



**CRISPR/Cas 9 genom düzenleme teknolojisi kullanılarak
fare modelinde implantasyon sürecini kontrol eden
genlerin ortaya çıkarılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 118S676

Proje Yürütücüsü:

Dr. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU

Araştırmacı(lar): Dr. Şule Ayla

Dr. Ece Keskin

Danışman(lar): Dr. Ceyda Açılan Ayhan

Vet Dr Ali Cihan taşkın

Doç. Dr. Mehmet Gönen

Bursiyer(ler): Gizem Nur Şahin

Aylin Seren Güller

NİSAN 2023

İSTANBUL

ÖNSÖZ

Bu projenin ana hedefi daha önce implantasyonla ilgili kurulmamış genleri ve bunların implantasyon alanındaki etkisini ortaya çıkarmaktır. Proje bu açıdan başarılı olmuş ve RNA dizi analizi daha önce implantasyonla fazla bağdaştırmadığımız pek çok genle tanışmamızı sağlamıştır. Bu genlerin uygun olanları ile yaptığımız genom düzenleme deneyleri implantasyon alanındaki hücrelerin manipüle edilebilir hücreler olduğunu ortaya koymuştur. Sadece artan değil azalan genlerle ilgili veriyi de RNA dizi analizi ile elde etmiş olmamız üzerinde çalışmak için bize yepyeni alanlar açmaktadır.

Bu süreç içinde bilim yapmanın ekonomik nedenlerle tüm dünyada giderek zorlaştığı bu dönemde projemizi destekleyen TÜBİTAK'a sonsuz minnetimizi proje ekibimiz adına bildirmek isterim.

Bu proje ile elde ettiğimiz verileri çoğaltarak ve hatta çalışmamıza devam ederek etki değeri yüksek bir bilimsel dergide verimizi sunmak ve elde ettiğimiz verilerle yeni ve translasyonel projelerin içinde bulunmak en büyük hedefimizdir.

Proje ekibimiz adına saygılarımı sunarım.

Dr. Öğr. Üyesi Serçin Karahüseyinoğlu

Proje Yürütücüsü

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
3. GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.1 Fare embriyolarının elde edilmesi	8
3.1.1 Süperovulasyon ve Oositlerin hazırlanması	8
3.1.2 İn Vitro Kültür.....	8
3.1.3 Deney gruplarında kullanılacak blastokistlerin seçilmesi	8
3.2 Sekans ve genom düzenleme deneyleri için fare blastokistlerinin hazırlanması	9
3.2.1 RNA dizi analizi deneyleri için kullanılacak GFP (+) blastokistlerin hazırlanması	9
3.3 Üç boyutlu endometriyal ko-kültür ortamının hazırlanması	9
3.3.1 Fare endometriyum epitel ve stroma hücrelerinin izolasyonu	9
3.3.2 Hücre dışı matrix (Matrijel®) kullanılarak üç boyutlu (3B) endometriyum ko-kültürü (EKK) oluşturulması	10
3.4 RNA dizileme (sekans) analiz deneyleri	10
3.4.1 Dizi analizi için deney gruplarının oluşturulması	10
3.4.2 RNA dizilemesi için örneklerin hazırlanması	11
3.4.3 RNA dizileme.....	12
3.4.4 RNA dizileme Sonrası Biyoinformatik Analizi	12
3.5 RNA sekans analizi sonrasında gen seçimi ve düzenlenmesi	13

3.5.1	Genlerin seçimi.....	13
3.5.2	sgRNA Dizayn Edilmesi	13
3.5.3	Endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenlenmesi	14
3.5.4	Zigotlarda genom düzenlenmesi.....	15
3.6	CRISPR/CAS9 ile genom düzenlemesi yapılmış hücrelerde implantasyon deneyleri 15	
3.6.1	Endometriyuma spesifik genlerin düzenlenmesi	15
3.6.2	Blastokiste spesifik genlerin düzenlenmesi	16
3.6.3	İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi.....	16
3.7	İstatiksel yöntemler.....	19
4.	BULGULAR.....	20
4.1	Fare embriyolarının elde edilmesi	20
4.2	Üç boyutlu endometriyal ko-kültür ortamının hazırlanması	22
4.2.1	Fare epitel ve stroma hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu	22
4.2.2	Üç boyutlu endometriyal ko-kültür (EKK) ortamları	23
4.3	Fare blastokistlerin seçilmesi	24
4.3.1	Elde sonrası zigotların inkübasyonu ve blastokistlerin oluşturulması ve seçilmesi 24	
4.4	Hücrelerin ve zigotun viral transdüksiyonu	25
4.4.1	Epitel ve stroma hücrelerinin viral transdüksiyonu	25
4.4.2	Zigotların transfeksiyonu ve transdüksiyonu	26
4.5	RNA dizi analizleri öncesi optimizasyon deneyleri.....	29
4.6	Hücre ayrıştırma deneyleri	29
4.6.1	İnsan villöz trofoblastların (HVT) kullanıldığı ko-kültürlerde FACS	29
4.6.2	LIF geninin epitel ya da stroma hücrelerinde susturulması ve sonrasında hücrelerin ayrıştırılması	30
4.7	Genom düzenleme optimizasyonu.....	34
4.7.1	Epitel ve stromada viral transdüksiyon çalışmaları	34
4.7.2	Mikroenjeksiyon çalışmaları.....	40

4.7.3	RNA dizilim için kullanılacak örneklerde optimizasyon çalışmaları.....	43
4.8	RNA dizileme analizleri.....	49
4.8.1	Dizilemede kullanılan örneklerin analizi.....	49
4.9	Genlerin seçilmesi	65
4.9.1	Epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenlemesi için genlerin seçilmesi ve doğrulanması	65
4.9.2	Blastokistte genom düzenlenmesi için genlerin seçilmesi ve doğrulanması	65
4.9.3	Doğrulanmış genlerin gRNAlarının oluşturulması ve sekans kontrolü.....	66
4.10	Deney grupları ve gruplarda implantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi	71
4.10.1	Deney grupları	71
4.10.2	İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi.....	72
4.10.3	Western blotlama analizleri.....	77
4.10.4	İmmünfloresan boyama analizleri	78
4.10.5	Canlı/Ölü hücre analizleri	79
5.	TARTIŞMA	80
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	92
	KAYNAKLAR	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. İmplantasyon analizi için kullanılan qPCR primerleri.

Tablo 2. Zigotta mikroenjeksiyon işlemleri.

Tablo 3. Kullanılan genlerin doğrulaması için kullanılmış primerlerin listesi.

Tablo 4. Doğrulanmış genler için hazırlanan gRNA'lar.

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1. İmplantasyonda etkili genler.
- Şekil 2. CRISPR (B) ile genlerin susturulması.
- Şekil 4. RNA analizi için ilk oluşturulan deney düzeneği.
- Şekil 4. İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi.
- Şekil 5. Farelerin ovulasyonu sonrası uterus eldesi.
- Şekil 6. Farelerde süperovulasyon sonrası zigot oluşumu.
- Şekil 7. Zigotların izolasyonu ve endometriyum hücrelerinin eldesi öncesi uterus.
- Şekil 8. Uterusun izolasyon öncesi konfokal mikroskop altındaki görüntüsü.
- Şekil 9. Endometriyum hücrelerinin izolasyonu ve kültürü.
- Şekil 10. Epitel ve stroma hücrelerinin karakterizasyonu.
- Şekil 11. Üç boyutlu endometriyal ko-kültürün hazırlanması.
- Şekil 12. Blastokistlerin oluşturulması ve seçimi.
- Şekil 13. GFP ve mCherry (+) endometriyum hücreleriyle ko-kültür oluşturulması.
- Şekil 14. Transfeksiyon/Transdüksiyon için uygulanan yöntemlerde kullanılan dozlar ve etkileri.
- Şekil 15. Piezzo manipülasyonun ayrıntıları.
- Şekil 16. GFP (+) embriyolar.
- Şekil 17. GFP (+) blastokistlerde oluşturulan 3-boyutlu kültürler.
- Şekil 18. GFP HVT sferoid, RFP stroma ve işaretsiz epitel hücrelerinin ayrıştırılması.
- Şekil 19. FACS için hazırlanan gruplar.
- Şekil 20. Kontrol grubunda 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları.
- Şekil 21. Grup 3'te 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları.
- Şekil 22. Grup 4'te 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları.
- Şekil 23. LIF'in susturulmadığı ve susturulduğu gruplarda LIF ve MMP9, PR ve ER'nin ekspresyonları
- Şekil 24. p53 geni endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenleme çalışmaları.
- Şekil 25. Yabancı epitel, stroma ve blastokist ko-kültüründe implantasyonla ilgili bazı genlerin ifadesi.
- Şekil 26. Mutant epitel (A) veya mutant stroma (B) hücreleri ile kurulmuş kültürlerde p53 geninin diğer implantasyon genlerine etkisi.

Şekil 27. Gruplarda p53 ve MMP9 gen ifadeleri.

Şekil 28. İmplantasyon alanında östrojen ve progesteron reseptörlerinin p53 geni susturulduğunda gen ifadeleri.

Şekil 29. Fibronektin ve entaktin genlerinin mutant ve kontrol gruplarında ifadesi.

Şekil 30. LIF ve E-kaderin genlerinin genlerinin mutant ve kontrol gruplarında ifadesi.

Şekil 31. Gelişimsel genlerin ifadeleri.

Şekil 32. Virus /plazmid mikroiinjeksiyonunun blastokistin canlılığına etkisi.

Şekil 33. Subzonal virus enjeksiyonu.

Şekil 34. Blastokistlerden elde edilen RNA'nın RIN değeri.

Şekil 35. mCherry ve GFP hücrelerde FACS.

Şekil 36. Transwell grubu deneylerinde 72. saatte hücrelerin ayrılması.

Şekil 37. Matrijel grubu deneylerinde de 72. saatte hücrelerin ayrılması.

Şekil 38. Transwell grubu deneylerinde 24. saatte hücrelerin ayrılması.

Şekil 39. Matrijel grubu deneylerinde 24. saatte hücrelerin ayrılması.

Şekil 40. RNA dizileme öncesi kültür düzeneği.

Şekil 41. RNA dizileme analizi öncesinde örneklerin analiz uygunluğu için kontrolü.

Şekil 42. RNA dizileme için uygun bulunan öncü örnekler.

Şekil 43. RNA dizileme için kullanılan örneklerin ve kullanılan RNA miktarının listesi.

Şekil 44. DESeq2 yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 45. DESeq2 yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 46. DESeq2 yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 47. DESeq2 yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. Saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 48. EdgeR yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 49. EdgeR yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 50. EdgeR yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 51. EdgeR yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 52. Limmi yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 53. Limmi yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 54. Limmi yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 55. Limmi yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri.

Şekil 56. Matrijelde yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 57. Transwellde yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 58. Matrijelde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 59. Transwellde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 60. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 61. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri.

Şekil 62. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel ve stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde ortak genlerin analizi.

Şekil 63. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel ve stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde ortak genlerin analizi.

Şekil 64. Transkriptomun PCA plot analizi.

Şekil 65. Epitel ve stromada susturulması planlanan genlerin doğrulanması.

Şekil 66. Hmga2 için gRNA sekans sonuçları

Şekil 67. Gm15452 için gRNA sekans sonuçları

Şekil 68. Tmem158 için gRNA sekans sonuçları

Şekil 69. Gata3 için gRNA sekans sonuçları

Şekil 70. Genlerin susturulması için kullanılması planlanan gRNA'ların qPCR sonuçları.

Şekil 71. Genom düzenlenen deney grupları ve kontrol grupları

Şekil 72. Epitel hücrelerinde Hmga2'nin susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi.

Şekil 73. Epitel hücrelerinde Gm15452'nin susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi

Şekil 74. Stroma hücrelerinde Tmem158'in susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi

Şekil 75. Blastokistte Tmsb4x'in susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi

Şekil 76. Blastokistte GATA3'ün susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi

Şekil 77. MMP9'un Hmga2 genin susturulduğu epitel hücrelerinde protein ifadesi

Şekil 78. İmmünofloresan boyamaların sonuçları.

Şekil 79. Canlı ve ölü hücre analizleri.

ÖZET

İmplantasyon başarısızlığı embriyonun endometriyuma invazyonu ile birlikte embriyonun trofoektoderm hücrelerinden salgılanmaya başlanan koryonik gonadotropinin hiç salgılanmaması veya salgılanması ancak gebelik kesesi oluşmaması durumudur. Yardımla üreme tekniklerine (YÜT) ihtiyaç duyulmayan spontan gebeliklerde dahi ilk denemede implantasyon başarısızlığı olma ihtimali %25-40 arasındadır. Bu projede genom düzenlenmesi konusundaki etkinliği kanıtlanmış olan CRISPR/Cas9 yöntemi ile implantasyonda etkinliği olan genlerin aktivitesi, birbirlerini ile olan etkileşimi, zamana ve hücre tipine bağlı değişkenliği, *in vitro* koşullardaki etki değişikliği, implantasyon üzerine etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda *in vitro* üç boyutlu olarak oluşturulmuş kültür ortamında farklı deney gruplarında inkübe edilen blastokistlerden 24. ve 72. Saatlerde örnekler alınmış, örneklerde RNA dizi analizi yapılmış ve etkin olan genler ortaya konulmuştur. Dizi analizi sonucunda etkin olduğu belirlenen her gen için blastokist, endometriyum epitel ve endometriyum stroma hücreleri ayrı ayrı susturulmuş ve her grup için *in vitro* implantasyon parametreleri incelenmiştir.

Elde edilen veriye göre endometriyum epitel hücrelerinde Hmga2 ve Gm15452; stroma hücrelerinde Tmem158, blastokistlerde GATA3 ve Tmsb4x genleri üzerinde çalışılmıştır. Bu genlerin etkin olarak susturabildiği gruplarda implantasyon parametreleri olarak belirlenen adezyon ve invazyon ile ilgili genlerle, gelişimsel ve fonksiyonel genlerde anlamlı değişiklikler gösterilmiştir. Epitel hücrelerinde Hmga2'nin susturulması ile LIF, MMP9, PR, entaktin, Timp3, Esr1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Hoxa10 ve Wnt 4 genlerinin farklı zaman gruplarında anlamlı olarak değiştiği, Epitel hücrelerinde Gm15452'nin susturulması sonrasında LIF, MMP9, PR, entaktin, TIMP3, fibronektin, laminin, Esr1, Muc1, Erbb1, Erb2, Wnt 4 ifadelerinde anlamlı olarak değiştiği, Stroma hücrelerinde Tmem158'in susturulması ile Pr, entaktin, Timp3, Fibronektin, Esr1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Hoxa10, Wnt4 ifadelerinin anlamlı olarak etkilendiği belirlenmiştir. Blastokistlerde de Tmsb4x ve Gata3 genleri susturulmuş olup, iki genin de invazyon ve gelişimde rol alan genlerle ilişkili olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: İmplantasyon, fare, RNA dizileme, CRISPR/Cas9, 3B kültür, *in vitro*

ABSTRACT

Implantation failure is an event where chorionic gonadotropins which should be secreted by embryonic trophectoderm are not secreted at all or there is no formation of a gestational sac. Even in spontaneous pregnancies where ART (assisted reproductive technologies) is not needed the rate of implantation failure in first trial is 25-40%. In ART cases, on the other hand, maximum implantation rate was shown to be 40-60% in the meta analysis. In this project proposal, it was aimed to demonstrate the activity of implantation-active genes, interaction of these genes with each other, time and cell type dependency, effect of *in vitro* conditional changes on implantation and fetus growth via use of CRISPR/Cas9 method that has a proven effectiveness on genomic regulation. Samples were incubated at 24th and 72nd hours in different experimental groups in a three-dimensional culture *in vitro* and were analyzed by RNA sequencing so that the effective genes have been revealed. Blastocyst, endometrium epithelium, and endometrium stromal cells were separately silenced for each gene determined to be effective by sequence analysis and were examined by *in-vitro* implantation parameters for each group. The data analysis has led gene knockout for Hmga2 and Gm15452 in endometrial epithelial cells, gene knock out for Tmem158 in endometrial epithelial cells, and GATA3 and Tmsb4x knock out in blastocysts. In the groups where these genes have been efficiently silenced, adhesion and invasion related genes are significantly affected, as well as the developmental and functional genes. According to our results silencing of Hmga2 in epithelial cells has resulted in significant alterations in expressions of LIF, MMP9, PR, entactin, Timp3, Esr1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Hoxa10 and Wnt 4, while silencing of Gm15452 in epithelial cells has resulted in significant alterations in expressions of LIF, MMP9, PR, entactin, TIMP3, fibronectin, laminin, Esr1, Muc1, Erbb1, Erb2, Wnt 4. In addition silencing of Tmem158 in endometrial stromal cells has resulted in changes in expression of Pr, Entactin, Timp3, Fibronectin, Esr1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Hoxa10, Wnt4. The Tmsb4x and Gata3 genes were also silenced in blastocysts, and it was observed that both genes were associated with genes involved in invasion and development.

Keywords: Implantation, mouse, RNA sequence, CRISPR/Cas9, 3D culture, *in vitro*

1. GİRİŞ

İmplantasyon oosit maturasyonun erken dönemlerinde başlayıp embriyo ve oosit arasındaki kompleks ilişkiye dayanmaktadır (Emiliani vd., 2005). Östrojen ve progesteron hormonlarının dinamik dalgalanmasının etkisiyle üreme siklusu üç evrede incelenir (Wang vd., 2006). İlk evre olan proöstrus veya foliküler evrede östrojen düzeyi çok yüksektir (Micheal vd., 1976). İkinci evre hemen ovulasyon sonrası iki hormonun da düzeyinin daha düşük olduğu evredir. Son evre luteal fazdır ve östrojen ve progesteron korpus luteumdan salgılanır. Embriyo implantasyonu luteal evrede olur. Bu evrede farede progesteron düzeyi yeni oluşan korpus luteumlardan kaynaklanan salgı nedeniyle yüksektir. Gebeliğin dördüncü günündeki (gün 1: vajinal plug) preimplantasyon östrojen artışı bu yüksekliğe eşlik eder ve dördüncü günün gece yarısında implantasyon gerçekleşir (McCormack vd., 1974). Başarısızlığın sebepleri arasında embriyonun kalitesi ve hangi gelişim fazında olduğunun yanı sıra transfer edilen embriyo sayısı, anne yaşı ve uterus alıcılığı ile de yakından ilgilidir (Coughlan vd., 2014). Birçok infertilite nedenini tedavi eden ve ortadan kaldıran IVF/ET (in vitro fertilizasyon/embriyo transferi) tekniklerindeki gelişmelere karşın yardımla üreme teknikleri (YUT) ile gebelik sonuçları temel olarak implantasyon başarısızlığı nedeniyle hala daha düşüktür (Coughlan vd., 2014). Başarılı implantasyon blastokistin implante olma kapasitesinin yanı sıra endometriyumun reseptivitesinin senkronizasyonu ile ilgilidir. Bu iki olay over kaynaklı östrojen ve progesteron başta olmak üzere maternal hormonlar tarafından düzenlenir. İmplantate olan embriyoya yanıt olarak embriyonun büyüme ve invazyonunu sağlamak için çevre stromal desidualizasyon adı verilen hücresel değişime uğrar (Lim vd., 2010). Desidua embriyonun yaşaması için gerekli ortamı sağlar. Aynı zamanda semi-allojenik olan embriyoya karşı gelişen maternal bağışıklık yanıtına karşı bariyer oluşturur. Klinik olarak implantasyon ultrasonografi altında gebelik kesesinin izlenmesi olarak tanımlanır. İmplantasyon başarısızlığı embriyonun endometriyuma invazyonu ile birlikte embriyonun trofoektoderm hücrelerinden salgılanmaya başlanan koryonik gonadotropinin hiç salgılanmaması veya salgılanması ancak gebelik kesesi oluşmaması durumudur. Yardımla üreme tekniklerine (YÜT) ihtiyaç duyulmayan spontan gebeliklerde dahi ilk denemede implantasyon başarısızlığı olma ihtimali %25-40 arasındadır. YÜT vakalarında ise en fazla implantasyon oranı meta analizlerde %40-60 olarak belirtilmiştir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen veri göz önüne alındığında her iyi kalite embriyonun her siklуста implante olmadığı belirlenmiştir. Embriyolojinin klinik uygulamaları arasında yer alan ve embriyo transferi sonrasında gebelik oranlarının artması için yapılan girişimler (hücre dışı matriksten zengin transfer besiyeri kullanımı, endometriyumu transfer

öncesi aktive etme çalışmaları vb) de yeterli derecede verimli olamamıştır. İmplantasyon defekti sonucunda sağlıklı gebeliğin gelişmemesi durumu sadece insanlara özgü bir durum olmayıp çeşitli memelilerde de sıkça görülmektedir.

CRISPR/Cas9 yöntemi hücrede istenen genlerin düzenlenmesini, susturulmasını veya eklenmesini sağlayan bir genom teknolojisi. CRISPR sayesinde gen diziliminde ekleme, çıkarma, duplikasyon veya translokasyon amaçlanabilir. CRISPR / Cas9 sistemi geniş bir yelpazede farklı türler, dokular ve hücrelerde genom düzenleme için kullanılmaktadır. Ancak sonuç, çözünürlük, etkinlik, doğruluk ve mutasyon yapısı açısından hedef bölge seçimi, sgRNA tasarımı, endonükleazın özellikleri, çift zincir kırıklarının benzersiz olup olmadığı, endonükleaz ve sgRNA'nın miktarı, DNA onarım yollarındaki gerçek farklılıklar gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Embriyonik kök hücre yöntemi ile susturulan genlerin başarıları %50-55 oranında kalırken CRISPR yöntemi ile susturulan genlerin başarıları %85-95 oranında değişmektedir.

Bu proje önerisinde genom düzenlenmesi konusundaki etkinliği kanıtlanmış olan CRISPR/Cas9 yöntemi ile implantasyonda etkinliği olan genlerin aktivitesi, birbirlerini ile olan etkileşimi, zamana ve hücre tipine bağlı değişkenliği, in vitro koşullardaki etki değişikliği, implantasyon üzerine etkisinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Bu hedef doğrultusunda *in vitro* üç boyutlu olarak oluşturulmuş kültür ortamında farklı deney gruplarında inkübe edilen blastokistlerden 24. ve 72. saatlerde örnekler alınması, örneklerde RNA sekans analizi yapılması, etkin olan genlerin ortaya konulması ve sekans analizi ile etkin olduğu belirlenen genlerin blastokist, endometriyum epitel ve endometriyum stroma hücreleri ayrı ayrı susturularak *in vitro* implantasyon parametrelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Daha önce implantasyonda etkili olduğu veya etkinin ne şekilde olduğu bilinmeyen genlerin implantasyonun 3 aşamasında yarattığı etkiler sonuçlar kısmında sunulmaktadır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

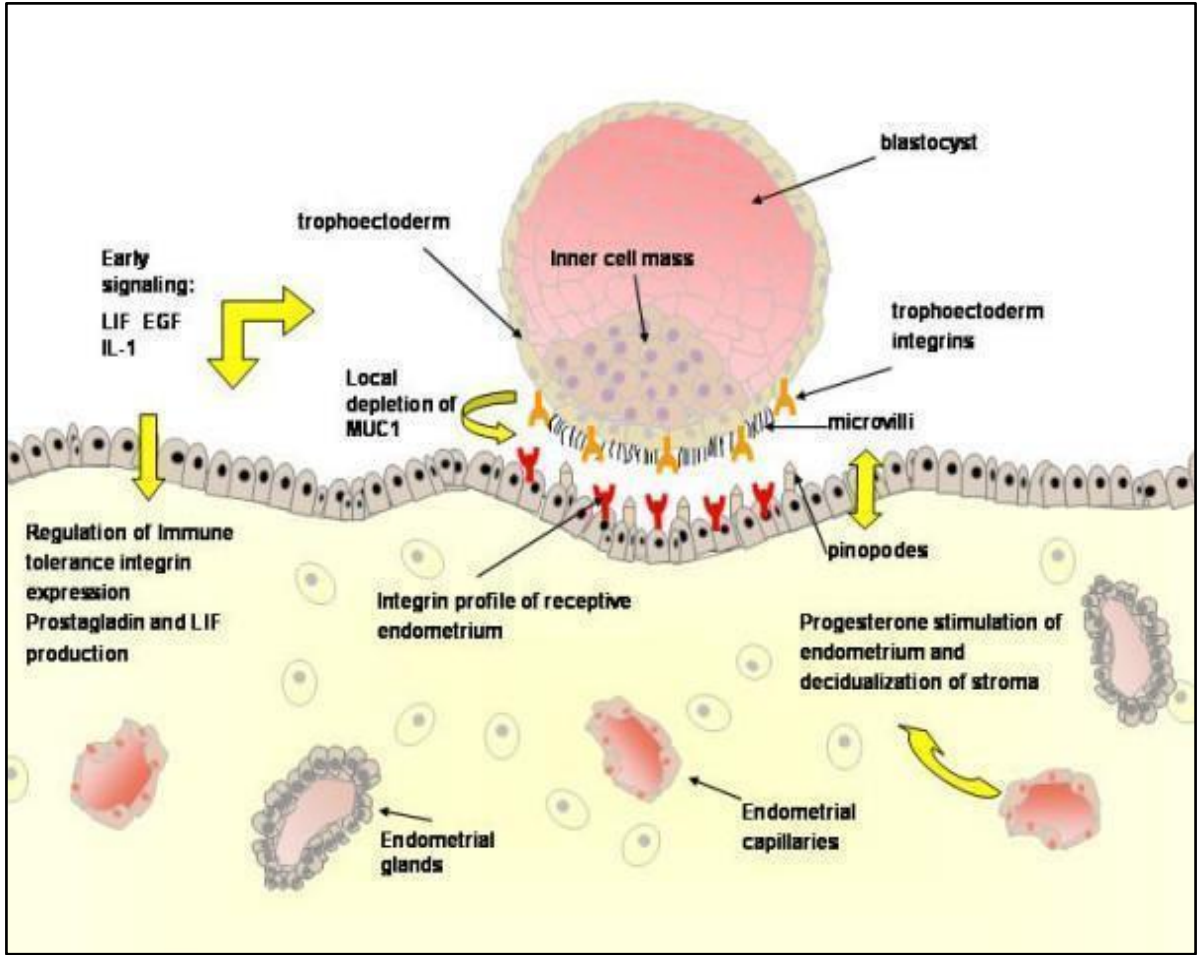
Doğal siklusta endometriumun nötr, reseptif ve refrakter olmak üzere 3 farklı dönemden geçer (Bergh vd., 1992). Blastosist implantasyonu ise şu üç ana süreci içerir: Apozisyon, ataşman ve blastokistin invazyonu (Hirota, 2019). Reseptif endometriyumda blastokistler sadece implantasyon penceresi adı verilen dönemde implante olabilirler (Yoshinaga, 1988). Farelerde bu zaman gebeliğin dördüncü gününde (Wang vd., 2006), insanlarda ise ovulasyondaki LH pikinden 6-10 gün sonradır (Rashid vd., 2011). İmplantasyon için endometriyum hem yapısal hem de fonksiyonel olarak değişim geçirir ve salgı üretiminin artmasının yanı sıra damarlanma ile de blastokist için gerekli ortam hazırlar. Embriyonun beslenmesi gerekli olan moleküller endometriyum tarafından uterus boşluğuna salınır ve uterus boşluğunda 72 saat geçirecek olan blastokistin beslenmesi amaçlanır (Boron vd., 2016). Uterus alıcılığında temel olarak steroid hormonlar (progesteron ve östrojen) (Tranguch vd., 2005) ve sitokinler rol oynar. Çalışılmış tüm sitokinler arasında LIF implantasyonla en ilgilidir (White vd., 2007). LIF ekspresyonu önce uterin glandlerde daha sonra ise tutunma sırasında blastokisti çevreleyen stroma hücrelerinde artar. Blastokist apozisyon ve yapışmasında adezyon molekülleri büyük rol oynar. Bu moleküllerin başlıcaları integrinler, trofinin/bistin/tastin kompleksi, selektinler ve kaderinlerdir (Zhang vd., 2013). E-kaderin implantasyondan önce luminal epitelde artarken blastokist invazyonundan önce azalır. Bu olayın hücre-hücre bağlantılarının gevşemesini sağladığı için implantasyon için gereklidir (Liu vd., 2012). Bunun yanı sıra, uterus epitel ve stroma hücreleri arasındaki uyumda bu parakrin etkilerin östrojen ve progesteron tarafından etkilendiği ve bu hormonların reseptörlerinde (özellikle farede gebelik progesteronu olan P4 reseptörü ve infertilitede önemli ER- α reseptörü) gebelikle değişiklik gözlemlendiği belirlenmiştir (Chung vd., 2011).

İmplantasyonun gerçekleşmesi için endometriyumun reseptif olmasının yanı sıra blastokistin de aktif halde olması gerekmektedir. Blastokistin aktif hale gelebilmesi için belirli gen ekspresyonlarının artmasının yanı sıra morfolojik olarak da değişiklik göstermesi gerekmektedir. Morfolojik olarak gerçekleşen değişiklikler ovaryan progesteron ve östrojenin etkisi altında luminal epitelin implantasyon bölgesinde düzleşmesi ve polaritesini kaybetmesi ile gerçekleşir. Aynı zamanda aktif blastokistlerde trofoblast hücreleri daha çok mikrovillüse sahiptirler ve sitoplazmalarında bol miktarda glikojen bulunur. Aktive edilmiş blastokistler uterus ile iletişim kurduktan sonra, implantasyona uygun blastokistler implantasyonu başlatır (Hiratsuka vd., 2022).

İmplantasyon sırasında trofoblast hücreleri tarafından adezyon moleküllerinin yanı sıra proteazlar ve sitokinler salgılanır (Zhang vd., 2013). HB-EGF embriyoda gerekli tutunma ve invazyon için trofoblast farklılaşmasını sağlar (Staun-Ram vd., 2005). İmplantasyon için

kompetansı olan blastokistlerde HB-EGF reseptörü olan ErbB1 ve ErbB4 ekspresyonunda ve ligand bağlama kapasitesinde artış gözlenir (Norwitz vd., 2001). İntegrinler, EGF (epidermal growth factor), TGF- β (transforming growth factor β) endometrial ve trofoblast kaynaklı olmak üzere iki taraftan da salgılanarak implantasyonda görev alırlar. İmplantasyon öncesi trofoektoderm hücreleri tarafından Cdx2, Tead4 and Eomes transkripsiyon faktörleri salgılanırken iç hücre kitlesi hücreleri tarafından hem farklılaşma kapasitesini artırmak hem de çoğalmalarını sağlamak amaçlı Oct4, Sox2 ve Nanog transkripsiyon faktörlerinde artış görülür. Embriyo implantasyonu, plasentasyon ve fetomaternal toleranstaki kusurlar gebelik başarısızlıklarına neden olabilir. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan gebelik kaybı veya preeklampsi (PE) dahil olmak üzere çeşitli bozuklukların gebelik başarısızlığına katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bu hastalıkların çoğu için, in vitro patolojiyi taklit etmedeki zorluklar nedeniyle kesin etiyoloji bilinmemektedir, bu da teşhis, tedavi ve korunmalarını zorlaştırmaktadır (Li vd, 2022).

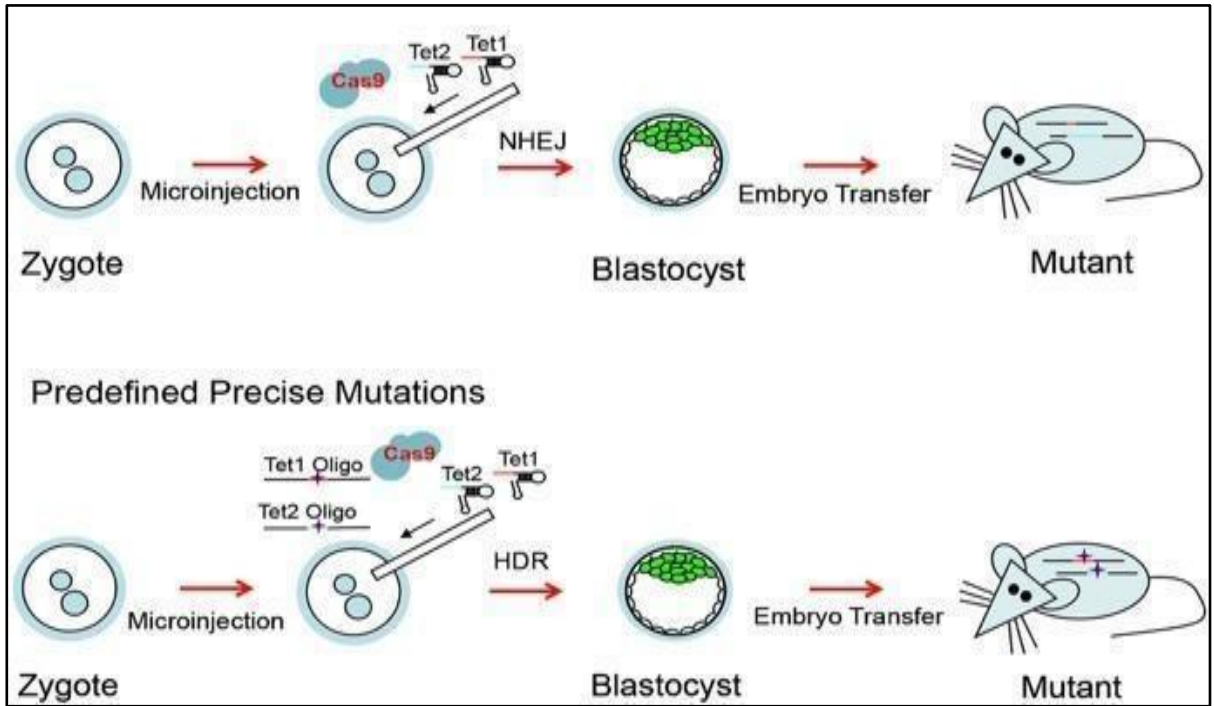
İmplantasyona yönelik modifikasyonlar uygulanmaktadır. Örneğin, IVF'te implantasyonu artırmaya yönelik birçok teknik kullanılmakta ve embriyo tarafından salgılanan sekretomikler ve metabolomikler sayesinde üreme potansiteli en yüksek kalite blastokistler seçilmektedir. IVM (in vitro maturasyon), destekli yuvalama (assisted hatching), gebelik aşısı, embriyo tutkalı implantasyon başarısını artırmak amaçlı kullanılır. Bunun yanı sıra *in vitro* çalışmalarda iki ya da üç boyutlu kültürler kullanılabilir. Embriyo implantasyonu daha önceki yapılan çalışmalarda epitel (Liu vd., 2012), stroma hücreleri (Diedrich vd., 2007) ve desidua hücreleri (Wang vd., 2000) kokültüre edilerek implantasyona etkileri gözlemlenmiştir. İki boyutlu ko-kültür modellerinde trofoblast sferoitlerinin stroma hücreleri üzerinde kültüre edilmesinin implantasyon ve plasenta oluşumu için trofoblastın invaziv olmasının yanı sıra blastokistin implantasyonu ve plasenta oluşumuna katkısı olduğu ispatlanmıştır (Sozen vd., 2014). İmplantasyonun ilerlemesini ve implantasyon sonrası embriyonik gelişimi görselleştirmek ve manipüle etmek için, embriyoların in vitro kültür tekniği 1930'lardan beri kullanılmaktadır (Gua vd, 2022). 3 boyutlu implantasyon modellemelerde endometriyal epitel ve stroma hücreleri fare tümör hücrelerinden elde edilen hücre dışı matriks ortamında kültüre edilerek blastokist invazyonu 3 boyutlu olarak değerlendirilmiştir (Desrochers vd., 2016). Üç boyutlu kültür ortam özelliğini veren matrijel hücreler arası laminin, kollajen IV, heparan sülfat proteoglikan, entaktin ve büyüme faktörleri bakımından zengindir. İmplantasyonda etkili genler şekil 1'de izlenebilir.



Şekil 1. İmplantasyonda etkili genler. İntegrin profili/pinopodların görünümü ile tanımlanan, alıcı endometriyuma yaklaşan bir blastokistin şematik gösterimi (Staun-Ram and Shalev, 2005).

Birçok biyolojik olayda hem moleküler mekanizmaları daha yakından incelemek hem de ifadesi değişen gen ürünlerinin biyolojik olaylar üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla genom düzenleme teknikleri kullanılmaktadır. Bu tekniklerden günümüzde en yaygın kullanılan CRISPR/Cas9 sistemlerine dayanan tekniklerdir. Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR), daha önce karşılaşılan virüs genomlarından ve diğer invaziv DNA'dan yakalanan boşluklarla kesilen, bakteri ve arkeal genomlarda bulunan tekrarlayıcı dizilerdir. Görevleri, tekrar karşılaşıldığında aynı invaziv DNA tipini indirgemek için RNA yönlendirmeli endonükleazlar gibi davranan CRISPR ile ilişkili (Cas) proteinler yoluyla bir adaptif bağışıklık biçimi sağlamaktır. CRISPR /Cas9 endonükleaz yöntemi ile DNA üzerinde çift zincir kırıkları meydana getirilerek bir veya birden fazla gen üzerinde istenilen mutasyon anda anda gerçekleştirilebilir iken diğer karışık gen düzenlemeleri de yapılabilir (Meseguer vd., 2001). Kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrar (CRISPR) ile ilişkili sistem (Cas) gibi genom düzenleme araçları, hayvan zigotları ve insan hücreleri dahil olmak üzere model

sistemlerdeki genleri değiştirmek için yaygın olarak kullanılmıştır ve hem temel araştırma hem de klinik uygulamalar için muazzam bir umut vaat etmektedir. Bugüne kadar, insan erken embriyolarındaki DNA onarım mekanizmalarına ilişkin anlayışımızda ve insan implantasyon öncesi embriyolarında CRISPR/Cas9 gibi teknolojilerin kullanımının verimliliği ve potansiyel hedef dışı etkileri konusunda ciddi bir bilgi açığı bulunmaktadır (Liang vd, 2015). Yapılan çalışmaların özeti olarak gen ve organizmaya bağlı olarak CRISPR başarısında farklılıklar gözlemlenmiş olup implantasyon ile ilgili genlerin aktivitesini ortaya koymak amaçlı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hayvanlarda, yapılan CRISPR çalışmalarında en çok NHEJ tamir mekanizması ile gen düzenlemesi yapılmış olup birçok türde mutasyon başarısının %90 a ulaştığı görülmüştür. HDR tamir mekanizması ile yapılan gen düzenlemesi çalışmalarında ise başarı oranının %5 ile 20 arasında kaldığı gözlemlenmiştir. CRISPR başarısını etkileyen faktörler arasında genom büyüklüğünün bir önem taşımadığı ve gRNA ve cas9 ilişkisinin CRISPR etkinliği üzerinde etkili olduğu ispatlanmıştır (Park vd., 2003). Yapılan çalışmalarda zigot evresindeki embriyonun blastokist evresine kadar kültüre edilip (4,5 gün) farklı mikroenjeksiyon yöntemlerinin verimliliğine bakıldığında; pronükleusa direkt DNA enjeksiyonunda verim %24, pronükleus direkt RNA enjeksiyonunda verim %33 iken sitoplazmaya direkt RNA enjeksiyonunda verimin %65 olduğu gözlenmiştir (Carver vd., 2003). Şekil 2 farelerde genom düzenlenmesinin uygulanması için kullanılan farklı yöntemleri göstermektedir (Bagis vd., 2011).



Şekil 2. CRISPR (B) ile genlerin susturulması

RNA sekans yöntemi kullanımı, geniş dinamik aralığı ve fonksiyonel dizi değişkenlerini belirleme yeteneği nedeniyle gen ekspresyonu analizi açısından benzersiz faydalar sunar. Bu teknoloji, gelişmekte olan embriyoyu test etme fırsatı da sağlamaktadır (Chitwood vd, 2013). RNA sekans yöntemi transkripte olan genlerin ekspresyon seviyelerini ölçmede sağladığı kesinlik sebebiyle transkriptom analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Farelerde yapılan RNA sekans yöntemlerinde ise yapılan gen analizlerinde uterin bezlerin uterus lümen sıvısının homeostazisini düzenleyen faktörleri salgıladığı ve uterustaki diğer hücre tipleriyle etkileşerek gebeliğin oluşması için uterus reseptivitesini ve blastosist implantasyonunu etkilediği görülmüştür (Wang vd., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Fare embriyolarının elde edilmesi

Hayvan Başına Düşen Barınma Alanı ve Bakım Koşulları: Kullanılacak hayvanlar, Koç Üniversitesi, Fen Fakültesi, Hayvan Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Her hayvan için 70 cm² alan sağlandı ve hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat ışık uygulamasına maruz bırakıldı. Ticari pelet yem ve otomatik suluklar ile ad libitum beslenme sağlandı. **Embriyo Verici:** Süperovulasyon sonucu yüksek sayıda embriyo eldesi için uygun olması nedeniyle CB6F1 dişi fare, 6-8 haftalık, 20-24 gr. 348 adet hayvan kullanıldı (HADYEK NO: 2016.HADYEK.033).

3.1.1 Süperovulasyon ve Oositlerin hazırlanması

CB6F1 dişi farelere 10 IU gebe kısarak serum gonadotropini (SIGMA - PMSG) intraperitoneal (i.p) enjeksiyonla uygulandı. Enjeksiyondan 48 saat sonra, 10 IU insan koryonik gonadotropini (-hCG) i.p. yolla veri süperovulasyon protokolü sonrası dişi fareler erkek CB6F1 (C57BL/6 X BALB/C) fareler ile çiftleştirildi. Ertesi sabah vajinal plak gözlemi ile çiftleşen fareler tespit edildi ve sakrifiye edilen farelerden elde edilen ampulalarının rüptürü ile burada bulunan döllenmiş oositler çevrelerindeki granüloza hücreleri ile hiyalüronidaz enzimli Hepes tamponlu-M2 ortamında 3 defa yıkandıktan sonra 4 mg/ml Sığır Serum Albümin (BSA, SİGMA Katalog, No A-3311, Fraksiyon V) ile takviye edilmiş ortam ile yıkandı (Bagis ve Taskin AC 2011).

3.1.2 İn Vitro Kültür

İn vitro embriyo kültür ortamı olarak Life Global tek aşamalı embriyo kültür ortamları kullanıldı. Petri kabı içerisinde 10 µl'lik embriyo kültür damlaları oluşturuldu ve damlaların üstü tümüyle mineral yağ ile (SAGE, A-155) kaplanarak kontaminasyon, buharlaşma ve damlaların bütünlüğü sağlandı ve %5 CO₂, 37°C ısı ve yüksek neme sahip inkübatöre gazlanması amacıyla embriyoların aktarılmasından en az 2 saat önce kaldırıldı. PN (pronükleus) embriyolar blastokist aşamasına kadar kültüre edildi (Bagis ve Taskin AC 2011).

3.1.3 Deney gruplarında kullanılacak blastokistlerin seçilmesi

Her deney grubu için bir fareden yaklaşık olarak 20-25 zigot elde edildi. Elde edilen bu zigotlardan kültür ortamında gelişen iyi kalitede zigotlar ve blastokistler kullanıldı. Günümüzde kullanılan tek bir blastokist skorlama sistemi yoktur. Bu nedenle zigot seçimi ve blastokist seçiminde literatürdeki skorlama sistemleri kullanıldı (Garner vd, Hardarson vd., 2012). Özet olarak zigot seçiminde 2PN için pronükleus pozisyonu, boyutu, çekirdekçik öncül

cisimlerinin(NPB) dağılımı, sayısı ve büyüklüğü, kutup cisimciklerinin yerleşimi ve sitoplazmik halonun varlığı dikkate alındı. Blastokist için en az 4AA/5AA kalitede blastokistler seçildi.

3.2 Sekans ve genom düzenleme deneyleri için fare blastokistlerinin hazırlanması

3.2.1 RNA dizi analizi deneyleri için kullanılacak GFP (+) blastokistlerin hazırlanması

Seçilmiş zigotlar literatüre uygun şekilde GFP repörör geninin ekspresyonunu sağlayan internal promotörü içerecek şekilde tasarlanmış olan lentiviral vektörler kullanılarak GFP ile enfekte edildi (Lois vd., 2002). Kısaca işlem şu şekilde uygulandı: Yaklaşık olarak 10 ile 100 µL konsantrasyonundaki virüs solüsyonu zigotun perivitellin boşluğuna enjekte edildi. 72 saat kültür sonrası GFP ekspresyonunun enjekte olan zigottan gelişen blastula veya morula evresindeki embriyolarda görülmesi beklendi. Founder farelerin yüzde 80 inde transgenin en az bir kopyası bulunurken bunların % 90' nında GFP nin yüksek düzeyde ekspresyonu görüldü. Öncü çalışmamızda hatch olmuş (zonasından ayrılmış) (6AA) blastokistin lentivirus ile enfekte edilerek GFP (+) duruma getirildiği görülmektedir, ancak bu yöntemle sadece trofoektoderm hücreleri etkileneceği için çalışmamızda mikroenjeksiyon yöntemi tercih edildi, ancak optimizasyon bölümünde belirtileceği üzere GFP pozitif blastokistin elde olarak sayısının ve elde edilen RNA miktarının düşük olması nedeniyle işaretsiz blastokistler kullanılmıştır.

3.3 Üç boyutlu endometriyal ko-kültür ortamının hazırlanması

3.3.1 Fare endometriyum epitel ve stroma hücrelerinin izolasyonu

Farelerin uterus hornları çıkarıldıktan sonra sıcak HBSS içine alındı ve stereo mikroskop altında açıldı ve iç kısımdaki epitel dokusu bistürinin ucuyla kazınıp, tabaka halinde ayrılması sağlandı. Kalan doku küçük parçalara ayrıldıktan sonra tripsin ve kollajenaz/dispaz karışımı içine alınıp 2 saat +4°C'de, 1 saat oda sıcaklığında beklendi. Süre bitiminden sonra 600G'de 3 dakika santrifüj edildi, supernatant ayrı tüpe alındı ve pelet üzerine HBSS eklenip epitel tabakasını bir tabaka olarak görene kadar vortekslendi. Tabaka halinde görünen epitel tabakası çekilerek farklı bir tüpe alınıp 600G'de 5 dakika santrifüj edildi ve %10 FBS'li DMEM F-12 Ham's içinde ekildi. HBSS içinde kalan dokular tekrar 600G'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra pelet üzerine tripsin+kollajenaz/dispaz karışımı eklendi, 30 dakika 37°C çalkantılı su banyosu üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonra tekrar santrifüj edilecek ve pelet üzerine %10 FBS 'li Dmem F-12 Ham's eklendi ve 60 mm kültür tabağı içine ekildi.

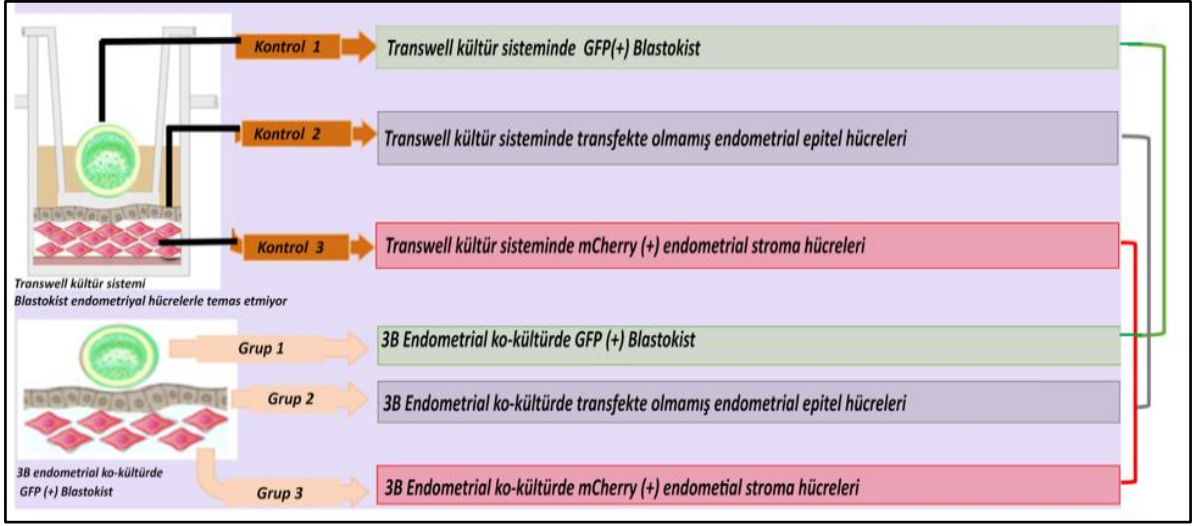
3.3.2 Hücre dışı matrix (Matrijel®) kullanılarak üç boyutlu (3B) endometriyum ko-kültürü (EKK) oluşturulması

BD Matrigel üreticinin önerisine uygun olarak 3:1 oranında serumsuz DMEM F-12 içinde çözüldü. Bu medyanın içine stroma hücreleri de eklendi ve Matrigel jelleşirken stroma hücreleri de içinde kaldı. 24 kuyucuklu kültür kabında, kuyucuk başına 200 mikrolitre karışım eklendi ve 37°C de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitince fazla matrijel tabakası çekildi ve hücreler öncelikle DMEM/F12 medyumunda çoğaltıldı. Kültür süresince epitel ve stroma hücrelerinin birbiri ile etkileşimi izlendi. Bu etkileşim tamamlandığında hücreler birbirleri ile ağsı bir yapı oluşturduktan sonra 3 boyutlu kültürün karakterizasyonu için jel %4 PFA ile fikse edildi ve epitel için anti pansitokeratin, stroma için anti vimentin boyandı. Sekonder antikor olarak Alexa 594 ve 488 kullanıldı, kapama Hoechst (1µg/ml) ile yapıldı ve floresan görüntü alındı. Boyamanın üç boyutlu endometriyum kültürünü doğrulaması sonucunda bu ko-kültür tipi blastokistin implantasyon deneylerinde endometrium taklitçisi olarak kullanıldı. Deney grupları oluşturulmasıyla kültür besiyeri literatüre uygun şekilde DMEM/F12 besiyeri içine %1 kömürsüz FBS, ve ayrıca preimplantasyon dönemdeki hormon dalgalanmalarını taklit etmek amacıyla 63,5 nmol/L of progesteron, 7,14 nmol/L of estradiol-17b, 100 mg/ml of insulin, ve 20 ng/ml of epidermal büyüme faktörü eklendi. Bu şartlarda 24 ve 72 saatlik inkübasyonlarda doğal siklus taklit edildi (Tan vd., 2005). Transwell kültürler benzer şekilde ancak transwell içinde yapıldı.

3.4 RNA dizileme (sekans) analiz deneyleri

3.4.1 Dizi analizi için deney gruplarının oluşturulması

Grupların ilk etapta aşağıdaki şekil 3'te belirtildiği şekilde matrijel ve transwell kullanılarak 24 ve 72. saatler için her saat için 3 örnek ve her hücre çeşidi için 3 örnek şeklinde oluşturuldu; ancak "Bulgular" bölümünde belirtildiği üzere bu düzenek ilk bulgularımızla değiştirildi. Kullanılan deney grupları ve yöntem, bu nedenle. bulgular bölümünde revize edilmektedir.



Şekil 3. RNA analizi için ilk oluşturan deney düzeneği. Bu düzenekte epitel hücreleri işaretli, blastokistler GFP pozitif ve stroma hücreleri mCherry pozitif olarak planlanmıştır.

Kültürlerde 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında RNA sekansı için örnekleme yapıldı. RNA dizilemesinden elde edilen sonuçların hangi hücre grubundan geldiğinin anlaşılabilmesi için blastokistler GFP ile, endometriyum stroma hücreleri mCherry ile transfekte edildi, endometriyum epitel hücrelerine transfeksiyon yapılmadı. Kontrol kültürler için transwell® (hücre gruplarını içinde bulunan sepetçikle ayıran hücre kültürü kabı kuyucuk sistemi) sistemi literatüre uygun olarak kullanıldı (Weimar vd., 2013). GFP pozitif blastokist kültür kabı kuyucuğunda asılı bulunan medium geçerken sepete yerleştirildi, endometriyum stroma (mCherry transfekte) ve epitel hücrelerinden oluşturulmuş 3-boyutlu ko-kültür kuyucuğun tabanında bulundu. Böylece tüm hücre çeşitlerinin aynı kültür ortamında birbirine değmeden bulunması sağlandı. Kontrol gruplarının amacı biyoinformatik analiz bölümünde sunuldu. GFP ve mCherry(+) hücreler FACS ile ayrıldı, her hücre grubundan ayrı ayrı RNA izolasyonu yapıldıktan sonra dizileme için optimizasyon deneyleri yapıldı. Blastokist kullanılan gruplarda **grup başına 10 blastokist** kullanıldı, ancak bunun yeterli olmadığı bulgular bölümünde detaylı olarak belirtilmektedir.

