



**İNSAN ENDOMETRİYAL ADENOKARSİNOM HÜCRE  
HATTINDA GALEKTİN-1 VE GALEKTİN-3  
EKSPRESYONLARININ HORMONAL  
DÜZENLENMESİ**

**AYTAC ABUŞOVA**

Yüksek Lisans Tezi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
İzmir Ekonomi Üniversitesi

İzmir  
2021

**İNSAN ENDOMETRİYAL ADENOKARSİNOM HÜCRE  
HATTINDA GALEKTİN-1 VE GALEKTİN-3  
EKSPRESYONLARININ HORMONAL  
DÜZENLENMESİ**

**AYTAC ABUŞOVA**

İzmir Ekonomi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Üreme Biyolojisi Anabilim Dalı'na  
Yüksek Lisans Tezi  
olarak sunulmuştur.

İzmir

2021

# ÖZET

## İNSAN ENDOMETRİYAL ADENOKARSİNOM HÜCRE HATTINDA GALEKTİN-1 VE GALEKTİN-3 EKSPRESYONLARININ HORMONAL DÜZENLENMESİ

Abuşova, Aytac

Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yasemin Seval Çelik

Ağustos, 2021

Uterin dokularda menstrual döngünün farklı evrelerinde galektinlerin ekspresyonlarının değişiyor olmasından yola çıkarak, endometriyumda eksprese edildiği bilinen galektin-1 ve galektin-3'ün ekspresyonunun ovaryan hormonlar ile düzenleniyor olabileceği hipotezi kurulmuştur. Çalışmamızda bir endometriyal adenokarsinom hücre hattı olan Ishikawa hücre hattına östradiol (E2) ve progesteronun (P4) ayrı ayrı veya birlikte verilmesi ile galektin-1 (Gal-1) ve galektin-3 (Gal-3) ekspresyonlarında mRNA ve protein düzeyinde meydana gelen değişikliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ishikawa hücre kültürlerinde hormon dozlarına ve zamana bağlı deney grupları oluşturulmuş, hücre kültür süpernatantları toplanarak ELISA yöntemi ile salgısal Gal-1 ve Gal-3 protein miktarları, hücrelerden RNA izole edilerek gerçek zamanlı PCR yöntemi ile Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonları değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre Ishikawa hücrelerinde Gal-1 ve Gal-3 mRNA ekspresyonu ve salgısal protein miktarının ovaryan hormonlarla zamana ve doza bağlı olarak

değiştiği, Gal-3'te daha belirgin olmak koşuluyla hem Gal-1 hem de Gal-3 ekspresyonunun östradiole kıyasla progesterona daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Patogenezi ve prognozunu hormonların etkilediği hastalıklar ve durumlarda (ER ve PR -pozitif kanserler, endometriyozis, pre-eklampsi, spontane düşükler, infertilite vb) galektinlerin hormonlarla düzenlendiğinin göz önünde bulundurulması ve tanı/tedavi yöntemlerinin ona göre seçilmesi gerekir.

Anahtar Kelimeler: Endometriyum, ovaryan hormonlar, Ishikawa hücre hattı, Galektin-1 ve Galektin-3



# ABSTRACT

## HORMONAL REGULATION OF GALECTIN-1 AND GALECTIN-3 EXPRESSION IN A HUMAN ENDOMETRIAL ADENOCARCINOMA CELL LINE

Abuşova, Aytac

Master Program in Reproductive Biology

Advisor: Assoc. Prof. Yasemin Seval elik

August, 2021

Given the fact that the expression of galectins in the uterine tissues change during different phases of the menstrual cycle, we hypothesized that the expression of galectin-1 and galectin-3 which are known to be expressed in the endometrium is regulated by the ovarian hormones. In our study, we aimed to determine the changes in galectin-1 (Gal-1) and galectin-3 (Gal-3) expressions at the mRNA and protein levels after the administration of estradiol (E2) and progesterone (P4) separately or together to the Ishikawa cell line, which is an endometrial adenocarcinoma cell line. Time and dose- dependent groups were formed in Ishikawa cell cultures and cell culture supernatants were collected in order to determine the secreted Gal-1 and Gal-3 protein levels via ELISA, and RNA was isolated in order to determine the Gal-1 and Gal-3 mRNA expression via real-time PCR. According to the results of the study, Gal-1 and Gal-3 mRNA expression and the amount of secretory Gal-1 and Gal-3 proteins in Ishikawa cells change with ovarian hormones depending on time and dose.

Moreover, while being more pronounced in Gal-3, both Gal-1 and Gal-3 expressions have been found to be more sensitive to progesterone induction when compared to estradiol. In diseases and conditions where Gal-1 and Gal-3 are implicated to have roles in and particularly in diseases and conditions in which the pathogenesis and prognosis are influenced by hormones (ER and PR-positive tumors, endometriosis, pre-eclampsia, spontaneous abortions, infertility etc.), diagnosis/treatment methods should be chosen considering that galectins are regulated by hormones.

Keywords: Endometrium, Ovarian Hormones, Ishikawa cell line, Galectin-1, Galectin-3



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez projemi destekleyen İzmir Ekonomi Üniversitesi Rektörlüğü; Proje Geliştirme ve Teknoloji Transfer Ofisi; Lisansüstü Eğitim Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na,

Yüksek lisans eğitimim ve tez dönemim süresince her aşamada tecrübeleri ve bilgileriyle bana ışık tutan, gelişimime katkı sağlayan, sabırlı, hoşgörülü ve güler yüzüyle beni cesaretlendiren değerli danışman hocam Doç. Dr. Yasemin SEVAL ÇELİK'e,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Üreme Biyolojisi Tezli Yüksek Lisans Programı Başkanı hocam Prof. Dr. V. Sevinç İNAN'a,

Yüksek lisans eğitimim ve tezimin deneyleri sürecinde değerli bilgilerini paylaşan, her konuda destek olarak, yol gösteren hocam Dr. Öğr. Üyesi A. Banu DEMİR'e,

Yüksek lisans tezimin deneyleri sürecinde değerli bilgilerini ve deneyimleri ile tez çalışmalarımıza çok değerli katkılar sunan hocam Arş. Gör. Elif BARIŞ'a,

Zaman ayırıp önerileriyle tezime yön veren değerli jüri üyelerimize,

Yoğun çalışma temposunda ihtiyacım olan her konuda desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Mert AYDIN, Ayshan BAGHİROVA, Suma GARİBOVA ve Aydan ALİZADA'ya,

Tüm hayatım boyunca sevgisini ve desteğini her daim hissettiren AİLEME...

Minnet ve şükranlarımı sunarım.

## ÖNSÖZ

Bu çalışma İzmir Ekonomi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca kabul edilen BAP-2019-12 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.





# İÇİNDEKİLER TABLOSU

ÖZET.....	iii
ABSTRACT .....	v
TEŞEKKÜR .....	vii
ÖNSÖZ .....	viii
İÇİNDEKİLER TABLOSU .....	ix
TABLO LİSTESİ .....	xii
ŞEKİL LİSTESİ .....	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ .....	xiv
BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
1.1. Galektinlerin Tanımı ve Önemi .....	1
1.2. Ishikawa Hücrelerinin Tanımı ve Önemi .....	2
1.3. Araştırmanın Amacı .....	3
1.4. Araştırmanın Hipotezi .....	3
BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Galektinler .....	4
2.1.1. Galektinlerin bağlanma aktiviteleri .....	6
2.1.2. Sitozol ve çekirdekte galektinler .....	6
2.1.3. Bozulmuş veziküllerdeki galektinler ve klasik olmayan salgı .....	7
2.1.4. Hücre dışı ve intraveziküler bölmedeki galektinler .....	8
2.1.5. Galektinlerin hücre dışı ve sitozolik fonksiyonları arasındaki bağlantı .....	8
2.1.6. Galektin inhibitörleri .....	9
2.1.7. Organizma düzeyinde hususlar .....	9
2.2. Galektin-1 .....	12
2.2.1. Galektin-1 lokalizasyonu ve ekspresyonu .....	12
2.2.2. Galektin-1 ve kanser .....	13
2.2.3. Galektin-1 ve tümör proliferasyonu .....	14
2.2.4. Galektin-1 ve tümör anjiyogenezi .....	15
2.2.5. Kanserde potansiyel bir terapötik hedef olarak Gal-1 .....	16
2.3. Galektin-3 .....	18
2.3.1. Galektin-3 ve immünoloji .....	18
2.3.2. Galektin-3 ve tümör gelişimi .....	19

2.3.3. <i>Galektin-3 ve diğer patolojik süreçler</i> .....	20
2.4. <i>Galektin-1 ve Galektin-3'ün kanserle ilişkisi</i> .....	21
2.5. <i>Endometriyal adenokarsinomlar</i> .....	21
2.5.1. <i>Sık kullanılan endometriyal hücre hatları</i> .....	22
2.5.2. <i>Ishikawa hücreleri</i> .....	22
2.6. <i>Östrojen ve Progesteron hormonları</i> .....	23
2.6.1. <i>Östrojenler</i> .....	23
2.6.2. <i>Progesteron</i> .....	23
2.6.3. <i>Östrojen ve Progesteron reseptörleri ve işlevleri</i> .....	24
2.6.4. <i>Menstrual döngü sırasındaki ER ve PR</i> .....	24
2.6.5. <i>Endometriyal karsinomlarda ER ve PR</i> .....	25
<b>BÖLÜM 3: GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	26
3.1. <i>Araştırmanın Tipi</i> .....	26
3.2. <i>Araştırmanın Yeri ve Zamanı</i> .....	26
3.3. <i>Araştırmanın Evreni ve Örneklemi</i> .....	26
3.4. <i>Araştırmanın Sınırlılıkları</i> .....	27
3.5. <i>Çalışma Materyali ve Yöntem</i> .....	27
3.5.1. <i>Gereçler</i> .....	27
3.5.2. <i>Hücre Kültürü Çalışmaları</i> .....	31
3.5.2.1. <i>Ishikawa hücreleri</i> .....	31
3.5.2.2. <i>Hücre Çözdürme</i> .....	32
3.5.2.3. <i>Hücre Pasajlama</i> .....	32
3.5.2.4. <i>Hücre Dondurma</i> .....	33
3.5.2.5. <i>Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini</i> .....	34
3.5.3. <i>Deney Grupları ve Hormon Uygulamaları</i> .....	35
3.5.4. <i>Bisinkoninik Asit (BCA) Analizi</i> .....	36
3.5.5. <i>MTT Analizi</i> .....	37
3.5.6. <i>RT-PCR</i> .....	37
3.5.7. <i>ELISA</i> .....	41
3.6. <i>Çalışma Planı ve Araştırma Takvimi</i> .....	43
3.7. <i>Verilerin Değerlendirilmesi</i> .....	44
<b>BÖLÜM 4: BULGULAR</b> .....	45
4.1. <i>Hücre Kültürü Bulguları</i> .....	45
4.2. <i>RT-PCR Bulguları</i> .....	46

4.2.1. Doza-bağlı Gruplarda Gal-1 Ekspresyonu .....	46
4.2.2. Doza-bağlı Gruplarda Gal-3 Ekspresyonu .....	47
4.2.3. Zamana-bağlı Gruplarda Gal-1 Ekspresyonu .....	48
4.2.3. Zamana-bağlı Gruplarda Gal-3 Ekspresyonu .....	49
4.3. ELISA Bulguları .....	50
4.3.1. Doza-bağlı Grupların Gal-1 ELISA Bulguları .....	50
4.3.2. Doza-bağlı Grupların Gal-3 ELISA Bulguları.....	51
4.3.3. Zamana-bağlı Grupların Gal-1 ELISA Bulguları.....	52
4.3.3. Zamana-bağlı Grupların Gal-3 ELISA Bulguları.....	53
4.4. MTT Bulguları .....	54
BÖLÜM 5: TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	55
5.1. Tartışma .....	55
5.2. Sonuçlar. ....	60
5.3. Öneriler .....	60
KAYNAKÇA .....	61

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Galektinlerin doku ve tür dağılımı.....	5
Tablo 2. Kullanılan cihazlar .....	27
Tablo 3. Kullanılan sarf malzemeleri .....	29
Tablo 4. Hücre ekimi .....	35
Tablo 5. RT-PCR için genlerin forward ve reverse primer dizileri .....	40
Tablo 6. Araştırma takvimi .....	44



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Galektin ailesi üyeleri .....	4
Şekil 2. Çalışma Planı .....	43
Şekil 3. Ishikawa hücrelerinin inverted mikroskop görüntüleri .....	45
Şekil 4. Doza-bağlı gruplarda Gal-1 Ekspresyonu .....	46
Şekil 5. Doza-bağlı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu .....	47
Şekil 6. Zamana-bağlı gruplarda Gal-1 Ekspresyonu .....	48
Şekil 7. Zamana-bağlı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu .....	49
Şekil 8. Doza-bağlı grupların Gal-1 ELISA grafiği .....	50
Şekil 9. Doza-bağlı grupların Gal-3 ELISA grafiği .....	51
Şekil 10. Zamana-bağlı grupların Gal-1 ELISA grafiği .....	52
Şekil 11. Zamana-bağlı grupların Gal-3 ELISA grafiği .....	53
Şekil 12. Östradiol ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi .....	54
Şekil 13. Progesteron ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi .....	54

## KISALTMALAR LİSTESİ

CRD	: Carbohydrate recognition domain
DBF	: Dibenzofuran
E1	: Östron
E2	: 17 $\beta$ -Östradiol
E3	: Östriol
EK	: Endometriyal karsinom
ER	: Östrojen Reseptörü
Gal-1	: Galektin-1
Gal-3	: Galektin-3
HIF-1	: Hipoksi indüklenbilir faktör-1
KDa	: Kilodalton
mAB	: Monoklonal antikor
OSD	: Oligosakkarit türevleri
P4	: Progesteron
PR	: Progesteron Reseptörü
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SCID	: Ciddi kombine immün yetmezlik
TCR	: T hücre reseptörü
TDG	: Tiyodigalaktozit
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

# BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ

## *1.1. Galektinlerin Tanımı ve Önemi*

Önceden S-tipi lektinler olarak adlandırılan galektinler, bütün organizmalarda en yaygın şekilde eksprese edilen lektin sınıfı olan bir protein grubunu temsil eder (Arthur et al., 2015) Lektinler karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir, bazı şeker kısımları veya yapıları için yüksek özgüllük sergilerler. Lektinler günümüzde çeşitli hücreSEL veya fizyolojik düzenlemelerde önemli rolleri olan modülatörler olarak bilinmektedir (Wang et al., 2019). Galektinler ekstraselüler alanda hücre yüzeyi ve hücre dışı matris glikanlarına bağlanır ve bu sayede çeşitli hücreSEL süreçleri etkilerler. Bununla birlikte galektinler, sitozol ve çekirdekte de tespit edilebilir ve diğer sitoplazmik ve çekirdek proteinleriyle protein-protein etkileşimleri yoluyla hücre içi sinyal yolları gibi hücreSEL fonksiyonları etkileyebilir (Yang, Rabinovich ve Liu, 2008).

Üreme tıbbı ve plasenta araştırmaları alanında galektinler için farklı işlevler önerilmiştir. İmplantasyonun inflamatuvar bir süreç olarak kabul edildiği ve bu nedenle bağışıklık faktörleri tarafından modüle edildiği kabul edilmektedir. Bu bağlamda, lökositlerin ortama çağırılması ve düzenlenmesi galektinlerin dahil olmasını gerektirir. Galektinler Th1 hücrelerinde apoptozun, immün toleransda rolü olan Treg hücreleri ve dendritik hücrelerin farklılaşmasının indükleyicileri olarak bildirilmişler (Blidner ve Rabinovich, 2013). Galektinler aynı zamanda, endometriyal immün sisteme sürekli meydan okuyan bakterilere karşı savunmaya katkıda bulunabilirler (Almkvist ve Karlsson, 2002).

İnsan endometriyumunda Gal-1, 3, 4, 9 ve 12 bildirilmiştir (Chou et al., 2018). Bunlardan sadece Gal-1 ve Gal-3 yüksek oranlarda bulunmuştur (von Wolff et al., 2005).

İmmunohistokimyasal çalışmalar, Gal-1'in esasen endometriyal stromada yer aldığı, Gal-3'ün ise endometriyal glandüler epitelde bulunduğu işaret etmektedir. Bu galektinler menstrual döngü boyunca farklı ekspresyon paternleri gösterirler. Gal-1'in menstrual döngü boyunca geç sekretuar evrede ve erken gebelik döneminde belirgin bir şekilde yükseldiği gösterilmiştir (von Wolff et al., 2005). Gal-1'in hem

insan endometriyumunda, hem de desiduada immünomodülatör rolü oynadığı ifade edilmektedir (Smetana et al., 1999) Gal-3 de implantasyon penceresi sırasında yüksek oranda eksprese edilerek hemen hemen Gal-1'e benzer bir ekspresyon paterni sergiler (Lee et al., 1998). Gal-1 ve Gal-3'ün menstrual döngü evrelerinde farklı ekspresyonlara sahip olmaları bu galektinlerin ekspresyonlarının ovaryan steroidlerle düzenlendiğine işaret eder.

### ***1.2 Ishikawa hücrelerinin tanımı ve önemi***

Üreme biyolojisi alanında sık kullanılan endometriyal hücre hatlarından biri de Ishikawa hücre hattıdır.

Ishikawa hücre hattı ilk olarak (Nishida et al., 1985). 39 yaşındaki bir kadından alınan endometriyal adenokarsinom G1'den kurulmuştur. Bu hücrelere ait özellikler: (a) tek tabakalı form; (b) popülasyon ikiye katlama süresi 36 saat (9. nesil); (c) diploid kromozom; (d) Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), in vitroda olduğu kadar ksenografıta da pozitif; (e) büyüme için östrojen bağımlılığı yok; (f) tip I Endometriyal karsinom (EK).

Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), endometriyal kanserler için en geçerli prognostik biyobelirteçlerdir (Salvesen, Haldorsen ve Trovik, 2012). Endometriyal karsinomu bulunan 832 hastadan alınan küretaj numunelerinde ER ve PR'yi değerlendiren prospektif bir çalışmada, ER ve PR çift kaybının bağımsız olarak lenf nodu metastazı ve daha kısa hastalığa özgü sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. (Trovik et al., 2013). Farklı çalışmalar da düşük dereceli endometriyal karsinom alt tiplerinde bile ER ve PR olumsuzluklarını kötü sağkalım ile ilişkilendirmiştir (Engelsen et al., 2008; Werner ve Salvesen, 2014).

Ishikawa hücreleri, glandüler ve luminal epitel özelliklerini gösterirler. Bu hücreler normal endometriyumda bulunan birçok enzim, protein ve steroidi içerdiklerinden, endometriyum fonksiyonunu incelemek için uzun zamandan beri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese etmeleri bu hücre hattını endometriyal endokrin çalışmalar için mükemmel bir model haline getirmektedir.



### ***1.3. Araştırmanın Amacı***

Çalışmanın amacı bir endometriyal adenokarsinom hücre hattı olan Ishikawa hücre hattına östrojen ve progesteronun ayrı ayrı veya birlikte verilmesi ile galektin-1 ve galektin-3 ekspresyonlarında mRNA ve protein düzeyinde meydana gelen değişiklikleri belirlemektir.

### ***1.4. Araştırmanın Hipotezi***

Östrojen ve progesteron endometriyal adenokarsinom hücre hattında Galektin-1 ve Galektin-3 mRNA ve protein düzeylerini değiştirir.



## BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER

### 2.1. Galektinler

Galektinler,  $\beta$ -galaktozid bağlayan karbonhidrat bağlayıcı proteinlerdir. Galektinler hücre yüzeyinde, hücre çekirdeğinde, sitoplazmada bulunabildikleri gibi ekstraselüler alanda da bulunabilirler. Hücre dışında galektinler hücre yüzeyine ve matris glikanlarına bağlanarak çeşitli hücresel süreçleri etkilerler. Aynı zamanda, sitoplazmik ve çekirdek proteinleriyle etkileşerek yoluyla hücre içi sinyal yolları üzerinden hücresel fonksiyonları da etkileyebilirler. Galektinlerin knock-out edildiği hayvan modellerini kullanan veya susturulduğu ya da inhibe edildiği güncel araştırmalar, galektinlerin immün ve enflamatuvar yanıtlar, tümör gelişimi ve ilerlemesi, nöral dejenerasyon, ateroskleroz, diyabet ve yara onarımı dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde önemli roller oynadığını göstermektedir.

Tüm galektinler, karbonhidrat bağlanmasından sorumlu olan yaklaşık 130 amino asitlik korunmuş karbonhidrat tanıma alanları (Carbohydrate Recognition Domain; CRD'ler) içerir. Bu CRD'lerin sayısı ve tipine göre galektin tipleri: a) *prototipik* galektinler; bir CRD'ye sahiptir (galektin-1, -2, -5, -7, -10, -11, -13, -14 ve -15); b) *tandem-tur-tipi* galektinler, 70 amino aside kadar (galektin-4, -6, -8, -9 ve -12) bir bağlayıcı ile ayrılmış tek bir polipeptit zincirinde iki homolog CRD içerir; ve c) *galektin-3*, bir CRD'ye bağlı bir non-lectin N-terminal bölgesi (yaklaşık 120 amino asit) içerir (Şekil 1.) (Yang, Rabinovich ve Liu, 2008).



Şekil 1. Galektin ailesi üyeleri (Kaynak: Bertuzzi et al., 2020)

Galektinler, sitozolik proteinler olarak sentezlenir ve ömürlerinin çoğunda sitozol ya da çekirdekte bulunurlar (Cummings ve Liu, 2009). Galektin ailesi üyeleri klasik bir sinyal dizisi içermemelerine rağmen salgılanabilirler ve bu nedenle, bir sinyal dizisi içermeyen ancak hücrelerin dışında işlev görebilen proteinler grubuna aittirler (Nöske ve Weidner, 1999).

Galektin CRD'leri (ya da diğer parçaları) ayrıca karbonhidrat olmayan bağlanma alanlarına sahiptir (Kim et al., 2013; Li et al., 2013). Tüm hücreler, bazen 5µM'a kadar yüksek sitozolik konsantrasyonlarda galektin eksprese edebilirler ancak hücre tipleri ve dokulara göre galektin ekspresyonları farklılık gösterir (Lindstedt et al., 1993) (Tablo 1.).

