve ölçümlerin yapıldığı bilgisayar sistemi

Tablo 3. 8: qPCR işlemini gerçekleştirmek için cihaz protokolü

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	10 dakika	1
Denatürasyon	95	15 saniye	1
Bağlanma	60	30 saniye	40
Uzama	72	30 saniye	

3.4. Histopatolojik İnceleme

3.4.1. Işık mikroskobu için dokuların hazırlanması

Işık mikroskobu çalışmalarının yapılacağı zamana kadar fallop tüpü dokuları %10'luk formaldehit çözeltisi içinde fikse edildi. Fikse olup sertleşen fallop tüpü dokularının, istmus ve ampulla kısımları orta segmentlerinden enine olacak şekilde, infundibulum/fimbria kısımları ise uzunlamasına kesilerek uygun boyutlara getirildi. Kasetler kodlandıktan sonra parçalar kasetlere alındı. Doku takibi işlemleri Leica TP 1010 doku takip cihazı kullanarak gerçekleştirildi (**Tablo 3.9**). Cihazdan alınan dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 3. 9: Doku takibi cihazının protokolü

İşlem&Kimyasal	Süresi
Akar su	1 gece
%60' lık Alkol	1 saat
%70' lik Alkol	1 saat
%80' lik Alkol	1 saat
%96' lık Alkol	1 saat
%100' lük Alkol	1 saat
Ksilen I	1 saat
Ksilen II	1 saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat
Gömme	

3.4.2. Kesitlerin alınması ve boyanması

Leica RM 2245 mikrotomunda parafin bloklardan 4-5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 1 gece etüvde bekletildikten sonra Mayer's Hematoksilen – Eozin (H-E) (**Tablo 3.10**) boyama yöntemi uygulandı.

Tablo 3. 10: H-E protokolü

İşlem&Kimyasal	Süresi
Ksilen	30 dk - 1 saat
Azalan alkol serileri (%100, %90, %80, %70)	5 dakika
Distile su	3 dakika
Hematoksilen	20 dakika
Akar çeşme suyu	15 dakika
Asit - Alkol	1-2 kere batır çıkar
Çeşme suyu	Çalkala
Akar çeşme suyu	15 dakika
Distile su	2 dakika
Eozin	7 saniye
Distile su	Çalkala
Artan alkol serileri (%90, %96, %100)	2 dakika
Ksilen	1 saat
Kapatma	

3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Fallop tüpü dokusunun farklı bölgelerinde eksprese edilen Wnt3a ligandlarını göstermek için bloklanmış dokulardan Leica RM 2245 (Almanya) mikrotomunda 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler pozitif şarjlı lamlara yerleştirildi ve 60°C etüvde bir gece bekletildi. İmmünohistokimyasal incelemenin diğer basamakları şu şekilde uygulanmıştır:

1. Lamlar 2x30 dk ksilende bekletildikten sonra azalan alkol serilerinden geçirildi.
2. Antijen kurtarma aşaması için lamlar %10 sitratlı tampon çözeltisi ile 700 watta 7 dk ve 400 watta 7 dk olmak üzere 2 defa kaynatıldı.
3. Tüm lamlar aynı solüsyon içerisinde 15 dk soğutuldu.
4. Dokular 3x2 dk PBS ile yıkandı.
5. Dokuların etrafı PAP Pen ile çerçevelendi.
6. Dokuların üzerine, %3 Hidrojen Peroksit (H₂O₂) çözeltisi damlatılarak 20 dk bekletildi.

7. 3x2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
8. Dokular 4 dk protein blokta bırakıldı.
9. Dokular 1/500 oranında dilüe edilmiş primer Wnt3a antikoruyla (WNT3A Polyclonal Antibody, PA5-78612, LOT: TL2681092F) 2,5 saat sıcak su dolu küvette inkübe edildi.
10. 3x2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
11. Dokulara 20 dk biyotinlenmiş sekonder antikor uygulaması yapıldı.
12. 3x2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
13. 15 dk 100 µL streptavidine maruz bırakıldı.
14. 3x2 dk PBS ile yıkama yapıldı.
15. Dokular 5-10 dk (ortalama 5 dk) 100 µL DAB kromojen (kahverengi renk görülene kadar) ile boyandı.
16. Lamlar musluk suyunda yıkandı ve 10 saniye Mayers Hematoksilen ile boyandı.
17. Lamlar tekrar musluk suyu ile yıkandı, derecesi artan alkol serilerinden geçirildi ve ksilende bırakılıp kapama işlemleri yapıldı.

Antikor için negatif ve pozitif kontrol boyaması da yapıldı. Wnt3a antikoru için pozitif kontrol dokusu olarak prostat dokusu, negatif kontrol olarak ise PBS çözeltisi kullanılmıştır.

Tüm gruplara ait hastaların fallop tüpü doku kesitlerinde Wnt3a proteinleri, Leica DM 750 marka ışık mikroskopunda 200× ve 400x büyütmelerde görsel olarak değerlendirilmiştir.

3.6. İstatistiksel Analizler

Sayısal değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shaphiro Wilk testi ile test edilmiştir. Normal dağılmayan değişkenlerin 3 grupta karşılaştırılmasında Kruskall Wallis ve All pairwise testleri kullanılmıştır. Bağımlı ölçümler arasındaki ilişkiler Friedman iki yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Analizlerde SPSS 22.0 Windows versiyon paket programı kullanılmıştır. $P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a ve Wnt10b genlerinin ölçüm değerleri ACTB geni ile normalize edildi. Referans olarak alınan ACTB geni farklı koşullar altında ekspresyon düzeyi değişmeyen, her doku ya da hücrede bazal düzeyde ve hücreler arası varyasyon göstermeden eksprese edilen bir gendir.

qRT-PCR sonuçlarında ilgili genin referans gene göre kıyaslanması yapılırken $2^{-\Delta Ct}$ değeri kullanılmıştır. Bu değer incelenen genin referans gene göre ekspresyon düzeyinin hangi oranda değiştiğini göstererek göreceli ekspresyon bilgisinin elde edilmesini sağlar. $2^{-\Delta Ct}$ değeri şu şekilde hesaplanmıştır: $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(\text{Gen Ct} - \text{Referans Ct})}$

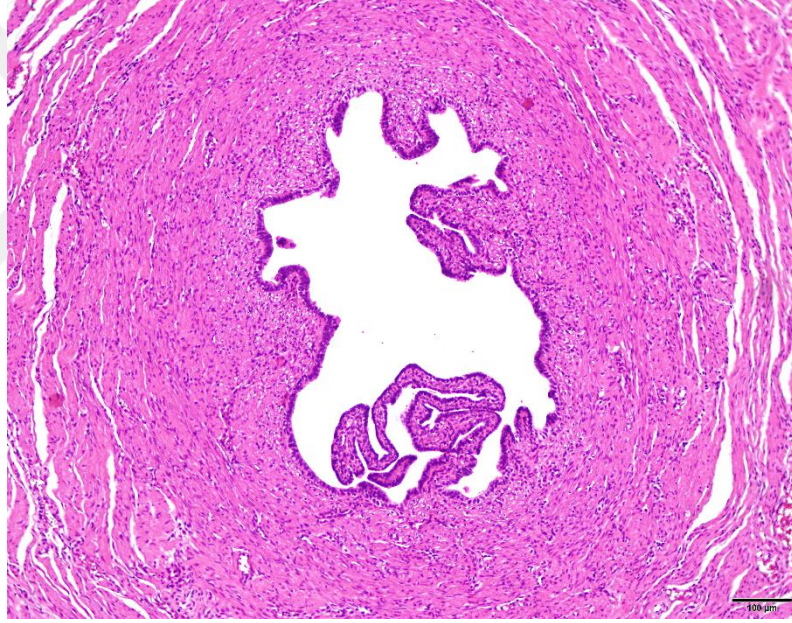


4. BULGULAR

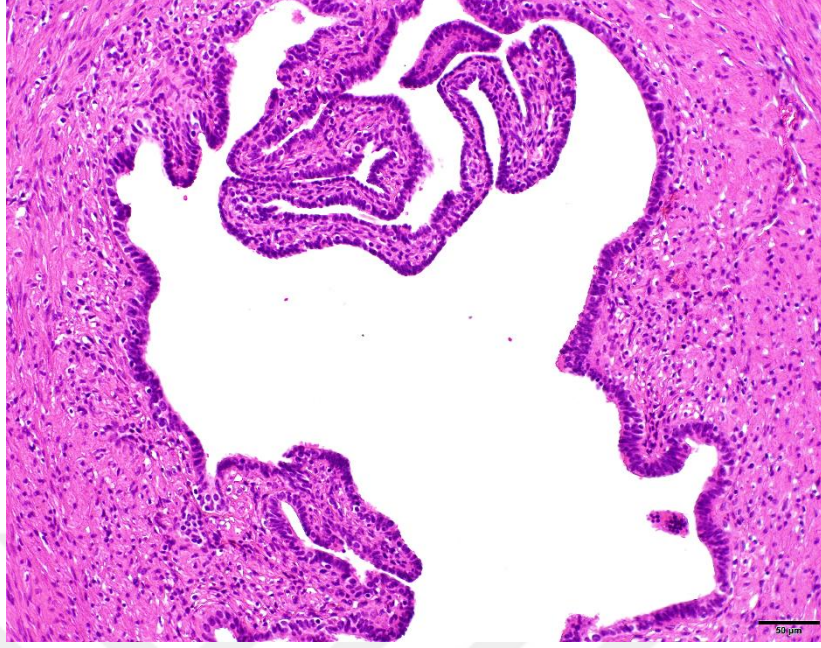
4.1. Işık Mikroskobu Bulguları

Çalışmada kullanılan fallop tüpü dokularının farklı anatomik bölgelerinin histolojik yapılarını değerlendirmek için H-E boyama yöntemi kullanılmıştır (**Resim 4.1, Resim 4.2, Resim 4.4, Resim 4.5, Resim 4.7, Resim 4.8**).

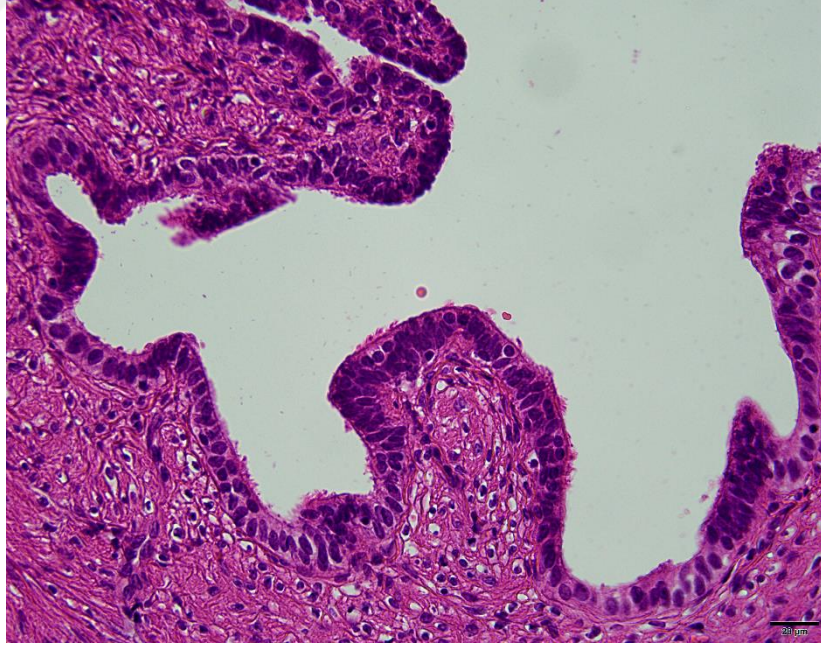
Bu yöntem ile fallop tüpünün farklı bölgelerinde, sekretuar fazda gözlenen histolojik değişiklikler incelenmiştir. Tüp mukozası incelendiğinde epitel genellikle tek katlı bir görünüme sahiptir. Progesteron etkisiyle sil miktarı ile birlikte hücre yüzey aktivitesi azalmıştır. Sil içermeyen hücrelerin hafif kubbeli görünümü bu bulguyu desteklemektedir (**Resim 4.3, Resim 4.6, Resim 4.9**).



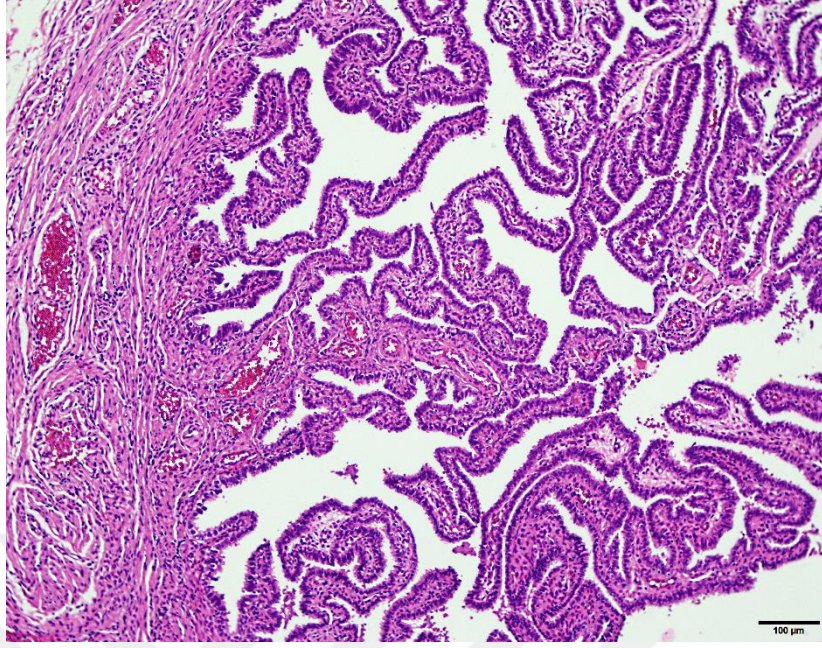
Resim 4. 1: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x100)



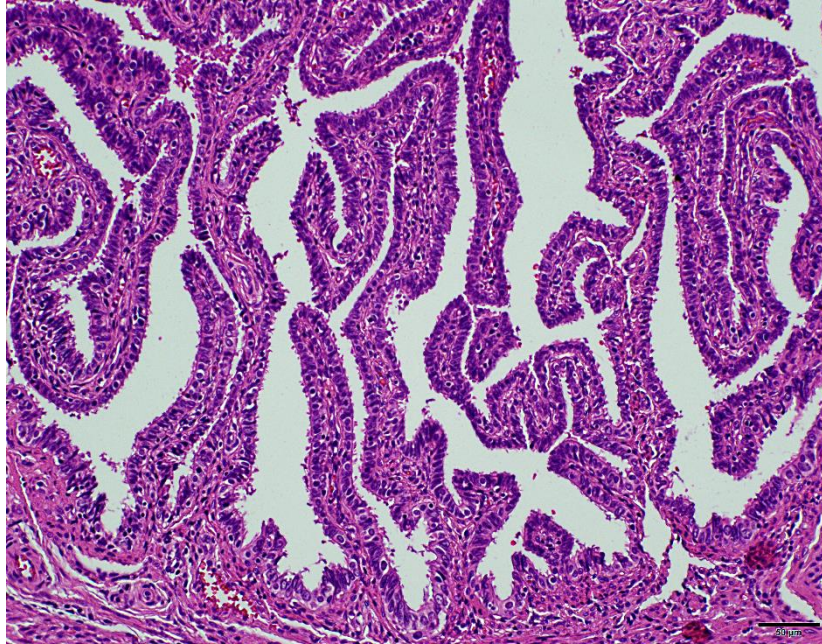
Resim 4. 2: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x200)