3.4.2 RNA dizilemesi için örneklerin hazırlanması

Hücreler tripsine edilerek çöktürildikten (200g, 5 dk) sonra, toplam RNA NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) kiti ile üretici firma protokolleri takip edilerek izole edildi. RNA örnekleri sulandırılarak NanoDrop cihazı ile konsantrasyon tayini yapıldı. RNA degradasyonu BioAnalyzer (Agilent) cihazı ile RNA 6000 Nano LabChip kullanılarak 18S ve 28S rRNA'lar arasında keskin bir bant ayırımı olup olmadığı kontrol edildi. Bu analiz sonucunda, >10 ng (10

µl ddH₂O içinde) ve RIN sayısı (RNA integrity number) 9'un üzerinde olan örnekler direk dizilemeye gönderildi (RIN sayısı için en yüksek değer 10'dur). Örnekler Illumina Stranded Total RNA Library Prep kitiyle çalışılarak dizilemeye alındı.

3.4.3 RNA dizileme

RNA eldesi aşamasından sonra RNA'ya göre deplesyon yapılarak mRNA moleküllerinin saflaştırılması sağlandı. Daha sonra, mRNA, yüksek sıcaklık altında iki değerli katyonlar kullanılarak küçük parçalara ayrıldı. Böylece fragmentasyonu yapılan RNA fragmanları, ters transkriptaz ve rastgele primerleri kullanarak tek zincirli cDNA'ya çevrildi. Sonra, manyetik boncuklarla toplanan bu DNA parçalarının uçları onararak 3' uçlarına adenin eklendi ve ligasyona temelli olarak fragmanlara adaptörler ve barkodlar eklendi. Daha sonra, ikinci PCR aşamasına geçilerek DNA'yı "daireelleştirme" adı verilen bir aşama ile aynı zincir üzerinde DNA Nanoball (DNB) oluşturuldu. Böylece PCR hataları en aza indirildi ve dizileme adımına geçildi. Dizileme ile oluşturulan her bir DNB, DNBSEQ G-400 dizileme platformundaki akış hücreindeki (Pattern Array) noktalara yerleştirildi ve akış hücresinde (Flow Cell) sekans işlemi gerçekleştirildi. Farklı boyalarla işaretlenmiş modifiye edilmiş dNTP'leri içeren reaksiyon çözeltisi akış hücreğine yüklendi ve cPAS veya CoolMPS teknolojisi kullanılarak her Nanoball'daki bazların okunması sağlandı. Sekans süreci; primer bağlama ve dizileme solüsyonunun akış hücreğine yüklenmesi, primer sonrası bazın bağlanması, görüntüleme, ayrılma ve ortamdaki bağlı olmayan bazların kaldırılması gibi aşamalardan oluşmuştur. Bu aşamalar sonunda biyoenformatik veritabanları kullanılarak örnekler arasındaki farklı şekilde ifade (eksprese) edilmiş genler tespit edildi.

3.4.4 RNA dizileme Sonrası Biyoinformatik Analizi

Biyoinformatik analiz için hizmet alımı yapıldı. Kısaca, ham verilerin filtrelenmesi işlemi Trimmomatic v0.39 (Bolger vd., 2014) ve fastp v0.20.0 (Chen vd., 2018) yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Filtreleme işleminden önce ve sonra okumaların FASTQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) yazılımı ile görselleştirilmiş ve MultiQC v1.6 (Ewels vd., 2016) aracı dosyaların biraraya getirilerek kalite kontrol dosyası oluşturulmuştur. upları arası gen/transkript bolluk tahminine (ing. gene/transcript abundance estimation) ait bilgiler normalize edilmiş şekilde StrigTie ile elde edilmiştir. Gruplar arasındaki gen/transkript ifade farklılıkları Ball Gown yazılımı ile elde edilmiştir. Grupları arasında bir genin ifadesinde istatistiksel açıdan farklılık olup olmadığı şu kritere göre belirlenmiştir; kat artış değeri $\log_2FC > 2$, düzenlenmiş p-değeri (< 0.001). Ayrıca, SRA, GEO gibi **veritabanlarında** oluşan diğer laboratuvarlar tarafından üretilen verilerin de bizim verilerimizle

karşılaştırmalı analizi gerektiği takdirde eklenmiştir.

3.5 RNA sekans analizi sonrasında gen seçimi ve düzenlenmesi

3.5.1 Genlerin seçimi

RNA dizi analizinden matrijel ve transwellde kültüre edilmiş hücrelerden epitel hücrelerinde ortak olarak artmış şekilde ifade edilmiş, stroma hücrelerinde anlamlı şekilde bölüm 3.4.4'te belirtildiği üzere ortak olarak artmış olarak ifade edilmiş genler kullanılmıştır. RNA-seq analizi, önce ham dizileme okumalarının bir referans genoma hizalanmasını ve ardından ham dizileme okumaları ile transkript arasında bir ilişki kurulmasını içermektedir. Daha sonra, referans genoma hizalanmış sıralama okumalarına göre genlerin veya transkriptlerin ifade edilme seviyesinin değerlendirilmesini içermektedir. Gruplar arası diferansiyel olarak ifade edilen genleri (DEG'ler) belirlemek için normalizasyon ve diferansiyel ekspresyon (DE) analizleri gereklidir. Hesaplamalara dayalı olarak gen ifadesini değerlendirmek için de normalizasyon yöntemleri kullanılarak bir ifade matrisi oluşturulmaktadır. DE analizi için kullanılan yazılım araçları arasında DESeq2, edgeR, ve limma en çok kullanılanlarıdır (Liu ve ark., 2022). DESeq ve edgeR yöntemlerinin her ikisi de RNA-seq verilerini negatif binom (NB) dağılımıyla doğrusal olmayan modelleri kullanır ve genlerin ortalama μ ve varyans σ^2 parametrelerini tahmin eder (Han, 2017). Sekans analizi sonucunda, edgeR ve DESeq2 analiz paketlerine göre değerlendirme yapılmış olup DEG'leri tanımlamak için $|\log_2FC| > 1$ eşiği kullanıldı. Her grup için; hem önemli ölçüde ifade değişimi görülen genlerin kat değişimlerine (FoldChange) göre hem de literatürde çalışılmamış olan genlere göre seçim yapılmıştır. Bu genlerin kodlayan gen olması, gen seçimi sonrasında genlerin hücrelerdeki varlığını doğrulamak amacıyla qPCR yapılmıştır. Bulgular bölümünde de değinileceği üzere blastokistler için dizileme mümkün olmadığından mevcut tek hücre dizileme analizi transkriptomlarından bulgular bölümünde belirtildiği şekilde gen seçildi. Bu amaçla literatür taraması sonucunda GEO (GSE75764 ve GSE168272) (Huang ve ark., 2022; Bai ve ark., 2022) dataları çekilerek gen seçimi yapılmıştır. Okuma hesaplamalarına (TPM No) göre 11 ila 1000 arasında veya 1000 üzerinde olan genler için önemli yüksek ifade söz konusudur. Buna göre >11 TPM ile ifade edilen genler seçildi.

3.5.2 sgRNA Dizayn Edilmesi

gRNA'lar susturulma (knock-out) işlemi için ilk ekzonlara yakın dizayn edilmelidir. On üç adet hedef genimizin (Hmga2, Pcmt1, NGFRAP1, GATA3, UXS1, Gm15452, EFS, TMSB4X, Tmem158, GM9826, Rab27a, SAMD5, PYY) oligo dizaynları için ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) ve IDTDNA (<https://www.idtdna.com/pages>) veritabanlarından

yararlanılmıştır. Bu veritabanları üzerinden ChopChop veritabanında hedef genler taratılarak GC (guanin-sitozin) yüzdeliklerinin %40-60 olmasına, verimliliğinin yüzde 50'nin üzerinde olmasına dikkat edilerek en düşük kendini tamamlayıcı ve hedef dışı bağlanmaya sahip gRNA'lar seçilmiştir. Aynı zamanda karşılaştırmalı olarak, seçilen gRNA'lar IDTDNA veritabanından kontrol edilerek hedef dışı alan (off target) oranları %100'e yakın olanlar seçilmiştir. Oligolar üst sekans olarak dizayn edilerek tamamlayıcı sekansları, o sekansın ters tamamlayıcı olarak ve her bir genden 3 ayrı oligo olarak dizayn edilmiştir. Ayrıca sgRNA'lar dizayn edilirken üst sekansın başına, plasmide ekleyeceğimiz ve Bsmbl kesim bölgesine ait olan 4 bazlık uzatma sekansları SnapGene programından kontrol edilerek eklenmiştir. Bu uzatma sekansları oligoların hedef bölgeye bağlanabilmesi için kullanılmıştır. Ayrıca dizayn edilen üst sekansın başına polimeraz aktivitesinin verimliliğini arttırmak için "G" bazı eklenmiştir. Aynı şekilde tamamlayıcı sekansın sonuna guanin bazı eşleniği olan "C" bazı eklenerek tasarlanmıştır.

3.5.3 Endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenlenmesi

Epitel ve stroma hücreleri için birkaç farklı genom düzenleme yöntemi kullanıldı. Optimizasyon çalışmaları için viral transdüksiyon yöntemi kullanıldı. Hücrelerinin transdüksiyonu sırasında lentiviral transdüksiyon amaçlı gRNA ve cas9 gen dizilimi içeren klonlama plazmid, paketleme için paketleme plazmid pCMV-dR8.74psPAX2 ve pseudotyping plasmid (pMD2.G) 293 T hücreleri ile transfekte edilerek istenilen g RNA ve Cas9 gen dizilimini içeren lentiviral partiküller oluşturuldu. Hedef hücre topluluğu olan epitel ve stroma hücreleri, lentiviral transdüksiyon yoluyla susturuldu. Ayrıca endometrial stroma hücreleri mCherry reporter geninin ekspresyonunu sağlayan iç promotör içerecek şekilde tasarlanmış olan vektörler kullanılarak mCherry enfekte edildi.

Öncü çalışmalar için olarak epitel ve stroma hücrelerinde literatürde de implantasyonla ilişkisi olduğu gösterilmiş olan LIF ekspresyonu baskılandı ve sonuçları bölümünde paylaşıldı. LIF geninin susturulması için tasarlanan gRNA için MIT gRNA dizayn sitesi kullanılmış olup, off-target oranı en az olan gRNA seçildi. LIF ekspresyonun primer hücrelerde baskılanma süresinin optimizasyonu, farklı zaman aralıklarında toplanan hücre pelletlerinden elde edilen lizatlarla yapılan Western Blotlama yöntemi ile gösterilmesi sonucu 7 gün olarak belirlendi (Yang vd., 2014). Hedef dışı bağlanmaları (off target) engellemek için gRNA tasarımı sırasında MIT gRNA dizayn sitesi (crispr.mit.edu:8079) kullanıldı. Ayrıca uzun süreli kültürlerde hedef dışı bağlanmaları engellemek için verilen virüs konsantrasyonları en düşük düzeyde tutularak her hücreye giren Cas9 miktarını en aza indirgeyerek hedef dışı alanlar azaltıldı. MIT'nin CRISPR gRNA tasarım aracı kullanıldı hedef dışı bağlanma olasılığı en az olan gRNA seçildi.

PlentiCv2 plazmidi klonlama için kullanıldı. Elde edilen virüsler LIF-susturulmuş stabil hücre hatları elde etmek için kullanıldı. Epitel ve stroma hücreleri 6 kuyucuklu kültür kabına ekildi ve %60 çoğunluğa ulaşması beklendi. İstenilen çoğunluğa ulaşıncı hücrelerin üzerine LIF virüsü (1ml virüs:1ml besiyeri) verildi. Ertesi gün girmeyen virüslerin ortamdı uzaklaştırılması için kültür medyası değıştirildi. Enfeksiyon işleminden 2 gün sonra seleksiyona başlandı ve puro antibiyotiğı kültür ortamına 1:1000 oranında eklendi. Seleksiyon işlemi sonunda virüs güren stabil hücreler elde edildi ve bu işlem yaklaşık 1 hafta sürdü.

p53 geninin susturulduğu öncü çalışmada lentivirüse p53 gRNA ve cas9 gen dizilimi içeren klonlama plazmidi ve pakitleme plazmidi verilerek 293T hücrelerinde bu parçaları içeren lentivirüs parçacıkları oluşturuldu. Endometriyum epitel ve stroma hücrelerinin lentivirüs yolu ile susturulması (“knock out”) hedeflendi. Kullanılan vektörlere ayrıca mCherry raporlama (“reporter”) geninin ifadesini sağlayan iç promotörler de eklendiğı için bu genin susturulduğu hücrelerin aynı zamanda mCherry pozitif olarak görölmesi sağlandı (Şekil 5). p53 geni için tasarlanan gRNA için MIT (Massachusetts Institute of Technology) gRNA düzenleme sitesi kullanılmış olup hedef dışı (“off target”) oranı en az olan gRNA’lar seçilmiştir. Burada seçilen gRNA’lar da ChopChop veritabanı (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) kullanılarak **3.5.2’de** açıklandığı gibi tasarlanmıştır.

3.5.4 Zigotlarda genom düzenlenmesi

İstenilen gen değışikliğı NHEJ (Non Homologous End Joining) yöntemi ile elde edileceğinden Cas9 (100 ng μl^{-1}) ve sgRNA (50 ng μl^{-1}) belirli konsantrasyonlarda kullanıldı. Mikroenjeksiyon yapılacak olan droplar hazırlandı ve üzeri mineral yağ ile kapatıldı. Hoffman modölasyon kontrastlı mikroskop altında mikroenjeksiyon yapıldı. Zigotlar GMOPS solüsyonuna alındı ve G RNA and Cas9 mRNA içeren enjeksiyon karışımını enjeksiyon pipetine aspire edildi ve bir pipet yardımıyla zigotlar tutulacak ve mikroenjekte edildi. Cas9’nın özellikle mRNA şeklinde verilecek olmasının nedeni RNA’nın hücrelere giriş süresinin ve degrade olma süresinin kısa olup off-target riskini en aza indirmesidir.

3.6 CRISPR/CAS9 ile genom düzenlemesi yapılmış hücrelerde implantasyon deneyleri

3.6.1 Endometriyuma spesifik genlerin düzenlenmesi

Endometriyum stroması ve epiteli için genler dizi analizine göre ayrı ayrı belirlendi. Bulgular bölümünde ayrıntılı olarak belirtileceğı üzere genlerin validasyonu sonunda epitel için 2, stroma için 1 gen uygun olabildi. Bu gruplarda mikroenjeksiyon yerine viral transdüksiyon kullanıldı ve

non-targeting guide RNA kullanımına gerekmedi. Gruplar aşağıdaki 24. ve 72. saatler için ayrı ayrı olacak şekilde matrijel ko-kültür kullanılarak oluşturuldu. Her gen için 3 kuyucuk replika, her replika için qPCR’da 3 teknik replika sağlandı. Her kültüre 3 adet blastokist yerleştirildi.

Grup 1: Yabanıl blastokist+yabanıl epitel+yabanıl stroma (**kontrol grubu**)

Grup 2: Yabanıl blastokist+yabanıl epitel+**mutant stroma**

Grup 3: Yabanıl blastokist+**mutant epitel**+yabanıl stroma

3.6.2 Blastokiste spesifik genlerin düzenlenmesi

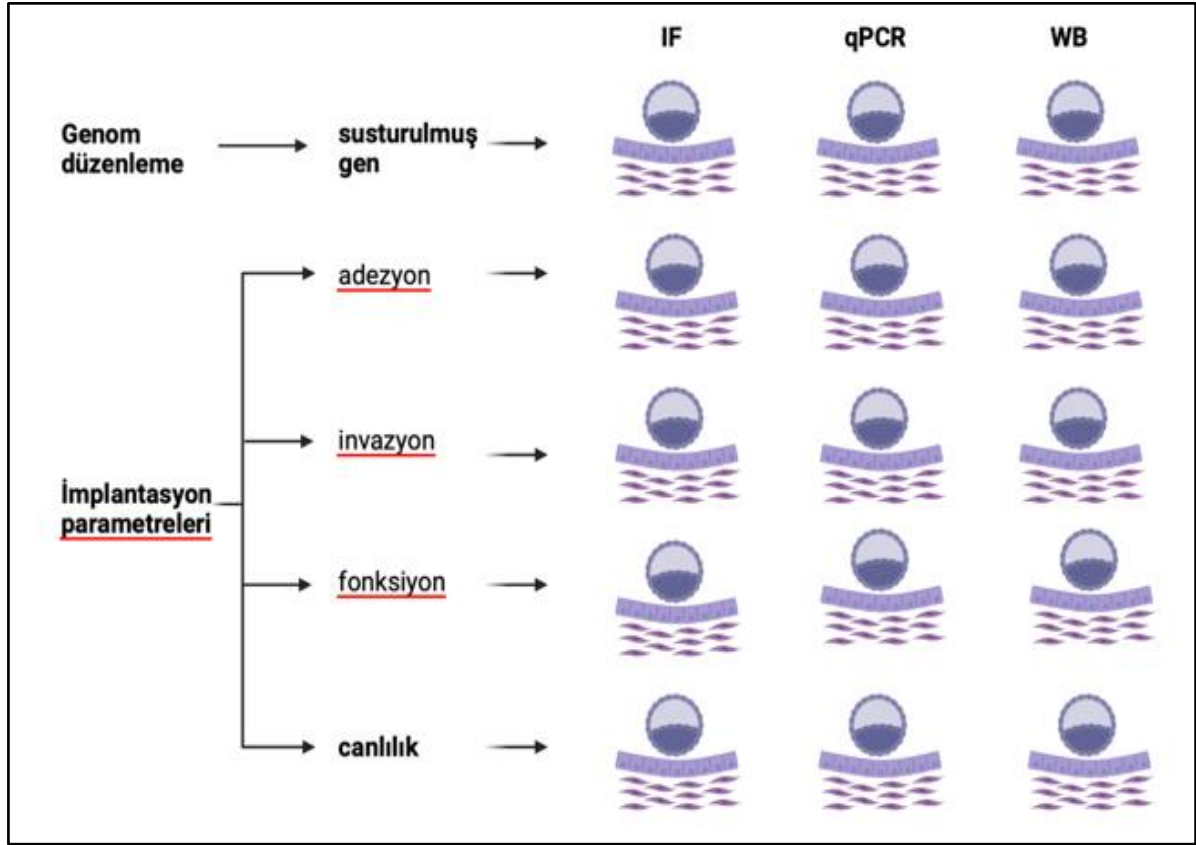
Blastokist için seçilmiş toplam 7 adet genden 2 tanesi buğular bölümünde açıklandığı şekilde uygun olarak belirlendi. Her gen için aşağıdaki gruplar uygulandı ve 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonunda implantasyon parametreleri değerlendirildi. Her gen için 3 kuyucuk replika, her replika için qPCR’da 3 teknik replika sağlandı. Her kültüre 3 adet blastokist yerleştirildi.

Grup 1: **Mutant (CRISPR/Cas9 uygulanmış) blastokist** + Yabanıl (mutant olmayan) epitel+Wild stroma

Grup 2: **Kontrol grubu**

3.6.3 İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi

Deney gruplarında yapılması planlanmış analizler şekil 4’te gösterilmiştir. Adezyonla ilgili belirteçleri olarak entaktin, laminin, fibronektin; invazyon için MMP9 ve TIMP3, gelişimsel gen olarak Wnt4 ve Hoxa10, fonksiyonel genler olarak ESR1, PR, MUC1, Erbb1, Erbb2 ve LIF kullanıldı. İlgili genler qPCR primerler tablo 1’de verilmiştir.



Şekil 4. İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi. Bu amaçla test edilecek her gen için qPCR analizinde 3 örnek (her örnekte 3 blast), Western blotlama analizi anlamlı sonuçlar için 3 örnek, IF için anlamlı sonuçlar 2 örnek kullanıldı.

Tablo 1. İmplantasyon analizi için kullanılan qPCR primerleri.

<u>Genler</u>	<u>FORWARD PRIMERLER (5' – 3')</u>	<u>REVERSE PRIMERLER (3' – 5')</u>
MMP9	TCCCCAAAGACCTGAAAACC	CTGCTTCTCTCCCATCATCTG
LIF	AAACGGCCTGCATCTAAGG	AGCAGCAGTAAGGGCACAAT
ESR1	TCCAGCAGTAACGAGAAAGGA	AGCCAGAGGCATAGTCATTGC
ERBB1	ATGAAAACACCTATGCCTTAGCC	TAAGTTCCGCATGGGCAGTTC
ERBB2	ACCGACATGAAGTTGCGACTC	AGGTAAGCTCCAAATTGCCCT
WNT4	AGACGTGCGAGAACTCAAAG	GGAAGTGGTATTGGCACTCCT
HOXA10	GGCAGTTCCAAAGGCGAAAAT	GTCTGGTGCTTCGTGAAGGG
FN1	GATGTCCGAACAGCTATTTACCA	CCTTGCAGCTTCAGCCACT
LAMA	ACTATGCCGTCAGCGATACAG	GGCACCAGCTTTGAATAATACGA
PR	GCCAGCCAGAGCCCACAATA	TGTGCTGCCCTTCCATTGCC
TIMP3	ACACGGAAGCCTCTGAAAGTC	ACTTTGTGGAGAGGTGGGAC
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA

İmplantasyon parametrelerinin değerlendirmesinde uygulanacak yöntemler:

İmmünfloresan (IF): % 4 paraformaldehit ile 20 dakika fikse edilen kültürler uygun PBS yıkaması sonrası belirlenen genler için IF primer antikorlar ve bunlara uygun sekonder antikorlarla işaretlendi, primer ve sekonder antikorlar 37°C'de, nemli çemberde 90 dakika inkübe edilecek, kapama ortamında Hoechst kullanıldı. Örnekler uygun dalga boyunda konfokal mikroskop altında gözlemlendi, her grup için boyamalar semikantitatif olarak değerlendirildi. Primer antikorlar anti-LIF (Ab113262), anti-MMP9 (Ab38898), anti-E-Kaderin (Ab76055), anti-entaktin (Ab14511) ve anti-laminin (Ab11575); sekonder antikorlar keçi anti-fare-488 (A-11029) ve keçi anti tavşan-594 (R37117) olarak kullanıldı. Kapamada Hoechst (1ug/ml) kullanıldı.

Konfokal görüntüleme: Floresan görüntülemeler Leica dmi8/SP8 konfokal mikroskop altında 405, 488 ve 552 nm diod lazer kullanarak alındı.

Hücre canlılık testi: Her grupta birer adet blastokist 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılık kiti (live cell/dead cell cytotoxicity assay) kullanıldı 30 dakika 2 mmol/L calcein-AM and 4 mmol/L ethidium homodimer-1 ile 37°C, 5%'te inkübe edildi , sonrasında PBS'te nazikçe yıkanıp hemen floresan mikroskop altında incelendi ve canlı (yeşil) ve ölü (kırmızı) hücreler kantitatif olarak belirlendi (Jiang ve Doudna, 2015).

qRT-PCR: Tüm gruplarda hücrelerden RNA elde edildi ve bu RNA geri yazılıma (reverse transcription) tabi tutularak cDNA yapıldı. Tutunma ve invazyon belirteç genlerinin ifadeleri gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemiyle belirlendi. Bu reaksiyonlarda sekans ve analizler sonucunda belirlenen genlere özgü primerler ve kontrol olarak GAPDH primerleri kullanıldı. Örneklerdeki gen seviyeleri GAPDH'e oranla ve delta Ct yoluyla belirlendi. Gen anlatımı düzeyindeki analizler sonucunda çıkan farklılıkların istatistiksel anlamlılığı hesaplandı (Bustin vd., 2004).

Western Blotlama: qRT-PCR ile gen seviyelerinde anlamlı farklılık görülen moleküller için protein analizi yapıldı. Rutin western blotlama protokolü uygulandı. Hücrelerden lizat eldesi sonrasında örnek yüklemesi yapıldı, örnekler jelde yürütüldü, jelden membrana transfer yapıldı, transfer tamamlandığında membran, jelden ayrılarak alındı membranla antikorlar arasındaki nonspesifik bağlanmaları en aza indirmek için membran yağsız süt tozu-TBST karışımı ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Membran, primer antikor (qRT-PCR'a göre belirlenmiş) çözeltisinde gece boyu 4°C' de, sekonder antikor ile 1 saat inkübe edildikten sonra yıkamalar yapıldı. Görüntüleme kiti içindeki Chemiluminescent substrat çözeltisi membranın tüm yüzeyine uygulandı ve reaksiyon için 5 dakika beklendi. Bio-Rad ChemiDoc görüntüleme sistemi ile görüntüleme yapıldı, sonuçlar kantitatif olarak analiz edildi (Brewer vd., 2020).

3.7 İstatiksel yöntemler

Analizler 3 biyolojik, 3 teknik tekrarla yapıldı. qPCR analizleri Gapdh normalizasyonu kullanılarak Double Delta CT ($\Delta\Delta CT$) analizi ile Excell'de yapıp istatistiksel anlamlılık ölçümleri ve grafik çizimi GraphPad programı kullanarak yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 Fare embriyolarının elde edilmesi

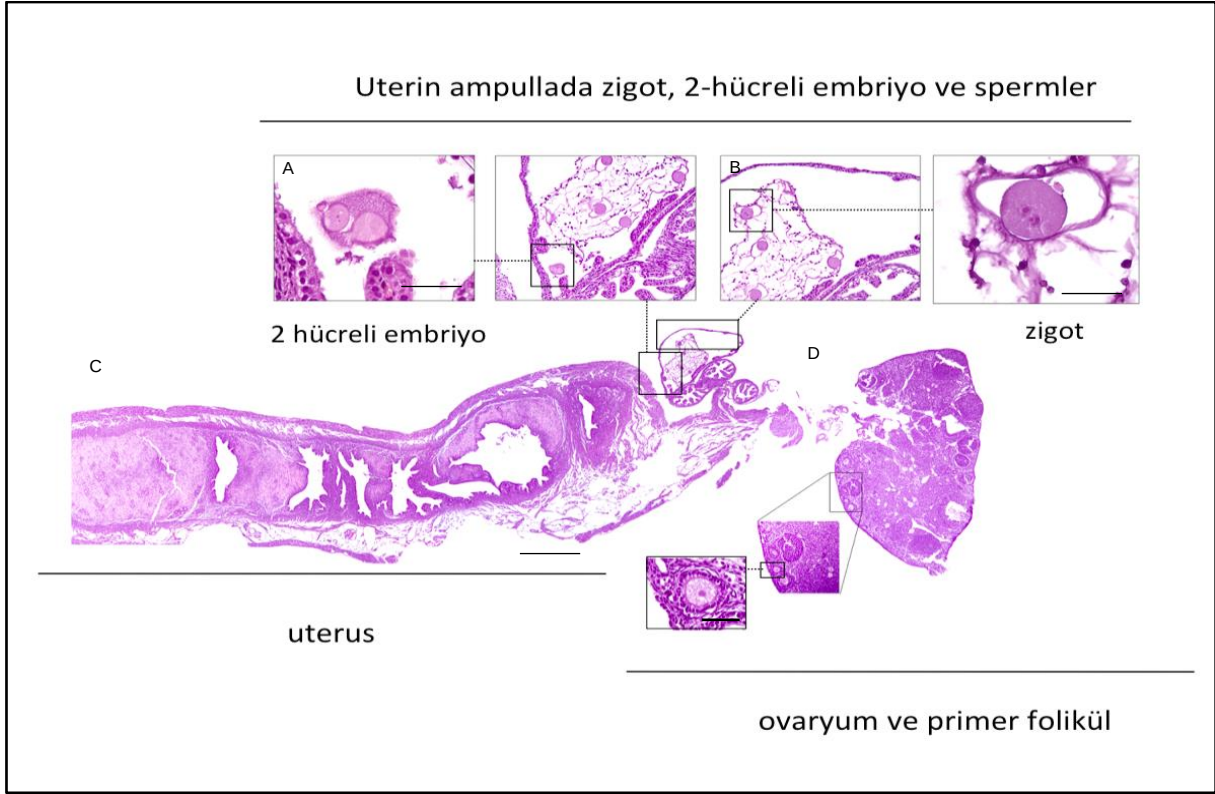
Farelerden süper ovulasyon sonrası eldenin sonuçları şekil 5-8’de özetlenmiştir.



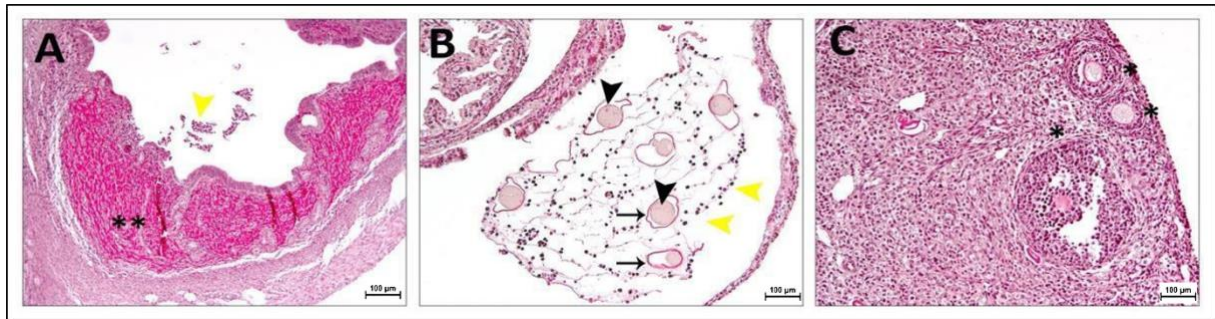
Şekil 5. Farelerin ovulasyonu sonrası uterus eldesi.

Gonadotropinlerle indükte edilen ovaryumlardan beta-HCG injeksiyonu ile ovulasyon sağlandı ve dişi fareler 1 dişiye 1 düşecek şekilde erkeklerle biraraya getirildi. Ertesi sabah yapılan kontrollerde vajinal plak gözüken (A, ok) dişi farelerde döllenme gerçekleştiği öngörülerek bu fareler sakrifiye edildi. Sakrifasyon sonra hızla uterus (B, siyah ok) ve ampullalar diseke edildi. Ampullalar ilk olarak önceden 37° C’de gazsız inkübatörde ısıtılmış ve hafif parafin yağ altında olan BSA eklenmiş tampon (GMOPS) solüsyonu içine, sonrasında da 80u/ml hiyaz solüsyonun alınarak ampullanın dijesyonu sonucunda zigotların çıkması ve kümülüslerin dökülmesi sağlandı. Gerekli durumlarda 135 um denudasyon pipeti ile kumulusler mekanik olarak da temizlendi. Elde edilen zigotlar hızla önceden CO₂’li inkübatörde bekletilerek pH’sı 7.34-7.35 olarak ayarlanmış tek aşamalı embriyo kültür ortamına alındı. Embriyolar için bu yöntem uygulandığı sırada başka bir ekip de elde edilen uteruslardan (C, siyah ok) endometriyum epitel ve stroma hücrelerinin ayrılması için çalışmalara başladı. Kırmızı ok ovaryumu göstermektedir.

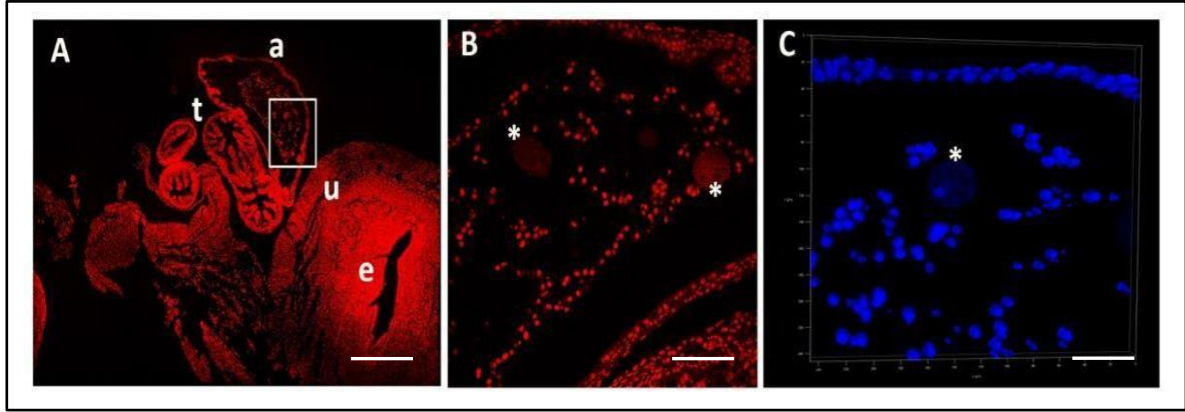
Ölçü çizgileri: A, B=1 cm; C=1,5 mm



Şekil 6. Farelerde süperovulasyon sonrası zigot oluşumu. On beş fotoğraftan oluşturulmuş bu panelde süper ovulasyon yapılmış farede uterus, tuba utarina, ve tek ovaryum izlenmektedir. Tuba utarının ampulla bölgesi şişmiş ve tuba çeperleri bu bölgede incelmıştır. Ampulla içinde zigotlar, fare spermeleri ve bir adet iki hücreli embriyo kesit alanında girmiştir. Büyütülerek gösterilen zigotta ikinci polar cisimcik oblik duruşundan ötürü daha küçük gözükmeyle beraber zigotun iki pronükleusu ve nükleolar prekürsör cisimcikleri (NBP) belirgin olarak izlenmektedir. *Boya: HE. Ölçü çizgileri: A, B=100 µm, C=1mm, D=80 µm.*



Şekil 7. Zigotların izolasyonu ve endometriyum hücrelerinin eldesi öncesi uterus. Uterusta glikojenden zengin stroma görülmektedir (A, çift asterisk). Uterus lümeninde hücrelerin yaptığı agregasyonlar izlenmektedir (A, sarı ok başı). Tuba uterinin ampulla kısmında yer alan zigotlar (B, siyah ok başları) ve başka hücreler (sarı okbaşı) izlenmektedir. Zigotları çevreleyen zona pellusida glikoprotein yapısı nedeniyle belirgin olarak izlenmektedir (B, siyah oklar). Ovaryumda ovulasyon sonrası farklı gelişim aşamalarında foliküller içinde oositler izlenmektedir (C, yıldızlar). *Işık Mikroskopik görüntüleme, Boya: PAS. Ölçü çizgileri=100 µm.*

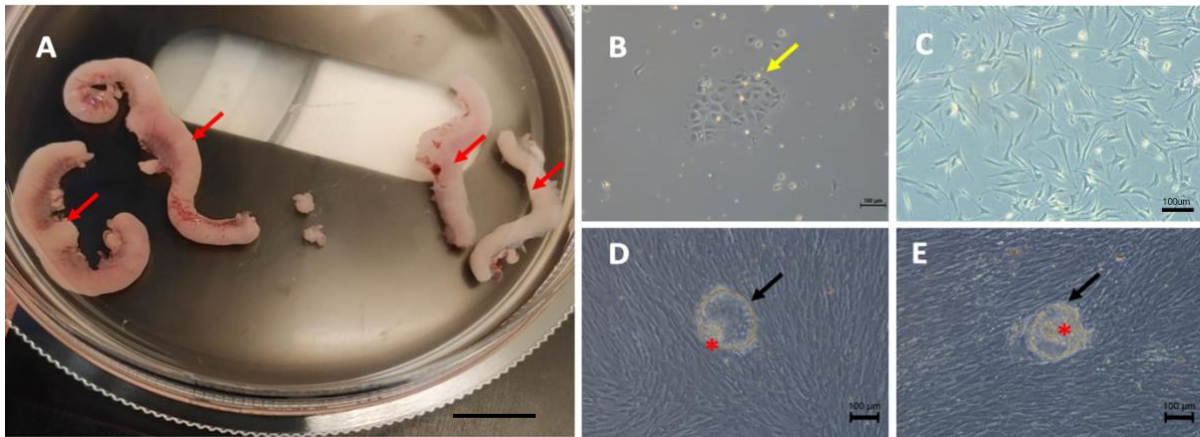


Şekil 8. Uterusun izolasyon öncesi konfokal mikroskop altındaki görüntüsü. Bu görüntü 15 adet x-y tile'da ve z aksında her alan için 10 adet optik kesit alınarak hazırlanmıştır. Bu kesitte DNA'ya direk bağlanan boyalarla profil görüntü elde edilerek uterusun bölümleri ve zigotlar gösterilmiştir. t: tuba uterina, a: ampulla, u: uterus, e: endometriyum (A). B, A' da bulunan kare ile işaretlenmiş alanın büyütülmüş halidir. C'de ise yapının çekirdek boyalı durumunu gösterilmektedir. Yıldızlar (B ve C) zigotları göstermektedir. *Konfokal Görüntüleme, Boyalar: A, 7AAD; B, Hoechst. Ölçü çizgileri: A=1 mm, B, C= 100 µm.*

4.2 Üç boyutlu endometriyal ko-kültür ortamının hazırlanması

4.2.1 Fare epitel ve stroma hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu

Endometriyum hücrelerinin izolasyon ve kültürü şekil 9'da gösterilmektedir. İzole edilen hücreler karakterizasyon amacıyla anti-vimetin ve anti-sitokeratin 18 berliteçleri ile boyanmış ve aynı belirteçlerin genleri için qPCR analizi yapılmıştır. Şekild 10'da karakterizasyon sonuçları gösterilmiş ve özetlenmiştir.

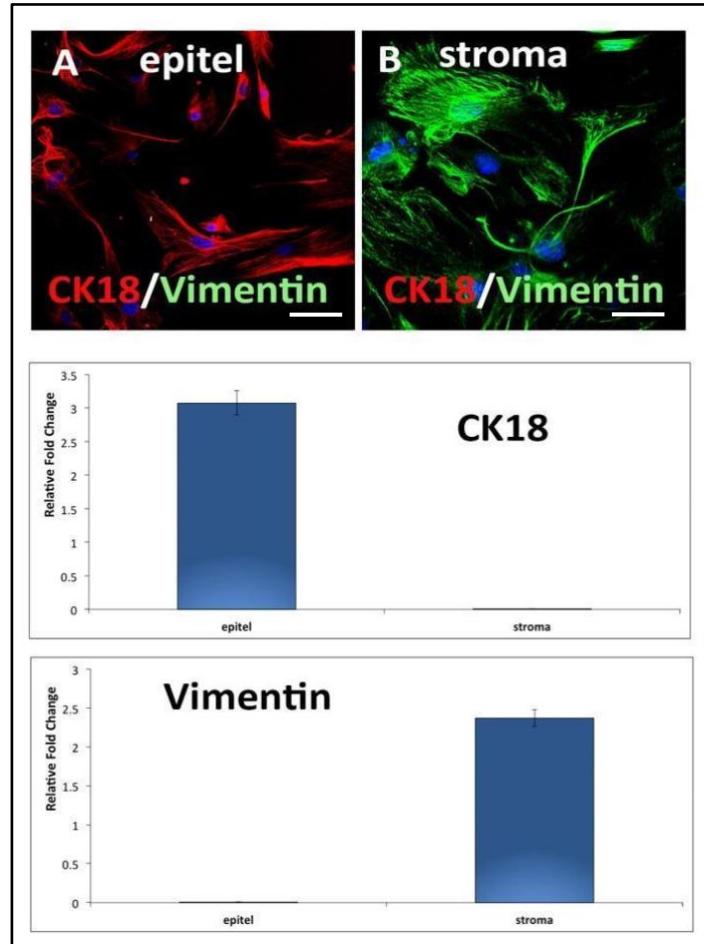


Şekil 9. Endometriyum hücrelerinin izolasyonu ve kültürü. Uteruslar (A, kırmızı oklar) vertikal şekilde açılarak bistüri ile endometriyum tabakası kazındı ve kazınan kısım bistüri ile küçük parçalara

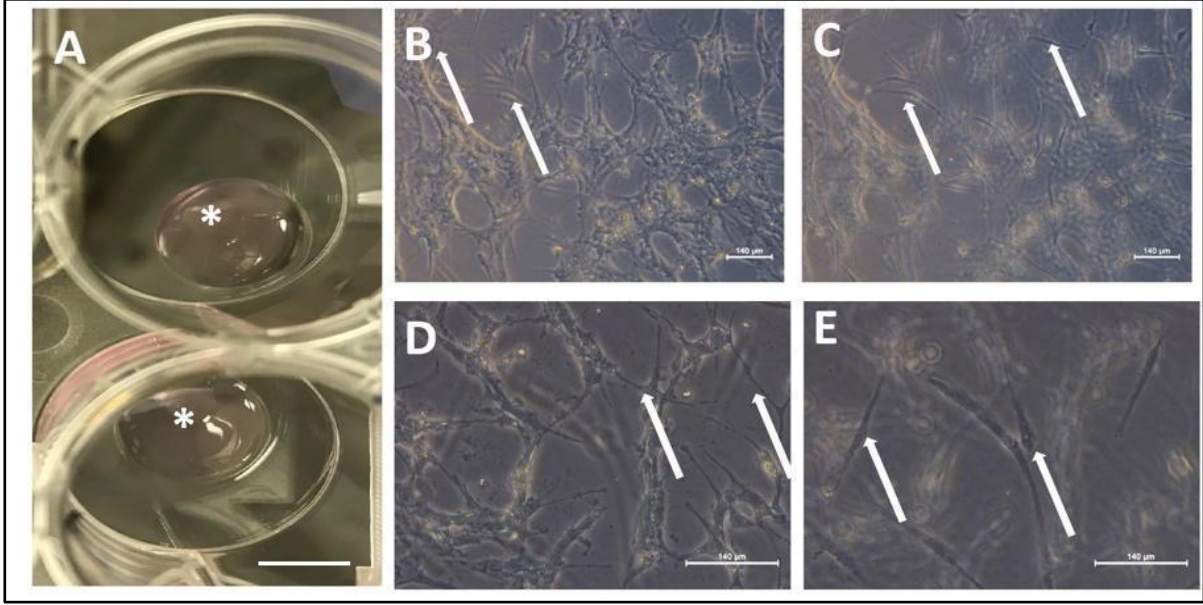
ayrıldı ve sindirildi Elde edilen süspansiyonda epitel hücreleri şeritler halinde asılmış halde izlendi ve süpansiyon önce 100 daha sonra 40 um genişlikte gözenekli olan elekler geçirildi. 40 um gözenekli elek üzerinde kalan hücreler yıkama ile buradan alınarak ekildi ve 72-96 saat sonra epitel adaları izlendi (B, sarı ok). 40 um gözenekli elekten geçen hücreler stroma hücreleri ise ekilerek hızla büyüdü (C). Hücre ko-kültürünün üzerine yerleştirilmiş blastokistler (D, E; siyah oklar) ve blastokistlerin iç hücre kütleleri (D, E; kırmızı yıldızlar) görülebilir. E'deki blastokistin yıldız işaretinin hemen altından kültüre tutunuyor olduğu izlenmektedir. Ölçü çizgileri: A=1 cm; B-D=100 μ m.

4.2.2 Üç boyutlu endometriyal ko-kültür (EKK) ortamları

Üç boyutlu matrijel ve transwell kültürler şekil 11 ve şekil 17'de gösterildiği şekilde başarı ile uygulanmıştır.



Şekil 10. Epitel ve stroma hücrelerinin karakterizasyonu. Kültüre edilen hücrelerden epitel hücreleri için ikinci, stroma hücreleri için üçüncü pasajda örnek alındı. İmmünfluoresan boyama sonrası epitel hücreleri sitokeratin için pozitif, vimentin için negatifken stroma hücrelerinde vimentin pozitif, sitokeratin negatifti. qPCR sonuçları da bu bulguyu destekledi. Ölçü çizgileri: A,B=20 μ m.

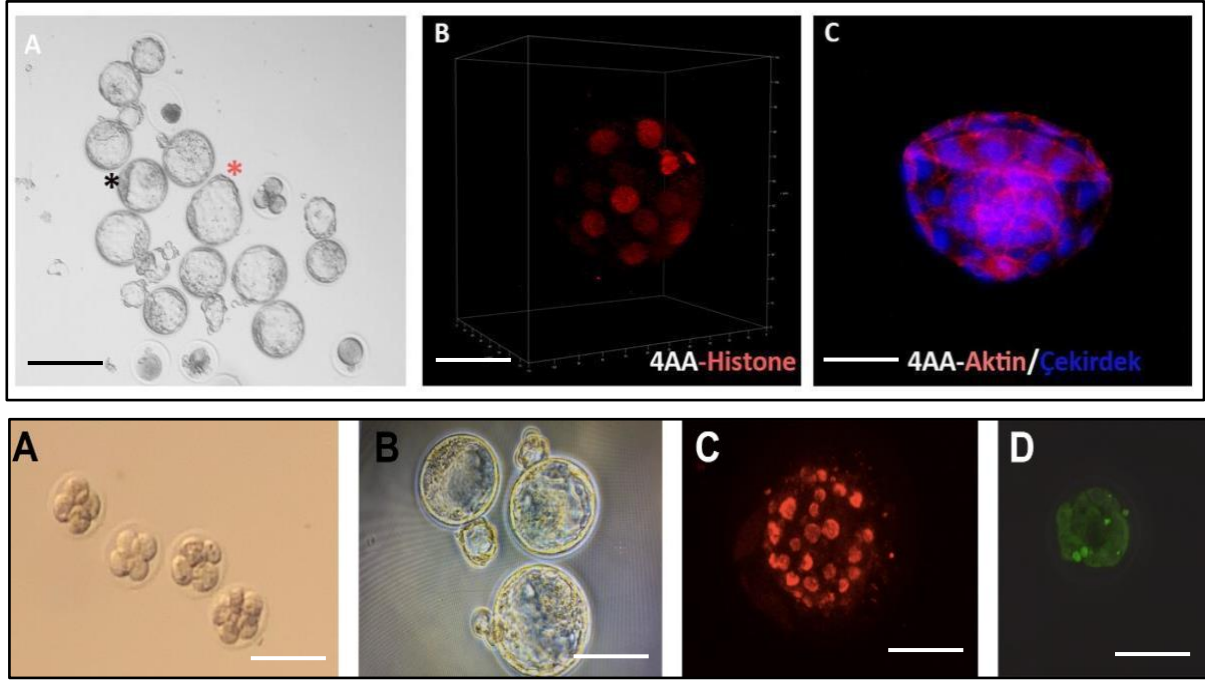


Şekil 11. Üç boyutlu endometriyal ko-kültürün hazırlanması. Semi-solid jel hücre dışı matris olan Matrijel (A, beyaz asterisk) hücrelerin tabakalı halde ekilebilmesini sağlamaktadır. Bu şekilde oluşturulan 3B endometriyal ko-kültürde beyaz oklar farklı odaklarda hücreleri göstermektedir. Ölçü çizgileri: A=50mm, B-E=140 μ m.

4.3 Fare blastokistlerin seçilmesi

4.3.1 Elde sonrası zigotların inkübasyonu ve blastokistlerin oluşturulması ve seçilmesi

Elde edilen bu zigotlardan kültür ortamında gelişen iyi kalitede blastokistler kullanıldı. Bu blastokistlerin 5AA ve 4AA skorlamasında olmasına dikkat edildi. Bu amaçla genişlemiş blastosöl, çok sayıda hücre içeren sıkı ve kompakt şekilde paketlenmiş iç hücre kütlesi ve çok hücre içeren ve kohezif bir epitel yapısı oluşturmuş trofoektoderm hücreleri bulunan blastokistler tercih edildi. Kullanılan/kullanılacak olan blastokistlerin kalitesine örnek fotoğraflar şekil 12’de görülebilir.

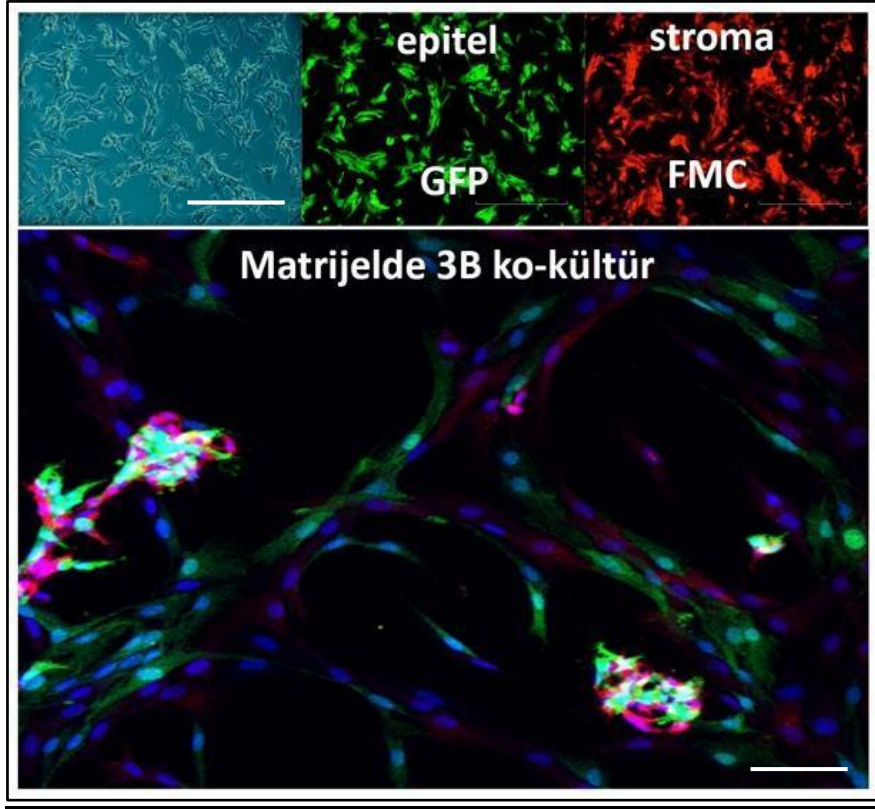


Şekil 12. Blastokistlerin oluşturulması ve seçimi. Tek aşamalı kültür mediumunda zigotların %65-80'i blastokist oluşturdu. Bu blastokistlerden 4AA (A, siyah asteriks), 5AA (kırmızı asteriks) kalitesinde olan GFP embriyolar (GFP yapıldıktan sonra) seçilmektedir (üst sıra). **İndükisyon sonrasında zigotlardan elde edilen farklı evrelerde fare embriyoları.** Klivaj dönemi (alt sıra, A, D) ve blastokist (alt sıra B, C) dönemi embriyoları izlenmektedir. (C: PI çekirdek boyaması, D: aktin (yeşil)/DIC) (alt sıra). Ölçü çizgileri: (üst) A=200 μ m, B, C=40 μ m; (alt) A=80 μ m, B=100 μ m, C,D=60 μ m.

4.4 Hücrelerin ve zigotun viral transdüksiyonu

4.4.1 Epitel ve stroma hücrelerinin viral transdüksiyonu

Viral transdüksiyon için besiyeri içine 2mg/ml olacak şekilde hazırlanan puromycin hücrelere verildi ve negatif kontrolde hücre kalmayana kadar devam edildi (3 gün). 3 günün sonunda seleksiyon sonlandırıldı ve virüs almayan hücreler ortamdan uzaklaştırıldı. Kullanılan promotörler nedeniyle epitel hücreleri GFP pozitif, stoma hücreleri mCherry pozitif olarak izlendi (Şekil 13).



Şekil 13. GFP ve mCherry pozitif endometriyum hücreleri ile ko-kültür oluşturulması. Ko-kültür ortamında epitel ve stroma hücreleri ayrı ayrı transfekte edilmiştir. Ölçü çizgileri: üst sıra=200 μ m, alt=50 μ m.