Tablo 1. Galektinlerin doku ve tür dağılımı (Kaynak: Johannes, Jacob ve Leffler, 2018)

Galektin	İnsan ve kemirgenlerde doku dağılımı	Türler (en yakın akrabaa)
Galektin-1	Birçok doku ve hücre tipinde ifade edilir	Omurgalılar
Galektin-2	Gastrointestinal sistem, plasenta	<i>Kuşlar ve memeliler, kurbağalar, kertenkeleler</i>
Galektin-3	Özellikle makrofajlar ve epitel hücrelerinde öne çıkan birçok doku ve hücre tipinde ifade edilir	<i>Omurgalılar</i>
Galektin-4	Bağırsak ve mide, rahim epitel hücreleri, kan damarı duvarları, hipokampal ve kortikal nöronlar	<i>Omurgalılar (çoğu kuş hariç)</i>
Galektin-5	Akciğer, böbrek, retikülositler, kemik iliği, eritrositler	<i>Sıçan (galektin-9, C-CRD)</i>
Galektin-6	Gastrointestinal sistem, karaciğer, böbrek, dalak, kalp	<i>Bazı fare türleri (galektin-4)</i>
Galektin-7	Gastrointestinal sistem, tabakalı epitel, deri, fetal kalp	<i>Memeliler (galektin-4, N-CRD)</i>
Galektin-8	Karaciğer, böbrek, kalp kası, akciğer ve beyin	<i>Omurgalılar</i>
Galektin-9	T lenfositler, ince bağırsak, karaciğer, uterin epitel hücreleri, deri epidermisi ve özofageal epitel	<i>Omurgalılar</i>
Galektin-10	Eozinofiller	<i>Primatlar, yarasalar (galektin-4, N-CRD)</i>
Galektin-12	Yağ dokusu	<i>Omurgalılar (galektin-8)</i>
Galektin-11 <sup>b</sup>	Abomasal mukoza (geviş getirenler), epitel hücreleri	<i>Ruminantlar (galektin-4, N-CRD)</i>
Galektin-14 <sup>b</sup>	Safra Yolları	
	Eozinofiller	<i>Ruminantlar (galektin-4, N-CRD)</i>

### **2.1.1 Galektinlerin bağlanma aktiviteleri**

Galektin CRD'leri hafifçe eğilmiş  $\beta$ -sandviç gibi bükülür (Leffler et al., 2002; Di Lella et al., 2011) (Şekil 1.). İçbükey S tarafı, bir tetrasakkaridi tutabilecek sıg bir oluk oluşturur (A-B-C-D; Şekil 2.). Galaktoz bağlama alanı (C), bu oluk içinde yer alır. Galaktoz bağlama sahasının her iki tarafındaki daha zayıf bölgeler, bağlanmayı artırabilmekte veya azaltabilmektedir. Böylelikle her bir galektin CRD'sine benzersiz özgülüğünü ve daha büyük glikokonjugatlar için daha yüksek afinite sağlar (Hirabayashi et al., 2002; Leffler et al., 2002; Salomonsson et al., 2010; Kamili et al., 2016).

Galektinler, fizyolojik konsantrasyonlarda çözelti içinde büyük ölçüde monomerik olsalar da (Salomonsson, et al., 2010; Lepur et al., 2012), birçok glikokonjugat ligandları çapraz bağlayabilir ve bunların kümelenmesine neden olabilirler. Örneğin, galektin-1 zayıf dimer oluşturur (Salomonsson et al., 2010; Di Lella et al., 2011) ve dimerizasyonu ligand ile karşılaşması üzerine artabilir. Galektin-3, yüksek konsantrasyonlara (100  $\mu$ M) kadar monomeriktir, ancak ligandlarla kümelenebilir ve N-terminal CRD olmayan bölgesi tarafından henüz tam olarak anlaşılmamış bir oligomerizasyon mekanizması aracılığıyla hücreleri aglütine edebilir (Massa et al., 1993).

### **2.1.2. Sitozol ve çekirdekte galektinler**

Galektinler, işlevsel olarak birbirleriyle bağlantılı görünmeyen sitozolik ve nükleer ligandlar grubu ile etkileşime girerler (Haudek et al., 2010). Genel olarak Galektin-3, bazal cisimler ve sentrozomlarla etkileşir ve yokluğu, mikrotübüllerin düzensizliğine ve birincil silya (Koch et al., 2010) ve hareketli solunum epitel sillerinin (Clare et al., 2014) morfogenezinin bozulmasına neden olabilir. Dahası galektin-3, kutup cisminin oluşması için gerekli, önemli bir mitotik düzenleyici olan nükleer mitotik aparat proteini (NuMa) ile etkileşebilmektedir (Magescas et al., 2017).

Galektinler için bir başka sitozolik fonksiyon örneği olarak, galektin-3'ün  $\beta$ -katenin ve Wnt sinyal yolu (Shimura et al., 2005), ve apoptozun düzenlenmesi için Bcl2 (Harazono, Nakajima ve Raz, 2014) ile ilişkisini gösterilebilir.

Galektin-1 ve galektin-3, çekirdekte pre-mRNA'ların kırılmasında ve aynı zamanda gen ekspresyonunda rol oynar (Dagher, Wang ve Patterson, 1995; Vyakarnam et al., 1997). Her iki galektinin, mRNA işleme ve nükleer taşınmada işlevsel olarak role sahip olduğu gösterilmiştir (Wang et al., 2006). Galektin-3'ün aynı zamanda farklı mekanizmalar yoluyla transkripsiyonun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Kang et al., 2016).

### **2.1.3. Bozulmuş veziküllerdeki galektinler ve klasik olmayan salgı**

Galektinler, bozulmuş endositik veziküller veya kompartmanlar etrafında hızla birikirler. Bu fenomen ilk olarak galektin-3 için, lizise uğramakta olan *Shigella* içeren vakuollerde keşfedilmiştir. Daha sonra, adenovirüs içeren endozomlarda galektin-3 (Maier et al., 2012) ve sonradan da galektin-1 ve galektin-9 için de aynı mekanizma gözlemlenmiştir (Thurston et al., 2012). Ayrıca galektinler, nörodejeneratif hastalıklarda bozulan endozomlar etrafında da birikir (Flavin et al., 2017; Jiang et al., 2017). Galektinlerin bozulmuş veziküllerin etrafındaki birikimi çok hızlı bir şekilde gelişir (dakikalar içinde) ve immünohistokimya veya GFP-konjuge galektinler kullanılarak tespit edilebilir (Paz et al., 2010). Bu nedenden dolayı galektinler, hücre kültüründe ve in vivoda vezikül bozulmasını tespit etmek için (Aits et al., 2015) yararlı bir araç haline gelmiştir (Stegmayr et al., 2016).

Galektinlerin bozulmuş veziküller etrafında birikmeleri ve luminal glikanlara bağlanabilmeleri, otofaji ve galektinlerin klasik olmayan salgılanması arasında mekanik bir bağlantı sağlayabileceği önerisine yol açmıştır (Hughes, 1999). Bununla birlikte, bir başka çalışmada, N-bağlantılı glikoproteininin olgunlaşmasının, sitozolden hücre dışı boşluğa galektin-3'ün taşınması için gerekli olmadığını ve salgılanan galektin-3'ün, ağırlıklı olarak serbest halde bulunduğu ve hücre dışı veziküllerle paketlenmediği gösterilmiştir (Stewart et al., 2017). Bu nedenlerden dolayı, galektinlerin klasik olmayan salgılanma mekanizması belirsizliğini korumaktadır (Johannes, Jacob ve Leffler, 2018).

#### ***2.1.4. Hücre dışı ve intraveziküler kompartmanlardaki galektinler***

Klasik olmayan salgılanma mekanizmasıyla salgılanmalarını takiben galektinler, galaktoz içeren glikoproteinler ve glikolipidler gibi ligandlarla karşılaştıkları ekstraselüler alana geçerler. Galektinler, endositoz yoluyla hücelere tekrar girebilmekte (Furtak, Hatcher ve Ochieng, 2001) ve endositik veya geri dönüşüm kompartmanlarına yerleşebilmektedirler (Stechly et al., 2009; Straube et al., 2013).

Galektinler, intraveziküler glikoprotein kargolarının taşınmasını da düzenlerler. Galektin-3 ve galektin-4, hücre yüzeyinden içeri girdikten sonra endozomal organellerde birikirler (Stechly et al., 2009). Alternatif olarak, sitozolden direkt endozomların lümenine geçtikleri bir yol mümkün olsa da bu yol henüz kanıtlanamamıştır. Her iki galektin de ligandlarını apikal hücre yüzeyine kadar taşır, burada apikal ortama girerler ve yeni bir apikal protein taşıma turu için endozomal organellere tekrardan dahil edilirler (Stechly et al., 2009; Straube et al., 2013). Bu iki galektinin ortamda olmadığı durumlar, ilgili glikoproteinlerin bazolaterale doğru yanlış yönlendirilmesine yol açtığı için galektinlerin, proteinlerin apikale yönlendirilmesinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Delacour et al., 2005, 2006).

Hücre dışı galektinler ayrıca hücre yüzeyinden sinyal indüksiyonuna katılırlar ve hücre dışı matriks ve matriks içi etkileşimleri modifiye eder (Di Lella et al., 2011; Arthur et al., 2015; Thiemann ve Baum, 2016; Gordon-Alonso et al., 2017). Galektin-1 bağlanmasının inhibisyonunun, Th1 hücrelerini apoptoza daha dirençli hale getirdiği ileri sürülmektedir (Di Lella et al., 2011).

#### ***2.1.5. Galektinlerin hücre dışı ve sitozolik fonksiyonları arasındaki bağlantı***

Galektinlerin sitozolik ve çekirdekteki lokalizasyonu ve fonksiyonları (Haudek et al., 2010) neredeyse hücre dışı olanlar kadar bilinmektedir (Di Lella et al., 2011) ve bu, hücre içi ve hücre dışı galektin fonksiyonlarının ilişkili olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Galektin-1, kültürdeki miyoblastlarda ağırlıklı olarak hücre içinde yer alırken, bu hücrelerin miyotüplere farklılaşmaları üzerine ağırlıklı olarak hücre dışı bir lokalizasyona geçmektedir (Massa et al., 1993). Gelişmekte olan meme bezi epitel hücrelerinde, galektin-1 esas olarak sitozol ve uç tomurcuk hücrelerinin çekirdeğinde bulunurken, boşaltım kanalı hücrelerinde hücre yüzeyinde veya hücre dışında lokalize

olmaktadır (Bhat et al., 2016). Ayrıca, galektin-1'in meme boşaltım kanalı hücrelerinde glikokonjugatlara bağlandığı ve bu etkileşimin galektini hücre dışı bir konuma çekebileceği ileri sürülmüştür (Bhat et al., 2016). Bu tür bir mekanizma, hücre dışı galektin-1 bağlayıcı glikokonjugatların galektin konsantrasyonunu ve sitozol ve/veya çekirdekteki ilişkili fonksiyonlarını azalttığı düzenleyici bir döngü sağlayabilir.

### ***2.1.6. Galektin inhibitörleri***

Galektinlerin hücrel ve patofizyolojik süreçlerdeki rolleri hem potansiyel ilaç öncülleri hem de hücre biyolojisinde deneysel araçlar olarak inhibitörlerinin araştırılmasına yol açmıştır. Son zamanlarda birçok çeşidi olan küçük moleküllü inhibitörler ele alınmıştır (Campo et al., 2016).

Galektinler arasındaki seçiciliği ve farmakokinetik özelliklerini optimize etmek amacı ile çok sayıda bileşik geliştirilmektedir (Delaine et al., 2016). Son zamanlarda, yalnızca bir şeker kalıntısı içeren yeni bir galektin inhibitörleri sınıfı geliştirilmiştir (Zetterberg et al., 2018). Bu inhibitörler, zardan geçebilen ve oral yoldan alınabilen ilk potent galektin inhibitörlerini oluşturur. Modifiye turuncgil pektini veya galaktomannanlar gibi bazı bitki kaynaklı polisakkaritlerin de, galektin-3'ün farmakolojik inhibitörleri olarak davrandığı öne sürülmüştür ve hatta bazıları klinik deneylere kadar gelebilmiştir (Glinsky ve Raz, 2009; Traber ve Zomer, 2013; Demotte et al., 2014).

### ***2.1.7. Organizma düzeyinde hususlar***

Yukarıda açıklanan biyokimyasal ve hücre ve organizma çalışmalarından, galektinlerin veya ligandlarının manipüle edildiği genetik teknikler ya da galektin inhibitörleri veya galektinlerin kendileri kullanılarak elde edilen kanıtlardan, galektinlerin enflamasyon, bağışıklık, kanser ve diğer birçok hastalığı fizyolojik ve patofizyolojik işlevleriyle ilgili birçok kanıt ulaşılmıştır. (Johannes, Jacob ve Leffler, 2018).

Galektinler, homeostaz, apoptoz, anjiyogenez, embriyogenez dahil olmak üzere birçok farklı fizyolojik süreçte ve preeklampsi, inflamasyon, diyabet, ateroskleroz ve kanser gibi patolojik durumlarda geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesine sahiptir





ekspresyonu ve salınımı, muhtemelen bir organizmanın hücre içi ve hücre dışı kompartmanlarında optimum bir galektin seviyesinin ayarlanmasına neden olur. Bu, doğrudan galektin ile uyarılan sinyalizasyona (örneğin, T-hücrelerinde apoptozun uyarılması) veya T-hücre reseptörü, VEGF reseptörü, TGF reseptörü ve insülin reseptörü gibi glikolize reseptörlerin galektin-aracılı hücre yüzeyine çıkarılması veya yanal organizasyonuna neden olur. Bunun sonucunda anjiyogenez ve lenfanjiyogenezin indüksiyonu, kronik inflamasyonda fibrozis ve diğer immün yanıtlar görülebilir (Blidner et al., 2015; Thiemann ve Baum, 2016).

Buna karşılık, galektinlerin sitozolik ve nükleer faaliyetlerinin organizma işlevlerine katkısı çok daha az bir kapsamda ele alınmıştır. Hasarlı veziküllerin çevresinde galektinlerin birikiminin nörodejeneratif hastalıklarda gözlemlendiği gibi organizma üzerindeki etkileri de gösterilmiştir (Aits et al., 2015). Bu nedenle, in vivo da vezikülü bozan aktivitelerin tayini için yararlı bir belirteç olabilirler (Flavin et al., 2017; Jiang et al., 2017). Diğer bir örnek, galektin-3'ün canlı organizma içindeki hava yolu silleri ve diğer silleri organize etmedeki rolüdür (Clare et al., 2014). Galektinlerin bu rolleri, yukarıda tarif edildiği gibi hücre dışı aktivitelerine de bağlanabilir ve galektin inhibitörlerinin terapötik ajanlar olarak ele alınmalarına neden olmuştur. Bu tür ajanlar, galektin-1, -3 ve -9'un kanserdeki immünosupresif ve anjiyogenezini indükleyici etkilerini inhibe etmek, gözde istenmeyen anjiyogenezini önlemek (Chen et al., 2017) ve kronik inflamasyonda fibrozisi azaltmak (Delaine et al., 2016) için kullanılmışlardır.

## **2.2. Galektin-1**

Galektin-1, 22q12 kromozomunda bulunan LGALS1 geni tarafından kodlanır (Camby et al., 2006). Promotörün metilasyon durumu, galektin-1 ekspresyonunu düzenleyen anahtar bir mekanizmadır (Chiariotti et al., 2002).

İnsan galektin-1 proteini 135 amino asit uzunluğundadır ve türler arasında yüksek oranda korunur. Çekirdekte, sitoplazmada, hücre yüzeyinde ve hücre dışında bulunabilir (Liao et al., 1994).

Galektin-1, alt birim başına bir CRD'ye sahip olan 14 KDa'lık bir monomer veya kovalent olmayan bir homodimerdir (Camby et al., 2006). Homodimerde birden fazla CRD'nin varlığı Gal-1'i, hücre yapışmasına aracılık etmek, hücre içi sinyalizasyonunu tetiklemek ve aynı zamanda hücre yüzeyi glikokonjugatlarıyla multivalent kafesler oluşturmak için uygun hale getirmektedir (Leffler et al., 2002). Galektin-1'in salgılanma mekanizması hala belirlenmemiş olsa da hücre dışı varlığı ve işlevi iyi öğrenilmiştir (Hsu ve Liu, 2002; Rabinovich et al., 2002; He ve Baum, 2004; Seelenmeyer et al., 2005). Son zamanlarda, galektin-1 için afiniteye sahip hücre yüzeyi glikanlarının, galektin-1'in klasik olmayan salgılanması için önemli olduğu gösterilmiştir (Thijssen et al., 2006).

### **2.2.1. Galektin-1 lokalizasyonu ve ekspresyonu**

Galektin-1, nöral kök hücre büyümesi, hematopoiez ve kas diferansiasyonu dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik süreçte rol oynar. Ek olarak, son yıllarda toplanan kanıtlar, galektin-1 ekspresyonundaki artışın hücre transformasyonu, hücre proliferasyonu, anjiyogenez, hücre adhezyonu ve invazyonu, ve immünosupresyondaki pleiotropik rolleri göz önüne alındığında tümör progresyonunu dramatik şekilde etkileyebileceği kanısına varılmasına neden olmuştur (Paz et al., 2001; Van den Brûle et al., 2003).

Hücre içi galektin-1 çekirdek, sitoplazma ve hücre membranının iç kısmında bulunabilir. Galektinlerin diğer üyeleri gibi, galektin-1 de aynı şekilde, standart endoplazmik retikulum / Golgi yolağıyla salgılama için gerekli sinyal dizileri olmamasına rağmen hücre dışı alana salgılanabilirler . Hücre dışı galektin-1, hücre

lizatlarında bulunan 14 kDa'luk hücre içi formuna kıyasla biraz daha yüksek moleküler ağırlığa (~15 kDa) sahiptir, bu da salgılanan galektin-1'in sekresyondan önce veya sonra başka post-transasyonel modifikasyonlara maruz kaldığını düşündürmektedir.

Normal hücrelerde, ekstraselüler alanda daha az salgısal galektin-1 vardır; çoğunluğu sitoplazma ve çekirdekte bulunmaktadır. Normal dokuların endotel hücrelerinde, galektin-1 esas olarak çekirdekte lokalize olur ve hücre aktivasyonu sonrası hücre dışı alana çıkar (Thijssen, Hulsmans ve Griffioen, 2008).

Hücre-matriks adhezyonundaki rolü göz önüne alındığında, hücre dışı galektin-1'in, aktifleşmiş endotel hücrelerinin ekstrasellüler matrikse yapışması ve göçü için gerekli olduğu tahmin edilmektedir, bu da fizyolojik anjiyogenezde önemli bir işlevi olduğunu düşündürmektedir (Elola et al., 2007).

Normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde galektin-1 ekspresyonunda artış bildiren kapsamlı literatür bulunur (Van den Brûle et al., 2003; Kim et al., 2013). Ayrıca, normal dokuya kıyasla çeşitli tümör tiplerinde kanser hücrelerinin ve tümörle ilişkili endotel hücrelerinin ekstraselüler alanında daha yüksek bir seviyede bulunduğu tespit edilmiştir (Thijssen, Hulsmans ve Griffioen, 2008; Croci et al., 2012).

### **2.2.2. Galektin-1 ve kanser**

Artmış galektin-1 ekspresyonu kolon, meme, akciğer, baş ve boyun, yumurtalık ve prostat kansinomların yanısıra, gliomalar, Kaposi sarkoması, miyeloproliferatif neoplazi ve Hodgkin lenfomasında da rapor edilmiştir (D'Haene et al., 2005; Szöke et al., 2005; Saussez et al., 2008; Barrow, Rhodes ve Yu, 2011; Croci et al., 2012). Bunlardan başka hem tümör hücrelerini çevreleyen stromada hem de kanserle ilişkili endotel hücrelerinde galektin-1'in aşırı eksprese edildiği saptanmıştır. Kolorektal kansinomlu veya baş ve boyun skuamöz hücreli kansinomlu ve kötü prognozlu hastaların plazmasında yükseldiğine dair veriler mevcuttur (Saussez et al., 2008).

Bunların yanısıra kolon, pankreas ve mesane tümörlerinde yapılan çalışmalarda, farklılaşmış tümörler veya normal bitişik dokular ele alındığında , az farklılaşmış ve

invaziv tümörlerde galektin-1 seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiği gösterilmiştir (Langbein et al., 2007; Chung et al., 2008). Mide ve serviks kanserinde son zamanlarda yapılan iki çalışma, galektin-1 ekspresyonu ile tümör evresi, tümör invazyonu ve lenf nodu metastazı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu öne sürmektedir (Chen et al., 2013; Kim et al., 2013). Kaposi sarkomu, kolon, meme, prostat ve mide kanserindeki benzer bulgular, galektin-1 ekspresyonu ile sağkalım arasındaki ilişkinin varlığına dair kanıtları güçlendirmektedir (Jung et al., 2007; Chen et al., 2013). Yapılan araştırmalar bu lektinin olası bir biyobelirteç olarak uygunluğunun altını çizmekte veya kanserde terapötik hedef olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedir.

### ***2.2.3. Galektin-1 ve tümör proliferasyonu***

Birkaç çalışmada hücre dışı galektin-1'in hücre döngüsü düzenlemesindeki rolü ele alınmıştır (Fischer et al., 2005). Yapılan araştırmalarda hücre dışı galektin-1'in, meme kanseri hücre hatlarında S'den G2 fazına geçiş sırasında hücre döngüsünü durdurduğu, bunu da apoptoz aktivasyonunun izlediği görülmüştür. Hücre dışı galektin-1,  $\alpha 5\beta 1$  integrin ile etkileşimi yoluyla hepatokarsinom, melanom, meme, yumurtalık ve kolon karsinomu dahil olmak üzere farklı kökenlerden tümör hücre hatlarında büyümeyi inhibe eder (Fischer et al., 2005).

Ekzojen galektin-1, trofoblastik tümör hücrelerinde proliferasyonu doza bağlı olarak azaltır (Jeschke et al., 2006). Başka bir çalışmada insan nöroblastom hücrelerinde, galektin-1'in gangliosid GM1 ile etkileşime girerek hücre-hücre ve hücre-stroma etkileşimlerini bozduğu ve bununla da hücre proliferasyonu inhibe ettiği kanısına varılmıştır (Kopitz et al., 2001).

Tüm bunların aksine, bazı çalışmalar ise galektin-1'in tümör hücresi büyümesini destekleyebileceğini göstermektedir. Kültürdeki glioma hücrelerinde plazmid transfeksiyonu aracılığıyla geliştirilen galektin-1 ekspresyonu, hücre proliferasyonunun artmasıyla sonuçlanmıştır. Ek olarak, ekzojen galektin-1 yumurtalık ve pankreas kanseri hücrelerinde in vitro hücre proliferasyonunu indüklemektedir (Kim et al., 2012). Ayrıca birkaç çalışma, farklı farmakolojik veya biyokimyasal yaklaşımlar kullanarak galektin-1 inhibisyonunun tümör büyümesi inhibisyonu sağladığını göstermiştir. Antisens mRNA veya siRNA ile galektin-1

inhibisyonu, sırasıyla glioblastoma hücrelerinde ve servikal kanserde in vitro hücre proliferasyonunu baskılamıştır (Kim et al., 2013).

Galektin-1'in immün yanıt inhibisyonu yoluyla kanser ilerlemesinde rol oynadığını dikkate almak çok önemlidir. Kanserde aşırı galektin-1 ekspresyonu, tümörün artan T hücre yanıtına karşı savunmasını güçlendirebilir. Bir çalışmada, galektin-1'in inhibitör etkisinin bloke edilmesinin, tümör büyümesini azalttığı ve dolayısıyla tümör reddini artırdığı gösterilmiştir (Rubinstein et al., 2004).

Birkaç rapor galektin-1'in tümör proliferasyonu üzerindeki olumlu ve olumsuz etkilerine değinmiştir. Bu sonuçlardaki çelişkilerin hücre tipine, tümör immün ayrıcalığına, hücre aktivasyon durumuna, monomerik / dimerik formlar arasındaki orana veya spesifik hücre yüzeyi glikoproteinleri veya hücre içi proteinlerle galektin-1 etkileşimine oldukça bağımlı olduğu görünmektedir (Camby et al., 2006).

#### ***2.2.4. Galektin-1 ve tümör anjiyogenezi***

Tümör kaynaklı anjiyogenezi, patolojik bir durum olup vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi tümör hücresi tarafından salgılanan faktörler tarafından indüklenen ve önceden var olan damarlardan yeni kapillerlerin büyümesiyle yeniden modellenen vasküler yapıların anormal yerleşiminden kaynaklanmaktadır. Birkaç çalışmada, galektin-1'in VEGF sinyali gibi anahtar proanjiyogenik yolları artırarak veya endotel hücrelerinin proliferasyonu ve aktivasyonu üzerine etki ederek tümör anjiyogenezi düzenlediği bildirilmiştir (Thijssen et al., 2006; Delaine et al., 2008; Hsieh et al., 2008).