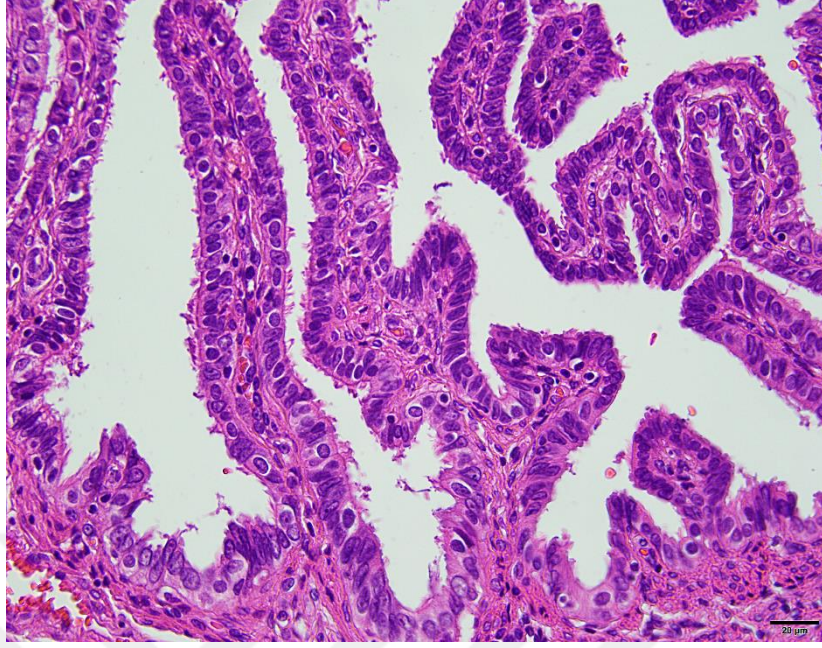
Resim 4. 3: Fallop tüpü istmus bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x400)



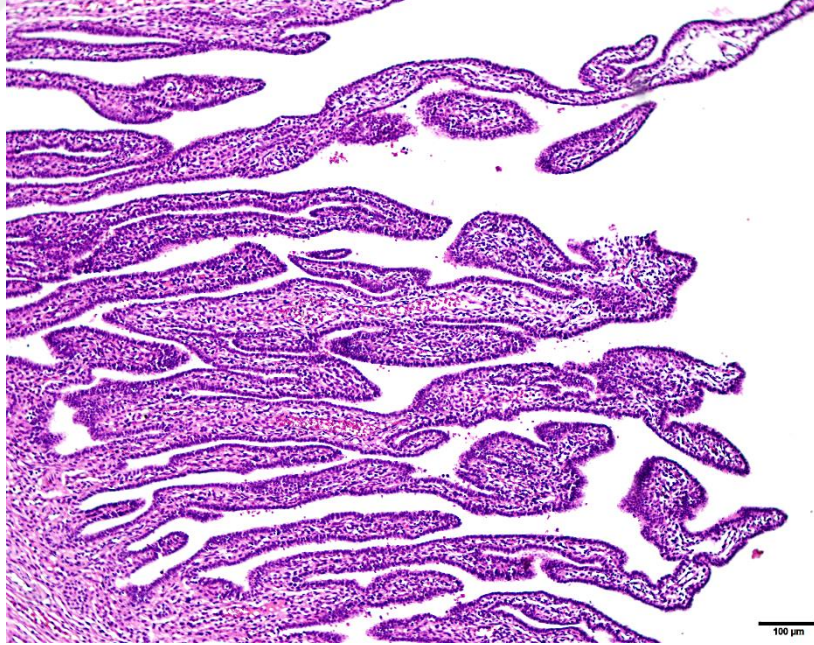
Resim 4. 4: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x100)



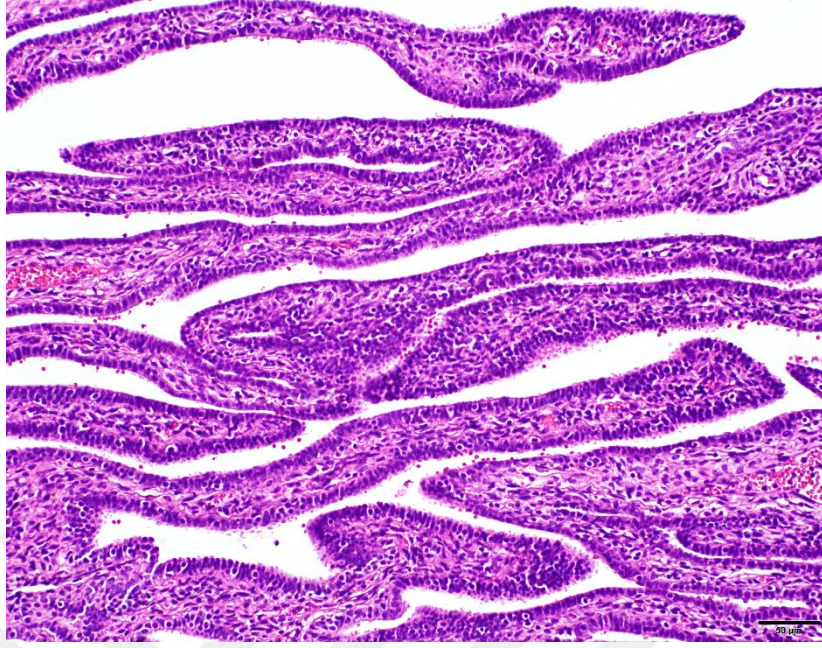
Resim 4. 5: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x200)



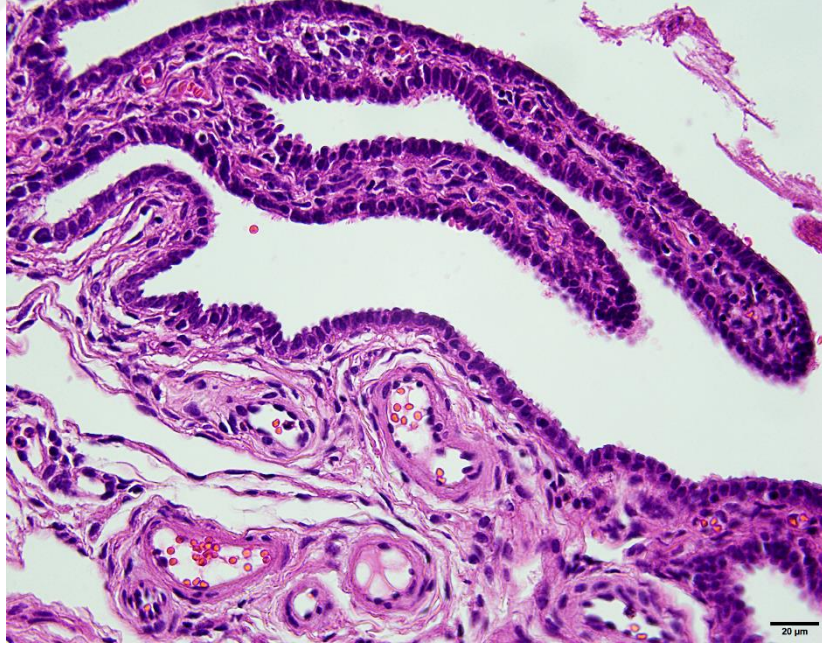
Resim 4. 6: Fallop tüpü ampulla bölgesinin normal histolojik görünümü (H-E, x400)



Resim 4. 7: Fallop tüpü fimbrialarının normal histolojik görünümü (H-E, x100)



Resim 4. 8: Fallop tüpü fimbrialarının normal histolojik görünümü (H-E, x200)



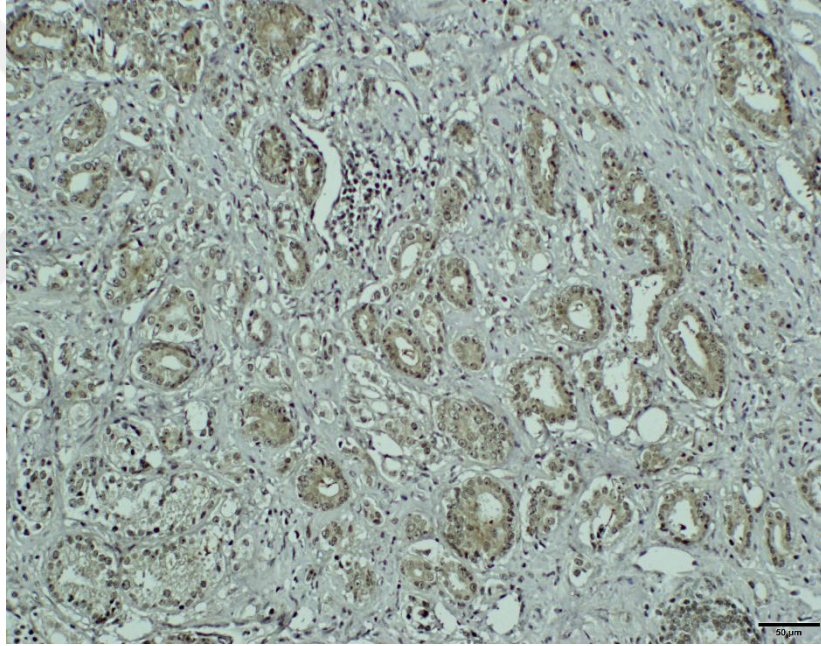
Resim 4. 9: Fallop tüpünün fimbiralarının normal histolojik görünümü (H-E, x400)

4.2. İmmünohistokimya Bulguları

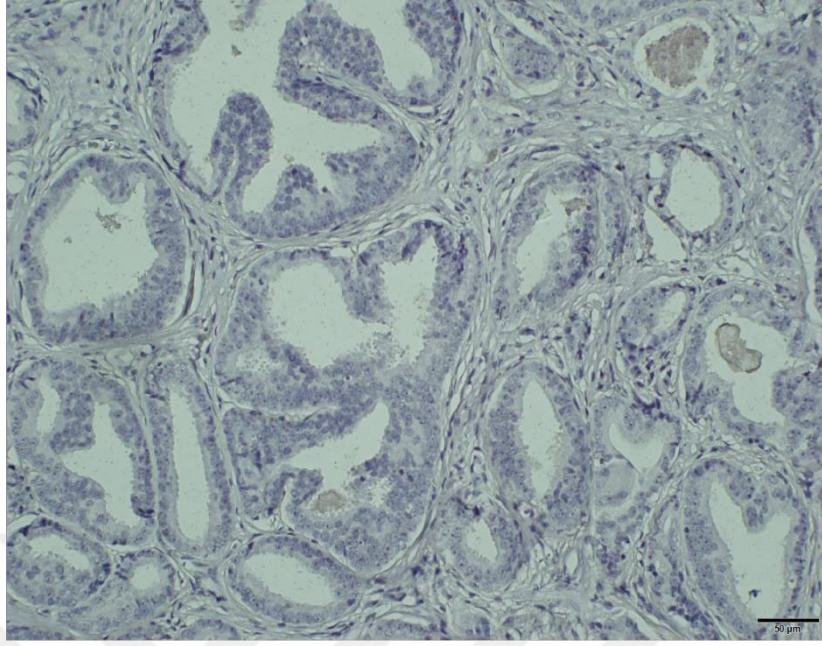
İmmünohistokimyasal incelemede Wnt3a antikorunun pozitif kontrol dokusu olarak prostat kullanıldı (**Resim 4.10**). Antikorun negatif kontrol boyaması için PBS kullanıldı (**Resim 4.11**). Sonuçlar görsel olarak değerlendirildi.

Wnt3a proteininin fallop tüpünün özellikle mukozasında lokalize olduğu gözlenmiştir. Tüp duvarının diğer kısımları olan muskularis tabakası ve seroza kısımlarında ise Wnt3a için boyanmanın daha az olduğu saptanmıştır (**Resim 4.12, Resim 4.14, Resim 4.16**).

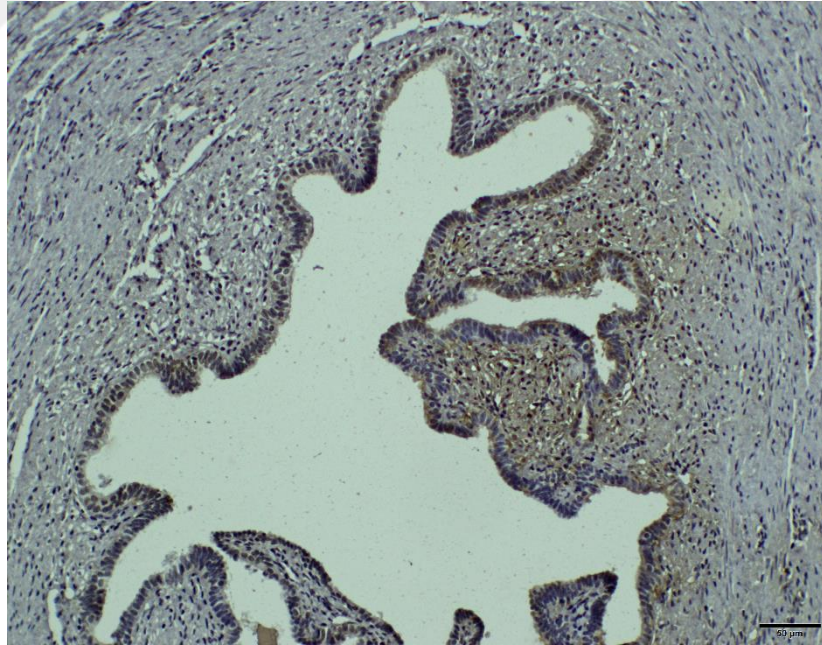
Tubal plikalar ile fimbrial uzantıların epitel ve lamina propriasında Wnt3a proteinlerinin yoğun olarak bulunduğu görülmüştür (**Resim 4.13, Resim 4.15, Resim 4.17**).



