



## RESEARCH ARTICLE

### Kısrak endometriyumunda Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) geni mRNA ekspresyonunun araştırılması

Gonca Şen<sup>1</sup>, Mustafa Hitit<sup>1,6</sup>, Çağlayan Özel<sup>1,5</sup>, Aydın Güzeloğlu<sup>1</sup>, Seyit Ali Kayış<sup>2</sup>,  
Mehmet Osman Atlı<sup>3</sup>, Ercan Kurar<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, <sup>2</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Biyometri-Genetik Anabilim Dalı, 42075, Konya, <sup>3</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, <sup>4</sup>Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 42080, Konya, <sup>5</sup>Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, 71450, Kırıkkale, <sup>6</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, Türkiye

Geliş: 15.10.2014, Kabul: 17.11.2014

\*ekurar@konya.edu.tr

### Expression of Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) gene at mRNA level in equine endometrium

Eurasian J Vet Sci, 2015, 31, 1, 51-56  
DOI: 10.15312/EurasianJvetSci.201518477

#### Özet

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, siklus ve erken gebelik dönemlerinde dinamik bir yapıya sahip olan kısrak endometriyumunda phosphatase and tensin homolog (PTEN) gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde belirlenmesidir.

**Gereç ve Yöntem:** Araştırmada her güne 4 farklı kısrak olacak şekilde (n=4/gün) siklik kısraklardan ovulasyon gününde (d0), geç diöstrusta (LD) ve luteolizis sonrası östrusta (AL), gebe kısraklardan ise gebeliğin 14. (P14), 18. (P18) ve 22. (P22) günlerinde endometriyum biyopsi örnekleri toplandı. Doku örneklerinden total RNA elde edildi ve cDNA'ya dönüştürüldü. PTEN ekspresyonlarında siklus ve gebeliğe bağlı muhtemel değişiklikler mRNA seviyesinde kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPZR) kullanılarak araştırıldı. Referans gen olarak GAPDH ekspresyonu ile normalize edilen veriler karışık model kullanılarak analiz edildi. Farklı olan grup(lar) Asgari Önemli Fark (LSD) testi ile tespit edildi.

**Bulgular:** PTEN ekspresyonu çalışmaya konu olan tüm siklus ve erken gebelik dönemlerinde at endometriyumunda mRNA düzeyinde tespit edildi. LD'e göre AL'de ekspresyon seviyesinde anlamlı olmayan bir düşüş gözlemlendi. Benzer şekilde d0'a göre araştırılan P14, P18 ve P22 erken gebelik günlerinde PTEN ekspresyonunun baskılanmış olduğu tespit edildi. Ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P>0.10).

**Öneri:** PTEN aktivitesinin ve protein düzeyinde ekspresyonunun araştırılmasının anlamlı olacağı kanaatine varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** At, endometriyum, PTEN, gen ekspresyonu

#### Abstract

**Aim:** Aim of this study was to investigate PTEN expression in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy.

**Materials and Methods:** Biopsies were obtained from mares on day of ovulation (d0, n=4), late diestrus (LD, n=4) and after luteolysis in the beginning of estrus phase (AL, n=4) of the cycle and days 14 (P14, n=4), 18 (P18, n=4), and 22 (P22; n=4) of pregnancy. Total RNA was isolated from the endometrial tissues and was converted to cDNA. Relative mRNA expression levels of genes were quantified using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). GAPDH was used as reference genes. A mixed model was fitted on the normalized data and least significant difference (LSD) test was employed to determine significantly different groups.

**Results:** PTEN expression at mRNA level was detected in equine endometrium during all stages of estrous cycle and early pregnancy. Compared to LD, PTEN expression tended to decrease at AL. Similarly, comparing to the d0, the expression was lower during early pregnancy days including P14, P18 and P22, but did not reach to significance (P>0.10). PTEN is expressed in equine endometrium and its level appears to be downregulated at cycle and early pregnancy.