4.4.2 Zigotların transfeksiyonu ve transdüksiyonu

Zigotlarda GFP ifadesini sağlamak için üç metod optimize edilmek üzere denenmiştir:

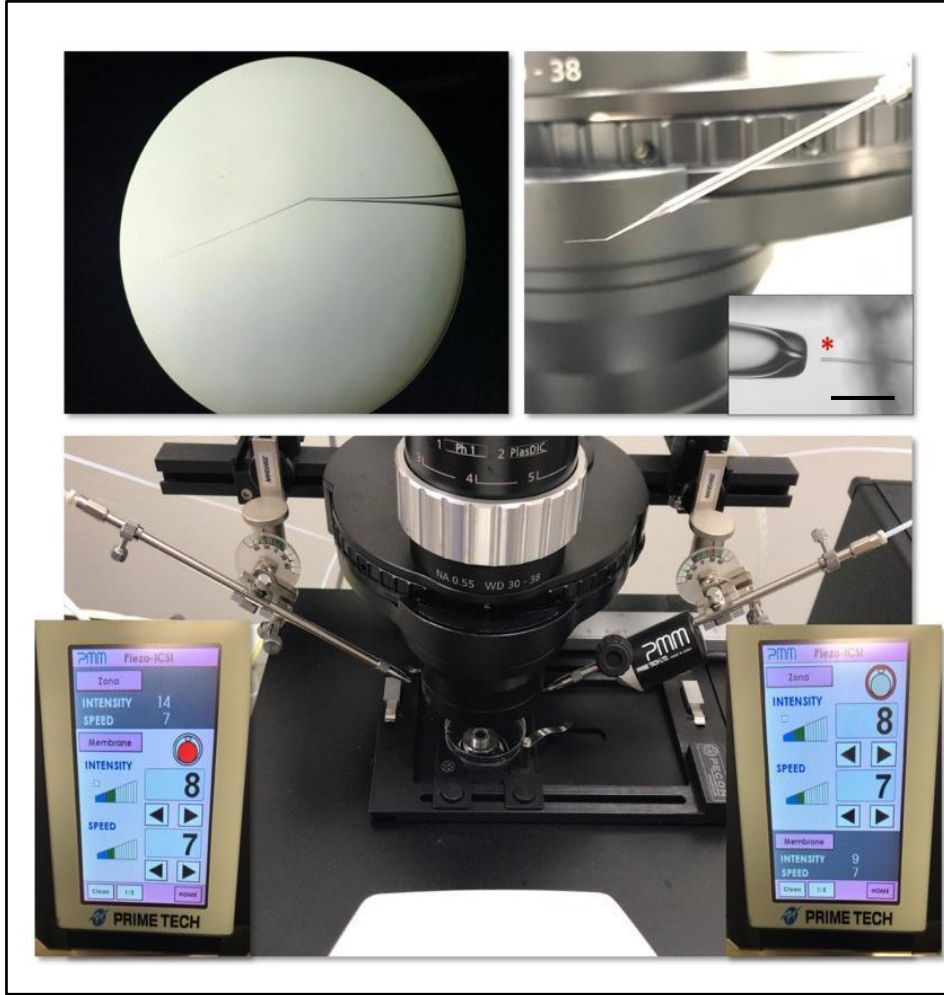
1. Zigotun izolasyon sonrası plazmid veya virüs damlacıklarına konması
2. Piezzo manipulasyonla sadece zona delinerek perivitellin aralığa plasmid gönderilmesi
3. Hem zona hem de oolemmaya piezzo manipülasyon uygulanarak mikroiinjeksiyonla transfeksiyon yapılması

Uygulanan yöntemlerde kullanılan dozlar ve etkileri şekil 14’de, piezzo manipulasyonun ayrıntıları şekil 15’te, oluşturulan GFP (+) embriyolar figure 13’te ve GFP (+) blastokistlerde oluşturulan 3-boyutlu kültürler şekil 16 ve 17’ de gösterilmektedir. Bu deneyler öncelikle blastokistin GFP pozitif olarak kullanılması için planlanmış, ancak aşağıda açıklanacak sonuçlar nedeniyle bu yöntem son bulguların eldesi için kullanılmamıştır.

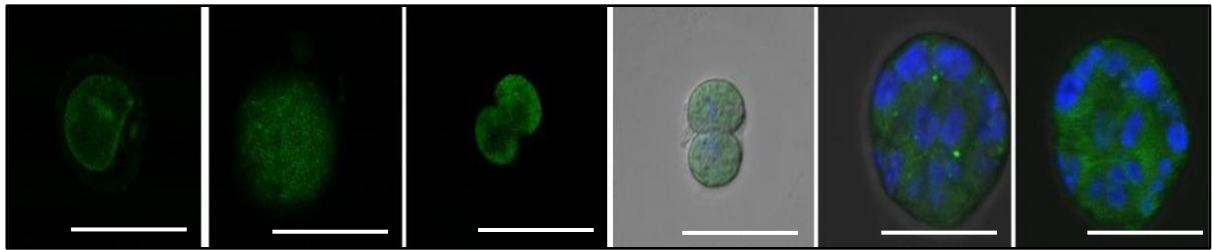
A TOTAL volüm	Virüs miktarı	Medium miktarı	Protamin sülfat/stock 8mg/ml
12 µl	3 µl	7 µl	2 µl
12 µl	5 µl	5 µl	2 µl
12 µl	7 µl	3 µl	2 µl
B TOTAL volüm	Plazmid miktarı	Medium miktarı	Fugene
12 µl **	3 µl	7 µl	2 µl
12 µl	5 µl	5 µl	2 µl
12 µl	7 µl	3 µl	2 µl

Şekil 14. Transfeksiyon/Transdüksiyon için uygulanan yöntemlerde kullanılan dozlar ve etkileri

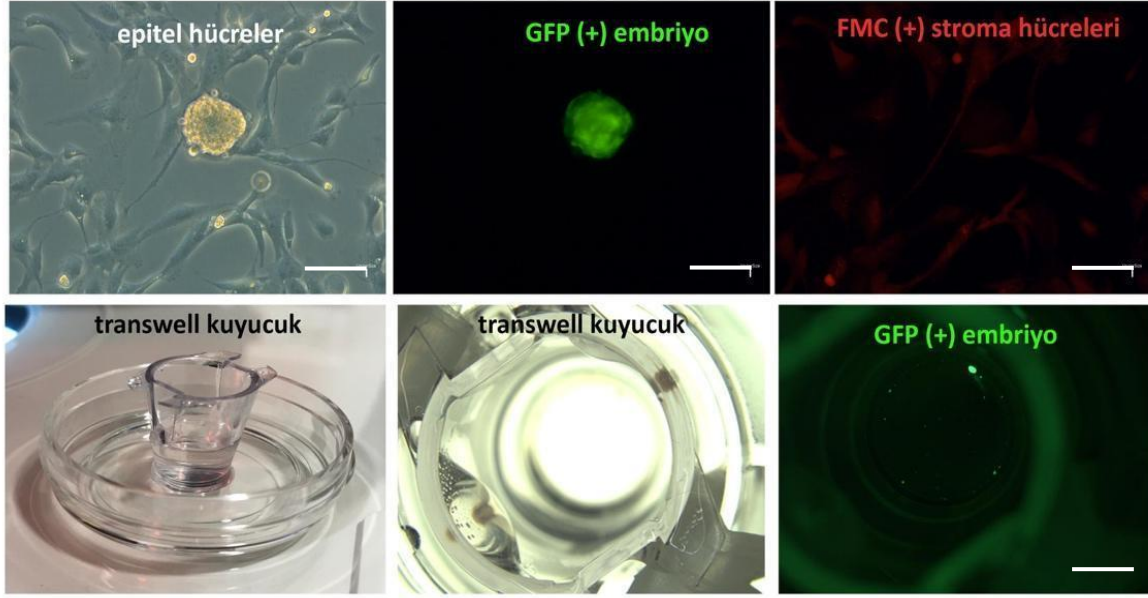
A.Virüs damlacıkları:Transdüksiyonda kullanılan lenti virüs GFP'dir. Lenti virüsün Retro virüse göre çok daha küçük olması hücreye/zigota girişi ve genoma entegre oluşunu daha verimli hale getirmektedir. Bununla beraber verilen protamin sülfat virüsün hücreye/zigota girişini kolaylaştırmakta ve verimi arttırmaktadır. Fakat konsantre halde verilen virüsün zigot için toksik olduğu ve zigotu dejenere ettiği gözlemlendi. **B.Plazmid damlacıkları:**Transfeksiyon ile verilen plazmid plexLVGP'dir. Plazmid dropları oluşturulurken kullanılan Fugene bir transfeksiyon kolaylaştırıcı olup, plazmidin etrafını sarıp hücreye/zigota girişini daha verimli hale getirmektedir.



Şekil 15. Piezzo manipülasyonun ayrıntıları. Zigotların transfeksiyonu için kullanılan bu yöntemde Piezzo manipülasyon pipeti ile zona pellusida ve oolemma piezo manipülasyonlarla delindikten sonra GFP için oluşturulan construct enjekte edilmektedir. Bu amaçla genelde zonada intensite 8, hız 7 ayarında uygulanırken, oolemma çoğu kez benzer şekilde, bazı durumlarda da daha düşük olarak uygulanmaktadır. Kullanılan mikroenjeksiyon pipeti klasik mikroenjeksiyon pipetlerinden farklı olarak geniş uçlu, uzun ve yatay bir pipettir (mikroenjeksiyon pipeti, kırmızı asteriks). Ölçü çizgisi=30 mm.



Şekil 16. GFP (+) embriyolar. Zigottan itibaren GFP pozitifliği gösteren embriyolar. İlk örnekte mikroenjeksiyon trasesinin izi bulunmaktadır. Ölçü çizgileri=80 μ m.



Şekil 17. GFP (+) blastokistlerde oluşturulan 3-boyutlu kültürler. Üst sırada transwell kullanılmadan yapılmış 3B kültürler, alt sırada transwelle hazırlanmış kültürler izlenmektedir. Transwell kültürlerinde görüntü stereomikroskop altında daha küçük büyütmede alınabilmıştır ve FMC (+) hücreler oldukça aşağıda kaldığı için iyi izlenememektedir. Ölçü çizgileri: üst sıra=100 μ m, alt sıra=1 mm.

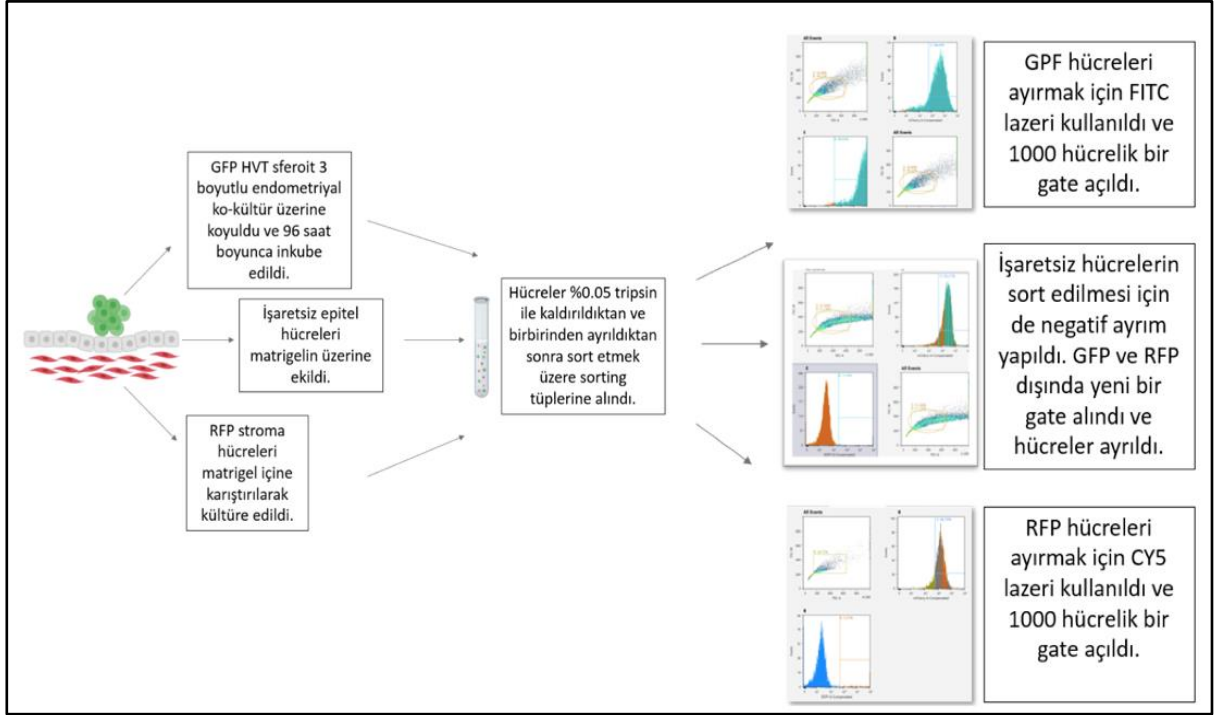
4.5 RNA dizi analizleri öncesi optimizasyon deneyleri

RNA dizi analizi deneylerinde embriyo kültürlerinde az sayıda hücre bulunması ancak kullanılacak yöntemin tek hücre dizilim yöntemi olmaması nedeniyle hali hazırda elimizde primerleri bulunan LIF ve P53 genlerinin endometriyum epitel ve/veya stroma hücrelerinde susturulması, bu hücrelerin GFP veya mCherry pozitif duruma getirilmesi, susturulma sonucu diğer bazı implantasyon genlerinin ifadesine etkisi, ve GFP/ mCherry pozitif hücrelerin FACS ile ayrılması ile ilgili HVT hücrelerinin de kullanıldığı pekçok optimizasyon deneyi yapılmıştır. Bu bölümde yapılan bu çalışmaların bulguları özetlenecektir.

4.6 Hücre ayrıştırma deneyleri

4.6.1 İnsan villöz trofoblastların (HVT) kullanıldığı ko-kültürlerde FACS

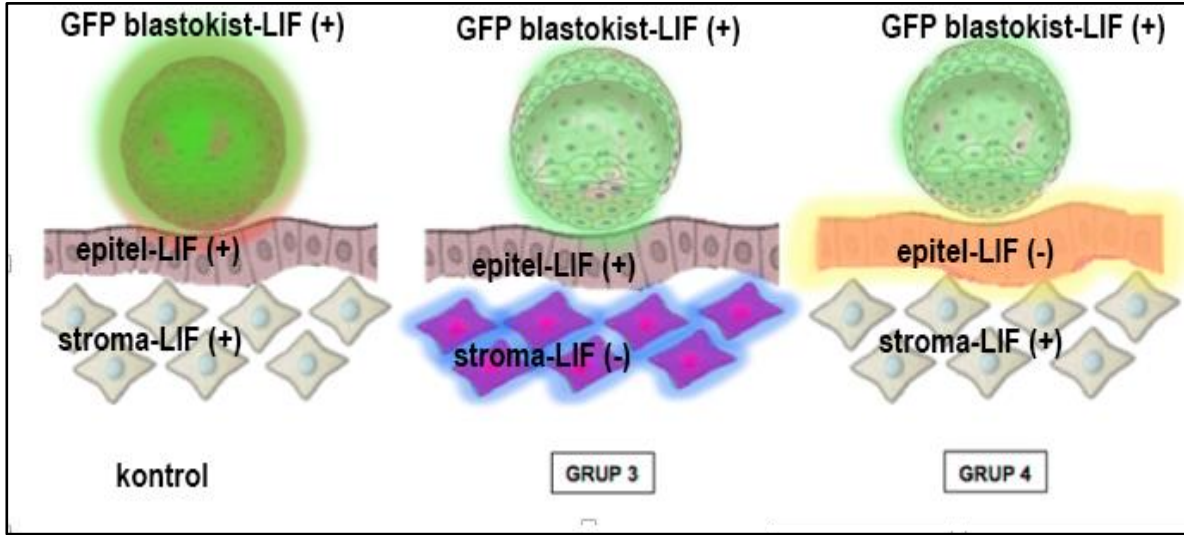
İmplantasyonu taklit etmek için oluşturulan matrijelli (transwellsiz) deney grubumuzun denemesini yapmak için transwell içine HVT sferoidler koyuldu ve 96 saate kadar kültüre edildi. Bu deneme sonunda hücreler 0.05% tripsin ile enzimatik olarak ayrıldıktan sonra ayrıştırıldı.



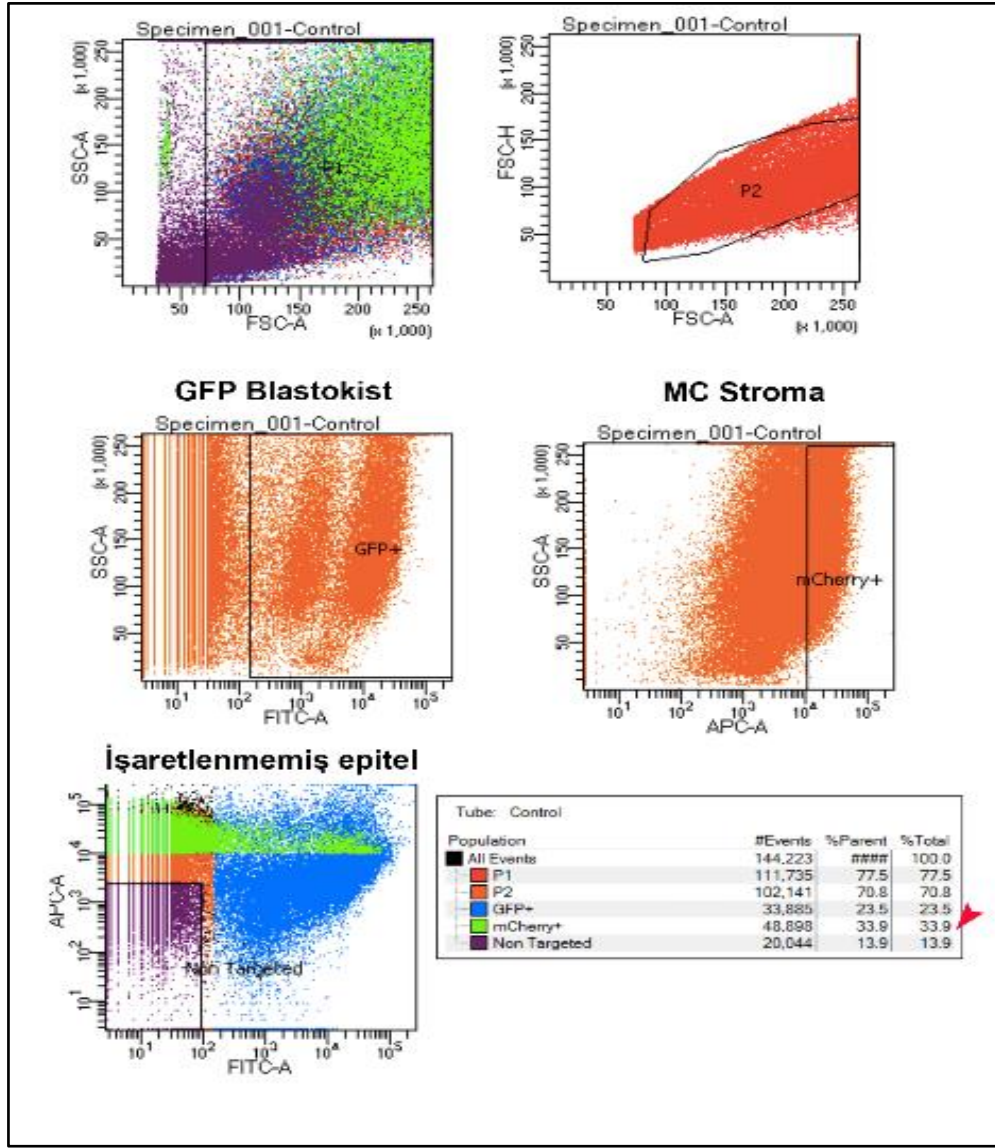
Şekil 18. GFP HVT sferoid, RFP stroma ve işaretsiz epitel hücrelerinin ayrıştırılması. Bu deneme GFP pozitif olan blastokistlerde hata olmadan hücre ayrıştırması yapılabilmesi için uygulanmıştır.

4.6.2 LIF geninin epitel ya da stroma hücrelerinde susturulması ve sonrasında hücrelerin ayrıştırılması

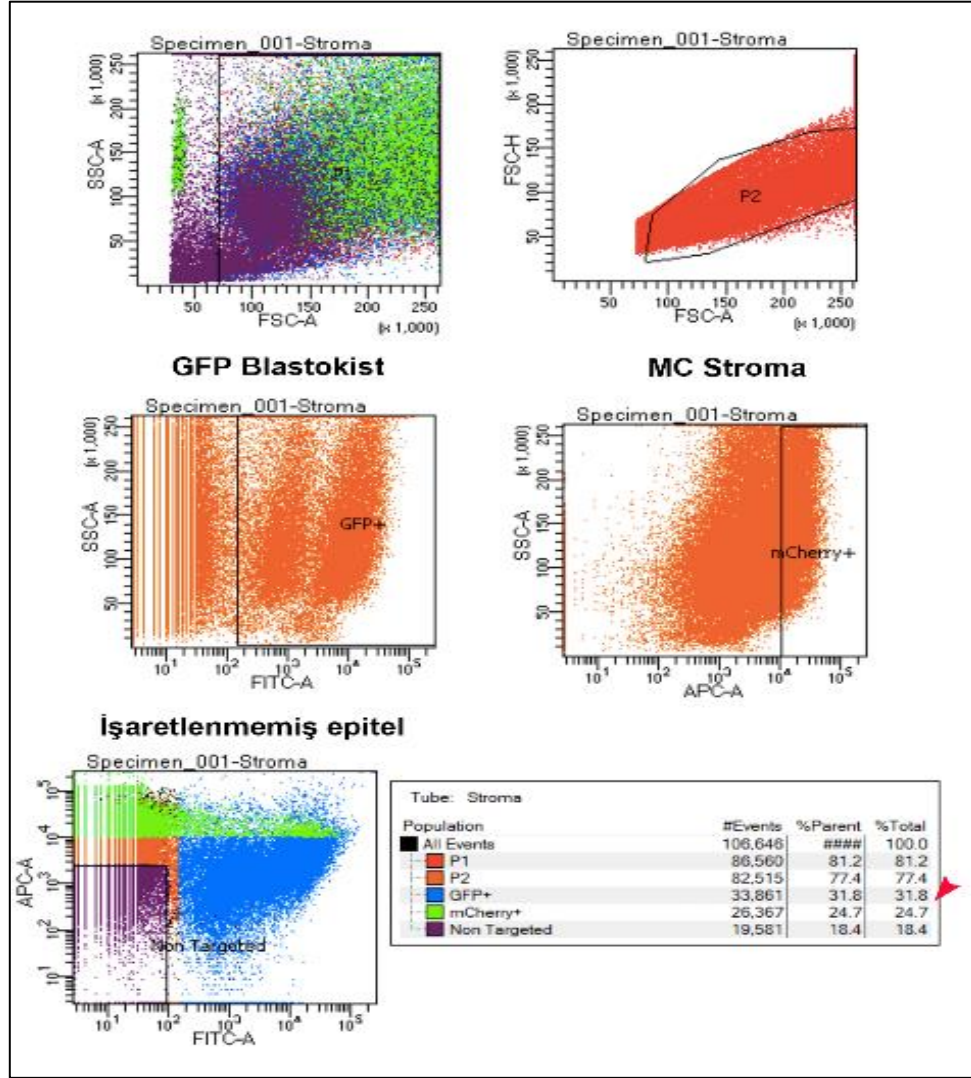
Öncelikli olarak GFP pozitif blastokistlerle yabancı tip (epitel, stroma ve blastokiste genom düzenleme yapılmamış) ve mutant gruplar oluşturulmuştur. Grupların ayrıntıları Şekil 18’de belirtilmektedir. Epitel ve stroma hücrelerinde yapılan genom düzenlemeleri ile ilgili ayrıntılar 6.1.3 bölümünde belirtilmektedir. Bu kültür için yapılan FACS özellikle epitel ve stroma hücreleri için yeterli olarak değerlendirilmiştir ve sonuçlar Şekil 19-21’de paylaşılmaktadır.



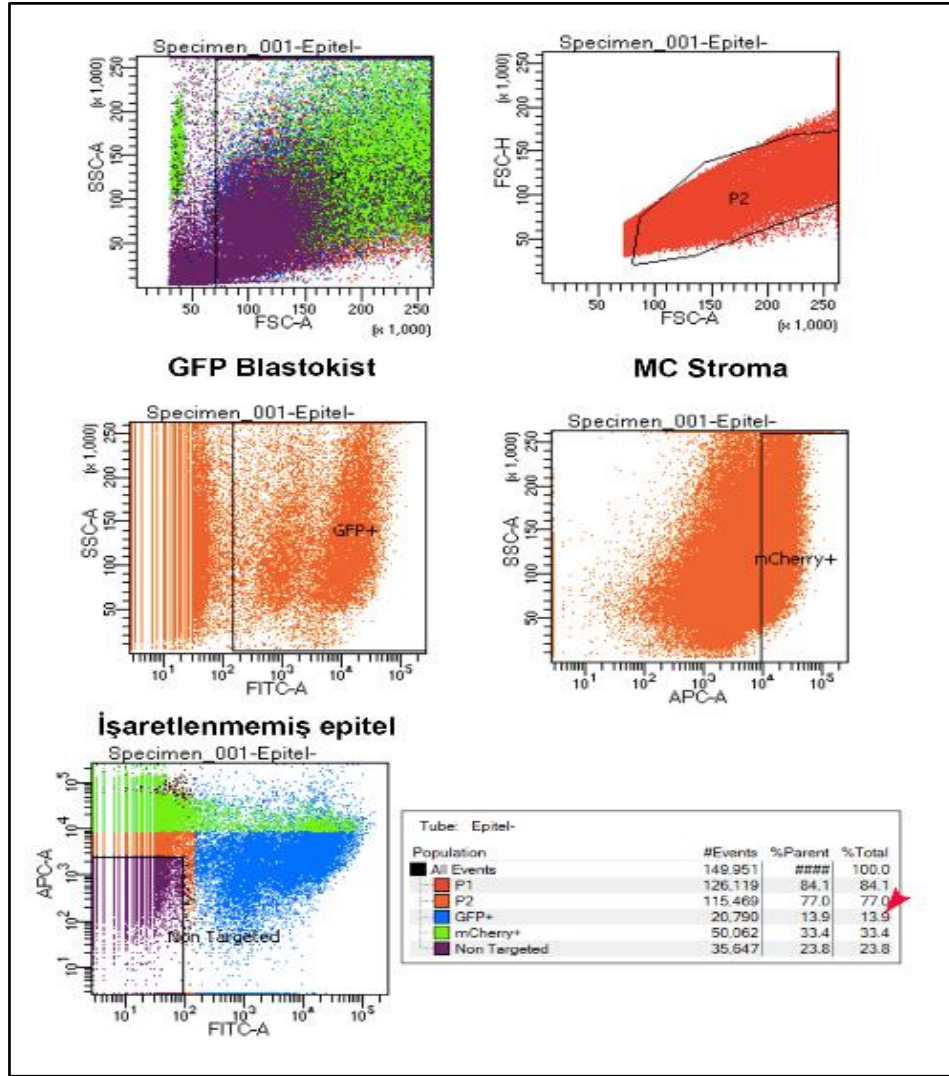
Şekil 19. FACS için hazırlanan gruplar. Kontrol grubu GFP pozitif embriyo, susturulmuş geni olmayan epitel ve stroma hücrelerinden kurulmuş endometriyal ko-kültürdeki implantasyon modelini ifade etmektedir. Grup 3 (yabanıl blastokist+ Vahşi epitel+mutant stroma) ve grup 4 (yabanıl blastokist+mutant epitel+ yabanıl stroma) gruplarını temsil eder. Tüm gruplarda blastokist GFP pozitif, epitel işaretsiz ve stroma mCherry pozitif olarak kullanıldı. Hücreler 2'şer biyolojik ve her biyolojik replikat için 2 teknik replikat ko-kültürde 72 saatlik inkübasyondan sonra izole edildiler.



Şekil 20. Kontrol grubunda 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları. 72 saat sonrasında GFP ve MC pozitif hücrelerin kültürde baskın halde izlenmesi iç hücre kütlesi ve trofoblastik hücrelerin implantasyon alanında çoğalıyor olduklarını, stroma hücrelerinin de aynı şekilde bu çoğalmaya eşlik ettiğini işaret etmektedir (kırmızı okbaşı).



Şekil 21. Grup 3'te 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları. Stromada LIF geninin susturulmasının stroma hücrelerinin çoğalmasında bir düşüklük yaratıyor olabileceği değerlendirildi (kırmızı okbaşı).



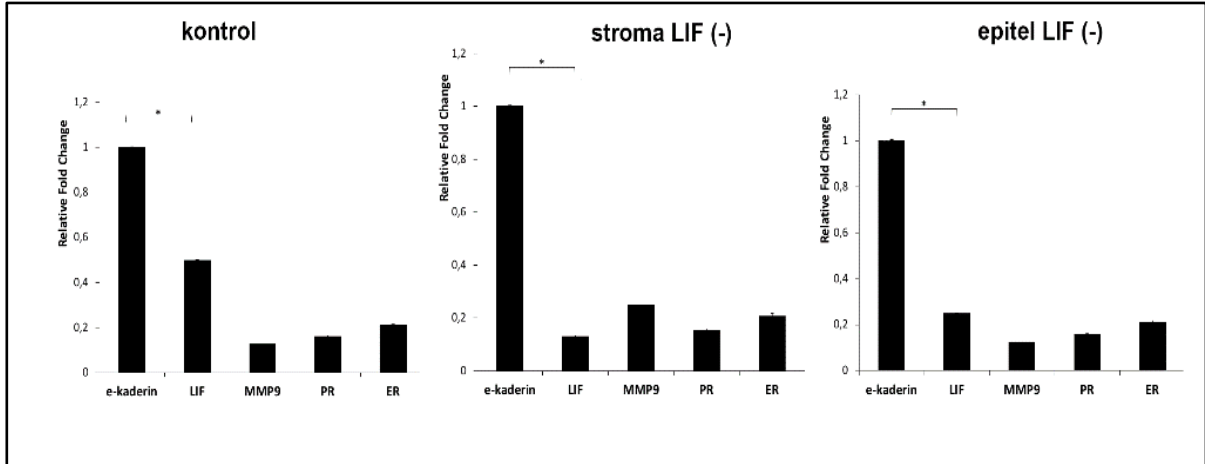
Şekil 22. Grup 4'te 72 saatlik inkübasyon sonrasında implantasyon alanındaki hücrelerin FACS sonuçları. Epitelde LIF geninin susturulmasının blastokist (ICM ve trofoblastik hücreler) hücrelerinin çoğalmasında bir düşüklük yaratıyor olabileceği düşünülmektedir (kırmızı okbaşı).

4.7 Genom düzenleme optimizasyonu

4.7.1 Epitel ve stromada viral transdüksiyon çalışmaları

4.7.1.1 LIF-susturulmuş epitel ve stroma hücreleriyle kurulmuş ko-kültürler

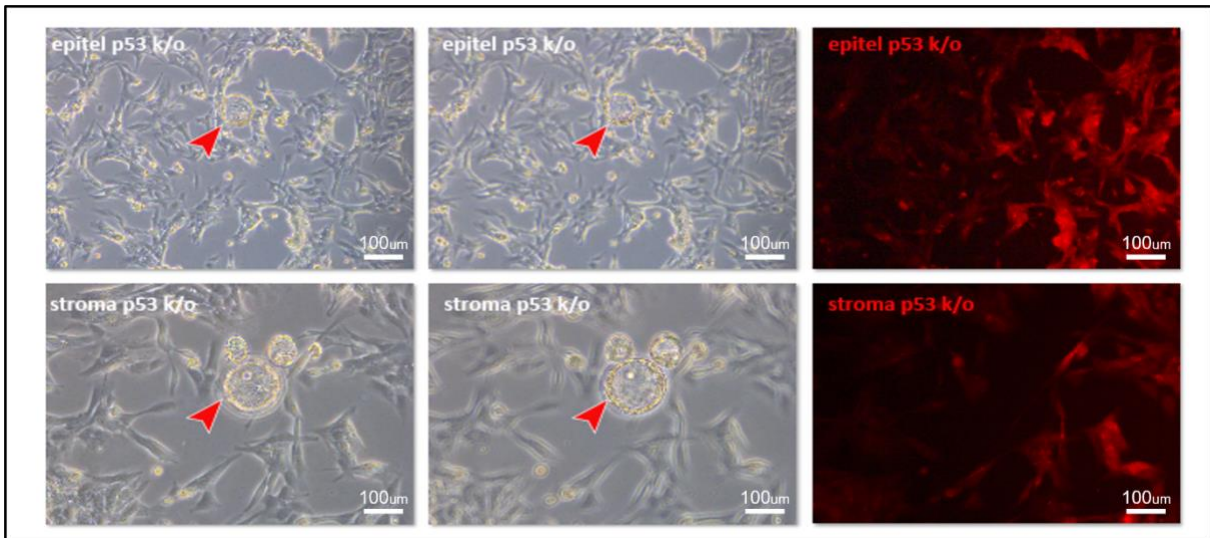
LIF susturulmuş gruplarda bazı implantasyon parametreleri için yapılan qPCR çalışmaları, LIF'in susturulduğu gruplarda ifadesinin anlamlı şekilde azaldığını, bu azalmanın ER ve PR (östrojen ve progesteron reseptörlerini) direk etkilemezken stromada LIF'in susturulduğu grupta MMP9'un hafif arttığını ancak bu verinin bu kısıtlı deney grubunda anlamlılık göstermediği izlenmiştir. Bu deney, sonuçlarından ziyade büyük gruplarda birçok implantasyon parametresi kullanarak yapılacak korelatif analizler için başlangıç deneyi olması açısından önemli idi. (Şekil 23).



Şekil 23. LIF'in susturulmadığı ve susturulduğu gruplarda LIF ve MMP9, PR ve ER'nin ekspresyonları. LIF'in susturulduğu kültürlerde LIF ifadesinin azalması anlamlılık göstermektedir. Bu da LIF'in bu kültürlerde susturulduğunu doğrulamaktadır. Stromada LIF hücreleri susturulmuşken MMP9'daki doğrulanması gerekli artış aynı zamanda FACS sonunda bu grupta stroma hücrelerinin diğer durumlara göre azalmış gözüktüğünü açıklayabilir.

4.7.1.2 mCherry pozitif p53 susturulmuş stroma hücreleri ile kurulmuş ko-kültürler

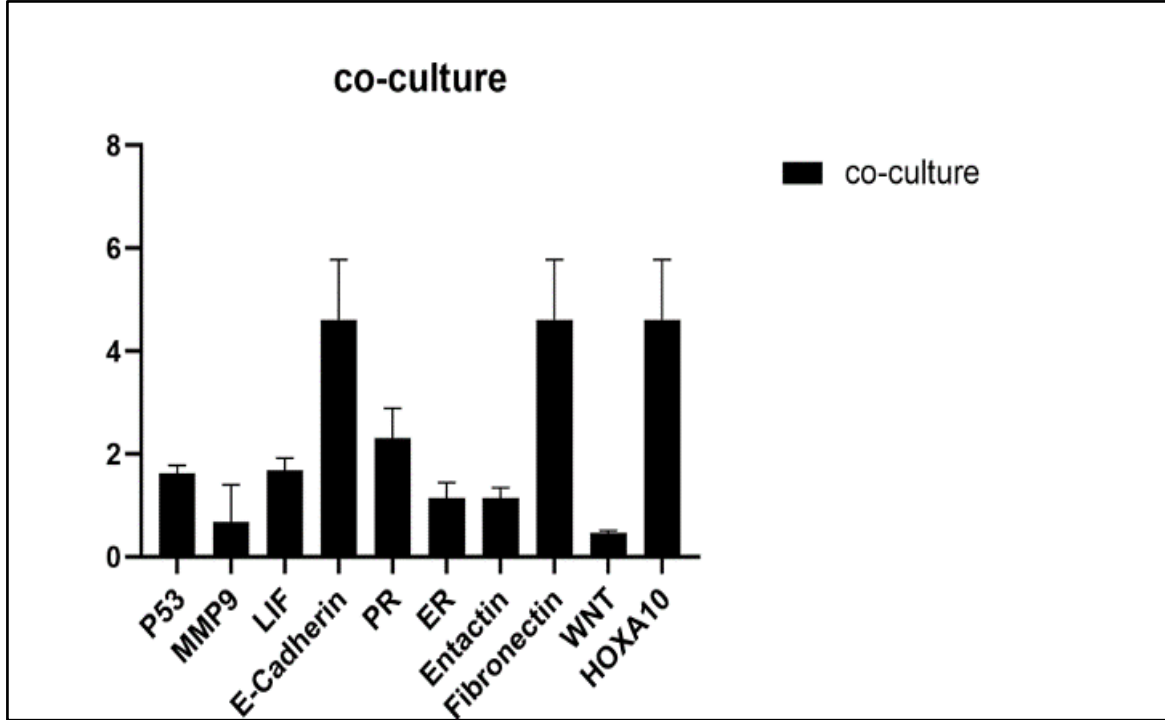
p53'ün susturulmasının gen ifadesi üzerindeki etkileri şekil 24'te gösterilmektedir.



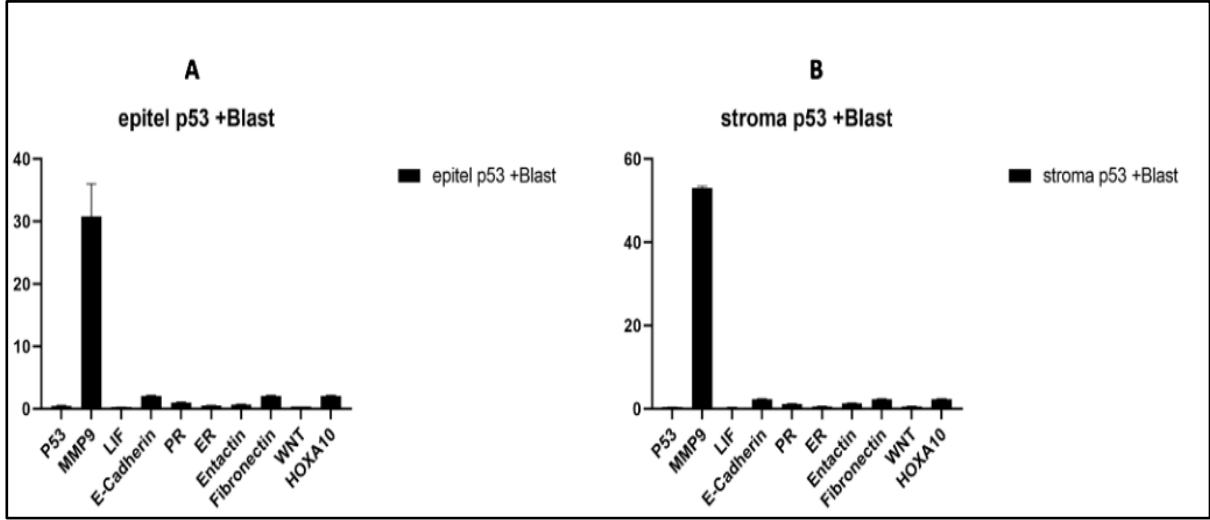
Şekil 24. p53 geni endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenleme çalışmaları. p53 geni endometriyum epitel ve stroma hücrelerinde susturuldu. Bu genin susturulduğu hücreler metin içinde anlatıldığı üzere mCherry ile işaretlendiği için kırmızı olarak görüldü. Şekilde matrijelde epitel ve stroma hücreleri üzerinde blastokistlerle (kırmızı oklar) oluşturulan üç boyutlu kültürler gösterilmektedir. Üstteki panel yabancı stroma, yabancı blastokist ve mutant epitel (p53 susturulmuş) grubu, alttaki panel

yabanıl epitel, yabanıl blastokist ve mutant stroma (p53 susturulmuş) grubu temsil etmektedir. Ölçü çizgileri=100 μ m.

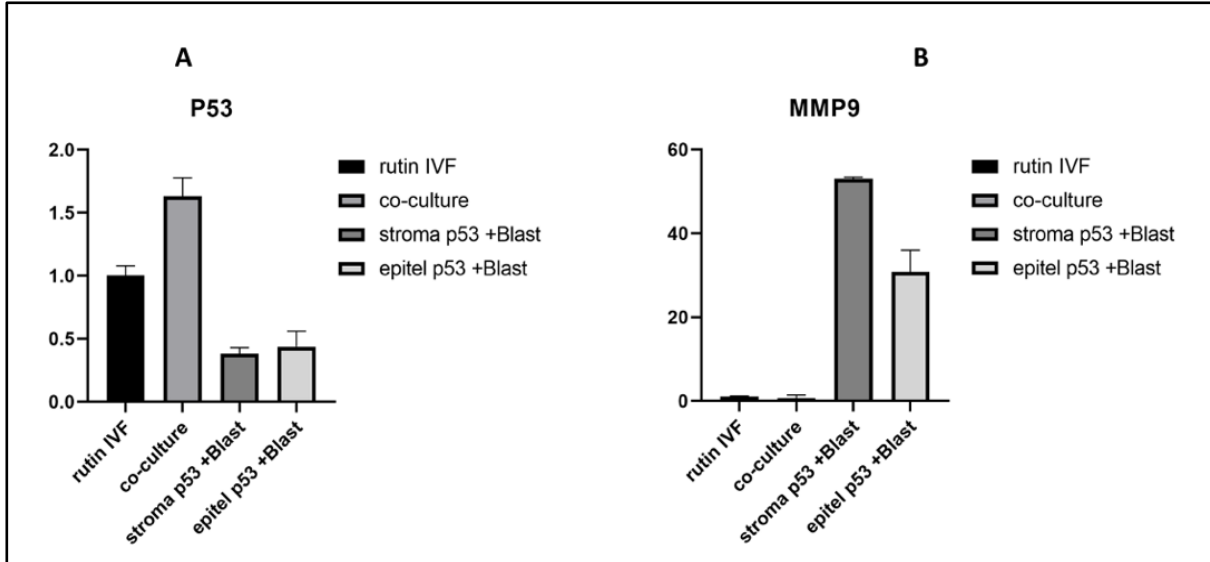
qPCR çalışmaları susturulmuş p53 geni varlığında incelenmiş ve bu çalışmalar da tümüyle optimize edilmiştir. İmplantasyonla ilgili incelenen genler invazyon için MMP9, adezyon için E-kaderin, Entaktin, Fibronektin, embriyonun gelişimi için Wnt, Hoxa10, LIF; endometriyum fonksiyonları için ise östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR) olarak belirlenmiştir. Bu gen ifadeleri ile ilgili analizler aşağıdaki şekillerde (25-31) bulunan grafiklerle gösterilmiş, yorumlar da şekil altlarına eklenmiştir. Analizlerde projede olmayan ama karşılaştırma açısından önemli olan ÜYTE laboratuvarlarında kullanıldığı şekilde rutin damlacık kültürü grubunu da içermektedir. Analizler iki teknik tekrarla yapıldığı için yöntemin oturtulması ve implantasyon parametreleri hakkında fikir vermesi açısından değerlidir.



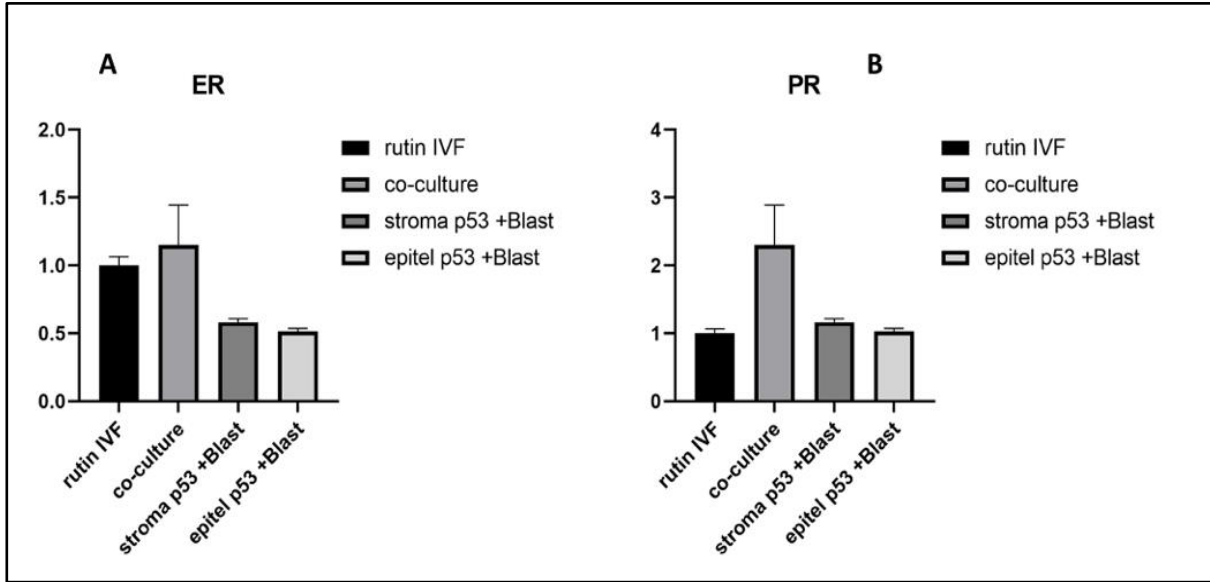
Şekil 25. Yabanıl epitel, stroma ve blastokist ko-kültüründe implantasyonla ilgili bazı genlerin ifadesi. Kültürün 24. saatinde elde edilmiş hücrelerde henüz özellikle yapışma ile ilgili genlerin (E-Kaderin, fibronektin) oldukça yüksek olduğu dikkat çekiyor. Erken gelişim genlerinden Hoxa10 da bu dönemde oldukça yüksek olarak izlenmekte. İnvazyon ile ilgili olarak MMP9 ifadesinin de düşük olması henüz derin invazyon için erken bir dönem olduğunu gösteriyor. Bu dönemde PR ve ER ise beklendiği şekilde bir gen ifadesi gösteriyorlar.



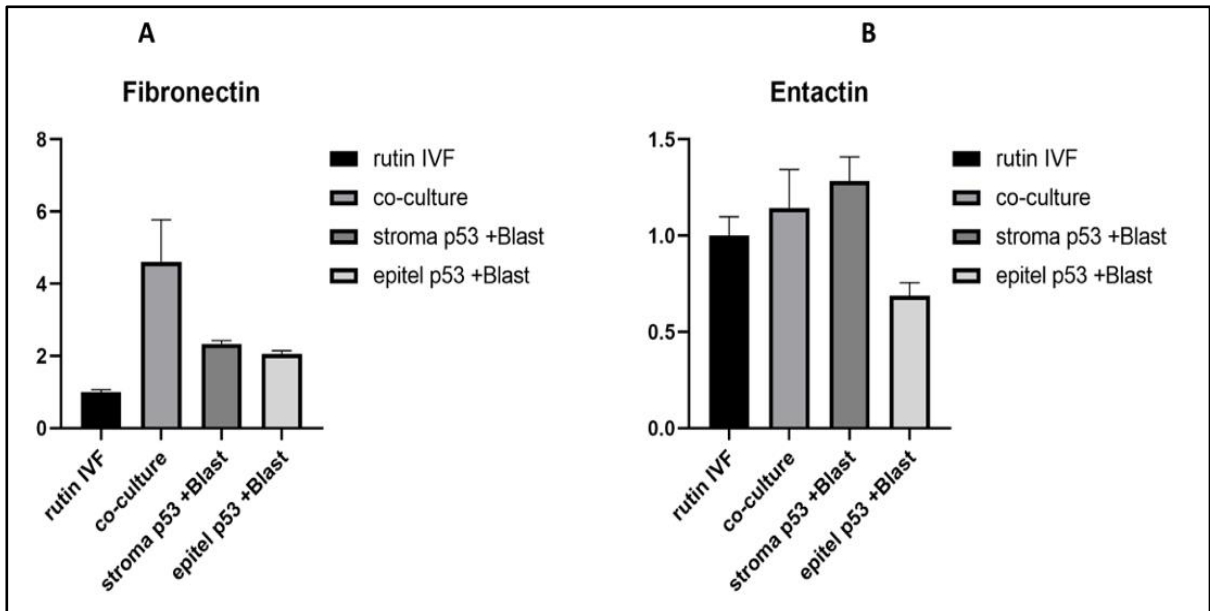
Şekil 26. Mutant epitel (A) veya mutant stroma (B) hücreleri ile kurulmuş kültürlerde p53 geninin diğer implantasyon genlerine etkisi. p53 geninin susturulması diğer tüm genlerin ifadelerini azaltırken MMP9'un ifadesini arttırdı. Tekrarlarla doğrulanması gerekli bir veri olmakla birlikte bu durum blastokistin kontrollü invazyonunda p53'ün önemli görevi olduğuna işaret etmektedir.



Şekil 27. Gruplarda p53 ve MMP9 gen ifadeleri. p53 susturulmadığı kontrol grubu (grup 5) ve rutin damla kültüründe mutant gruplara göre beklentilere uygun şekilde ve şekil 6 ile uyumlu olarak yükseldi (A). MMP9 ise genel grafikte (şekil 25) paylaşılan veriye uygun olarak mutant gruplarda çok yüksek iken kontrol grubunda neredeyse izlenemedi. Tekrar sayısı henüz yeteri kadar olmadığı ve bu gen sadece örnekleme ve optimizasyon için kullanıldığından ötürü p değeri verilmemekle birlikte hata çubuklarının belirli derecede anlamlılık gösterdiği değerlendirildi.

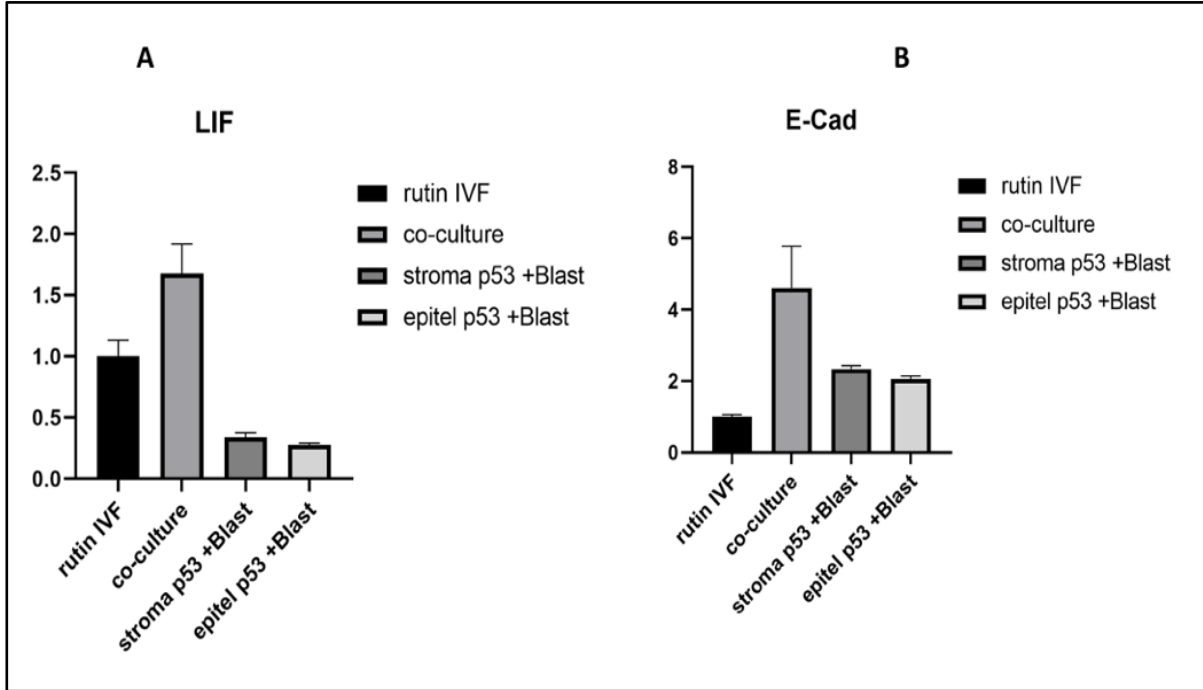


Şekil 28. İmplantasyon alanında östrojen ve progesteron reseptörlerinin p53 geni susturulduğunda gen ifadeleri. İmplantasyon süreci boyunca özellikle endometriyum stroma ve epitel hücrelerindeki östrojen ve progesterona cevabın sağlanması için gerekli olan bu reseptörlerin gen ifadesi mutant gruplarda kontrol grubuna göre belirgin şekilde azalmış olarak izlendi.