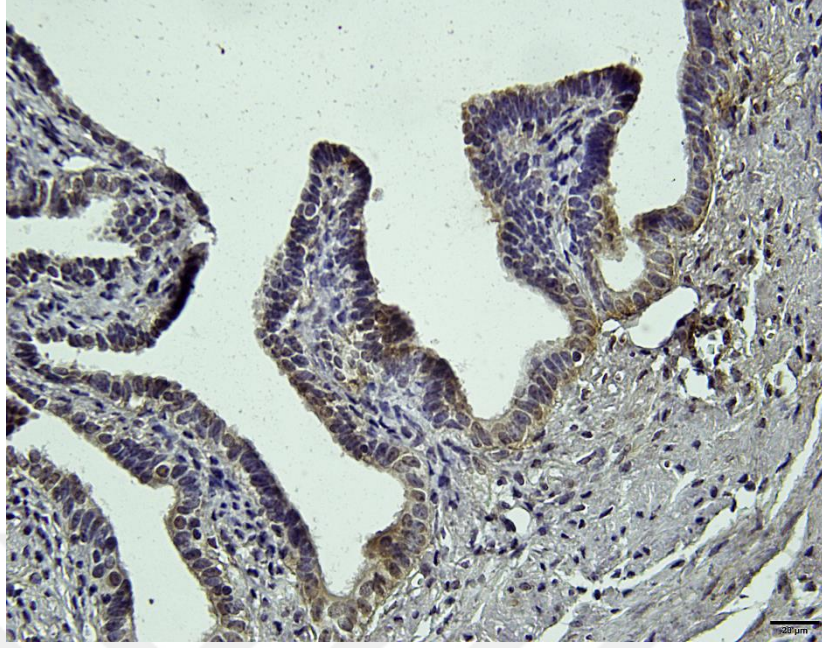
Resim 4. 10: Wnt3a antikorunun pozitif kontrol boyaması (prostat, x200)



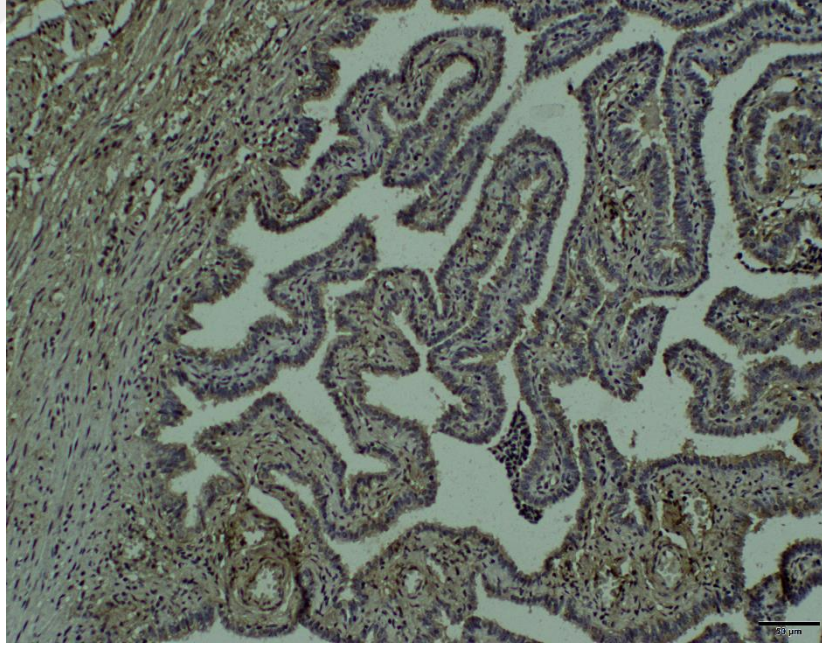
Resim 4. 11: Prostat dokusunda negatif kontrol boyaması (x200)



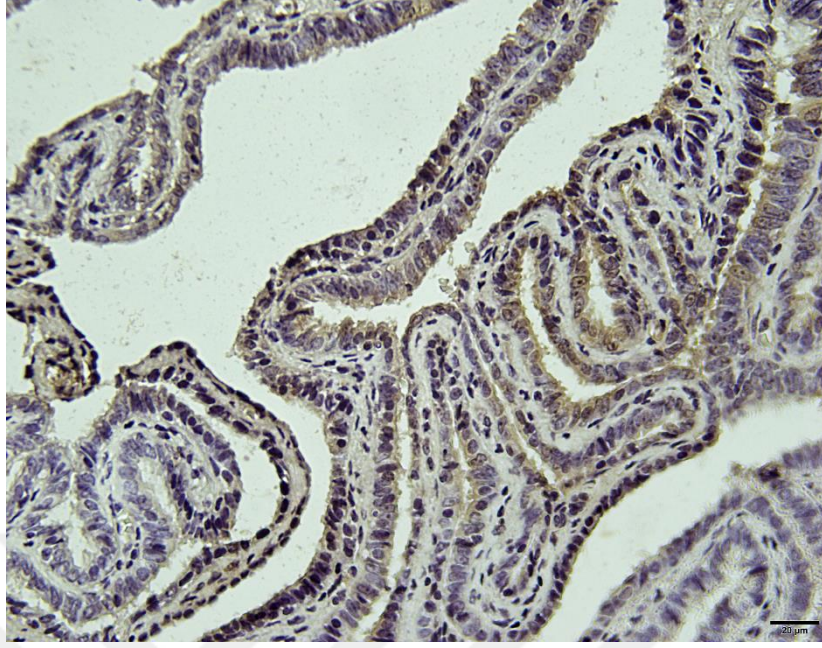
Resim 4. 12: Fallop tüpünün istmus bölgesi (Wnt3a, x200)



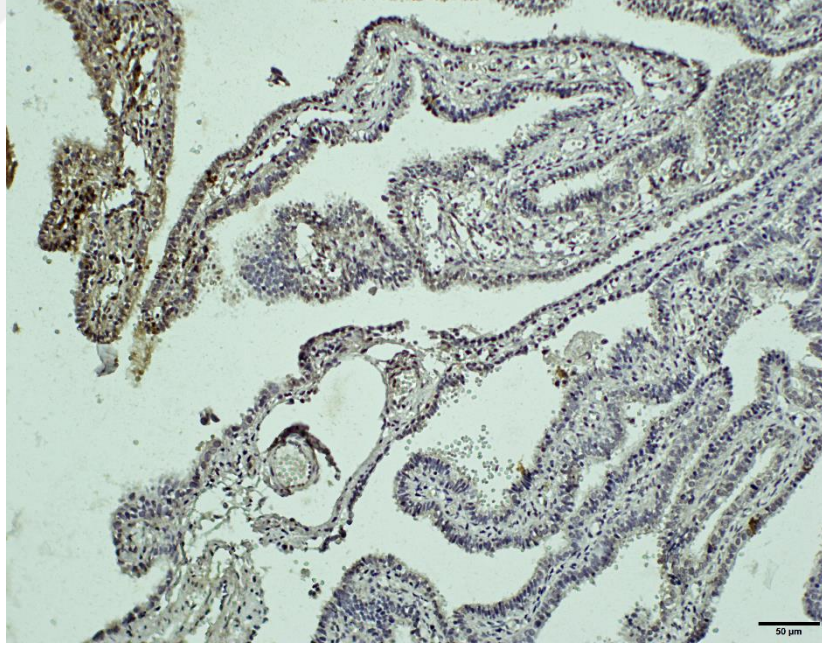
Resim 4. 13: Fallop tüpünün istmus bölgesi (Wnt3a, x400)



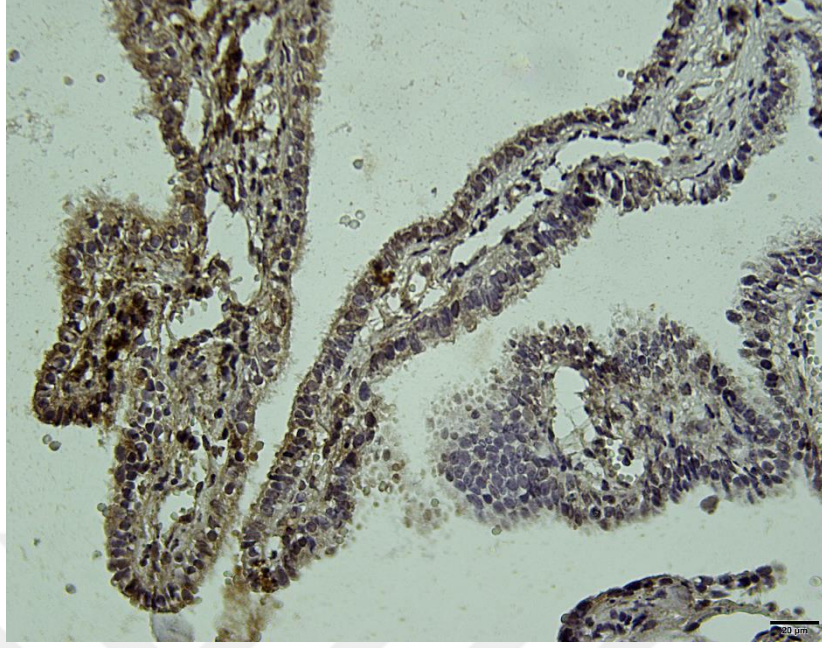
Resim 4. 14: Fallop tüpünün ampulla bölgesi (Wnt3a, x200)



Resim 4. 15: Fallop tüpünün ampulla bölgesi (Wnt3a, x400)



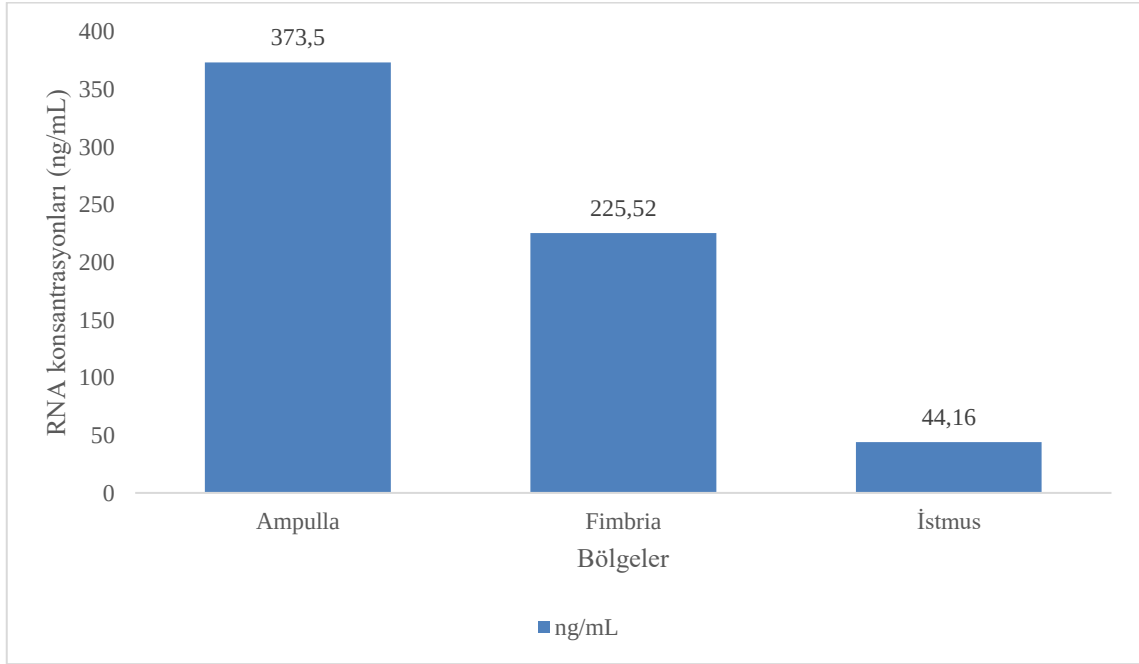
Resim 4. 16: Fallop tüpü fimbriaları (Wnt3a, x200)



Resim 4. 17: Fallop tüpü fimbriaları (Wnt3a, x400)

4.3. RNA Spektrofotometrik Ölçüm Bulguları

Çalışmaya dahil edilen 5 hastanın operasyon sırasında çıkarılan unilateral fallop tüpü dokularında RNA izolasyonu işleminin ardından yapılan konsantrasyon ölçümleri değerlendirilmiştir. Özellikle istmus bölgesinde konsantrasyonların diğer bölgelere oranla daha düşük olduğu görülmüştür (**Şekil 4.1**).



Şekil 4. 1: Bölgeler arası RNA konsantrasyon ortalamalarının karşılaştırılması

İstmus ve ampulla bölgelerinde, yapılan spektrofotometrik ölçümün ardından total RNA konsantrasyonları değerlendirildiğinde, ampulla bölgesinden elde edilen RNA'nın konsantrasyonu istmus bölgesine göre anlamlı derecede yüksektir (**Tablo 4.1**) ($p=0,44$).

Tablo 4. 1: RNA konsantrasyonları için bölgeler arasındaki p değerleri

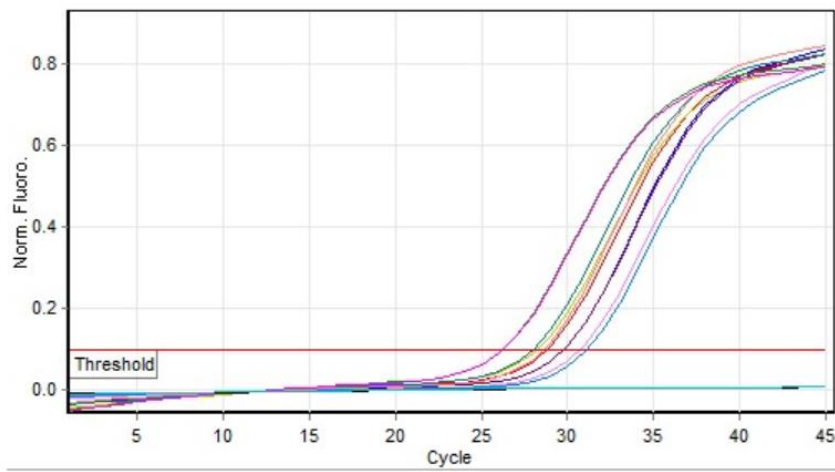
Örnek 1 – Örnek 2	p
İstmus – Fimbria	0,12
İstmus – Ampulla	0,013*
Fimbria – Ampulla	0,358

4.4. Revers Transkriptaz Kantitatif PCR Bulguları

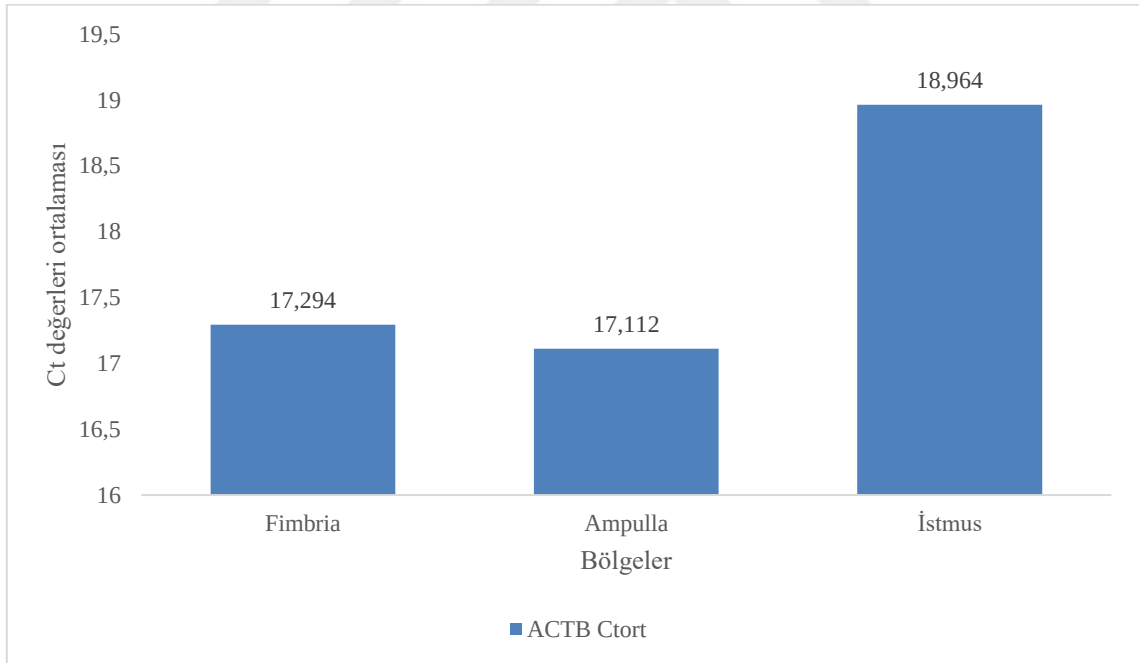
Çalışmaya dahil edilen 5 hastanın operasyon sırasında çıkarılan unilateral fallop tüpü dokularında, referans gen olan ACTB ile birlikte (**Şekil 4.2, Şekil 4.3**) Wnt1, Wnt2,

Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a ve Wnt10b genlerinin ekspresyon düzeyleri çalışılmıştır.