**Conclusion:** It is important to investigate PTEN activity and expression at protein level.

**Keywords:** Equine, endometrium, PTEN, gene expression.





## Giriş

Phosphatase and tensin homolog (PTEN) hücre proliferasyonu, adezyon, migrasyon, programlanmış hücre ölümü (apoptosis) ve kök hücre yenilenmesi gibi önemli hücrel olaylarda görev almaktadır. Phosphatidylinositide 3' kinase (PI3K) antagonisti olan PTEN, phosphatidylinositol-2-phosphates (PIP2)'den PIP3 sentezlenmesini engeller. PI3K/AKT sinyal yolağı üzerine negatif regülasyonu nedeniyle PTEN hücre döngüsünü kontrol etmektedir ve aynı zamanda tümör suppressor gen olarak bilinmektedir (Hill ve ark 2002, Downward 2004). PTEN mutasyonları ovaryum, tiroit, prostat, göğüs, mide ve endometriyum kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Endometrial adenokarsinom (EC) olgularında büyük oranda (~%83) PTEN mutasyonları tespit edilmiştir (Hollander ve ark 2011). PTEN geninin delesyonu farelerde erken embriyonik ölümler ile farklı organ ve dokularda kanser gelişimine neden olmaktadır (Suzuki ve ark 1998, Podsypnina ve ark 1999).

Bir lipid fosfotaz olan PTEN aktivitesinin yok olması PIP3'ün hücre içinde kontrolsüz artışına ve dolayısıyla PI3K/AKT sinyal yolağının sürekli aktif kalmasına neden olur. Bunun sonucunda hücre gelişimi, yaşama, invazyonu, metabolizması ve kanser gelişimi uyarılmaktadır. İn vitro çalışmaların sonuçları artmış PTEN seviyesinin cyclin D1 ekspresyonunu dolayısıyla hücre bölünmesini (Weng ve ark 2001) ve meme epitel hücre sayısını baskılamaktadır (Zhao ve ark 2005).

Uterus gebeliğin oluşumu esnasında özellikle ovaryum kökenli steroid hormonlar ve embriyo tarafından salgılanan farklı faktörler ile çok sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Uterus eğer gebelik şekillenmiş ise bu durumda embriyonun implantasyonu ve plasantasyon aşamalarına, aksi takdirde bir sonraki östrüs siklusuna kendisini kısa sürede hazırlaması gerekmektedir. Endometriyum, bütün bu karmaşık fizyolojik olayları gerçekleştirmek için farklı mekanizmaları kullanmaktadır (McLennan ve Rydell 1965, Groothuis ve ark 2007, Verdi ve ark 2014). Ayrıca dinamik bir fizyolojiye sahip olan endometriyumun (hızla proliferen olan ve gerileyen hücreler) kanser gelişiminde rolü bulunan moleküler mekanizmaların anlaşılmasında iyi bir model doku olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı, siklus ve erken gebelik dönemlerinde mitojenik ve apoptotik hücre faaliyetlerinin gözlemlendiği kısrak endometriyum dokusunda PTEN gen ekspresyonunun mRNA düzeyinde belirlenmesidir.

## Gereç ve Yöntem

Toplam 10 kısrak ve bir aygır bu çalışmanın hayvan materyalini oluşturdu. Reprodüktif muayeneler, hayvanların bakım ve beslenmesi, östrus ve ovulasyonların senkronizasyonu, tohumlama, östrüs günlerinin ve gebeliğin tespiti ile endometriyum biyopsi örneklerinin toplanması işlemleri Atli ve

ark (2010) tarafından açıklandı. Siklik olarak gruplandırılan kısraklardan östrusta (d0, n=4) ve ovulasyon sonrası 14. (geç diöstrüs, LD, n=4) ve 18. günlerde (luteolizis sonrası, AL, n=4) biyopsi örnekleri alındı. Kısraklardan gebelik grubuna ayrılanlar gün aşırı (48 saatte bir) taze sperma ile tohumlandı ve ultrasonografi ile 12 saat aralıklarla ovaryum muayenesi yapılarak ovulasyon günü belirlendi. Gebeliğin tespitinin ardından 14. (P14, n=4), 18. (P18, n=4) ve 22. (P22, n=4) günlerde endometriyum biyopsi örnekleri toplandı. Alınan örnekler anında sıvı nitrojen içerisinde donduruldu ve -80°C'de muhafaza edildi.