Galektin-1, normal dokuların endotel hücrelerinde zayıf bir şekilde eksprese edilirken, kolon ve meme tümörlerinin proliferatif endotel hücrelerinde güçlü bir şekilde eksprese edilir. Normal endotel hücrelerinde galektin-1 genellikle çekirdekte lokalize iken, tümörle ilişkili endotel hücrelerinde bu lokalizasyon değişmektedir (Thijssen, Hulsmans ve Griffioen, 2008; Thijssen et al., 2015).

Tümörlerdeki aşırı hücre proliferasyon hızı, yerel oksijen kaynağına büyük bir talep getirir. Ayrıca, anormal tümör damar yapısı kan akışını azaltır ve tümör boyunca

oksijen dağıtımını sınırlar ve bu da hipoksi indüklenebilir faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )'yı uyaran eden hipoksiye neden olur (Semenza, 2007). İlginç bir şekilde, kolon kanseri hücrelerinde HIF-1 $\alpha$ , galektin-1 mRNA'sını ve protein ekspresyonunu arttırmıştır. Bununla uyumlu olarak, galektin-1 ekspresyonu, Kaposi sarkomu, melanomu, meme ve prostat karsinom hücre hatlarında hipoksik koşullar altında artmıştır (Crocì et al., 2012).

Özet olarak, bu bilgiler, tümör damar gelişiminde tümör kaynaklı galektin-1 rolünün altını çizmektedir. Galektin-1'in proanjyogenik özellikleri, esas olarak endotel hücrelerinin artan proliferasyonu, yapışması, göçü ve apoptoza direnci ile ilgilidir.

### ***2.2.5. Kanserde potansiyel bir terapötik hedef olarak Galektin-1***

Galektin-1 inhibisyonu, kanser tedavilerine artan ilginin konusudur. Galektin-1 ve ligandları arasındaki etkileşimleri bloke eden bir dizi yeni bileşik veya farmakolojik yaklaşım değerlendirilmiştir.

Rabinoviç ve diğerleri sentetik laktuloz aminlerin, galektin-1 ve galektin-3 karbonhidrat bağlanmasının güçlü ve spesifik inhibitörleri olduğunu tarif etmişlerdir. Bunların, melanom hücrelerinin galektin-1 aracılı homotipik agregasyonunu önlediğini, endotel hücre göçünü, istilasını ve farklılaşmasını inhibe ettiğini ve küçük hücreli akciğer karsinomu hücre hatlarında apoptozu indüklediğini bildirmişlerdir (Rabinovich et al., 2006). Son zamanlarda, ekzojen oligosakkaritlerin, neoplastik hücrelerin sağ kalımı, yapışması ve göçünde galektinin biyolojik fonksiyonlarının söndürücü ajanları olarak hareket ederek, bu lektinlerin, galektinlerin endojen ligandlarını taklit edebileceği öne sürülmüştür. Doğal galektin ligandlarının oligosakkarit parçalarını taşıyan bir dizi oligosakkarit türevleri (OSD'ler), çeşitli prelinik modellerde potansiyel galektin inhibitörleri olarak çalışılmıştır. OSD'ler melanom hücrelerinin homotipik hücre agregasyonunu azaltmış ve insan küçük hücreli akciğer karsinomunun apoptozunu indüklemiştir. Ne yazık ki bu farmakolojik yaklaşım, benzer CRD alanları taşıyan diğer galektin üyelerini de inhibe edebildiği için özgünlükten yoksundur (Rabinovich et al., 2006).

Sentetik ve metabolize olmayan bir disakkarit olan tiyodigalaktosid (TDG), galektin-1 CRD için nispeten yüksek afinite gösterir. Yakın zamanda yapılan bir çalışma, TDG'nin meme ve kolon ksenograftlarında akciğer metastazı gelişiminde önemli inhibitör etkilerle kanser hücrelerinin endotel hücrelerine yapışmasını azalttığını göstermiştir (Cumpstey et al., 2005). Galektin-1 CRD alanı için yüksek afiniteye sahip yeni TDG türevleri tasarlanmıştır. Bu ikinci nesil TDG'ler, akciğer ve prostat tümör hücrelerinin in vitro göçünü engellemişlerdir (Cumpstey et al., 2007; Delaine et al., 2008).

Croci ve arkadaşları yakın zamanda galektin-1'e özgü monoklonal bir antikorun (mAb) in vivo terapötik yararlarını doğrulamıştır. Bu yeni nötralize edici mAb (F8.G7), galektin-1'in endotel hücrelerine bağlanmasını önleyerek, galektin-1 ile indüklenen endotel hücre proliferasyonunu, göçünü, istilasını ve kapiller tıp oluşumunu inhibe etmiştir (Croci et al., 2012).

Anginex ( $\beta$  pep-25), galektin-1'i hedefler. Anginex, endotel hücrelerde galektin-1'e bağlanarak endotel hücre proliferasyonunu ve göçünü inhibe eder ve hücre ölümünü indükler. Anginex melanom, koryokarsinom ve yumurtalık kanserlerinin prelinik modellerinde, tümör damar yoğunluğunda bir azalma ile birlikte tümör büyümesini doza bağlı bir şekilde inhibe etmiştir (Brandwijk et al., 2006).

Anginex ile elde edilen umut verici sonuçlar göz önüne alındığında, terapötik dozajı azaltmak ve moleküler boyutu en aza indirmek için geliştirilmiş özgüllüğe sahip yeni nesil bileşikler tasarlanmıştır. Anginex'in dibenzofuran (DBF) bazlı peptidomimetği galektin-1  $\beta$ -sandviçinin bir tarafına bağlanır (Dings et al., 2013). DBF tedavisinden sonra çeşitli ksenograft modellerinde tümör büyümesinin ve tümör anjiyogenezinin inhibisyonu tanımlanmıştır. (Mayo et al., 2003).

Kanserde potansiyel terapötik ajanlar olarak galektin-1 inhibitörleri üzerine yapılan çalışmaların çoğu klinik öncesi veya klinik gelişimin erken aşamalarında olduğundan, insanlarda yan etkilere ilişkin veriler henüz tam bildirilmemiştir.

### **2.3. Galektin-3**

Galektin-3, bir C-terminal CRD'ye bağı küçük amino asit segmentlerinin (toplam neredeyse 120 amino asit) ardışık oluşan büyütülmüş bir N-terminal kısmına sahip galektin ailesinin tek üyesidir.

Diğer galektinler gibi, galektin-3 de klasik salgı yolu yoluyla salgılanmak için gerekli bir sinyal dizisinden yoksundur, ancak yine de protein hücre dışı alana salınır.

Galektin-3 çok değerlikli karbonhidrat ligandlarının mevcudiyetinde oligomerize olmaktadır ve hücre yüzeyinde glikanları çapraz bağlama yeteneğine sahiptir. Böylece transmembran sinyal yolaklarını başlatır ve çeşitli hücrel fonksiyonlar üzerinde etkilidir. Bu kendi kendine birleşme özelliği, proteinin N-terminal bölgesine bağlıdır. Bu bölge, kollajenaz ve matriks metalloproteinazlar gibi proteazlara duyarlı olduğundan, *in vivo* galektin-3'ün biyolojik aktiviteleri muhtemelen bu enzimler tarafından modüle edilmektedir (Almkvist ve Karlsson, 2002; Liu ve Rabinovich, 2005).

Diğer galektinlerle karşılaştırıldığında, galektin-3'ün hücre içi işlevleri daha kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Gen transfeksiyonu ve antisens yaklaşımları kullanılarak, galektin-3'ün farklı apoptotik uyarılara karşı bir dizi hücre tipinde anti-apoptotik aktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır. Hücre içi galektin-3'ün apoptoza direnç kazandırdığı mekanizmalar tam olarak aydınlatılmamıştır, ancak mevcut bilgiler, mitokondride faaliyet gösterenler de dahil olmak üzere diğer apoptoz düzenleyicileri ile etkileşimi içerebileceklerini göstermektedir (Huang et al., 2017).

#### **2.3.1. Galektin-3 ve immunoloji**

Galektin-3, çeşitli bağışıklık hücrelerinin farklılaşmasını ve büyümesini etkiler: T hücreleri ve nötrofillerde apoptozu indükler ve mast hücreleri, nötrofiller, monositler ve T hücreleri dahil olmak üzere birçok lenfoid ve myeloid hücreyi aktive etmektedir. Rekombinant galektin-3 ayrıca insan monositlerinin ve makrofajlarının göçünü indüklemeye bir kemokin gibi işlev görebilir (Liu ve Rabinovich, 2005; Elola et al., 2007).



Galektin-3, TCR kompleksi ile kafesler oluşturabilir ve bu mekanizma aracılığıyla, TCR tarafından başlatılan sinyal transdüksiyonunun negatif düzenleyicisi olarak hizmet edebilir. Bu lektinin bazı hücrelerde destekleyici fonksiyonlara sahip olması, ancak diğerlerinde baskılayıcı aktivitelere sahip olması çok şaşırtıcı değildir, çünkü muhtemelen ya pozitif sinyaller veren reseptörlere ya da negatif sinyaller veren reseptörlere bağlanmaktadır (Yang, Rabinovich ve Liu, 2008).

Endojen galektin-3'ün aktiviteleri, galektin-3-yoksun (Lgals32/2) farelerden alınan hücreler kullanılarak ele araştırılmıştır (Elola et al., 2007). Lgals32/2 farelerinden elde edilen peritoneal makrofajlar, vahşi tip farelere kıyasla lipopolisakkarit ve IFN- $\gamma$  tarafından indüklenen apoptoza karşı daha duyarlıdır. Bu, galektin-3'ün anti-apoptotik işlevleriyle tutarlıdır.

Lgals32/2 farelerinin kullanıldığı in vivo çalışmalar, galektin-3'ün enflamatuvar yanıtları desteklediği fikrini desteklemektedir (Elola et al., 2007). Ek olarak, Lgals32/2 fareleri, bir periton iltihabı modelinde vahşi tip farelere göre zayıflamış lökosit infiltrasyonu sergilemiştir. Bu çalışmalar ayrıca galektin-3 tarafından Th2 polarizasyonunun teşvik edildiğini ortaya koydu.

### **2.3.2. Galektin-3 ve tümör gelişimi**

Galektin-3'ün tümör büyümesi, ilerlemesi ve metastazdaki rolü kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Hücre hatlarında galektin-3 ekspresyonunun inhibisyonu ve galektin-3'ün ektopik ekspresyonunu içeren çalışmalardan, tümörlerin transforme fenotipini kazanması ve büyümeleri için galektin-3 ekspresyonunun gerekli olduğuna işaret etmektedir (Liu ve Rabinovich, 2005). Galektin-3'ün hücre transformasyonu ve büyümesine dahil olduğu mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi de bu süreçlere dahil olabilmektedir.

Galektin-3'ün tümör progresyonu ile ilgili en kapsamlı çalışılan işlevi, çeşitli apoptotik uyarılara (kemoterapotik ajanlar dahil) maruz kalan bir dizi tümör hücre tipinde apoptozun inhibisyonudur (Liu ve Rabinovich, 2005). Galektin-3, p53 yolağının aşağı kısmında apoptoz düzenleyici yolda bir efektör molekül olabilmektedir.

### *Metastazdaki rolü*

Rekombinant galektin-3'ün tümör hücrelerinin motilitesini etkilediği ve in vitro invazivliğini etkilediği gösterilmiştir.

Galektin-3, tümörlerin mikroçevresi üzerine etki ederek tümör metastazını da etkileyebilir. Stromada galektin-3 varlığının meme kanserinde olumsuz bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir. Galektin-3, endotel hücrelerinin göçünü indükleme kabiliyeti ile ilişkili olarak in vitro anjiyojenik aktiviteye sahip olmaktadır. Ek olarak, galektin-3'ün karaciğerdeki miyofibroblastların aktivasyonunda kritik bir rol oynadığı ve karbon tetraklorür tarafından indüklenen karaciğer fibrozisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Böylece bu lektin diğer çeşitli fibrotik süreçlere katkıda bulunabilir (Yang, Rabinovich ve Liu, 2008).

Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda galektin-3'ün in vivo tümör metastazındaki rolüne dair kanıtlar sunulmuştur (Liu ve Rabinovich, 2005). Örneğin, ciddi kombine immün yetmezlikli (SCID) farelerde insan adenokarsinom ksenotransplantlarının karaciğer metastazları, anti-galektin-3 antikoru ile inhibe edilebilir. Galektin-3'ü aşırı eksprese eden transgenik meme karsinomu hücreleri, daha yüksek metastatik potansiyele sahip olmaktadır (Prior et al., 2003).

### **2.3.3. Galektin-3 ve diğer patolojik süreçler**

Galektin-3, aterosklerotik lezyonlarda ve makrofajlarda eksprese edilir ve apolipoprotein ile karşılaştırıldığında ateroskleroz gelişmesine katılmaktadır.

Galektin-3 ayrıca yaranın yeniden epitelizasyonunda rol oynayabilir. Lgals32/2 farelerinde kornea epitel yara kapanma oranları, excimer-lazer ablasyonlu kornealar veya in vivo veya in vitro kısmen iyileşmesine izin verilen alkali yanık yaraları dahil olmak üzere çeşitli kornea yara iyileşmesi modellerinde vahşi tip farelere göre önemli ölçüde daha yavaş olduğu görülmüştür. Bu, galektin-3'ün eşzamanlı hücre içi ve hücre dışı etkilerinin yara iyileşmesi için gerekli olabileceğini düşündürmektedir (Yang, Rabinovich ve Liu, 2008).

#### **2.4. Galektin-1 ve Galektin-3'ün Kanserlerle İlişkisi**

Gal-1 ve Gal-3, çeşitli tümörlerde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Thijssen et al., 2015). İnsan endometriyal kanserlerinde, galektin-1 ekspresyonu, normal endometriyum ile karşılaştırıldığında uterus adenokarsinomlarında artmış bir ekspresyon gösterirken, galektin-3 ekspresyonu, normal mukoza ile karşılaştırıldığında endometriyal kanser hücrelerinde azalır (Yang et al., 2012; Al-Maghrabi et al., 2017). İlginç bir şekilde, galektin-3'ün sitoplazmada eksprese edildiği tümörler, galektin-3'ün hem çekirdekte hem de sitoplazmada bulunduğu lezyonlara kıyasla miyometriyumun daha derin bir invazyonu ile karakterize edilmiştir (Chou et al., 2018). İnsan mesane kanseri vakalarında, transizyonel hücreli karsinomlarda galektin-1'in artan mRNA ekspresyonu, histolojik derece ve klinik evre ile pozitif korelasyon göstermiştir (Rubinstein et al., 2004). Galektin-3 seviyelerinin kanser hastalarının kan örneklerinde artmış olduğu gözlemlenmiştir.

#### **2.5. Endometriyal Adenokarsinomlar**

Endometriyal kanser (EK), dünya çapında en yaygın jinekolojik malignitelerden biridir ve bu nedenle halk sağlığı ile ilgili önemli bir sorunu temsil eder (Siegel, Miller ve Jemal, 2015). Amerika Birleşik Devletleri, yıllık 60.000 yeni vaka insidansının yanı sıra 10.000'den fazla ölüm raporlamaktadır. Bu insidansın, obez hastaların epidemisi ile sıkı bir şekilde bağlantılı olduğu bildirilmektedir (Tran ve Gehrig, 2017; Siegel, Miller ve Jemal, 2018). EK, 2014 WHO sınıflandırmasına göre çoklu histolojik alt tiplere ayrılabilir. En yaygın histolojik alt tipler şunlardır: endometrioid (%77); karışık hücre tipi (%7); seröz (%8); karsinosarkom (%3); şeffaf hücre (%2); müsinöz (%1) ve diğer tipler (%1) (Lax, 2016, 2019).

Hücre hatları, kanserin biyolojik mekanizmalarını araştırmak için kullanılabilir. Günümüzde bunlar yaygın olarak in vitro tümör modelleri olarak kullanılmaktadır.

Kanser hücresi araştırmalarının odak noktası, karsinogenezin biyolojik mekanizmalarını ve endometriyumda gözlenen mekanizmalarını ortaya çıkarmak ve anlamaktır. Bu, kanser hücre hatlarının yardımıyla elde edilebilir. Hücre hatlarının kullanımı prelinik kategoriye girer. Hücre hatlarının in vitro tümör modelleri olarak

kullanımı günümüzde oldukça yaygındır ve bazı sınırlılıklara rağmen kanser araştırmalarında güçlü bir araç olarak karşımıza çıkmaktadır (Zhou et al., 2007).

Hücre hatları ilaç geliştirme alanında, özellikle onkoloji alanında sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, daha karmaşık kültür teknikleri ile karşılaştırıldığında, hücre hatları, nispeten hızlı ve ucuz bir şekilde sonuç verme yeteneği ile hala en kararlı kültür tekniğini sağlar.

### ***2.5.1. Sık kullanılan endometriyal hücre hatları***

En yaygın olarak bilinen endometrial CCL, Ishikawa, HEC-1-A, HEC-1-B ve KLE'dir. 2018 yılındaki çalışmalarında, Nyen ve ark. AN3-CA, ECC-1, HEC1A, HEC1B, Ishikawa ve KLE'yi tip I olarak tanımlamıştır (Nyen et al., 2018).

### ***2.5.2. Ishikawa Hücreleri***

Üreme biyolojisi alanında sık kullanılan endometriyal hücre hatlarından biri Ishikawa hücre hattıdır.

Ishikawa hücreleri, glandüler ve luminal epitel özelliklerini gösterirler. Bu hücreler normal endometriyumda bulunan birçok enzim, protein ve steroidi içerirler. Özellikle östrojen ve progesteron reseptörlerini (sırasıyla ER ve PR) eksprese etmeleri bu hücre hattını endometriyal endokrin çalışmalar için mükemmel bir model haline getirmektedir. Bu hücrelerin 25. pasajdan alınan hücrelerinin nude farelere transplante edildiği bir çalışmada ER ve PR pozitif olarak belirlenmiş, ve hatta 50. jenerasyona kadar reseptör pozitivitesi devam etmiştir (Nishida, 2002).

Ishikawa hücre hattı, endometriyum fonksiyonunu incelemek için uzun zamandan beri yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

## **2.6. Östrojen ve Progesteron hormonları**

Östrojen ve progesteron, kadınlarda cinsel ve üreme gelişimi için önemli olan hormonlardır. Östrojen ve progesteron, bir kadının menstrual döngüsünü düzenlemeye yardımcı olur ve gebelikte önemli bir rol oynar. Genellikle 'kadın hormonları' olarak düşünülse de, erkeklerde de hem östrojen hem de progesteron bulunur.

Overler iki grup seks hormonu üretir ve salgılar: östrojen ve progesteron .

### **2.6.1. Östrojenler**

Östrojenler olarak bilinen ve östradiol, östriol ve östron olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Östradiol en potent olan alt tipidir ve primer olarak ovaryan folliküllerden salınır. Daha az potent olan östriol gebelik sırasında karacigerde sentezlenir. En düşük potensi olan östron ise periferik dokularda östradiol ya da androstenediondan oluşturulur.

Bu hormonlar, ergenlik döneminde kadın cinsiyet özelliklerinin sağlıklı gelişimini desteklemek ve doğurganlığı sağlamak için birlikte çalışır.

### **2.6.2. Progesteron**

Progesteron, progestojenler adı verilen bir hormon sınıfına ait bir steroid hormondur. Kadın vücudunun menstrual döngüsünün ikinci yarısında ovülasyondan sonra oluşturduğu geçici bir endokrin bez olan korpus luteum tarafından salgılanır.

Progesteron, ovülasyondan sonraki gebelik potansiyeli için endometriyumu hazırlar. Dölllenmiş bir yumurtayı kabul etmek için mukozanın kalınlaşmasını tetikler. Ayrıca uterusun konseptusu reddetmesine neden olacak myometriyal kasılmalarını da durdurur. Gebelik süresince önce korpus luteum, sonrasında ise plasenta tarafından salgılanan progesteron yumurtlamayı engeller.

Gebeliğin gerçekleşmediği durumlarda, korpus luteum lizise uğrar ve progesteron seviyeleri düşer. Bu, menstruasyonun başlamasını tetikler.

### **2.6.3. Östrojen ve Progesteron reseptörleri ve işlevleri**

ER ve PR, nükleer reseptör süper ailesine aittir. Bunlar, spesifik genlerin ekspresyonunu başlatmak için farklı DNA bölgelerine bağlanabilen ligand bağımlı transkripsiyonel faktörlerdir.

ER; ER- $\alpha$  ve ER- $\beta$  olmak üzere 2 ana izoformda bulunur. Hücresel proliferasyon ve farklılaşma sırasında değişen dokularda belirgin bir ekspresyon paternine sahiptirler (Mueller ve Korach, 2001; Yang, Kriatchko ve Roy, 2002). ER- $\alpha$ , östrojenlere yüksek afinite ve düşük kapasite ile bağlanır. Ağırlıklı olarak endometriyumda bulunur ve östrojene duyarlı dokuların gelişimi için gereklidir. ER- $\beta$  düşük afiniteli ve yüksek kapasiteli östrojenlere bağlanır ve transkripsiyonu inhibe eder. Epitel hücrelerinin organizasyonu ve yapışması ve dolayısıyla farklı doku morfolojisi ve fonksiyonel olgunlaşması için gereklidir.

Progesteron reseptörü (PR), işlevsel olarak farklı iki transkripsiyon faktörü olan 2 izoforma, PR-A ve PR-B'ye sahiptir. PR-A'nın uterusunda progesteronun anti-proliferatif etkilerini, yani östrojen-antagonistik etkisini modüle eder ve PR-A'nın yokluğunda PR-B hücre büyümesini, yani östrojen agonisti etkisini indükler.

PR geninin transkripsiyonunun östrojene yanıt veren hücrelerin çoğunda östrojen tarafından indüklendiği ve progesteron tarafından inhibe edildiği literatürde iyi belgelenmiştir, bu nedenle ER ve PR ekspresyonunun koordineli olduğu düşünülür (Lesniewicz et al., 2009).

### **2.6.4. Menstrual döngü sırasındaki ER ve PR**

Normal bir menstrual döngüde östrojenler, ovulasyon öncesi proliferatif faz ve postovülasyon sırasında endometriyumun epitelyal ve stromal elemanlarının proliferasyonunu indükler. Progesteron, glandüler farklılaşma ve glikojenezin yanı sıra stromal proliferasyon ve pre-desidual hücrelerin gelişiminde rol oynar. Böylece foliküler fazda endometriyal epitel ve stromada ER artar ve ovulasyondan sonra düşerek geç luteal fazda düşük bir düzeye ulaşır.

Hem PR-A hem de PR-B muhtemelen östrojenin etkisi altında foliküler fazda artar ve luteal fazda epitelde azalır, ancak menstruasyona kadar stromada (baskın izoform-PRA) daha yüksek seviyede kalır (Mylonas et al., 2007).

#### **2.6.5. Endometriyal karsinomda ER ve PR**

EK, seks steroid hormonuna bağlı olduğundan, steroid reseptörleri ER- $\alpha$ , PR-A ve PR-B'nin varlığı, histolojik farklılaşma, tedaviye yanıt ve metastatik potansiyel ile nicel olarak ilişkilendirilmiştir (Markman, 2005).

Seks steroid reseptörlerinin kaybının endometriyal karsinogeneizde erken bir olay olduğu ve endometriyal karsinomun genellikle normal endometriyum veya endometriyal hiperplaziden daha düşük seviyede steroid reseptörlerine sahip olduğu gösterilmiştir. ER- $\alpha$  ekspresyonu EC21,22'de malign olmayan dokuya göre hem bezlerde hem de stromada azalır ve EK derecesi arttıkça daha da azalır. ER- $\alpha$  ekspresyonu bezlere göre stromada daha düşüktür. EK'da stroma hücrelerinin epitel hücrelerinden önemli ölçüde daha fazla etkilendiği gösterilmiştir (Jazaeri et al., 2001; Collins et al., 2009; Šmuc ve Rižner, 2009; Gul et al., 2010).