Quantitation data for Cycling A.Green

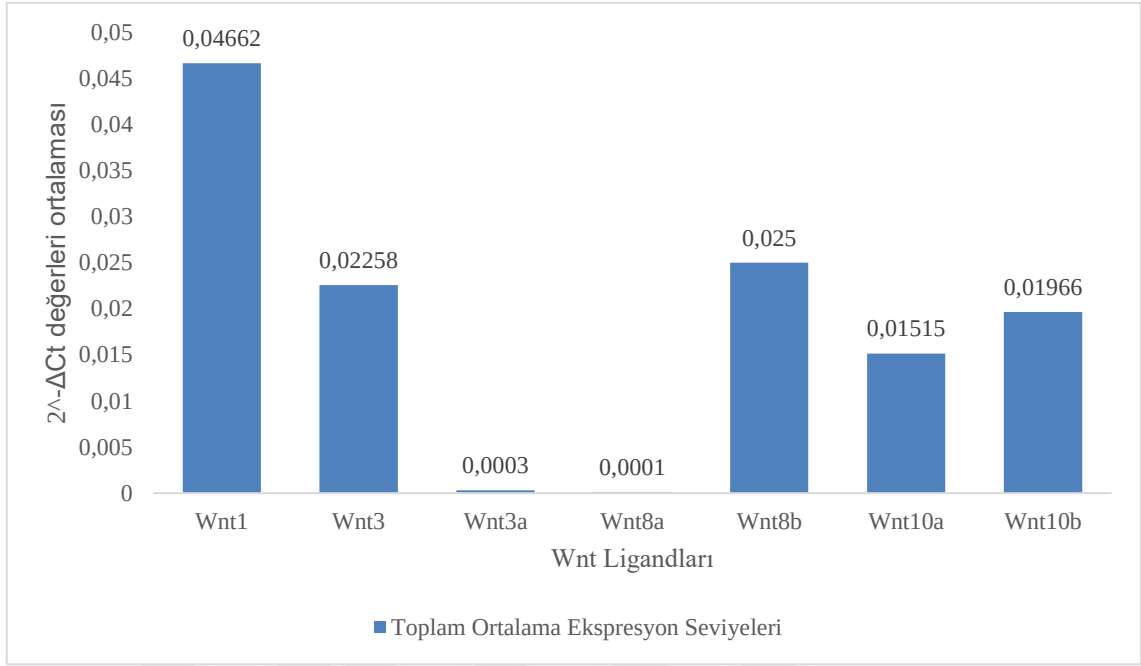


Şekil 4. 2: İlk 10 örnek için ACTB geninin ekspresyon grafiği



Şekil 4. 3: Bölgeler arası ACTB Ct değerleri ortalamalarının karşılaştırılması

Wnt genlerinin ekspresyon seviyesini gösteren Ct değerlerinin formülle standardize edildiği $2^{-\Delta Ct}$ değerleri üzerinden çalışıldı (Şekil 4.4, Tablo 4.2). Sekretuar fazda, insan fallop tüplerinde Wnt2 ekspresyonu saptanamamıştır.



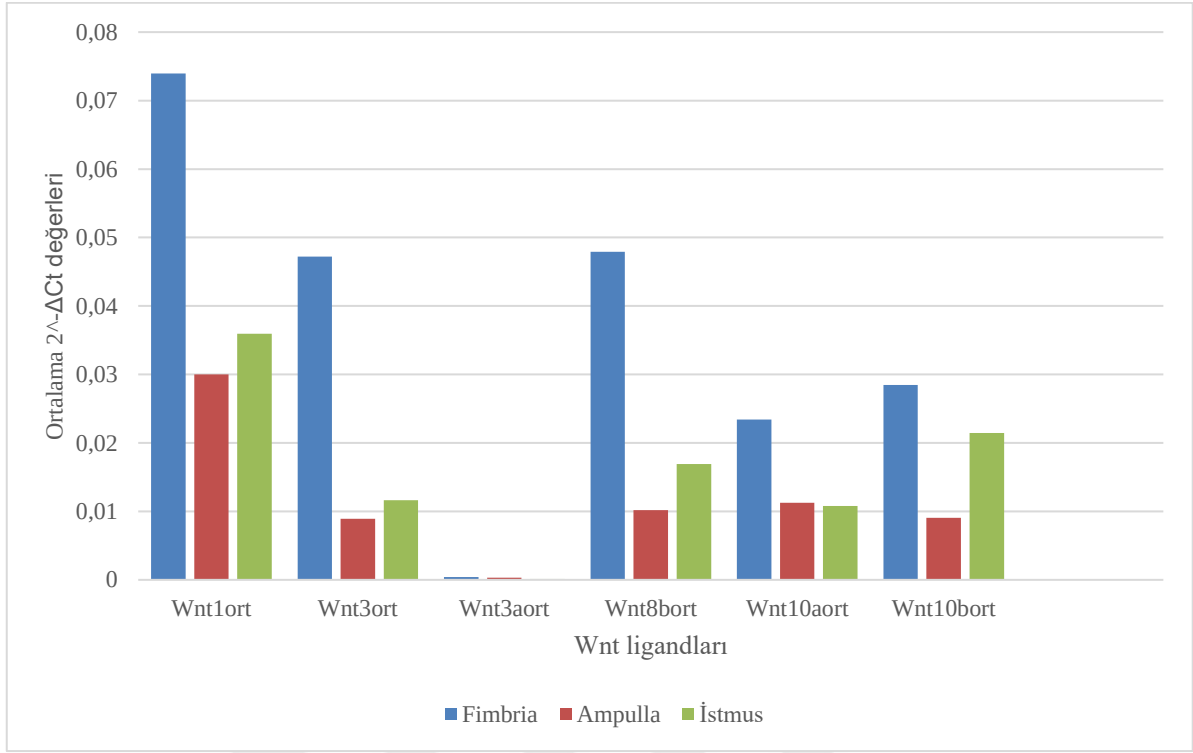
Şekil 4. 4: Wnt ligandlarının tüm bölgelerde toplam ekspresyon seviyelerinin ortalamasını gösteren grafik

Wnt8a ekspresyonu sekretuar fazda fallop tüplerinin farklı bölgelerinde saptanmıştır. Ancak çok düşük miktarlarda ekspresyonu, bölgeler arasında ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç alınması için yeterli olmamıştır.

Tablo 4. 2: Wnt ligandlarının fallop tüpünün farklı bölgelerinde $2^{-\Delta C_t}$ değerleri ortalamaları ve standart sapmaları

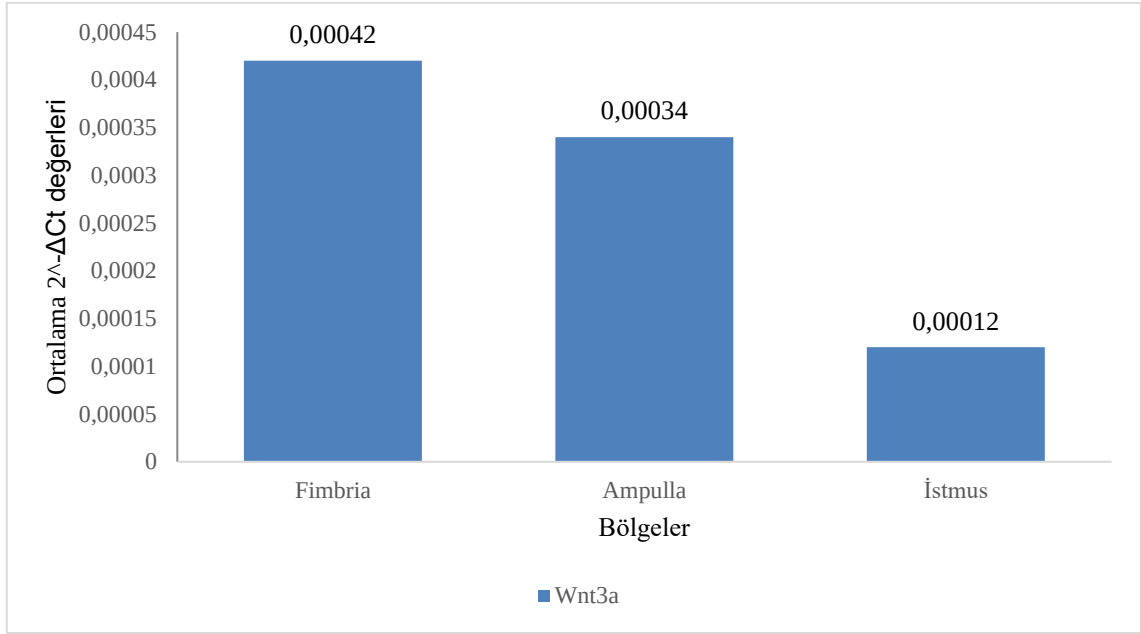
Ligandlar	Bölgeler	Ortalama $\pm$ Standart Sapma	P Değeri
Wnt1	Ampulla	0,02999 $\pm$ 0,0598	0,932
	Fimbria	0,07394 $\pm$ 0,15782	
	İstmus	0,03593 $\pm$ 0,05176	
Wnt3	Ampulla	0,00892 $\pm$ 0,01508	0,961
	Fimbria	0,04721 $\pm$ 0,10139	
	İstmus	0,01162 $\pm$ 0,01708	
Wnt3a	Ampulla	0,00034 $\pm$ 0,00027	0,034*

	Fimbria	$0,00042 \pm 0,00013$	
	İstmus	$0,00012 \pm 0,00003$	
Wnt8b	Ampulla	$0,01018 \pm 0,01531$	0,932
	Fimbria	$0,04789 \pm 0,10247$	
	İstmus	$0,01693 \pm 0,02483$	
Wnt10a	Ampulla	$0,01127 \pm 0,02051$	0,914
	Fimbria	$0,02341 \pm 0,04948$	
	İstmus	$0,01077 \pm 0,01501$	
Wnt10b	Ampulla	$0,00904 \pm 0,01199$	0,827
	Fimbria	$0,02846 \pm 0,06043$	
	İstmus	$0,02147 \pm 0,03488$	



Şekil 4. 5: Wnt genleri için bölgeler arası karşılaştırma grafiği

Wnt1, Wnt3, Wnt8b, Wnt10a ve Wnt10b ligandlarının fimbrialarda daha yüksek ekspresyon gösterdiği bulgusu elde edilmiştir (**Şekil 4.5**). Ancak fallop tüpünün farklı bölgeleri arasında bu genlerin ekspresyon seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Wnt3a ölçümleri (**Şekil 4.6**) bakımından gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur. İstmus bölgesinde ampulla ve fimbria bölgelerine göre ekspresyon seviyeleri daha düşüktür (**Tablo 4.3**) ($p=0,034$).



Şekil 4. 6: Wnt3a ligandı için bölgeler arası karşılaştırma grafiği

Tablo 4. 3: Wnt3a ligandı için bölgeler arasındaki p değerleri

Örnek 1 – Örnek 2	p
İstmus-Ampulla	0,046*
İstmus-Fimbria	0,013*
Ampulla-Fimbria	0,596

İstmus bölgesinde, ampulla ve fimbria bölgelerine göre Wnt3a miktarı anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p=0,046$, $p=0,013$). Ampulla ile fimbria grupları arasında ise bu ölçüm bakımından anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,596$).

Fallop tüpünün farklı bölgelerinde gen ekspresyonlarının birbirlerine göre farkları değerlendirilmiştir. Her bir bölge için sıfır hipotezi “Wnt1, Wnt3, Wnt3a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt10a ve Wnt10b dağılımları aynıdır.” olmak üzere bağımlı ölçümlerde karşılaştırmalar yapılmıştır (Asimptotik önemler gösterilmiştir. Anlamlılık seviyesi 0,50) (**Tablo 4.4**).

Tablo 4. 4: Wnt transkriptleri için farklı bölgelerdeki p değerleri

Bölge	p
Ampulla	0,003*
Fimbria	0,005*
İstmus	0,423

Ampulla ve fimbria kısımları için, mRNA ölçümleri karşılaştırıldığında, seviyeler arasında anlamlı farklar bulunmuştur (**Tablo 4.5, Tablo 4.6**). İstmus bölgesi için genlerin ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamamıştır. Diğer Wnt ligandlarının mRNA'ları ile karşılaştırıldığında Wnt8a, Wnt3a ve Wnt10a ekspresyonları daha düşük olarak ölçülmüştür.

Tablo 4. 5: Ampulla bölgesi için Wnt transkriptlerinin çoklu karşılaştırma tablosu

Bölge	Örnek 1 - Örnek 2	p
Ampulla	Wnt8a - Wnt10a	0,040*
	Wnt8a - Wnt3	0,019*
	Wnt8a - Wnt1	0,001*
	Wnt8a - Wnt8b	0,001*
	Wnt8a - Wnt10b	0,001*
	Wnt3a - Wnt1	0,028*
	Wnt3a - Wnt8b	0,028*
	Wnt3a - Wnt10b	0,013*

Tablo 4. 6: Fimbrialar için Wnt transkriptlerinin çoklu karşılaştırma tablosu

Bölge	Örnek 1 - Örnek 2	p
Fimbria	Wnt8a - Wnt3	0,013*
	Wnt8a - Wnt1	0,001*
	Wnt8a - Wnt8b	0,005*
	Wnt8a - Wnt10b	0,019*
	Wnt3a - Wnt1	0,028*
	Wnt10a - Wnt1	0,019*

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Fallop tüpü uterus ve ovaryumlar arasında uzanan bir çift tüptür. Fallop tüpü oositi ovaryumdan uterusa taşır, fertilizasyon ve zigotun morula evresine geçişi sırasında gerekli ortamı sağlar [1]. Anatomik olarak insan fallop tüpleri dört ayrı bölüme ayrılmıştır; intramural parça, istmus, ampulla ve infundibulum/fimbria [2]. Fallop tüpü hem epitelyal yenilenme için progenitörlere sahip olup [3] hem de MKH'leri içeren bir organdır [4]. Fallop tüpü tıbbi teşhis açısından, dişi üreme kanalının en az erişilebilir kısmıdır. Tüp histolojisi ve patolojisi ile ilgili mevcut bilgiler, genellikle histerektominin bir parçası olarak salpenjektomi yapılmış hastalardan gelmektedir [5]. Fallop tüpünün genital sistemdeki işlevine ek olarak, seröz ovaryan kanser başlangıcında esas doku olduğunun anlaşılmasıyla bu organ ile ilgili daha fazla çalışma yapma gerekliliği doğmuştur [6].

İn vitro fertilizasyondaki (IVF) ilerlemeler ile birlikte, fallop tüpünün başarılı üreme yönündeki katkısı nispeten gözden kaçmaktaydı. IVF'te başarı için, tubal çevreye maruz kalarak, tubal taşınmadan geçmenin, fertilizasyon ve implantasyon gerçekleşmesi için temel gereklilikler olmadığı açıktır. Bu nedenle fallop tüpünün bir kanaldan yalnızca biraz daha farklı olduğu düşünülmektedir. Ancak, *in vivo* fertilizasyonda, fallop tüpü temel bir rol oynar. Artan kanıtlarla birlikte, tubal taşınımın mekanizmaları önceden düşünülenlere göre daha komplekstir ve fertilitiyi zayıflatacak çeşitli faktör ve koşullardan etkilenebilir [54]. Dolayısıyla gamet taşınımı, fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi için önemli olan bu organ ile ilgili mekanizmaları aydınlatmak önemlidir.

Fallop tüpünde epitelyal yükseklikteki döngüsel varyasyonlar ilk kez 1928'de bildirilmiş [73] ve daha sonra birçok araştırmacı tarafından doğrulanmıştır [53]. Bu durum fallop tüpünün genel kabulün aksine hücresel anlamda durgun bir organ olmadığını göstermektedir. Menstrual siklus fazına göre, salınan hormonların etkileri ile birlikte organın birtakım özellikleri değişmektedir. Dolayısıyla siklus ile paralel olarak hücreler arasında iletişimi sağlayan sinyal moleküllerinin salınımı ile ilgili değişiklikler olacağı açıktır. Tüpteki hücrelerin davranışları, sinyal moleküllerindeki dalgalanmalar sonucunda sinyal molekülünün özelliğine göre değişimler gösterecektir.