Gebe ve siklik hayvanlardan çalışma günlerine uygun şekilde toplam 24 adet endometriyum biyopsi örneğinden total RNA izolasyonu ile kalite kontrolü ve cDNA sentezi Kurar ve ark (2010a) tarafından detaylı olarak açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Kısaca, 50 mg endometriyum örneği 800 µL TRIzol içerisinde homojenize edildi. Ependorf tüpe alınan 800 µL süspansiyon üzerine 200 µL kloroform eklenerek vorteksleildi. Oda ısısında 10 dakika bekletilen örnekler +4°C soğutmalı santrifüjde 12000 g hızda 15 dakika santrifüj edildi. Başka bir ependorf tüpe alınan 500 µL süpernatant üzerine 600 µL butanol ilave edilerek, 10 dakika oda ısısında bekletildi ve +4°C'de 12000 g hızda 10 dakika santrifüj edildi. RNA peletine 3 defa (sırası ile %70, %70 ve %95) +4°C'de 7000 g hızda 5'er dakika soğuk etanol ile yıkandı. RNA peleti yeterince kurutulduktan sonra 100 µL steril DEPC-ddH2O içerisinde çözdürüldü.

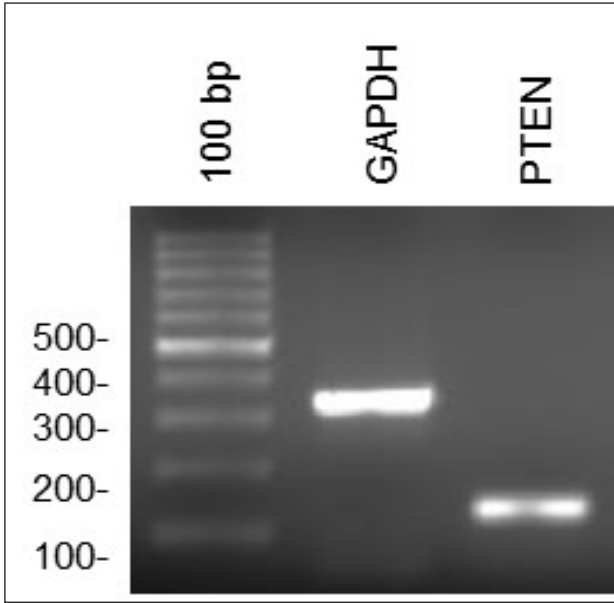
Elde edilen RNA'ların miktarı ve kalitesi Nanodrop ND-100 kullanılarak değerlendirildi. UV ölçümleri A260/A280 için 2±0.1 ve A260/A230 için 2.0-2.4 arasında olan total RNA örnekleri kullanıldı. Ayrıca 1 µg total RNA %1 agaroz jel elektroforezi sonrası 28S ve 18S bant yoğunlukları gözlemlendi. Total RNA örnekleri -70°C'de muhafaza edildi.

DNase-I enzimi ile olası gDNA kontaminasyonları temizlendi. Total RNA'dan tek zincir cDNA (complementary DNA) üretilmesinde RevertAid First Strand cDNA Sentez kiti (Fermentas, ABD) ve üretici firmanın protokolü kullanıldı. Sentezlenen cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi. Genlerin ekspresyon seviyelerinin mRNA düzeyinde tespiti amacıyla kantitatif PZR (qPZR) teknolojisi kullanıldı. qPZR protokolünde 10 µL 2x SYBR Green Master Mix (Fermentas, ABD), her bir primerden 5 pMol (Tablo 1), 1 µL cDNA ve toplam 20 µL hacimde hazırlandı. Termal siklus profili olarak; 95°C'de 10 dakika denatürasyon sonrası 40 siklus 95°C'de 30 saniye, 60°C'de 30 saniye ve 72°C'de 30 saniye kullanıldı. Melting curve analizlerinde 95°C (1 dakika), daha sonra 55°C ve 95°C arasında her bir °C'de floresans ölçümü yapıldı. qPZR analizlerinde Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System kullanıldı. PZR ürünleri kontrol amacıyla %2.5 agaroz jel elektroforezde görüntüldü (Şekil 1).

Kısrak endometriyumunu gen ekspresyonu normalizasyon çalışmalarında en uygun referans gen olarak tespit edilen

Tablo 1. qRT-PZR analizlerinde kullanılan primerler.