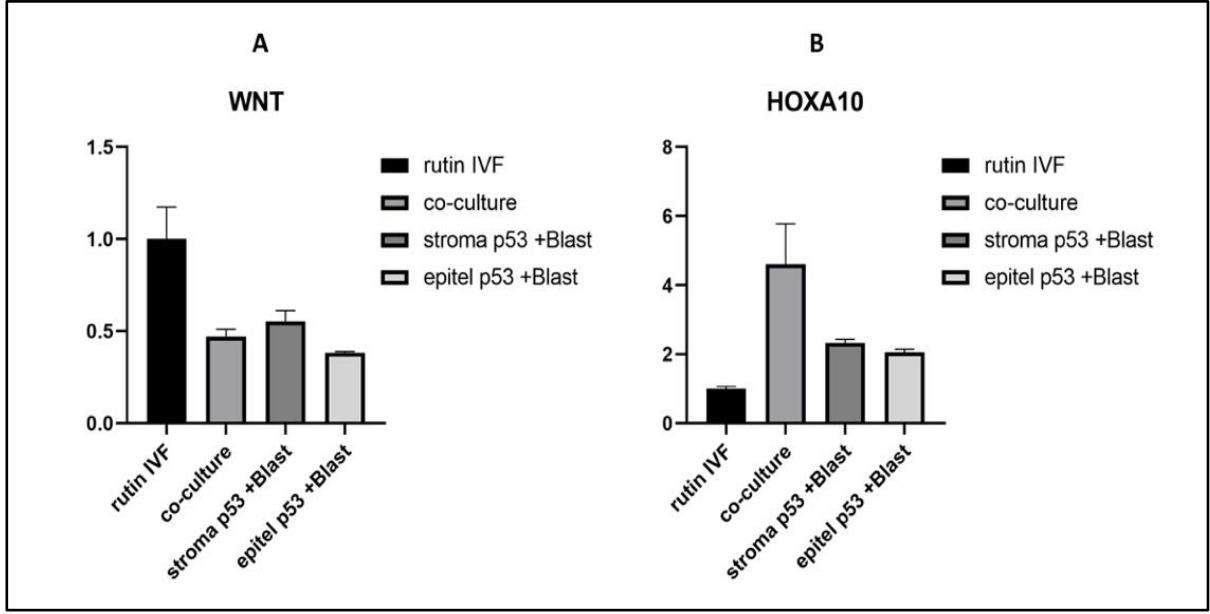


Şekil 29. Fibronektin ve entaktin genlerinin mutant ve kontrol gruplarında ifadesi. Bir hücre dışı matriks glikoproteini olan ve hücre-hücre dışı matriks haberleşmesinde önemli rol oynayan fibronektinin mutant gruplarda ifadesi azalmıştır. Bu grafikte (A) damlacık kültüründe fibronektin ifadesinin en düşük olmasının nedeni bu tip kültürde endometriyum hücrelerinin bulunmamasıdır. Bir bazal lamina elemanı olan ve endometriyumda özellikle bez yapılarının çevresini saran bir protein olan entaktin (yeni adıyla nidogen-1) özellikle mutant epitel grubunda beklendiği şekilde azalmıştır. Bununla birlikte bu grafikte mutant stroma grubundaki artışın tekrarlarla değerlendirilmesi gereklidir. Hata çubukları göz önüne

alındığında bu gen için kontrol ve mutant stroma grubu arasındaki farkın anlamlı olmayabileceği değerlendirildi.



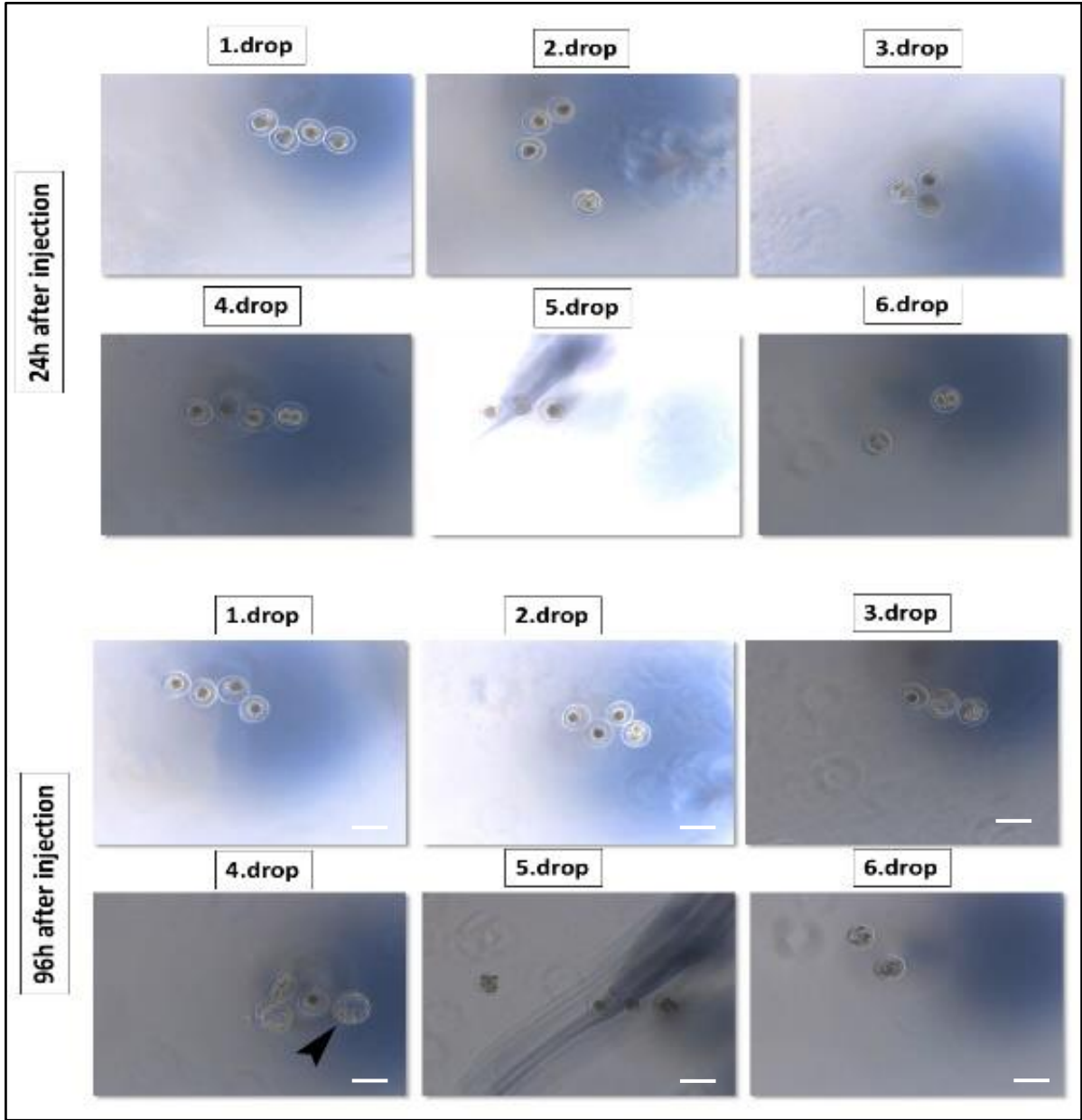
Şekil 30. LIF ve E-kaderin genlerinin genlerinin mutant ve kontrol gruplarında ifadesi. LIF implantasyonun başlangıç aşamalarında embriyonun sağlığı ve aktivitesi ile ilgili önemli genlerden biridir. p53'ün susturulması ile bu gende önemli bir azalma izlenmektedir. Bu grafikte (A) önemli verilerden biri de damla kültüre göre kontrol grubunda (mutant olmayan tümüyle değiştirilmemiş grup) blastokistin daha iyi destekleniyor olmasıdır. B grafiğinde incelenen E-kaderinin kültürün 24.saatinde henüz yüksek olması beklenebilir ve kontrol grubunda da bu şekilde ifadesi görülmektedir. E-kaderin implantasyon sürecinin ilerlemesi ile hücrelerarası bağların bazı bölgelerde zayıflaması bazı bölgelerde ise artması özelliğini gösteren bir proteindir. Bu genin de p53 susturulmasından belirgin şekilde etkilendiği izlenmektedir.



Şekil 31. Gelişimsel genlerin ifadeleri. p53 geninin susturulması kontrol ve mutant gruplar arasında Wnt geni ifadesi açısından fark yaratmamak ile birlikte damla kültürde Wnt ifadesinin yüksekliğinin anlamlılık açısından araştırılması gerekir. Hoxa10 ise embriyonun erken ve geç gelişiminde önemli görevler alacak bir gen olarak p53 geninin susturulması ile kontrol grubuna göre düşük olarak izlenmiştir.

4.7.2 Mikroenjeksiyon çalışmaları

Blastokist canlılığı açısından (sekans için GFP pozitif yaptığımız embriyolar için uyguladığımız yöntem de dahil olmak üzere) daha kapsamlı bir çalışma yapıldı.

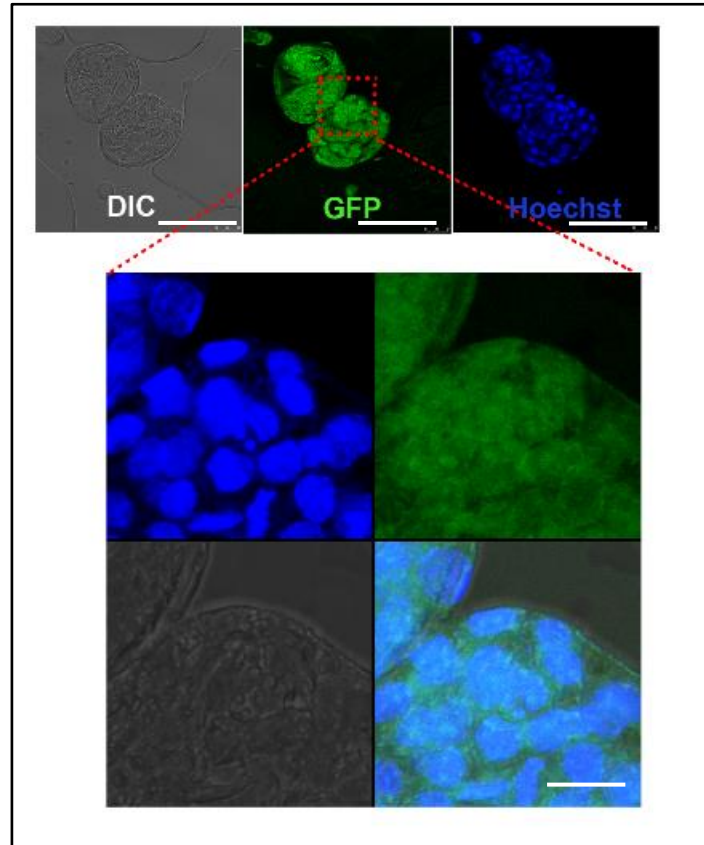


Şekil 32. Virus /plazmid mikroinjeksiyonunun blastokistin canlılığına etkisi. Mikroenjeksiyondan 24 ve 96 saat sonra blastokistler görüntülendi. Ölçü çizgileri=100 μ m.

Şekil 32’de izlenen damlacık grupları şu şekil de oluşturuldu; subzonal injeksiyonda canlı blastokist eldesi daha iyi olarak izlendi (Tablo 2). Bununla birlikte RNA dizi analizi için RNA konsantrasyonu ve RIN (RNA fragman analizi ile elde edilen “RNA integrity number”) değerinin yüksek olması (>8-9) gerekliydi ve toplam GFP pozitif blast sayısı ile bu karşılanmadı. Hatta bu değer için kuyucuk başına yaklaşık 1500 blastokist fare kullanımını da son derece yükseltecek şekilde bir blast kullanımının gerekliliği ortaya çıktı. Şekil 33’te blastokistlerden elde edilen RNA’nın RIN değerinin düşüklüğü gösterilmektedir.

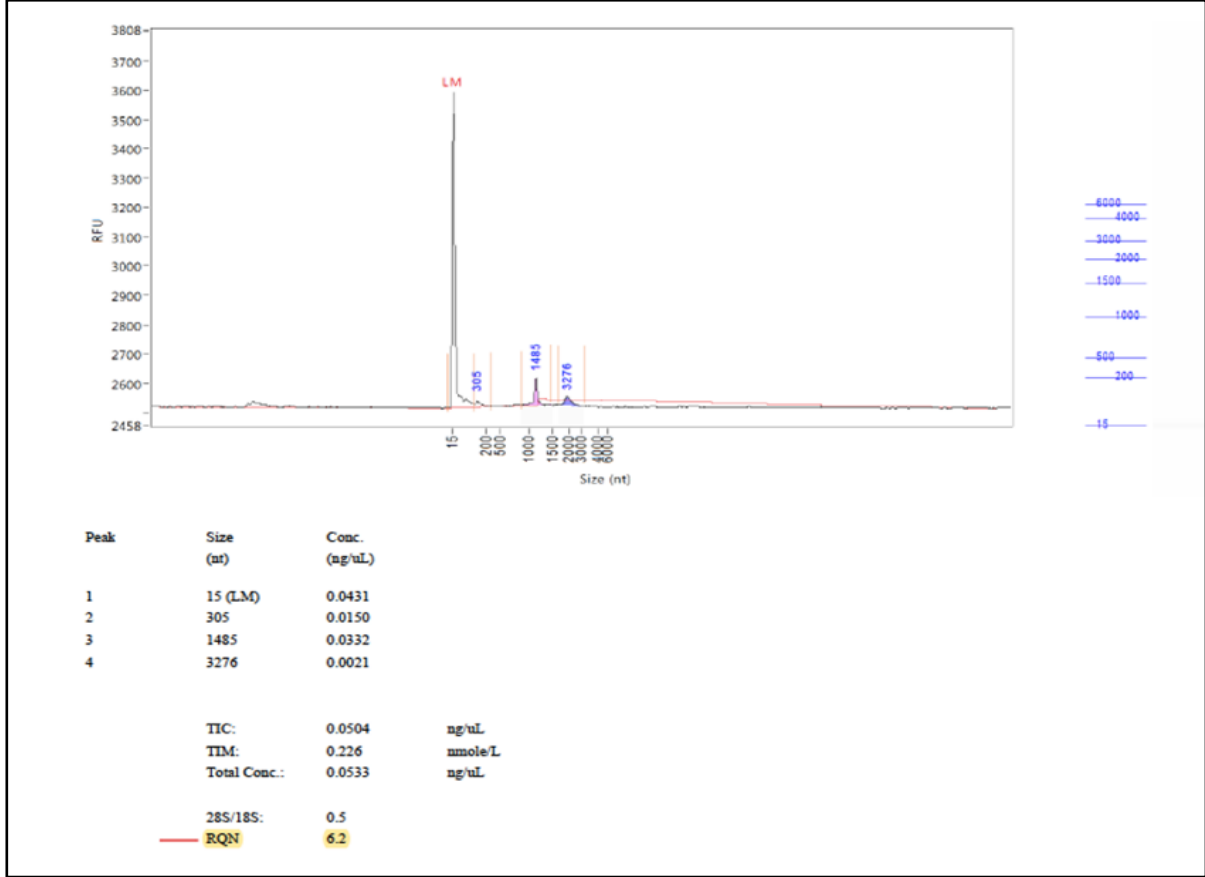
Tablo 2. Zigotta mikroinjeksiyon işlemleri

Damlacık no.	İşlem (n=5)	24 saat post-injeksiyon	96 saat post-injeksiyon
Damlacık 1	Sadece mikroinjeksiyon (virüs ve plasmid yok)	Dejenere (5/5)	Dejenere
Damlacık 2	Subzonal plasmid injeksiyonu	1/5 canlı	1/5 arrest
Damlacık 3	İntrasitoplazmik virus injeksiyonu (mphH-p65-hsf1-GFP)	2/5 canlı	1/5 blastokist
Damlacık 4	Subzonal virus injeksiyonu (mphH-p65-hsf1-GFP)	3/5 canlı	2/5 blastokist
Damlacık 5	Piezzo zona ve oolemma delinmesi sonrası plasmid injeksiyonu	2/5 canlı	2/5 arrest
Damlacık 6	Stereomikroskop altında plasmid kaplı pipet ile subzonal injeksiyon	4/5 canlı	4/5 arrest



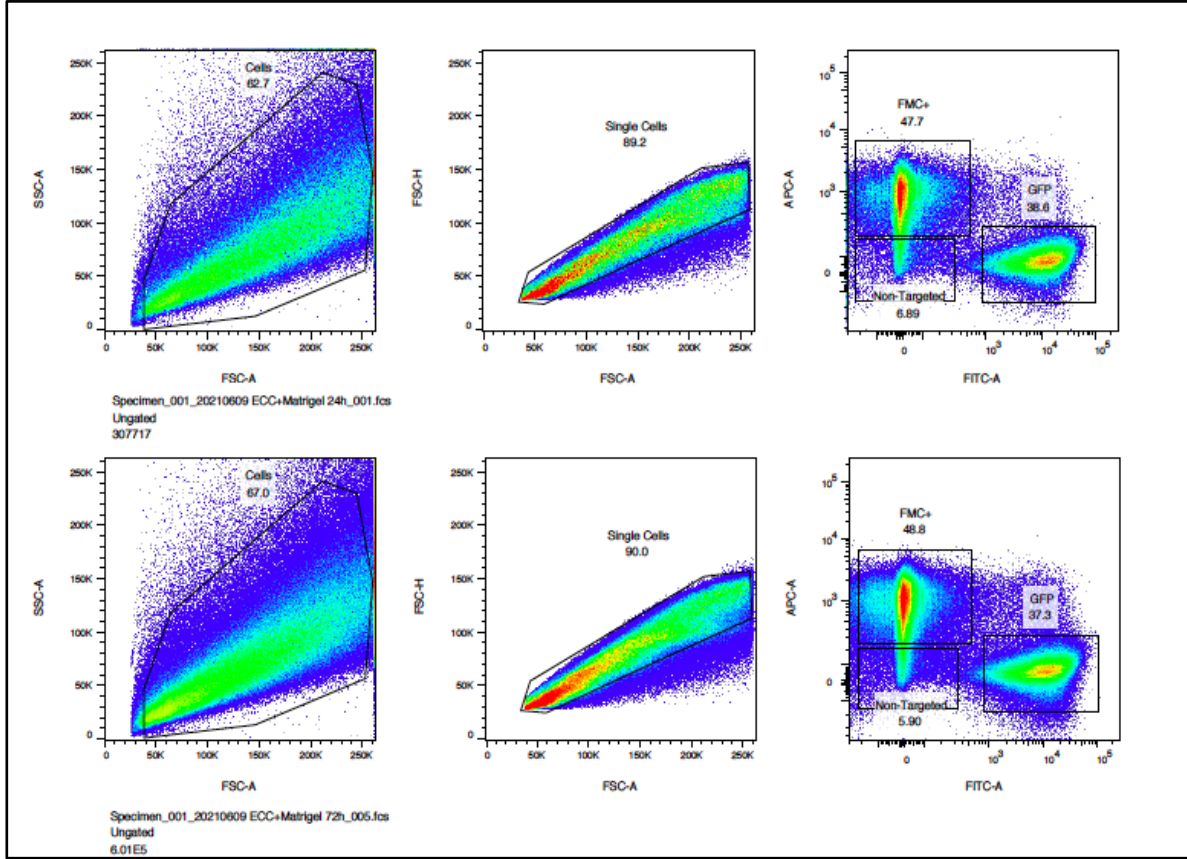
Şekil 33. Subzonal virus enjeksiyonu. mphH-p65-hsf1-GFP yapılan ve GFP olan zigotlar hatching blastokist (zona pellusidasından ayrılan blastokist) evresine ulaştıklarında iç hücre kütlesi ve trofoblastik hücrelerde GFP'yi belirgin şekilde ifade ediyorlardı. Ölçü çizgileri: üst sıra=100 μ m, alt sıra=5 μ m.

4.7.3 RNA dizilim içim kullanılacak örneklerde optimizasyon çalışmaları

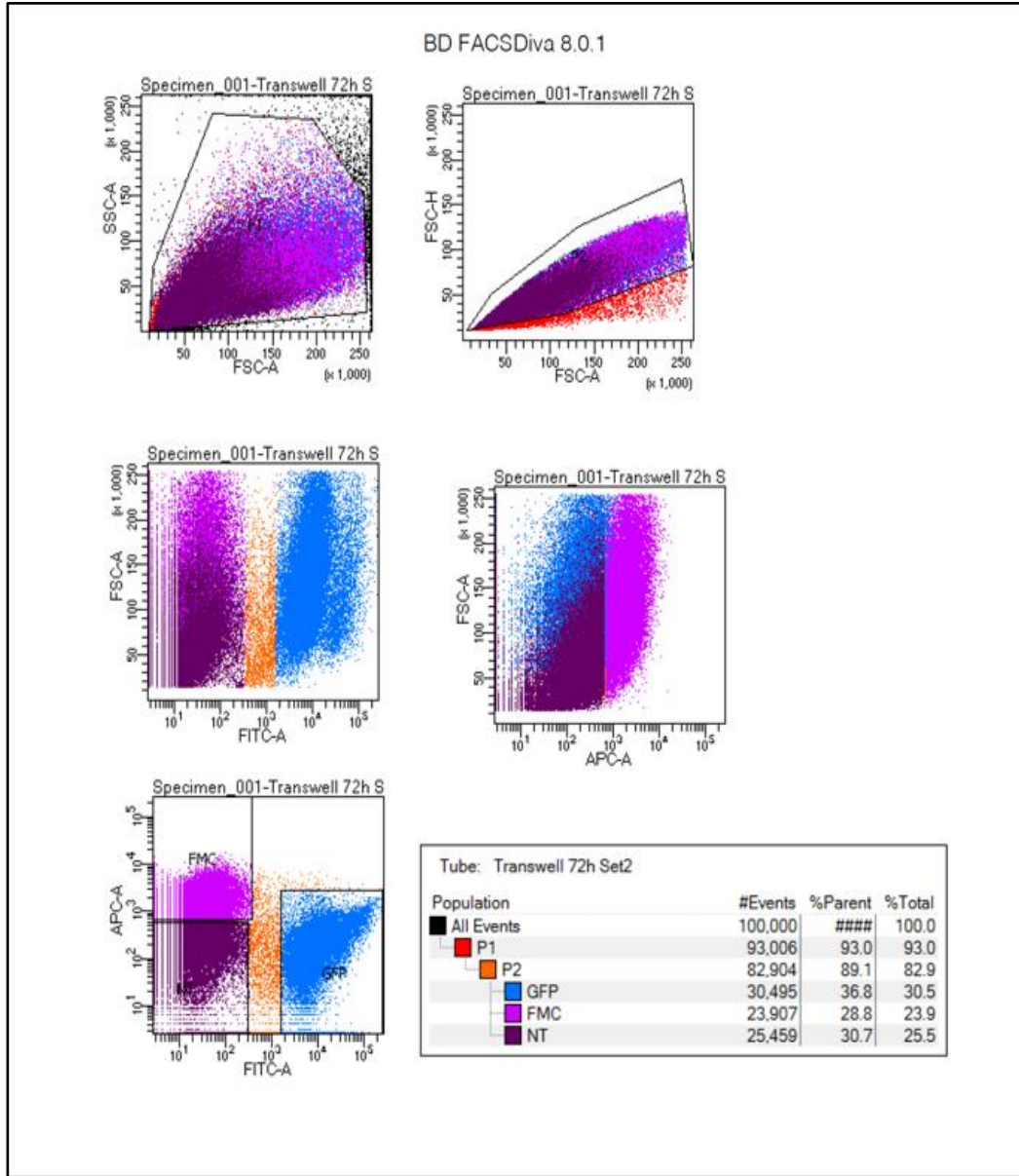


Şekil 34. Blastokistlerden elde edilen RNA'nın RIN değeri. RNA dizilemesinin doğru sonuç verecek şekilde yapılabilmesi için bu değer 8'den yüksek olması istenmektedir. Blastokistler içinse bu 6.2 olarak gerçekleşmiştir.

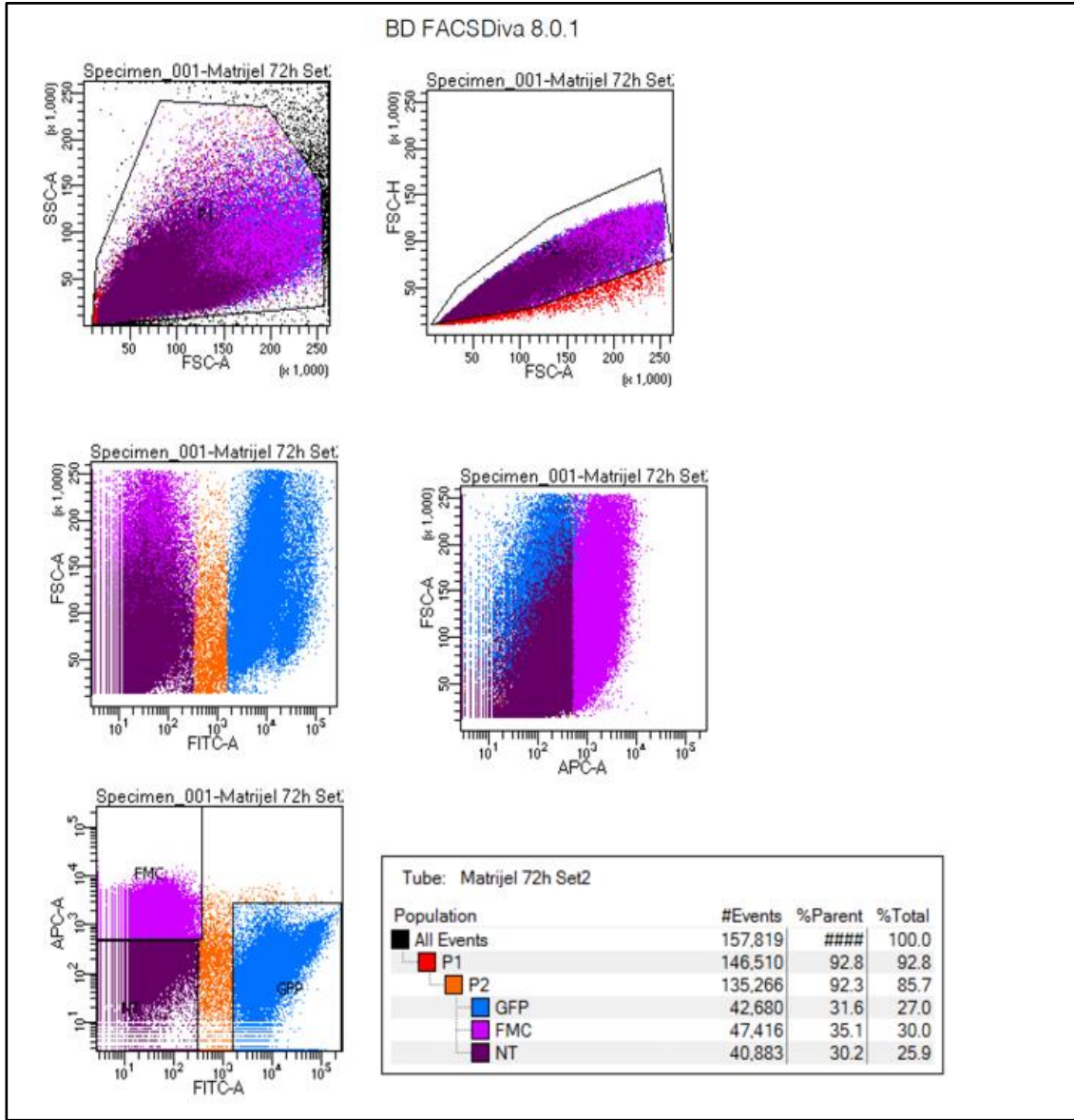
FACS sonrası GFP pozitif blastokistten elde edilen hem total RNA hem de RIN çok düşük olduğu için deneylere sırasıyla mCherry ve GFP pozitif stroma ve epitel hücresi, ve işaretlenmemiş blastokist ile devam edilmiştir. Bu düzenek sonucunda FACS ile ayrılan hücrelerden elde edilen hücre sayısı Şekil 35'te belirtilmektedir. Bu öncü çalışma sonucunda daha fazla örnekle bu grup düzeneği tekrarlandı. Bu optimizasyon çalışmasının sonuçları Şekil 36-39'da gösterilmiştir.



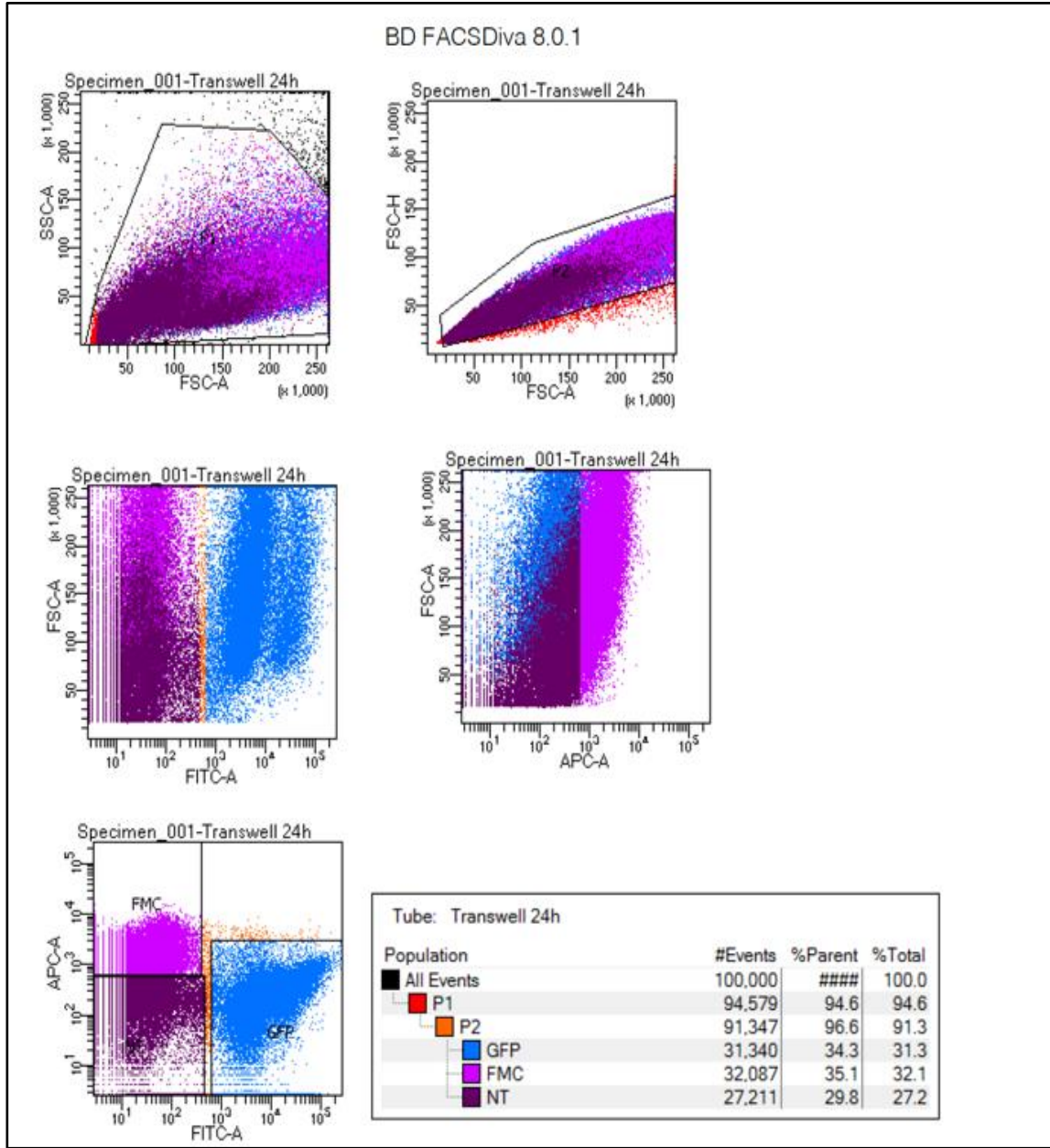
Şekil 35. mCherry ve GFP hücrelerde FACS. Çok sayıda mCherry ve GFP pozitif stroma ve epitel hücresi ve işaretlenmemiş blastokist kullanıldığında ayırıştırma için kullanılan hücre sayısında belirgin bir artış gözlenmektedir.



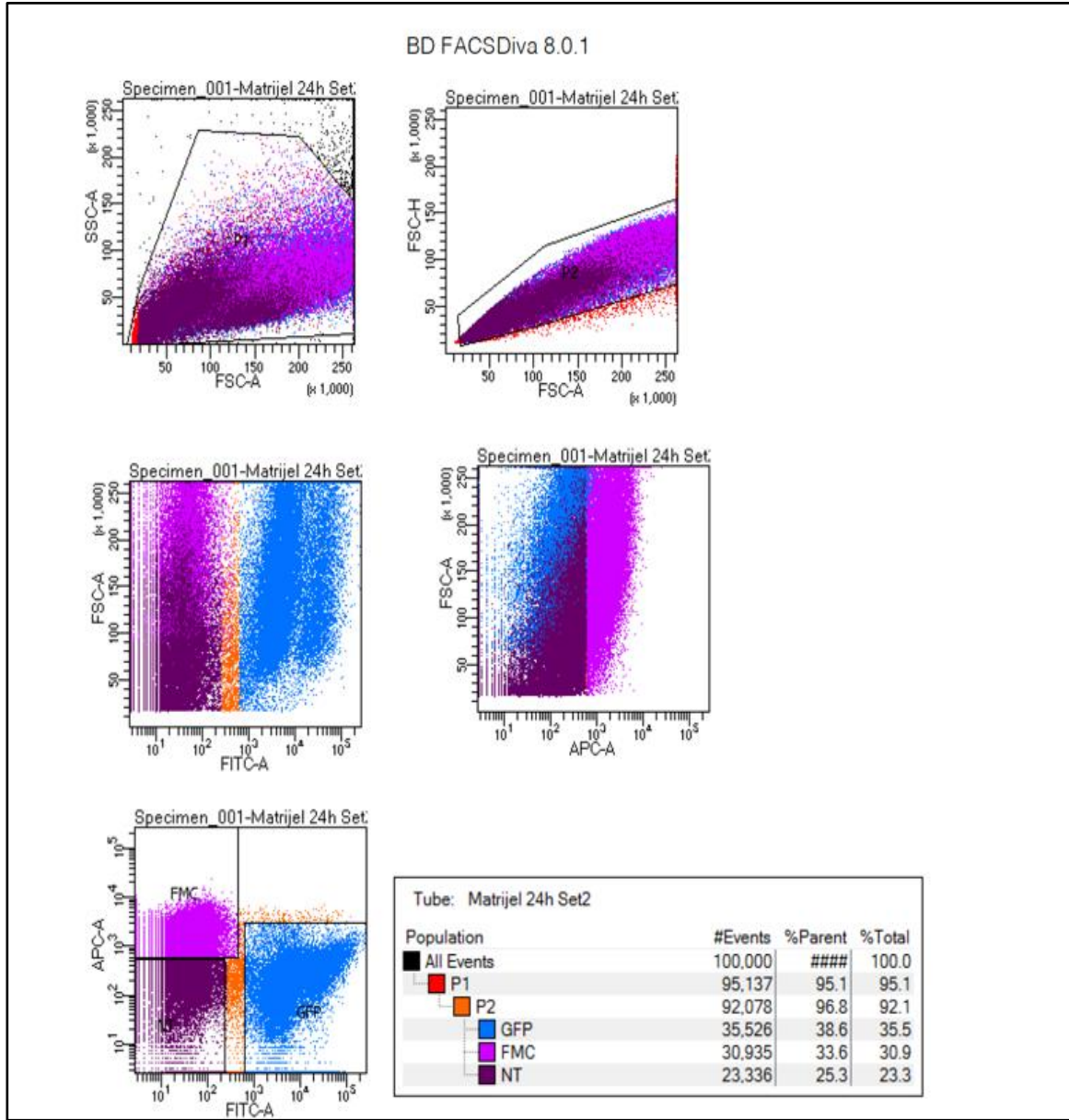
Şekil 36. Transwell grubu deneylerinde 72. saatte hücrelerin ayrılması. 72.saat verimli olarak değerlendirildi. Yaklaşık 30bin GFP pozitif (epitel), 23bin FMC pozitif (stroma) ve 25bin boyasız hücre eldesi oldu.



Şekil 37. Matrijel grubu deneylerinde de 72. saatte hücrelerin ayrılması. 72. saat verimli zaman verimli olarak değerlendirildi. Yaklaşık 40bin GFP pozitif (epitel), 47bin FMC pozitif (stroma) ve 40bin boyasız hücre eldesi oldu.

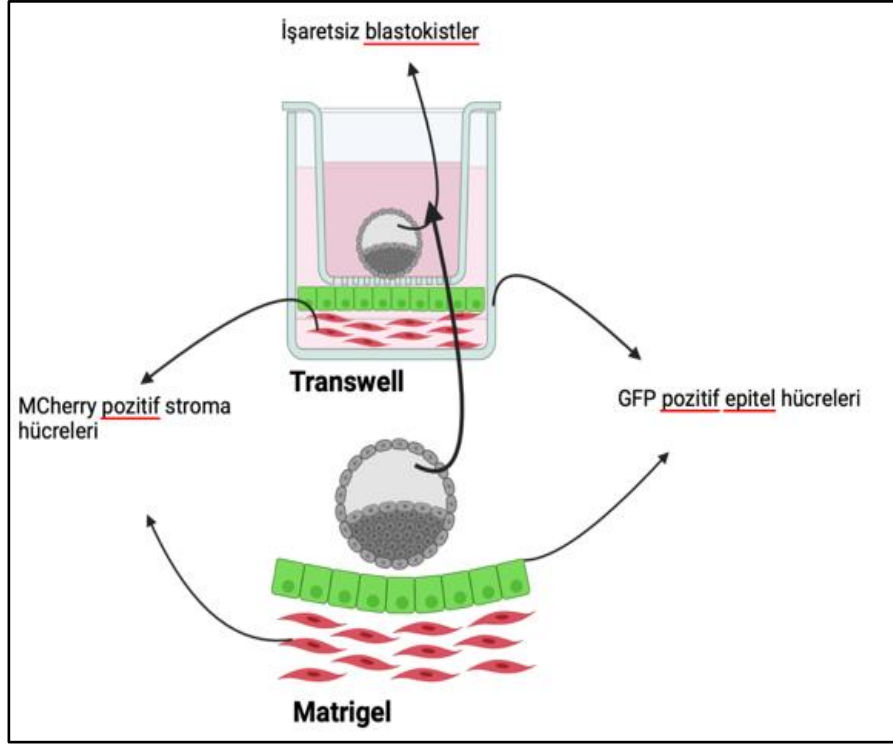


Şekil 38. Transwell grubu deneylerinde 24. saatte hücrelerin ayrılması. Yaklaşık 30bin GFP pozitif (epitel), 30bin FMC pozitif (stroma) ve 27bin boyasız hücre eldesi oldu.



Şekil 39. Matrijel grubu deneylerinde 24. saatet hücrelerin ayrılması. Yaklaşık 35 bin GFP pozitif (epitel), 30bin FMC pozitif (stroma) ve 23bin boyasız hücre eldesi oldu.

Bu nedenle dizileme için yeni kültür düzeneği şekil 39'daki olarak uygulandı.



Şekil 40. RNA dizileme öncesi kültür düzeneği.

4.8 RNA dizileme analizleri

4.8.1 Dizilemede kullanılan örneklerin analizi

RNA dizilemesi için optimizasyon deneylerinde belirlendiği şekilde örnekler hazırlanarak her gruptan iki zaman için 3'er örnek hazırlanarak, yedeklerle birlikte toplam 61 örnek hizmet sağlayıcı firmaya iletili. İlk iletilen liste ve ölçülen RNA'lar şekil 39'da paylaşılmıştır. Bu analiz için gerekli protein miktarı $>50 \mu\text{g/ml}$, tercih edilen $\text{RIN}>9$ iken, örneklerin bazılarında ve blastokistlerin tümünde (10 farklı denemede) istenen RNA miktarı sağlanamadı (Şekil 39, kırmızı ile belirtilmiş örnekler). Yöntem bölümünde de belirtildiği üzere her grupta 60 işaretsiz blastokist kullanılmış ve işaretsiz hücrelerin hücre ayrıştırma sonrası sayısı yeterli olarak değerlendirilmişti ancak RNA'nın transfer sırasında normalde olan degradasyonu ile birlikte blastokistlerden istenen düzeyde RNA eldesi için her gruba yaklaşık 1500 blastokist koyma gerekliliği hesaplanınca (1 hücreden 10 pikogram total RNA elde edildiği, 100 hücreden 1 nanogram elde edilebileceği, 50 ng için 5000 hücre gerektiği hesaplanmıştır (Huang vd., 2018). RNA dizi analizi için gerekli için olan 50 ng/ul'nin de en az 30 ul ile elde edilmesi gerekliliği (kullanılan cihaz nedeniyle, dizi analizi deneyleri için her blastokistli gruptan toplam 1500 ng RNA'nın elde edilmesi gerektiği ve 1 fare blastokistinde ortalama 90 (80-100) hücreden yaklaşık 1 ng RNA eldesi yapılabileceği hesap edilerek blastokistin dizi analizi için

hiç RNA degradasyonu olmasa dahi her grupta az 1500 blastokiste ihtiyac olacağı hesaplandı), bunun elde edilmesi kullanılabilecek fare sayısını etik sınırlar dışında arttıracacağı için ve bu grup için tek hücre dizileme (single cell sequencing) imkanı ve bütçesi bulunmamasından dolayı bu grup için kullanılacak genlerin fare ve insan blastokisti için yapılmış transkriptom analizlerinden elde edilmesine karar verilerek önce epitel ve stroma için hücre sayısı önceden planlanana göre artırılarak bu gruplar için küçük bir analiz grubu hizmet verici firmaya iletildi (Şekil 40), bu örneklerin analiz için yeterli olacağı değerlendirilerek dizileme analizi yapılacak örnekleri oluşturuldu ve bu dizileme analiz sonuçları bu örneklerden elde edildi (Şekil 41). Blastokist için gen seçimlerinin detayları bölüm 3'de belirtilmektedir.

no	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	no	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)	no	Örnek Adı	Konsantrasyon (ng/μl)
1	Matrigel 24hr Epitel	42,2	22	Transwell 72hr Stroma	56,2			
2	Matrigel 24hr Epitel	36,2	23	Transwell 72hr Stroma	26,2			
3	Matrigel 24hr Epitel	52,6	24	Transwell 72hr Stroma	40,5	43	Transwell 24hr Epitel Yed	10,5
4	Matrigel 72hr Epitel	77,6	25	Matrigel 24hr Blast	10,3	44	Transwell 72hr Epitel Yed	19,4
5	Matrigel 72hr Epitel	82,8	26	Matrigel 24hr Blast	10	45	Transwell 72hr Epitel Yed	11,2
6	Matrigel 72hr Epitel	80,5	27	Matrigel 24hr Blast	10	46	Matrigel 24hr Stroma Yed	10,3
7	Transwell 24hr Epitel	56,4	28	Matrigel 72hr Blast	19,4	47	Matrigel 24hr Stroma Yed	6,2
8	Transwell 24hr Epitel	45,3	29	Matrigel 72hr Blast	25,6	48	Matrigel 24hr Stroma Yed	5,5
9	Transwell 24hr Epitel	81,5	30	Matrigel 72hr Blast	21,6	49	Matrigel 72hr Stroma Yed	53
10	Transwell 72hr Epitel	71,9	31	Transwell 24hr Blast	16,6	50	Matrigel 72hr Stroma Yed	24
11	Transwell 72hr Epitel	33,3	32	Transwell 24hr Blast	12	51	Matrigel 72hr Stroma Yed	9,30
12	Transwell 72hr Epitel	66,6	33	Transwell 24hr Blast	13,2	52	Transwell 24hr Stroma Ye	13,9
13	Matrigel 24hr Stroma	49,8	34	Transwell 72hr Blast	7,4	53	Transwell 72hr Stroma Ye	10,2
14	Matrigel 24hr Stroma	35,7	35	Transwell 72hr Blast	22,9	54	Matrigel 24hr Blast Yedek	8,5
15	Matrigel 24hr Stroma	63	36	Transwell 72hr Blast	12,6	55	Matrigel 24hr Blast Yedek	5,3
16	Matrigel 72hr Stroma	81,5	37	Matrigel 24hr Epitel Yedek	9,48	56	Matrigel 24hr Blast Yedek	1,7
17	Matrigel 72hr Stroma	79,3	38	Matrigel 24hr Epitel Yedek	4,6	57	Matrigel 72hr Blast Yedek	12,8
18	Matrigel 72hr Stroma	72,3	39	Matrigel 24hr Epitel Yedek	2,3	58	Matrigel 72hr Blast Yedek	12,3
19	Transwell 24hr Stroma	66,6	40	Matrigel 72hr Epitel Yedek	69,6	59	Transwell 24hr Blast Yede	8,1
20	Transwell 24hr Stroma	60,2	41	Matrigel 72hr Epitel Yedek	11,8	60	Transwell 72hr Blast Yede	7,1
21	Transwell 24hr Stroma	41,7	42	Matrigel 72hr Epitel Yedek	8,8	61	Transwell 72hr Blast Yede	5,8

Şekil 41. RNA dizileme analizi öncesinde örneklerin analiz uygunluğu için kontrolü. Bu analiz için gerekli protein miktarı >50 ng/ μl, tercih edilen RIN>9 iken, örneklerin bazılarında ve blastokistlerin tümünde istenen RNA miktarı elde edilemedi.

NUMUNE BİLGİLERİ				
Sıra no	Örnek Adı	Tüp numarası	Konsantrasyon (ng/μl)	Qubit Konsantrasyon (ng/μl)
4	Matrigel 72hr Epitel	4	77,6	66
5	Matrigel 72hr Epitel	5	82,8	71
7	Transwell 24hr Epitel	7	56,4	52
16	Matrigel 72hr Stroma	16	81,5	72
40	Matrigel 72hr Epitel Yedek	40	69,6	52

Şekil 42. RNA dizileme için uygun bulunan öncü örnekler. Bu örneklerde de izleneceği üzere örneklerin laboratuvarından çıkış konsantrasyonu (soldaki kolon) ile hizmet verici merkezdeki

konsantrasyonu (sağdaki kolon) arasında RNA degradasyonu ve ölçüm cihazı farkı nedeniyle bazı farklar oluşabiliyor.

No	Örnek	qubit RNA (ng/μl)	No	Örnek	qubit RNA (ng/μl)
1	Matrigel Epitel 24hr	76	13	Matrigel Epitel 72hr	55
2	Matrigel Epitel 24hr	54	14	Matrigel Epitel 72hr	65
3	Matrigel Epitel 24hr	49	15	Matrigel Epitel 72hr (5-14)	34
4	Matrigel Stroma 24hr	121	16	Matrigel Stroma 72hr	37
5	Matrigel Stroma 24hr	66	17	Matrigel Stroma 72hr	71
6	Matrigel Stroma 24hr	38	18	Matrigel Stroma 72hr	61
7	Transwell Epitel 24hr	112	19	Transwell Epitel 72hr	68
8	Transwell Epitel 24hr	76	20	Transwell Epitel 72hr	61
9	Transwell Epitel 24hr	89	21	Transwell Epitel 72hr	46
10	Transwell Stroma 24hr	154	22	Transwell Stroma 72hr	79
11	Transwell Stroma 24hr	91	23	Transwell Stroma 72hr	64
12	Transwell Stroma 24hr	78	24	Transwell Stroma 72hr	46

Şekil 43. RNA dizileme için kullanılan örneklerin ve kullanılan RNA miktarının listesi.

DESeq2, edgeR ve Limma normalizasyon yöntemleri kullanılarak yapılan analizlerde, her üç yaklaşımdan elde edilen sonuçların örnekleri şekil 42-52 'de belirtilmiş, ayrıntılı analiz dosyaları ise sisteme yüklenmiştir.