Daha önce yapılan çalışmalarda progesteron alan kadınların, fallop tüplerinde hücre yüksekliğinde ve mitotik indekste önemli bir azalma gözlenmiştir. Bu durum insan tubal epiteline progesteronun antiöstrojenik etkisi hipotezini desteklemektedir. Progesteron

varlığında östrojen sistemde bulunmasına rağmen; progesteronun östrojen tarafından kontrol edilen mitotik aktiviteyi bloke edilebildiği gösterilmiştir [64].

Yetişkinlerde, proliferasyon (Wnt/ β -katenin sinyali açık) ve farklılaşma (Wnt/ β -katenin sinyali kapalı) arasındaki dengenin korunmasında, Wnt/ β -katenin sinyali önemli bir işleve sahiptir [14]. Yapılan çalışma sonucunda progesteron etkisi altındaki fallop tüplerinde kanonik Wnt ligandları saptanmıştır. Sekretuar faz dolayısıyla baskılanan bu yolağın, tüpün farklı bölgelerinde gözlenmesi, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun etkilerinin fallop tüpü homeostazını sağlamada önemini gösterir niteliktedir. Çalışmamızda Wnt2 ekspresyonu saptanamamıştır ve Wnt8a ekspresyonunun ise çok düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Ancak GeneCards® (<https://www.genecards.org/>) veri tabanında bu genlerin eksprese edildikleri organlar incelendiğinde, fallop tüpünün de bu organlar arasında bulunduğu görülmüştür. Bu durum ise çalışmada kullanılan dokuların sekretuar fazdaki hastalardan toplanması ile ilişkilendirilebilir. Progesteron etkisi bu genlerin ekspresyonunu baskılamış ya da azaltmış olabilir.

Fallop tüpü uzun lümenli bir yapıdır ve epitelyal hücrelerin kompozisyonu, proksimalden distal fimbria sonuna kadar farklılık gösterir. Paik ve arkadaşları yaptıkları çalışmada fallop tüpü epitelinin kök hücrelerinin farklı dağılım gösterip göstermediğini araştırmıştır. Bu hücrelerin görsel olarak lokalize edilmesi ve miktarının belirlenmesi için EPCAM/CD44/ITGA6 üçlü pozitif hücrelerin sayısı normal fallop tüpü örneklerinin, distal ve proksimal kısımlarında ışık mikroskobu ve akım sitometri teknikleri ile incelenmiştir. Bu analizlere dayanarak, epitelyal kök hücre karakterindeki hücrelerin yüzdesinin distalde proksimale göre iki kat fazla olduğu ortaya konulmuştur. Araştırmacıların elde ettikleri sonuçlar, epitelyal kök hücrelerin tüp boyunca yerleştiğini, ancak distal fimbria ucunda daha yoğun olduğunu göstermektedir [3]. Fallop tüpünün farklı bölgelerinde bulunan epitelyal kök hücrelerin yoğunluğunda gözlenen bu değişiklik, distal ve proksimal kısımlarda bulunan kök hücrelerin farklı parakrin sinyalizasyon moleküllerine maruz kaldığı fikrini ortaya çıkarmaktadır. Bu durumla paralel olarak çalışmamızda Wnt3a transkriptlerinin istmus bölgesinde ampulla ve fimbria bölgelerine göre daha az eksprese olduğu ($p=0,046$, $p=0,013$) gösterilmiştir. Aynı zamanda fallop tüpünün farklı bölgelerinden izole edilen RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri sonrasında elde edilen RNA konsantrasyon sonuçları karşılaştırıldığında,

konsantrasyonun organın proksimal kısmı olan istmus bölgesinde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Yine bu durum organın farklı anatomik kısımlarının farklı hücresel davranışlar gösterdiğine dair bir kanıt olarak düşünülebilir.

Wang ve arkadaşları, fare ovidaktı üzerinde yaptıkları çalışmada; H2B-GFP molekülünü kullanarak ovidakt epitelyal kök hücrelerini incelediklerinde yine distal fimbrial uçta yoğunlaşan epitelyal kök hücre havuzunu göstermişlerdir. Uzun-vadeli etiket-tutucu hücrelerin 47 haftalık bir takibe kadar distal ovidakta kaldığını ve bu hücrelerin ex-vivo kültürünün kendini yenileme kapasitesini gösteren farklılaşmamış sferoidler oluşturduğunu ve dişi embriyonik üreme kanalı olan paramezonefrik kanalın farklı türevlerine benzeyen hücrelere farklılaşması için indüklenebileceğini göstermişlerdir [81]. Bu durum burada bulunan epitelyal kök hücre havuzunun potensi yeteneğinin gösterilmesi açısından önemlidir. Tüpte bulunan epitelyal kök hücrelerin davranışını anlamak yeni araştırmalar için farklı bakış açıları sağlayabilir. Çalışmamızda yaptığımız immünohistokimyasal inceleme sonucunda Wnt3a proteinlerinin özellikle tüp epiteli ve lamina propriadaki lokalizasyonu kanonik Wnt yolağının bu ligandının epitel hücrelerinin biyolojisinde etkileri olduğuna dair kanıt sağlamaktadır.

Kök hücrelerde köklülüğü teşvik edici genlerin azalması, farklılaşmayı artırmakta ve bu duruma düşük proliferasyon eşlik etmektedir. Kessler ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Wnt3a proteininin fallop tüpü organoid kültürlerinin köklülüğünü sağladığını göstermişlerdir [37]. Tüpte köklülüğü koruyan faktörler tüpün hücre popülasyonunu değiştirmekte ve tüpün en çok hasara uğrayan kısmı olan distal fimbria ucunda kök hücrelerin yoğunlaşmasını sağlayabilmektedir. Farklı Wnt ligandlarının ekspresyonları tüpün distalinde proksimaline göre artış göstermektedir. Wnt3a ligandının ekspresyonunda ise distal ve proksimal ölçümleri arasında anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0,034$). Bu sonuçlar toplu olarak Wnt ligandlarının köklülüğü sağlayıcı proteinler olarak düşünülebileceği sonucunu doğurmaktadır.

Genellikle cerrahi prosedürlerden sonra atılan insan fallop tüpü doku parçaları, rejeneratif tıp için yeni bir potansiyel multipotent hücre kaynağını temsil edebileceği fikrine dayanarak, Jazedje ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ilk kez histerektomi prosedürleri ile atılan normal yetişkin insan fallop tüplerinin MKH'ler açısından zengin bir kaynak olduğunu göstermiştir [4]. Epitelyal ve mezenkimal progenitörlere sahip olan fallop tüplerinde kök hücre biyolojisinde etkileri bulunan ligandların çalışılması önemlidir.

Çalışmamızda 7 farklı Wnt ligandının sekretuar fazda fallop tüpünde eksprese olduğu ortaya konulmuştur. Bu ligandların, fallop tüpü kök hücreleri üzerine etkileri ilerleyen araştırmalarda ortaya konulabilir.

Kök hücre biyolojisinde, Wnt'ler ve membran arasındaki etkileşimlerin, hücre konfigürasyonlarına yakın hücrede olduğu düşünülen nişlerin, kök hücre kaderini nasıl kontrol ettiğini anlamada büyük önemi vardır [142]. Wnt3a proteininin fallop tüpü epitelyal hücrelerine yakın yerlerde ekspresyonu bu proteinin fallop tüpü epitelyal kök hücre nişi sinyallerinden birisi olabileceğini fikrini ortaya çıkarmaktadır.

Farklı kanser tipleri ile Wnt/ β -katenin sinyalizasyon defektlerinin sıklıkla birlikte oluşu; yetişkin kök hücre nişlerinin homeostazisindeki Wnt sinyalizasyonunun merkezi rolünü yansıtmaktadır (örneğin; meme, kolon, mide, karaciğer, ovaryum, uterus, deri gibi) [14]. Endometriyal kanserlerde, gen mutasyonları kanonik Wnt sinyalizasyonunun erken dönemde aktivasyonuna neden olur [230]. Wnt sinyal değişikliği ovaryum kanserinin özelliklerinden biridir. Moleküler ve klinik bulgulara dayanarak, yüksek dereceli seröz ovaryum karsinomasının ovaryum yüzey epitelinden ziyade fallop tüpü fimbrialarından kaynaklandığının kabul edilmesi nedeniyle, fallop tüp epiteli homeostazı ile ilgili düzenleyici mekanizmaları aydınlatmak önemlidir [5]. Fallop tüpü fimbrialarından kaynaklandığı düşünülen seröz ovaryan kanserin, burada fizyolojik koşullar altında etki gösteren Wnt yolağı bileşenlerinin disregülasyonu ile ilişkisi bulunabilir.

Yapılan bir çalışmada yetişkin fare ovidaktında aktif kanonik Wnt sinyali bildirilmiştir [231]. Ng ve Barker yaptıkları derleme çalışmasında, Wnt-içsel programının yetişkin insan fimbrialarında hücre işlevini düzenlenmesinde bir rolü bulunup bulunmadığının keşfedilmemiş olarak kaldığını belirtmişlerdir [83]. Yapılan çalışma farklı Wnt genlerinin, fimbrialarda yoğun olmak üzere insan fallop tüplerinin farklı bölgelerinde eksprese edildiğini ortaya koymuştur. Dolayısıyla Wnt sinyal yolağının, öncelikle fimbrialar olmak üzere fallop tüpü boyunca hücresel işlevleri düzenleyebileceği sonucuna varılabilir.

Genital sistemin normal gelişimi için Wnt sinyalizasyonuna gereksinim bulunmaktadır. Bununla birlikte, Wnt/ β -katenin sinyalizasyonunun aktivasyonu, ektopik gebelik [28, 29] ve endometriozis [30] gibi patolojik koşullar ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda artmış Wnt sinyali, enfeksiyona karşı bir mukozal yanıttır [31]. Fizyolojik ve patolojik koşullar

altında fallop tüpünde Wnt parakrin sinyalizasyonunun tüm yönlerini aydınlatmak için daha fazla çalışma gerektiği bildirilmiştir [5]. Sekretuar faz koşulları altında farklı Wnt ligandlarının fallop tüplerinde ekspresyonunun çalışılması, literatüre bu anlamda katkı sağlayacaktır.

Tüp epitelinin, ovulasyonla ilişkili pro-inflamatuar ortama maruz kalması sonucu, çift sarmal DNA kırıklarında artışın [76] özellikle fimbrialarda mutasyonların ortaya çıkmasına zemin hazırlayacağı düşünülebilir. Progesteron tarafından baskılanan bir gen ailesinin üyelerinin, sekretuar faz koşulları altında fimbrialarda daha yoğun olarak gözlenmesi, kanonik Wnt yolağının fimbria homeostazında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Ovulasyonla birlikte ortaya çıkan DNA hasarının ardından, Wnt/ β -katenin yolağı bileşenleri disregüle olabilir. Bu disregülasyon fimbrial epitel kökenli patolojik durumların oluşumuna zemin hazırlayabilir.

Fizyolojik koşullar altında fallop tüpünden salınan Wnt sinyal yolağı ligandlarının incelenmesi çeşitli patolojik durumlar için de ışık tutacaktır. Wnt yolağı kök hücrelerde oldukça sıkı bir şekilde kontrol altında tutulur. Yolağın olağan dışı etkinlik kazanması ya da disregülasyonu kanser kök hücrelerinin ortaya çıkışına neden olmaktadır. Dolayısıyla kanser kök hücrelerinin yok edilmesi için Wnt sinyal yolağının hedef alınması etkili olabilir. Bazı küçük moleküllerin sitoplazma veya çekirdekteki Wnt yolağı sinyallerini hedef almak amacıyla hücreye yönlendirildiği faz ½ denemeler gerçekleştirilmiştir [232, 233]. Tüpte meydana gelen patolojik bir durum altında disregüle olan Wnt ligandlarının baskılanması, fallop tüpünde ortaya çıkan patolojilerin tedavisi için etkili bir yöntem oluşturabilir.

Yapılan bu araştırma nispeten erişilemeyen bu organın biyolojisi ve patolojisi, özellikle kanser patogenezi ve üreme tıbbı ile ilgili araştırmalara katkı sağlayacaktır.

6. KAYNAKÇA

1. Ross M.H., W. Pawlina, Histology: a Text and Atlas. Histoloji: Konu Anlatımı ve Atlas. 6. baskıdan çeviri, Baykal B. (Editör) 2011, Ankara: Palme Yayıncılık. 845.
2. Palter S.F., Mulayim N., Senturk L., Arici A., Interleukin-8 in the human fallopian tube. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2660-7.
3. Paik D.Y., Janzen D.M., Schafenacker A.M., Velasco V.S., Shung M.S., Cheng D., Huang J., Witte O.N., Memarzadeh S., Stem-like epithelial cells are concentrated in the distal end of the fallopian tube: a site for injury and serous cancer initiation. Stem Cells, 2012. **30**(11): p. 2487-97.
4. Jazedje T., Perin P. M., Czeresnia C. E., Maluf M., Halpern S., Secco M., Bueno D.F., Vieira N.M., Zucconi E., Zatz M., Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures. J Transl Med, 2009. **7**: p. 46.
5. Kessler M., Zietlow R., Meyer T.F., Adult Stem Cell Niches — Stem Cells in the Female Reproductive System, in Adult Stem Cell Niches, S. Wislet-Gendebien, Editor. 2014, InTech: Rijeka. p. Ch. 06.
6. Kim J., Coffey D.M., Creighton C.J., Y. Yu Z., Hawkins S.M., Matzuk M.M., High-grade serous ovarian cancer arises from fallopian tube in a mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(10): p. 3921-6.
7. Lodish H., Berk A., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P., Molecular Cell Biology. Moleküler Hücre Biyolojisi. 6. baskıdan çeviri ed. 2008, Ankara: Palme Yayıncılık. 699.
8. Logan C.Y., Nusse R., The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004. **20**: p. 781-810.
9. Can A., Kök Hücre Biyolojisi Türleri ve Tedavide Kullanımları. 2014, Ankara: Akademisyen Tıp Kitapevi. 133, 134, 136, 608
10. Vainio S., Heikkilä M., Kispert A., Chin N., McMahon A.P., Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. Nature, 1999. **397**(6718): p. 405-9.
11. Carroll T.J., Park J.S., Hayashi S., Majumdar A., McMahon A.P., Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. Dev Cell, 2005. **9**(2): p. 283-92.

12. Mericskay M., Kitajewski J., Sassoon D., Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development*, 2004. **131**(9): p. 2061-72.
13. Miller C., Sassoon D.A., Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development*, 1998. **125**(16): p. 3201-11.
14. Wang Y., Hanifi-Moghaddam P., Hanekamp E.E., Kloosterboer H.J., Franken P., Veldscholte J, van Doorn HC, Ewing PC, Kim JJ, Grootegoed JA, Burger CW, Fodde R., Blok L.J., Progesterone inhibition of Wnt/beta-catenin signaling in normal endometrium and endometrial cancer. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(18): p. 5784-93.
15. Tulac S., Nayak N.R., Kao L.C., Van Waes M., Huang J., Lobo S., Germeyer A., Lessey B.A., Taylor R.N., Suchanek E., Giudice L.C., Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003. **88**(8): p. 3860-6.
16. Tulac S., Overgaard M.T., Hamilton A.E., Jumbe N.L., Suchanek E., Giudice L.C., Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006. **91**(4): p. 1453-61.
17. Nei H., Saito T., Yamasaki H., Mizumoto H., Ito E., Kudo R., Nuclear localization of beta-catenin in normal and carcinogenic endometrium. *Mol Carcinog*, 1999. **25**(3): p. 207-18.
18. Hou X., Tan Y., Li M., Dey S.K., Das S.K., Canonical Wnt signaling is critical to estrogen-mediated uterine growth. *Mol Endocrinol*, 2004. **18**(12): p. 3035-49.
19. Jeong J.W., Lee H.S., Franco H.L., Broaddus R.R., Taketo M.M., Tsai S.Y., Lydon J.P., DeMayo F.J., beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene*, 2009. **28**(1): p. 31-40.
20. Li L., Ji S.Y., Yang J.L., Li X.X., Zhang J., Zhang Y., Hu Z.Y., Liu Y.X., Wnt/beta-catenin signaling regulates follicular development by modulating the expression of Foxo3a signaling components. *Mol Cell Endocrinol*, 2014. **382**(2): p. 915-25.