Lokus	Primer dizisi	PZR ürünü	Kaynak
PTEN	CCCAGTCAGAGGCGCTATGTATAT GTTCGCCACTGAACATTGG	125 bç	Dourdin ve ark 2008
GAPDH	ATCACCATCTTCCAGGAGCGAGA GTCTTCTGGGTGGCAGTGATGG	341 bç	Boerboom ve ark 2004



Şekil 1. PTEN ve GAPDH qPCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. DNA bantları 100 bp DNA standardı kullanılarak karşılaştırılmıştır.

glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) kullanıldı (Kayis ve ark 2011). Verilerin normalizasyonunda Livak ve Schmittgen (2001) tarafından belirtilen metodu kullanıldı. Burada dir ( ve sırasıyla, hedef ve referans genlerin amplifikasyonlarına ait eşik döngü değerleridir). Veriler General Linear Model (GLM)'de karışık model kullanılarak analiz edildi. Gebe ve gebe olmayan gruplar içinde ortalamaları istatistiki olarak farklı olan günlerin tespiti için Asgari Önemli Fark (LSD) testi uygulandı. İstatistiksel analizlerde Genstat (Release 7, Payne ve ark 2003) yazılımı kullanıldı.

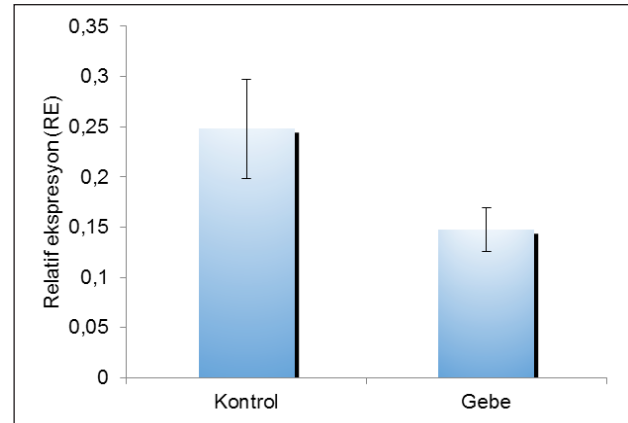
### Bulgular

At endometriyumunda çalışmaya konu olan tüm siklus ve erken gebelik dönemlerinde PTEN ekspresyonu mRNA düzeyinde tespit edildi (Şekil 1). PTEN'in mRNA düzeyindeki ekspresyonu gebe endometriyumunda kontrol grubu ile kıyaslandığında düşme eğiliminde olduğu görüldü ( $P=0.07$ , Şekil 2). Benzer şekilde, kan progesteron seviyesinin yüksek olduğu geç diöstrüste (LD) AL'e göre yüksek olma eğilimi gösterdi ( $P=0.17$ , Şekil 3). Progesteron seviyesinin yüksek olduğu erken gebeliğin 14. günü (P14) ile LD karşılaştırıldığında progesteron varlığına rağmen gebelikte PTEN mRNA ekspresyonunu baskılanma eğiliminde olduğu tespit edildi ( $P=0.08$ , Şekil 3).

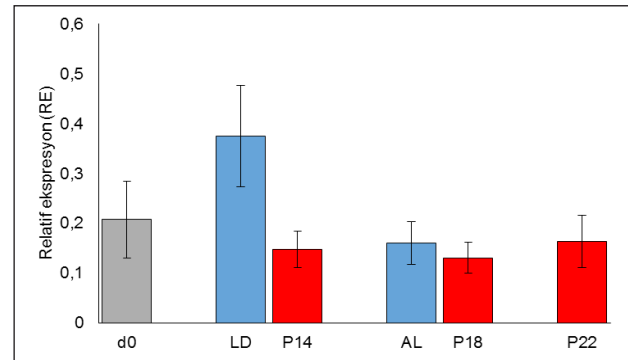
### Tartışma

Sunulan çalışmada erken gebelik ve östrus siklusunun farklı aşamalarında kısrak endometriyumunda PTEN mRNA ekspresyonunun varlığı karakterize edildi. Özellikle endometriyumun gebelik sırasında ovaryum kaynaklı progesteron ve embriyonik faktörlerin, siklus döneminde folliküler faz sırasında ovaryumdaki preovulatorik follikülden salgılanan östrojenin, luteal fazda ise corpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu etkisi altında olduğu bilinmektedir. Elde edilne sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde progesteron varlığında PTEN ekspresyonu artma eğilimi göstermekte (LD), ancak embriyonik faktörler progesteronun varlığına rağmen bu artışı baskılama eğilimindedir.