1	Gene_ID	1_536	2_537	3_538	13_548	14_549	15_550	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG00000000031	0	0	0	49	12	95	1.91912E-08	8.117575601	1.03401E-11	46.26294664	277.7370051	7.716897147
3	ENSMUSG000000028703	134	130	230	66	50	80	0.013636988	-1.216489873	2.20425E-05	18.00413667	0.43032845	1.865281533
4	ENSMUSG000000032116	68	91	159	37	24	39	0.013636988	-1.530185699	1.88274E-05	18.3043751	0.346232798	1.865281533
5	ENSMUSG000000056758	12	1	34	182	71	31	0.017032137	2.900781387	3.67072E-05	17.03447859	7.468307795	1.768730867
6	ENSMUSG000000025151	123	264	410	126	58	113	0.029066862	-1.29493982	8.07778E-05	15.539999	0.407553166	1.536601857
7	ENSMUSG000000015750	225	255	460	164	77	186	0.029066862	-1.036689719	9.39661E-05	15.25422849	0.487444639	1.536601857
8	ENSMUSG000000040952	59	103	143	31	27	42	0.030210188	-1.48312931	0.000113939	14.89043429	0.357712066	1.519846574
9	ENSMUSG000000051855	188	238	541	145	20	131	0.039378507	-1.604621354	0.000190952	13.91808978	0.32882198	1.40474075
10	ENSMUSG000000069662	1274	1530	3149	1235	754	1274	0.039378507	-0.71013815	0.000183681	13.99107261	0.611261603	1.40474075
11	ENSMUSG000000049866	523	569	1126	468	309	464	0.044749312	-0.690276937	0.000241106	13.48010581	0.619734875	1.349213642
12	ENSMUSG000000092341	31	20	40	73	54	107	0.058437522	1.453412852	0.000346343	12.80149178	2.738551198	1.23330821
13	ENSMUSG000000060743	435	520	1035	406	173	417	0.060019334	-0.877345186	0.000430334	12.39565415	0.544368244	1.221708831
14	ENSMUSG000000026872	290	295	513	544	464	615	0.060019334	0.696135863	0.000430704	12.39404843	1.620159516	1.221708831
15	ENSMUSG0000000276809	27217	17176	33911	43199	30391	51064	0.060019334	0.75130031	0.000452732	12.30093251	1.683309324	1.221708831
16	ENSMUSG000000022462	250	398	753	259	135	282	0.086099652	-0.901558692	0.000695848	11.50030293	0.53530807	1.064998602
17	ENSMUSG000000018770	438	531	853	390	291	374	0.097169606	-0.660949019	0.000837669	11.1558544	0.63246212	1.012469558
18	ENSMUSG000000039952	115	112	197	77	49	77	0.114841084	-0.951699515	0.001051885	10.73393554	0.517023042	0.939902716
19	ENSMUSG000000008398	41	35	67	83	116	93	0.141828522	1.214600893	0.001375492	10.23836823	2.320765724	0.848236423
20	ENSMUSG0000000041308	43	47	113	109	133	122	0.160332452	1.078261445	0.001641334	9.912797545	2.111490044	0.794978566
21	ENSMUSG000000032115	36	33	63	14	6	19	0.172609343	-1.666063333	0.001860014	9.682795213	0.315112014	0.762935701
22	ENSMUSG000000032294	91	104	259	88	30	74	0.188395779	-1.082116849	0.002209801	9.366557602	0.472335263	0.724928833
23	ENSMUSG000000032382	33	32	58	16	9	12	0.188395779	-1.614965745	0.002233986	9.346607576	0.326472698	0.724928833
24	ENSMUSG000000096492	1106	1437	2800	1305	529	1141	0.188395779	-0.719966171	0.002436152	9.187937599	0.607111678	0.724928833
25	ENSMUSG000000024498	106	84	122	156	184	220	0.188395779	0.940020034	0.00239905	9.216031862	1.918554881	0.724928833
26	ENSMUSG000000000420	171	218	331	149	116	111	0.190678785	-0.802899763	0.00256841	9.091208977	0.573195917	0.719697625
27	ENSMUSG000000029817	160	184	259	333	309	290	0.199779464	0.752836496	0.002798635	8.93430803	1.685102672	0.699449156
28	ENSMUSG000000019795	35	11	146	9	4	22	0.223215768	-2.131040994	0.003247212	8.663308423	0.228293076	0.651271529
29	ENSMUSG0000000074884	73	121	233	79	18	77	0.231925361	-1.181644951	0.004789756	7.957158007	0.440848559	0.634651758
30	ENSMUSG000000067274	551	759	1453	687	366	551	0.231925361	-0.63193013	0.003935985	8.31311427	0.645312497	0.634651758
31	ENSMUSG000000030678	347	466	868	378	182	394	0.231925361	-0.69060189	0.004421938	8.101879537	0.619595302	0.634651758
32	ENSMUSG000000054808	732	606	1400	1146	1325	1243	0.231925361	0.645068764	0.004694505	7.99352017	1.563813821	0.634651758
33	ENSMUSG000000015165	334	319	487	261	199	222	0.231925361	-0.639674836	0.004873432	7.925817659	0.641857598	0.634651758
34	ENSMUSG000000074781	355	329	541	217	205	293	0.231925361	-0.665440546	0.003777279	8.387895795	0.630496145	0.634651758
35	ENSMUSG000000039081	24	26	53	14	5	10	0.231925361	-1.700404206	0.004409461	8.107001296	0.307699882	0.634651758
36	ENSMUSG000000020914	79	72	77	165	177	109	0.231925361	1.069989989	0.004559533	8.046353933	2.099418799	0.634651758
37	ENSMUSG000000008855	24	33	69	11	10	16	0.231925361	-1.580984286	0.003682138	8.434274116	0.334253765	0.634651758
38	ENSMUSG0000000118815	311	228	374	172	137	209	0.231925361	-0.742125384	0.003968733	8.298065477	0.597857937	0.634651758
39	ENSMUSG000000022332	6	23	19	59	57	27	0.231925361	1.711706893	0.004647184	8.011865463	3.275481257	0.634651758
40	ENSMUSG000000022858	46	110	172	160	220	193	0.231925361	1.030870498	0.004518613	8.062686723	2.043256747	0.634651758
41	ENSMUSG000000074794	543	775	1777	561	262	763	0.235425125	-0.800355184	0.005080045	7.850720797	0.574207793	0.62814719
42	ENSMUSG000000054889	8	9	17	34	22	38	0.235425125	1.598693253	0.005200663	7.80830618	3.0286886	0.62814719
43	ENSMUSG000000083116	192	126	305	322	263	309	0.259111521	0.674398631	0.006003123	7.549365	1.595931391	0.586513276

Şekil 44. DESeq2 yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

1	Gene_ID	4_539	5_540	6_541	16_551	17_552	18_553	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG00000069495	723	471	604	251	245	168	0.000323273	-1.09721973	8.44274E-08	28.70174943	0.467416403	3.49043107
3	ENSMUSG00000023266	2528	1989	4714	802	733	848	0.000621067	-1.556124005	3.24402E-07	26.09870347	0.340063482	3.206861408
4	ENSMUSG00000060126	2	0	0	27	20	18	0.000717431	5.406472687	5.62103E-07	25.03804099	42.4141189	3.144219964
5	ENSMUSG00000033863	656	381	704	116	122	195	0.006147198	-1.563517595	6.42173E-06	20.35820132	0.338325167	2.211322823
6	ENSMUSG00000025980	3	1	2	42	12	22	0.006543564	4.006231587	8.54474E-06	19.81193581	16.06925998	2.184185629
7	ENSMUSG00000020064	278	160	265	489	409	224	0.032079911	1.004555638	5.02689E-05	16.43794388	2.006325436	1.49376685
8	ENSMUSG00000027358	23	9	15	43	72	34	0.040422809	2.057282611	0.000102373	15.09242391	4.162016288	1.393373515
9	ENSMUSG00000034640	228	118	173	45	52	59	0.040422809	-1.322840986	0.000104086	15.06109744	0.399746973	1.393373515
10	ENSMUSG00000051855	624	289	1412	249	204	120	0.040422809	-1.631388203	0.000103404	15.07351898	0.322777472	1.393373515
11	ENSMUSG00000054871	102	46	106	336	241	75	0.040422809	1.67120662	0.00010557	15.0343837	3.184808484	1.393373515
12	ENSMUSG00000025912	49	36	27	141	91	51	0.060699072	1.60370164	0.00019023	13.92521324	3.039221114	1.216817945
13	ENSMUSG00000099927	0	0	0	9	10	10	0.060699072	6.075450123	0.000179513	14.03422612	67.43614319	1.216817945
14	ENSMUSG00000043716	2	0	0	16	10	13	0.070947967	4.701185601	0.000240878	13.48187914	26.01344565	1.149060047
15	ENSMUSG00002076348	448	326	452	104	64	167	0.08349928	-1.454380172	0.000330206	12.89077297	0.36491183	1.078317272
16	ENSMUSG00000050708	0	0	0	11	8	8	0.08349928	5.937937567	0.000336954	12.85291712	61.30520093	1.078317272
17	ENSMUSG00000020075	2	0	0	14	6	20	0.08349928	4.803358702	0.000436141	12.3706256	27.9225482	1.078317272
18	ENSMUSG00000056073	32	25	59	6	8	4	0.08349928	-2.330388576	0.000435463	12.3735311	0.198830561	1.078317272
19	ENSMUSG00000021701	40	11	50	3	5	2	0.08349928	-2.901900591	0.000412176	12.47616996	0.133795306	1.078317272
20	ENSMUSG00000023830	0	0	0	16	4	10	0.08349928	6.072100226	0.000353367	12.76393426	67.27974003	1.078317272
21	ENSMUSG00000023944	10	6	9	45	15	39	0.08349928	2.359134135	0.000422989	12.42780414	5.13062341	1.078317272
22	ENSMUSG00000030551	1263	894	1126	1555	1238	1151	0.084244445	0.603947308	0.000462035	12.26297085	1.519869345	1.074458725
23	ENSMUSG00000047215	0	0	0	8	4	16	0.087213809	6.092290953	0.000501098	12.11157515	68.22794947	1.059414745
24	ENSMUSG00000058013	0	0	0	14	2	14	0.098209807	6.124999647	0.0006555	11.61136625	69.79247784	1.007845144
25	ENSMUSG00000020181	18	5	10	62	43	15	0.098209807	2.196537326	0.000666873	11.57937771	4.583778484	1.007845144
26	ENSMUSG00000021835	85	47	102	29	19	20	0.098209807	-1.411329169	0.000659384	11.60037779	0.375965147	1.007845144
27	ENSMUSG00000021477	0	2	0	44	8	6	0.098209807	4.905025354	0.000643307	11.64629073	29.96123846	1.007845144
28	ENSMUSG00000025290	2	4	0	24	14	18	0.099389114	3.458790746	0.000700837	11.48702487	10.99511467	1.002661179
29	ENSMUSG00000045128	0	2	0	18	4	24	0.131594319	4.779277009	0.000962298	10.89873704	27.46032908	0.88076286
30	ENSMUSG00000018665	123	67	86	243	167	80	0.144269487	1.12935763	0.001246135	10.42065724	2.16313136	0.840825511
31	ENSMUSG00000025403	0	0	0	7	4	12	0.144269487	5.79039669	0.001280747	10.37006947	55.34559877	0.840825511
32	ENSMUSG00000035864	115	102	114	51	45	27	0.144269487	-1.132371989	0.001306138	10.33838123	0.45616511	0.840825511
33	ENSMUSG00000036620	246	129	211	96	53	77	0.144269487	-0.995816345	0.001270136	10.38543021	0.501452049	0.840825511
34	ENSMUSG00000052298	0	0	0	18	2	8	0.144269487	5.933119405	0.001231231	10.44288072	61.10080173	0.840825511
35	ENSMUSG000000018583	0	0	0	28	4	2	0.144269487	6.096435052	0.001295319	10.34918464	68.424214	0.840825511
36	ENSMUSG00000057170	0	2	0	48	4	7	0.144269487	4.901175781	0.001318734	10.31611793	29.88139883	0.840825511

Şekil 45. DESeq2 yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	Gene_ID	7_542	8_543	9_544	19_554	20_555	21_556	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10(padj)
2	ENSMUSG000000051855	332	201	767	56	99	81	0.018347105	-1.528658209	4.67561E-06	20.96577734	0.346599575	1.736432462
3	ENSMUSG00000008398	74	63	129	101	187	89	0.36260735	1.204017569	0.000277223	13.21834198	2.303803341	0.440563397
4	ENSMUSG000000302402	86	29	82	124	296	29	0.36260735	1.722842598	0.000268553	13.27789831	3.300861481	0.440563397
5	ENSMUSG000000050743	690	439	1600	268	410	185	0.861695007	-0.820334221	0.000878384	11.06782979	0.566310733	0.064646423
6	ENSMUSG00000051285	69	120	282	42	93	106	0.990765909	-0.074198201	0.874283266	0.02503364	0.949869878	0.004028945
7	ENSMUSG000000048538	12	2	18	1	3	5	0.990765909	-0.726466777	0.547640135	0.361561788	0.604382261	0.004028945
8	ENSMUSG00000057363	6	15	38	11	23	13	0.990765909	0.455657611	0.533479785	0.387758887	1.37140778	0.004028945
9	ENSMUSG000000084353	125	9	57	44	162	24	0.990765909	0.829360544	0.170488158	1.878645655	1.7768976	0.004028945
10	ENSMUSG00000066693	10	4	16	4	4	3	0.990765909	-0.536153119	0.620504659	0.245158907	0.689602766	0.004028945
11	ENSMUSG000000026374	0	0	0	4	0	0	0.990765909	3.75499325	0.235537589	1.407104914	13.50098957	0.004028945
12	ENSMUSG00000081441	10	2	7	3	8	0	0.990765909	-0.276535618	0.831518818	0.045264279	0.825571105	0.004028945
13	ENSMUSG00000057335	450	307	852	303	569	255	0.990765909	0.241030835	0.294345289	1.099639243	1.181836806	0.004028945
14	ENSMUSG00000025912	73	48	75	59	112	28	0.990765909	0.572615975	0.173057304	1.85625799	1.487217834	0.004028945
15	ENSMUSG00000045210	156	120	246	81	166	64	0.990765909	-0.093119478	0.763910125	0.09021018	0.937493454	0.004028945
16	ENSMUSG000000041763	51	20	75	26	41	21	0.990765909	0.09979727	0.834957436	0.043408793	1.071622866	0.004028945
17	ENSMUSG00000026483	0	0	0	0	0	2	0.990765909	3.056649256	0.367474223	0.812187779	8.320379061	0.004028945
18	ENSMUSG000000019699	343	181	767	169	394	181	0.990765909	0.043817373	0.871020226	0.026361653	1.030837819	0.004028945
19	ENSMUSG00000063659	375	239	688	182	339	181	0.990765909	-0.099915856	0.688470453	0.160746182	0.933087411	0.004028945
20	ENSMUSG000000043019	74	42	88	17	53	26	0.990765909	-0.417883411	0.363012499	0.827444576	0.748521982	0.004028945
21	ENSMUSG00000032666	31	15	18	13	26	10	0.990765909	0.18093824	0.786278418	0.073520383	1.133620883	0.004028945
22	ENSMUSG000000015961	2	1	2	2	2	0	0.990765909	0.292135668	0.89156495	0.018584303	1.224451531	0.004028945
23	ENSMUSG000000026235	12	4	26	10	14	4	0.990765909	0.28764284	0.733955018	0.115511086	1.220644287	0.004028945
24	ENSMUSG000000026482	41	34	58	4	35	8	0.990765909	-1.053277497	0.099282147	2.71037196	0.481872209	0.004028945
25	ENSMUSG00000008475	0	3	0	13	0	4	0.990765909	2.936349153	0.113971604	2.498267648	7.654717594	0.004028945
26	ENSMUSG000000056870	2	10	9	4	0	0	0.990765909	-1.734689948	0.294293668	1.099874408	0.300473581	0.004028945
27	ENSMUSG00000039630	2996	1153	3862	1314	2357	748	0.990765909	-0.123950174	0.593912408	0.284275638	0.917671575	0.004028945
28	ENSMUSG00000025915	10	8	9	8	19	2	0.990765909	0.503426613	0.592141586	0.287012183	1.41757652	0.004028945
29	ENSMUSG00000099377	117	50	132	47	118	38	0.990765909	0.10225725	0.78102404	0.077275539	1.073451679	0.004028945
30	ENSMUSG000000042772	601	335	703	263	826	309	0.990765909	0.382454534	0.157924938	1.993984021	1.303557782	0.004028945
31	ENSMUSG000000026491	6	0	0	8	4	0	0.990765909	1.698758048	0.375675534	0.784805271	3.246213861	0.004028945
32	ENSMUSG000000025917	7	1	34	8	11	2	0.990765909	0.051371602	0.931246043	0.00744376	1.036249641	0.004028945
33	ENSMUSG00000004364	1113	607	1581	452	1014	353	0.990765909	-0.182159844	0.398971194	0.711424874	0.8813825	0.004028945
34	ENSMUSG000000026478	29	16	82	11	20	7	0.990765909	-0.87861415	0.155883073	2.013716209	0.54379643	0.004028945
35	ENSMUSG000000042699	46	8	22	23	29	14	0.990765909	0.55117871	0.401173649	0.704805569	1.465282371	0.004028945
36	ENSMUSG000000025986	3	9	24	1	6	5	0.990765909	-0.757851985	0.500821048	0.453196151	0.59137617	0.004028945
37	ENSMUSG00000064943	2	0	2	10	0	0	0.990765909	2.485315889	0.234449362	1.41366245	5.599569396	0.004028945
38	ENSMUSG000000056763	9	0	6	5	10	2	0.990765909	0.942012727	0.466462376	0.530342893	1.921206675	0.004028945
39	ENSMUSG000000026109	39	29	78	10	41	25	0.990765909	-0.181521131	0.736943235	1.112831484	0.881727293	0.004028945
40	ENSMUSG00000067851	146	92	190	63	168	81	0.990765909	0.216422098	0.514779613	0.424339518	1.161848612	0.004028945
41	ENSMUSG00000055980	8	10	34	30	17	2	0.990765909	0.781341753	0.353733817	0.860017419	1.718728603	0.004028945
42	ENSMUSG00000056708	8	4	13	14	2	3	0.990765909	0.624989281	0.563520859	0.333644595	1.542199367	0.004028945
43	ENSMUSG000000026470	7	7	25	12	8	0	0.990765909	-0.140204925	0.893776415	0.017829526	0.907390258	0.004028945
44	ENSMUSG000000026150	68	46	165	41	61	47	0.990765909	0.009412684	0.964696768	0.001958991	1.006545706	0.004028945
45	ENSMUSG000000026469	40	20	73	21	33	16	0.990765909	-0.097710028	0.847781949	0.03644519	0.93451519	0.004028945
46	ENSMUSG000000018417	6	3	14	4	10	2	0.990765909	0.21346065	0.842983153	0.039235342	1.15921331	0.004028945
47	ENSMUSG000000072324	7	0	27	4	3	4	0.990765909	-0.295631924	0.814539204	0.050520575	0.814715396	0.004028945

Şekil 46. DESeq2 yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	Gene_ID	10_545	11_546	12_547	22_557	23_558	24_559	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
1	ENSMUSG000000003545	200	78	104	779	471	342	7.47903E-12	2.410740257	3.99094E-15	61.7043667	5.317470987	11.12615493
2	ENSMUSG000000026826	55	13	20	122	110	90	9.01331E-06	2.311610831	9.61933E-09	32.91670264	4.964370641	5.045115797
3	ENSMUSG000000049775	6940	3383	3594	2424	1708	2199	1.76406E-05	-0.828640099	2.82401E-08	30.82483329	0.563059739	4.753485778
4	ENSMUSG000000051855	664	351	371	121	97	234	2.55827E-05	-1.366632951	5.46056E-08	29.54598657	0.387795253	4.592053172
5	ENSMUSG000000052684	49	21	25	146	76	68	0.00036813	1.927467055	1.14558E-06	23.66652864	3.803867662	3.433998904
6	ENSMUSG000000093826	1276	574	579	1417	903	1150	0.00036813	0.839649739	1.17864E-06	23.61176907	1.789615602	3.433998904
7	ENSMUSG000000092341	33	20	19	216	56	43	0.002167152	2.354796371	8.09502E-06	19.91529357	5.115220288	2.664110709
8	ENSMUSG000000091243	183	126	82	276	145	317	0.002362835	1.146757267	1.00868E-05	19.49491011	2.214156606	2.626566559
9	ENSMUSG000000107462	9	8	11	101	23	37	0.00294503	2.648159081	1.47251E-05	18.77281309	6.268686882	2.530910232
10	ENSMUSG000000053907	2451	1281	1216	856	486	1094	0.00294503	-0.768263494	1.57152E-05	18.64872784	0.587123743	2.530910232
11	ENSMUSG000000005667	61	26	29	162	68	71	0.003100785	1.679451126	1.8201E-05	18.36884524	3.203060673	2.508528357
12	ENSMUSG000000060743	1183	607	495	370	244	458	0.003843723	-0.799169377	2.4613E-05	17.79422196	0.574679951	2.415247886
13	ENSMUSG00000003038	265	255	143	71	41	115	0.005523921	-1.387038063	3.62385E-05	17.0588804	0.382348982	2.282003414
14	ENSMUSG000000025025	99	16	51	208	131	87	0.005680815	1.782205243	4.24394E-05	16.75904862	3.439515229	2.45589317
15	ENSMUSG000000025151	477	162	177	102	69	136	0.007191906	-1.057930164	6.14037E-05	16.05885887	0.480320682	2.143156013
16	ENSMUSG000000022528	109	38	48	221	173	71	0.007191906	1.682629273	6.01502E-05	16.09791642	3.210124548	2.143156013
17	ENSMUSG0000000118866	270	111	80	56	41	41	0.008191838	-1.348546033	7.43123E-05	15.69775568	0.392687605	2.086618666
18	ENSMUSG000000040652	1274	564	553	446	235	489	0.008960286	-0.739425524	8.60646E-05	15.42017232	0.598977816	2.047678145
19	ENSMUSG000000056758	19	0	1	198	228	178	0.010663243	5.70760569	0.000108112	14.98948608	52.25893034	1.972110713
20	ENSMUSG000000018363	150	100	105	268	140	198	0.01097491	0.995781472	0.000124358	14.72542079	1.994160421	1.954775212
21	ENSMUSG000000020886	379	138	145	445	291	275	0.01097491	0.9955797	0.000123363	14.74057116	1.993881541	1.954775212
22	ENSMUSG000000022858	251	105	129	258	156	315	0.011903217	0.872730829	0.000139739	14.50566158	1.831125699	1.924335649
23	ENSMUSG000000036478	715	401	363	602	544	880	0.012199707	0.742208221	0.00014973	14.37560493	1.672734205	1.913650593
24	ENSMUSG000000062014	118	83	68	38	16	34	0.014277724	-1.401343402	0.000182852	13.99957056	0.378576456	1.845341013
25	ENSMUSG000000011716	25	26	14	207	22	55	0.016107692	2.222302559	0.000214884	13.69624392	4.666376	1.792966685
26	ENSMUSG000000008398	78	51	49	162	87	96	0.016275732	1.206626576	0.000225811	13.60311454	2.307973367	1.788459475
27	ENSMUSG000000015750	569	290	259	202	132	214	0.017237237	-0.73411119	0.000275943	13.22701462	0.601188288	1.763532335
28	ENSMUSG000000028195	942	574	481	909	579	1364	0.017237237	0.746785266	0.000268804	13.27614983	1.678049491	1.763532335
29	ENSMUSG000000021877	1653	884	915	479	481	747	0.017237237	-0.72325432	0.000261926	13.32474792	0.605729542	1.763532335
30	ENSMUSG000000062248	152	118	69	25	8	60	0.017237237	-1.19338087	0.000271801	13.25536077	0.303688022	1.763532335
31	ENSMUSG000000017677	224	74	160	282	353	206	0.018204083	1.277552314	0.000301135	13.06332257	2.424273239	1.739831201
32	ENSMUSG000000025809	414	97	152	331	276	367	0.018957432	0.982413885	0.000323713	12.92794582	1.975768457	1.72222049
33	ENSMUSG000000021250	79	37	21	112	81	76	0.019660917	1.355501106	0.000346217	12.80217406	2.558859802	1.706396235
34	ENSMUSG000000020572	369	148	217	333	247	459	0.021616415	0.789441776	0.000392187	12.56905513	1.728405558	1.66521634
35	ENSMUSG000000019132	1700	812	875	521	507	683	0.021823065	-0.66117278	0.000407581	12.49711357	0.632364034	1.661084257
36	ENSMUSG000000038965	456	269	183	98	76	199	0.023677981	-1.023738688	0.00045486	12.29218121	0.491840115	1.625655332
37	ENSMUSG000000000355	144	81	65	33	19	49	0.024268611	-1.265422272	0.000492106	12.1453415	0.415977594	1.614955084
38	ENSMUSG000000071172	764	312	410	761	501	628	0.024268611	0.666197515	0.000488162	12.16034885	1.586884928	1.614955084
39	ENSMUSG000000025283	125	39	51	158	94	107	0.02479048	1.107650509	0.000542374	11.96402977	2.154944194	1.605715062
40	ENSMUSG000000063015	86	43	67	147	80	122	0.02479048	1.071693945	0.000532737	11.99744094	2.101899871	1.605715062
41	ENSMUSG000000000420	647	245	245	150	93	245	0.02479048	-0.904348669	0.000518579	12.04764502	0.534273857	1.605715062
42	ENSMUSG000000026728	73	70	40	263	117	67	0.025723997	1.512736966	0.000622843	11.70643699	2.853508708	1.589661553

Şekil 47. DESeq2 yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. Saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	Gene_ID	1_536	2_537	3_538	13_548	14_549	15_550	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
1	ENSMUSG000000051285	100	106	191	141	61	100	9.21473E-10	12.51588248	2.20712E-13	9.21473E-10	5856.741393	9.035517452
2	ENSMUSG00000048538	4	5	1	3	2	1	0.019926864	-2.225480699	1.00477E-05	0.019926864	0.213827498	1.700561046
3	ENSMUSG00000057363	10	16	21	10	4	19	0.019926864	4.137852963	1.43187E-05	0.019926864	17.60426346	1.700561046
4	ENSMUSG00000084353	19	16	23	34	24	44	0.043193655	11.74576481	4.13831E-05	0.043193655	3434.215396	1.364580046
5	ENSMUSG00000066693	2	1	12	2	4	3	0.044598121	-2.158865917	5.37947E-05	0.044598121	0.223932229	1.350683437
6	ENSMUSG00000026374	0	0	0	0	4	1	0.044598121	-1.775257914	6.40931E-05	0.044598121	0.292142081	1.350683437
7	ENSMUSG00000081441	1	0	7	0	2	3	0.09075878	2.072232782	0.000171947	0.09075878	4.205370126	1.04211135
8	ENSMUSG00000057335	303	357	544	611	301	482	0.09075878	-1.890083476	0.000173909	0.09075878	0.269791448	1.04211135
9	ENSMUSG00000025912	21	25	19	44	66	18	0.093982552	5.367856117	0.000202597	0.093982552	41.29388115	1.026952767
10	ENSMUSG00000045210	97	103	134	115	84	117	0.09405332	-2.401159268	0.000225277	0.09405332	0.189312389	1.026625872
11	ENSMUSG00000041763	15	19	64	22	22	27	0.102382423	-2.334439738	0.00027974	0.102382423	0.198273017	0.989774594
12	ENSMUSG00000026483	6	0	0	4	0	0	0.102382423	-2.332391551	0.000294273	0.102382423	0.198554704	0.989774594
13	ENSMUSG00000019699	212	416	492	469	186	451	0.115697903	9.184920746	0.000371871	0.115697903	582.0183165	0.936674512
14	ENSMUSG00000063659	217	218	420	282	135	297	0.115697903	-3.36367473	0.000387969	0.115697903	0.097147809	0.936674512
15	ENSMUSG00000043019	50	36	72	42	16	47	0.140623886	-1.517472755	0.000505236	0.140623886	0.349297263	0.851940905
16	ENSMUSG00000032666	3	18	13	20	10	13	0.154003502	-6.243980205	0.000614234	0.154003502	0.013193945	0.812469403
17	ENSMUSG00000015961	0	0	0	1	2	8	0.154003502	-2.449781128	0.000634609	0.154003502	0.183038479	0.812469403
18	ENSMUSG00000026235	8	13	27	8	3	21	0.154003502	-2.298306763	0.000663967	0.154003502	0.203301567	0.812469403
19	ENSMUSG00000026482	22	22	21	29	11	24	0.203850523	2.266123015	0.000927703	0.203850523	4.810287138	0.69068817
20	ENSMUSG00000008475	0	0	0	0	0	2	0.21744386	-3.085769477	0.00115533	0.21744386	0.117785228	0.66265285
21	ENSMUSG00000056870	1	1	5	3	2	7	0.21744386	1.722192451	0.00115611	0.21744386	3.29937429	0.66265285
22	ENSMUSG00000039630	1404	1341	2307	1307	1270	1169	0.21744386	8.418235481	0.001145812	0.21744386	342.0907965	0.66265285
23	ENSMUSG00000025915	12	4	12	5	11	9	0.288922796	-1.393122884	0.001726744	0.288922796	0.380739754	0.539218191
24	ENSMUSG00000099377	38	44	52	56	40	51	0.288922796	2.43462488	0.00179852	0.288922796	5.406237456	0.539218191
25	ENSMUSG00000042772	307	201	379	432	282	379	0.288922796	-3.663182346	0.001900681	0.288922796	0.078935476	0.539218191
26	ENSMUSG00000026491	1	0	0	9	3	0	0.288922796	-2.189537383	0.002001646	0.288922796	0.219221715	0.539218191
27	ENSMUSG00000025917	9	4	24	0	12	2	0.288922796	6.464620554	0.002099325	0.288922796	88.3170791	0.539218191
28	ENSMUSG00000004364	554	527	981	632	470	509	0.288922796	1.525496131	0.002188855	0.288922796	2.878857006	0.539218191
29	ENSMUSG00000026478	33	30	52	24	8	72	0.288922796	8.636610867	0.002195724	0.288922796	397.9962059	0.539218191
30	ENSMUSG00000042699	9	8	19	12	16	12	0.288922796	7.850491319	0.002220138	0.288922796	230.7987049	0.539218191
31	ENSMUSG00000025986	3	14	18	0	6	8	0.288922796	8.16194779	0.002225787	0.288922796	286.4119327	0.539218191
32	ENSMUSG00000064943	2	4	0	0	0	0	0.288922796	-1.58087261	0.002274718	0.288922796	0.334279639	0.539218191
33	ENSMUSG00000056763	2	2	5	5	4	9	0.288922796	5.048225282	0.002313324	0.288922796	33.08774992	0.539218191
34	ENSMUSG00000026109	40	41	58	31	19	46	0.288922796	8.545327114	0.002397927	0.288922796	373.5939066	0.539218191
35	ENSMUSG00000067851	93	80	85	120	68	125	0.288922796	6.815086886	0.002422107	0.288922796	112.6018629	0.539218191
36	ENSMUSG00000026473	2	0	2	4	0	2	0.289949207	-1.287572721	0.00255535	0.289949207	0.409639653	0.537678074
37	ENSMUSG00000055980	11	2	14	3	0	5	0.289949207	-1.323990548	0.002635235	0.289949207	0.399428575	0.537678074
38	ENSMUSG00000056708	0	5	13	1	8	11	0.289949207	4.913536271	0.002639059	0.289949207	30.1385117	0.537678074
39	ENSMUSG00000026470	6	8	11	20	20	6	0.303744045	1.688520927	0.00283737	0.303744045	3.223260807	0.517492228
40	ENSMUSG00000026150	47	42	98	64	36	57	0.324090819	2.138406924	0.003105062	0.324090819	4.402756096	0.489333272
41	ENSMUSG00000026469	10	17	44	18	19	16	0.334412446	3.980635995	0.00328405	0.334412446	15.78668111	0.475717567
42	ENSMUSG00000018417	6	0	5	4	11	19	0.371541152	-2.788385852	0.003814044	0.371541152	0.144747882	0.429993076

Şekil 48. EdgeR yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

1	Gene_ID	4_539	5_540	6_541	16_551	17_552	18_553	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG00000051285	198	118	163	73	72	131	1.00811E-07	9.053677112	2.41464E-11	1.00811E-07	531.4083592	6.996490557
3	ENSMUSG00000048538	4	2	6	3	9	0	3.62636E-06	7.374998791	1.73718E-09	3.62636E-06	165.9953239	5.440529311
4	ENSMUSG00000057363	25	24	29	46	20	14	0.000696184	5.628245764	5.00252E-07	0.000696184	49.46190034	3.157276217
5	ENSMUSG00000084353	86	25	32	109	102	16	0.008755431	2.925824007	9.45687E-06	0.008755431	7.599076001	2.05772245
6	ENSMUSG00000066693	10	5	2	11	7	10	0.008755431	-2.263830402	1.04855E-05	0.008755431	0.208218419	2.05772245
7	ENSMUSG00000026374	2	0	0	0	10	0	0.009541969	6.357675735	1.3713E-05	0.009541969	82.00703288	2.020362002
8	ENSMUSG00000081441	3	1	0	2	5	2	0.013944465	-3.351047496	2.37218E-05	0.013944465	0.09800183	1.855598146
9	ENSMUSG00000057335	583	384	327	394	331	386	0.013944465	-2.274054695	2.67199E-05	0.013944465	0.206748004	1.855598146
10	ENSMUSG00000025912	49	36	27	141	91	51	0.016880733	9.37871291	4.28041E-05	0.016880733	665.6928717	1.772608688
11	ENSMUSG00000045210	212	128	180	185	135	146	0.016880733	-4.157214191	4.34854E-05	0.016880733	0.056047188	1.772608688
12	ENSMUSG00000041763	61	53	39	47	18	19	0.016880733	3.358260443	4.44762E-05	0.016880733	10.25503452	1.772608688
13	ENSMUSG00000026483	8	10	0	0	0	2	0.017798776	4.909357499	5.11582E-05	0.017798776	30.0513417	1.749609871
14	ENSMUSG00000019699	487	385	746	453	373	390	0.01827461	6.503586817	5.6903E-05	0.01827461	90.73497238	1.738151894
15	ENSMUSG00000063659	612	434	873	524	465	282	0.024217479	3.127231263	8.63259E-05	0.024217479	8.737564878	1.615871073
16	ENSMUSG00000043019	62	51	84	67	32	41	0.024217479	-1.600746002	8.72934E-05	0.024217479	0.329706446	1.615871073
17	ENSMUSG00000032666	10	21	18	14	21	10	0.024217479	9.190272063	9.28095E-05	0.024217479	584.181177	1.615871073
18	ENSMUSG00000015961	8	1	0	12	1	6	0.025392986	2.297967362	0.000103397	0.025392986	4.917644217	1.595286219
19	ENSMUSG00000026235	19	10	12	8	17	8	0.026581543	6.780003544	0.000114603	0.026581543	109.8966458	1.575419808
20	ENSMUSG00000026482	43	48	26	16	15	9	0.028895121	9.387681631	0.000131499	0.028895121	669.8441372	1.539175483
21	ENSMUSG00000008475	8	0	8	8	0	2	0.032625911	2.393399188	0.000157093	0.032625911	5.253938045	1.486437348
22	ENSMUSG00000056870	1	3	8	4	8	10	0.032625911	5.68446237	0.000164106	0.032625911	51.4272951	1.486437348
23	ENSMUSG00000039630	3294	1514	2591	3066	2882	1281	0.033862268	-1.924633739	0.000178436	0.033862268	0.263407122	1.470283964
24	ENSMUSG00000025915	18	7	5	16	3	4	0.034655309	-2.047769803	0.000190915	0.034655309	0.24185767	1.460230219
25	ENSMUSG00000099377	93	51	67	83	98	41	0.038125155	-2.371876403	0.000219572	0.038125155	0.193194188	1.418788384
26	ENSMUSG00000042772	571	417	450	522	450	366	0.038125155	6.575716335	0.000228294	0.038125155	95.38670781	1.418788384
27	ENSMUSG00000026491	7	7	2	13	5	0	0.047078039	9.399608645	0.000293181	0.047078039	675.4048108	1.327181634
28	ENSMUSG00000025917	6	7	2	12	3	0	0.053212888	6.777172706	0.000345458	0.053212888	109.6812194	1.273983169
29	ENSMUSG00000004364	1087	553	815	689	654	532	0.053212888	9.45725082	0.000366823	0.053212888	702.9366272	1.273983169
30	ENSMUSG00000026478	48	13	42	46	19	41	0.053212888	2.759910627	0.000369622	0.053212888	6.773542874	1.273983169
31	ENSMUSG00000042699	39	21	30	25	13	15	0.072537311	-2.114178818	0.000521226	0.072537311	0.230977012	1.139438548
32	ENSMUSG00000025986	7	12	20	13	9	6	0.07451204	3.245909877	0.000553263	0.07451204	9.486723356	1.127773547
33	ENSMUSG00000064943	0	0	0	0	0	2	0.084329417	-2.432284441	0.000646357	0.084329417	0.185271845	1.074020902
34	ENSMUSG00000056763	10	2	10	15	2	11	0.085045591	4.648061618	0.000672217	0.085045591	25.07298084	1.070348195
35	ENSMUSG00000026109	34	26	26	30	28	39	0.088785011	9.19632755	0.000734335	0.088785011	586.6383393	1.051660348
36	ENSMUSG00000067851	162	105	156	153	100	124	0.088785011	9.442978948	0.000756625	0.088785011	696.0171033	1.051660348
37	ENSMUSG00000026473	11	5	4	13	7	11	0.088785011	-3.164750388	0.000765571	0.088785011	0.111510357	1.051660348
38	ENSMUSG00000055980	18	6	3	17	12	10	0.096090654	8.970013579	0.000872347	0.096090654	501.4679124	1.017318853
39	ENSMUSG00000056708	12	8	11	8	4	3	0.096090654	-2.23161629	0.000881779	0.096090654	0.212920049	1.017318853
40	ENSMUSG00000026470	28	3	14	14	2	7	0.096090654	-8.568771622	0.000897613	0.096090654	0.002633557	1.017318853
41	ENSMUSG00000026150	95	57	213	79	68	79	0.098721054	6.011245932	0.00094583	0.098721054	64.500835	1.005590218
42	ENSMUSG00000026469	52	27	52	37	28	10	0.100849391	5.213726418	0.001031413	0.100849391	37.10975107	0.996326721
43	ENSMUSG00000018417	4	5	3	8	10	12	0.100849391	9.041749641	0.001038075	0.100849391	527.0330559	0.996326721

Şekil 49. EdgeR yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Gene_ID	7_542	8_543	9_544	19_554	20_555	21_556	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG000000051285	69	120	282	42	93	106	0.06131086	-2.237969024	1.46852E-05	0.06131086	0.211984543	1.212462589
3	ENSMUSG000000048538	12	2	18	1	3	5	0.586106537	4.759418774	0.000509371	0.586106537	27.08493595	0.232023435
4	ENSMUSG000000057363	6	15	38	11	23	13	0.586106537	2.464749233	0.000540305	0.586106537	5.5203098	0.232023435
5	ENSMUSG000000084353	125	9	57	44	162	24	0.586106537	1.706659053	0.000561539	0.586106537	3.264040715	0.232023435
6	ENSMUSG000000066693	10	4	16	4	4	3	1	3.010088659	0.001876199	1	8.056139465	0
7	ENSMUSG000000026374	0	0	0	4	0	0	1	6.450699437	0.003002599	1	87.46897222	0
8	ENSMUSG000000081441	10	2	7	3	8	0	1	-1.740969015	0.003046135	1	0.299168666	0
9	ENSMUSG000000057335	450	307	852	303	569	255	1	2.489930914	0.003229637	1	5.617510494	0
10	ENSMUSG000000025912	73	48	75	59	112	28	1	8.259752266	0.003479353	1	306.5019124	0
11	ENSMUSG000000045210	156	120	246	81	166	64	1	-1.428446743	0.003596404	1	0.371530681	0
12	ENSMUSG000000041763	51	20	75	26	41	21	1	2.7574551	0.005260865	1	6.762023827	0
13	ENSMUSG000000026483	0	0	0	0	0	2	1	5.328214187	0.005363662	1	40.17466775	0
14	ENSMUSG000000019699	343	181	767	169	394	181	1	-1.214902572	0.005423205	1	0.430802172	0
15	ENSMUSG000000063659	375	239	688	182	339	181	1	8.785727975	0.005490892	1	441.3342722	0
16	ENSMUSG000000043019	74	42	88	17	53	26	1	-2.751643596	0.005511403	1	0.148481635	0
17	ENSMUSG000000032666	31	15	18	13	26	10	1	-1.245336993	0.005979619	1	0.182809358	0
18	ENSMUSG000000015961	2	1	2	2	2	0	1	1.3766006	0.006071307	1	2.596582866	0
19	ENSMUSG000000026235	12	4	26	10	14	4	1	-2.814302771	0.006164657	1	0.142170814	0
20	ENSMUSG000000026482	41	34	58	4	35	8	1	-1.843414594	0.006280436	1	0.278661463	0
21	ENSMUSG000000008475	0	3	0	13	0	4	1	-1.340978984	0.00653175	1	0.394752694	0
22	ENSMUSG000000056870	2	10	9	4	0	0	1	1.664058902	0.006572731	1	3.169068626	0
23	ENSMUSG000000039630	2996	1153	3862	1314	2357	748	1	-7.777768926	0.00742334	1	0.004556782	0
24	ENSMUSG000000025915	10	8	9	8	19	2	1	5.0948471	0.007633945	1	34.17447099	0
25	ENSMUSG000000099377	117	50	132	47	118	38	1	-1.917536458	0.00807719	1	0.264706136	0
26	ENSMUSG000000042772	601	335	703	263	826	309	1	-5.428769885	0.008297861	1	0.023215467	0
27	ENSMUSG000000026491	6	0	0	8	4	0	1	1.938953676	0.009182181	1	3.834274636	0
28	ENSMUSG000000025917	7	1	34	8	11	2	1	-1.739110399	0.009620101	1	0.299553381	0
29	ENSMUSG000000004364	1113	607	1581	452	1014	353	1	-8.263977555	0.009807262	1	0.003254302	0
30	ENSMUSG000000026478	29	16	82	11	20	7	1	-1.284866385	0.01055066	1	0.410408813	0
31	ENSMUSG000000042699	46	8	22	23	29	14	1	-1.512400143	0.010699662	1	0.350527578	0
32	ENSMUSG000000025986	3	9	24	1	6	5	1	-2.504572796	0.01123986	1	0.176217267	0
33	ENSMUSG000000064943	2	0	2	10	0	0	1	1.336593626	0.011204724	1	2.525543037	0
34	ENSMUSG000000056763	9	0	6	5	10	2	1	1.718736033	0.011528108	1	3.291479091	0
35	ENSMUSG000000026109	39	29	78	10	41	25	1	1.400546204	0.011707692	1	2.640015141	0
36	ENSMUSG000000067851	146	92	190	63	168	81	1	-4.571635069	0.011829215	1	0.042053361	0
37	ENSMUSG000000026473	1	2	8	4	2	0	1	2.846777483	0.012816225	1	7.193916841	0
38	ENSMUSG000000055980	8	10	34	30	17	2	1	1.433762983	0.012842033	1	2.701504308	0
39	ENSMUSG000000056708	8	4	13	14	2	3	1	5.550043508	0.013014437	1	46.85215518	0
40	ENSMUSG000000026470	7	7	25	12	8	0	1	1.256072232	0.013087031	1	2.388445954	0
41	ENSMUSG000000026150	68	46	165	41	61	47	1	-3.631675583	0.01307501	1	0.080678296	0
42	ENSMUSG000000026469	40	20	73	21	33	16	1	3.19219773	0.013549025	1	9.140022586	0
43	ENSMUSG000000018417	6	3	14	4	10	2	1	-5.16004523	0.014443632	1	0.027968657	0

Şekil 50. EdgeR yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Gene_ID	10_545	11_546	12_547	22_557	23_558	24_559	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG000000051285	225	60	82	158	113	112	1.85846E-18	7.869539018	4.45182E-22	1.85846E-18	233.8661124	17.73080549
3	ENSMUSG000000048538	11	10	4	2	1	8	1.79991E-09	3.447845723	8.62233E-13	1.79991E-09	10.91021572	8.744748965
4	ENSMUSG000000057363	38	17	4	17	6	38	8.949E-06	3.298931709	6.43042E-09	8.949E-06	9.841864879	5.048225693
5	ENSMUSG000000084353	55	64	45	36	17	95	0.000643766	2.741280363	6.32236E-07	0.000643766	6.68663498	3.191271706
6	ENSMUSG000000066693	9	7	7	5	1	7	0.000643766	-2.00160737	7.70978E-07	0.000643766	0.249721619	3.191271706
7	ENSMUSG000000026374	0	2	0	0	0	0	0.002483722	5.687226786	3.76043E-06	0.002483722	51.52593184	2.604897067
8	ENSMUSG000000081441	5	1	8	4	0	4	0.002483722	3.769258559	4.16432E-06	0.002483722	13.63514898	2.604897067
9	ENSMUSG000000057335	703	342	374	436	342	387	0.005187501	3.348246023	1.01305E-05	0.005187501	10.18409603	2.285041796
10	ENSMUSG000000025912	32	42	37	39	29	121	0.005187501	3.741327694	1.15353E-05	0.005187501	13.3737087	2.285041796
11	ENSMUSG000000045210	353	114	170	144	106	134	0.005187501	11.50896943	1.42554E-05	0.005187501	2914.372211	2.285041796
12	ENSMUSG000000041763	37	27	18	29	6	34	0.005187501	2.382807857	1.46739E-05	0.005187501	5.215508277	2.285041796
13	ENSMUSG000000026483	0	0	0	0	0	0	0.005187501	-6.267096218	1.49102E-05	0.005187501	0.012984226	2.285041796
14	ENSMUSG000000019699	562	280	315	513	332	446	0.008800012	6.099982908	2.74012E-05	0.008800012	68.59268898	2.05516721
15	ENSMUSG000000063659	752	327	350	275	261	674	0.010897325	-2.046020189	3.65419E-05	0.010897325	0.242151159	1.96268009
16	ENSMUSG000000043019	100	25	43	35	52	57	0.01417562	9.256839485	4.10212E-05	0.01417562	611.7674277	1.942426609
17	ENSMUSG000000032666	47	11	6	37	8	26	0.013526432	8.665258948	5.49549E-05	0.013526432	405.9783401	1.868816762
18	ENSMUSG000000015961	0	0	0	3	1	1	0.013526432	-1.223103053	5.64074E-05	0.013526432	0.428360378	1.868816762
19	ENSMUSG000000026235	14	7	7	8	7	16	0.013526432	-2.031741991	5.83175E-05	0.013526432	0.244559601	1.868816762
20	ENSMUSG000000026482	97	29	41	40	7	16	0.015393251	-5.482756143	7.71008E-05	0.015393251	0.022362788	1.812669643
21	ENSMUSG000000008475	0	0	0	10	0	0	0.015393251	-1.971389823	7.94031E-05	0.015393251	0.255007251	1.812669643
22	ENSMUSG000000056870	8	5	7	5	2	0	0.015393251	2.538534463	8.10045E-05	0.015393251	5.809985099	1.812669643
23	ENSMUSG000000039630	3472	2094	1689	1269	934	2060	0.015393251	1.619581525	8.11141E-05	0.015393251	3.072858905	1.812669643
24	ENSMUSG000000025915	16	4	10	7	5	3	0.023362886	2.400647415	0.000130271	0.023362886	5.280400712	1.631473515
25	ENSMUSG000000099377	133	80	52	61	38	82	0.023362886	1.182974837	0.000139473	0.023362886	2.270444604	1.631473515
26	ENSMUSG000000042772	678	378	419	682	368	453	0.023362886	-2.507517685	0.000143714	0.023362886	0.175857932	1.631473515
27	ENSMUSG000000026491	4	2	3	2	1	4	0.023362886	-1.851438689	0.000145493	0.023362886	0.277115884	1.631473515
28	ENSMUSG000000025917	24	2	3	12	0	0	0.028541023	-1.555045371	0.000184577	0.028541023	0.340317826	1.544530465
29	ENSMUSG000000004364	1158	547	598	654	430	751	0.036863619	2.125291164	0.000254097	0.036863619	4.362911363	1.433402027
30	ENSMUSG000000026478	76	25	29	53	24	16	0.036863619	1.921981663	0.000256059	0.036863619	3.789432117	1.433402027
31	ENSMUSG000000042699	24	12	8	15	2	21	0.037871472	3.15056957	0.00027213	0.037871472	8.880060898	1.421687818
32	ENSMUSG000000025986	5	11	4	13	10	3	0.038452884	-1.182811534	0.000286419	0.038452884	0.440492227	1.41507108
33	ENSMUSG000000064943	0	0	0	6	0	0	0.038452884	-1.141008951	0.000294729	0.038452884	0.453442351	1.41507108
34	ENSMUSG000000056763	4	2	8	6	2	8	0.042096567	-5.670981954	0.000335173	0.042096567	0.01962747	1.375753316
35	ENSMUSG000000026109	67	41	27	31	18	42	0.042096567	1.706657985	0.000345332	0.042096567	3.264038298	1.375753316

Şekil 51. EdgeR yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Gene_ID	1_536	2_537	3_538	13_548	14_549	15_550	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG000000032116	68	91	159	37	24	39	0.241755469	-1.525527641	0.000212669	-5.333845797	0.347352494	0.616623692
3	ENSMUSG000000028703	134	130	230	66	50	80	0.241755469	-1.223405971	0.000231622	-5.279562221	0.428270446	0.616623692
4	ENSMUSG0000002076809	27217	17176	33911	43199	30391	51064	0.241755469	0.778109974	0.000208379	5.346841559	1.714882791	0.616623692
5	ENSMUSG0000000000031	0	0	0	0	49	12	0.241755469	6.445025985	0.000138471	5.610802605	87.12567269	0.616623692
6	ENSMUSG000000036427	0	0	0	8	6	6	0.290878757	3.882073838	0.000348358	5.023622144	14.74418157	0.536287994
7	ENSMUSG000000050890	7	8	14	0	0	1	0.308574182	-3.682686406	0.00044346	-4.874902677	0.077875514	0.510640413
8	ENSMUSG000000040952	59	103	143	31	27	42	0.309620069	-1.460184841	0.000741605	-4.564152602	0.363446561	0.509170896
9	ENSMUSG000000015750	225	255	460	164	77	186	0.309620069	-1.068814367	0.000694908	-4.603022907	0.476710607	0.509170896
10	ENSMUSG000000069662	1274	1530	3149	1235	754	1274	0.309620069	-0.728526458	0.000669752	-4.625114204	0.603520023	0.509170896
11	ENSMUSG000000044533	0	0	0	8	4	6	0.309620069	3.737605575	0.000533192	4.762620358	13.33924933	0.509170896
12	ENSMUSG000000092341	31	20	40	73	54	107	0.331777295	1.446770239	0.000874144	4.466409848	2.725971047	0.479153338
13	ENSMUSG000000049866	523	569	1126	468	309	464	0.340357199	-0.708684373	0.000978272	-4.399934711	0.61187787	0.468065059
14	ENSMUSG000000032382	33	32	58	16	9	12	0.36111096	-1.591925934	0.001527635	-4.139854968	0.331728315	0.44235933
15	ENSMUSG000000039952	115	112	197	77	49	77	0.36111096	-0.953538527	0.001578488	-4.12093372	0.51636441	0.44235933
16	ENSMUSG000000032115	36	33	63	14	6	19	0.36111096	-1.674990504	0.001677142	-4.085969268	0.313168171	0.44235933
17	ENSMUSG000000051855	188	238	541	145	20	131	0.36111096	-1.849934212	0.001720476	-4.071281083	0.277405018	0.44235933
18	ENSMUSG000000060743	435	520	1035	406	173	417	0.36111096	-0.919294278	0.00165852	-4.092402849	0.528767614	0.44235933
19	ENSMUSG000000026872	290	295	513	544	464	615	0.36111096	0.676237206	0.001779259	4.051958818	1.597966546	0.44235933
20	ENSMUSG000000060036	0	0	0	6	2	9	0.36111096	3.559922983	0.001366031	4.204646901	11.79352414	0.44235933
21	ENSMUSG000000038485	0	0	1	8	4	6	0.36111096	3.205615649	0.001576013	4.121839992	9.225426754	0.44235933
22	ENSMUSG000000030867	0	0	0	4	6	4	0.36111096	3.361734658	0.001816367	4.040099438	10.27975986	0.44235933
23	ENSMUSG000000025151	123	264	410	126	58	113	0.36355673	-1.258316592	0.001934441	-4.003970857	0.418031455	0.439427811
24	ENSMUSG000000018770	438	531	853	390	291	374	0.36355673	-0.669949969	0.002002827	-3.984077162	0.628528483	0.439427811
25	ENSMUSG000000008855	24	33	69	11	10	16	0.376796265	-1.584195538	0.002585839	-3.838526067	0.333510586	0.423893411
26	ENSMUSG000000039081	24	26	53	14	5	10	0.376796265	-1.696337876	0.002698275	-3.814399995	0.308568377	0.423893411
27	ENSMUSG000000054889	8	9	17	34	22	38	0.376796265	1.538688042	0.002797729	3.793909435	2.905301809	0.423893411
28	ENSMUSG000000032294	91	104	259	88	30	74	0.376796265	-1.135402847	0.003860383	-3.612626167	0.45520779	0.423893411
29	ENSMUSG000000000420	171	218	331	149	116	111	0.376796265	-0.827836643	0.003591064	-3.653199925	0.563373401	0.423893411
30	ENSMUSG000000022462	250	398	753	259	135	282	0.376796265	-0.907569044	0.003351869	-3.691949132	0.533082585	0.423893411
31	ENSMUSG000000043702	41	56	57	9	23	18	0.376796265	-1.624268619	0.004998002	-3.468333999	0.32437429	0.423893411
32	ENSMUSG000000008398	41	35	67	83	116	93	0.376796265	1.106556153	0.004806925	3.490054831	2.153310182	0.423893411
33	ENSMUSG000000031871	0	0	0	2	12	14	0.376796265	3.915905063	0.002906628	3.772317387	15.09401871	0.423893411
34	ENSMUSG000000030741	8	3	9	1	0	0	0.376796265	-3.105884646	0.003044886	-3.746075454	0.116154371	0.423893411
35	ENSMUSG0000000116678	2	8	6	0	0	0	0.376796265	-3.250884753	0.00277186	-3.79916608	0.10504761	0.423893411
36	ENSMUSG000000033004	33	33	38	78	45	84	0.376796265	1.084011673	0.005450019	3.420155512	2.11992272	0.423893411
37	ENSMUSG000000029165	115	100	211	72	60	90	0.376796265	-0.81492294	0.004905135	-3.478782624	0.568438848	0.423893411
38	ENSMUSG000000052684	21	18	38	45	47	66	0.376796265	1.128498085	0.005719668	3.393320876	2.186310163	0.423893411
39	ENSMUSG000000042507	0	0	1	3	7	17	0.376796265	3.460183503	0.003314802	3.698207473	11.00573433	0.423893411
40	ENSMUSG000000024498	106	84	122	156	184	220	0.376796265	0.935601638	0.004983723	3.469927594	1.912688105	0.423893411
41	ENSMUSG000000041308	43	47	113	109	133	122	0.376796265	0.986348431	0.00546266	3.418867542	1.981164165	0.423893411
42	ENSMUSG000000084413	9	10	22	2	2	2	0.376796265	-2.361044418	0.004782609	-3.492882085	0.19465018	0.423893411
43	ENSMUSG000000062127	0	0	0	17	1	6	0.376796265	3.676532999	0.003486799	3.669754059	12.78635367	0.423893411