## **BÖLÜM 3: GEREÇ VE YÖNTEM**

### ***3.1. Araştırmanın Tipi***

Araştırmamız deneysel bir çalışmadır.

### ***3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı***

Araştırmamız İzmir Ekonomi Üniversitesi, Tıp Fakültesi laboratuvarlarında yapılmıştır.

Araştırmaya Eylül 2020 tarihinde literatür taraması ile başlanmış olup, araştırma proje materyalleri Nisan 2021 tarihinde tamamlanmıştır. Nisan 2021-Haziran 2021 tarihleri arasında deney grupları oluşturularak elde edilen örneklerden ELISA ve RT-PCR analizleri yapılmıştır. Toplanan verilerin değerlendirilmesi 01-16 Temmuz 2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir.

### ***3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme***

Araştırmamız herhangi bir bölge ile sınırlandırılmamış evrensel bir çalışmadır.

Örnekleme seçiminde aşağıdaki kriterler dikkate alınmıştır.

#### **Çalışmaya dahil edilme kriterleri:**

- Kültürdeki hücrelerin morfolojisinde herhangi bozukluk olmaması
- Kültürdeki hücrelerin ikiye katlama sürelerine uygun olarak çoğalmaları

#### **Çalışmadan dışlanma kriterleri:**

- Kültürde kontaminasyon riski olması
- ELISA analizleri için protein konsantrasyonunun belirlenen standart aralığına dahil olmaması
- RT-PCR analizleri için izole edilen RNA'nın konsantrasyonlarının düşük çıkması



### 3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma bulguları Ishikawa hücrelerinin E2 (17 $\beta$ -östradiol) ve P4 (progesteron) hormonlarının belirlenen konsantrasyonları ile muamelesi ve erken dönem galektin ekspresyonunun analizi ile sınırlıdır.

### 3.5. Çalışma Materyali ve Yöntem

#### 3.5.1. Gereçler

Araştırmada kullanılan cihazlar, araçlar ve malzemeler aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (Tablo 2. Ve Tablo 3.).

Tablo 2. Kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka, Katalog No	Kullanım Amacı
Orbital Çalkalayıcı	Stuart, #S1500	ELISA inkübasyonlarının gerçekleştirilmesi
Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Cihazı	Biorad, #CFXConnect	qRT-PCR deneylerinin yürütülmesi
Plaka Okuyucu Spektrofotometre	Thermo Fischer, #Multiskan	ELISA yöntemi absorpsiyon ölçümü
Inverted Mikroskop	Olympus, #CKX53SE	Hücre Kültürü deneylerinin gerçekleştirilmesi
PCR Cihazı (Thermal Cycler)	Applied Biosystems, #Veriti 9902	cDNA sentezinin gerçekleştirilmesi
Vorteks	Daihan Scientific, #VM-10	Kimyasal ve hücre örneklerinin karıştırılması

Tablo 2. Kullanılan cihazlar (Ön sayfadan devam)

Elektrikli Pipet Pompası	Isolab, #010.01.005	Hücre Kültürü deneylerinin gerçekleştirilmesi
Çok kanallı pipet	Brand, #Transferpette 12	ELISA yöntemi kuyucukların yıkama işlemleri
Santrifüj	Hettich, #Rotina 380R	Hücre kültürü deneyleri ve örneklerinin eldesi
Su Banyosu	Mipro, #MCS30	Hücre kültürü deneyleri
Etüv	Binder, #16-03170	Sterilizasyon sonrası kurutma işlemleri
Otoklav	Hirayama, #HV-85L	Sterilizasyon
Buz Cihazı	Scotsman, #AF80	RNA izolasyonu ve cDNA sentezi deneylerinde örneklerin saklanması
Distile Su Cihazı	GFL, #2104	ELISA materyallerinin hazırlanması amacıyla distile su eldesi
Hassas Terazî	Bel Engineering, #M214Ai	Kimyasal tartımı
-86C Ultra Derin Dondurucu	Thermo Scientific, #88400V	Örneklerin ve dondurulan hücrelerin saklanması
Sıvı Azot Tankı	Thermo Scientific, #CY50935-70	Dondurulan hücrelerin saklanması

Tablo 3. Kullanılan sarf malzemeleri (kimyasallar, kitler vb)

Malzeme Adı	Marka, Katalog No	Kullanım Amacı
Ishikawa İnsan Endometriyal Adenokarsinom Hücre Hattı	Sigma, #99040201	Deney gruplarının oluşturulup yanıtların incelenmesi
Östradiol	Sigma Aldrich, # E2758	ücre kültürü model oluşturulması
Progesteron	Sigma Aldrich, #P8783-15	Hücre kültürü model oluşturulması
DMEM	Gibco, #41966029	Hücre kültürü için besiyeri
FBS	Hyclone, #SV30160.03.H1	Kültür besiyerine eklenen serum
Penisilin-Streptomisin	Hyclone, #SV30010	Kültürde kontaminasyonun önlenmesi
Tripsin-EDTA	Wisent, #325-043EL	Pasajlama sırasında hücrelerin kaplardan kaldırılması
Phenol red free DMEM	Gibco/21063029	Fenol-kırmızı içermeyen besiyeri
PBS	Diagnovum, #D402-500ML	Hücrelerin yıkanması
DMSO	Biobasic, #D0231	Hücre dondurulması
Tripan Mavisi	Biological Industries, #03-102-1B	Hücre sayımı ve canlılık tayini

Tablo 3. Kullanılan sarf malzemeleri (kimyasallar, kitler vb) (ön sayfadan devam)

GAL-1 ELISA Kiti	Bioassay Technology Laboratory (BT Lab), #E1951Hu	GAL-1 protein analizi
GAL-3 ELISA Kiti	Bioassay Technology Laboratory (BT Lab), #E2989Hu	GAL-3 protein analizi
RNA İzolasyon Kiti	Biobasic, #EZ-10	Hücre örneklerinden RNA eldesi
cDNA Sentez Kiti	ABM, #G236	Hücre örneklerinden cDNA eldesi
PCR MasterMix	Biorad, #SMX200	qRT-PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi
BCA Protein Tayin Kiti	Biobasic, #SK3021	Örneklerde total protein konsantrasyonunun tayini
MTT Kit	ABP Biosciences, #A015	Hücre Canlılığı Tayini
Primerler	Biobasic, #HPLC100	qRT-PCR reaksiyonunun gerçekleştirilmesi

### 3.5.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmamızda donmuş olarak temin edilmiş hücrelerden araştırma ve üretim amacıyla yeni kültürler hazırlanmıştır.

Kullanılan örnekler ve solüsyonlar:

- *Ishikawa İnsan Endometriyal Adenokarsinom Hücre Hattı Prof. Dr. Sevinç İnan'ın hediyesi (pasaj #2)*
- *Besiyeri*
  1. %10 v/v FBS (Fetal Sığır Serum), %1 v/v Pen-Strep (100 U penicillin/0.1 mg/mL streptomycin) eklenmiş Fenol-kırmızısı içeren 500ml DMEM besiyeri
  2. Hormon deneyleri için kullanılan serum ve Fenol-kırmızısı içermeyen, %1 Pen-Strep eklenmiş DMEM besiyeri

#### 3.5.2.1. *Ishikawa Hücreleri*

İnsan endometriyal adenokarsinom hücre hattı Ishikawa hücreleri, glandüler ve luminal epitel özelliklerini göstermektedir. Ishikawa hücrelerinin, normal endometriyumda bulunan birçok enzim, protein, steroidlerin yanı sıra östrojen ve progesteron reseptörlerini eksprese etmesi endometriyal endokrin çalışmalar için yaygın olarak kullanılmaktadır (Seval et al., 2006; Vergetaki et al., 2014). Çalışmamızda kullanılan Ishikawa hücre hattı Prof. Dr. Sevinç İnan tarafından hediye edilmiştir (Pasaj #2).

Ishikawa hücreleri %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle besiyerinde (DMEM) -37 °C'de; %5 CO<sub>2</sub> koşullarına sahip inkübatörde çoğaltıldı. Hücre konfluensinin %70-80'e ulaşmasının ardından hormon uygulamaları için 6-kuyucuklu plakalara ekilerek hormon inkübasyonu için gerekli gruplar oluşturuldu. Hücre besiyeri hormon uygulama protokolünden 24 saat önce fenol-kırmızısı ve serum içermeyen DMEM ile değiştirildi.

### **3.5.2.2. Hücre çözündürme**

Çalışmamızda donmuş olarak temin edilmiş hücrelerden araştırma ve üretim amacıyla yeni kültürler hazırlandı ve eş zamanlı olarak, özellikle erken pasajlardan hücreler donduruldu.

#### *Hücre Çözündürme Protokolü*

- Hücreler donmuş halde teminlerinin ardından çözündürmelerine kadar geçen sürede -80°C’de derin dondurucuda saklanır.
- Dondurulmuş hücreleri içeren kriyotüp 37°C’deki su banyosunda kapak kısmından tutularak hızlıca çözündürülür (yaklaşık 1-2 dk).
- Tamamen çözünmüş hücre kriyotüpü alkol ile silindikten sonra laminer hava akışlı kabin içerisine alınır.
- Hücreler kriyotüp içerisinden alınarak 5 ml besiyeri içeren santrifüj tüpüne aktarılır.
- Hücreler 1000 rpm’ de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Tüpün içine 3 ml taze besiyeri eklenerek pipetaj ile karıştırılır. Ardından hücreler T25 kültür flasksı içine ekilir.
- Kültür kabı üzerine hücrenin adı, açılma tarihi ve dondurulduğu tarihteki pasaj sayısı yazılarak hücreler 37°C, %5 karbondioksit içeren inkübatöre kaldırılır.

### **3.5.2.3. Hücre pasajlama**

Tek tabakalı kültürlerde pasajlama işlemi için, hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları gerekir. Bu da çalkalama veya bir hücre kazıyıcı ile mekanik olarak, veya enzimatik ve kimyasal işlemlerle mümkündür. Çalışmamızda hücreleri kültür kabından kaldırmak ve ayırmak için tripsin-EDTA kullanılmıştır.

#### *Hücre Pasajlama Protokolü*

- Hücreler %70-80 konfluent olunca besiyeri uzaklaştırılır
- Kültür kabının hacmine uygun tripsin eklenir (T-25 flasklara 3ml, T-75 flasklara 6ml, 6-kuyucuklu plakalara 1ml).

- Ardından kültür kabı inkübatöre yerleştirilir. Tripsinle yaklaşık 6-8 dk muamele edildikten sonra kültür kabından tamamen ayrılan Ishikawa hücrelerinin üzerine tripsin hacmi kadar besiyeri eklenerek tripsin inaktive edilir ve hücre süspansiyonu santrifüj tüplerine aktarılır.
- Hücreler 5 dakika boyunca oda ısısında 1600 RPM de çöktürülür.
- Çöken hücrelerin üzerindeki süpernatant atılır ve hücreler önce 2ml besi yeri ile, ardından ihtiyaca ve tahmini hücre sayısına göre 5ml ya da 10ml besiyerine tamamlayacak kadar besi yeri ile yukarı-aşağı pipetlenerek resüspanse edilir.
- Hücreler tripan mavisi ile  $\frac{1}{4}$  oranında dilüe edilerek Neubauer lamına aktarılır ve sayılır. Hücre konsantrasyonu ve pasajlanacak kapların boyutları göz önüne alınarak kültür kaplarına ekilir.

#### **3.5.2.4. Hücre dondurma**

Çalışmamızda kriyoprotektan olarak DMSO kullanılmış ve hücreler metabolik aktivitenin yavaşlaması amacıyla  $-79^{\circ}\text{C}$ 'nin altındaki sıcaklıklara sahip ultra derin dondurucularda dondurulmuştur.

##### *Hücre Dondurma Protokolü*

- Hücre kültür flasklarında ekili, %70-80 konfluense ulaşan hücreler yaklaşık 6-8 dakika boyunca tripsin ile muamele edilir.
- Tripsinizasyonun ardından hücrelere taze besiyeri eklenerek tripsin inaktive edilir.
- Hücreler 5 dakika boyunca 1600 RPM de santrifüj edilerek çöktürülür.
- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılır, ardından elde edilen hücre pelleti üzerine dondurma ortamı (%95 FBS+%5DMSO) eklenerek resüspanse edilir. Bu aşamada hücreler sayılarak stok konsantrasyonları belirlenir.
- Elde edilen hücre süspansiyonu kriyotüplere aktarılır.
- Tüplerin üstüne hücrenin adı, dondurulma tarihi ve dondurulduğu tarihteki pasaj sayısı yazılır.  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat muhafaza edilerek yavaş dondurma işlemi gerçekleştirilir.
- Ardından hücreler  $-86^{\circ}\text{C}$ 'de saklanır

### 3.5.2.5. Hücre sayımı ve canlılık tayini

Hücrelerin boyanarak incelenmesi, hücre morfolojisini gözlemek ve hücreleri tanımlayabilmek için kullanılan en kolay ve en direkt tekniklerdendir.

Canlılık tayininde veya hücre sayımında membran bütünlüğünün korunması esasına göre ölü hücreler boya alırlar. Çalışmamızda hücre kültürü deneylerinde tripan mavisi boyası kullanılarak hücre morfolojisi ve canlılığı takip edildi.

Tripan mavisi boyası ile mavi boyanarak gözlemlenen hücreler canlılığını yitirmiş hücre olarak değerlendirildi. Canlı hücreler ise parlak sarı renkte ayırt edildi.

#### *Hücre Sayımı Protokolü*

- Hücre süspansiyonu 1500 RPM' de 5 dakika santrifüj edilir ve süpernatant uzaklaştırılır.
- Hücre pelleti 5 ml besiyeri ile resüspanse edilir.
- Hücre süspansiyonu 1:4 oranında tripan mavisi boyası ile seyreltilerek hücre sayımı için gerekli hücre süspansiyonu oluşturulur.
- Elde edilen hücre süspansiyonu içerisinde 10 µL örnek Neubauer lamına aktararak inverted mikroskop yardımı ile 100X büyütmede 1 mm<sup>2</sup>'lik 4 farklı alandaki canlı hücre sayısı belirlenir. Küçük karelerin üst ve sağ taraflarındaki kare çizgilerinde bulunan hücreler sayıma dahil edilir.
- Canlı hücrelerin mililitredeki toplam sayısının hesaplanması için aşağıda belirtilen formül kullanılır;

***hücre/ml***=tüm karelerde sayılan hücrelerin ortalaması x dilüsyon faktörü x 10<sup>4</sup>

***Total hücre sayısı***= hücre/ml x örneğin alındığı hücre süspansiyonunun hacmi



### *Hücre ekimi ve kültürü*

Hücreler boyanarak sayıldıktan sonra hücre kültür kaplarının hacmine uygun sayıda hücre ekilmesi gerçekleştirilir. Üzerine kültür kaplarının boyutuna göre yeterli miktarda besiyeri eklenir (Tablo 4.). Kültür kapları uygun şekilde etiketlenir ve inkübatöre kaldırılır. Bu aşamadan sonra hücrelerin tutunup tutunmadığı kontrol edilir ve hücre kabının yüzey alanının %70-80'i hücrelerle kaplanana kadar (%70-80 konfluent) 2 günde bir besi yeri tazelemeyle değiştirilir.

Tablo 4. Hücre ekimi

Kültür Kabı	Hücre sayısı	Besiyeri (ml)
96-kuyucuklu plaka	$0.01 \times 10^6$	0.1-0.2 ml
6-kuyucuklu plaka	$0.4 \times 10^6$	1-3 ml
T-25 flask	$0.7 \times 10^6$	3-5 ml
T-75 flask	$2.1 \times 10^6$	8-15 ml

### **3.5.3. Deney Grupları ve Hormon Uygulamaları**

#### ***Hormonların hazırlanması***

Östrojen ve Progesteronun belirlenen konsantrasyonlarının hazırlanması için Östrojen (E2) ve Progesteron (P4) hassas terazi ile tartıldı ve absolut etanol içerisinde  $10^{-2}$  mol/L stok solüsyonları hazırlandı. Daha sonra bu stok solüsyonlar yine etanol ile dilüe edilerek  $10^{-7}$ -  $10^{-10}$  mol/L aralığındaki hormon solüsyonları hazırlandı.

#### ***MTT Analizi***

Doz çalışmalarından önce MTT analiz yöntemi kullanılarak hücreler E2 ( $10^{-10}$ ;  $10^{-9}$ ;  $10^{-8}$  mol/L) ve P4'ün ( $10^{-9}$ ;  $10^{-8}$ ;  $10^{-7}$  mol/L) farklı konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edildi ve bu konsantrasyonların hücre canlılığı üzerine etkileri değerlendirildi.

### ***Hormon Uygulama Protokolü***

Ishikawa hücreleri 2 ml besiyeri içinde, 6-kuyucuklu kültür plakalarına ( $0,4 \times 10^6$  hücre/kuyucuk) %10 FBS içeren besiyeri içerisinde ekildi. Ekim sonrasında 24 saat yüzeye tutunmaları ve %70 konfluens elde edilmek amaçlı uygun koşullarda sürdürüldü. Hormon uygulaması öncesinde hücreler, fenol-kırmızısının östrojenik etkilerinden arındırılmaları için FBS ve fenol-kırmızısı içermeyen DMEM içinde 24 saat inkübe edildi. Hormon uygulaması sırasında hücreler serum ve fenol-kırmızısı içermeyen DMEM içinde kültüre edildi.

Hormon uygulaması çalışmalarının ilki doza-bağlı bir çalışma olup, hücreler  $17\beta$ -östradiolün farklı dozları ile [(E2),  $10^{-10}$  -  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  mol/L] ve progesteronun farklı dozları [(P4) ,  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  mol/L] ile tek başına 24 saat muamele edildi. Uygulama sonrası hücrelerden Gal-1 ve Gal-3 RT-PCR analizi için mRNA ve protein analizleri için hücre kültür süpernatantı elde edildi. Kontrol grubu olarak E2 ve P4 hormonlarının çözgeni (etil alkol), hormon uygulamaları ile aynı hacimde kullanıldı.

Hormon uygulaması çalışmalarının ikincisi zamana-bağlı bir çalışma olup literatürde Ishikawa hücrelerinde fonksiyonel çalışmalarda kullanılan ve fizyolojik dozlara en yakın eş değerlilikteki E2 ve P4 konsantrasyonları (E2 için  $10^{-8}$  mol/L ve P4 için  $10^{-7}$  mol/L) seçilerek zamana-bağlı çalışmalara başlandı (Seval et al., 2006; Yang et al., 2011, 2012, 2016). 6-kuyucuklu kültür plakalarında, kontrol (çözgen) E2 ( $10^{-8}$  mol/L), P4 ( $10^{-7}$  mol/L) ve E2+P4 ( $10^{-8}$  mol/L +  $10^{-7}$  mol/L) grupları oluşturularak hücreler 8, 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Uygulama sonrası hücrelerden Gal-1 ve Gal-3 RT-PCR analizi için mRNA (8 ve 24 saatlik gruplardan) ve protein analizleri için hücre kültür süpernatantı (24 ve 48 saatlik gruplardan) elde edildi.

#### ***3.5.4. Bisinkoninik Asit (BCA) Analizi***

Hücre kültür süpernatantlarındaki total protein tayini için ticari bir kolorimetrik kit kullanıldı. Standartlar stok çözüldüden uygun dilüsyonlar ile hazırlandı (25-500  $\mu$ g/ml). Tüm standart ve örnekler distile su ile 4 kat seyreltilerek 96-kuyucuklu plaka içine 25  $\mu$ l pipetlendi. Çalışma reaktif solüsyonunun kit kılavuzunda belirtilen 50:1 oranında sırası ile Reaktif A ve Reaktif B karıştırılarak hazırlandı. Tüm standart ve

örneklere 200 µl çalışma reaktifi eklenerek 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında spektrofotometre cihazı ile 562 nm'de absorbansları ölçüldü. Absorbans değerleri kullanılarak standart grafik oluşturuldu ve tüm örneklerdeki total protein miktarı belirlendi. Elde edilen en düşük total protein konsantrasyonuna göre (1226µg/ml) tüm örneklerin total protein konsantrasyonu ELISA analizleri öncesinde eşitlendi.

### **3.5.5. MTT Analizi**

Ishikawa hücreleri, 100µl besiyeri içinde 96 kuyucuklu plakalara (0.01x10<sup>6</sup>/kuyucuk) ekildi. Hücrelerin yüzeye tutunmalarının ardından 24 saat boyunca çeşitli konsantrasyonlarda östradiol ve progesteron ile inkübe edildi. İnkübasyon periyodunun sonunda her bir kuyucuğa 10µl, 5mg/ml 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazolyum bromür solüsyonu eklenerek hücreler 37 °C; %5 CO<sub>2</sub> inkübatöre yerleştirildi. MTT solüsyonunun eklenmesini takiben üç saat sonra canlı hücrelerde oluşan koyu mavi formazan kristallerini çözmek için 100 µl deterjan solüsyonu eklendi ve gece boyu 37 °C; %5 CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda spektrofotometre cihazı ile 562 nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

### **3.5.6. RT-PCR**

#### **Total RNA İzolasyonu**

##### **1. Hücrelerin elde edilmesi**

a) RNA izolasyonu öncesinde Ishikawa hücreleri 6-kuyucuklu kültür plakalarının her bir kuyucuğuna 400.000 hücre olacak şekilde ekildi ve deney gruplarına uygun doz ve sürelerde hormon inkübasyonu gerçekleştirildi.

b) Hormon inkübasyon protokolü sonrasında besiyeri uzaklaştırılarak hücreler PBS (3ml) ile yıkandı. Ardından PBS uzaklaştırılarak hücrelere %0.1-0.25 tripsin-EDTA eklendi. Tripsinizasyon sonrasında hücrelere serum içeren besiyeri (tripsini inaktive etmek için) eklendi ve hücreler bir santrifüj tüpüne aktararak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

## 2. RLT solüsyonu ile hücre lizisi

- a) Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet halindeki hücreler buza alınarak üzerlerine 350 µl RLT solüsyonu eklenerek hücre lizisi gerçekleştirildi.
- b) Ardından hücreler 1 dakika boyunca 5.000 rpm'de (6.000 x g) santrifüj edildi.
- c) Hücre lizati 5 kez steril enjektörden (20-G, D=0.9mm) geçirilerek homojenize edildi.
- d) Homojenize lizata 350 µl, %70 etanol eklendi ve aşağı-yukarı pipetlenerek karıştırıldı.

## 3. RNA izolasyonu

- a) %70 etanol içindeki hücre lizati 2.0 ml'lik kolonlara aktarıldı ve 1 dakika, 8.000 rpm'de (6.000 x g) santrifüj edildi.
- b) Kolonların alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Ardından kolonlara 500 µl RW solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm'de (8.000 x g) 1 dakika santrifüj edildi.
- c) Kolonların alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Ardından kolonlara 500 µl RPE Solüsyonu eklenip, 10.000 rpm'de (8.000 x g) 1 dakika santrifüj edildi. RPE solüsyonunun tamamının uzaklaştırılması için santrifüj aşaması ikinci kez tekrarlandı.
- d) Kolonların alt kısmına geçen sıvı uzaklaştırıldı. Kolonlar RNaz içermeyen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kolonlara 40µl RNaz içermeyen su eklenerek buz üstünde 2 dakika inkübe edildi. Ardından 1 dakika boyunca 10.000 rpm'de (8.000 x g) santrifüj edildi. Elde edilen RNA örnekleri cDNA sentezleme aşamasına kadar -86°C'de muhafaza edildi.