Mutter ve ark (2000) insan endometriyumunda ovulasyon sonrası progesteronun yüksek olduğu sekretorik faz sıra-



Şekil 2. Siklik (kontrol) ve gebe kısrak endometriyumunda PTEN ekspresyonu.



Şekil 3. Kısrak endometriyumunda siklusun ovulasyon günü (d0), geç diöstrüs (LD) ve lutealiz sonrası (AL) dönemleri ile gebeliğin 14. (P14), 18. (P18) ve 22. (P22) günlerinde PTEN ekspresyonu.



sında PTEN mRNA ekspresyonunun östrojen etkisi altındaki proliferatif faz ile kıyaslandığında arttığını bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada da benzer şekilde progesteron etkisi altında (LD) PTEN mRNA seviyesi yüksek olmasına rağmen, luteolizis sonrası (AL) istatistiksel anlamlı olmasa da PTEN mRNA ekspresyonu azalma eğilimine girmiştir. Bu durum, progesteronun insanlarda olduğu gibi at endometriyumunda da PTEN mRNA ekspresyonunu arttırdığına işaret edebilir.

PTEN ekspresyonu ve hücrede etkinliği fosforilizasyon, hücre lokalizasyon gibi farklı posttranskriptiyonel ve epigenetik mekanizmaların kontrolü altındadır. Promotor bölgesinin metilasyonunun bir sonucu olarak farklı kanser türlerinde PTEN ekspresyonun susturulduğu tespit edilmiştir (Kang ve ark 2002, Mirmohammadsadegh ve ark 2006).

Epigenetik mekanizmanın önemli bir parçası olan mikroRNA'lar hedef genin mRNA'sına bağlanarak translasyonu engeller veya mRNA stabilitesini azaltır. Liu ve ark (2013) miR-141'in fare endometriyumunda PTEN gen ekspresyonunu negatif olarak düzenleyerek hücre proliferasyonunu ve apoptozu etkilediğini ve embriyo implantasyonunda önemli rolünü bildirmiştir. miR-26a, PTEN mRNA'sını hedefleyerek tümör proliferasyonunu baskılamaktadır (Huse ve ark 2009). Farklı kanser dokularında ve hücre hatlarında artmış miR-21 ekspresyonu tespit edilmiştir. Deneysel olarak insan hepatocellular kanser (HCC) hücrelerinde miR-21 ekspresyonunun baskılanması ile PTEN ekspresyon seviyesi artmış olup tümör hücrelerinin çoğalması, göçü ve invazyonunda düşme gözlenmiştir. HCC (Meng ve ark 2007) ve EC (Qin ve ark 2012) hücrelerinde miR-21 transfeksiyonu ile PTEN ekspresyonunun baskılandığı ve onkojenik aktivitenin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum, miR-21'in direkt olarak PTEN ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan örneklerde mikroarray teknolojisi ile gerçekleştirilen global miRNA ekspresyon çalışmasında, kısrak endometriyumunda ovulasyon gününe (d0) göre erken gebelik günlerinde miR-21 ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Güzeloglu ve ark 2013). Bu çalışmada ise, erken gebelik günlerinde d0 ve LD'e göre PTEN mRNA miktarında bir azalma tespit edilmiştir.