Şekil 52. Limmi yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Gene_ID	4_539	5_540	6_541	16_551	17_552	18_553	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG00000003863	656	381	704	116	122	195	0.134055683	-1.706743163	8.12839E-05	-5.9382968	0.306350866	0.872714769
3	ENSMUSG000000118642	12	162	10	600	238	333	0.134055683	4.337227526	0.000128437	5.636474925	20.21322375	0.872714769
4	ENSMUSG000000032366	2528	1989	4714	802	733	848	0.134055683	-1.542508143	0.000103685	-5.776664439	0.343288125	0.872714769
5	ENSMUSG000000069495	723	471	604	251	245	168	0.134055683	-1.105418548	0.000119837	-5.681659286	0.464767616	0.872714769
6	ENSMUSG000000060126	2	0	0	27	20	18	0.159256261	4.973619831	0.000190726	5.382176688	31.42018632	0.797903484
7	ENSMUSG000000026193	11041	8413	14817	1651	1444	4656	0.173947989	-2.025725426	0.000249985	-5.211465825	0.245581633	0.759580588
8	ENSMUSG000002076348	448	326	452	104	64	167	0.209255535	-1.662324947	0.000350848	-5.001170567	0.315929608	0.679323045
9	ENSMUSG000000034640	228	118	173	45	52	59	0.229972031	-1.394414477	0.000494033	-4.792613532	0.380399043	0.638324979
10	ENSMUSG000000064345	2	18	0	99	47	44	0.229972031	4.930260999	0.00053856	4.740595958	30.4899314	0.638324979
11	ENSMUSG000000009927	0	0	0	9	10	10	0.229972031	4.629874613	0.00058806	4.687821612	24.75888797	0.638324979
12	ENSMUSG000000050708	0	0	0	11	8	8	0.229972031	4.553321502	0.000605914	4.669921244	23.47936526	0.638324979
13	ENSMUSG000000064367	4	65	0	131	78	98	0.237167945	4.991005261	0.000696094	4.587220439	31.80111096	0.624944009
14	ENSMUSG000000025912	49	36	27	141	91	51	0.237167945	1.632326172	0.000879544	4.448998482	3.100124536	0.624944009
15	ENSMUSG000000027358	23	9	15	43	72	34	0.237167945	1.942068531	0.000999011	4.374350421	3.842561982	0.624944009
16	ENSMUSG000000064341	6	62	0	166	75	77	0.237167945	4.823355304	0.000974457	4.38890327	28.31226575	0.624944009
17	ENSMUSG000000064351	20	127	0	387	148	241	0.237167945	5.23717766	0.001101783	4.31723981	37.71790551	0.624944009
18	ENSMUSG000000064370	2	44	0	111	68	43	0.237167945	4.862177984	0.000973035	4.389757851	29.08448763	0.624944009
19	ENSMUSG000000020064	278	160	265	489	409	224	0.237167945	0.974995431	0.001136134	4.29938227	1.965634972	0.624944009
20	ENSMUSG000000043716	2	0	0	16	10	13	0.237167945	4.238495439	0.000976614	4.38760944	18.87618667	0.624944009
21	ENSMUSG00000002076161	271116	204259	253187	62209	44185	128660	0.237167945	-1.467703689	0.001050666	-4.344917211	0.361557325	0.624944009
22	ENSMUSG000000042834	939	636	750	230	166	391	0.259761566	-1.332554661	0.001306585	-4.21836348	0.397064515	0.585425107
23	ENSMUSG000000021835	85	47	102	29	19	20	0.272614836	-1.403281547	0.001621075	-4.094249325	0.378068211	0.564450513
24	ENSMUSG000000025290	2	4	0	24	14	18	0.272614836	3.809274781	0.001622839	4.093626096	14.01864282	0.564450513
25	ENSMUSG000000000031	0	7	0	236	55	218	0.272614836	7.331342933	0.001556139	4.117695839	161.0475533	0.564450513
26	ENSMUSG000000037335	0	4	0	29	10	20	0.272614836	4.614099837	0.001705203	4.065282483	24.48964298	0.564450513
27	ENSMUSG000000023830	0	0	0	16	4	10	0.272614836	4.535188248	0.001716351	4.061555724	23.18609968	0.564450513
28	ENSMUSG000000023169	0	0	0	10	6	4	0.272614836	4.120875992	0.001763018	4.046222497	17.39831871	0.564450513
29	ENSMUSG000000025980	3	1	2	42	12	22	0.283985732	3.600245208	0.001904575	4.002163646	12.12779366	0.546703479
30	ENSMUSG000000001506	72	30	50	8	1	17	0.296584943	-2.773175732	0.002841028	-3.775888943	0.146282011	0.527850901
31	ENSMUSG000000036620	246	129	211	96	53	77	0.296584943	-1.048578541	0.002399877	-3.871005907	0.483444258	0.527850901
32	ENSMUSG000000042379	10	6	6	27	24	16	0.296584943	1.900705996	0.003282285	3.694897707	3.733958765	0.527850901
33	ENSMUSG0000000506073	32	25	59	6	8	4	0.296584943	-2.219261583	0.00350164	-3.658714713	0.214751247	0.527850901
34	ENSMUSG000000071072	9	14	10	31	31	20	0.296584943	1.707108233	0.003715032	3.625683645	3.265057125	0.527850901
35	ENSMUSG000000035864	115	102	114	51	45	27	0.296584943	-1.104210617	0.003105879	-3.725847846	0.465156916	0.527850901
36	ENSMUSG000000020181	18	5	10	62	43	15	0.296584943	2.079457452	0.003971518	3.588467089	4.226482428	0.527850901
37	ENSMUSG000000054871	102	46	106	336	241	75	0.296584943	1.540224796	0.002940858	3.756483938	2.908398176	0.527850901
38	ENSMUSG000000070366	111	73	146	40	44	35	0.296584943	-1.100689703	0.003340969	-3.684979623	0.466293523	0.527850901
39	ENSMUSG000000064363	2	20	0	54	20	52	0.296584943	4.236206878	0.003731479	3.623219144	18.84626693	0.527850901
40	ENSMUSG000000040152	99	152	153	28	15	60	0.296584943	-1.852609508	0.003763768	-3.618413084	0.276891082	0.527850901
41	ENSMUSG000000020183	0	0	0	8	10	3	0.296584943	4.132294823	0.002166552	3.928910923	17.5365716	0.527850901
42	ENSMUSG000000021823	2400	1534	2523	1109	1026	1066	0.296584943	-0.662073582	0.002412268	-3.868095402	0.631969316	0.527850901
43	ENSMUSG000000042453	48	26	38	10	4	13	0.296584943	-1.827612506	0.004830809	-3.479627753	0.281730467	0.527850901

Şekil 53. Limmi yöntemi ile matrijel kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	Gene_ID	7_542	8_543	9_544	19_554	20_555	21_556	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
2	ENSMUSG000000051855	332	201	767	56	99	81	0.539342031	-1.647581216	0.000129184	-5.556520633	0.319174829	0.268135734
3	ENSMUSG0000002076161	153276	132435	363720	50132	90169	64149	0.868176001	-0.869772197	0.000889443	-4.397980795	0.547233252	0.061392223
4	ENSMUSG000000060743	690	439	1600	268	410	185	0.868176001	-0.847729669	0.002298217	-3.862859706	0.555658473	0.061392223
5	ENSMUSG000000037742	5644	4019	14675	2784	4463	2504	0.868176001	-0.468117512	0.033091739	-2.410181443	0.722907262	0.061392223
6	ENSMUSG000000049775	2847	2804	9318	1083	2495	1549	0.868176001	-0.705991827	0.026353465	-2.534931746	0.613020903	0.061392223
7	ENSMUSG000000022462	497	272	1188	167	283	141	0.868176001	-0.871119433	0.003747876	-3.593378705	0.546722467	0.061392223
8	ENSMUSG000000082536	4928	3277	13058	2363	4118	2057	0.868176001	-0.459941417	0.036972729	-2.34907434	0.72701578	0.061392223
9	ENSMUSG000000069662	1865	1056	4324	815	1342	654	0.868176001	-0.522960793	0.021669119	-2.641564807	0.695942109	0.061392223
10	ENSMUSG000000026193	2516	3034	8736	1083	1916	1614	0.868176001	-0.770433201	0.032545281	-2.419335382	0.586241416	0.061392223
11	ENSMUSG000000031207	869	552	1168	599	1440	460	0.868176001	0.576116978	0.017455605	2.758918322	1.490831263	0.061392223
12	ENSMUSG000000022710	565	335	616	381	884	312	0.868176001	0.69825393	0.011346838	2.991922505	1.62253987	0.061392223
13	ENSMUSG000000008398	74	63	129	101	187	89	0.868176001	1.226154351	0.000654291	4.575304061	2.339425605	0.061392223
14	ENSMUSG000000021877	904	440	2191	334	688	218	0.868176001	-0.694854742	0.016880074	-2.77708261	0.617771516	0.061392223
15	ENSMUSG0000002076809	37076	40839	79773	11939	35225	21951	0.868176001	-0.523075666	0.081365006	-1.904319437	0.695886697	0.061392223
16	ENSMUSG000000037236	3417	1857	5615	1356	2704	1090	0.868176001	-0.351561649	0.04148947	-2.285278635	0.783735282	0.061392223
17	ENSMUSG000000030678	733	264	1220	212	360	188	0.868176001	-0.694887099	0.013933093	-2.880920793	0.617757661	0.061392223
18	ENSMUSG000000005610	20940	10714	30330	7917	17349	6654	0.868176001	-0.258424759	0.078198147	-1.927268695	0.836000228	0.061392223
19	ENSMUSG000000084067	191	166	314	146	408	225	0.868176001	0.873768814	0.010486214	3.034556638	1.832434624	0.061392223
20	ENSMUSG000000091243	102	83	204	104	297	90	0.868176001	0.979760018	0.004472335	3.496775873	1.972137331	0.061392223
21	ENSMUSG000000020745	749	417	1382	253	579	228	0.868176001	-0.531696201	0.021907203	-2.635622869	0.691740964	0.061392223
22	ENSMUSG000000018593	742	1032	2531	225	468	553	0.868176001	-1.023425108	0.027676139	-2.508170878	0.491947032	0.061392223
23	ENSMUSG000000049866	638	481	1612	289	506	245	0.868176001	-0.580277313	0.023976143	-2.586500556	0.668835203	0.061392223
24	ENSMUSG000000028646	254	133	439	47	145	67	0.868176001	-0.969829964	0.004704184	-3.469210779	0.510566235	0.061392223
25	ENSMUSG000000018363	129	108	172	99	284	121	0.868176001	0.939418539	0.008366706	3.156659179	1.917755154	0.061392223
26	ENSMUSG000000036241	673	540	1223	476	1297	457	0.868176001	0.516384607	0.037883062	2.33563764	1.430366256	0.061392223
27	ENSMUSG000000028949	188	91	275	42	82	41	0.868176001	-0.993990657	0.003078096	-3.70145241	0.502087023	0.061392223
28	ENSMUSG000000061657	100	76	102	127	176	64	0.868176001	1.087348265	0.005724238	3.362405754	2.124831242	0.061392223
29	ENSMUSG000000067274	999	497	2138	403	758	318	0.868176001	-0.477585454	0.04261658	-2.270396536	0.718178588	0.061392223
30	ENSMUSG000000054808	1900	1527	2195	1019	3777	1110	0.868176001	0.583309237	0.066987473	2.016038785	1.498282052	0.061392223
31	ENSMUSG000000032035	123	98	205	114	272	82	0.868176001	0.777464037	0.013216329	2.909479416	1.714115159	0.061392223
32	ENSMUSG000000024498	310	171	304	182	462	161	0.868176001	0.674517286	0.027065048	2.520376439	1.596062654	0.061392223
33	ENSMUSG000000053907	1802	914	3375	812	1461	492	0.868176001	-0.389285337	0.063280371	-2.048445841	0.763507727	0.061392223
34	ENSMUSG000000036438	2206	905	3602	902	1564	532	0.868176001	-0.398816023	0.069573401	-1.994405476	0.75848049	0.061392223
35	ENSMUSG000000062270	230	269	492	85	198	73	0.868176001	-0.783353756	0.022428533	-2.622829959	0.581014569	0.061392223
36	ENSMUSG000000032402	86	29	82	124	296	29	0.868176001	1.6110936	0.007147361	3.241943063	3.054833183	0.061392223
37	ENSMUSG000000026872	636	442	897	399	1082	339	0.868176001	0.487936761	0.053924507	2.138873215	1.402437775	0.061392223
38	ENSMUSG000000025959	170	128	323	138	262	208	0.868176001	0.707521753	0.027778457	2.506152891	1.632996562	0.061392223
39	ENSMUSG000000052512	135	36	74	119	224	41	0.868176001	1.336669271	0.010466729	3.035561999	2.525675461	0.061392223
40	ENSMUSG000000031731	268	126	456	64	180	73	0.868176001	-0.697589332	0.021422288	-2.647793059	0.616601656	0.061392223
41	ENSMUSG000000071172	545	348	746	318	731	354	0.868176001	0.459298821	0.056175501	2.11584422	1.374873439	0.061392223
42	ENSMUSG000000053931	49	49	92	80	102	46	0.868176001	0.996119867	0.008560859	3.14424771	1.99462822	0.061392223
43	ENSMUSG000000022263	79	29	94	70	108	49	0.868176001	0.931389971	0.008533103	3.146004587	1.907112527	0.061392223

Şekil 54. Limmi yöntemi ile transwell kullanılan kültürde epitel hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

	Gene_ID	10_545	11_546	12_547	22_557	23_558	24_559	padj	log2FoldChange	pvalue	stat	foldChange	log10padj
1	ENSMUSG00000049775	6940	3383	3594	2424	1708	2199	0.03873164	-0.865490835	9.27704E-06	-8.295870215	0.548859642	1.411934112
2	ENSMUSG00000051855	664	351	371	121	97	234	0.091005813	-1.424035972	7.49137E-05	-6.480704937	0.372668305	1.040930867
3	ENSMUSG00000003545	200	78	104	779	471	342	0.091005813	2.261246809	8.88425E-05	6.345991108	4.794056158	1.040930867
4	ENSMUSG00000056758	19	0	1	198	228	178	0.091005813	6.36594447	0.000106928	6.201670965	82.47840164	1.040930867
5	ENSMUSG00000042541	0	0	0	14	4	12	0.091005813	4.523493792	0.000108989	6.186923403	22.99891332	1.040930867
6	ENSMUSG00000026826	55	13	20	122	110	90	0.115702808	2.177519221	0.000215302	5.674927693	4.523750058	0.936656101
7	ENSMUSG00000053907	2451	1281	1216	856	486	1094	0.115702808	-0.791262757	0.000196465	-5.742248159	0.577838103	0.936656101
8	ENSMUSG00000093826	1276	574	579	1417	903	1150	0.115702808	0.795039435	0.000221706	5.653473867	1.735124802	0.936656101
9	ENSMUSG00000091243	183	126	82	276	145	317	0.141941275	1.158576926	0.000305981	5.420683529	2.232371179	0.847891297
10	ENSMUSG00000060743	1183	607	495	370	244	458	0.15636506	-0.821273623	0.000374527	-5.277373387	0.565942104	0.805860285
11	ENSMUSG00000040652	1274	564	553	446	235	489	0.166876951	-0.767291759	0.000506224	-5.067503266	0.587519337	0.777603645
12	ENSMUSG00000005610	28015	16561	14014	12649	7923	14789	0.166876951	-0.48411183	0.000474572	-5.112105873	0.714937073	0.777603645
13	ENSMUSG00000083573	0	0	0	9	2	10	0.166876951	3.981929889	0.000519617	5.049519919	15.80084588	0.777603645
14	ENSMUSG00000052684	49	21	25	146	76	68	0.167669841	1.78924839	0.000761355	4.79000668	3.45634778	0.775545047
15	ENSMUSG00000062014	118	83	68	38	16	34	0.167669841	-1.366500514	0.000781251	-4.772716074	0.387830854	0.775545047
16	ENSMUSG00000025151	477	162	177	102	69	136	0.167669841	-1.08927299	0.000750278	-4.799843508	0.46998159	0.775545047
17	ENSMUSG00000015750	569	290	259	202	132	214	0.167669841	-0.755737632	0.000704288	-4.842406079	0.592243502	0.775545047
18	ENSMUSG00000003555	144	81	65	33	19	49	0.167669841	-1.277483715	0.000925653	-4.659742755	0.412514371	0.775545047
19	ENSMUSG000000118866	270	111	80	56	41	41	0.167669841	-1.407691283	0.000902861	-4.676273489	0.376914373	0.775545047
20	ENSMUSG00000018363	150	100	105	268	140	198	0.167669841	0.997304646	0.000891541	4.684649041	1.996266934	0.775545047
21	ENSMUSG00000022858	251	105	129	258	156	315	0.167669841	0.846315612	0.000865296	4.704510811	1.797903529	0.775545047
22	ENSMUSG00000063015	86	43	67	147	80	122	0.167669841	1.087564161	0.001038312	4.583921301	2.125149243	0.775545047
23	ENSMUSG00000032376	11	4	1	30	16	33	0.167669841	2.696286944	0.001028918	4.589901719	6.481316758	0.775545047
24	ENSMUSG00000047045	199	108	94	58	31	76	0.167669841	-1.039814648	0.001196172	-4.491220774	0.486389959	0.775545047
25	ENSMUSG00000079509	363	176	168	87	86	135	0.167669841	-0.942593461	0.001316011	-4.429128751	0.520296728	0.775545047
26	ENSMUSG00000031402	0	0	0	8	4	4	0.167669841	3.679604078	0.00073984	4.809254629	12.81360109	0.775545047
27	ENSMUSG00000019132	1700	812	875	521	507	683	0.167669841	-0.718180416	0.001103821	-4.54375042	0.607863621	0.775545047
28	ENSMUSG00000028851	91	52	45	100	75	129	0.167669841	0.942867746	0.001683128	4.270703833	1.922345624	0.775545047
29	ENSMUSG00000083394	0	0	0	13	2	6	0.167669841	3.906970502	0.00081637	4.743309493	15.00083082	0.775545047
30	ENSMUSG00000000567	61	26	29	162	68	71	0.167669841	1.541753391	0.001804615	4.226231157	2.911481377	0.775545047
31	ENSMUSG000000107462	9	8	11	101	23	37	0.167669841	2.605225398	0.002004446	4.159537492	6.084865603	0.775545047
32	ENSMUSG00000008398	78	51	49	162	87	96	0.167669841	1.166603351	0.001742536	4.248547681	2.244852576	0.775545047
33	ENSMUSG00000055639	35	7	17	0	1	2	0.167669841	-3.653059615	0.001302048	-4.436047833	0.079491278	0.775545047
34	ENSMUSG000000204740	139	62	71	49	22	38	0.167669841	-1.059420471	0.00190613	-4.191428218	0.479824766	0.775545047
35	ENSMUSG000000021877	1653	884	915	479	481	747	0.167669841	-0.776825071	0.00123544	-4.470175413	0.583649815	0.775545047
36	ENSMUSG00000028060	63	46	31	101	63	82	0.167669841	1.073324735	0.001997934	4.161598057	2.104277155	0.775545047
37	ENSMUSG00000042302	49	19	24	61	36	71	0.167669841	1.123856197	0.002175914	4.107674073	2.179286989	0.775545047
38	ENSMUSG00000054871	82	66	44	106	83	143	0.167669841	1.04614899	0.001972254	4.169794429	2.065010317	0.775545047
39	ENSMUSG00000030678	1108	614	602	419	329	525	0.167669841	-0.615541674	0.001472296	-4.356595772	0.652684791	0.775545047
40	ENSMUSG00000029580	40	16	28	100	29	76	0.167669841	1.473663808	0.002487988	4.023469298	2.777263009	0.775545047
41	ENSMUSG00000062248	152	118	69	25	8	60	0.167669841	-1.828634981	0.002475135	-4.026712457	0.281530868	0.775545047
42	ENSMUSG00000003038	265	255	143	71	41	115	0.167669841	-1.322542691	0.002071965	-4.138576664	0.399829634	0.775545047

Şekil 55. Limmi yöntemi ile transwell kullanılan kültürde stroma hücrelerinin 24 ve 72. saatlerde karşılaştırmalı analizi sonucu gen ifadeleri. Bu şekilde analiz edilen gen sayısı 4175 olmuştur.

Belirtilen analizler sonucunda gruplar arasında anlamlı derece artma ve azalma gösteren gösteren analizlerin özeti şekil 53-55'te belirtilmiştir. Bu analizlerin detaylı belgeleri de raporla birlikte yüklenmiştir. Analizlerde üç farklı yöntemle genler bakılmış ve $\log_2fc > 1$ ve $padj < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir. Aşağıdaki şekillerde anlamlı bulunan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Genlerin tipi ve tanımı soldaki kolonlarda verilmektedir.

	UP-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)						
	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Description
DESeq2	ENSMUSG00000000031	1.91912E-08	8.117575601	1.03401E-11	H19	lncRNA	H19, imprinted maternally expressed transcript [Source:MG1 Gene Name:Acc:MG1:95891]
	ENSMUSG000000056758	0.017032137	2.900781387	3.67072E-05	Hmga2	coding	high mobility group AT-hook 2 [Source:MG1 Gene Name:Acc:MG1:101761]
edgeR	ENSMUSG000000051285	9.21473E-10	12.51588248	2.20712E-13	Pomtl	coding	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
	ENSMUSG000000057363	0.019926864	4.137852963	1.43187E-05	Uxsl	coding	UDP-glucuronate decarboxylase 1
	ENSMUSG000000084353	0.043193655	11.74576481	4.13831E-05	Gml5452	pseudo	predicted gene 15452
limma	No significant differentially expressed genes were found ($\log_2fc > 1$, < -1 , $padj < 0.05$)						

Şekil 56. Matrijelde yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. 24-72. saat aralığında anlamlı şekilde artan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Limma ile anlamlı gen bulunmamıştır.

	UP-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)			
	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue
DESeq2	No significant differentially expressed genes were found (log2fc > 1, padj < 0.05)			
edgeR	No significant differentially expressed genes were found (log2fc > 1, < -1, padj < 0.05)			
limma	No significant differentially expressed genes were found (log2fc > 1, < -1, padj < 0.05)			

Şekil 57. Transwelldede yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. Anlamli gen artışı bulunmamıştır.

	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
DESeq2	ENSMUSG000000060126	0.000717431	5.406472687	5.62103E-07	Tpt1	coding	Mouse	tumor protein, translationally-controlled 1
	ENSMUSG000000025980	0.006543564	4.006231587	8.54474E-06	Hspd1	coding	Mouse	heat shock protein 1 (chaperonin)
	ENSMUSG000000020064	0.032079911	1.004555638	5.02689E-05	Herc4	coding	Mouse	hect domain and RLD 4
	ENSMUSG000000054871	0.040422809	1.67120662	0.00010557	Tmem158	coding	Mouse	transmembrane protein 158
	ENSMUSG000000027358	0.040422809	2.057282611	0.000102373	Bmp2	coding	Mouse	bone morphogenetic protein 2
edgeR	ENSMUSG000000051285	1.00811E-07	9.053677112	2.41464E-11	Pcmtd1	coding	Mouse	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
	ENSMUSG000000048538	3.62636E-06	7.374998791	1.73718E-09	Gm9826	pseudo	Mouse	predicted gene 9826
	ENSMUSG000000057363	0.000696184	5.628245764	5.00252E-07	Uxi1	coding	Mouse	UDP-glucuronate decarboxylase 1
	ENSMUSG000000084353	0.008755431	2.925824007	9.45687E-06	Gm15452	pseudo	Mouse	predicted gene 15452
	ENSMUSG000000026374	0.009541969	6.357675735	1.3713E-05	Tsn	coding	Mouse	translin
	ENSMUSG000000041763	0.016880733	3.358260443	4.44762E-05	Tpp2	coding	Mouse	tripeptidyl peptidase II
	ENSMUSG000000025912	0.016880733	9.37871291	4.28041E-05	Mybl1	coding	Mouse	myeloblastosis oncogene-like 1
	ENSMUSG000000026483	0.017798776	4.909357499	5.11582E-05	Nlban1	coding	Mouse	nlban apoptosis regulator 1
	ENSMUSG000000019699	0.01827461	6.503586817	5.6903E-05	Akt3	coding	Mouse	thymoma viral proto-oncogene 3
	ENSMUSG000000063659	0.024217479	3.127231263	8.63259E-05	Zbtb18	coding	Mouse	zinc finger and BTB domain containing 18
	ENSMUSG000000032666	0.024217479	9.190272063	9.28095E-05	1700025G04R1	coding	Mouse	RIKEN cDNA 1700025G04 gene
	ENSMUSG000000015961	0.025392986	2.297967362	0.000103397	Adss	coding	Mouse	adenylosuccinate synthetase, non muscle
	ENSMUSG000000026235	0.026581543	6.780003544	0.000114603	Epha4	coding	Mouse	Eph receptor A4
	ENSMUSG000000026482	0.028895121	9.387681631	0.000131499	Rgl1	coding	Mouse	ral guanine nucleotide dissociation stimulator,-like 1
	ENSMUSG000000008475	0.032625911	2.393399188	0.000157093	Apc5	coding	Mouse	actin related protein 2/3 complex, subunit 5
	ENSMUSG000000056870	0.032625911	5.68446237	0.000164106	Gulp1	coding	Mouse	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
	ENSMUSG000000042772	0.038125155	6.575716335	0.000228294	Smg7	coding	Mouse	Smg-7 homolog, nonsense mediated mRNA decay factor (C. elegans)
	ENSMUSG000000026491	0.047078039	9.399608645	0.000293181	Ahtcf1	coding	Mouse	AT hook containing transcription factor 1
limma	No significant differentially expressed genes were found (log2fc > 1, < -1, padj < 0.05)							

Şekil 58. Matrijelde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. 24-72. saat aralığında anlamlı şekilde artan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Birçok gen ifadesinin anlamlı şekilde arttığı görülmektedir.

	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
DESeq2	ENSMUSG000000003545	7.47903E-12	2.410740257	3.99094E-15	Fosb	coding	Mouse	FBJ osteosarcoma oncogene B
	ENSMUSG000000026826	9.0131E-06	2.311610831	9.61933E-09	Nr4a2	coding	Mouse	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2
	ENSMUSG000000052684	0.00036813	1.927467055	1.14558E-06	Jun	coding	Mouse	jun proto-oncogene
	ENSMUSG000000092341	0.002167152	2.354796371	8.09502E-06	Malat1	lncRNA	Mouse	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-coding RNA)
	ENSMUSG000000091243	0.002362835	1.146757267	1.00868E-05	Vgll3	coding	Mouse	vestigial like family member 3
	ENSMUSG0000000107462	0.00294503	2.648159081	1.47251E-05	Cm7384	pseudo	Mouse	predicted gene 7384
	ENSMUSG000000005667	0.003100785	1.679451126	1.8201E-05	Sox9	coding	Mouse	SOX9 (sex determining region Y)-box 9
	ENSMUSG000000025025	0.005680815	1.782205243	4.24394E-05	Meil1	coding	Mouse	MAX interactor 1, dimerization protein
	ENSMUSG000000022528	0.007191906	1.682629273	6.01502E-05	Hes1	coding	Mouse	hes family bHLH transcription factor 1
	ENSMUSG000000056758	0.010663243	5.70760569	0.000108112	Hmga2	coding	Mouse	high mobility group AT-hook 2
	ENSMUSG000000011716	0.016107692	2.222302559	0.000214884	Cm49879	pseudo	Mouse	predicted gene, 49879
	ENSMUSG000000008398	0.016275732	1.206626576	0.000225811	Elk3	coding	Mouse	ELK3, member of ETS oncogene family
	ENSMUSG000000016777	0.018204083	1.277552314	0.000301135	Wt1	coding	Mouse	WD repeat and SOCS box-containing 1
	ENSMUSG000000021250	0.019660917	1.355501106	0.000346217	Fos	coding	Mouse	FBJ osteosarcoma oncogene
	ENSMUSG000000063015	0.02479048	1.071693945	0.000532737	Ccn1	coding	Mouse	cyclin 1
	ENSMUSG000000025283	0.02479048	1.107650509	0.000542374	Sat1	coding	Mouse	spermidine/spermine N1-acetyl transferase 1
edgeR	ENSMUSG000000051285	1.85864E-18	7.869539018	4.45182E-22	Pcmtd1	coding	Mouse	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
	ENSMUSG000000048538	1.79991E-09	3.447845723	8.62233E-13	Gm9826	pseudo	Mouse	predicted gene 9826
	ENSMUSG000000057363	8.949E-06	3.298931709	6.43042E-09	Uxi1	coding	Mouse	UDP-glucuronate decarboxylase 1
	ENSMUSG000000084353	0.000643766	2.741280363	6.32236E-07	Gm15452	pseudo	Mouse	predicted gene 15452
	ENSMUSG000000081441	0.002483722	3.769258559	4.16432E-06	Gm6161	pseudo	Mouse	predicted gene 6161
	ENSMUSG000000026374	0.002483722	5.687226786	3.76043E-06	Tsn	coding	Mouse	translin
	ENSMUSG000000041763	0.005187501	2.382807857	1.46739E-05	Tpp2	coding	Mouse	tripeptidyl peptidase II
	ENSMUSG000000057335	0.005187501	3.348246023	1.01305E-05	Cep170	coding	Mouse	centrosomal protein 170
	ENSMUSG000000025912	0.005187501	3.741327694	1.15353E-05	Mybl1	coding	Mouse	myeloblastosis oncogene-like 1
	ENSMUSG000000045210	0.005187501	11.50869643	1.42554E-05	Vcp1	coding	Mouse	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1
	ENSMUSG000000019699	0.008000012	6.099982908	2.74012E-05	Akt3	coding	Mouse	thymoma viral proto-oncogene 3
	ENSMUSG000000043019	0.011417562	9.256839485	4.10212E-05	Edem3	coding	Mouse	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3
	ENSMUSG000000032666	0.013526432	8.665258948	5.49549E-05	1700025G04R1	coding	Mouse	RIKEN cDNA 1700025G04 gene
	ENSMUSG000000039630	0.015393251	1.619581525	8.11141E-05	Hnmpu	coding	Mouse	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U
	ENSMUSG000000056870	0.015393251	2.538534463	8.10045E-05	Gulp1	coding	Mouse	GULP, engulfment adaptor PTB domain containing 1
limma	No significant differentially expressed genes were found (log2fc > 1, < -1, padj < 0.05)							

Şekil 59. Transwellde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. 24-72. saat aralığında anlamlı şekilde artan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Birçok gen ifadesinin anlamlı şekilde arttığı görülmektedir.

Matrijel ve transwellde kurulan ko-kültürlerdeki 24. saatten 72. saate kadar geçen sürede artan gen ifadelerinin yanında birçok genin de azaldığı belirlenmiştir. Bu genler bu projenin konusu dışında olmakla birlikte, bir kısım analiz örnek olması açısından şekil 56 ve 57’de gösterilmektedir.

DOWN-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)								
	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Symbol	Gene Name	Species	Description
DESeq2	ENSMUSG00000001855	0.039378507	-1.604621354	0.000190952	Mest	coding	Mouse	mesoderm specific transcript [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:96968]
	ENSMUSG000000032116	0.013636988	-1.530185699	1.88274E-05	Stt3a	coding	Mouse	STT3, subunit of the oligosaccharyltransferase complex, homolog A (S. cerevisiae) [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1333780]
	ENSMUSG000000040952	0.030210188	-1.48312931	0.000113939	Rpl19	coding	Mouse	ribosomal protein S19 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:1930187]
	ENSMUSG000000025151	0.029066862	-1.29493982	8.07778E-05	Maged1	coding	Mouse	MAGE family member D1 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2441984]
	ENSMUSG000000028703	0.013636988	-1.216489873	2.20425E-05	Lrrc4l	coding	Mouse	leucine rich repeat containing 41 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2441984]
	ENSMUSG000000015750	0.029066862	-1.036689719	9.39661E-05	Apha1	coding	Mouse	aph1 homolog A, gamma secretase subunit [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:2385110]
edgeR	ENSMUSG000000048538	0.019926864	-2.225480699	1.00477E-05	Gm9826	pseudo	Mouse	predicted gene 9826 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:3642725]
	ENSMUSG000000066693	0.044598121	-2.158865917	5.37947E-05	Gm7493	pseudo	Mouse	predicted gene 7493 [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:3643471]
	ENSMUSG000000026374	0.044598121	-1.775257914	6.40931E-05	Tsn	coding	Mouse	translin [Source:MGI Symbol:Acc:MGI:109263]
limma								
DOWN-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)								
	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
DESeq2	ENSMUSG00000001855	0.018347105	-1.528658209	4.67561E-06	Mest	coding	Mouse	mesoderm specific transcript
edgeR								
limma								
DOWN-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)								
	Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
DESeq2	ENSMUSG000000069495	0.000323273	-1.09721973	8.44274E-08	Epc2	coding	Mouse	enhancer of polycomb homolog 2
	ENSMUSG000000032366	0.000621067	-1.556124005	3.24402E-07	Tpm1	coding	Mouse	tropomyosin 1, alpha
	ENSMUSG000000033863	0.006147198	-1.563517595	6.42173E-06	Klf9	coding	Mouse	Kruppel-like factor 9

Şekil 60. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. 24-72. saat aralığında anlamlı şekilde azalan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Birçok gen ifadesinin anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir.

DOWN-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)							
Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
ENSMUSG00000069495	0.000323273	-1.09721973	8.44274E-08	Epc2	coding	Mouse	enhancer of polycarb homolog 2
ENSMUSG00000032366	0.000621067	-1.556124005	3.24402E-07	Tpm1	coding	Mouse	tropomyosin 1, alpha
ENSMUSG00000033863	0.006147198	-1.563517595	6.42173E-06	Klf9	coding	Mouse	Kruppel-like factor 9
ENSMUSG00000051855	0.040422809	-1.631388203	0.000103404	Mest	coding	Mouse	mesoderm specific transcript
ENSMUSG00000034640	0.040422809	-1.322840986	0.000104086	Tmpap	coding	Mouse	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase
ENSMUSG00000066693	0.008755431	-2.263830402	1.04855E-05	Gm7493	pseudo	Mouse	predicted gene 7493
ENSMUSG00000081441	0.013944465	-3.351047496	2.37218E-05	Gm6161	pseudo	Mouse	predicted gene 6161
ENSMUSG00000057335	0.013944465	-2.274054695	2.67199E-05	Cep170	coding	Mouse	centrosomal protein 170
ENSMUSG00000045210	0.016880733	-4.157214191	4.34854E-05	Vcplp1	coding	Mouse	valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1
limma							
DOWN-Regulated Ensembl Gene IDs (ranked based on Adj p-value)							
Ensembl Gene ID	padj	log2FoldChange	pvalue	Gene Name	Type	Species	Description
ENSMUSG00000051855	2.55827E-05	-1.366632951	5.46056E-08	Mest	coding	Mouse	mesoderm specific transcript
ENSMUSG00000030308	0.005223921	-1.387038063	3.62385E-05	Hmgn2	coding	Mouse	high mobility group nucleosomal binding domain 2
ENSMUSG00000025151	0.007191906	-1.057930164	6.14037E-05	Maged1	coding	Mouse	MAGE family member D1
ENSMUSG000000118866	0.008191838	-1.348546033	7.43123E-05	Metazoa_SRP	misc_RNA	Mouse	Metazoan signal recognition particle RNA
ENSMUSG00000062014	0.014277724	-1.401343402	0.000182852	Gmfb	coding	Mouse	glia maturation factor, beta
ENSMUSG00000062248	0.017237237	-1.719338087	0.000271801	Cks2	coding	Mouse	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
ENSMUSG00000038965	0.023677981	-1.023738688	0.00045486	Ube2l3	coding	Mouse	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 3
ENSMUSG00000000355	0.024268611	-1.265422272	0.000492106	Mct1	coding	Mouse	malignant T cell amplified sequence 1
ENSMUSG00000047045	0.029650553	-1.025538033	0.000844881	Tmem164	coding	Mouse	transmembrane protein 164
ENSMUSG00000066693	0.000643766	-2.00160737	7.70978E-07		pseudo	Mouse	predicted gene 7493
ENSMUSG00000026483	0.005187501	-6.267096218	1.49102E-05	Niban1	coding	Mouse	niban apoptosis regulator 1
ENSMUSG00000063659	0.010897325	-2.046020189	3.65419E-05	Zbtb18	coding	Mouse	zinc finger and BTB domain containing 18
ENSMUSG00000026235	0.013526432	-2.031741991	5.83175E-05	Epha4	coding	Mouse	Eph receptor A4
ENSMUSG00000015961	0.013526432	-1.223103053	5.64074E-05	Adis	coding	Mouse	adenylosuccinate synthetase, non muscle
ENSMUSG00000026482	0.015393251	-5.482756143	7.71008E-05	Rgl1	coding	Mouse	ral guanine nucleotide dissociation stimulator, like 1
ENSMUSG00000008475	0.015393251	-1.971389823	7.94031E-05	Arpc5	coding	Mouse	actin related protein 2/3 complex, subunit 5

Şekil 61. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde gen ifadeleri. 24-72. saat aralığında anlamlı şekilde azalan genler kırmızı ile belirtilmiştir. Birçok gen ifadesinin anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir.

Matrijel ve transwell kültürlerin yapılmasındaki amaç her iki kültür sisteminde de birlikte artan ortak genlerin bulunması ve bu genlerin susturulmasının hedeflenmesiydi. Ortak artmış genler şekil 58'de, azalmış genler ise şekil 59'da kırmızı olarak belirtilmiştir.

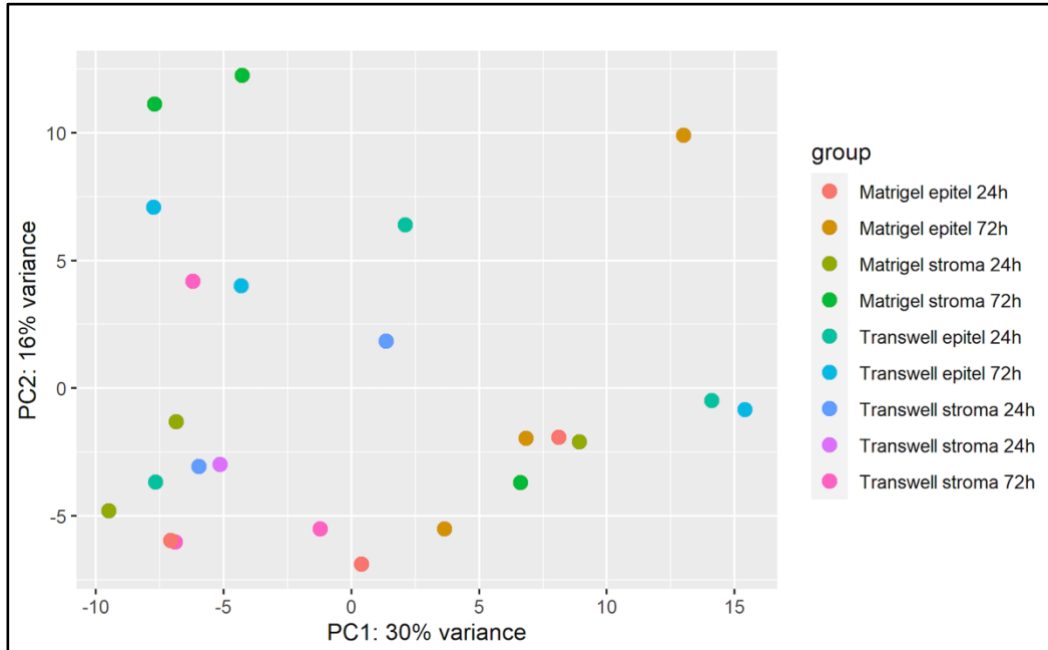
UP-Regulated Genes		
	Matrigal Epitel vs. Transwell Epitel	Matrigal Stroma vs. Transwell Stroma
DESeq2		Tmem158
edgeR		Pcmdt1
		Gm9826
		Uxs1
		Gm15452
		Tsn
		Tpp2
		Mybl1
		Akt3
		1700025G04Rik
		Gulp1

Şekil 62. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel ve stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde ortak genlerin analizi. Epitelde transwell grup analizinde anlamlı genler görülmediği için ortak gen bulunmamaktadır. Stroma hücrelerinde ise her iki analizle de ortak genler bulunmaktadır.

	DOWN-Regulated Genes	
	Matrigal Epitel vs. Transwell Epitel	Matrigal Stroma vs. Transwell Stroma
DESeq2	Pcmd1	Mest
edgeR		Gm7493

Şekil 63. Matrijel ve transwellde yetiştirilmiş epitel ve stroma hücrelerinde 24-72. saatlerde ortak genlerin analizi. Epitel ve stroma hücrelerinde her iki grupta azalan genler gösterilmiştir. Pcmd1'in stroma hücrelerin artmış ortak gen olmasına karşın (şekil 58) epitelde azalan ortak gen olması dikkat çekicidir.

Hem azalan hem de artan gen ifadelerinde ortak gen sayısının az olması örneklerin ve grupların RNA dizileme için kullanılan birçok örnekten daha az olması ve bu durumun grup içinde değişkenlik ("variance") yaratması olarak açıklanabilir. Şekil 60'daki PCA plot analizi bu durumu yansıtmaktadır. RNA dizileme genellikle primer hücreler yerine hücre dizilerinde (örneğin kanser hücreleri) kullanıldığı bu projede kullanılandan çok daha fazla sayıda grup ve hücre çalışılmaktadır. Fareden primer olarak elde edilmiş hücre ve blastokistlerle kurulan kültürlerde bu sayıya ulaşmak mümkün olmamakta, kullanılması gereken hayvan sayısı açısından etik olarak uygun bulunmamaktadır.



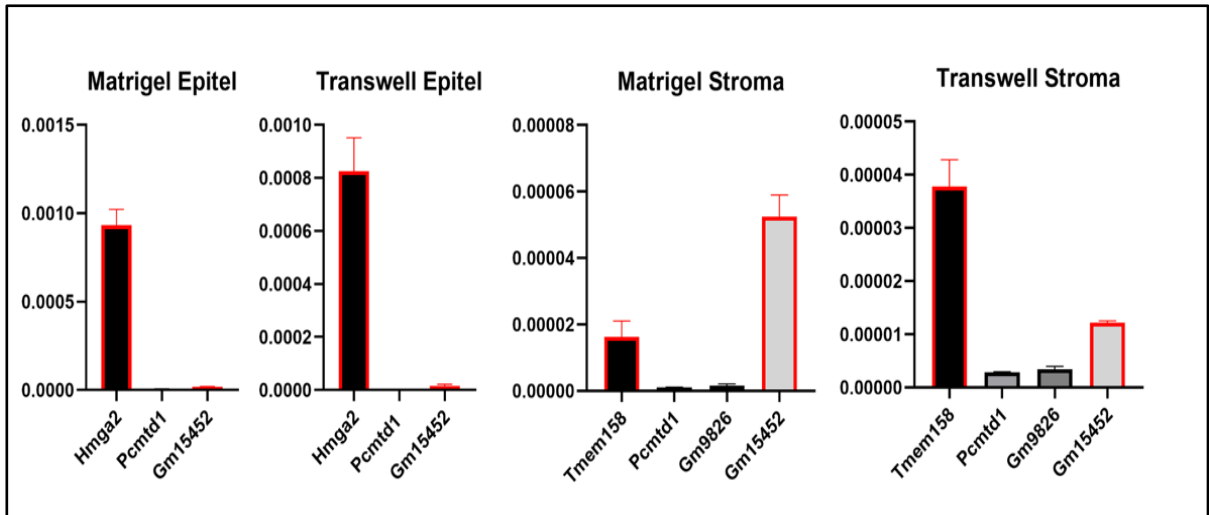
Şekil 64. Transkriptomun PCA plot analizi. Aynı gruptaki transkriptomun birbirinden uzak şekilde izlenmesi grup içindeki değişkenliği gösterir. Açıklama için metne bakınız.

4.9 Genlerin seçilmesi

4.9.1 Epitel ve stroma hücrelerinde genom düzenlemesi için genlerin seçilmesi ve doğrulanması

Stroma hücreleri için iki analizden elde edilen ve anlamlılık seviyesi en yüksek olan 5 aday gen seçilmiştir. Şekil 56’ da izlenebileceği gibi bu genler Tmem158, Pcmdt1, Gm9826, Uxs1 ve Gm15452’dir. Öncelikli olarak, her RNA dizi analizinden sonra yapılması gerektiği şekilde bu genlerin ilgili hücrelerde varlığının ispat edilmesi için qPCR yapılmış ve delta Ct değeri 35-36 olan genler **Tmem158** ve **Gm15452** olarak tespit edilmiştir. Diğer genlerin delta Ct değerleri bu değerden yüksek çıktığı için kullanılmadı.

Epitel hücreleri için bölüm 4’te de belirtildiği üzere transwell grubunda anlamlı gen bulunamamış, bu nedenle ortak grupta da gen elde edilememiştir. Bu nedenle matrijel grubunda en yüksek anlamlılık gösteren beş gen olan H19, Hmga2, Pcmdt1, Uxs1, Gm15452 genleri incelenmiştir. H19 kodlayan bir gen olmadığı için kullanılamamış, diğer genlerden qPCR sonucuna göre ifadesi yeterli olan **Hmga2** ve **Gm15452** sürdürülecek genler olarak tespit edilmiştir. Tüm genlerin qPCR sonuçları şekil 61’de görülebilir.



Şekil 65. Epitel ve stromada sürdürülmesi planlanan genlerin doğrulanması. Bu hücrelerde bu genlerin bulunduğu qPCR ile doğrulandı. Kırmızı işaretli çubuklar hücrelerde ifadesi olan genleri göstermektedir. Pcmdt1 epitel ve stroma hücrelerinde gen ifadesi göstermemiştir.

4.9.2 Blastokistte genom düzenlenmesi için genlerin seçilmesi ve doğrulanması

Literatürde fare blastokistinin tam transkriptom analizi için çok az sayıda yayın bulunmaktadır. Bu yayınlardan (Huang ve ark., 2022; Bai ve ark., 2022) taranması sonucunda GEO (GSE75764 ve GSE168272) data'ları çekilerek gen seçimi yapılmıştır. Okuma hesaplamalarına

(TPM No) göre 11 ila 1000 arasında veya 1000 üzerinde olan genler için önemli yüksek ifade söz konusudur. Buna göre >11 TPM ile ifade edilen genler seçilmiş olup 5 adet gen belirlenmiştir. Bu genler kodlama özelliği bulunan Gata3, Efs, Ngfrap, Rab27 ve Tmsb4x'tir. Aday genlerde yüksek ifade dışında hücre vitalitesini doğrudan etkileyebilecek (örneğin aktin üretimi, onkogen olması, vb..) özellikler dışarıda bırakıldığında ve ürettiğimiz blastokistlerdeki gen ifadelerinin en yüksek olan **Gata3 ve Tmsb4x** zigotta genom edisyonu için seçilmiş genlerdir.

Bu bölümler için kullanılan primer listesi tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan genlerin doğrulaması için kullanılmış primerlerin listesi.

Gen	Forward	Reverse
mHmga2	TCGCGGGTGGGCTGAGT	TCAGCCCAGGGACAACCT
mPcmd1	AAAGAAGCTCAGTACATCCGAAC	TTGTAAGCATTGTCTCGGTAGC
mUxs1	CCAGAAATACCCGCCTGTAAAG	CCAGAAATACCCGCCTGTAAAG
mGm15452	GATCCCGCTTACTCTTCTGC	CCAAGTCTCCTCCACTCCTC
mTmem158	AACATCAGCGTGCAACGACA	AGCCCCAGATGCTCGATGA
mGata3	CTCGGCCATTCTGACATGGAA	GGATACCTCTGCACCGTAGC
mTmsb4x	ATGTCTGACAAACCCGATATGGC	CCAGCTTGCTTCTCTTGTCA

4.9.3 Doğrulanmış genlerin gRNAlarının oluşturulması ve sekans kontrolü

4.9.3.1 Doğrulanmış genlerin gRNA'ları (kılavuz RNA'lar)

Bu genler için gRNA'lar knock-out için ilk ekzonlara yakın dizayn edilmiştir. Hedef genlerin oligo dizaynları için ChopChop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) ve IDTDNA (<https://www.idtdna.com/pages>) veritabanlarından yararlanılmıştır. Bu veritabanları üzerinden ChopChop'ta hedef genler taratılarak GC (guanin-sitozin) yüzdelerinin %40-60 olmasına, verimliliğinin yüzde 50'nin üzerinde olmasına dikkat edilerek en düşük kendini tamamlayıcı ve hedef dışı bağlanmaya sahip gRNA'lar seçilmiştir. Aynı zamanda karşılaştırmalı olarak, seçilen gRNA'lar IDTDNA veritabanından kontrol edilerek off-target oranları %100'e yakın olanlar seçilmiştir. Oligolar üst sekans olarak dizayn edilerek tamamlayıcı sekansları, o sekansın ters tamamlayıcı olarak ve her bir genden 3 ayrı oligo olarak dizayn edilmiştir. Ayrıca sgRNA'lar dizayn edilirken üst sekansın başına, plasmide ekleyeceğimiz ve Bsmbl kesim bölgesine ait olan 4 bazlık uzatma sekansları SnapGene programından kontrol edilerek eklenmiştir. Bu uzatma sekansları oligoların hedef bölgeye bağlanabilmesi için kullanılmıştır. Ayrıca dizayn edilen üst sekansın başına polimeraz aktivitesinin verimliliğini arttırmak için "G" bazı

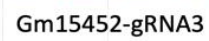
eklenmiştir. Aynı şekilde tamamlayıcı sekansın sonuna guanin bazı eşleniği olan “C” bazı eklenerek tasarlanmıştır. Seçilen gRNA’lar Tablo 4’deki gibidir.

Tablo 4. Doğrulanmış genler için hazırlanan gRNAlar. Sekans sonuçların göre (Şekil 66-69) en iyi çalışan gRNA CRISPR/Cas9 genom düzenleme deneyleri için kullanıldı (şekil 64).