## 4. Elde edilen RNA konsantrasyonlarının tayini

Konsantrasyon tayini 1µl RNA kullanılarak 260nm'de absorbans ölçümü ile gerçekleştirildi. RNA'ların saflık derecesi 260/230'de absorbans ölçümü ile belirlendi ve kullanılan örneklerde bu oranın ~1,8 ve üzeri olmasına özen gösterildi. cDNA sentezi esnasında her bir örnek için 1µg RNA kullanıldı.

## **cDNA sentezi**

cDNA sentez kitinin içerisindeki tüm kimyasallar kullanım öncesinde çözünerek buza yerleştirildi.

1. cDNA sentezi için 4 µl RT Tamponu (5X), 1 µl dNTP, 1 µl Oligo(dT), 1 µl RTase ve 1 µg'a karşılık gelecek RNA miktarı PCR tüpleri içerisinde karıştırılarak reaksiyon hacmi, nükleaz-içermeyen su ile birlikte 20 µl'ye tamamlandı.

2. Elde edilen karışım termal döngü cihazına yerleştirilerek 50°C'de 50 dakika reaksiyon gerçekleştirildi.

3. Reaksiyon 85°C'de 5 dakika ısıtarak durduruldu. Elde edilen cDNA buz üzerinde soğutularak RT-PCR reaksiyonunda kullanımına kadar -20°C'de muhafaza edildi.

## RT-PCR (Real-Time PCR; Gerçek-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)

### Analizi

RT-PCR analizi için kullanılan tüm malzeler ve örnekler kullanım öncesinde çözünerek buza yerleştirildi. 96-kuyucuklu PCR plakasına 10 µl- 2X MasterMix, 0.5µl- cDNA, 1.0µl- ilgili genin Forward-Reverse primer karışımı eklenerek reaksiyon hacmi steril su ile 20 µl'ye tamamlandı. 96-kuyucuklu PCR plakasının üstü uygun şekilde kapatılarak gerçek zamanlı PCR cihazına yerleştirildi. Reaksiyon basamakları; 95°C'de 3dk dakika polimeraz aktivasyonu/denatürasyon; 95°C'de 10 saniye, amplifikasyon aşamasında Gal-1 için 54°C'de 45 saniye, GAPDH için 51°C'de 45 saniye, Gal-3 için 58°C'de 45 saniye (40 döngü) ve son olarak dissosiyasyon aşamasında 55°C' den başlayarak 5 saniyede 0,5°C'lik artışlarla 95°C'ye yükseliş şeklindedir. Endojen kontrol olarak GAPDH kullanıldı ve hedef genlerin elde edilen değerleri ile gen ekspresyonu  $2^{-\Delta\Delta CT}$  değişimi yöntemi ile hesaplandı (Livak ve Schmittgen, 2001). Galektin 1 ve Galektin 3 genlerinin forward ve reverse primer dizileri ilgili tabloda yer almaktadır (Tablo 5.).

Tablo 5. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu için ilgili genlerin forward ve reverse primer dizileri

Hedef Gen	Forward Sekans (5'→3')	Reverse Sekans (5'→3')
GAL-1	5'-TCTTCTGACTGCTGGTGGAG-3'	5'-CCCGAACTTTGAGACATTCC-3'
GAL-3	5'-GCGGAAAATGGCAGACAATT-3'	5'-CTTGAGGGTTTGGGTTTCCA-3'
GAPDH	5'-ACCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'	5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGACAA-3'

### 3.5.7. ELISA

#### *Hormon inkübasyonu sonrasında hücre kültür süpernatantının eldesi*

E2 ve P4 uygulanmasından sonra hücrelerin besiyerine (kültür süpernatantları) salgıladıkları galektinlerin miktarının ölçülebilmesi amacıyla doza-bağı ve zamana-bağı çalışmalarımızdaki her bir deney grubundan kültür süpernatantları toplanarak yaklaşık 20 dakika boyunca 2000 RPM'de santrifüjlendi. Santrifüj ardından hücre süpernatantı bölünerek steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ELISA analizlerine kadar -20 °C'de muhafaza edildi. ELISA deneyleri için önce optimizasyon çalışmaları yapılarak, kültür süpernatantlarının galektin değerlerinin standard eğri içinde yer alması için örnekler steril PBS (pH 7.2-7.4) ile 1/10000 oranında seyreltilti. Galektin-1 ve 3 analizleri için aynı dilüsyon katsayısı ve protokol uygulandı.

#### *ELISA analizi ön hazırlıkları*

Gal-1 ve Gal-3 ELISA analizleri için kullanılan kitler içerisindeki solüsyonlar kullanıma hazır olarak tedarik edildi. Kit protokolü öncesinde yalnızca yıkama tamponu (25X) aşağıda belirtildiği şekilde seyreltilti.

Yıkama tamponunun (1X) hazırlanması: 500 ml, 1x yıkama tamponu elde etmek için 20 ml yıkama tamponu konsantresi 25 kat distile su ile seyreltilti.

#### *ELISA Test Prosedürü*

1. Kite ait tüm reaktifler, standart solüsyonları ve numuneler kitin kullanma talimatlarına göre hazırlandı. Kullanmadan önce kit içerisindeki tüm kimyasallar oda sıcaklığına getirildi.

2. ELISA analizi için gereken antikor kaplı kuyucuk sayısı analiz öncesinde belirlendi ve kalan kuyucuklar 2-8°C'de saklandı.

3. Her bir kuyucuğa 50µl standart çözelti eklendi. Standart solüsyonları biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart içeren kuyucuklara antikor eklenmedi.

4. Her bir kuyucuğa 40µl örnek, ardından 10µl anti-Galectin-1 veya -3 antikorunu eklendi.

5. Tüm standart ve örneklere 50µl streptavidin-HRP eklendi. Ardından kuyucukları içeren plaka bir film ile örtülerek 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.

6. İnkübasyon süresinin sonunda kuyucuklar 5 kez (her bir yıkama 30 saniye ile 1 dakika süre ile) 350 µl yıkama tamponu (1X) ile yıkandı. Yıkama sonunda kuyucukların içerisindeki sıvı, kuyucukları içeren plaka kağıt havluya ters çevirilerek uzaklaştırıldı.

7. Her kuyucuğa sırasıyla 50µl substrat solüsyonu A ve B karanlık ortamda eklenerek 37°C'de 5 dakika inkübe edildi ve mavi renk oluşumu gözlemlendi.

8. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 50µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.

9. Stop solüsyonu eklenmesinin ardından absorbans değerleri 450 nm mikropilaka okuyucu ile ölçüldü.

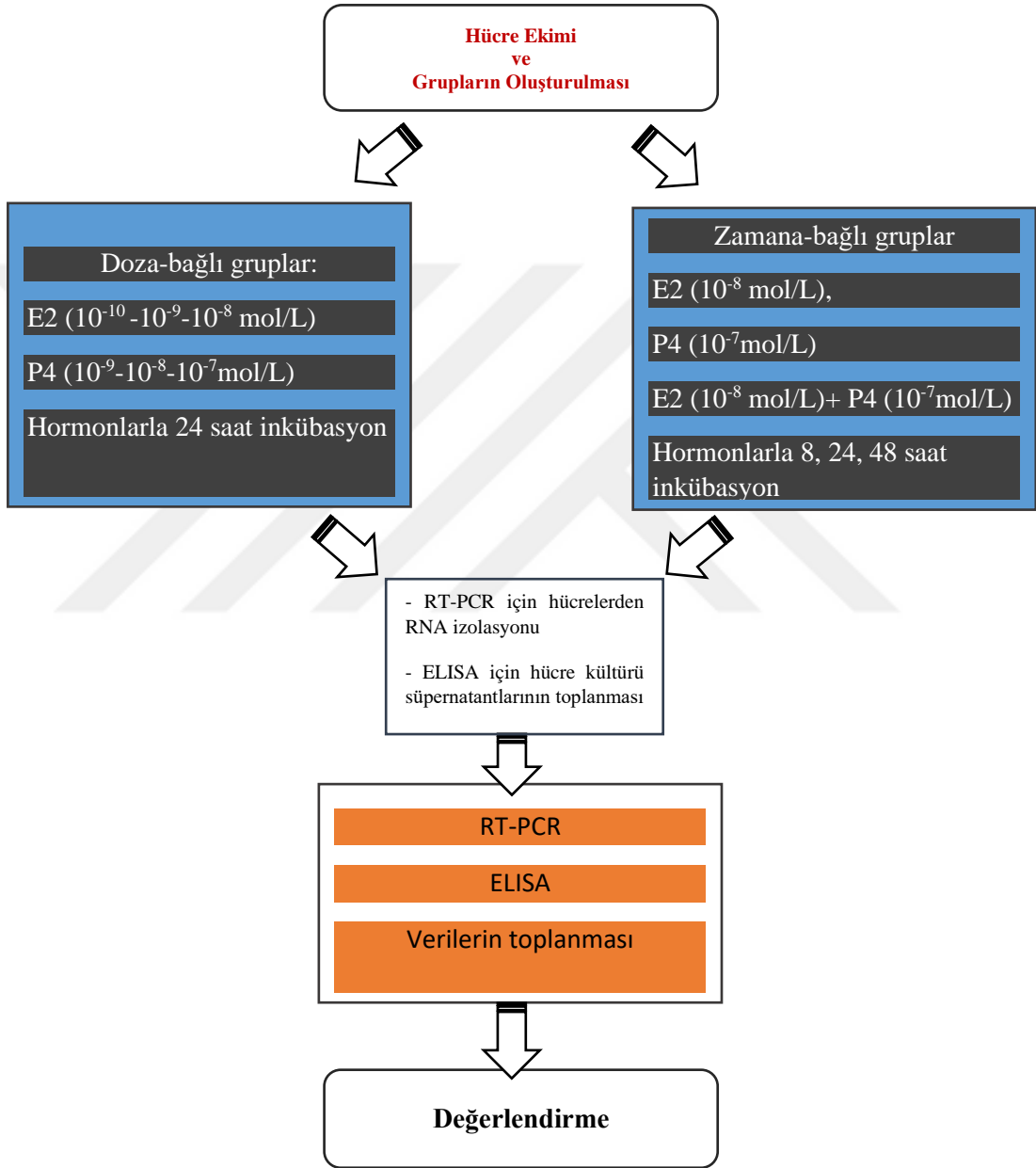




### 3.6. Çalışma Planı ve Araştırma Takvimi

Çalışma planı ve araştırma takvimi aşağıda gösterilmiştir.

Şekil 2. Çalışma Planı



Tablo 6. Araştırma Takvimi

No	İş Paketlerinin Adı / Tanımı	2020				2021							
		Eylül	Ekim	Kasım	Aralık	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ağustos
1	Literatür tarama	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	Tez önerisi		■										
3	Sarf malzemelerin temini			■	■	■	■	■	■	■			
4	Deneysel gruplarının oluşturulması								■	■	■		
5	ELISA ve RT-PCR Deneyleri									■	■		
6	Verilerin değerlendirilmesi ve tez yazımı										■	■	■

### 3.7. Verilerin Değerlendirilmesi

#### İstatistiksel analizler

Gruplar arasındaki parametrik değerlerin karşılaştırılması için varyans analizi (ANOVA) ve post hoc Tukey testi uygulandı. İstatistiksel analiz için GraphPad (GraphPad Prism 5, La Jolla, USA) programı kullanıldı. Çalışmadaki tüm değerler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilmiş ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

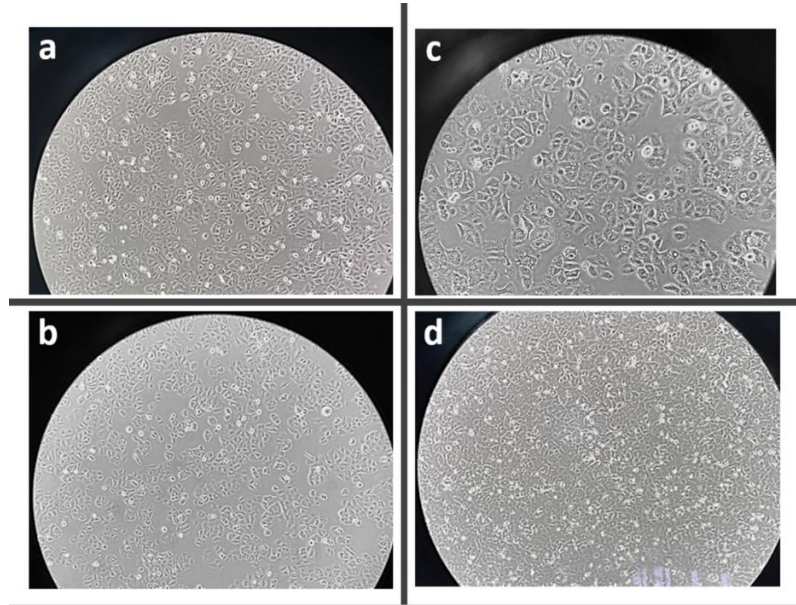
## BÖLÜM 4: BULGULAR

Çalışmamızda iyi diferansiye endometriyal adenokarsinom hücre hattına östrojen ve progesteron verilmesi ile birlikte galektin-1 ve galektin-3'ün mRNA ve protein seviyelerinde bir değişiklik olup olmadığı RT-PCR ve ELISA yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

### 4.1. Hücre Kültürü Bulguları

Ishikawa insan endometriyal adenokarsinom hücre hattı %10 Fötal Sığır Serumı (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren tam besiyeri içinde 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemli inkübatörde flasklar veya 6-kuyucuklu kültür plakalarında çoğaltıldı.

İyi diferansiye ve Tip I EK olan bu hücreler inverted mikroskop altında değerlendirildiğinde, hücrelerin epitel benzeri, poligonal yapıda oldukları ve agregatlar yapmak suretiyle kültür kabına tutunarak çoğaldıkları izlendi (Şekil 2.).



Şekil 3. Ishikawa Hücre Hatlarının İverted Mikroskop Görüntüleri. a ve b: %80 konfluent Ishikawa hücre hattı (20x), c: %80 konfluent Ishikawa hücre hattı (40x), d: %100 konfluent Ishikawa hücre hattı (10x)

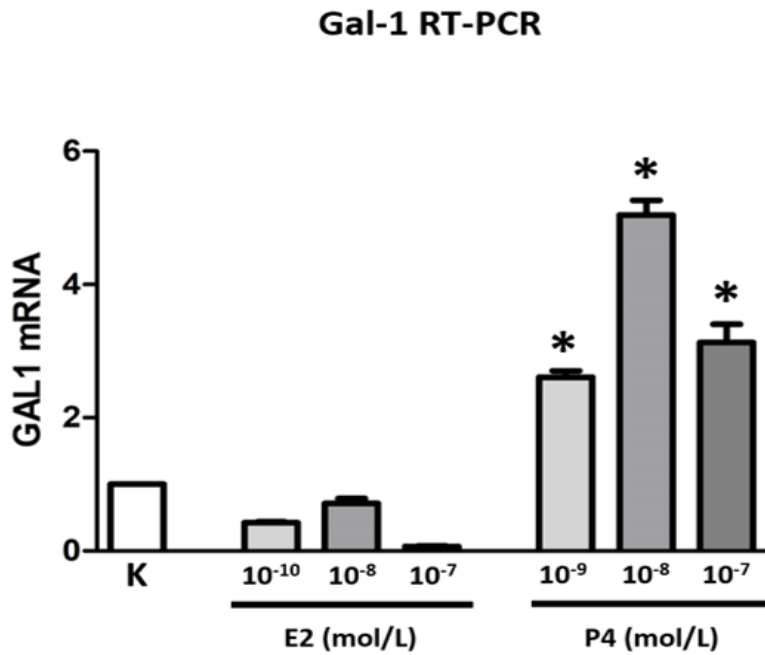
#### 4.2. RT-PCR bulguları

Ishikawa hücrelerinin lizatlarında Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonunun belirlenmesi için Real-time PCR yapıldı. Normalizasyon için houskeeping gen olan GAPDH kullanıldı.

Doza-bağlı deney gruplarında hormon uygulamalarından 8 saat sonra RNA izole edilirken, zamana- bağli çalışmalar için 24 saat sonra izole edildi.

##### 4.2.1. Doza-bağli gruplarda Gal-1 Ekspresyonu

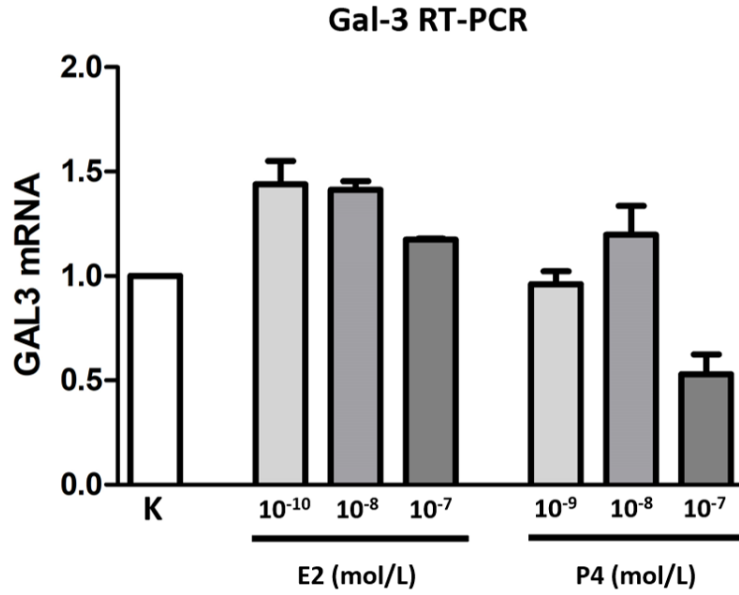
Elde edilen verilere göre Ishikawa hücrelerine E2 uygulanması Gal-1 ekspresyonunda anlamlı olmayan bir azalmaya neden olmuştur. Buna karşılık P4 uygulanması her üç dozda da [ $10^{-9}$  mol/L:  $2.608 \pm 0.093$ ;  $10^{-8}$  mol/L:  $5.04 \pm 0.222$ ;  $10^{-7}$  mol/L:  $3.126 \pm 0.275$ ) kontrole göre Gal-1 ekspresyonunu anlamlı şekilde artırmıştır (\* $p < 0.0001$ ) (Şekil 3.).



Şekil 4. Doza-bağli gruplarda Gal-1 Ekspresyonu

#### 4.2.2. Doza-bağılı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu

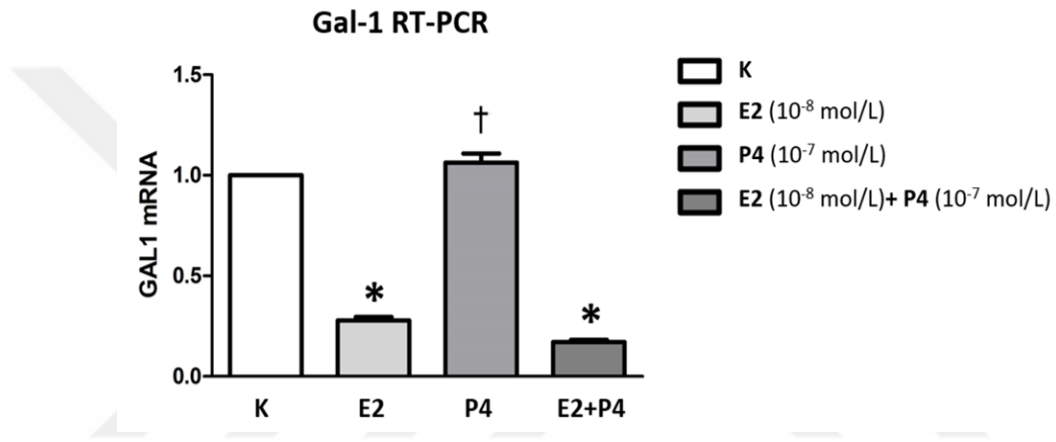
Elde edilen verilere göre Ishikawa hücrelerine E2 uygulanması Gal-3 ekspresyonunda hafif ve anlamlı olmayan bir artışa neden olmuştur. Buna karşılık P4 uygulanması Gal-1 mRNA düzeylerinde gözlenen anlamlı artıştan (Şekil 4.2.1.1.) farklı olarak kontrole göre anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4.).



Şekil 5. Doza-bağılı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu

### 4.2.3. Zamana-bağlı gruplarda Gal-1 Ekspresyonu

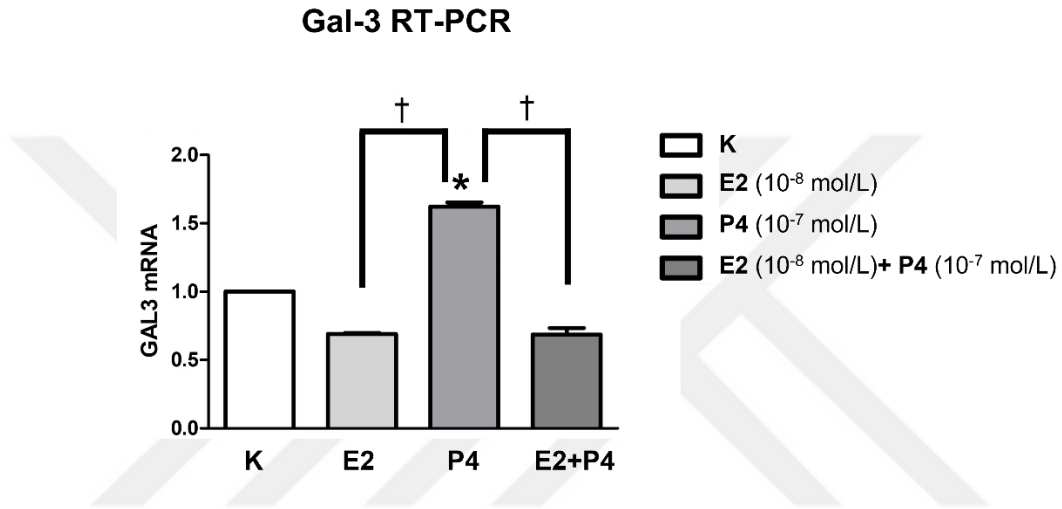
Elde edilen bulgulara göre Ishikawa hücrelerine E2 uygulanması ( $0.277 \pm 0.006$ ) 24 saat sonunda Gal-1 ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya neden olmuştur ( $*p < 0.0001$ ). Buna karşılık P4 uygulanması ( $1.063 \pm 0.045$ ) sonrası Gal-1 ekspresyonu yine 8 saatteki deneylerdeki anlamlı artışı göstermemiştir. İlginç olarak, P4 ile birlikte E2'nin hücrelere verilmesinin ( $0,17 \pm 0.011$ ), P4'ün tek başına yarattığı etkiyi ( $1.063 \pm 0.045$ ) anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (P4 vs E2; P4 vs E2+P4,  $^{\dagger}p < 0.0001$ ) (Şekil 5.).



Şekil 6. Zamana-bağlı gruplarda Gal-1 Ekspresyonu

#### 4.2.4. Zamana-bağılı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu

Elde edilen bulgulara göre Ishikawa hücrelerine E2 uygulanması 8 saat süren deneylerdeki gibi Gal-3 ekspresyonunda anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. Buna karşılık P4 uygulanması ( $1.622 \pm 0.044$ ) sonrası Gal-3 ekspresyonu kontrole göre anlamlı bir şekilde artmıştır (\* $p < 0.0001$ ). İlginç olarak, P4 ile birlikte E2'nin hücelere verilmesinin ( $0.685 \pm 0.049$ ), P4'ün tek başına yarattığı etkiyi ( $1.622 \pm 0.044$ ) anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür (P4 vs E2+P4; P4 vs E2; † $p < 0.0001$ ) (Şekil 6.).