Tyrosine kinase reseptörü olan insulin-like growth factor-1 reseptör (IGF-1R), PI3K/AKT ve Ras/Raf/MAPK yolları ile mitojenik etkilerini ortaya koymaktadır. Farklı in vitro ve in vivo çalışmalarda, artmış PTEN ekspresyonu AKT yolağı ve IGF-1R protein translasyonunu baskılamıştır. Bunun sonucunda hücre bölünmesi baskılanırken apoptozis mekanizmalarının uyarıldığı bildirilmiştir (Zhao ve ark 2005). Atların siklus ve erken gebelik dönemlerinde IGF-1R ekspresyonunun etkisi daha önce tespit edilmiştir (Kurar ve ark 2010b). PTEN benzer şekilde AKT aktivasyonunu ve dolayısıyla hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) stabilizasyonunu kontrol etmektedir (Zundel ve ark 2000). Kurar ve ark (2013) endometriyumda HIF1 $\alpha$  ekspresyonun östrüs siklusü ve er-

ken gebelik günlerinde progesteron tarafından etkilendiğini göstermiştir.

Nehad ve ark (2009) immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak menstrüel siklus ve farklı endometrium patolojilerinde PTEN ekspresyonunu araştırmışlardır. EC'da PTEN ve progesteron reseptörü ekspresyonları arasında anlamlı ilişki tespit edilmiştir. Ayrıca, menstrüel siklus boyunca PTEN ekspresyonu farklılık göstermektedir. Menstrüel siklus ve erken gebelik günlerinde endometriyum PTEN ekspresyonunun dönemsel olarak hormonal değişimlerden etkilendiği bildirilmiştir. Östrojen PTEN etkinliğini fosforilizasyon ile baskılamaktadır. Progesteron ise fosforilizasyonu baskılayarak protein seviyesini artırmaktadır. Dolayısıyla PTEN'in fosforilizasyonu ve defosforilizasyonu arasındaki denge PTEN'in proliferatif ve antiproliferatif etkinliğini kontrol etmektedir (Guzeloglu-Kayisli ve ark 2003). Fosforilize PTEN daha stabil olmasına rağmen etkinliği daha kısıtlıdır (Romona ve Schepis 2012). PTEN'in defosforilize olması etkinliği kadar degradasyonunu da artırmaktadır.

PTEN proteininin etkinliği ve yarılanma ömrü ayrıca asetilasyon, oksidasyon ve ubiquitinasyon reaksiyonları ile kontrol edilmektedir (Romona ve Schepis 2012). PTEN'in ubiquitinasyonu sitoplazma-çekirdek taşınması için gereklidir. Hücre döngüsü, farklılaşma ve dinlenme durumuna göre hücre lokalizasyonu dolayısıyla diğer proteinler ile etkileşimleri PTEN'in fonksiyonunu etkilemektedir. Yaygın kaniya göre PTEN sitoplazmada bulunmaktadır. Ancak son çalışmalar PTEN'in tümör süpresör etkisini çekirdekte bulunduğu zaman gösterdiği yönündedir. Nitekim farklı kanser türlerinde PTEN proteininin hücre çekirdeğinden kaybolduğu gözlenmiştir (Romona ve Schepis 2012).

## Öneriler

PTEN ekspresyonu ve fonksiyonun gerçekleşmesinde farklı epigenetik mekanizmalar görev almaktadır. Sonuç olarak at endometriyumda PTEN ekspresyonun çalışmalarında hücre tipi, hücre lokalizasyonu ile aktivitesinin ve protein düzeyinde araştırılmasının anlamlı olacağı kanaatine varılmıştır.

## Teşekkür

Bu çalışma 5. Ulusal Veteriner Zooteknik Kongresi'nde (29 Mayıs - 1 Haziran 2014, Burdur) sunulmuştur.

## Kaynaklar

- Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, Guzeloglu A, 2010. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. Anim Reprod Sci, 122, 124-132.
- Boerboom D, Brown KA, Vaillancourt D, Poitras P, Goff AK, Watanabe K, Dore M, Sirois J, 2004. Expression of key pros-