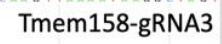
Gen adı	Sequence 5’-3’
gRNA1-Tmem158-F	CACC G CCGGTGTCGTCCCAATACAC
gRNA1-Tmem158-R	AAAC GTGTATTGGGACGACACCGG C
gRNA2-Tmem158-F	CACC G ACCACTGCTCATCGAGCATC
gRNA2-Tmem158-R	AAAC GATGCTCGATGAGCAGTGGT C
gRNA3-Tmem158-F	CACC G CAAGACCTGCGCCTGTGCGT
gRNA3-Tmem158-R	AAAC ACGCACAGGCGCAGGTCTTG C
gRNA1-Hmga2-F	CACC G ATCCCTACAAACCTTCTCAA
gRNA1-Hmga2-R	AAAC TTGAGAAGGTTTGTAGGGAT C
gRNA2-Hmga2-F	CACC G CATTTTCATGTTGGTCGTGTG
gRNA2-Hmga2-R	AAAC CACACGACCAACATGAAATG C
gRNA3-Hmga2-F	CACC G CAGCCGTCCACATCAGCCCA
gRNA3-Hmga2-R	AAAC TGGGCTGATGTGGACGGCTG C
gRNA1-Gm15452-F	CACC G TCGATGAGCACTACGAGTAC
gRNA1-Gm15452-R	AAAC GTACTCGTAGTGCTCATCGA C
gRNA2-Gm15452-F	CACC G CTTGGTGTCCAACAGAGTCT
gRNA2-Gm15452-R	AAAC AGACTCTGTTGGACACCAAG C
gRNA3-Gm15452-F	CACC G GTGTCCAACAGAGTCTAGGA
gRNA3-Gm15452-R	AAAC TCCTAGACTCTGTTGGACAC C
gRNA1-Gata3-F	CACC G CCTATAGGACGTACATTCTA
gRNA1-Gata3-R	AAAC TAGAATGTACGTCCTATAGG C
gRNA2-Gata3-F	CACC G TGGTTCGGAAGTGCCCTAT
gRNA2-Gata3-R	AAAC ATAGGGGCACTTCCGAACCA C
gRNA3-Gata3-F	CACC G ATTGGAGGCGAACTTGTGTA
gRNA3-Gata3-R	AAAC TCAACAAGTTCGCCTCCAAT C
gRNA1-Tmsb4x-F	CACC G TAATACGACTCACTATAGCG CCCCTCCCGACAATCCGCAG
gRNA1-Tmsb4x-R	AAAC CTGCGGATTGTCTGGGAGGGG CGCTATAGTGAGTCGTATTA C
gRNA2-Tmsb4x-F	CACC G TAATACGACTCACTATAGCG TTGCAGACGAATGTATGCAA
gRNA2-Tmsb4x-R	AAAC TTGCATACATTCGTCTGCAA CGCTATAGTGAGTCGTATTA C
gRNA3-Tmsb4x-F	CACC G TAATACGACTCACTATAGCGTGTATGCAAAGGCCGTCAAA
gRNA3-Tmsb4x-R	AAAC TTTGACGGCCTTTGCATACA CGCTATAGTGAGTCGTATTA C



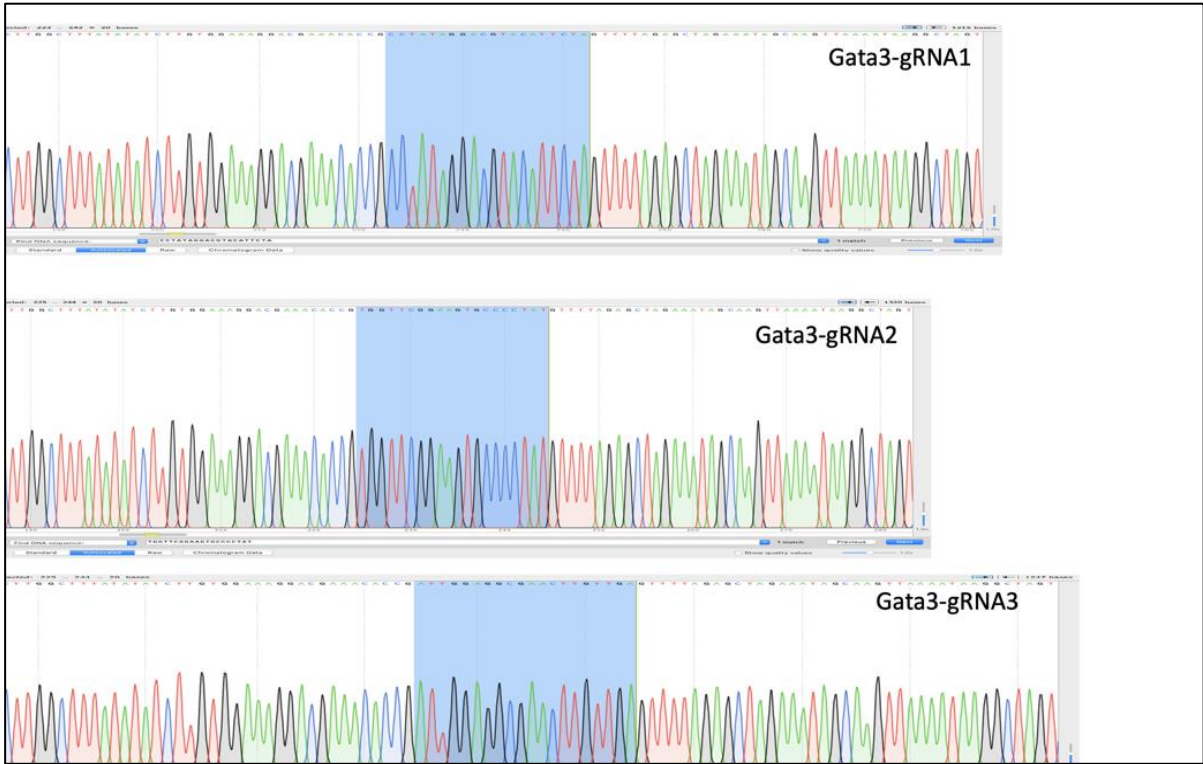
Şekil 66. Hmga2 için gRNA sekans sonuçları



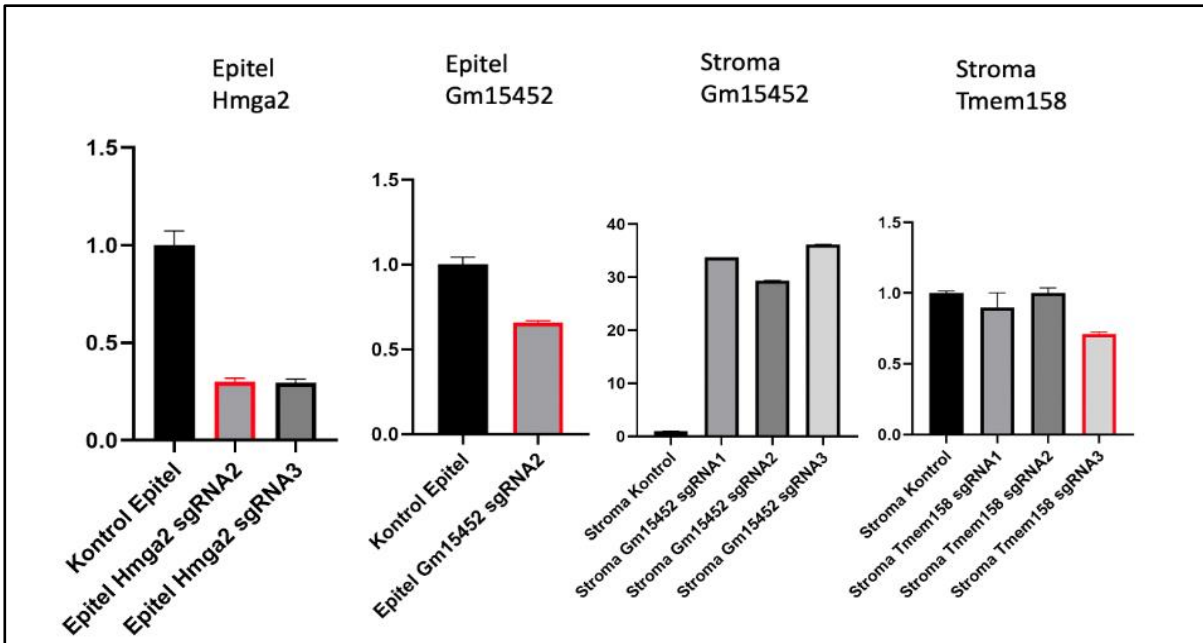
Şekil 67. Gm15452 için gRNA sekans sonuçları



Şekil 68. Tmem158 için gRNA sekans sonuçları



Şekil 69. Gata3 için gRNA sekans sonuçları



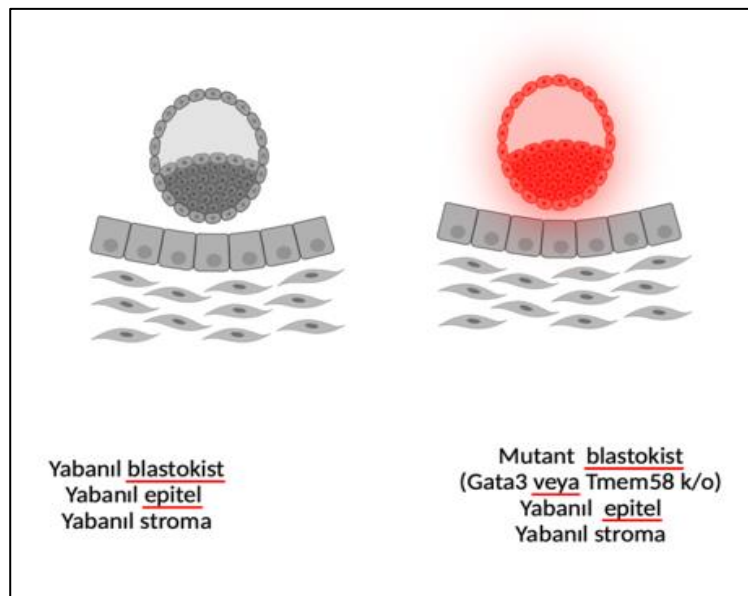
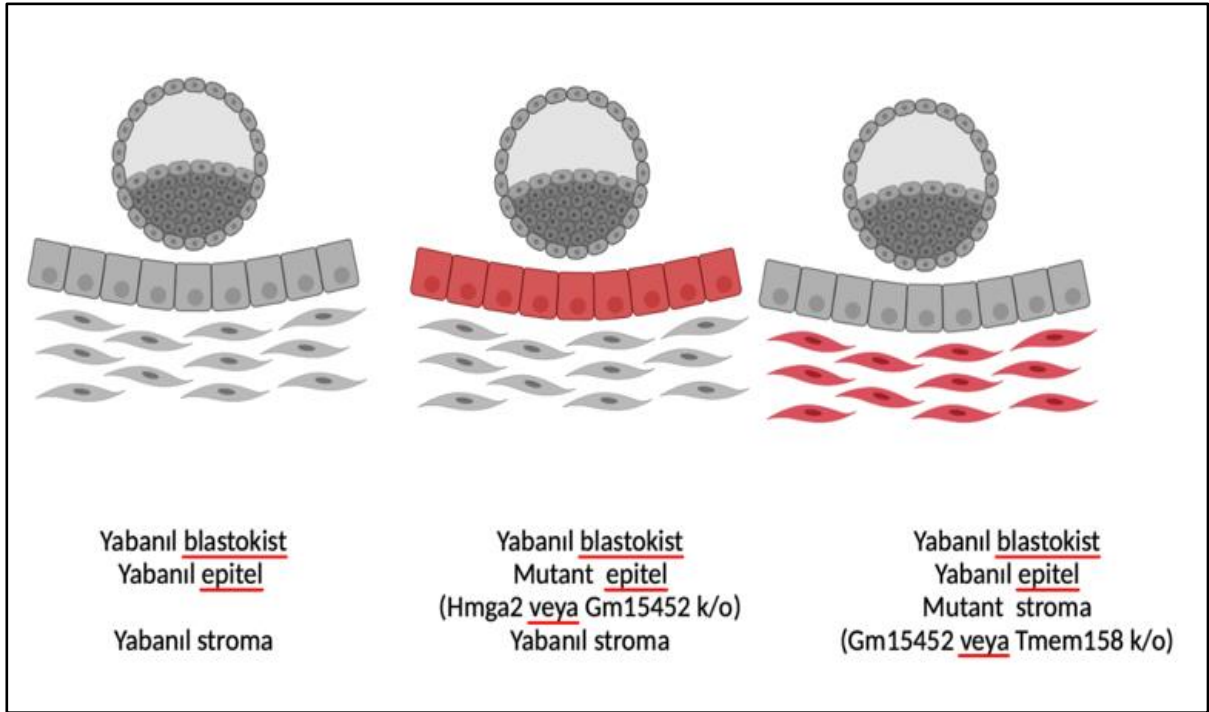
Şekil 70. Genlerin susturulması için kullanılması planlanan gRNA'ların qPCR sonuçları. Epitel hücrelerinde Hmga2 genini susturmak için %50'den fazla susturma yapabilen iki no'lu gRNA , Gm15452 genini susturmak için %50 kadar susturma yapabilen 2 no'lu gRNA'nın kullanıldı. Stroma hücrelerinde Gm15452 genini susturmak için dizayn edilen hiçbir gRNA, sekans analizi uygun çıkmasında karşın bu

susturmayı sağlayamadığı için stromada tek gen olarak Tmem 158, düşük verimle çalışmasına karşın, kullanıldı.

4.10 Deney grupları ve gruplarda implantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi

4.10.1 Deney grupları

Deney gruplar şekil 64'deki gibi oluşturuldu.



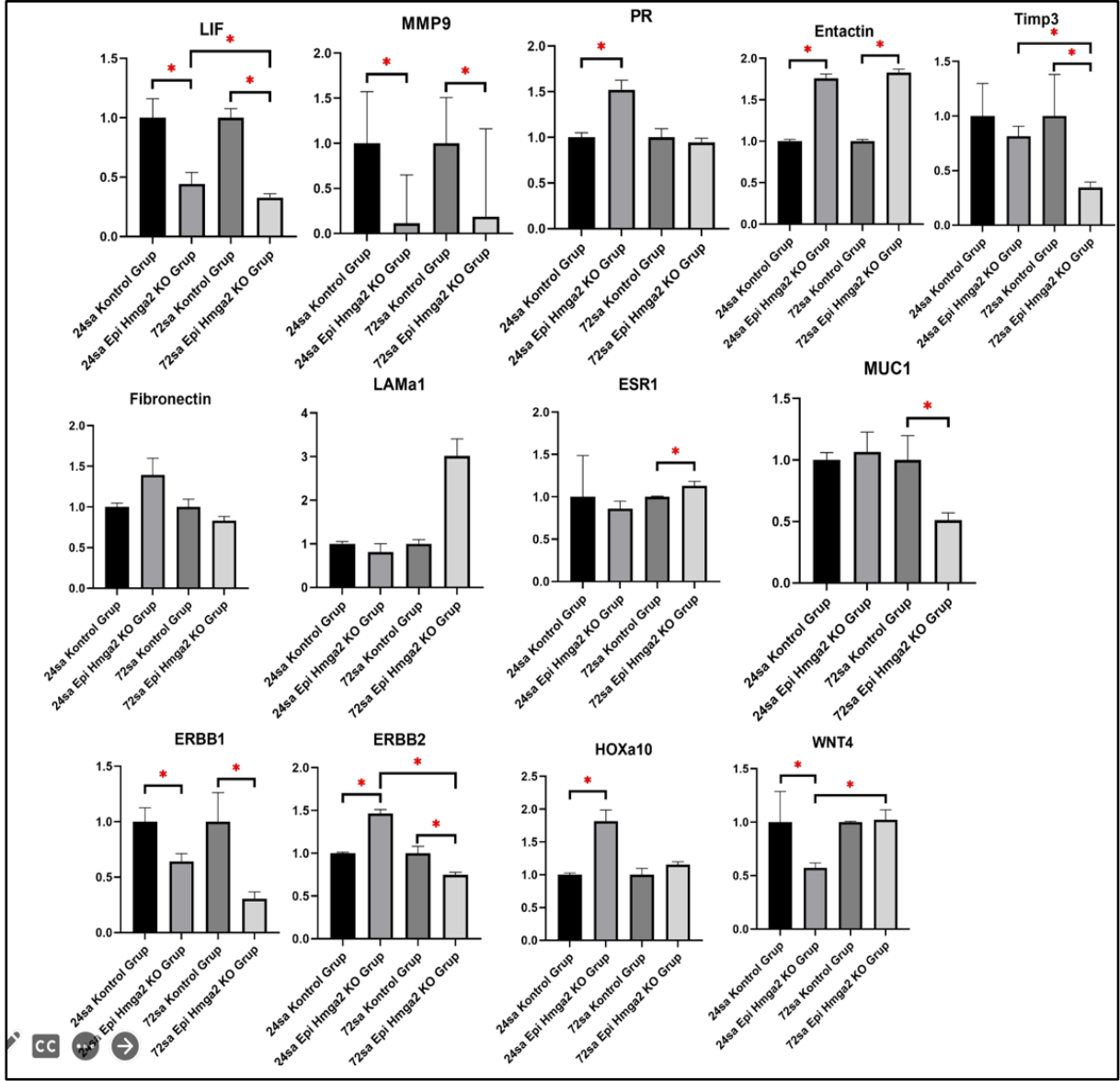
Şekil 71. Genom düzenlenen deney grupları ve kontrol grupları

4.10.2 İmplantasyon parametrelerinin değerlendirilmesi

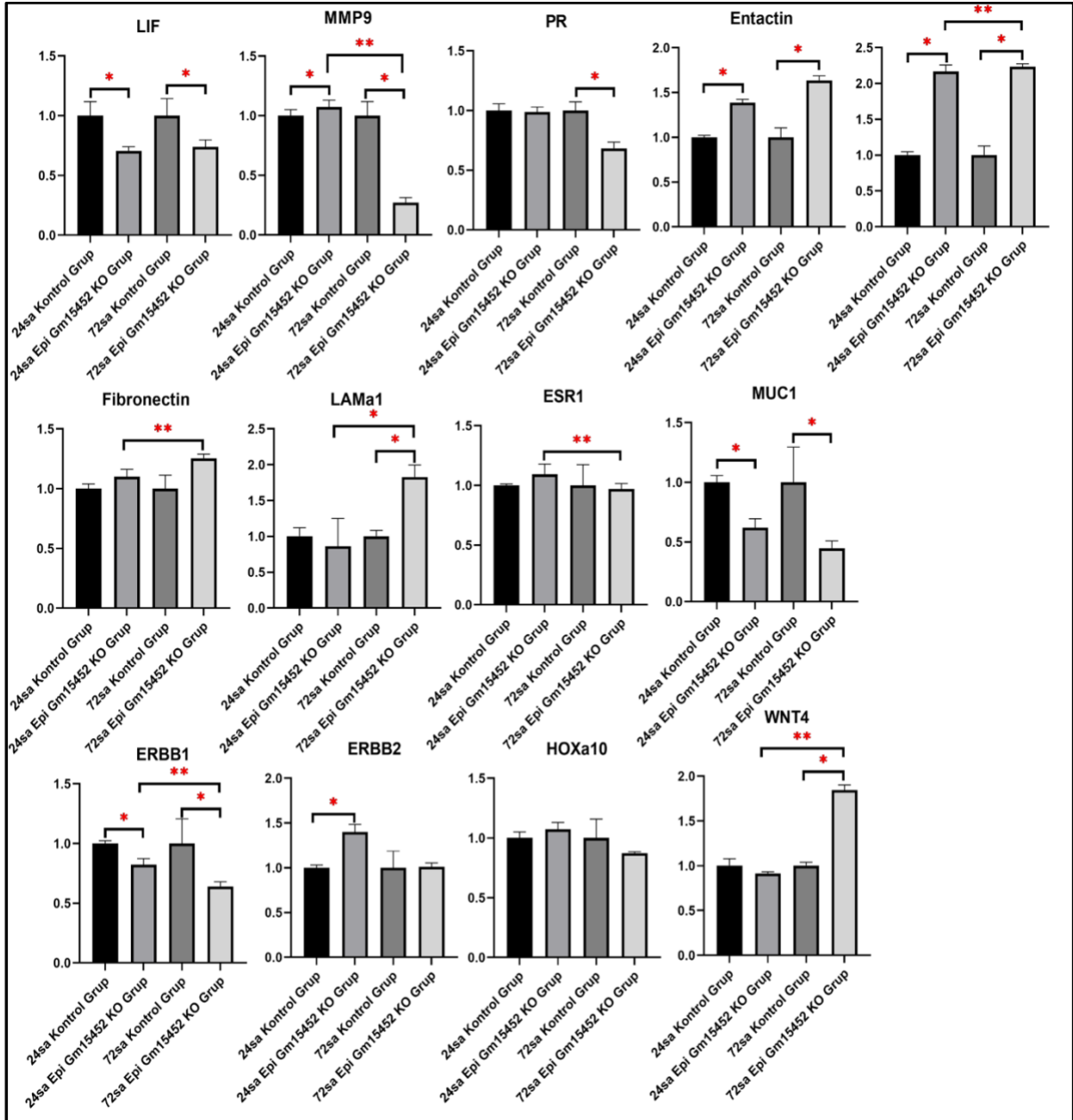
4.10.2.1 Gen ifade analizleri

Bölüm 4'te belirtilen genler için yapılan implantasyon parametreleri analizinde LIF, MMP9, PR, (progesteron reseptörü) Entactin, Timp3, Fibronektin, Laminina1, Esr1 (östrojen reseptörü), Muc1 (mucin), Erbb1, Erbb2, Hoxa10, Wnt4 genlerinin ifadesi incelendi. E-kaderin primerleri için bu analiz kullanılan primerlerden çelişkili sonuçlar alınması nedeniyle bu rapora yansıtılmadı. Bu genlerden adezyon için entaktin, fibronektin, laminin; invazyon için MMP9, Timp3; fonksiyonlar için PR, ESR, Muc1, Erbb1, Erbb2 ve gelişimsel olarak da Hoxa10 ve Wnt4 incelendi.

Epitel hücrelerinde Hmga2'nin susturulması ile LIF, MMP9, PR, entaktin, Timp3, ESR1, MUC1, ERBB1, ERBB2, Hoxa10 ve Wnt 4 genlerinin farklı zaman gruplarında anlamlı olarak değiştiği belirlendi ($p < 0.05$). Buna göre LIF 24 ve 72. Saatlerde kontrole göre daha düşük bir ifade gösterirken, 72. saatte Hmga2 susturulmuş gruplarda LIF ifadesi 24. saate göre azalmıştı. MMP9 24 ve 72. saatlerde kontrole göre daha düşük bir ifade gösterdi. PR, Erbb2 ve entaktin susturulmuş grupta 24. saatte, entaktin ve ESR 72. saatte yüksek kontrole göre daha yüksek bir ifade gösterdi. TIMP3 ve MUC1 72. saatte susturulmuş gruba göre düşük ifade gösterirken, TIMP3'te susturulmuş gruplarda 24'ten 72'ye anlamlı azalma görüldü. Gelişim genlerinden Hoxa10 24. saatte azalırken Wnt 4 artmıştı.



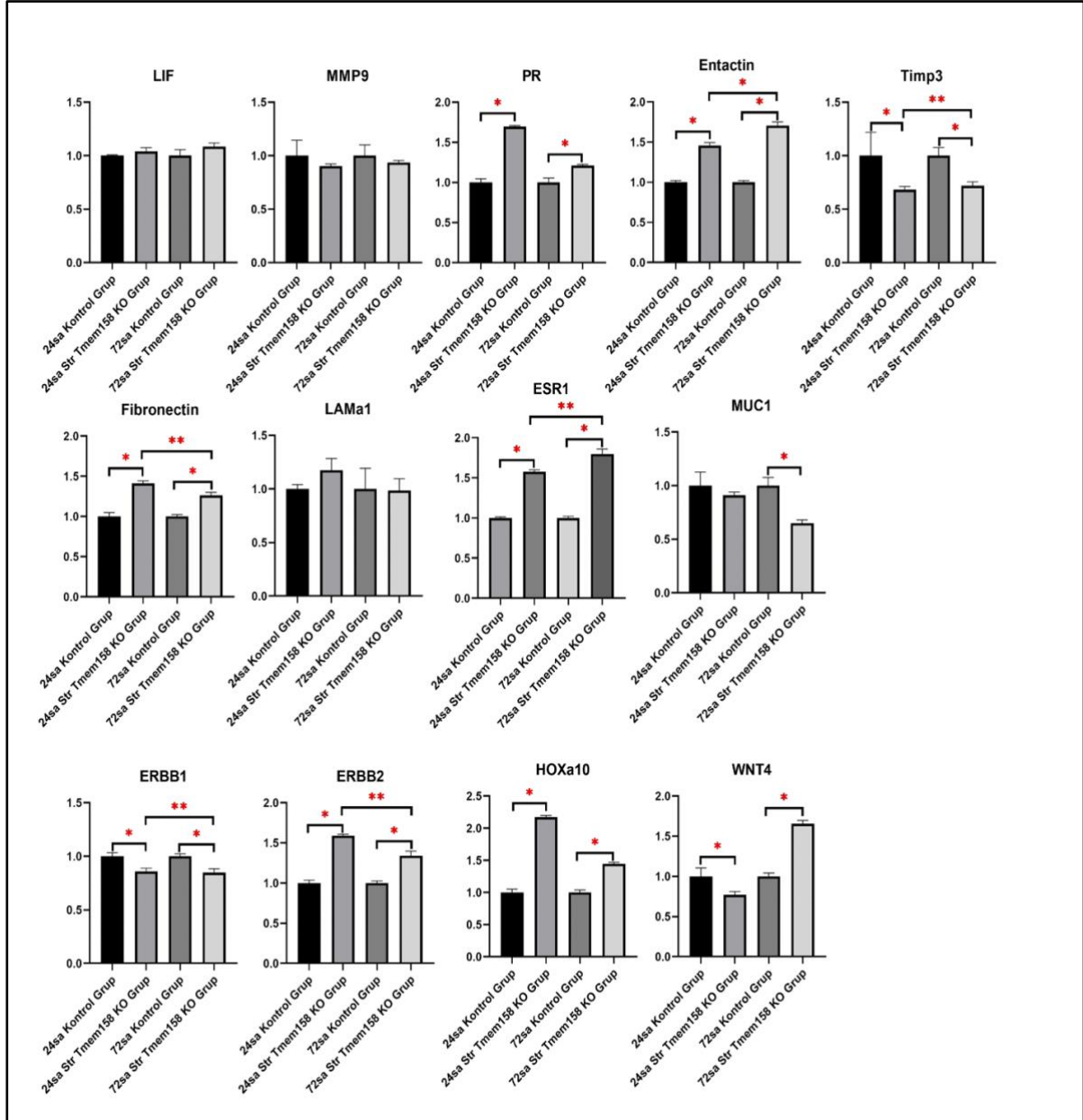
Şekil 72. Epitel hücrelerinde Hmg2'nin susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi. Birçok gen ifadesinde anlamlı farklılıklar izlendi (yıldız, $p < 0.05$ 'i gösterir).



Şekil 73. Epitel hücrelerinde Gm15452'nin susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi (tek yıldız, $p<0.05$ 'i; çift yıldız $p<0.01$ 'i gösterir).

Epitel hücrelerinde Gm15452'nin susturulması sonrasında LIF, MMP9, PR, entaktin, TIMP3, fibronektin, laminin, ESR, MUC1, ERBB1, ERB2, Wnt 4 ifadelerinde anlamlı değişiklikler izlendi ($p<0.05$ veya $p<0.01$). LIF ve MUC1 her iki saatte kontrole göre anlamlı olarak azalırken ($p<0.05$); susturulmuş grubun 72. saatinde MMP9 kontrole ($p<0.05$) ve 24. saatteki susturulmuş gruba göre ($p<0.01$) azalmış olarak izlendi. Entaktin, laminin ve fibronektin gibi yapışma molekülerinde susturulmuş gruplarda genel olarak artış belirlendi. MMP9 azalırken TIMP3'in susturulmuş gruplarda arttığı dikkat çekti. ESR1'de ve PR'de susturulmuş grupta 72.

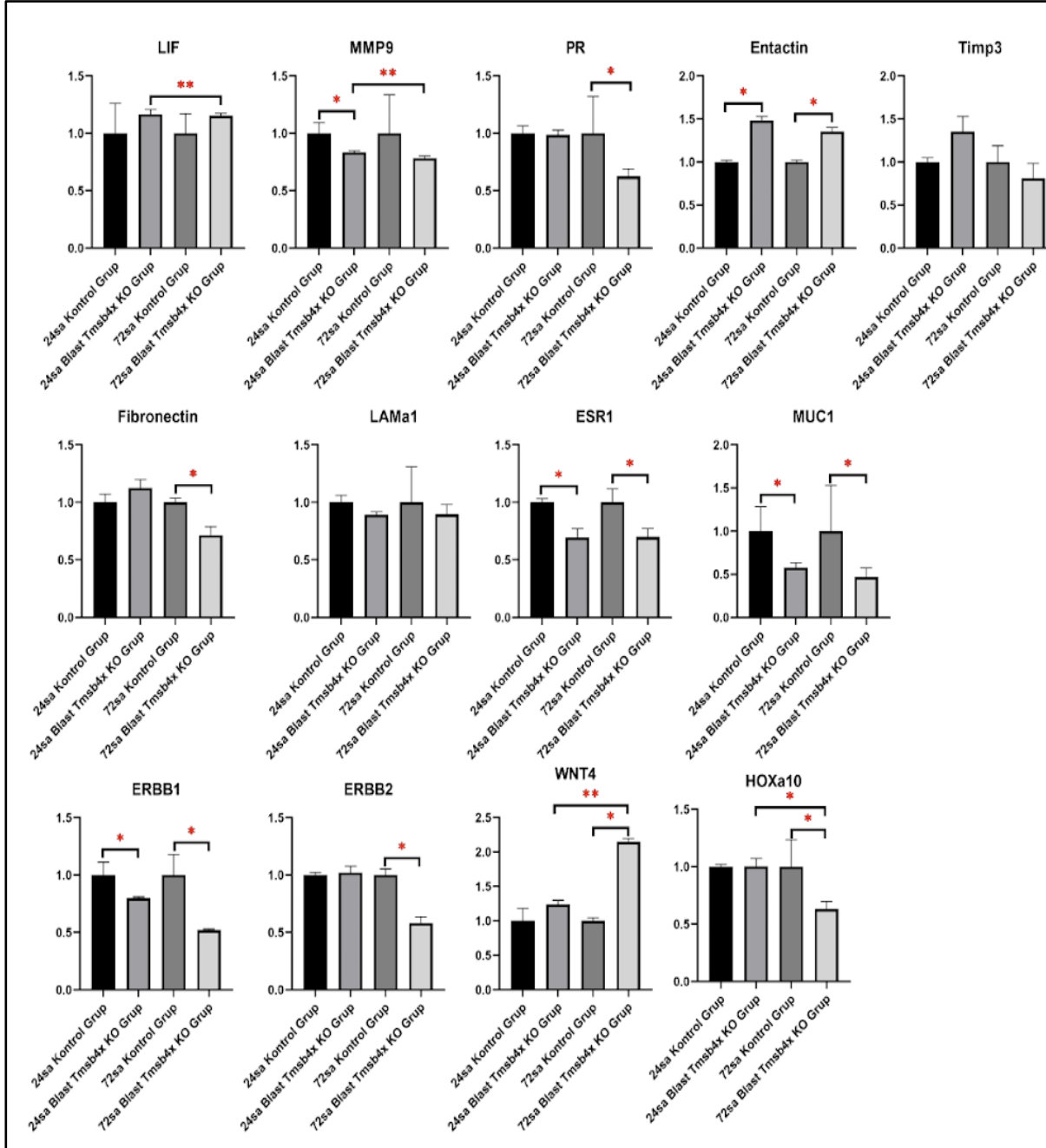
saat sonunda kontrole göre anlamlı azalma (sırasıyla $p<0.01$, $p<0.05$) izlendi. MUC1 ve ERBB1'de azalma ve Wnt4'te artma anlamlıydı (Şekil 73).



Şekil 74. Stroma hücrelerinde Tmem158'in susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi (tek yıldız, $p<0.05$ 'i; çift yıldız $p<0.01$ 'i gösterir).

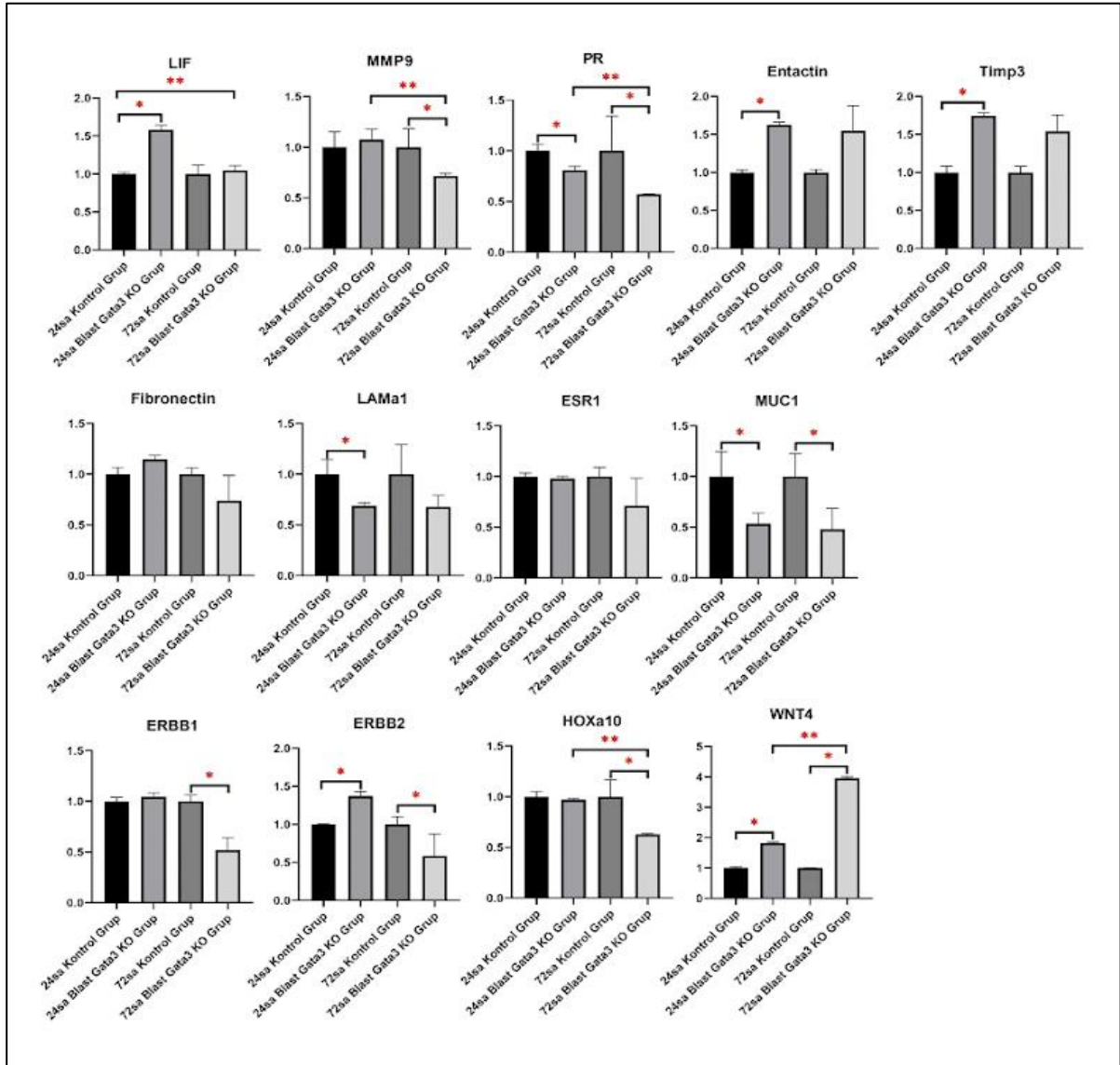
Stroma hücrelerinde Tmem158'in susturulması ile PR, entaktin, Timp3, Fibronektin, ESR1, MUC1, ERBB1, ERBB2, HOXA10, WNT4 ifadelerinin anlamlı olarak etkilendiği belirlendi ($p<0.05$ veya $p<0.01$). PR,ESR ve ERBB2'de kontrol grubuna göre artış gözlenirken, ESR1de susturulmuş gruplarda 72. saatte 24'e göre artış da izlendi. TIMP3 azalırken entaktin ve

fibronektinin arttığı belirlendi. Hoxa10da önce azalma sonra artma gözlenirken, Wnt4'ün 72. saatte kontrol grubunda yüksek olduğu belirlendi (Şekil 74).



Şekil 75. Blastokistte Tmsb4x'in susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi (tek yıldız, $p < 0.05$ 'i; çift yıldız $p < 0.01$ 'i gösterir).

Blastokistlerde Tmsb4x'in susturulması LIF, MMP9, PR, entaktin, Timp3, fibronektin, Esr1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Wnt4 ve Hox a10'u anlamlı şekilde etkilemiştir. Özellikle gelişimsel genler Wnt4 artarken, Hoxa10 azalmıştır. MMP9, ESR ve PR'deki düşüş dikkat çekicidir.

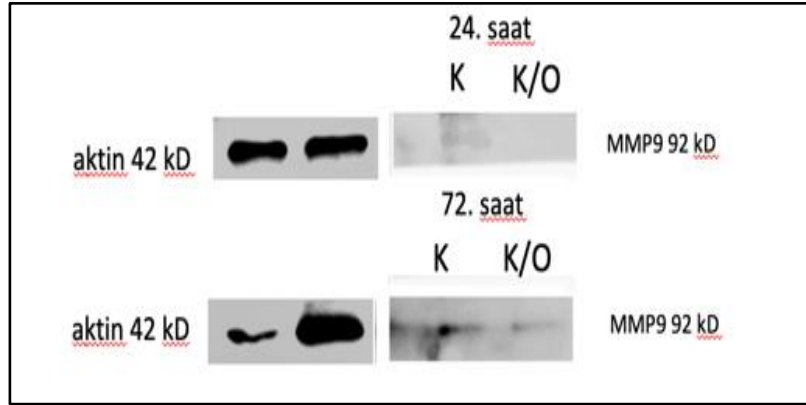


Şekil 76. Blastokistte GATA3'ün susturulması sonrası implantasyonla ilgili diğer genlerin ifadesi(tek yıldız, $p < 0.05$ 'i; çift yıldız $p < 0.01$ 'i gösterir).

Blastokistte GATA3'ün susturulması sonrası LIF, MMP9, PR, entaktin, Timp3, Lama1, Muc1, Erbb1, Erbb2, Hoxa10, Wnt4'ü anlamlı şekilde etkilemiştir. Tmsb4x'in susturulmasına benzer şekilde Wnt4 artarken, Hoxa10'un azalması dikkat çekicidir. PR, LIF ve MMP9daki değişikliklerde $p < 0.01$ olarak belirtilmiştir.

4.10.3 Western blotlama analizleri

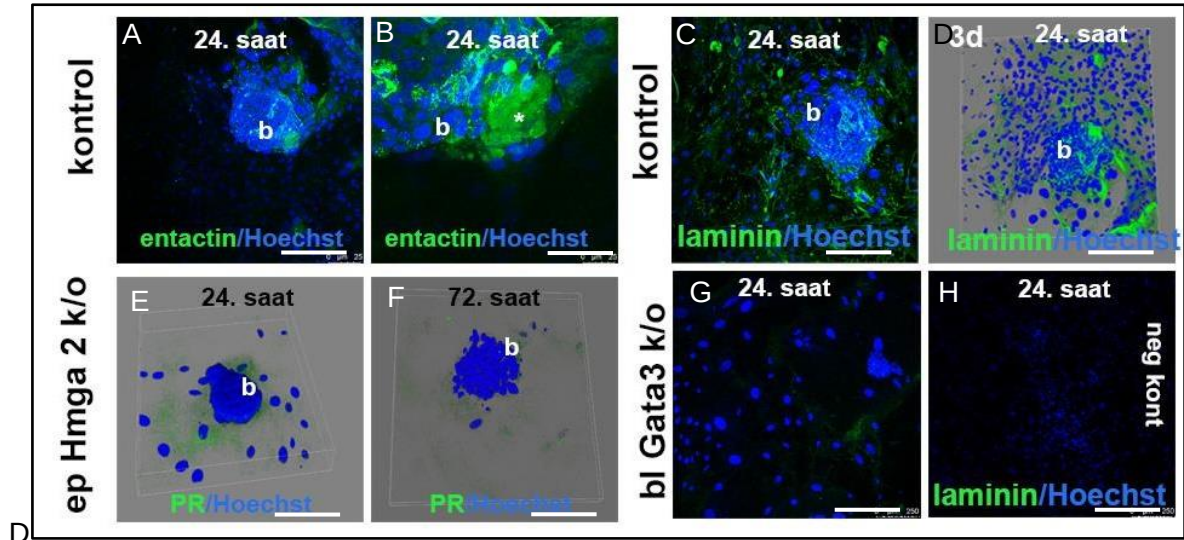
LIF, entaktin, MMP9 için Western blotlama yapılmış ancak elde edilen protein miktarının azlığı nedeniyle sonuçlar tanımlayıcı olmamıştır. Bununla birlikte MMP2 Hmga2 genin susturulduğu epitel hücrelerinde 72. saatte hafif bir artış izlenmiştir (Şekil 77.)



Şekil 77. MMP9'un Hmga2 genin susturulduğu epitel hücrelerinde protein ifadesi

4.10.4 İmmüno Floresan boyama analizleri

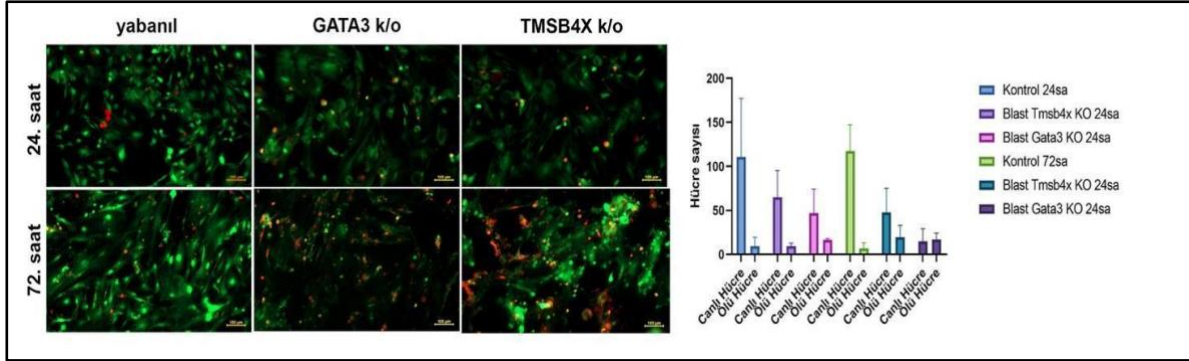
Immunofluoresan boyamalardan qPCR sonuçlarını destekleyenler ve boyama sonuçları anlamlı olanlar Şekil 78'de gösterilmektedir.



Şekil 78. İmmüno Floresan boyamaların sonuçları. Kontrol gruplarında entaktin ve laminin 24.saatte belirgin olarak izlendi. Laminin Gata3 susturulmuş grupta 24.saatte kontrole göre düşük olduğu gözlemlendi. Kontrol grubunda entaktinin iç hücre kütlelerinde yaygın boyandığı (yıldız) izlendi. PR HMga2 geninin susturulduğu epitel hücrelerimizde 72. Saatte 24.saate göre azalmış olarak izlendi. b: blastokist. Görüntülemeler konfokal mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Ölçü çizgileri: A,D=100 μ m, B;C =25 μ m, E,F=150 μ m, G,H=250 μ m.

4.10.5 Canlı/Ölü hücre analizleri

Blastokistte genlerin susturulduğu gruplarda hücrelerin canlılığı kontrol edildi. 24. Saatte gruplar arasında belirgin fark yokken, 72. saatte Gata3'ün susturulduğu grupta daha belirgin olmak üzere genlerin susturulduğu grupta ölü hücrelerde belirgin artış izlendi (Şekil 78) Bu analiz belirtilen gruplar için tek örnekte ancak her örnekten 5 alan sayılarak yapıldı.



Şekil 79. Canlı ve ölü hücre analizleri. 24 ve 72 saatlik örneklerde GATA3 ve TMSB4X susturulmuş gruplara göre yabancı grupta canlı (yeşil) hücre sayısının daha fazla olduğu, ölü (kırmızı) hücrelerin daha az olduğu gözlenmektedir. Bu durum GATA3 veya TMSB4X genlerinin hücrelerde susturulmasının hücrede canlılığı olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. Hücre sayımlarında GATA3 geninin susturulmuş grupta hücre ölümlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Floresan ataçmanlı faz kontrast mikroskobu. Ölçü çizgileri=100 µm.

5. TARTIŞMA

Tümör baskılayıcı p53 geni (p53), 17. kromozom üzerinde yer alır ve bir hücre içinde DNA hasarı meydana geldiğinde, p53 proteini indüklenir ve hücre döngüsünün durmasına neden olur. Bu, hücrelere onarım şansı verir, ancak hasar çok şiddetliyse hücreler apoptoz geçirir (Berke vd., 2022). p53 yollarındaki tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler), in vitro fertilizasyon (IVF) geçiren infertil kadınlarda endometrial reseptivite ve implantasyonda rol oynadığı gösterilmiştir. TP53'ün rolü, embriyo implantasyonunda da öne çıkmaktadır. Bu nedenle, p53'ün koruyucu bir rolünün, embriyo-maternal arayüzde hücrelerin genomik stabilitesini korumakla ilgili olabileceği öne sürülmüştür (Palomares vd., 2021). Cohen vd., 2008'e göre p53, farklı hücrelerde MMP'lerin güçlü bir transkripsiyon düzenleyicisidir, MMP'ler, hücre dışı matrisin (ECM) birkaç proteinini parçalama yeteneğine sahiptir ve önemli matris iskele makromoleküllerini bozarak ECM'nin yeniden modellenmesine aktif olarak katılırlar. Doku inhibitörleri (TIMP'ler) ile normal erken gebelik ve plasenta gelişimini sürdürmek için bir denge oluştururlar. (Nissi vd., 2013) Biz de çalışmamızda mutant epitel ve stroma hücreleri ile kullanılan kültürlerde p53 geninin diğer implantasyon genlerine olan etkisi kapsamında, p53 geninin nakavt edilmesiyle diğer genlerin ifadesinde belirgin ölçüde azalma görürken MMP9'un etkisinde belirgin artış gözlemlendi. Literatür bilgisiyle karşılaştırıldığında, p53'ün blastokistin invazyonunda önemli bir rolü olduğuna dair bulgumuz tutarlıdır. Progesteron ve östrojen, implantasyon penceresinin düzenlenmesinden sorumlu steroid hormonlardır. Progesteron, alıcı bir endometriyumun oluşmasına yol açan sinyal yollarında değişikliklere neden olur. Östrojen reseptörleri (ER) α ve β ve progesteron reseptörleri (PR)-A ve -B, insan endometriyumunun epitelinde ve stromasında ifade edilir. İmplantasyon sırasında ER ve PR sinyali, sitokinlerin yanı sıra büyüme faktörlerinin aracılık ettiği parakrin ve otokrin faktörler aracılığıyla gerçekleştirilir (Klonos vd., 2020). Çalışmamız kapsamında p53 geninin susturulmasıyla, implantasyon bölgesinde östrojen ve progesterona yanıtta önemli rol oynayan östrojen ve progesteron reseptörü genlerinin ifadeleri analiz edilmiştir. Gen ifadelerinde mutant gruplarda, kontrol grubuna göre belirgin azalma görülmektedir.

Blastokistlerde fibronektin, hücre dışı matriks proteinlerine bağlanarak çeşitli hücre tiplerinin adezyonunda önemli bir rol oynar (Yoshihara vd., 2021). Öte yandan, entaktin olarak da bilinen Nidogen, bir bazal membran glikoproteindir (Bayramoglu vd., 2022). Bazal lamina elemanı olan ve endometriyumda özellikle bez yapılarının çevresini saran bir protein olan entaktinin gen ifadesinin çalışmamızın mutant epitel grubunda beklenildiği üzere belirgin ölçüde azaldığı görülmüştür fakat mutant stroma grubunda ise artış görülmüştür bu artışın tekrarlı deneylerle değerlendirilmesi gerekirken, bu gen göz önüne alındığında kontrol ve mutant grupları

arasındaki farkın anlamlı olmayabileceği düşünülmektedir. p53 fonksiyonunun kaybının, hücre döngüsü kontrol noktası kontrollerini ve apoptozu etkilediği iyi bilinmektedir. Ancak artık p53'ün, hücre göçü ve istilası gibi metastatik ilerlemenin diğer önemli aşamalarını da düzenlediği açıktır. Ayrıca, son veriler, mutant p53'ün ifadesinin, p53 kaybının eşdeğeri olmadığını ve mutant p53'lerin, kısmen p63 işlevine müdahale ederek hücre göçünü, istilasını ve metastazını yönlendirmek için yeni işlevler kazanabileceğini göstermektedir (Muller vd., 2011). Yukarıda açıklandığı üzere, P53'ün nakavt olduğu durumlarda invazyonu artırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir, çalışmamızda da entaktinin gen ifadesinin azalmasıyla bazal membranın yıkımı gerçekleştiği düşünülebilir. Fibronektinin ise gen ifadesi mutant gruplarda belirgin ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir.

İmplantasyon için kritik bir sitokin olan lösemi inhibe edici faktörü (LIF) kodlayan gen, bu etkinin akış aşağı aracısı olarak işlev gören p53 tarafından düzenlenen bir gen olarak tanımlandı. p53 işlevinin kaybı, uterusdaki LIF'in hem seviyesini hem de işlevini azalttığı belirtilmiştir (Hu vd., 2007). Biz de çalışmamız kapsamında literatür bilgileriyle örtüşecek biçimde, p53'ün susturulmasıyla LIF geninde önemli bir miktarda azalma gözlemledik. Öte yandan, E-kaderin, epitel hücreleri arasındaki adezyondan sorumlu olan bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. E-kaderin, bazı insan trofoblast popülasyonlarında tanımlanmıştır ve sitotrofoblastlar arasındaki homofilik etkileşimlere aracılık ettiğine inanılmaktadır. Farelerde, E-kaderinin peri-implantasyon embriyosunda ve uterus epitel hücrelerinde ve ayrıca implantasyonun bağlanma aşaması sırasında trofektoderm ve uterus epiteli arasındaki odak temaslarında eksprese edildiği belirtilmiştir (Jha vd., 2006). Chang vd., 2011'e göre, p53'ün inhibisyonunun, DNMT1 ekspresyonunu ve müteakip SBOT hücrelerinde E-kaderin promotör metilasyonunu artırarak E-kaderin ifadesini aşağı yönde düzenlediğini gösterir. Çalışmamız sonucunda literatür bilgileriyle örtüşecek şekilde E-kaderin geni aktivitesinin p53'ün susturulmasından etkilendiği görülmektedir.

Son yıllardaki yayınlarda, memeli implantasyonu ve karar vermede Wnt sinyal yolunun öneminin ortaya koyulmuştur. 2006 yılında Cancer Research dergisinde yayınlanan bir çalışmada, p53 nakavtının, bir fare akciğer kanseri modelinde Wnt yolu genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırılmıştır, bu çalışma, p53 inaktivasyonunun, Wnt3, Wnt5a ve β -katenin dahil olmak üzere birkaç Wnt yolu geninin yukarı regülasyonuna yol açtığını bulunmuştur (Xiao Q., vd., 2022). Bu bilgiler ışığında, bizim çalışmamızda ise p53 geninin susturulması ile kontrol ve mutant grupları arasında Wnt geni ifadesi açısından fark olmadığı sonucuna varılmıştır.

Hoxa10 geni, hayvanlarda vücut planının gelişmesinde önemli rol oynayan Hox gen ailesinin bir üyesidir, dişi üreme sisteminin gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Hoxa10 nakavt farelerin uterustaki P53 geninin ekspresyonunu değiştirdiğini ve bunun da bu farelerde üreme bozukluklarına katkıda bulunabileceğini bulunmuştur (Zheng ve diğerleri, 2018). Bizim analiz sonuçlarımıza göre ise p53 geninin susturulması ile, Hoxa10 geninin ifadesinde kontrol grubuna göre azalma görülmüştür. P53'ün nakavt edilmesiyle HOXA10 geninin ifadesinin değişmesine dair bulgumuz literatür bilgileriyle örtüşmektedir.

LIF (lösemi inhibitör faktörü), erken embriyonik gelişim ve implantasyonda çok önemli bir rol oynayan bir sitokindir. Çalışmalar, LIF nakavtının farelerde doğurganlığın azalmasına ve implantasyon başarısızlığına yol açmadığını göstermiştir. Yayınlanan bir araştırma, farelerde LIF nakavt ve MMP-9 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi araştırdı. Çalışma, LIF nakavtının endometriumda azalmamış MMP-9 ifadesi ile sonuçlandığını fakat sonucun LIF nakavt farelerde gözlemlenen implantasyon başarısızlığına sebep olmadığını tespit etti (Pizarro vd, 2008). Araştırmacılar, LIF'in JAK/STAT3 sinyal yolağı yoluyla MMP-9 ekspresyonunu düzenleyebileceğini önermektedir. Çalışmada, LIF'in insan endometriyal stromal hücrelerinde MMP-9 salınımı üzerindeki etkisini incelemiştir (Poehlmann vd, 2005). Çalışma, LIF'in MMP-9 ekspresyonunu doza bağlı bir şekilde yukarı yönde düzenlediğini bulmuştur, bu da LIF'in erken gebelik sırasında MMP-9 ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bizim qPCR çalışmaları sonucunda elde ettiğimiz bulgularımıza göre ise, LIF geninin susturulduğu gruplarda beklenen şekilde LIF ekspresyonun azaldığı gözlemlenirken bu azalma aynı orda ER ve PR'de görülmedi fakat 2012 yılında Moleküler ve Hücrel Endokrinoloji dergisinde yayınlanan bir araştırma (Robertshaw vd., 2016), LIF'in farelerde östrojen reseptörü (ER) gen ekspresyonunu düzenlemedeki rolünü araştırdı. Çalışma, LIF nakavtının hamile farelerin uteruslarında azalmış ER ekspresyonu ile sonuçlandığını ve bunun uterusta azalmış östrojen yanıtı ile ilişkili olduğunu bulmuştur. Araştırmacılar, LIF'in JAK/STAT3 sinyal yolu aracılığıyla ER ifadesini düzenleyebileceğini önermektedir. Öte yandan, çalışmamızda LIF'in susturulduğu gruplarda MMP9 ifadesinde az da olsa bir artma gözlemlenmiştir fakat bu artışın kısıtlı deney grubunda anlamlılık göstermediği görülmüştür. Yukarıda anlatıldığı üzere, LIF geninin susturulması sonucunda MMP9, ER ve PR genlerinin ifadesinin ne şekilde etkilendiğinde dair farklı değerlendirmeler bulunmaktadır fakat genel olarak, literatür bilgileri ve bizim bulgularımız, LIF'in MMP-9, ER ve PR ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini ve başarılı implantasyon ve gebeliğe katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Hmga2 geni, kromatinle ilişkili proteinlerin yüksek hareketlilik grubu (HMG) ailesine ait olup, Hmga2 adlı bir proteini kodlar. Farelerdeki Hmga2 geni, 16. Kromozom üzerinde, 16A3 konumunda bulunur. Gen, yaklaşık 8,8 kilobazlık bir bölgeyi kapsar ve insan Hmga2 geninin yapısına benzeyen beş ekzon içerir. Çalışmalar, Hmga2'nin embriyonik gelişim sırasında kök hücre pluripotensi, hücre kaderi tayini ve proliferasyon dahil olmak üzere çeşitli biyolojik süreçlerde kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Ek olarak, Hmga2, tümör oluşumu, proliferasyon ve metastaz dahil olmak üzere kanser gelişiminin ve ilerlemesinin çeşitli yönlerinde de rol oynamıştır. Hmga2, trofoblast proliferasyonu ve istilasında önemli roller oynar ve plasantasyon ve fetal gelişim için kritik olduğu düşünülmektedir (Matsubara vd., 2021). Ayrıca başka bir çalışmaya göre, plasenta dokusunda HMGA2 haberci RNA ekspresyonu erken gebelikte belirgin şekilde yükselir (Burchardt vd., 2020). Bu nedenle, Hmga2'nin erken gebelikte plasenta ve embriyo gelişiminde önemli roller oynadığı düşünülmektedir.