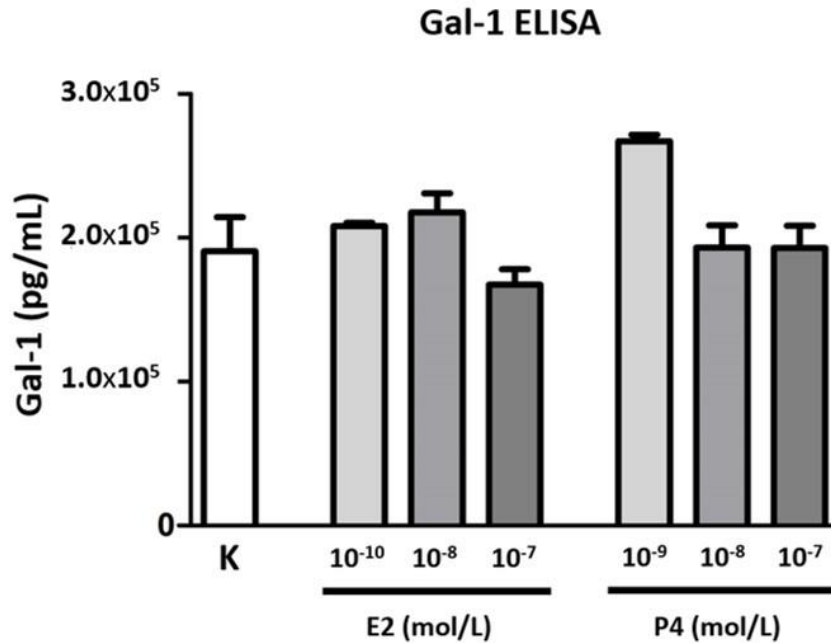
Şekil 7. Zamana-bağılı gruplarda Gal-3 Ekspresyonu

### 4.3. ELISA bulguları

Doza-bağılı gruplar için E2 ve P4 hormonlarının farklı konsantrasyonları ile hücreler 24 saat boyunca, zamana-bağılı gruplar için E2 ve P4'nin Ishikawa hücrelerinde etkinliği literatür ile belirlenmiş konsantrasyonları (E2:  $10^{-8}$  mol/L ve P4:  $10^{-7}$  mol/L) ile hücreler 24 ve 48 saat boyunca inkübe edildi. Hücrelerin salgıladıkları proteinleri içeren kültür süpernatantında Gal-1 ve Gal-3'ün konsantrasyonlarının belirlenmesi için ELISA yöntemi kullanıldı.

#### 4.3.1. Doza-bağılı grupların Gal-1 ELISA bulguları

ELISA verilerine göre, Ishikawa hücreleri buldukları besiyerine Gal-1 salgılamaktadır. Hem E2 hem de P4'ün değişen konsantrasyonlarına bağılı olarak Gal-1 protein miktarında anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Hücrelerin besiyerine salgıladıkları Gal-1 miktarı E2'nin  $10^{-8}$  mol/L ( $2.17 \times 10^5 \pm 0.13 \times 10^5$  pg/ml) ve P4'ün  $10^{-9}$  mol/L ( $2.67 \times 10^5 \pm 0.43 \times 10^5$  pg/ml) konsantrasyonlarında kontrole ( $1.90 \times 10^5 \pm 0.23 \times 10^5$  pg/ml) göre daha yüksekti ancak bu artış anlamlı bulunmadı (Şekil 7.).



Şekil 8. Doza-bağılı grupların Gal-1 ELISA grafiğı

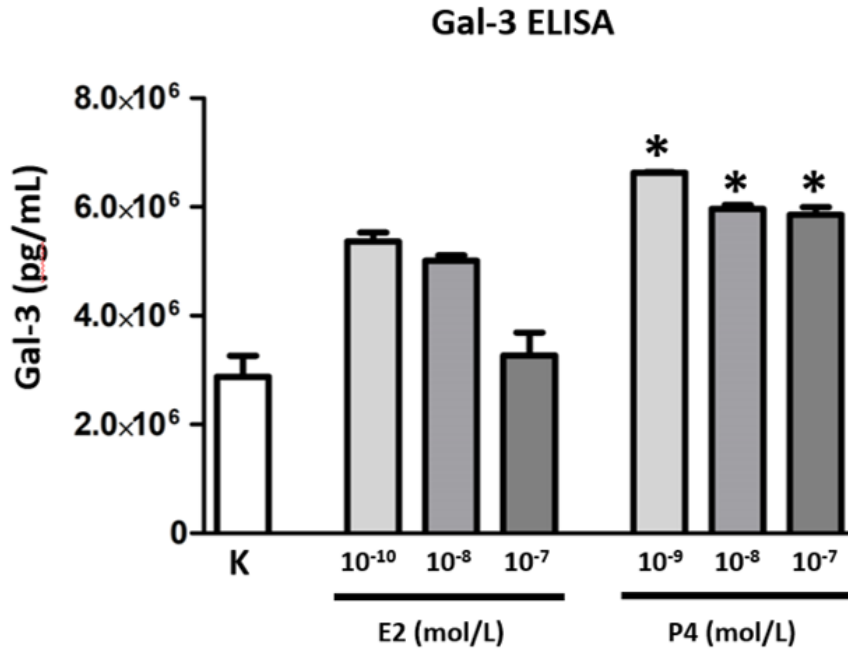


#### 4.3.2. Doza-bağlı grupların Gal-3 ELISA bulguları

ELISA verilerine göre, Ishikawa hücreleri buldukları besiyerine Gal-3 salgılamaktadır. Hücrelerin besiyerine salgıladıkları Gal-3 miktarı Gal-1 miktarlarına göre daha yüksekti.

E2 ile inkübe edilen hücrelerin kültür süpernatantlarında her ne kadar anlamlı bulunmasa da kontrole göre daha yüksek miktarda Gal-3 proteini tespit edildi. Gal-3 protein miktarındaki bu artışın E2'nin artan konsantrasyonları ile ters orantılı olduğu izlendi. Özellikle E2'nin  $10^{-10}$  mol/L konsantrasyonunun Gal-3 protein miktarında ( $5.36 \times 10^6 \pm 0.16 \times 10^6$  pg/ml) artışa neden olduğu, ancak bu artışın kontrole ( $2.87 \times 10^6 \pm 0.38 \times 10^6$  pg/ml) göre anlamlı olmadığı izlendi (Şekil 8).

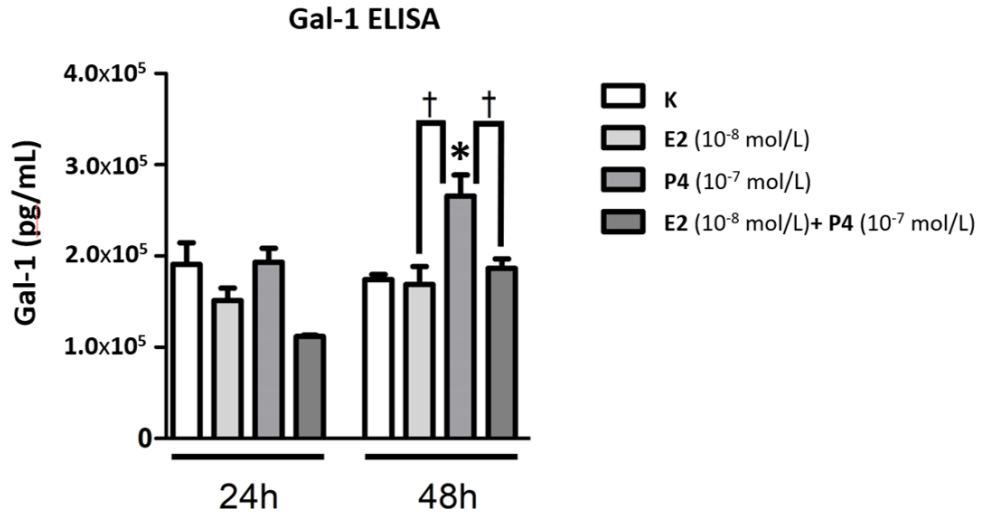
P4 ile inkübe edilen hücrelerin kültür süpernatantlarında da kontrole göre daha yüksek miktarda Gal-3 proteini tespit edildi. P4'ün her üç konsantrasyonu da [ $10^{-9}$  mol/L:  $6.62 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$ ;  $10^{-8}$  mol/L:  $5.96 \times 10^6 \pm 0.07 \times 10^6$ ;  $10^{-7}$  mol/L:  $5.85 \times 10^6 \pm 0.14 \times 10^6$  pg/ml) kontrole ( $2.87 \times 10^6 \pm 0.38 \times 10^6$  pg/ml) göre anlamlı bir biçimde Gal-3 protein miktarını arttırdı (\* $p < 0.05$ ) (Şekil 8).



Şekil 9. Doza-bağlı grupların Gal-3 ELISA grafiği

#### 4.3.3. Zamana-bağlı grupların Gal-1 ELISA bulguları

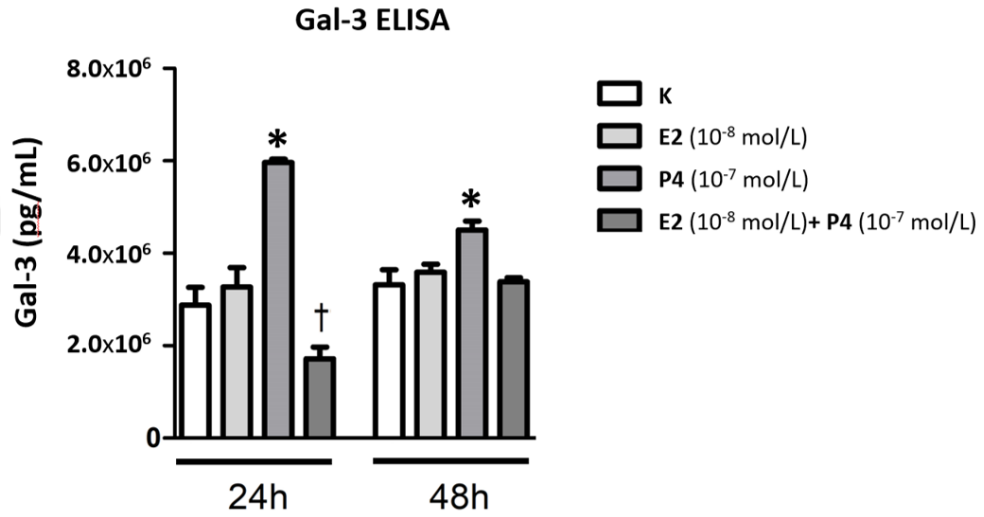
Besiyerine salgılanan Gal-1 miktarı zamana bağlı olarak özellikle de progesteron hormonu ( $2.65 \times 10^5 \pm 0.23 \times 10^5$  pg/ml) ile 48 saatlik inkübasyon ile kontrole ( $1.74 \times 10^5 \pm 0.05 \times 10^5$  pg/ml) göre anlamlı bir artış göstermiştir (\* $p < 0.05$ ). 48 saatlik hormon inkübasyonu yapılan gruplarda, E2+P4 ( $1.86 \times 10^5 \pm 0.10 \times 10^5$  pg/ml) kombine inkübasyonun sadece P4 ( $2.65 \times 10^5 \pm 0.23 \times 10^5$  pg/ml) ile inkübasyona kıyasla Gal-1 protein miktarını sadece E2 ( $1.68 \times 10^5 \pm 0.19 \times 10^5$  pg/ml) ile yapılan inkübasyondan elde edilen protein miktarına yaklaşacak kadar anlamlı şekilde azalttığı saptanmıştır (P4 vs E2+P4; P4 vs E2;  $^{\dagger}p < 0.05$ ) (Şekil 9.).



Şekil 10. Zamana-bağlı grupların Gal-1 ELISA grafiği

#### 4.3.4. Zamana-bağlı grupların Gal-3 ELISA bulguları

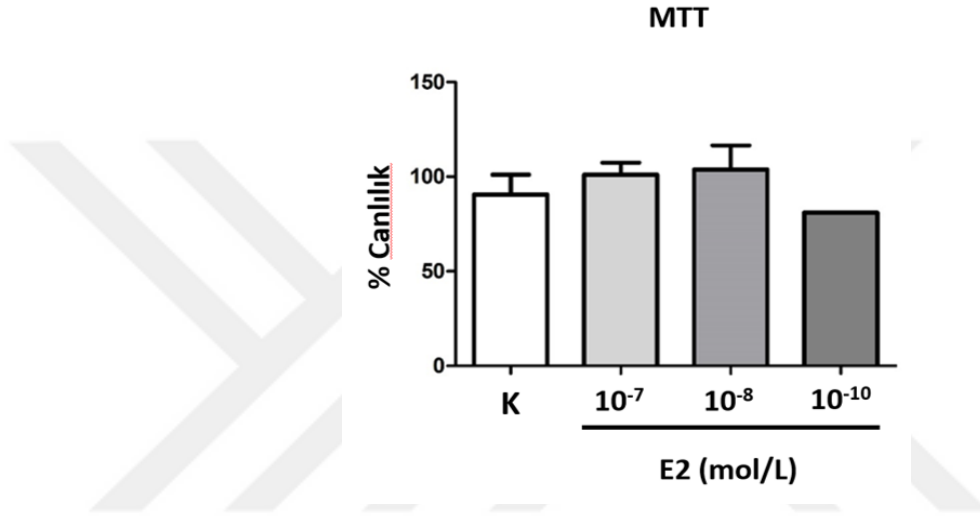
Besiyerine salgılanan Gal-3 miktarı zamana bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Bulgular hem 24. saatte ( $5,96 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$  pg/ml) hem de 48. saatte ( $4,5 \times 10^6 \pm 0,19 \times 10^6$  pg/ml) P4 ile muamele ardından hücre kültür süpernatantında Gal-3 miktarının kontrole (24 saat Kontrol:  $2,87 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$  pg/ml; 48 saat Kontrol:  $3,31 \times 10^6 \pm 0,32 \times 10^6$  pg/ml) göre anlamlı bir şekilde arttığını göstermektedir (\* $p < 0,05$ ). E2+P4 ile 24 saatlik inkübasyon ( $1,71 \times 10^6 \pm 0,02 \times 10^6$  pg/ml) sadece P4 ile 24 saatlik inkübasyon ( $5,96 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$  pg/ml) sonucu elde edilen Gal-3 protein miktarını anlamlı şekilde azaltmıştır ( $^{\dagger}p < 0,05$ ). E2 ile inkübasyon Gal-3 miktarlarında her iki saat diliminde anlamlı olmayan bir artışa neden olurken, E2'nin P4 ile birlikte 48 saatlik inkübasyonu Gal-3 miktarlarında yine bir düşüşe neden olmuştur ancak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 10.).



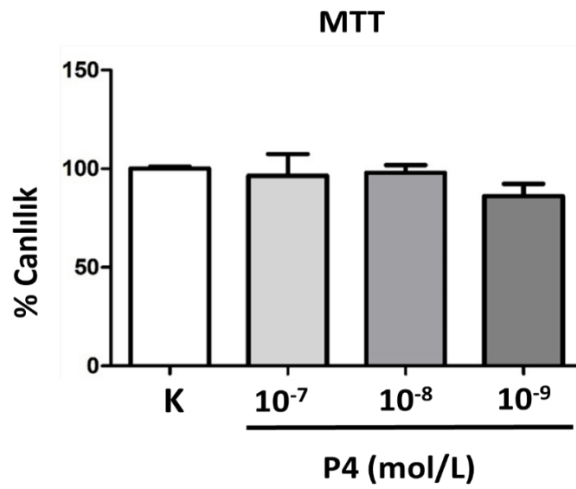
Şekil 11. Zamana-bağlı grupların Gal-3 ELISA grafiği

#### 4.4. MTT bulguları

Ishikawa hücreleri  $17\beta$ -östradiolün farklı dozları ile [(E2),  $10^{-10}$  - $10^{-9}$  - $10^{-8}$  mol/L] ve Progesteronun farklı konsantrasyonları [(P4) , $10^{-9}$ - $10^{-8}$ - $10^{-7}$  mol/L] ile tek başına 24 saat muamele edilmiş ve bu hormon konsantrasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkilerinin incelenebilmesi için MTT assay kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre hücre canlılığı E2'in ve P4'ün kullanılan konsantrasyonlarından olumsuz etkilenmemiştir (Şekil 11. ve 12.).



Şekil 12. Östradiol ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi



Şekil 13. Progesteron ile inkübe edilen hücrelerde MTT analizi

## BÖLÜM 5: TARTIŞMA VE SONUÇLAR

### 5.1. Tartışma

Galektinlerin hücre ölümü, farklılaşması, adhezyonu, göçü ve sinyalizasyonu gibi birçok hücreyel süreçte önemli rollere sahip olmaları nedeniyle galektinler üreme biyolojisi alanında da oldukça ilgi görmeye başlamışlardır (Dumic, Dabelic ve Flögel, 2006).

Galektinlerin farklı tiplerini normal endometriyum, overler ve plasentanın yanı sıra endometriyal kanserler, endometriozis, infertilite, düşükler ve pre-eklampside gösteren çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır.

İnsan endometriyumunda gal-1, 3, 4, 7, 9 ve 12 tespit edilmiştir. Bunlardan özellikle Gal-1 ve Gal-3 yüksek oranlarda bulunmuştur (von Wolff et al., 2005; Menkhorst et al., 2014).

Normal endometriyumda menstrual döngü esnasında galektinlerin farklı eksprese edilmeleri, galektin ekspresyonunun cinsiyet hormonları ile düzenlenebileceğine işaret etmektedir. Çalışmamızda bu amaçla glandüler ve luminal epitel özelliklerini gösteren ve normal endometriyumda bulunan steroid reseptörlerini, enzimler ve proteinlerin birçoğunu eksprese eden Ishikawa hücre hattında östradiol ve progesteronun galektin-1 ve -3 ekspresyonu üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık. Çalışmamız Ishikawa hücre hattında Gal-1 ve Gal-3'ün steroid hormonlarla düzenlenmesini ele alan ilk çalışmadır.

Galektin-1 ve -3'ün menstrual döngü boyunca endometriyumdaki ekspresyonunu immunohistokimya ile gösteren çalışmalar Gal-1'in esasen endometriyal stromal hücrelerde, Gal-3'ün ise endometrial luminal ve glandüler epitelde eksprese olduğunu göstermiştir (von Wolff et al., 2005). Çalışmamızın ELISA bulgularına göre kontrol grubu Ishikawa hücrelerinden salgılanan Gal-3 miktarları kontrol grubu Gal-1 miktarlarından fazladır ve literatür ile uyumludur. Salgılanan Gal-3 miktarının daha fazla olması kullandığımız hücre hattının luminal ve glandüler

epitelyal özellikte hücreler olması ve bu hücrelerde Gal-3 ekspresyonunun yüksek olmasıyla açıklanabilir.

Gal-1 ve Gal-3 menstrual döngü boyunca farklı ekspresyon paternleri sergilerler. Hem Gal-1 hem de Gal-3 ekspresyonlarının geç sekretuar evrede ve erken gebelik döneminde belirgin bir şekilde yükseldiği bildirilmiştir (Choe et al., 1997; von Wolff et al., 2005; Yang, Lei ve Zhang, 2012; Vergetaki et al., 2014; Yang et al., 2016). Geç sekretuar evrenin östrojenden çok progesteronun egemen olduğu bir evre olduğu göz önüne alınır, Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonunun progesteron ile artması beklenir. Nitekim çalışmamızın hipotezinin temelini oluşturan bu bulgu ile uyumlu olarak çalışmamızda, P4 ile 48 saat inkübasyon sonunda ELISA ile belirlenen Gal-1 protein miktarı kontrole göre anlamlı bir şekilde artmış bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Gerçek zamanlı PCR sonuçlarımıza göre Gal-1 ekspresyonu progesteronun tüm konsantrasyonlarında hem 8 saat hem de 24 saat inkübasyon sonunda anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.0001$ ). Benzer şekilde, ELISA ile belirlenen Gal-3 protein miktarı, hem P4'ün tüm konsantrasyonlarında, hem 24 saat hem de 48 saat inkübasyon sonunda anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). Gerçek zamanlı PCR sonuçlarımıza göre Gal-3 ekspresyonu P4 ile 24 saat inkübasyon sonunda anlamlı olarak artmıştır ( $p<0.0001$ ).

Ovariektomize edilmiş farelerle yapılan bir başka çalışmada östrojen ve progesteronun Gal-1 ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır (Choe et al., 1997). Çalışmada overleri çıkarılmış farelere tek bir  $17\beta$ -östradiol (100 ng/fare), progesteron (1 mg/fare) enjeksiyonu veya ikisinin kombinasyonu enjekte edilmiş hayvanlar belirli zaman aralıklarından sonra sakrifiye edilmiş ve uterus dokularında Northern blotting yöntemi ile Gal-1 bakılmıştır. Bahsi geçen çalışmada  $17\beta$ -östradiol enjeksiyonundan 6 saat gibi kısa bir süre sonra Gal-1 mRNA düzeylerinin arttığı ve 24. saatten itibaren azaldığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda östradiol uygulanan grupta Gal-1 mRNA düzeyleri 8 ve 24. saatte anlamlı bir artış göstermemiş, aksine kontrollerden de düşük seyretmiştir. Bu farklılığın nedeni; fare dokuları ekstrakte edilerek yapılan çalışmada Gal-1 ekspresyonunun çoğunun Gal-1'in daha yoğun eksprese edildiği stromal hücrelerden kaynaklanması olabilir. Aynı çalışmada, Gal-1 mRNA düzeylerinin hayvanlara progesteron enjeksiyonundan 6 saat sonra arttığı ve 12 saat sonra maksimum seviyelere ulaşarak, giderek azalmak koşuluyla 48 saate kadar yüksek seviyede kaldığı görülmüştür. Progesteron Gal-1'in glandüler ve luminal epitelyal

hücrelerde ekspresyonunu çok daha belirgin bir şekilde arttırdığı için, benzer bir artış paterni bizim çalışmamızda da P4 uygulanan gruplarda izlenmiştir. Progesteron ile östradiolün birlikte enjekte edildiği durumda Gal-1 mRNA düzeyinin, enjeksiyondan 12 saat sonra arttığı, ardından aniden hızla azaldığı bildirilmiştir. In vivo koşullarda da E2+P4'ün Gal-1 mRNA düzeylerini azaltan etkisi, bizim çalışmamızın in vitro koşullarda elde ettiği bulgularla örtüşmektedir. Çalışmamız aynı zamanda Gal-1'in endometriyal hücrelerde hormonlarla düzenlendiğini gösteren ilk in vitro çalışmadır.

Çalışmamızda P4'ün Gal-1 ve daha çok Gal-3 ekspresyonunda artışa neden olan etkisi, E2+P4 hücrelere birlikte verildiğinde her iki galektininin ekspresyonunu ve salgısını kontrol değerlerinin altına düşürmüştür. Bu sonuçlar, Gal-1 ve -3'ün progesterona östradiolden daha duyarlı olduğunu, östradiolün progesteron etkisini bir şekilde antagonize edebildiğine işaret etmektedir. Böyle bir etkinin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Endometriyal epitelyal hücrelerin primer kültürlerinde Gal-3'ün hormonlarla düzenlenmesine bakan bir çalışmada çalışmamızla benzer olarak E2+P4 grubundaki Gal-3 ekspresyonunu, yalnız P4 grubundakinden anlamlı olarak daha düşük bulmuşlardır. Aynı çalışmanın sonuçlarına göre, normal endometriyal hücrelerde Gal-3'ün E2 ve P4 ile düzenlenmesi endometriyozisli kadınların ötopik endometriyal hücrelerinde görülmemiştir. (Yang et al., 2016).