- taglandin synthases in equine endometrium during late diestrus and early pregnancy. *Biol Reprod*, 70, 391-399.
- Dourdin N, Schade B, Lesurf R, Hallett M, Munn RJ, Cardiff RD, Muller WJ, 2008. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 deficiency accelerates tumor induction in a mouse model of ErbB-2 mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 68, 2122-2131.
- Downward J, 2004. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin Cell Dev Biol*, 15, 177-182.
- Groothuis PG, Dassen HHNM, Romano A, Punyadeera C, 2007. Estrogen and the endometrium: Lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update*, 13, 405-417.
- Guzeloglu A, Atli MO, Kurar E, Kayis SA, Semacan A, Aslan S, Kaya MS, 2013. Preliminary expression analysis of global microRNA and biogenesis pathway in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Reprod Dom Anim*, 48, 71.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Al-Rejjal R, Zheng W, Luleci G, Arici A, 2003. Regulation of PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 5017-5026.
- Hill MM, Hemmings BA, 2002. Inhibition of protein kinase B/Akt implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther*, 93, 243-251.
- Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA, 2011. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. *Nat Rev Cancer*, 11, 289-301.
- Huse JT, Brennan C, Hambarzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland EC, 2009. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev*, 23, 1327-1337.
- Kang YH, Lee SY, Kim WH, 2002. Promoter methylation and silencing of PTEN in gastric carcinoma. *Lab Invest*, 82, 285-291.
- Kayis SA, Atli MO, Kurar E, Bozkaya F, Aslan S, Semacan A, Guzeloglu A, 2011. Rating of putative housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in cyclic and early pregnant equine endometrium. *Anim Reprod Sci*, 125, 124-132.
- Kurar E, Atli MO, Guzeloglu A, Ozsensoy Y, Semacan A, 2010a. Comparison of five different RNA isolation methods from equine endometrium for gene transcription analysis. *KU Vet Fak Derg*, 16, 851- 855.
- Kurar E, Atli MO, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, Celik S, Guzeloglu A, 2010b. Expressions of Insulin-Like Growth Factor (IGF)-I, -II and their receptor genes are regulated in mare endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Reprod Dom Anim*, 45, 94.
- Kurar E, Guzeloglu A, Atli MO, Kayis SA, Aslan S, Semacan A, 2013. Expression of  $\alpha$  subunits of hypoxia inducible factor (HIF) mRNA are regulated during the estrous cycle and early pregnancy in mare endometrium. *Reprod Dom Anim*, 48, 95.
- Liu X, Gao R, Chen X, Zhang H, Zheng A, Yang D, Ding Y, Wang Y, He J, 2013. Possible roles of mmu-miR-141 in the endometrium of mice in early pregnancy following embryo implantation. *PLoS One*, 8(6).
- Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method. *Methods*, 25, 402-428.
- McLennan CE, Rydell AH, 1965. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet Gynecol*, 26, 605-621.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janeck H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T, 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133, 647-658.
- Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR, 2006. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res*, 66, 6546-6552.
- Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C, 2000. Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 2334-2338.
- Nehad MR, El-Maqsoud A, El-Gelany S, 2009. Differential expression patterns of PTEN in cyclic, hyperplastic and malignant endometrium: its relation with ER, PR and clinicopathological parameters. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*, 21, 323-331.
- Payne RW, Murray DA, Harding SA, Baird DB, Soutar DM, 2003. *GenStat for Windows (7th Edition) Introduction*, VSN International, Hemel Hempstead.
- Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, Gu J, Tamura M, Yamada KM, Cordon-Cardo C, Catoretti G, Fisher PE, Parsons R, 1999. Mutation of PTEN/MMAC1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 1563-1568.
- Romona C, Schepis C, 2012. PTEN gene: a model for genetic diseases in dermatology. *The ScientificWorld J*, doi:10.1100/2012/252457
- Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrentes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW, 1998. High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol*, 8, 1169-1178.
- Qin X, Yan L, Zhao X, Li C, Fu Y, 2012. MicroRNA-21 overexpression contributes to cell proliferation by targeting PTEN in endometrioid endometrial cancer. *Oncol Lett*, 4, 1290-1296.
- Verdi J, Tan A, Shoaie-Hassani A, Seifalian AM, 2014. Endo-





metrial stem cells in regenerative medicine. *J Biol Eng*, 8, 20

Weng LP, Brown JL, Eng C, 2001. PTEN coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. *Hum Mol Genet*, 10, 599-604.

Zhao H, Cui Y, Dupont J, Sun H, Hennighausen L, Yakar S, 2005.

Overexpression of the tumor suppressor gene phosphatase and tensin homologue partially inhibits Wnt-1-induced mammary tumorigenesis. *Cancer Res*, 65, 6864-6873.

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ, 2000. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev*, 14, 391-396.