21. Stapp A.D., Gómez B.I., Gifford C.A., Hallford D.M., Hernandez Gifford J.A., Canonical WNT signaling inhibits follicle stimulating hormone mediated steroidogenesis in primary cultures of rat granulosa cells. *PLoS One*, 2014. **9**(1): p. e86432.
22. Wang, H.X., Li T.Y., Kidder G.M., WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biol Reprod*, 2010. **82**(5): p. 865-75.
23. Hsieh M., Johnson M.A., Greenberg N.M., Richards J.S., Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology*, 2002. **143**(3): p. 898-908.
24. Hernandez-Gonzalez I., Gonzalez-Robayna I., Shimada M., Wayne C.M., Ochsner S.A., White L., Richards J.S., Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol*, 2006. **20**(6): p. 1300-21.
25. Boyer A., Lapointe E., Zheng X., Cowan R.G., Li H., Quirk S.M., DeMayo F.J., Richards J.S., Boerboom D., WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *Faseb j*, 2010. **24**(8): p. 3010-25.
26. Cederroth C.R., Pitetti J.L., Papaioannou M.D., Nef S., Genetic programs that regulate testicular and ovarian development. *Mol Cell Endocrinol*, 2007. **265-266**: p. 3-9.
27. Harwood B.N., Cross S.K., Radford E.E., Haac B.E., De Vries W.N., Members of the WNT signaling pathways are widely expressed in mouse ovaries, oocytes, and cleavage stage embryos. *Dev Dyn*, 2008. **237**(4): p. 1099-111.
28. Kodithuwakku S.P., Pang R.T., Ng E.H., Cheung A.N., Horne A.W., Ho P.C., Yeung W.S., Lee K., Wnt activation downregulates olfactomedin-1 in Fallopian tubal epithelial cells: a microenvironment predisposed to tubal ectopic pregnancy. *Lab Invest*, 2012. **92**(2): p. 256-64.
29. Li P., Zhu W.J., Ma Z.L., Wang G., Peng H., Chen Y., Lee K.K., Yang X., Enhanced beta-catenin expression and inflammation are associated with human ectopic tubal pregnancy. *Hum Reprod*, 2013. **28**(9): p. 2363-71.

30. Matsuzaki S., Darcha C., In vitro effects of a small-molecule antagonist of the Tcf/ β -catenin complex on endometrial and endometriotic cells of patients with endometriosis. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61690.
31. Kessler M., Zielecki J., Thieck O., Mollenkopf H.J., Fotopoulou C., Meyer T.F., Chlamydia trachomatis disturbs epithelial tissue homeostasis in fallopian tubes via paracrine Wnt signaling. *Am J Pathol*, 2012. **180**(1): p. 186-98.
32. Nakaya N., Lee H.S., Takada Y., Tzchori I., Tomarev S.I., Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway. *J Neurosci*, 2008. **28**(31): p. 7900-10.
33. Borthwick J.M., Charnock-Jones D.S., Tom B.D., Hull M.L., Teirney R., Phillips S.C., Smith S.K., Determination of the transcript profile of human endometrium. *Mol Hum Reprod*, 2003. **9**(1): p. 19-33.
34. Horcajadas J.A., Riesewijk A., Martín J., Cervero A., Mosselman S., Pellicer A., Simón C., Global gene expression profiling of human endometrial receptivity. *J Reprod Immunol*, 2004. **63**(1): p. 41-9.
35. Liu Y., Lee K.F., Ng E.H., Yeung W.S., Ho P.C., Gene expression profiling of human peri-implantation endometria between natural and stimulated cycles. *Fertil Steril*, 2008. **90**(6): p. 2152-64.
36. King A.E., Wheelhouse N., Cameron S., McDonald S.E., Lee K.F., Entrican G., Critchley H.O., Horne A.W., Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of Chlamydia trachomatis infection. *Hum Reprod*, 2009. **24**(3): p. 679-86.
37. Kessler M., Zietlow R., Meyer T.F., The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8989.
38. Ghosh A., Syed S.M., Tanwar P.S., In vivo genetic cell lineage tracing reveals that oviductal secretory cells self-renew and give rise to ciliated cells. *Development*, 2017. **144**(17): p. 3031-3041.
39. Finch A., Beiner M., Lubinski J., Lynch H.T., Moller P., Rosen B., Murphy J., Ghadirian P., Friedman E., Foulkes W.D., Kim-Sing C., Wagner T., Tung N., Couch F., Stoppa-Lyonnet D., Ainsworth P., Daly M., Pasini B., Gershoni-Baruch R., Eng C., Olopade O.I., McLennan J., Karlan B., Weitzel J., Sun P., Narod S.A.,

- Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *Jama*, 2006. **296**(2): p. 185-92.
40. Kurman R.J., Ellenson L.H., Ronnett B.M., (Editörler) Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, 2011: Springer International Publishing.
 41. Bahathiq A.O.S., Ledger W.L., Historical Background and Functional Anatomy, in *The Fallopian Tube in Infertility and IVF Practice*, A.O.S. Bahathiq, S.L. Tan, and W.L. Ledger, Editors. 2010, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-7.
 42. Mescher A.L., Junqueira's Basic Histology, Junqueira Temel Histoloji. 2015, 13. baskıdan çeviri, Solakoğlu S: (Editör), İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 544.
 43. Standring S., Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. Forty-first edition ed. 2016, London: Elsevier.
 44. Paulsen F., Waschke J., Sobotta Atlas of Human Anatomy Internal Organs. 2011, Munich: Elsevier.
 45. Moore K.L., Persaud T.V.N.V., Torchia M.G., The Developing Human Clinically Oriented Embryology. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. 10. baskıdan çeviri, Dalçık H. (Editör), 2016, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 528.
 46. O'Rahilly R., The timing and sequence of events in the development of the human reproductive system during the embryonic period proper. *Anatomy and Embryology*, 1983. **166**(2): p. 247-261.
 47. Robboy S.J., Taguchi O., Cunha G.R., Normal development of the human female reproductive tract and alterations resulting from experimental exposure to diethylstilbestrol. *Hum Pathol*, 1982. **13**(3): p. 190-8.
 48. O'Rahilly R., Prenatal Human Development, in *Biology of the Uterus*, R.M. Wynn and W.P. Jollie (Editörler), 1989, Springer US: Boston, MA. p. 35-55.
 49. Sadler T.W., Langman's Medical Embryology. Langman Medikal Embriyoloji. 11. baskıdan çeviri ed. 2010, Ankara: Palme Yayıncılık. 385.
 50. Yin Y., Ma L., Development of the mammalian female reproductive tract. *J Biochem*, 2005. **137**(6): p. 677-83.
 51. Du H., Taylor H.S., Molecular regulation of mullerian development by Hox genes. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1034**: p. 152-65.

52. Taylor H.S., Vanden Heuvel G.B., Igarashi P., A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod*, 1997. **57**(6): p. 1338-45.
53. Verhage H.G., Bareither M.L., Jaffe R.C., Akbar M., Cyclic changes in ciliation, secretion and cell height of the oviductal epithelium in women. *Am J Anat*, 1979. **156**(4): p. 505-21.
54. Lyons R.A., Saridogan E., Djahanbakhch O., The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. *Hum Reprod Update*, 2006. **12**(4): p. 363-72.
55. Kattal N., Cohen J., Barmat L.I., Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. *Fertil Steril*, 2008. **90**(4): p. 1069-76.
56. Patek E., Nilsson L., Johannisson E., Hellema M., Bout J., Scanning electron microscopic study of the human fallopian tube. 3. The effect of midpregnancy and of various steroids. *Fertil Steril*, 1973. **24**(1): p. 31-43.
57. Crow J., Amso N.N., Lewin J., Shaw R.W., Morphology and ultrastructure of fallopian tube epithelium at different stages of the menstrual cycle and menopause. *Hum Reprod*, 1994. **9**(12): p. 2224-33.
58. Hunter R.H.F., The fallopian tubes: Their role in fertility and infertility. *Gamete Research*. 1988, Berlin: Springer-Verlag. 191.
59. Wu A.S.H., Carlson S.D., First N.L., Scanning Electron Microscopic Study of the Porcine Oviduct and Uterus. *Journal of Animal Science*, 1976. **42**(4): p. 804-809.
60. Flechon J.E., Hunter R.H., Distribution of spermatozoa in the utero-tubal junction and isthmus of pigs, and their relationship with the luminal epithelium after mating: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell*, 1981. **13**(1): p. 127-39.
61. Hunter R.H., Flechon B., Flechon J.E., Pre- and peri-ovulatory distribution of viable spermatozoa in the pig oviduct: a scanning electron microscope study. *Tissue Cell*, 1987. **19**(3): p. 423-36.
62. Fadel H.E., Berns D., Zaneveld L.J., Wilbanks G.D., Brueschke E.E., The human uterotubal junction: a scanning electron microscope study during different phases of the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 1976. **27**(10): p. 1176-86.
63. Allen E., Further experiments with an ovarian hormone in the ovariectomized adult monkey, macacus rhesus, especially the degenerative phase of the

- experimental menstrual cycle. *American Journal of Anatomy*, 1928. **42**(2): p. 467-487.
64. Donnez J., Casanas-Roux F., Caprasso J., Ferin J., Thomas K., Cyclic changes in ciliation, cell height, and mitotic activity in human tubal epithelium during reproductive life. *Fertil Steril*, 1985. **43**(4): p. 554-9.
 65. Brenner R.M., Renewal of oviduct cilia during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Fertil Steril*, 1969. **20**(4): p. 599-611.
 66. Borell U., Nilsson O., Westman A., Ciliary Activity in the Rabbit Fallopian Tube During Œstrus and After Copulation. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 1957. **36**(1): p. 22-28.
 67. Critoph F.N., Dennis K.J., Ciliary activity in the human oviduct. *Obstet Gynecol Surv*, 1977. **32**(7): p. 602-3.
 68. Weström L., Mårdh P.A., Mecklenburg C.V., Håkansson C.H., Studies on ciliated epithelia of the human genital tract. II. The mucociliary wave pattern of fallopian tube epithelium. *Fertil Steril*, 1977. **28**(9): p. 955-61.
 69. Lyons R.A., Djahanbakhch O., Mahmood T., Saridogan E., Sattar S., Sheaff M.T., Naftalin A.A., Chenoy R., Fallopian tube ciliary beat frequency in relation to the stage of menstrual cycle and anatomical site. *Hum Reprod*, 2002. **17**(3): p. 584-8.
 70. Gaddum-Rosse P., Blandau R.J., Thiersch J.B., Ciliary activity in the human and *Macaca nemestrina* oviduct. *Am J Anat*, 1973. **138**(2): p. 269-75.
 71. Patek E., The epithelium of the human Fallopian tube. A surface ultrastructural and cytochemical study. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl*, 1974. **31**(0): p. 1-28.
 72. Jansen R.P.S., Endocrine Response in the Fallopian Tube. *Endocrine Reviews*, 1984. **5**(4): p. 525-551.
 73. Novak E., Everett H.S., Cyclical and other variations in the tubal epithelium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 1928. **16**(4): p. 499-530.
 74. Critoph F.N., Dennis K.J., The cellular composition of the human oviduct epithelium. *Br J Obstet Gynaecol*, 1977. **84**(3): p. 219-21.
 75. George S.H., Greenaway J., Milea A., Clary V., Shaw S., Sharma M., Virtanen C., Shaw P.A., Identification of abrogated pathways in fallopian tube epithelium from BRCA1 mutation carriers. *J Pathol*, 2011. **225**(1): p. 106-17.

76. King S.M., Hilliard T.S., Wu L.Y., Jaffe R.C., Fazleabas A.T., Burdette J.E., The impact of ovulation on fallopian tube epithelial cells: evaluating three hypotheses connecting ovulation and serous ovarian cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(5): p. 627-42.
77. Bahar-Shany K., Brand H., Sapoznik S., Jacob-Hirsch J., Yung Y., Korach J., Perri T., Cohen Y., Hourvitz A., Levanon K., Exposure of fallopian tube epithelium to follicular fluid mimics carcinogenic changes in precursor lesions of serous papillary carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2014. **132**(2): p. 322-7.
78. Pollow K., Inthraphuvasak J., Manz B., Grill H.J., Pollow B., A comparison of cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human fallopian tube and endometrial tissue. *Fertil Steril*, 1981. **36**(5): p. 615-22.
79. Amso N.N., Crow J., Lewin J., Shaw R.W., A comparative morphological and ultrastructural study of endometrial gland and fallopian tube epithelia at different stages of the menstrual cycle and the menopause. *Hum Reprod*, 1994. **9**(12): p. 2234-41.
80. Patterson A.L., Pru J.K., Long-term label retaining cells localize to distinct regions within the female reproductive epithelium. *Cell Cycle*, 2013. **12**(17): p. 2888-98.
81. Wang Y., Sacchetti A., van Dijk M.R., van der Zee M., van der Horst P.H., Joosten R., Burger C.W., Grootegoed J.A., Blok L.J., Fodde R., Identification of quiescent, stem-like cells in the distal female reproductive tract. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e40691.
82. Foudi A., Hochedlinger K., Van Buren D., Schindler J.W., Jaenisch R., Carey V., Hock H., Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*, 2009. **27**(1): p. 84-90.
83. Ng A., Barker N., Ovary and fimbrial stem cells: biology, niche and cancer origins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(10): p. 625-38.
84. Janzen D.M., Cheng D., Schafenacker A.M., Paik D.Y., Goldstein A.S., Witte O.N., Jaroszewicz A., Pellegrini M., Memarzadeh S., Estrogen and progesterone together expand murine endometrial epithelial progenitor cells. *Stem Cells*, 2013. **31**(4): p. 808-22.

85. Yang A., Kaghad M., Wang Y., Gillett E., Fleming M.D., Dötsch V., Andrews N.C., Caput D., McKeon F., p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 1998. **2**(3): p. 305-16.
86. Massé J., Watrin T., Laurent A., Deschamps S., Guerrier D., Pellerin I., The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. *Int J Dev Biol*, 2009. **53**(2-3): p. 411-24.
87. Orvis G.D., Behringer R.R., Cellular mechanisms of Mullerian duct formation in the mouse. *Dev Biol*, 2007. **306**(2): p. 493-504.
88. Guioli S., Sekido R., Lovell-Badge R., The origin of the Mullerian duct in chick and mouse. *Dev Biol*, 2007. **302**(2): p. 389-98.
89. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop Dj., Horwitz E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. **8**(4): p. 315-7.
90. Bobis S., Jarocho D., Majka M., Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*, 2006. **44**(4): p. 215-30.
91. Phinney D.G., Prockop D.J., Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
92. Valtieri M., Sorrentino A., The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis. *J Cell Physiol*, 2008. **217**(2): p. 296-300.
93. Tare R.S., Babister J.C., Kanczler J., Oreffo R.O., Skeletal stem cells: Phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008. **288**(1): p. 11-21.
94. Warburton D., Perin L., Defilippo R., Bellusci S., Shi W., Driscoll B., Stem/progenitor cells in lung development, injury repair, and regeneration. *Proc Am Thorac Soc*, 2008. **5**(6): p. 703-6.
95. Vieira N.M., Brandalise V., Zucconi E., Jazedje T., Secco M., Nunes V.A., Strauss B.E., Vainzof M., Zatz M., Human multipotent adipose-derived stem cells restore dystrophin expression of Duchenne skeletal-muscle cells in vitro. *Biol Cell*, 2008. **100**(4): p. 231-41.