Gal-1'in hem insan endometriyumunda, hem de desiduada immünomodülatör rolü oynadığı görülmektedir (Smetana et al., 1999). Gal-3 ve Gal-1 implantasyon penceresi sırasında yüksek oranda eksprese edilir (Lee et al., 1998). Her ikisinin ekspresyonundaki değişikliklerin implantasyon kayıplarına, endometriozis ve infertiliteye yol açabileceği bildirilmiştir (Jeschke et al., 2013).

Başta östrojen ve progesteron olmak üzere steroidler, birçok biyolojik süreçte, özellikle de üreme dokularının gelişimi ve korunmasında önemli roller oynarlar. Endometriozis ile ilişkili infertilitenin anormal cinsiyet hormonu düzenlemeleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Yang et al., 2012). Endometriyoziste endometriyal doku rahim boşluğu dışında bir alana lokalize olur ve *de novo* olarak östrojen salgılayıp hormonal düzensizliklere katkı sunar (Jeschke et al., 2013). Endometriyozisin kronik enflamatuar bir durum olması ve endometriyoziste hormonal dengenin bozulması

galektinlerin bu hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Literatürdeki çalışmaların birçoğu endometriyozis olgularında, proliferatif ve sekretuar fazlarda normal endometriyuma kıyasla ötopik endometriyumda artmış Gal-1 ve -3 ekspresyonu bildirilmiştir (Noël et al., 2011; Vergetaki et al., 2014; Mattos et al., 2019). Yapılan araştırmalarda, Gal-3'ün endometriozisli kadınların hem ötopik hem de ektopik endometriyumlarında kontrollere kıyasla aşırı eksprese edildiği vurgulanmıştır (Noël et al., 2011). Bu sonuçlar, proinflatuar moleküllerin üretimini tetiklediği (Jeon et al., 2010) ve immün hücre aktivasyonunu (Dragomir et al., 2012) teşvik ettiği gözlemlenen Gal-3 ile uyumludur. Bu çalışmaların aksine, endometriyozisi olan kadınların ötopik endometriyumunda Gal-3 ekspresyonunun azaldığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Yang et al., 2016).

Galektinlerin, immün gözetim (sürvelans), anjiyogenez, hücre migrasyonu, tümör hücresi adezyonu ve kemoterapiye hücresel yanıt üzerindeki etkileri yoluyla tümör ilerlemesini güçlü bir şekilde düzenleyebildiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Galektinlerin ve özellikle galektin-1'in kanser patogeneğinde önemli rol oynadığını ve galektin ekspresyonunun tümör saldırganlığı ve neoplazilerdeki ilerlemeyle ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Hirabayashi et al., 2002).

Normal hücrelere kıyasla tümör hücrelerinde galektin-1 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını bildiren kapsamlı literatür vardır (Van den Brûle et al., 2003; Kim et al., 2013). Ayrıca, normal dokuya kıyasla çeşitli tümör tiplerinde kanser hücrelerinin ve tümörle ilişkili endotel hücrelerinin ekstraselüler alana yüksek miktarlarda salgılandığı tespit edilmiştir (Thijssen, Hulsmans ve Griffioen, 2008; Croci et al., 2012). Kaposi sarkomu, kolon, meme, prostat ve mide kanserindeki benzer bulgular, galektin-1 ekspresyonu ile sağkalım arasında güçlü bir ilişkinin varlığı gösterilmiştir (Jung et al., 2007; Chen et al., 2013). Tüm bunlara ek olarak, Gal-1'in ekspresyonundaki artışın hücre transformasyonu, hücre proliferasyonu anjiyogenez, hücre adezyonu ve invazyonu, ve immünosupresyondaki pleiotropik rolleri göz önüne alındığında tümör progresyonunu dramatik şekilde etkileyebileceği kanısına varılmıştır (Paz et al., 2001; Van den Brûle et al., 2003). Gal-1 ekspresyonu genellikle kötü prognoz ve metastaza eğilim ile ilişkili gözükmektedir (Camby et al., 2006). Gal-1 hücre migrasyonu, adezyon ve anjiyogenez gibi çeşitli biyolojik olayları



indükleyerek tümör gelişimi, progresyonu ve metastazını etkiliyor gözükmektedir (Liu ve Rabinovich, 2005). Yapılan araştırmalar Gal-1'in olası bir biyobelirteç olarak uygunluğunun altını çizmekte veya kanserde terapötik hedef olarak kullanılabileceğini ileri sürmektedir.

Gal-3'ün tümör progresyonundaki fonksiyonu ise Gal-1'den farklı olarak apoptozis inhibisyonu yapmasıyla ilişkili durmaktadır (Liu ve Rabinovich, 2005). Yapılan bir çalışmada p53 tümör supresör geni ile indüklenen apoptozisin Gal-3 ile inhibe edildiği gösterilmiştir (Cecchinelli et al., 2006). Yapılan araştırmalarda Gal-3'ün bir takım hücre tipinde çeşitli dizi apoptotik uyarılara karşı anti-apoptotik etkinliğe sahip olduğunu saptamıştır (Hsu ve Liu, 2002; Hsu, Yang ve Liu, 2006).

Çalışmamızda bir adenokarsinom hücre hattında galektinlerin hormonlarla düzenlenmesinin kanser patogenezi açısından da önemi bulunmaktadır. Östrojen reseptörü (ER) ve progesteron reseptörü (PR), endometriyal kanser için en geçerli prognostik biyobelirteçlerdir (Salvesen, Haldorsen ve Trovik, 2012). Bu bağlamda, östrojen ve progesteron hormonlarına ait reseptörleri olan tümörlerde, tedavi sürecinde hormon etkileri mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

Galektinler ile ilgili araştırmalar son on yılda uzun bir yol kat etmiş olsada, hücre içi ve hücre dışı alandaki işlevlerinin moleküler mekanizmaları ve bu aktiviteler arasındaki ilişki ve bunlarla ilişkili düzenleyici mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca, galektin fonksiyonunun yapısal yönleri, özellikle oligomerizasyonlarıyla bağlantılı olanlar da tam olarak bilinmemektedir ve daha fazla çalışma gerektirmektedir. Hücresel glikobiyoloji alanında belirlenmesi gereken bir diğer konu, galektinlerin hücrelerde ve dokularda sağlık ve hastalık durumlarında niceliksel dağılımlarının ve seviyelerinin belirlenmesidir.

Bu sorunların ele alınması, galektinlerin birçok hücrenel ve organizma işlevinin gizemini çözmeye yardımcı olacak ve ilişkili hastalıklar ve durumlar için gelecekteki tedavi stratejilerinin yolunu açacaktır.

## **5.2. Sonuçlar**

Çalışmamızda;

- Ishikawa hücrelerinde Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonunun ovaryan steroidlerle düzenlendiği,

- Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonu östradiol ve progesteronla zamana ve doza bağlı bir şekilde değiştiği,

- Gal-3'ün Ishikawa hücrelerinden Gal-1'e göre daha yüksek miktarlarda salgılandığı,

- Gal-3'te daha belirgin olmak koşuluyla hem Gal-1 hem de Gal-3 ekspresyonunun östradiole kıyasla progesterona daha duyarlı olduğu,

- Östradiolün Ishikawa hücrelerinde progesteron ile birlikte artış gösteren Gal-1 ve Gal-3 ekspresyonlarını henüz bilinmeyen bir mekanizma ile antagonize edebileceği gösterilmiştir.

## **5.3. Öneriler**

Gal-1 ve Gal-3'ün patogenezinde rol aldığı bilinen ve özellikle de patogenezinin ve prognozunu hormonların etkilediği hastalıklar ve durumlarda (ER ve PR -pozitif kanserler, endometriyozis, pre-eklampsi, spontane düşüklükler, infertilite vb) galektinlerin hormonlarla düzenlendiğinin göz önünde bulundurulması ve tedavi yöntemlerinin ona göre seçilmesi gerekir. Bütün bu bilgiler ışığında ovaryan hormonların galektinler üzerindeki etkilerinin moleküler mekanizmaları ve yollarının aydınlatılabilmesi için hormon reseptör antagonistleri ve galektin inhibitörleri ile yapılacak detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## KAYNAKÇA

- Advedissian, T., Deshayes, F. and Viguiet, M. (2017) *Galectin-7 in epithelial homeostasis and carcinomas*, International Journal of Molecular Sciences, 18(12), ss. 8 -10.
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Jonassen, A.H., Gromova, I., Mortensen, M. and Jäättelä, M. (2015) *Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay*, in Autophagy, 11(8), ss. 1408–1424.
- Akahani, S., Nangia-Makker, P., Inohara, H., Kim, H.R.C. and Raz, A. (1997) *Galectin-3: A novel antiapoptotic molecule with A functional BHI (NWGR) domain of Bcl-2 family*, Cancer Research, 57(23), ss. 5272–5276.
- Al-Maghrabi, J., Abdelrahman, A.S., Ghabrah, T., Butt, N.S., Al-Maghrabi, B. and Khabaz, M.N. (2017) *Immunohistochemical expression of galectin-3 is significantly associated with grade, stage and differentiation of endometrial carcinomas*, Pathology Research and Practice, 213(4), ss. 348–352.
- Almkvist, J. and Karlsson, A. (2002) *Galectins as inflammatory mediators*, Glycoconjugate Journal, 19, ss. 575–581.
- Arthur, C.M., Baruffi, M.D., Cummings, R.D. and Stowell, S.R. (2015) *Evolving mechanistic insights into galectin functions*, Methods in Molecular Biology, 1207, ss. 1–35.
- Barrow, H., Rhodes, J.M. and Yu, L.G. (2011) *The role of galectins in colorectal cancer progression*, International Journal of Cancer, 107(10), ss. 1390-1398
- Bertuzzi, S., Quintana, J.I., Ardá, A., Gimeno, A. and Jiménez-Barbero, J. (2020) *Targeting Galectins With Glycomimetics*, Frontiers in Chemistry, 7(8), ss. 500-593.
- Bhat, R., Belardi, B., Mori, H., Kuo, P., Tam, A., Hines, W.C., Le, Q.T., Bertozzi, C.R. and Bissell, M.J. (2016) *Nuclear repartitioning of galectin-1 by an extracellular glycan switch regulates mammary morphogenesis*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(33), ss. E4820–E4827.
- Blidner, A.G., Méndez-Huergo, S.P., Cagnoni, A.J. and Rabinovich, G.A. (2015) *Re-*

wiring regulatory cell networks in immunity by galectin-glycan interactions, *FEBS Letters*, 589(22) ss. 3407–3418.

Blidner, A.G. and Rabinovich, G.A. (2013) 'Sweetening' Pregnancy: Galectins at the Fetomaternal Interface, *American Journal of Reproductive Immunology*, 69(4), ss. 369–382.

Brandwijk, R.J.M.G.E., Dings, R.P.M., van der Linden, E., Mayo, K.H., Thijssen, V.L.J.L. and Griffioen, A.W. (2006) *Anti-angiogenesis and anti-tumor activity of recombinant anginex*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(3), ss. 1073–1078.

Van den Brûle, F., Califice, S., Garnier, F., Fernandez, P.L., Berchuck, A. and Castronovo, V. (2003) *Galectin-1 accumulation in the ovary carcinoma peritumoral stroma is induced by ovary carcinoma cells and affects both cancer cell proliferation and adhesion to laminin-1 and fibronectin*, *Laboratory Investigation*, 83(3), ss. 377–386.

Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F. and Kiss, R. (2006) *Galectin-1: A small protein with major functions*, *Glycobiology*. Oxford, 16(11), ss. 137-157.

Campo, V.L., Marchiori, M.F., Rodrigues, L.C. and Dias-Baruffi, M. (2016) *Synthetic glycoconjugates inhibitors of tumor-related galectin-3: an update*, *Glycoconjugate Journal*, 33(6) ss. 853–876.

Cecchinelli, B., Lavra, L., Rinaldo, C., Iacovelli, S., Gurtner, A., Gasbarri, A., Olivieri, A., Del Prete, F., Trovato, M., Piaggio, G., Bartolozzi, A., Soddu, S. and Sciacchitano, S. (2006) *Repression of the Antiapoptotic Molecule Galectin-3 by Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2-Activated p53 Is Required for p53-Induced Apoptosis*, *Molecular and Cellular Biology*, 26(12), ss. 4746–4757.

Chen, J., Zhou, S.J., Zhang, Y., Zhang, G.Q., Zha, T.Z., Feng, Y.Z. and Zhang, K. (2013) *Clinicopathological and prognostic significance of galectin-1 and vascular endothelial growth factor expression in gastric cancer*, *World Journal of Gastroenterology*, 19(13), ss. 2073–2079.

Chen, W.S., Cao, Z., Leffler, H., Nilsson, U.J. and Panjwani, N. (2017) *Galectin-3 inhibition by a small-molecule inhibitor reduces both pathological corneal neovascularization and fibrosis*, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*,

58(1), ss. 9–20.

Chiariotti, L., Salvatore, P., Frunzio, R. and Bruni, C.B. (2002) *Galectin genes: Regulation of expression*, Glycoconjugate Journal, 19(7-9), ss. 441–449.

Choe, Y.S., Shim, C., Choi, D., Lee, C.S., Lee, K.-K. and Kim, K. (1997) *Expression of Galectin-1 mRNA in the Mouse Uterus Is Under the Control of Ovarian Steroids During Blastocyst Implantation*, Molecular Reproduction and Development, 48, ss. 261–266.

Chou, F.C., Chen, H.Y., Kuo, C.C. and Sytwu, H.K. (2018) *Role of galectins in tumors and in clinical immunotherapy*, International Journal of Molecular Sciences, 19(2), ss. 430-450.

Chung, J.C., Oh, M.J., Choi, S.H. and Bae, C.D. (2008) *Proteomic analysis to identify biomarker proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma*, ANZ Journal of Surgery, 78(4), ss. 245–251.

Clare, D.K., Magescas, J., Piolot, T., Dumoux, M., Vesque, C., Pichard, E., Dang, T., Duvauchelle, B., Poirier, F. and Delacour, D. (2014) *Basal foot MTOC organizes pillar MTs required for coordination of beating cilia*, Nature Communications, 5(1), ss. 4888- 4898.

Collins, F., MacPherson, S., Brown, P., Bombail, V., Williams, A.R.W., Anderson, R.A., Jabbour, H.N. and Saunders, P.T.K. (2009) *Expression of oestrogen receptors, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and ER $\beta$  variants, in endometrial cancers and evidence that prostaglandin F may play a role in regulating expression of ER $\alpha$* , BMC Cancer, 9(1), ss. 330-340.

Croci, D.O., Salatino, M., Rubinstein, N., Cerliani, J.P., Cavallin, L.E., Leung, H.J., Ouyang, J., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A., Domaica, C.I., Croci, M.C., Shipp, M.A., Mesri, E.A., Albini, A. and Rabinovich, G.A. (2012) *Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma*, Journal of Experimental Medicine, 209(11), ss. 1985–2000.

Cummings, R.D. and Liu, F.-T. (2009) *Galectins*, Essentials of Glycobiology. 3üncü Bası. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cumpstey, I., Salomonsson, E., Sundin, A., Leffler, H. and Nilsson, U.J. (2007)

*Studies of arginine-arene interactions through synthesis and evaluation of a series of galectin-binding aromatic lactose esters*, ChemBioChem, 8(12), ss. 1389–1398.

Cumpstey, I., Sundin, A., Leffler, H. and Nilsson, U.J. (2005) *C2-symmetrical thiodigalactoside bis-benzamido derivatives as high-affinity inhibitors of galectin-3: Efficient lectin inhibition through double arginine-arene interactions*, Angewandte Chemie, 117(32), ss. 5240–5242.

D'Haene, N., Maris, C., Sandras, F., Dehou, M.F., Remmelink, M., Decaestecker, C. and Salmon, I. (2005) *The differential expression of galectin-1 and galectin-3 in normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphomas*, International Journal of Immunopathology and Pharmacology, 18(3), ss. 431–443.

Dagher, S.F., Wang, J.L. and Patterson, R.J. (1995) *Identification of galectin-3 as a factor in pre-mRNA splicing*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 92(4), ss. 1213–1217.

Delacour, D., Cramm-Behrens, C.I., Drobecq, H., Le Bivic, A., Naim, H.Y. and Jacob, R. (2006) *Requirement for galectin-3 in apical protein sorting*, Current Biology, 16(4), ss. 408–414.

Delacour, D., Gouyer, V., Zanetta, J.P., Drobecq, H., Leteurtre, E., Grard, G., Moreau-Hannedouche, O., Maes, E., Pons, A., André, S., Le Bivic, A., Gabius, H.J., Manninen, A., Simons, K. and Huet, G. (2005) *Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells*, Journal of Cell Biology, 169(3), ss. 491–501.

Delaine, T., Collins, P., MacKinnon, A., Sharma, G., Stegmayr, J., Rajput, V.K., Mandal, S., Cumpstey, I., Larumbe, A., Salameh, B.A., Kahl-Knutsson, B., van Hattum, H., van Scherpenzeel, M., Pieters, R.J., Sethi, T., Schambye, H., Oredsson, S., Leffler, H., Blanchard, H. (2016) *Galectin-3-Binding Glycomimetics that Strongly Reduce Bleomycin-Induced Lung Fibrosis and Modulate Intracellular Glycan Recognition*, ChemBioChem, 17(18), ss. 1759–1770.

Delaine, T., Cumpstey, I., Ingrassia, L., Le Mercier, M., Okechukwu, P., Leffler, H., Kiss, R. and Nilsson, U.J. (2008) *Galectin-inhibitory thiodigalactoside ester derivatives have antimigratory effects in cultured lung and prostate cancer cells*, Journal of Medicinal Chemistry, 51(24), ss. 8109–8114.

Demotte, N., Bigirimana, R., Wieërs, G., Stroobant, V., Squifflet, J.L., Carrasco, J.,

Thielemans, K., Baurain, J.F., Van Der Smissen, P., Courtoy, P.J. and Van Der Bruggen, P. (2014) *A short treatment with galactomannan GM-CT-01 corrects the functions of freshly isolated human tumor-infiltrating lymphocytes*, *Clinical Cancer Research*, 20(7), ss. 1823–1833.

Dings, R.P.M., Kumar, N., Miller, M.C., Loren, M., Rangwala, H., Hoye, T.R. and Mayo, K.H. (2013) *Structure-based optimization of angiostatic agent 6DBF7, an allosteric antagonist of galectin-1*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 344(3), ss. 589–599.

Dragomir, A.-C.D., Sun, R., Choi, H., Laskin, J.D. and Laskin, D.L. (2012) *Role of Galectin-3 in Classical and Alternative Macrophage Activation in the Liver following Acetaminophen Intoxication*, *The Journal of Immunology*, 189(12), ss. 5934–5941.

Dumic, J., Dabelic, S. and Flögel, M. (2006) *Galectin-3: An open-ended story*, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1760(4), ss. 616–635.

Elola, M.T., Wolfenstein-Todel, C., Troncoso, M.F., Vasta, G.R. and Rabinovich, G.A. (2007) *Galectins: Matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival*, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(13), ss. 1679–1700.

Engelsen, I.B., Stefansson, I.M., Akslen, L.A. and Salvesen, H.B. (2008) *GATA3 expression in estrogen receptor  $\alpha$ -negative endometrial carcinomas identifies aggressive tumors with high proliferation and poor patient survival*, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5), ss. 543.e1-543.e7.

Fischer, C., Sanchez-Ruderisch, H., Welzel, M., Wiedenmann, B., Sakai, T., André, S., Gabius, H.J., Khachigian, L., Detjen, K.M. and Rosewicz, S. (2005) *Galectin-1 interacts with the  $\alpha 5 \beta 1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27*, *Journal of Biological Chemistry*, 280(44), ss. 37266–37277.

Flavin, W.P., Bousset, L., Green, Z.C., Chu, Y., Skarpathiotis, S., Chaney, M.J., Kordower, J.H., Melki, R. and Campbell, E.M. (2017) *Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins*, *Acta Neuropathologica*, 134(4), ss. 629–653.

Furtak, V., Hatcher, F. and Ochieng, J. (2001) *Galectin-3 mediates the endocytosis of  $\alpha$ -1 integrins by breast carcinoma cells*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(4), ss. 845–850.

Gehlken, C., Suthahar, N., Meijers, W.C. and de Boer, R.A. (2018) *Galectin-3 in Heart Failure: An Update of the Last 3 Years*, Heart Failure Clinics, 14(1), ss. 75–92.

Glinsky, V. V. and Raz, A. (2009) *Modified citrus pectin anti-metastatic properties: one bullet, multiple targets*, Carbohydrate Research. Elsevier, 344(14), ss. 1788–1791.

Gordon-Alonso, M., Hirsch, T., Wildmann, C. and Van Der Bruggen, P. (2017) *Galectin-3 captures interferon-gamma in the tumor matrix reducing chemokine gradient production and T-cell tumor infiltration*, Nature Communications, 8(1), ss. 1–15.

Gul, A.E., Keser, S.H., Barisik, N.O., Kandemir, N.O., Cakir, C., Sensu, S. and Karadayi, N. (2010) *The relationship of cerb B 2 expression with estrogen receptor and progesterone receptor and prognostic parameters in endometrial carcinomas*, Diagnostic Pathology, 5(13), ss. 1596-1746.

Harazono, Y., Nakajima, K. and Raz, A. (2014) *Why anti-Bcl-2 clinical trials fail: A solution*, Cancer and Metastasis Reviews, 33(1), ss. 285–294.

Haudek, K.C., Spronk, K.J., Voss, P.G., Patterson, R.J., Wang, J.L. and Arnoys, E.J. (2010) *Dynamics of galectin-3 in the nucleus and cytoplasm*, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1800(2), ss. 181–189.

He, J. and Baum, L.G. (2004) *Presentation of Galectin-1 by Extracellular Matrix Triggers T Cell Death*, Journal of Biological Chemistry, 279(6), ss. 4705–4712.

Hirabayashi, J., Hashidate, T., Arata, Y., Nishi, N., Nakamura, T., Hirashima, M., Urashima, T., Oka, T., Futai, M., Muller, W.E.G., Yagi, F. and Kasai, K.I. (2002) *Oligosaccharide specificity of galectins: A search by frontal affinity chromatography*, Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects, 1572(2-3), ss. 232–254.

Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M. and Chen, Y.L. (2008) *Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells*, Oncogene, 27(26), ss. 3746–3753.

Hsu, D.K. and Liu, F.T. (2002) *Regulation of cellular homeostasis by galectins*, Glycoconjugate Journal, 19(7-9), ss. 507–515.

Hsu, D.K., Yang, R.Y. and Liu, F.T. (2006) *Galectins in Apoptosis*, Methods in



Enzymology, 417, ss. 256–273.

Huang, K.Y., Ong, S.C., Wu, C.C., Hsu, C.W., Lin, H.C., Fang, Y.K., Cheng, W.H., Huang, P.J., Chiu, C.H. and Tang, P. (2017) *Metabolic reprogramming of hydrogenosomal amino acids in Trichomonas vaginalis under glucose restriction*, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 52(4), ss. 630-637.

Hughes, R. (1999) *Memeli karbonhidrat bağlayıcı proteinlerin galektin ailesinin salgılanması*, Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects, 1473(1), ss. 172-185.

Jazaeri, A.A., Nunes, K.J., Dalton, M.S., Xu, M., Shupnik, M.A. and Rice, L.W. (2001) *Well-differentiated endometrial adenocarcinomas and poorly differentiated mixed mullerian tumors have altered ER and PR isoform expression*, Oncogene, 20(47), ss. 6965–6969.