Entaktin, fibronektin ve laminin esansiyel birer bazal membran proteini olup hücre-ekstraselüler matriks etkileşimi için önemlidir (Yi vd., 1998). Önceden yapılmış kaynak taramalarında Hmga2 geni ile bazal membran elemanları arasında yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada ise Hmga2 geninin susturulması implantasyon başlangıcında ve devamında entaktin salınımını artırdığı tespit edilmiştir.

Literatürde daha önce ERBB1 ve ERBB2 genlerinin Hmga2 geni ile korelasyonuna bakılmamıştır. Ancak çalışma sonucunda hem 24 saat hem de 72 saat gruplarında anlamlı değişimler olduğu saptanmıştır. Bu da bu genlerin Hmga2 geni ile ilişkisine yönelik ileri çalışmaların yapılması gerekliliğini belirtmektedir.

24 saatte fare epitelinde hmga2 geninin devre dışı bırakılmasından sonra ESR1 gen seviyelerinde başlangıçta önemli bir değişiklik olmaması, ardından hafif bir düşüş ve ardından 72 saatte önemli bir artış birkaç nedene bağlı olabilir. Bir olasılık, ESR1'in hmga2 tarafından düzenlenmesinin karmaşık olması ve hmga2 kaybını telafi eden ve gecikmiş bir yanıtla sonuçlanan birçok başka faktörü veya yolu içermesidir. Başka bir olasılık, ESR1 gen ekspresyonunun hmga2'nin knock-out'ına verdiği yanıtın hücre tipi veya dokuya özgü olması ve mikroçevre veya sinyal faktörlerinden etkilenebilmesidir. Ek olarak, nakavt deneyinin zamanlaması da ESR1 gen ifadesinde gözlenen değişiklikleri etkilemiş olabilir. Fare epitelinde hmga2 ve ESR1 gen ekspresyonu arasındaki ilişkinin altında yatan kesin mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulabilir.

Sun ve diğerlerinin (2013) yaptığı bir çalışmaya göre, Hmga2 gen ifadesinin azalması Tet1 gen ifadesinin artmasına sebep olduğu ve bu artışın HOX gen ailesi üyeleri üzerinde artırıcı etkiye sahip olduğunu ispatlamışlardır. Bu çalışmanın sonuçları epitel grubunda Hmga2 nakavtından ötürü 24 saat sonraki grupta anlamlı bir artmış olması ile uyumlu bir sonuç vermektedir. 72 saat grubunda HOXa10 gen ifade seviyelerinin azalması, ancak yine de kontrol grubundan yüksek ifadeye sahip olması Hmga-HOX sinyal yolağının telafi edici bir mekanizmaya sahip olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde bu durumu açıklayıcı bir çalışma olmadığı için, Hmga2 ve HOXa10 gen ifadesi arasındaki kesin ilişkiyi belirlemek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

LIF (Lösemi inhibe edici faktör) geninin implantasyon sürecine dahil olduğu bilinmektedir ve farelerde başarılı implantasyon için kritik öneme sahiptir (Salleh vd., 2014). Çalışmamız sonucunda hem 24 saat grubunda hem de 72 saat grubunda anlamlı bir düşüş olması literatür çalışmalarını destekler niteliktedir. Ayrıca 24 saat ve 72 saat grupları da kendi içlerinde anlamlı bir düşüş göstermişlerdir. Bu da Hmga2 nakavtının, zamana bağlı olarak da LIF gen ifadelerini düşürdüğüne dair bir anlam ifade etmektedir.

Matriks metallopeptidaz 9 geninin Hmga2 geni tarafından aktive edildiği bilinmektedir (Matsubara vd., 2021). Hmga2 nakavt gruplarında hem 24 saat hem de 72 saat gruplarında anlamlı şekilde düştüğü saptanmıştır.

Alam ve diğerlerinin (2015) küçük hücreli olmayan-akciğer-kanseri hücrelerinde yaptığı bir çalışmaya göre, Muc1 genin LIN28B→LET-7 yolağı üzerinden Hmga2 gen ifadesini arttırdığı saptanmıştır. Hem 24 saat hem de 72 saat gruplarında Muc1 geninin anlamlı şekilde azalması çalışmanın sonucunu destekler niteliktedir.

Timp3 geni bir implantasyon belirtecidir (Shi vd., 2017). Çalışmada Hmga2 geninin nakavt edildiği durumda Timp3 gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Özellikle 72 saat grubunda anlamlı bir düşüş saptanmıştır. Bu durumda tekrarlı gebelik kaybı yaşayan hastalarda Hmga2 genindeki bir mutasyon da sebep oluyor olabilir.

Zong ve diğerleri tarafından (2012) yapılan bir çalışmada Hmga2 ifadesinin artmasından kaynaklı H3K9/K14 asetilasyonunda aracılı olarak stromada Wnt ligandlarının ifadesinin artmasına katkıda bulunduğu saptanmıştır. 24 saat grubundaki anlamlı düşüş, çalışmanın sonucu ile örtüşmekle birlikte, 72 saat grubunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ve Wnt gen ifadelerinin artışında telafi edici başka sinyal yolları olabileceğini düşündürmektedir.

Gm15452 geni ya da “öngörülen gen 15452”, farede 1. kromozom üzerinde bulunan bir psödogendir (Ncbi Gene ID: 100039474). Yapılan RNA dizileme sonucunda bu genin yüksek seviyede ifade edildiği gözlemlenmiş olup, protein kodlayan bir gen olabileceği öngörülmüştür. Literatürde halihazırda bu gene yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak bu genin nakavtı sonucu 11 gende anlamlı değişimler saptanmıştır. Bu da Gm15452 geninin psödogen olmasından ziyade, protein kodlayan bir gen olduğuna dair düşüncelerimizi güçlendirmektedir.

Tmem158 geni, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer alan, zayıf karakterize edilmiş bir gendir. Tmem158'in farelerdeki spesifik rolü hakkında sınırlı bilgi olsa da, son zamanlarda yapılan bir çalışma, onun Wnt sinyal yolu ve wnt4 geni ile olan potansiyel bağlantısına biraz ışık tutmuştur.

Yayınlanan bir çalışmada araştırmacılar, bir tmem158 genide aşağı yönde ekspresyon oluşturmak için bir RNA interferans sistemi kullandılar. Çalışma, tmem158 aşağı yönde ekspresyon görülen over kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etti ve indüklenmiş G1 fazı hücre döngüsü durmasını sağladı. Tmem158 nakavt farelerin, Wnt4 dahil olmak üzere Wnt sinyal yolunda yer alan birkaç genin değiştirilmiş ekspresyonunu sergilediğini de buldu. Spesifik olarak, araştırmacılar tmem158 nakavt farelerin kanserli over hücrelerinde wnt4 ifadesinde bir artış gözlemlediler, bu da tmem158'in wnt4 ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Cheng vd., 2015). Bizim sonuçlarımızda, Tmem158 nakavt, kontrole göre 24 saat sonrasında anlamlı şekilde azalmış, 72 saat sonrası kontrole göre artmıştır. 24 saat ve 72 saati kıyasladığımızda bu genin nakavtının Wnt4 ifadesini anlamlı olarak arttırdığı görülmüştür. Bu da Wnt4 geninin kanser yolakları ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda Tmem158 susturulduğunda Wnt4 ekspresyonu kontrol grubuna göre 24 saatte azalırken, 72 saatte bir artış görülmüştür. Farklı zaman noktalarında fare stromasında tmem158 gen nakavtını takiben Wnt4 geninin diferansiyel ekspresyonu, geri besleme mekanizmaları ve telafi edici mekanizmalar dahil olmak üzere bir dizi faktöre bağlı olabilir (Clevers vd., 2012; Angers ve Moon, 2009).

Tmem158 ve Wnt4 ilişkisine bakıldığında bununla ilgili mekanizmaları aydınlatan bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda Tmem158 nakavt edilmiş hücrelerde Wnt4 ekspresyon ilişkisine baktığımızda, 24 saat sonra bir düşüş olduğunu bulduk ve ilk düşüşün olası bir açıklaması, Wnt4 sinyal yolunu bastırmaya veya inhibe etmeye hizmet eden geri besleme mekanizmalarının aktivasyonu olabilir. Wnt sinyal yolunun, Wnt inhibitörlerinin ifadesi, Wnt

sinyalinin negatif düzenleyicileri ve Wnt sinyalinin aşağı akış hedeflerini içeren geri besleme döngüleri dahil olmak üzere bir dizi geri besleme mekanizması tarafından düzenlendiği iyi bilinmektedir. Tmem158'in kaybının, bu geri besleme mekanizmalarından birini veya daha fazlasını bozarak, Wnt4 gen ifadesinde başlangıçtaki bir azalmaya yol açması mümkün olabilir (Clevers vd., 2012). Bununla birlikte, tmem158 nakavtından 72 saat sonra, Wnt4 gen ekspresyonunda gözlemlenen artış, tmem158 kaybına yanıt olarak aktive edilen telafi edici mekanizmalardan kaynaklanıyor olabilir. Genel olarak, farklı zaman noktalarında fare stromasında tmem158 gen nakavtını takiben Wnt4 ifadesinde gözlenen farklılıklardan sorumlu altta yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulacaktır (Takeda vd., 2021; Min vd., 1998).

TIMP3, Metalloproteinaz 3'ün Doku İnhibitörü anlamına gelir. Hücre dışı matrisin (ECM) yeniden şekillenmesini ve doku homeostazını düzenlemede kritik bir rol oynayan bir proteindir. TIMP3, matris metalloproteinazlar (MMP'ler) adı verilen enzimlerin aktivitesini engelleyen metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) adı verilen bir protein ailesine ait olarak bilinirler TIMP'ler ayrıca metalloproteinazlardan bağımsız biyolojik aktivitelere sahiptir; bunlar hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre göçü, antianjiyogenez, anti- ve pro-apoptoz süreçlerinde yer alırlar. Bu aileden olan TIMP3, MMP-2, MMP-9 ve MMP-14 dahil olmak üzere birçok MMP'nin aktivitesini inhibe eder ve ECM sentezi ile bozunması arasındaki dengenin korunmasında önemli bir rol oynar. TIMP3 ekspresyonunun düzensizliği, yaşa bağlı makula dejenerasyonu, Alzheimer hastalığı ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Brew vd., 2010). TIMP3'ten yoksun farelerde iltihaplı karaciğerler geliştiğini ve bu iltihabın nedeninin TNF- α aktivitesinde bir artış olduğunu bulmuşlardır (Su vd., 2019; Black, 2004). Birkaç çalışma, TIMP3 ifadesinin, Wnt sinyali dahil olmak üzere çeşitli sinyal yolları tarafından düzenlendiği belirtilmiştir TIMP3'ün β -katenin içeren hücre içi sinyal yollarını etkilediğini göstermiş, TIMP3, seçici gen ekspresyonunu ve hücre davranışını etkilemek için hücre tipine özgü bir şekilde hareket ettiğini belirtmişlerdir. Ayrıca TIMP3 kaybı, hedef genlerini MMP ve ADAM proteolitik aktivitesi yoluyla etkilemiştir. Bu yolun periselüler proteolitik düzenlemesinin önemini göstererek β -katenin düzenlemesini kanonik Wnt sinyalinin ötesine genişlettiği göstermiştir (Hojilla vd., 2007).

Farelerde Tmem158 gen nakavt ve TIMP3 ekspresyonu arasındaki ilişkiyi özel olarak araştıran yayınlanmış çalışma yoktur. Bununla birlikte, tmem158'in, Wnt sinyalini veya diğer sinyal yollarını modüle ederek dolaylı olarak TIMP3 ifadesinin düzenlenmesine dahil olması mümkündür (Zhao vd, 2020). Bizim sonuçlarımıza göre Tmem158 nakavtı, 24 saat ve 72 saat sonraki fare stroma hücreleri kıyaslandığında, anlamlı bir şekilde artış gözlenmiştir. Bu durum

Tmem158 geninin TIMP3 üzerinde implantasyon mekanizmasında azaltan bir etki yaratmadığını göstermektedir. Ancak dolaylı yoldan farklı mekanizmalarla etkileşimi olabilir.

Tmem158 geninin nakavtı ve PR (progesteron reseptörü) ekspresyonu/fonksiyonu arasındaki ilişkiyi özel olarak araştıran yayınlanmış çalışma yoktur. Bununla birlikte, progesteron reseptörünün üreme fizyolojisi ve kanser biyolojisinde önemli roller oynadığı bilinmektedir ve Tmem158'in sinyal yollarının modüle edilmesinde yer aldığı öne sürülmüştür. Bu nedenle, Tmem158'in, sinyal yolları veya diğer hücresel süreçler üzerindeki etkisiyle progesteron reseptörü işlevini dolaylı olarak etkilemesi mümkündür. Progesteron reseptörü, ligand bağlanmasına yanıt olarak gen ekspresyonunu düzenleyen steroid hormon reseptörlerini içeren nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesidir. Dişi üreme sisteminde, progesteron reseptörü gebeliğin sürdürülmesi için gereklidir ve adet döngüsünün düzenlenmesinde kritik bir rol oynar. Anormal progesteron reseptör sinyali, meme kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde de rol oynamıştır (Osborne, 1998). Tmem158'in, çeşitli bağlamlarda progesteron reseptörü sinyalleşmesi ile etkileşime girdiği gösterilen Wnt sinyal yolu dahil olmak üzere sinyal yollarının modüle edilmesinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Knutson vd., 2012; Tong vd., 2022; Sulaiman vd., 2016) Bizim çalışma gruplarımız da Tmem158 gen nakavtının, PR üzerinde azaltıcı bir etki yapmadığını göstermektedir. Ancak 24 saat ve 72 saat gruplarını kendi aralarında kıyasladığımızda PR geni ifadesinin azaldığı gözlenmektedir. Bu durum implantasyon mekanizmasında olumsuz bir etki olabileceğini göstermektedir. Tmem158'i progesteron reseptörü işlevine bağlayan doğrudan bir kanıt bulunmamakla birlikte, Tmem158'in Wnt veya diğer sinyal yollarını modüle ederek progesteron reseptörü sinyalini dolaylı olarak etkilemesi mümkündür. Bu olasılığı araştırmak ve bu genler arasındaki fonksiyonel ilişkileri daha iyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

MUC1 (Mucin 1), solunum, mide-bağırsak ve üreme yollarının astarı dahil olmak üzere çeşitli epitel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen bir glikoproteindir. Ayrıca birçok kanser hücresinde aşırı eksprese edilir. MUC1, yüksek oranda glikosile edilmiş tandem tekrarları, bir transmembran alanı ve kısa bir sitoplazmik kuyruk içeren büyük bir hücre dışı alandan oluşur. MUC1'in hücre dışı alanı, hücre yapışması, yağlanması ve epitel yüzeyinin korunmasında rol alırken, sitoplazmik kuyruk, sinyal iletimi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde yer alır. Kanser hücrelerinde, MUC1 sıklıkla aşırı eksprese edilir ve anormal şekilde glikosile edilir, bu da hücre yüzeyinde ekspresyonunun artmasına ve fonksiyonun değişmesine yol açar. MUC1'in kanser hücrelerinde değişen işlevi, tümör ilerlemesi, metastaz ve kemoterapiye direnç ile

ilişkilendirilmiştir (Nath ve Mukherjee, 2014). Farelerde veya diğer türlerde Tmem158 gen nakavt ve MUC1 ekspresyonu veya fonksiyonu arasındaki ilişkiyi araştıran yayınlanmış hiçbir çalışma yoktur. Tmem158'i MUC1 ekspresyonu veya fonksiyonuna bağlayan doğrudan bir kanıt bulunmamakla birlikte, Tmem158'in Wnt veya diğer sinyal yollarını modüle ederek MUC1'i dolaylı olarak etkilemesi mümkündür. Bu olasılığı araştırmak ve bu genler arasındaki fonksiyonel ilişkileri daha iyi anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulacaktır. Bu çalışmaların özellikle Tmem158 ve MUC1 arasındaki ilişkiyi araştırmadığını, bunun yerine Wnt sinyali ile MUC1 ifadesi ve işlevi arasındaki potansiyel etkileşimler için bağlam sağladığını not etmek önemlidir. Tmem158'in MUC1'i in vivo olarak etkileyip etkilemediğini ve nasıl etkileyebileceğini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulacaktır. Bizim sonuçlarımızda Tmem158 geni nakavtının çalışma gruplarımızdaki etkisi anlamlı bulunmamakla birlikte, 24 saat grupları arasında kontrole kıyasla bir azalma görülmüştür. Çalışma grupları arasında kıyasladığımızda 24 saat ve 72 saat arasında azalma görülürken, 72 saat hücre grupları kontrole kıyasla anlamlı olarak azalmıştır. Bu durum, Tmem158 susturulmasının 24 saat sonrasında MUC1 ekspresyonunu azaltıcı yönde etkilemesinin implantasyon açısından sonuçlarının olumsuz olabileceğidir.

Tmem158 ve MMP9 arasındaki spesifik ilişki hakkında sınırlı sayıda araştırma vardır, ancak Fu ve ark. (2020), pancreatic cancer hücrelerinde MMP9 ekspresyonunun Tmem158 ile ilişkili olduğu, bu sebeple Tmem158'in, farklı dokularda ve bağlamlarda MMP9 ekspresyonunu ve aktivitesini düzenlemede rol oynayabileceğini düşünülmektedir (Fu vd.,2020). Bununla birlikte, bu potansiyel ilişkinin altında yatan mekanizmaları tam olarak aydınlatmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olmakla birlikte, sonuçlarımızda MMP9 etkisinin, Tmem158 gen nakavtı açısından önemli bulunmadığı görülmüştür.

Lösemi inhibitör faktörü (LIF), embriyonik gelişim, inflamasyon ve kanser dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynayan pleiotropik bir sitokindir. LIF ifadesinin veya sinyalinin düzensizliği, çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Tmem158 ve LIF arasındaki spesifik ilişki hakkında da araştırmalar oldukça sınırlıdır ancak Li ve arkadaşları (2022), fare glioma hücrelerinde Tmem158 gen ifadesinin azaltılmasının, Janus kinaz/sinyal dönüştürücüsünün ve transkripsiyon aktivatörünün (JAK/STAT) sinyal yolunun p-STAT3 aracılı aktivasyonunun azalmasına sebep olduğu bulunmuştur. Tmem158'in, LIF reseptörünün (LIFR) hücre yüzeyi üzerindeki stabilitesini ve lokalizasyonunu modüle ederek LIF sinyalini düzenlemede rol oynayabileceğini öne sürülmektedir. Ayrıca, Tmem158'in hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) yolunun aktivitesini modüle ederek LIF ifadesini düzenleyebileceği

öne sürülmüştür (Qiang vd. 2022; Hirai vd., 2011; Li vd. 2022). Bu çalışmalar, Tmem158'in, farklı dokularda ve bağlamlarda LIF sinyallemesini ve ekspresyonunu düzenlemede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımızda, Tmem158 nakavtının LIF üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmamakla birlikte, gruplar arasında Tmem158 geni nakavt edildiğinde LIF ifade düzeylerinde bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir.

Hoxa10, embriyonik gelişim ve doku farklılaşmasında önemli rol oynayan Hox gen ailesinin bir üyesidir. Hoxa10 ekspresyonunun düzensizliği, endometriyoz ve kanser dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda rol oynamıştır. Tmem158 ve Hoxa10 arasındaki spesifik ilişki hakkında sınırlı araştırma mevcuttur. Bizim sonuçlarımızda, Tmem158 gen nakavtının HOXA10 ifade düzeyinde anlamlı değişiklikler yarattığı ve her iki 24 saat ve 72 saatlik çalışma gruplarında kontrole kıyasla artış görüldüğü bulunmuştur. Aynı zamanda 24 saat ve 72 saat nakavt grupları HOXA10 geni ifadesi açısından kıyaslandığında 72 saatlik grupta azalma olduğu görülmüştür. Bu durum, Tmem158 gen nakavtının daha geç dönemde bu gen yolağında etki ettiği ve dolaylı mekanizmalar yoluyla etki edebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte implantasyon bozulmasına neden olabileceği söylenebilir.

Fibronektin, hücre adezyonu, migrasyonu ve doku organizasyonunda kritik bir rol oynayan bir glikoproteindir. Tmem158 ve fibronektin arasındaki spesifik ilişki hakkında literatüre dayalı araştırmaya rastlanmamıştır. Tmem158'in çeşitli organlarda fibronektin ekspresyonunu ve doku rejenerasyonunu düzenlemede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımızla bu çalışmalarla kıyaslandığında, 24 saatlik gruplar ve 72 saatlik gruplar kontrollere göre kıyaslandığında artış görülmekle birlikte, 24 saat ve 72 saat grupları arasında anlamlı şekilde azalma görülmüştür. Bu durum Tmem158 gen nakavtının Fibronektini 24 saatlik dönemden sonra etkilediği görülmektedir.

ESR1 geni tarafından kodlanan östrojen reseptörü alfa (ER α), farelerde ve insanlarda üreme ve üreme dışı işlevlerin ana düzenleyicisidir. Tmem158 ve ESR1 arasındaki ilişki hakkında herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bizim sonuçlarımızda, 24 saatlik gruplar ve 72 saatlik gruplar kontrollere göre kıyaslandığında artış görülmekle birlikte, 24 saat ve 72 saat grupları arasında anlamlı şekilde artış görülmüştür. Bu durum Tmem158 gen nakavtının ESR1 genini 24 saatlik dönemden sonra da etkilediği görülmektedir.

ERBB1 olarak da bilinen epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hayatta kalmasında çok önemli bir rol oynayan bir transmembran reseptör tirozin kinazdır. Genel olarak, Tmem158'in farelerde EGFR sinyallemesini ve üreme

fonksiyonunu düzenlemede rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Tmem158 ve EGFR ilişkisi araştırılmamış olup bizim sonuçlarımızda, 24 saatlik gruplar ve 72 saatlik gruplar kontrollere göre kıyaslandığında azalma görülmekle birlikte, 24 saat ve 72 saat grupları arasında anlamlı bir değişiklik görülmüştür. Bu durum Tmem158 gen nakavtının ESR1 geninin implantasyon için önemli olduğu görülmektedir.

HER2 olarak da bilinen ERBB2, EGFR reseptör tirozin kinaz ailesinin başka bir üyesidir. Normal hücrelerde, hücre yüzeyinde az sayıda HER2 molekülü bulunur, dolayısıyla az sayıda heterodimer oluşur ve büyüme sinyalleri nispeten zayıf ve kontrol edilebilirdir. HER2 aşırı eksprese edildiğinde, çoklu HER2 heterodimerleri oluşur ve hücre sinyali daha güçlüdür. Bu durum büyüme faktörlerine ve malign büyümeye karşı artan yanıt ile sonuçlanır. HER2, yeni meme kanseri tedavileri için oldukça spesifik ve umut verici bir hedeftir (Rubin ve Yarden, 2001). HER2'nin insan tümör hücrelerinde aşırı ekspresyonu, artan anjiyogenez ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) ekspresyonu ile ilişkilidir (Kumar ve Yarmand-Bagheri, 2001). Bizim sonuçlarımızda, 24 saatlik gruplar ve 72 saatlik gruplar kontrollere göre kıyaslandığında artış görülmekle birlikte, 24 saat ve 72 saat grupları arasında anlamlı bir artış görülmüştür.

Nidogen olarak da bilinen entaktin, bazal membranların önemli bir bileşeni olan bir glikoproteindir. Hücre yapışması, göçü ve farklılaşması dahil olmak üzere çeşitli hücresel işlemlerde yer alır (Chung ve Durkin, 1990). Farelerde Tmem158 geni ile entaktin arasındaki ilişkiye dair literatür bilgisine rastlanmamıştır. Tong ve diğerleri tarafından yapılan bir çalışma (2022), Tmem158'in meme kanseri hücre göçünü ve istilasını düzenlemedeki rolünü araştırmıştır (Tong vd., 2022). Tmem158'in entaktin proteinlerinin hücre dışı matriste salgılanmasını ve birikmesini düzenleyebileceğini ve bunun da hücre göçünü ve istilasını modüle edebileceği düşünülebilir. Tmem158'in, hücre dışı matriste entaktin seviyelerinin ve birikiminin düzenlenmesinde bir rol oynayabileceğini ve bunun da tümör mikroçevresi ve meme kanseri hücre göçü ve istilasını dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçler için etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Bizim sonuçlarımızda, Tmem158 gen nakavtının 24 saatlik gruplar ve 72 saatlik gruplar kontrollere göre kıyaslandığında entaktin ifadesinde anlamlı bir artış görülürken, 24 saat ve 72 saat grupları arasında da anlamlı bir artış saptanmıştır.

43 amino asitlik kısa bir peptit olan Tmsb4x, hücresel motilite, anjiyogenez, iltihaplanma, hücre sağkalımı ve yara iyileşmesi dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelerde yer alır. Daha önce yapılan fare modeli çalışmalarında metastatik yaygın tip mide kanseri hücrelerinin, WNT

aracılı epitelyal-mezenkimal geçişe yol açtığı, neredeyse tamamen E-cadherin ekspresyonu kaybına sebep olduğu gösterilmiştir (Park vd., 2018). Tmsb4x'in ayrıca multipl miyelomda tümör baskılayıcı etkileri olduğu gösterilmiştir, bu da kanser türüne bağlı olarak farklı roller oynadığı anlamına gelir (Caers vd, 2010). Ayrıca Wnt3a'nın tedavisi yoluyla Wnt sinyal yolu aktivasyonu organoid yapılarında hücrelerde Tmsb4x mRNA ekspresyonunun artırıldığı gözlemlendi (An vd. 2021). Yaptığımız çalışmada da Tmsb4x susturulması 72.saatte implantasyon alanında bir invazyon ve gelişim geni olan Wnt4 salınımını artırmıştır. Bu sebeple Tmsb4x ile Wnt yolağı arasında anlamlı bir ilişki olduğu ve ileride yapılacak çalışmalarla bu konudaki literatür bilgisinin genişletilebileceği düşünülmektedir.

Erken fare gelişimi sırasında, bir transkripsiyon faktörü olan GATA3'ün mRNA ifadesi 4 hücreli aşamada indüklenir ve implantasyon öncesi embriyonik gelişim sırasında sürekli olarak bulunur. Önceden yapılan çalışmalarda Gata3'ün trofoblast oluşum ve gelişiminde önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Blastokist aşamasında, Gata3 mRNA'sı, trofoektoderm (TE) soyu içinde seçici olarak yukarı regüle edilir ve GATA3 proteini, yalnızca TE'de bol miktarda bulunur, ancak ICM'de bulunmaz (Home vd, 2010). Gata3 geninin implantasyondaki rolünü araştırdığımız bu çalışmada da Wnt4, Hoxa10 ve Mmp9 gibi invazyon ve gelişim genleri ile yakından ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırma in vitro kültür ortamında implantasyon modellerinin uygulanması için çok bilgi sağlayıcı olmasının yanı sıra implantasyonda önemli olabilecek yeni genlerin veya implantasyon ile ilgisi daha önce kurulmamış genlerin açığa çıkmasını sağlamıştır. Örneğin; p53 geninin östrojen ve progesterone reseptörü genlerinin ifadesinde önemli rol oynayabileceği,

Hmga2 geni ile implantasyon sırasında bazal zar mutiadezif glikoproteinlerinden entaktinin implantasyon sırasında düzenlenmesinde görev alıyor olabileceği,

ErbB1 ve 2'nin Hmga2 ile ilişkili olabileceği

Bu zamana kadar psödogen olarak tanımlanan Gm15452 geninin protein kodlayan bir gen olduğu ve bu genin implantasyonda görev aldığı,

Tmsb4x geninin Wnt4 ile ilişkisinin implantasyon sırasında embriyonun invazyonu ve gelişimi için önemli olduğu, vb. Pek çok yeni ve özgün gen-implantasyon ilişkisinin ortaya konduğu bir araştırma olmuştur.

Elde edilen büyük veri setleri artan ve azalan, ancak daha önce implantasyon adı geçmeyen pek çok geni gündeme getirmiştir. Artan başka genlere bu proje sonlanmış olsa dahi çalışmamıza kendi imkanlarımızla devam ederek implantasyon biyolojisini daha iyi anlamamızı sağlayacak genom düzenlemelerini yapmaya devam etmeyi planlıyoruz. Ekibimizin çok tecrübeli olduğu konulardan biri olan CRISPR/dCas9 ile gen aktivasyonu yapılabilecek pek çok azalmış gen de dizi analizi ile ortaya konmuştur ve bu genler üzerinde de ayrıca çalışmayı, hatta virus benzeri parçacıklarla (VLP) genom/epigenome düzenlemesi yaparak, bu hücrelerin in vivo kullanımı konusunda çalışmayı hedeflemekte, böylece tekrarlayan implantasyon başarısızlığı, tekrarlayan habitüel abortus gibi durumlarda implantasyonu arttırıcı hücre tedavileri konusunda ilerlemek istiyoruz.

KAYNAKLAR

Alam, M., Ahmad, R., Rajabi, H., & Kufe, D. (2015). MUC1-C Induces the LIN28B-LET-7-HMGA2 Axis to Regulate Self-Renewal in NSCLC. *Molecular cancer research:MCR*, 13(3), 449–460. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0363>

An, H.W., Kim, S.Y., Kwon, J.W., Seok, S.H., Woo, S.H., Kim, D.Y., & Park, J.W. (2021) In vivo CRISPR-Cas9 knockout screening using quantitative PCR identifies thymosin beta-4 X-linked that promotes diffuse-type gastric cancer metastasis. *Mol Carcinog. Sep*;60(9):597-606. <https://doi.org/10.1002/mc.23326>.

Angers, S., & Moon, R.T. (2009). Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):468-477. <https://doi.org/10.1038/nrm2717>.

Ataalla W.M., & Cheung A.P. 2008. Value of the zygote score in predicting pregnancy success following ICSI treatment. *Fertility and Sterility.* 90,S396. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008>.

Bagis, H., Aktoprakligil, D., Gunes, C., Arat, S., Akkoc, T., Cetinkaya, G., Kankavi, O., Taskin, A.C., Arslan, K., Dundar, M., Tsoncheva, V.L., & Ivanov, I.G. (2011). Expression of biologically active human interferon gamma in the milk of transgenic mice under the control of the murine whey acidic protein gene promoter. *Biochemical genetics*, 49(3-4), 251–257. <https://doi.org/10.1007/s10528-010-9403-7>

Bayramoglu, Z., Kilinc, A.N.U., Omeroglu, E., Yilmaz, F., Bayramoglu, D., Unlu, Y., & Aydin, H.A. (2022). Expression of extracellular matrix proteins nidogen-1 and legumain in endometrial carcinomas. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 48:1019-1025. <https://doi.org/10.1111/jog.15158>

Bergh, P. A., & Navot, D. (1992). The impact of embryonic development and endometrial maturity on the timing of implantation. *Fertility and sterility*, 58(3), 537–542. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55259-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55259-5)

Berke, T.P., Slight, S.H., & Hyder, S.M. (2022). Role of Reactivating Mutant p53 Protein in Suppressing Growth and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer. *Onco Targets and Therapy*, 15, 23-30. <https://doi.org/10.2147/OTT.S342292>

Black, R. TIMP3 checks inflammation. *Nat Genet* 36, 934–935 (2004).
<https://doi.org/10.1038/ng0904-934>

Bolger, A.M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.

Boron, W.F., & Boupaep, E.L. (2016) *Medical Physiology*. 3rd Edition, Elsevier Publisher, Philadelphia.

Brew, K., Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1803(1), 55-71. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.01.003

Brewer, J. D., & Habtemichael, E. N. (2020). Semi-dry western blotting. In *Protein Blotting: Methodology, Research and Diagnostic Applications*. Springer, Cham. (pp. 57-69).

Burchardt, L., Gottlieb, A., Helmke, B.M., Wosniok, W., Kuepker, W., & Bullerdiek, J. (2020). Expression patterns of HMGA2 in the placenta during pregnancy. Cold Spring Harbor Laboratory. <https://doi.org/10.1101/2020.12.07.20245092>

Bustin, S. (2004). *A-Z of Quantitative PCR*. IUL Biotechnology Series, International University Line, La Jolla, California.

Caers, J., Hose, D., & Kuipers, I., (2010). Thymosin β 4 has tumor suppressive effects and its decreased expression results in poor prognosis and decreased survival in multiple myeloma. *Haematologica*. 2010;95(1): 163-167 <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.006411>

Carver, J., Martin, K., Spyropoulou, I., Barlow, D., Sargent, I., & Mardon, H. (2003). An in-vitro model for stromal invasion during implantation of the human blastocyst. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(2), 283–290. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg072>

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884-i890.

Chen, Y., Zhu, B., Zhang, J., Xiao, W., Wang, J., Zhou, X., & Zhang, Y. (2018). Knockout of TMEM158 causes diminished lung fibrosis and better survival in a mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Frontiers in physiology*, 9, 358.

Cheng, Z., Guo, J., Chen, L. et al. Overexpression of TMEM158 contributes to ovarian carcinogenesis. *J Exp Clin Cancer Res* 34, 75 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0193-y>

Chung, A. E., & Durkin, M. E. (1990). Entactin: structure and function. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 3(4), 275–282. <https://doi.org/10.1165/ajrcmb/3.4.275>

Chung, D., & Das, S. K. (2011). Mouse primary uterine cell coculture system revisited: ovarian hormones mimic the aspects of in vivo uterine cell proliferation. *Endocrinology*, 152(8), 3246–3258. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0223>

Clevers H, & Nusse R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*. 2012;149(6):1192-1205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>.

Cohen M, Wullemmin C, Irion O, Bischof P. Regulation of MMP-9 by p53 in first trimester cytotrophoblastic cells. *Hum Reprod*. 2008 Oct;23(10):2273-81. doi:10.1093/humrep/den264. Epub 2008 Jul 16. PMID: 18635530; PMCID: PMC2538584.

Coughlan, C., Ledger, W., Wang, Q., Liu, F., Demiroglu, A., Gurgan, T., Cutting, R., Ong, K., Sallam, H., & Li, T.C. (2014). Recurrent implantation failure: definition and management. *Reproductive biomedicine online*, 28(1), 14–38. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.011>

Desrochers, L. M., Bordeleau, F., Reinhart-King, C. A., Cerione, R. A., & Antonyak, M. A. (2016). Microvesicles provide a mechanism for intercellular communication by embryonic stem cells during embryo implantation. *Nature communications*, 7, 11958. <https://doi.org/10.1038/ncomms11958>

Diedrich, K., Fauser, B. C. J. M., Devroey, P., Griesinger, G., & on behalf of the Evian Annual Reproduction (EVAR) Workshop Group. (2007). The role of the endometrium and embryo in

human implantation. Human Reproduction Update, 13(4), 365–377.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmm011>

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Emiliani, S., Delbaere, A., Devreker, F., & Englert, Y. (2005). Embryo-maternal interactive factors regulating the implantation process: Implications in assisted reproductive. *Reproductive Biomedicine Online*, 10(4), 527–540. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60831-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60831-0)

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048.

Fu, Y., Yao, N., Ding, D., Zhang, X., Liu, H., Ma, L., Shi, W., Zhu, C., & Tang, L. (2020). TMEM158 promotes pancreatic cancer aggressiveness by activation of TGFβ1 and PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 235(3), 2761–2775. <https://doi.org/10.1002/jcp.29181>

Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C. M., & Shoham, Z. (2018). *Textbook of Assisted Reproductive Techniques* (5th Edition). CRC Press.

Han, H. (2017). A novel feature selection for RNA-seq analysis. *Computational Biology and Chemistry*, 71, 245–257. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2017.10.010>

Hardarson, T., Van Landuyt, L., & Jones, G. M. (2012). The blastocyst. *Human Reproduction* (Oxford, England), 27 Suppl 1, i72–i91. <https://doi.org/10.1093/humrep/des230>

Hirai, H., Karian, P., & Kikyo, N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *The Biochemical journal*, 438(1), 11–23. <https://doi.org/10.1042/BJ20102152>

Hojilla, C. V., Kim, I., Kassiri, Z., Fata, J. E., Fang, H., & Khokha, R. (2007). Metalloproteinase axes increase beta-catenin signaling in primary mouse mammary epithelial cells lacking TIMP3. *Journal of cell science*, 120(Pt 6), 1050–1060. <https://doi.org/10.1242/jcs.003335>

Home, P., Ray, S., Dutta, D., Bronshteyn, I., Larson, M., & Paul, S. (2009). GATA3 is selectively expressed in the trophectoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(42), 28729–28737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016840>

Hu, W., Feng, Z., Teresky, A. K., & Levine, A. J. (2007). p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature*, 450(7170), 721-724. <https://doi.org/10.1038/nature05993>

Huang, X. T., Li, X., Qin, P. Z., Zhu, Y., Xu, S. N., & Chen, J. P. (2018). Technical Advances in Single-Cell RNA Sequencing and Applications in Normal and Malignant Hematopoiesis. *Frontiers in oncology*, 8, 582. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00582>

Jha, R. K., Titus, S., Saxena, D., Kumar, P. G., & Laloraya, M. (2006). Profiling of E-cadherin, beta-catenin and Ca(2+) in embryo-uterine interactions at implantation. *FEBS letters*, 580(24), 5653–5660. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.09.014>

Jiang, F., & Doudna, J. A. (2015). The structural biology of CRISPR-Cas systems. *Current opinion in structural biology*, 30, 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.02.002>

Kang, Y. J., Forbes, K., Carver, J., & Aplin, J. D. (2014). The role of the osteopontin-integrin $\alpha\beta 3$ interaction at implantation: functional analysis using three different in vitro models. *Human reproduction* (Oxford, England), 29(4), 739–749. <https://doi.org/10.1093/humrep/det433>

Karahuseyinoglu, S., Sahin, G.N., Kocabay, A., Taskin, A.C. (2016). Cellular and Molecular Dynamics Of In-vitro 2D and 3D Cultured Blastocysts Throughout The Implantation Process. P1553- The American Cell Biology (ASCB) Annual Meeting, San Francisco, CA, Dec 3-7, 2016.

Karahuseyinoglu, S., Sahin, G.N., Taskin, A.C., Yucel, D. (2016). Endometrium co-culture, 3D endometrium co-culture, 3D polymeric carrier aided endometrium co-culture: Comparative

effects on implantation. The 32nd annual meeting of European Society of Human Reproduction & Embryology (ESHRE), p-346, Helsinki, Finland, July 3-6 2016.

Klonos, E., Katopodis, P., Karteris, E., Papanikolaou, E., Tarlatzis, B., & Pados, G. (2020). Endometrial changes in estrogen and progesterone receptor expression during implantation in an oocyte donation program. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20, 178. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9308>

Knutson, T. P., Daniel, A. R., Fan, D., Silverstein, K. A., Covington, K. R., Fuqua, S. A., & Lange, C. A. (2012). Phosphorylated and sumoylation-deficient progesterone receptors drive proliferative gene signatures during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, 14(5), R95. <https://doi.org/10.1186/bcr3229>

Kumar, R., & Yarmand-Bagheri, R. (2001). The role of HER2 in angiogenesis. *Seminars in oncology*, 28(5 Suppl 16), 27–32. [https://doi.org/10.1016/s0093-7754\(01\)90279-9](https://doi.org/10.1016/s0093-7754(01)90279-9)

Li, D., Zand, M. S., Dye, T. D., Goniewicz, M. L., Rahman, I., & Xie, Z. (2022). An evaluation of RNA-seq differential analysis methods. *PLOS One*, 17(9), e0264246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264246>

Li, J., Wang, X., Chen, L. et al. TMEM158 promotes the proliferation and migration of glioma cells via STAT3 signaling in glioblastomas. *Cancer Gene Ther* 29, 1117–1129 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41417-021-00414-5>

Li, J., Zhang, C., Huang, R., Lv, M., Liu, M., Wang, Y., ... & Zhang, Y. (2020). TMEM158 regulates uterine receptivity and fertility through modulation of PI3K/Akt signaling pathway in mice. *Frontiers in Physiology*, 11, 77.

Lim, H. J., & Wang, H. (2010). Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 1004–1015. <https://doi.org/10.1172/JCI41210>

Liu, W. M., Pang, R. T., Cheong, A. W., Ng, E. H., Lao, K., Lee, K. F., & Yeung, W. S. (2012). Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PloS one*, 7(5), e37039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037039>

- Liu, X., Zhao, J., Xue, L. et al. (2022). A comparison of transcriptome analysis methods with reference genome. *BMC Genomics*, 23(1), 232. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08465-0>
- Lois, C., Hong, E. J., Pease, S., Brown, E. J., & Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), 868–872. <https://doi.org/10.1126/science.1067081>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Matsubara, K., Matsubara, Y., Uchikura, Y., Takagi, K., Yano, A., & Sugiyama, T. (2021). HMGA1 Is a Potential Driver of Preeclampsia Pathogenesis by Interference with Extravillous Trophoblasts Invasion. *Biomolecules*, 11(6), 822. <https://doi.org/10.3390/biom11060822>
- McCormack, J. T., & Greenwald, G. S. (1974). Evidence for a preimplantation rise in oestradiol-17beta levels on day 4 of pregnancy in the mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41(2), 297–301. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0410297>
- Meseguer, M., Aplin, J. D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J. E., Martín, J. C., Remohí, J., Pellicer, A., & Simón, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biology of Reproduction*, 64(2), 590–601. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.2.590>
- Michael, S. D. (1976). Plasma prolactin and progesterone during the estrous cycle in the mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 153(2), 254–257. <https://doi.org/10.3181/00379727-153-39522>
- Muller, P. A. J., Vousden, K. H., & Norman, J. C. (2011). p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion. *Journal of Cell Biology*, 192(2), 209-218. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009059>

Nath, S., & Mukherjee, P. (2014). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in molecular medicine*, 20(6), 332–342. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007>

Nissi, R., Talvensaaari-Mattila, A., Kotila, V., Lehtimäki, T., Tervahartiala, T., Sorsa, T., & Myllynen, P. (2013). Circulating matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-2/TIMP-2 complex are associated with spontaneous early pregnancy failure. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 2. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-2>

Norwitz, E. R., Schust, D. J., & Fisher, S. J. (2001). Implantation and the survival of early pregnancy. *The New England Journal of Medicine*, 345(19), 1400–1408. <https://doi.org/10.1056/NEJMr000763>

Osborne, C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. *Breast Cancer Res Treat* 51, 227–238 (1998). <https://doi.org/10.1023/A:1006132427948>

Palomares, A. R., Castillo-Domínguez, A. A., Ruiz-Galdón, M., González-Casado, A., González-Sánchez, J., Pérez-Sanz, J., Martínez-Conejero, J. A., & Esteban, F. J. (2021). Genetic variants in the p53 pathway influence implantation and pregnancy maintenance in IVF treatments using donor oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(12), 3267–3275. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02324-9>

Park, D. W., Choi, D. S., Ryu, H. S., Kwon, H. C., Joo, H., & Min, C. K. (2003). A well-defined in vitro three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion. *Cancer letters*, 195(2), 185–192. [https://doi.org/10.1016/s0304-3835\(03\)00131-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(03)00131-9)

Park, J. W., Kim, M. S., Voon, D. C., et al. (2018). Multi-omics analysis identifies pathways and genes involved in diffuse-type gastric carcinogenesis induced by E-cadherin, p53, and Smad4 loss in mice. *Molecular Carcinogenesis*, 57(7), 947–954.

Pizarro, T., Salamonsen, L.A., Manuelpillai, U., Dimitriadis, E. (2008). Leukemia inhibitory factor promotes human first trimester extravillous trophoblast adhesion to extracellular matrix and secretion of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2. *Human reproduction* (Oxford, England). 23. 1724–32. 10.1093/humrep/den121.

Poehlmann, T.G., Fitzgerald, J.S., Meissner, A., Wengenmayer, T., Schleussner, E., Friedrich, K., Markert, U.R. (2005). Trophoblast invasion: tuning through LIF, signalling via Stat3, Placenta, Volume 26, Supplement, 2005, Pages S37-S41, ISSN 0143-4004, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2005.01.007>.

Qiang Luo, Ziquan Hu, Hongcheng Zhao, Yanmei Fan, Xiancong Tu, Yueqing Wang, Xiaowen Liu, The role of TGF- β in the tumor microenvironment of pancreatic cancer, Genes & Diseases, 2022, ISSN 2352-3042, <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.10.019>.

Rashid, N. A., Lalitkumar, S., Lalitkumar, P. G., & Gemzell-Danielsson, K. (2011). Endometrial receptivity and human embryo implantation. American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989), 66 Suppl 1, 23–30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01048.x>

Robertshaw I, Bian F, Das SK. Mechanisms of uterine estrogen signaling during early pregnancy in mice: an update. J Mol Endocrinol. 2016 Apr;56(3):R127-38. doi: 10.1530/JME-15-0300. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26887389; PMCID: PMC4889031.

Rubin, I., & Yarden, Y. (2001). The basic biology of HER2. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 12 Suppl 1, S3–S8. https://doi.org/10.1093/annonc/12.suppl_1.s3

Salleh, N., & Giribabu, N. (2014). Leukemia inhibitory factor: roles in embryo implantation and in nonhormonal contraception. TheScientificWorldJournal, 2014, 201514. <https://doi.org/10.1155/2014/201514>

Shi, C., Han, H. J., Fan, L. J., Guan, J., Zheng, X. B., Chen, X., Liang, R., Zhang, X. W., Sun, K. K., Cui, Q. H., & Shen, H. (2017). Diverse endometrial mRNA signatures during the window of implantation in patients with repeated implantation failure. In Human Fertility (Vol. 21, Issue 3, pp. 183–194). Informa UK Limited. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1324180>

Sozen, B., Can, A., & Demir, N. (2014). Cell fate regulation during preimplantation development: a view of adhesion-linked molecular interactions. *Developmental biology*, 395(1), 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.08.028>

Staun-Ram, E., Shalev, E. Human trophoblast function during the implantation process. *Reprod Biol Endocrinol* **3**, 56 (2005). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-56>

Su, C. W., Chang, Y. C., Chien, M. H., Hsieh, Y. H., Chen, M. K., Lin, C. W., & Yang, S. F. (2019). Loss of TIMP3 by promoter methylation of Sp1 binding site promotes oral cancer metastasis. *Cell death & disease*, 10(11), 793. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2016-0>

Sulaiman, A., Sulaiman, B., Khouri, L., McGarry, S., Nessim, C., Arnaout, A., Li, X., Addison, C., Dimitroulakos, J., & Wang, L. (2016). Both bulk and cancer stem cell subpopulations in triple-negative breast cancer are susceptible to Wnt, HDAC, and ER α coinhibition. *FEBS letters*, 590(24), 4606–4616. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12496>

Sun, M., Song, C.-X., Huang, H., Frankenberger, C. A., Sankarasharma, D., Gomes, S., Chen, P., Chen, J., Chada, K. K., He, C., & Rosner, M. R. (2013). HMGA2/TET1/HOXA9 signaling pathway regulates breast cancer growth and metastasis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 110, Issue 24, pp. 9920–9925). <https://doi.org/10.1073/pnas.1305172110>

Tan, Y., Tan, D., He, M., Gu, M., Wang, Z., Zeng, G., & Duan, E. (2005). A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice. *Biology of reproduction*, 72(3), 556–561. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032821>

Tang, F., Barbacioru, C., Bao, S., Lee, C., Nordman, E., Wang, X., Lao, K., & Surani, M. A. (2010). Tracing the derivation of embryonic stem cells from the inner cell mass by single-cell RNA-Seq analysis. *Cell stem cell*, 6(5), 468–478. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.03.015>

Tong, J., Li, H., Hu, Y., Zhao, Z., & Li, M. (2022). TMEM158 Regulates the Canonical and Non-Canonical Pathways of TGF- β to Mediate EMT in Triple-Negative Breast Cancer. *Journal of Cancer*, 13(8), 2694–2704. <https://doi.org/10.7150/jca.65822>

Tranguch, S., Daikoku, T., Guo, Y., Wang, H., & Dey, S. K. (2005). Molecular complexity in establishing uterine receptivity and implantation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 62(17), 1964–1973. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5230-0>

Trapnell, C., Williams, B. A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M. J., Salzberg, S. L., Wold, B. J., & Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nature biotechnology*, 28(5), 511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>

Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nature reviews. Genetics*, 7(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/nrg1808>

Wang, H., Pilla, F., Anderson, S., Martínez-Escribano, S., Herrer, I., Moreno-Moya, J. M., Musti, S., Bocca, S., Oehninger, S., & Horcajadas, J. A. (2012). A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. *Molecular human reproduction*, 18(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/molehr/gar064>

Wang, J., Mayernik, L., Schultz, J. F., & Armant, D. R. (2000). Acceleration of trophoblast differentiation by heparin-binding EGF-like growth factor is dependent on the stage-specific activation of calcium influx by ErbB receptors in developing mouse blastocysts. *Development (Cambridge, England)*, 127(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/dev.127.1.33>

Weimar, C. H., Post Uiterweer, E. D., Teklenburg, G., Heijnen, C. J., & Macklon, N. S. (2013). In-vitro model systems for the study of human embryo-endometrium interactions. *Reproductive biomedicine online*, 27(5), 461–476. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.002>

White, C. A., Zhang, J. G., Salamonsen, L. A., Baca, M., Fairlie, W. D., Metcalf, D., Nicola, N. A., Robb, L., & Dimitriadis, E. (2007). Blocking LIF action in the uterus by using a PEGylated antagonist prevents implantation: a nonhormonal contraceptive strategy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19357–19362. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710110104>

Xiao Q, Werner J, Venkatachalam N, Boonekamp KE, Ebert MP, Zhan T. Cross-Talk between p53 and Wnt Signaling in Cancer. *Biomolecules*. 2022 Mar 15;12(3):453. doi:10.3390/biom12030453. PMID: 35327645; PMCID: PMC8946298.

Yang, H., Wang, H., & Jaenisch, R. (2014). Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nature Protocols*, 9(8), 1956-1968. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.134>

Yi, X.-Y., Wayner, E. A., Kim, Y., & Fish, A. J. (1998). Adhesion of cultured human kidney mesangial cells to native entactin: Role of integrin receptors. *Cell Adhesion and Communication*, 5(3), 237-248. <https://doi.org/10.3109/15419069809040294>

Yoshihara, M., Mizutani, S., Kato, Y., Matsumoto, K., Mizutani, E., Mizutani, H., Fujimoto, H., Osuka, S., & Kajiyama, H. (2021). Recent insights into human endometrial peptidases in blastocyst implantation via shedding of microvesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13479. <https://doi.org/10.3390/ijms222413479>

Yoshinaga, K. (1988). Uterine receptivity for blastocyst implantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541, 424-431. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1988.tb22279.x>

Zhao, Y., Gu, X., & Wang, Y. (2020). MicroRNA-103 promotes nasopharyngeal carcinoma through targeting TIMP-3 and the Wnt/ β -catenin pathway. *The Laryngoscope*, 130(3), E75–E82. <https://doi.org/10.1002/lary.28045>

Zheng, J., Luo, X., Bao, J. et al. Decreased Expression of HOXA10 May Activate the Autophagic Process in Ovarian Endometriosis. *Reprod. Sci.* 25, 1446–1454 (2018). <https://doi.org/10.1177/1933719118768704>

Zhang, Q., Huang, R., Tang, Q., Yu, H., Zhao, Y., & Zhang, Y. (2018). TMEM158 regulates liver regeneration after partial hepatectomy through ERK signaling pathway. *Cell Death & Disease*, 9(9), 924. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0993-7>

Zhang, S., Lin, H., Kong, S., Wang, S., Wang, H., Wang, H., & Armant, D. R. (2013). Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(5), 939-980. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.12.011>

Zischewski, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances*, 35(1), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016>

Zong, Y., Huang, J., Sankarasharma, D., Morikawa, T., Fukayama, M., Epstein, J. I., Chada, K. K., & Witte, O. N. (2012). Stromal epigenetic dysregulation is sufficient to initiate mouse prostate cancer via paracrine Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1217982109>