96. de Mendonça Costa A., Bueno D.F., Martins M.T., Kerkis I., Kerkis A., Fanganiello R.D., Cerruti H., Alonso N., Passos-Bueno M.R., Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*, 2008. **19**(1): p. 204-10.
97. Evangelista M., Soncini M., Parolini O., Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? *Cytotechnology*, 2008. **58**(1): p. 33-42.
98. Secco M., Zucconi E., Vieira N.M., Fogaça L.L., Cerqueira A., Carvalho M.D., Jazedje T., Okamoto O.K., Muotri A.R., Zatz M., Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*, 2008. **26**(1): p. 146-50.
99. Zhang M.J., Liu B., Xia W., Sun Z.Y., Lu K.H., Could cells from menstrual blood be a new source for cell-based therapies? *Medical Hypotheses*, 2009. **72**(3): p. 252-254.
100. Friedenstein, A.J., Chailakhjan R.K., Lalykina K.S., The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 1970. **3**(4): p. 393-403.
101. da Silva Meirelles, L., Chagastelles P.C., Nardi N.B., Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
102. da Silva Meirelles L., Caplan A.I., N.B. Nardi, In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2008. **26**(9): p. 2287-99.
103. Krampera M., Marconi S., Pasini A., Galiè M., Rigotti G., Mosna F., Tinelli M., Lovato L., Anghileri E., Andreini A., Pizzolo G., Sbarbati A., Bonetti B., Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone*, 2007. **40**(2): p. 382-90.
104. Prunet-Marcassus B., Cousin B., Caton D., André M., Pénicaud L., Casteilla L., From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Exp Cell Res*, 2006. **312**(6): p. 727-36.
105. Gargett C.E., Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod Update*, 2007. **13**(1): p. 87-101.
106. Gargett C.E., Chan R.W., Schwab K.E., Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2007. **19**(4): p. 377-83.

107. Meng X., Ichim T.E., Zhong J., Rogers A., Yin Z., Jackson J., Wang H., Ge W., Bogin V., Chan K.W., Thébaud B., Riordan N.H., Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med*, 2007. **5**: p. 57.
108. Schwab K.E., Hutchinson P., Gargett C.E., Identification of surface markers for prospective isolation of human endometrial stromal colony-forming cells. *Hum Reprod*, 2008. **23**(4): p. 934-43.
109. Patel A.N., Park E., Kuzman M., Benetti F., Silva F.J., Allickson J.G., Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant*, 2008. **17**(3): p. 303-11.
110. Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H., Allogeneic endometrial regenerative cells: an "Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *J Transl Med*, 2008. **6**: p. 45.
111. Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A., Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 2008. **26**(7): p. 1695-704.
112. Secco M., Zucconi E., Vieira N.M., Fogaça L.L., Cerqueira A., Carvalho M.D., Jazedje T., Okamoto O.K., Muotri A.R., Zatz M., Mesenchymal stem cells from umbilical cord: do not discard the cord! *Neuromuscul Disord*, 2008. **18**(1): p. 17-8.
113. Vieira N.M., Bueno C.R. Jr., Brandalise V., Moraes L.V., Zucconi E., Secco M., Suzuki M.F., Camargo M.M., Bartolini P., Brum P.C., Vainzof M., Zatz M., SJL dystrophic mice express a significant amount of human muscle proteins following systemic delivery of human adipose-derived stromal cells without immunosuppression. *Stem Cells*, 2008. **26**(9): p. 2391-8.
114. Bueno D.F., Kerkis I., Costa A.M., Martins M.T., Kobayashi G.S., Zucconi E., Fanganiello R.D., Salles F.T., Almeida A.B., do Amaral C.E., Alonso N., Passos-Bueno M.R., New source of muscle-derived stem cells with potential for alveolar bone reconstruction in cleft lip and/or palate patients. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(2): p. 427-35.

115. Quayle A.J., The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol*, 2002. **57**(1-2): p. 61-79.
116. Fahey J.V., Schaefer T.M., Channon J.Y., Wira C.R., Secretion of cytokines and chemokines by polarized human epithelial cells from the female reproductive tract. *Hum Reprod*, 2005. **20**(6): p. 1439-46.
117. Wolff E.F., Wolff A.B., Hongling Du., Taylor H.S., Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci*, 2007. **14**(6): p. 524-33.
118. Gregorieff A., Pinto D., Begthel H., Destrée O., Kielman M., Clevers H., Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterology*, 2005. **129**(2): p. 626-38.
119. Nusse R., Varmus H.E., Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982. **31**(1): p. 99-109.
120. MacDonald B.T., Tamai K., He X., Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 2009. **17**(1): p. 9-26.
121. Miller J.R., The Wnts. *Genome Biol*, 2002. **3**(1): p. Reviews3001.
122. Cadigan K.M., Nusse R., Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*, 1997. **11**(24): p. 3286-305.
123. Clevers H., Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 2006. **127**(3): p. 469-80.
124. Morrell N.T., Leucht P., Zhao L., Kim J.B., ten Berge D., Ponnusamy K., Carre A.L., Dudek H., Zachlederova M., McElhaney M., Brunton S., Gunzner J., Callow M., Polakis P., Costa M., Zhang X.M., Helms J.A., Nusse R. Liposomal Packaging Generates Wnt Protein with In Vivo Biological Activity. *PLOS ONE*, 2008. **3**(8): p. e2930.
125. Wodarz A., Nusse R., Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1998. **14**: p. 59-88.
126. Behrens J., Lustig B., The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*, 2004. **48**(5-6): p. 477-87.

127. Shibamoto S., Higano K., Takada R., Ito F., Takeichi M., Takada S., Cytoskeletal reorganization by soluble Wnt-3a protein signalling. *Genes Cells*, 1998. **3**(10): p. 659-70.
128. Baum B., Georgiou M., Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 2011. **192**(6): p. 907.
129. Brembeck F.H., Rosario M., Birchmeier W., Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*, 2006. **16**(1): p. 51-9.
130. Gumbiner B., Stevenson B., Grimaldi A., The role of the cell adhesion molecule uvomorulin in the formation and maintenance of the epithelial junctional complex. *J Cell Biol*, 1988. **107**(4): p. 1575-87.
131. Kim W., Kim M., Jho E.H., Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. *Biochem J*, 2013. **450**(1): p. 9-21.
132. Gottardi C.J., Wong E., Gumbiner B.M., E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*, 2001. **153**(5): p. 1049-60.
133. Brembeck F.H., Schwarz-Romond T., Bakkers J., Wilhelm S., Hammerschmidt M., Birchmeier W., Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev*, 2004. **18**(18): p. 2225-30.
134. Ji H., Wang J., Nika H., Hawke D., Keezer S., Ge Q., Fang B., Fang X., Fang D., Litchfield D.W., Aldape K., Lu Z., EGF-induced ERK activation promotes CK2-mediated disassociation of alpha-Catenin from beta-Catenin and transactivation of beta-Catenin. *Mol Cell*, 2009. **36**(4): p. 547-59.
135. Thibeault S., Rautureau Y., Oubaha M., Faubert D., Wilkes B.C., Delisle C., Gratton J.P., S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. *Mol Cell*, 2010. **39**(3): p. 468-76.
136. Usongo, M., X. Li, and R. Farookhi, Activation of the canonical WNT signaling pathway promotes ovarian surface epithelial proliferation without inducing beta-catenin/Tcf-mediated reporter expression. *Dev Dyn*, 2013. **242**(3): p. 291-300.
137. Kimelman D., Xu W., beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 2006. **25**(57): p. 7482-91.

138. Huang H., He X., Wnt/beta-catenin signaling: new (and old) players and new insights. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 119-25.
139. Xing Y., Clements W.K., Kimelman D., Xu W., Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev*, 2003. **17**(22): p. 2753-64.
140. Hamada F., Bienz M., The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF. *Dev Cell*, 2004. **7**(5): p. 677-85.
141. Nusse R., Varmus H.E., Wnt genes. *Cell*, 1992. **69**(7): p. 1073-87.
142. Nusse R., Wnt signaling and stem cell control. *Cell Res*, 2008. **18**(5): p. 523-7.
143. Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T., Yates J.R., Nusse R., Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 2003. **423**(6938): p. 448-52.
144. Takada R., Satomi Y., Kurata T., Ueno N., Norioka S., Kondoh H., Takao T., Takada S., Monounsaturated fatty acid modification of Wnt protein: its role in Wnt secretion. *Dev Cell*, 2006. **11**(6): p. 791-801.
145. Kadowaki T., Wilder E., Klingensmith J., Zachary K., Perrimon N., The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev*, 1996. **10**(24): p. 3116-28.
146. Rocheleau C.E., Downs W.D., Lin R., Wittmann C., Bei Y., Cha Y.H., Ali M., Priess J.R., Mello C.C., Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell*, 1997. **90**(4): p. 707-16.
147. Hofmann K., A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem Sci*, 2000. **25**(3): p. 111-2.
148. Zhai L., Chaturvedi D., Cumberledge S., *Drosophila* wnt-1 undergoes a hydrophobic modification and is targeted to lipid rafts, a process that requires porcupine. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33220-7.
149. Noordermeer, J., Klingensmith J., Nusse R., Differential requirements for segment polarity genes in wingless signaling. *Mech Dev*, 1995. **51**(2-3): p. 145-55.
150. Ching W., Nusse R., A dedicated Wnt secretion factor. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 432-3.
151. Bartscherer K., Pelte N., Ingelfinger D., Boutros M., Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell*, 2006. **125**(3): p. 523-33.

152. Cadigan K.M., Fish M.P., Rulifson E.J., Nusse R., Wingless repression of *Drosophila* frizzled 2 expression shapes the Wingless morphogen gradient in the wing. *Cell*, 1998. **93**(5): p. 767-77.
153. Strigini M., Cohen S.M., Wingless gradient formation in the *Drosophila* wing. *Curr Biol*, 2000. **10**(6): p. 293-300.
154. Zecca, M., Basler K., Struhl G., Direct and long-range action of a wingless morphogen gradient. *Cell*, 1996. **87**(5): p. 833-44.
155. Greco, V., Hannus M., Eaton S., Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell*, 2001. **106**(5): p. 633-45.
156. Panáková D., Sprong H., Marois E., Thiele C., Eaton S., Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling. *Nature*, 2005. **435**(7038): p. 58-65.
157. Ramirez-Weber F.A., Kornberg T.B., Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell*, 1999. **97**(5): p. 599-607.
158. Clevers H., Loh K.M., Nusse R., Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*, 2014. **346**(6205): p. 1248012.
159. Baeg G.H., Lin X., Khare N., Baumgartner S., Perrimon N., Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development*, 2001. **128**(1): p. 87-94.
160. Lin X., Perrimon N., Role of heparan sulfate proteoglycans in cell-cell signaling in *Drosophila*. *Matrix Biol*, 2000. **19**(4): p. 303-7.
161. Lin, X., Perrimon N., Dally cooperates with *Drosophila* Frizzled 2 to transduce Wingless signalling. *Nature*, 1999. **400**(6741): p. 281-4.
162. Tsuda M., Kamimura K., Nakato H., Archer M., Staatz W., Fox B., Humphrey M., Olson S., Futch T., Kaluza V., Siegfried E., Stam L., Selleck S.B., The cell-surface proteoglycan Dally regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature*, 1999. **400**(6741): p. 276-80.
163. Alexandre C., Baena-Lopez A., Vincent J.P., Patterning and growth control by membrane-tethered Wingless. *Nature*, 2014. **505**(7482): p. 180-5.

164. Hoang B., Moos M. Jr., Vukicevic S., Luyten F.P., Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *J Biol Chem*, 1996. **271**(42): p. 26131-7.
165. Rattner A., Hsieh J.C., Smallwood P.M., Gilbert D.J., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nathans J., A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(7): p. 2859-63.
166. Hsieh J.C., Kodjabachian L., Rebbert M.L., Rattner A., Smallwood P.M., Samos C.H., Nusse R., Dawid I.B., Nathans J., A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 1999. **398**(6726): p. 431-6.
167. Bafico A., Gazit A., Pramila T., Finch P.W., Yaniv A., Aaronson S.A., Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 1999. **274**(23): p. 16180-7.
168. Dennis S., Aikawa M., Szeto W., d'Amore P.A., Papkoff J., A secreted frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates wnt-1 signaling. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 21): p. 3815-20.
169. Leyns L., Bouwmeester T., Kim S.H., Piccolo S., De Robertis E.M., Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 747-56.
170. Salic A.N., Kroll K.L., Evans L.M., Kirschner M.W., Sizzled: a secreted Xwnt8 antagonist expressed in the ventral marginal zone of *Xenopus* embryos. *Development*, 1997. **124**(23): p. 4739-4748.
171. Uren A., Reichsman F., Anest V., Taylor W.G., Muraiso K., Bottaro D.P., Cumberledge S., Rubin J.S., Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 2000. **275**(6): p. 4374-82.
172. Wang S., Krinks M., Lin K., Luyten F.P., Moos M. Jr., Frzb, a secreted protein expressed in the Spemann organizer, binds and inhibits Wnt-8. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 757-66.
173. Xu Y.K., Nusse R., The Frizzled CRD domain is conserved in diverse proteins including several receptor tyrosine kinases. *Curr Biol*, 1998. **8**(12): p. R405-6.

174. Oishi I., Suzuki H., Onishi N., Takada R., Kani S., Ohkawara B., Koshida I., Suzuki K., Yamada G., Schwabe G.C., Mundlos S., Shibuya H., Takada S., Minami Y., The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells*, 2003. **8**(7): p. 645-54.
175. Matsuda T., Nomi M., Ikeya M., Kani S., Oishi I., Terashima T., Takada S., Minami Y., Expression of the receptor tyrosine kinase genes, Ror1 and Ror2, during mouse development. *Mech Dev*, 2001. **105**(1-2): p. 153-6.
176. Forrester W.C., The Ror receptor tyrosine kinase family. *Cell Mol Life Sci*, 2002. **59**(1): p. 83-96.
177. Mikels A.J., Nusse R., Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*, 2006. **4**(4): p. e115.
178. He X., Semenov M., Tamai K., Zeng X., LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development*, 2004. **131**(8): p. 1663-77.
179. Binnerts M.E., Kim K.A., Bright J.M., Patel S.M., Tran K., Zhou M., Leung J.M., Liu Y., Lomas W.E., Dixon M., Hazell S.A., Wagle M., Nie W.S., Tomasevic N., Williams J., Zhan X., Levy M.D., Funk W.D., Abo A., R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(37): p. 14700-5.
180. Bhanot P., Brink M., Samos C.H., Hsieh J.C., Wang Y., Macke J.P., Andrew D., Nathans J., Nusse R., A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature*, 1996. **382**(6588): p. 225-30.
181. Hsieh J.C., Rattner A., Smallwood P.M., Nathans J., Biochemical characterization of Wnt-frizzled interactions using a soluble, biologically active vertebrate Wnt protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(7): p. 3546-51.
182. Wu C.H., Nusse R., Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(44): p. 41762-9.
183. Chen W., ten Berge D., Brown J., Ahn S., Hu L.A., Miller W.E., Caron M.G., Barak L.S., Nusse R., Lefkowitz R.J., Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science*, 2003. **301**(5638): p. 1391-4.