Jeon, S.-B., Yoon, H.J., Chang, C.Y., Koh, H.S., Jeon, S.-H. and Park, E.J. (2010) *Galectin-3 Exerts Cytokine-Like Regulatory Actions through the JAK–STAT Pathway*, The Journal of Immunology, 185(11), ss. 7037–7046.

Jeschke, U., Hutter, S., Heublein, S., Vrekoussis, T., Andergassen, U., Unverdorben, L., Papadakis, G. and Makrigiannakis, A. (2013) *Expression and function of galectins in the endometrium and at the human feto-maternal interface*, Placenta, 34(10), ss. 863–872.

Jeschke, U., Karsten, U., Wiest, I., Schulze, S., Kuhn, C., Friese, K. and Walzel, H. (2006) *Binding of galectin-1 (gal-1) to the Thomsen-Friedenreich (TF) antigen on trophoblast cells and inhibition of proliferation of trophoblast tumor cells in vitro by gal-1 or an anti-TF antibody*, Histochemistry and Cell Biology, 126(4), ss. 437–444.

Jiang, P., Gan, M., Yen, S.H., McLean, P.J. and Dickson, D.W. (2017) *Impaired endo-lysosomal membrane integrity accelerates the seeding progression of  $\alpha$ -synuclein aggregates*, Scientific Reports, 7(1), ss. 1–13.

Johannes, L., Jacob, R. and Leffler, H. (2018) *Galectins at a glance*, Journal of Cell Science, 131(9) [Çevrimiçi], Erişim Adresi: <https://journals.biologists.com/jcs/article/131/9/jcs208884/57083/Galectins-at-a-glance> (Erişim Tarihi: 17 Nisan 2021).

Jung, E.J., Moon, H.G., Bok, I.C., Jeong, C.Y., Joo, Y.T., Lee, Y.J., Hong, S.C., Choi,

- S.K., Ha, W.S., Jae, W.K., Lee, C.W., Jong, S.L. and Park, S.T. (2007) *Galectin-1 expression in cancer-associated stromal cells correlates tumor invasiveness and tumor progression in breast cancer*, *International Journal of Cancer*, 120(11), ss. 2331–2338.
- Kamili, N.A., Arthur, C.M., Gerner-Smidt, C., Tafesse, E., Blenda, A., Dias-Baruffi, M. and Stowell, S.R. (2016) *Key regulators of galectin-glycan interactions*, *Proteomics*, 16(24), ss. 3111–3125.
- Kang, H.G., Kim, D.H., Kim, S.J., Cho, Y., Jung, J., Jang, W. and Chun, K.H. (2016) *Galectin-3 supports stemness in ovarian cancer stem cells by activation of the Notch1 intracellular domain*, *Oncotarget*, 7(42), ss. 68229–68241.
- Kim, B.W., Beom Hong, S., Hoe Kim, J., Hoon Kwon, D. and Song, H.K. (2013) *Structural basis for recognition of autophagic receptor NDP52 by the sugar receptor galectin-8*, *Nature Communications*, 4(1), ss. 1–8.
- Kim, H.J., Do, I.G., Jeon, H.K., Cho, Y.J., Park, Y.A., Choi, J.J., Sung, C.O., Lee, Y.Y., Choi, C.H., Kim, T.J., Kim, B.G., Lee, J.W. and Bae, D.S. (2013) *Galectin 1 expression is associated with tumor invasion and metastasis in stage IB to IIA cervical cancer*, *Human Pathology*, 44(1), ss. 62–68.
- Kim, H.J., Jeon, H.K., Cho, Y.J., Park, Y.A., Choi, J.J., Do, I.G., Song, S.Y., Lee, Y.Y., Choi, C.H., Kim, T.J., Bae, D.S., Lee, J.W. and Kim, B.G. (2012) *High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion*, *European Journal of Cancer*, 48(12), ss. 1914–1921.
- Koch, A., Poirier, F., Jacob, R. and Delacour, D. (2010) *Galectin-3, a Novel Centrosome-associated Protein, Required for Epithelial Morphogenesis*, *Molecular Biology of the Cell*, 21(2), ss. 219–231.
- Kopitz, J., Von Reitzenstein, C., André, S., Kaltner, H., Uhl, J., Ehemann, V., Cantz, M. and Gabius, H.J. (2001) *Negative Regulation of Neuroblastoma Cell Growth by Carbohydrate-dependent Surface Binding of Galectin-1 and Functional Divergence from Galectin-3*, *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), ss. 35917–35923.
- Lakshminarayan, R., Wunder, C., Becken, U., Howes, M.T., Benzing, C., Arumugam, S., Sales, S., Ariotti, N., Chambon, V., Lamaze, C., Loew, D., Shevchenko, A., Gaus, K., Parton, R.G. and Johannes, L. (2014) *Galectin-3 drives glycosphingolipid-dependent biogenesis of clathrin-independent carriers*, *Nature Cell Biology*, 16(6), ss.

592–603.

Landegren, U., Al-Amin, R.A. and Björkesten, J. (2018) *A myopic perspective on the future of protein diagnostics*, *New Biotechnology*, 45, ss. 14–18.

Langbein, S., Brade, J., Badawi, J.K., Hatzinger, M., Kaltner, H., Lensch, M., Specht, K., André, S., Brinck, U., Alken, P. and Gabius, H.J. (2007) *Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance*, *Histopathology*, 51(5), ss. 681–690.

Lax, S.F. (2016) *Neues in der WHO-Klassifikation 2014 der Tumoren des Corpus uteri*, *Pathologe*, 37(6), ss. 500–511.

Lax, S.F. (2019) *Precursor lesions of endometrial carcinoma*, *Pathologe*, 40(1), ss. 13–20.

Lee, V.H., Lee, A.B., Phillips, E.B., Roberts, J.K. and Weitlauf, H.M. (1998) *Spatio-Temporal Pattern for Expression of Galectin-3 in the Murine Utero-Placental Complex: Evidence for Differential Regulation*, *Biology of Reproduction* 58(5), ss. 1277–1282.

Leffler, H., Carlsson, S., Hedlund, M., Qian, Y. and Poirier, F. (2002) *Introduction to galectins*, *Glycoconjugate Journal*, 19(7), ss. 433–440.

Di Lella, S., Sundblad, V., Cerliani, J.P., Guardia, C.M., Estrin, D.A., Vasta, G.R. and Rabinovich, G.A. (2011) *When galectins recognize glycans: From biochemistry to physiology and back again*, *Biochemistry*, 50(37), ss. 7842–7857.

Lepur, A., Salomonsson, E., Nilsson, U.J. and Leffler, H. (2012) *Ligand induced galectin-3 protein self-association*, *Journal of Biological Chemistry*, 287(26), ss. 21751–21756.

Lesniewicz, T., Kanczuga-Koda, L., Baltaziak, M., Jarzabek, K., Rutkowski, R., Koda, M., Wincewicz, A., Sulkowska, M. and Sulkowski, S. (2009) *Comparative evaluation of estrogen and progesterone receptor expression with connexins 26 and 43 in endometrial cancer*, *International Journal of Gynecological Cancer*, 19(7), ss. 1253–1257.

Li, S., Wandel, M.P., Li, F., Liu, Z., He, C., Wu, J., Shi, Y. and Randow, F. (2013) *Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for*

*the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy*, *Science Signaling*, 6(261), ss. ra9-ra9.

Liao, D.I., Kapadia, G., Ahmed, H., Vasta, G.R. and Herzberg, O. (1994) *Structure of S-lectin, a developmentally regulated vertebrate  $\beta$ -galactoside-binding protein*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(4), ss. 1428–1432.

Lindstedt, R., Apodaca, G., Barondes, S.H., Mostov, K.E. and Leffler, H. (1993) *Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway*, *Journal of Biological Chemistry*, 268(16), ss. 11750–11757.

Liu, F.T., Patterson, R.J. and Wang, J.L. (2002) *Intracellular functions of galectins*, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1572(2-3), ss. 263–273.

Liu, F.T. and Rabinovich, G.A. (2005) *Galectins as modulators of tumour progression*, *Nature Reviews Cancer*, 5(1), ss. 29–41.

Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$  method*, *Methods*, 25(4), ss. 402–408.

Magescas, J., Sengmanivong, L., Viau, A., Mayeux, A., Dang, T., Burtin, M., Nilsson, U.J., Leffler, H., Poirier, F., Terzi, F. and Delacour, D. (2017) *Spindle pole cohesion requires glycosylation-mediated localization of NuMA*, *Scientific Reports*, 7(1), ss. 1–14.

Maier, O., Marvin, S.A., Wodrich, H., Campbell, E.M. and Wiethoff, C.M. (2012) *Spatiotemporal Dynamics of Adenovirus Membrane Rupture and Endosomal Escape*, *Journal of Virology*, 86(19), ss. 10821–10828.

Markman, M. (2005) *Hormonal therapy of endometrial cancer*, *European Journal of Cancer*, 41(5), ss. 673–675.

Massa, S.M., Cooper, D.N.W., Leffler, H. and Barondes, S.H. (1993) *L-29, an Endogenous Lectin, Binds to Glycoconjugate Ligands with Positive Cooperativity*, *Biochemistry*, 32(1), ss. 260–267.

Mattos, R.M. de, Machado, D.E., Perini, J.A., Alessandra-Perini, J., Meireles da Costa, N. de O., Wicikowski, A.F. da R. de O., Cabral, K.M. dos S., Takiya, C.M., Carvalho,

R.S. and Nasciutti, L.E. (2019) *Galectin-3 plays an important role in endometriosis development and is a target to endometriosis treatment*, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 486, ss. 1–10.

Mayo, K.H., Dings, R.P.M., Flader, C., Nesmelova, I., Hargittai, B., Van Der Schaft, D.W.J., Van Eijk, L.I., Walek, D., Haseman, J., Hoye, T.R. and Griffioen, A.W. (2003) *Design of a Partial Peptide Mimetic of Anginex with Antiangiogenic and Anticancer Activity*, *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), ss. 45746–45752.

Menkhorst, E.M., Gamage, T., Cuman, C., Kaitu’U-Lino, T.J., Tong, S. and Dimitriadis, E. (2014) *Galectin-7 acts as an adhesion molecule during implantation and increased expression is associated with miscarriage*, *Placenta*, 35(3), ss. 195–201.

Mueller, S.O. and Korach, K.S. (2001) *Estrogen receptors and endocrine diseases: Lessons from estrogen receptor knockout mice*, *Current Opinion in Pharmacology*, 1(6), ss. 613–619.

Mylonas, I., Jeschke, U., Shabani, N., Kuhn, C., Kunze, S., Dian, D., Friedl, C., Kupka, M.S. and Friese, K. (2007) *Steroid receptors ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR-A and PR-B are differentially expressed in normal and atrophic human endometrium*, *Histology and Histopathology*, 22(1–3), ss. 169–176.

Nishida, M. (2002) *The Ishikawa cells from birth to the present.*, *Human cell : official journal of Human Cell Research Society*, 15(3), ss. 104–117.

Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H. and Hayashi, K. (1985) *Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors*, *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica*, 37(7), ss. 1103–1111.

Noël, J.C., Chapron, C., Borghese, B., Fayt, I. and Anaf, V. (2011) *Galectin-3 is overexpressed in various forms of endometriosis*, *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, 19(3), ss. 253–257.

Nöske, H.D. and Weidner, W. (1999) *Varicocele - A historical perspective*, *World Journal of Urology*, 17(3), ss. 151–157.

Nyen, T. Van, Moiola, C.P., Colas, E., Annibali, D. and Amant, F. (2018) *Modeling endometrial cancer: Past, present, and future*, *International Journal of Molecular*

Sciences, 19(8), s. 2348-2348.

Paz, A., Haklai, R., Elad-Sfadia, G., Ballan, E. and Kloog, Y. (2001) *Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation*, *Oncogene*, 20(51), ss. 7486–7493.

Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M.-C., Lafont, F. and Sansonetti, P. (2010) *Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens*, *Cellular Microbiology*, 12(4), ss. 530–544.

Prior, I.A., Muncke, C., Parton, R.G. and Hancock, J.F. (2003) *Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains*, *The Journal of Cell Biology*, 160(2), ss. 165–170.

Rabinovich, G.A., Baum, L.G., Tinari, N., Paganelli, R., Natoli, C., Liu, F.T. and Iacobelli, S. (2002) *Galectins and their ligands: Amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response?*, *Trends in Immunology*, 23(6), ss. 313–320.

Rabinovich, G.A., Cumashi, A., Bianco, G.A., Ciavardelli, D., Iurisci, I., D'Egidio, M., Piccolo, E., Tinari, N., Nifantiev, N. and Iacobelli, S. (2006) *Synthetic lactulose amines: Novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis*, *Glycobiology*, 16(3), ss. 210–220.

Rubinstein, Natalia, Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L. and Rabinovich, G.A. (2004) *Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege*, *Cancer Cell*, 5(3), ss. 241–251.

Rubinstein, N., Ilarregui, J.M., Toscano, M.A. and Rabinovich, G.A. (2004) *The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response*, *Tissue Antigens*, 64(4), ss. 1–12.

Salomonsson, E., Carlsson, M.C., Osla, V., Hendus-Altenburger, R., Kahl-Knutson, B., Öberg, C.T., Sundin, A., Nilsson, R., Nordberg-Karlsson, E., Nilsson, U.J., Karlsson, A., Rini, J.M. and Leffler, H. (2010) *Mutational tuning of galectin-3 specificity and biological function*, *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), ss. 35079–35091.

- Salomonsson, E., Larumbe, A., Tejler, J., Tullberg, E., Rydberg, H., Sundin, A., Khabut, A., Frejd, T., Lobsanov, Y.D., Rini, J.M., Nilsson, U.J. and Leffler, H. (2010) *Monovalent interactions of galectin-1*, *Biochemistry*, 49(44), ss. 9518–9532.
- Salvesen, H.B., Haldorsen, I.S. and Trovik, J. (2012) *Markers for individualised therapy in endometrial carcinoma*, *The Lancet Oncology*, 13(8), ss. 353-361.
- Saussez, S., Lorfevre, F., Lequeux, T., Laurent, G., Chantrain, G., Vertongen, F., Toubeau, G., Decaestecker, C. and Kiss, R. (2008) *The determination of the levels of circulating galectin-1 and -3 in HNSCC patients could be used to monitor tumor progression and/or responses to therapy*, *Oral Oncology*, 44(1), ss. 86–93.
- Seelenmeyer, C., Wegehngel, S., Tews, I., Künzler, M., Aebi, M. and Nickel, W. (2005) *Cell surface counter receptors are essential components of the unconventional export machinery of galectin-1*, *Journal of Cell Biology*, 171(2), ss. 373–381.
- Semenza, G.L. (2007) *Hypoxia and cancer*, *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), ss. 223–224.
- Seval, Y., Cakmak, H., Kayisli, U.A. and Arici, A. (2006) *Estrogen-mediated regulation of p38 mitogen-activated protein kinase in human endometrium*, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(6), ss. 2349–2357.
- Shimura, T., Takenaka, Y., Fukumori, T., Tsutsumi, S., Okada, K., Hogan, V., Kikuchi, A., Kuwano, H. and Raz, A. (2005) *Implication of galectin-3 in Wnt signaling*, *Cancer Research*, 65(9), ss. 3535–3537.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2015) *Cancer statistics, 2015*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65(1), ss. 5–29.
- Siegel, R.L., Miller, K.D. and Jemal, A. (2018) *Cancer statistics, 2018*, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(1), ss. 7–30.
- Smetana, K., Holíková, Z., Klubal, R., Bovin, N. V., Dvořánková, B., Bartůňková, J., Liu, F.T. and Gabius, H.J. (1999) *Coexpression of binding sites for A(B) histo-blood group trisaccharides with galectin-3 and Lag antigen in human Langerhans cells*, *Journal of Leukocyte Biology*, 66(4), ss. 644–649.
- Šmuc, T. and Rižner, T.L. (2009) *Aberrant pre-receptor regulation of estrogen and progesterone action in endometrial cancer*, *Molecular and Cellular Endocrinology*,

301(1–2), ss. 74–82.

Stechly, L., Morelle, W., Dessen, A.F., André, S., Gard, G., Trinel, D., Dejonghe, M.J., Leteurtre, E., Drobecq, H., Trugnan, G., Gabius, H.J. and Huet, G. (2009) *Galectin-4-regulated delivery of glycoproteins to the brush border membrane of enterocyte-like cells*, *Traffic*, 10(4), ss. 438–450.

Stegmayr, J., Lepur, A., Kahl-Knutson, B., Aguilar-Moncayo, M., Klyosov, A.A., Field, R.A., Oredsson, S., Nilsson, U.J. and Leffler, H. (2016) *Low or No Inhibitory Potency of the Canonical Galectin Carbohydrate-binding Site by Pectins and Galactomannans*, *Journal of Biological Chemistry*, 291(25), ss. 13318–13334.

Stewart, S.E., Menzies, S.A., Popa, S.J., Savinykh, N., Harrison, A.P., Lehner, P.J. and Moreau, K. (2017) *A genome-wide CRISPR screen reconciles the role of N-linked glycosylation in galectin-3 transport to the cell surface*, *Journal of Cell Science*, 130(19), ss. 3234–3247.

Straube, T., Von Mach, T., Hönig, E., Greb, C., Schneider, D. and Jacob, R. (2013) *pH-dependent recycling of galectin-3 at the apical membrane of epithelial cells*, *Traffic*, 14(9), ss. 1014–1027.

Szöke, T., Kayser, K., Baumhäkel, J.D., Trojan, I., Furak, J., Tiszlavicz, L., Horvath, A., Szluha, K., Gabius, H.J. and Andre, S. (2005) *Prognostic significance of endogenous adhesion/growth-regulatory lectins in lung cancer*, *Oncology*, 69(2), ss. 167–174.

Thiemann, S. and Baum, L.G. (2016) *Galectins and Immune Responses-Just How Do They Do Those Things They Do?*, *Annual Review of Immunology*, 34, ss. 243–264.

Thijssen, V.L., Heusschen, R., Caers, J. and Griffioen, A.W. (2015) *Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review*, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1855(2), ss. 235–247.

Thijssen, V.L., Hulsmans, S. and Griffioen, A.W. (2008) *The galectin profile of the endothelium: Altered expression and localization in activated and tumor endothelial cells*, *American Journal of Pathology*, 172(2), ss. 545–553.

Thijssen, V.L.J.L., Postel, R., Brandwijk, R.J.M.G.E., Dings, R.P.M., Nesmelova, I., Satijn, S., Verhofstad, N., Nakabeppu, Y., Baum, L.G., Bakkers, J., Mayo, K.H.,



Poirier, F. and Griffioen, A.W. (2006) *Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(43), ss. 15975–15980.

Thurston, T.L.M., Wandel, M.P., Von Muhlinen, N., Foeglein, Á. and Randow, F. (2012) *Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion*, Nature, 482(7385), ss. 414–418.

Traber, P.G. and Zomer, E. (2013) *Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors*, PLoS ONE, 8(12), ss. 81-83.

Tran, A.Q. and Gehrig, P. (2017) *Recent Advances in Endometrial Cancer*, F1000Research, 6 [Çevrimiçi]. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5288678/> (Erişim Tarihi: 20 Haziran 2021).

Trovik, J., Wik, E., Werner, H.M.J., Krakstad, C., Helland, H., Vandenput, I., Njolstad, T.S., Stefansson, I.M., Marcickiewicz, J., Tingulstad, S., Staff, A.C., Amant, F., Akslen, L.A. and Salvesen, H.B. (2013) *Hormone receptor loss in endometrial carcinoma curettage predicts lymph node metastasis and poor outcome in prospective multicentre trial*, European Journal of Cancer, 49(16), ss. 3431–3441.

Vergetaki, A., Jeschke, U., Vrekoussis, T., Taliouri, E., Sabatini, L., Papakonstanti, E.A. and Makrigiannakis, A. (2014) *Galectin-1 overexpression in endometriosis and its regulation by neuropeptides (CRH, UCN) indicating its important role in reproduction and inflammation*, PLoS ONE, 9(12), ss. 114-229.

Vyakarnam, A., Dagher, S.F., Wang, J.L. and Patterson, R.J. (1997) *Evidence for a role for galectin-1 in pre-mRNA splicing*, Molecular and Cellular Biology, 17(8), ss. 4730–4737.

Wang, W.-H., Lin, C.-Y., Chang, M.R., Urbina, A.N., Assavalapsakul, W., Thitithanyanont, A., Chen, Y.-H., Liu, F.-T. and Wang, S.-F. (2019) *The Role of Galectins in Virus Infection - A Systemic Literature Review*, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 53(6), ss. 925-935..

Wang, W., Park, J.W., Wang, J.L. and Patterson, R.J. (2006) *Immunoprecipitation of spliceosomal RNAs by antisera to galectin-1 and galectin-3*, Nucleic Acids Research, 34(18), ss. 5166–5174.

Werner, H.M.J. and Salvesen, H.B. (2014) *Current status of molecular biomarkers in endometrial cancer*, Current Oncology Reports, 16(9), s. 403.

von Wolff, M., Wang, X., Gabius, H.J. and Strowitzki, T. (2005) *Galectin fingerprinting in human endometrium and decidua during the menstrual cycle and in early gestation*, Molecular Human Reproduction, 11(3), ss. 189–194.

Yang, H., Lei, C., Cheng, C., Feng, Y., Zhang, W., Petracco, R.G. and Sak, S. (2012) *The antiapoptotic effect of galectin-3 in human endometrial cells under the regulation of estrogen and progesterone*, Biology of Reproduction, 87(2), ss. 39–40.

Yang, H., Lei, C. and Zhang, W. (2012) *Expression of galectin-3 in mouse endometrium and its effect during embryo implantation*, Reproductive BioMedicine Online, 24(1), ss. 116–122.

Yang, H., Taylor, H.S., Lei, C., Cheng, C. and Zhang, W. (2011) *Hormonal Regulation of Galectin 3 in Trophoblasts and Its Effects on Endometrium*, Reproductive Sciences, 18(11), ss. 1118–1127.

Yang, H., Yin, J., Ficarrota, K., Hsu, S.H., Zhang, W. and Cheng, C. (2016) *Aberrant expression and hormonal regulation of Galectin-3 in endometriosis women with infertility*, Journal of Endocrinological Investigation, 39(7), ss. 785–791.

Yang, P., Kriatchko, A. and Roy, S.K. (2002) *Expression of ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  in the hamster ovary: Differential regulation by gonadotropins and ovarian steroid hormones*, Endocrinology, 143(6), ss. 2385–2398.

Yang, R.Y., Rabinovich, G.A. and Liu, F.T. (2008) *Galectins: Structure, function and therapeutic potential*, Expert Reviews in Molecular Medicine, 10(17), s. e17-e17.

Yang, T.I., Li, W.L., Chang, T.H., Lu, C.Y., Chen, J.M., Lee, P.I., Huang, L.M. and Chang, L.Y. (2019) *Adenovirus replication and host innate response in primary human airway epithelial cells*, Journal of Microbiology, Immunology and Infection, 52(2), ss. 207–214.

Zetterberg, F.R., Peterson, K., Johnsson, R.E., Brimert, T., Håkansson, M., Logan, D.T., Leffler, H. and Nilsson, U.J. (2018) *Monosaccharide Derivatives with Low-Nanomolar Lectin Affinity and High Selectivity Based on Combined Fluorine–Amide, Phenyl–Arginine, Sulfur– $\pi$ , and Halogen Bond Interactions*, ChemMedChem, 13(2),

ss. 133–137.

Zhou, X., Wang, Z., Zhao, Y., Podratz, K. and Jiang, S. (2007) *Characterization of sixteen endometrial cancer cell lines*, *Cancer Research*, 3870, ss. 14-18.