184. Li Y., Bu G., LRP5/6 in Wnt signaling and tumorigenesis. *Future Oncol*, 2005. **1**(5): p. 673-81.
185. Liu G., Bafico A., Harris V.K., Aaronson S.A., A novel mechanism for Wnt activation of canonical signaling through the LRP6 receptor. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(16): p. 5825-35.
186. Tamai K., Zeng X., Liu C., Zhang X., Harada Y., Chang Z., He X., A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell*, 2004. **13**(1): p. 149-56.
187. MacDonald B.T., Yokota C., Tamai K., Zeng X., He X., Wnt signal amplification via activity, cooperativity, and regulation of multiple intracellular PPPSP motifs in the Wnt co-receptor LRP6. *J Biol Chem*, 2008. **283**(23): p. 16115-23.
188. Zeng X., Tamai K., Doble B., Li S., Huang H., Habas R., Okamura H., Woodgett J., He X., A dual-kinase mechanism for Wnt co-receptor phosphorylation and activation. *Nature*, 2005. **438**(7069): p. 873-7.
189. Davidson G., Wu W., Shen J., Bilic J., Fenger U., Stannek P., Glinka A., Niehrs C., Casein kinase 1 γ couples Wnt receptor activation to cytoplasmic signal transduction. *Nature*, 2005. **438**: p. 867.
190. Mao J., Wang J., Liu B., Pan W., Farr G.H., Flynn C., Yuan H., Takada S., Kimelman D., Li L., Wu D., Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell*, 2001. **7**(4): p. 801-9.
191. Zeng X., Huang H., Tamai K., Zhang X., Harada Y., Yokota C., Almeida K., Wang J., Doble B., Woodgett J., Wynshaw-Boris A., Hsieh J.C., He X., Initiation of Wnt signaling: control of Wnt coreceptor Lrp6 phosphorylation/activation via frizzled, dishevelled and axin functions. *Development*, 2008. **135**(2): p. 367-75.
192. Wong H.C., Bourdelas A., Krauss A., Lee H.J., Shao Y., Wu D., Mlodzik M., Shi D.L., Zheng J., Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell*, 2003. **12**(5): p. 1251-60.
193. Wallingford J.B., Habas R., The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development*, 2005. **132**(20): p. 4421-36.

194. Bilic J., Huang Y.L., Davidson G., Zimmermann T., Cruciat C.M., Bienz M., Niehrs C., Wnt induces LRP6 signalosomes and promotes dishevelled-dependent LRP6 phosphorylation. *Science*, 2007. **316**(5831): p. 1619-22.
195. Cliffe, A., Hamada F., Bienz M., A role of Dishevelled in relocating Axin to the plasma membrane during wingless signaling. *Curr Biol*, 2003. **13**(11): p. 960-6.
196. Tolwinski N.S., Wieschaus E., A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS Biol*, 2004. **2**(4): p. E95.
197. Miller, J.R., Moon R.T., Analysis of the signaling activities of localization mutants of beta-catenin during axis specification in *Xenopus*. *J Cell Biol*, 1997. **139**(1): p. 229-43.
198. Cox R.T., Pai L.M., Miller J.R., Orsulic S., Stein J., McCormick C.A., Audeh Y., Wang W., Moon R.T., Peifer M., Membrane-tethered *Drosophila* Armadillo cannot transduce Wingless signal on its own. *Development*, 1999. **126**(6): p. 1327-35.
199. van de Wetering M., Cavallo R., Dooijes D., van Beest M., van Es J., Loureiro J., Ypma A., Hursh D., Jones T., Bejsovec A., Peifer M., Mortin M., Clevers H., Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell*, 1997. **88**(6): p. 789-99.
200. Behrens J., von Kries J.P., Kühl M., Bruhn L., Wedlich D., Grosschedl R., Birchmeier W., Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 1996. **382**(6592): p. 638-42.
201. Molenaar M., van de Wetering M., Oosterwegel M., Peterson-Maduro J., Godsave S., Korinek V., Roose J., Destree O., Clevers H., XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, 1996. **86**(3): p. 391-9.
202. Munemitsu S., Albert I., Rubinfeld B., Polakis P., Deletion of an amino-terminal sequence beta-catenin in vivo and promotes hyperphosphorylation of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(8): p. 4088-94.
203. Yost C., Torres M., Miller J.R., Huang E., Kimelman D., Moon R.T., The axis-inducing activity, stability, and subcellular distribution of beta-catenin is

- regulated in *Xenopus* embryos by glycogen synthase kinase 3. *Genes Dev*, 1996. **10**(12): p. 1443-54.
204. Giles R.H., van Es J.H., Clevers H., Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1653**(1): p. 1-24.
 205. Yang J., Wu J., Tan C., Klein P.S., PP2A:B56 ϵ is required for Wnt/ β -catenin signaling during embryonic development. *Development*, 2003. **130**(23): p. 5569-5578.
 206. Hsu W., Zeng L., Costantini F., Identification of a domain of Axin that binds to the serine/threonine protein phosphatase 2A and a self-binding domain. *J Biol Chem*, 1999. **274**(6): p. 3439-45.
 207. Cong F., Varmus H., Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 2882-7.
 208. Henderson B.R., Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, 2000. **2**(9): p. 653-60.
 209. Wiechens N., Heinle K., Englmeier L., Schohl A., Fagotto F., Nucleo-cytoplasmic Shuttling of Axin, a Negative Regulator of the Wnt- β -Catenin Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(7): p. 5263-5267.
 210. Cavallo R.A., Cox R.T., Moline M.M., Roose J., Polevoy G.A., Clevers H., Peifer M., Bejsovec A., *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature*, 1998. **395**(6702): p. 604-8.
 211. Brantjes H., Roose J., van De Wetering M., Clevers H., All Tcf HMG box transcription factors interact with Groucho-related co-repressors. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(7): p. 1410-9.
 212. Chen G., Fernandez J., Mische S., Courey A.J., A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in *Drosophila* development. *Genes Dev*, 1999. **13**(17): p. 2218-30.
 213. Tago K., Nakamura T., Nishita M., Hyodo J., Nagai S., Murata Y., Adachi S., Ohwada S., Morishita Y., Shibuya H., Akiyama T., Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev*, 2000. **14**(14): p. 1741-9.

214. Takemaru K., Yamaguchi S., Lee Y.S., Zhang Y., Carthew R.W., Moon RT., Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature*, 2003. **422**(6934): p. 905-9.
215. Ye F., Chen Y., Hoang T., Montgomery R.L., Zhao X.H., Bu H., Hu T., Taketo M.M., van Es J.H., Clevers H., Hsieh J., Bassel-Duby R., Olson E.N., Lu Q.R., HDAC1 and HDAC2 regulate oligodendrocyte differentiation by disrupting the beta-catenin-TCF interaction. *Nat Neurosci*, 2009. **12**(7): p. 829-38.
216. Kang D.W., Choi K.Y., Min do S., Phospholipase D meets Wnt signaling: a new target for cancer therapy. *Cancer Res*, 2011. **71**(2): p. 293-7.
217. Wu Z., Zheng S., Li Z., Tan J., Yu Q., E2F1 suppresses Wnt/beta-catenin activity through transactivation of beta-catenin interacting protein ICAT. *Oncogene*, 2011. **30**(37): p. 3979-84.
218. Kang D.W., Min do S., Positive feedback regulation between phospholipase D and Wnt signaling promotes Wnt-driven anchorage-independent growth of colorectal cancer cells. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12109.
219. Park J.I., Venteicher A.S., Hong J.Y., Choi J., Jun S., Shkreli M., Chang W., Meng Z., Cheung P., Ji H., McLaughlin M., Veenstra T.D., Nusse R., McCrea P.D., Artandi S.E., Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 2009. **460**(7251): p. 66-72.
220. Hrdlickova R., Nehyba J., Bose H.R. Jr., Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Mol Cell Biol*, 2012. **32**(21): p. 4283-96.
221. Hoffmeyer K., Raggioli A., Rudloff S., Anton R., Hierholzer A., Del Valle I., Hein K., Vogt R., Kemler R., Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*, 2012. **336**(6088): p. 1549-54.
222. Greider C.W., Molecular biology. Wnt regulates TERT--putting the horse before the cart. *Science*, 2012. **336**(6088): p. 1519-20.
223. Ishitani T., Ninomiya-Tsuji J., Nagai S., Nishita M., Meneghini M., Barker N., Waterman M., Bowerman B., Clevers H., Shibuya H., Matsumoto K., The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*, 1999. **399**(6738): p. 798-802.

224. Lee J.M., Kim I.S., Kim H., Lee J.S., Kim K., Yim H.Y., Jeong J., Kim J.H., Kim J.Y., Lee H., Seo S.B., Kim H., Rosenfeld M.G., Kim K.I., Baek S.H., ROR α Attenuates Wnt/ β -Catenin Signaling by PKC α -Dependent Phosphorylation in Colon Cancer. *Molecular Cell*, 2010. **37**(2): p. 183-195.
225. Topol L., Jiang X., Choi H., Garrett-Beal L., Carolan P.J., Yang Y., Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *J Cell Biol*, 2003. **162**(5): p. 899-908.
226. Shtutman M., Zhurinsky J., Simcha I., Albanese C., D'Amico M., Pestell R., Ben-Ze'ev A., The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(10): p. 5522-7.
227. Yamashita, Y.M., Jones D.L., Fuller M.T., Orientation of Asymmetric Stem Cell Division by the APC Tumor Suppressor and Centrosome. *Science*, 2003. **301**(5639): p. 1547-1550.
228. Habib S.J., Chen B.C., Tsai F.C., Anastassiadis K., Meyer T., Betzig E., Nusse R., A localized Wnt signal orients asymmetric stem cell division in vitro. *Science*, 2013. **339**(6126): p. 1445-8.
229. Zeng Y.A., Nusse R., Wnt proteins are self-renewal factors for mammary stem cells and promote their long-term expansion in culture. *Cell Stem Cell*, 2010. **6**(6): p. 568-77.
230. Lax S.F., Molecular genetic pathways in various types of endometrial carcinoma: from a phenotypical to a molecular-based classification. *Virchows Arch*, 2004. **444**(3): p. 213-23.
231. Mohamed O.A., Jonnaert M., Labelle-Dumais C., Kuroda K., Clarke H.J., Dufort D., Uterine Wnt/ β -catenin signaling is required for implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(24): p. 8579-84.
232. Takahashi-Yanaga F., Kahn M., Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells? *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(12): p. 3153-62.
233. Takebe N., Ivy S.P., Controversies in cancer stem cells: targeting embryonic signaling pathways. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(12): p. 3106-12.

EKLER

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Fallop Tüplerinde Wnt Sinyali Ekspresyon Paternlerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	423

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimler Fakültesi 2. Kat Şehitkamil/Gaziantep
	TELEFON	0342 360 07 53 / 77704
	FAKS	0342 360 39 27
	E-POSTA	gaunetikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Nuray BOSTANCİERİ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji Embriyoloji Bölümü			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Histoloji Embriyoloji Bölümü			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİL CİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
FAZ 4		☐			
Gözlemsel ilaç çalışması		☐			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		☐			
In vitro tıbbi tam cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		☐			
İlaç dışı klinik araştırma	☐				
Diğer ise belirtiniz :					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TÜRK MERKEZİ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐	

DEĞERLENDİRİLEN BİLGİLER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
ERLENDİRİLEN BİLGİLER	Belge Adı			Açıklama		
	SIGORTA	☐				

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı Prof. Dr. Belgin ALAŞTIRIRI
İmza:

Min *Dr. Belgin Alastiriri* *Dr. Nuray Bostancıeri* *Dr. Ali Rıza* *Dr. Ayhan* *Dr. Ali*

Not: Etik kurul başkanının imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	İnsan Fallop Tüplerinde Wnt Sinyali Ekspresyon Paternlerinin İncelenmesi
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	423

KARAR BİLGİLERİ	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER	☐	
	Karar No:2017 /423	Tarih: 26.12. 2017	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıda katılan etik kurul üye tani sayısının salt çoğunluğa ile karar verilmiştir.		
	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr.Belgin ALAŞEHİRLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ	FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Mehmet KESKİN	PEDİATRİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Feridun İŞİK	GÖĞÜS CERRAHİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. İlker SEÇKİNER	ÜROLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Prof. Dr. Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Zeynel Abidin ÖZTÜRK	TEK HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Doç. Dr. Seval KUL	BIYOİSTATİSTİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Yrd. Doç. Dr. Beül TAŞ	AĞIZ DIŞ ve ÇENE CERRAHİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Uzm. Dr. Cahide FİRHAN	FARMAKOLOJİ	Gaziantep İl Sağlık Müdürlüğü	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Eyüp ÇELİK	AVUKAT	Gaziantep Barosu	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	
Recep TÜRK	BANKACI	Ziraat Bankası Gaziantep Bölge Yöneticisi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☐	

* Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Belgin ALAŞEHİRLİ
İmza:

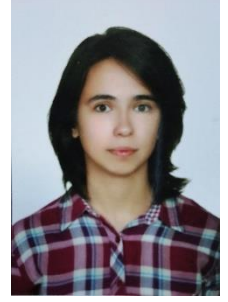
Not: Etik kurul başkanı, imzasının yer almadığı her sayfaya imza atmalıdır.

Elden teslim aldım.

Not: 02.01.2018

18.04.2018

ÖZGEÇMİŞ



Naciye ÖZYURT

Tel: 0 541 639 1934

Adres: Gaziantep Üniversitesi Temel Tıp Bilimleri Binası Kat:3 Histoloji ve Embriyoloji AD

Doğum Tarihi: 15.11.1993
Doğum Yeri: Kozan/ADANA
Uyruğu: T.C.
Medeni Hali: Bekar

Eğitim Durumu:

2016 - ... **Gaziantep Üniversitesi (GAZİANTEP)**
Histoloji ve Embriyoloji AD Yüksek Lisans
2011 – 2016 **Cumhuriyet Üniversitesi (SİVAS)**
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
2007 – 2011 **Kozan Anadolu Öğretmen Lisesi (Kozan/ADANA)**
Ortaöğretim
1999 – 2007 **Atatürk İlköğretim Okulu (Kozan/ADANA)**

İlköğretim

Yabancı Dil: **İngilizce**

YÖKDİL (Sağlık Bilimleri) 66,25

YDS (65)

Katıldığı Seminer, Kongre ve Kurslar:

22-25 Kasım 2018 **Ejons International Journal On Mathematics, Engineering & Natural Sciences**

- EJONS 5. Uluslararası Matematik, Mühendislik, Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi

21-22 Aralık 2017 **Middle Eastern Association for Cancer Research (MEACR)**

- The 7th Annual Meeting of the Middle Eastern Association for Cancer Research, Cancer Research from Basic Science to Clinic

2-6 Ekim 2017 **Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi**

- Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları
- Kök Hücrede Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi

5-6 Mart 2017 **Marmara Üniversitesi**

- 6. Kök Hücre Sempozyumu ve Kök Hücre Kursu

8-10 Mart 2013 **İstanbul Üniversitesi Genetik Kulübü (İÜGEN)**

- 10. İÜGEN Uluslararası Moleküler Biyoloji ve Genetik Kış Okulu

23 Aralık 2011 **Marmara Üniversitesi ve Türk İmmünoloji Derneği**

- 2. Kök Hücre Sempozyumu

Ulusal ve Uluslararası Toplantılarda Sunulan Bildiriler

BOSTANCIERİ N., MARTBAŞ Ş., ÖZYURT N., POLAT S., *Moringa oleifera* Lam Ekstraktının (MOLE) Sertoli Hücresinin İnce Yapısı Üzerine Etkisi: Rat Testisinde Deneysel Bir Kriptorşidizm Modeli. EJONS 5. Uluslararası Matematik, Mühendislik, Fen ve Sağlık Bilimleri Kongresi, Gaziantep, 22-25 Kasım 2018.

Bilgisayar Bilgisi:

* Microsoft Windows 7/8/8.1/10

* Microsoft Office

* MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

İlgi Alanları:

Sinema, Edebiyat

