

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK



NORMAL OKSİJEN VE HİPOKSİK KOŞULLARDA VEGF
SİTOKİNİNİN ADAMTS-2 VE ADAMTS-3 GENLERİNİN
İFADELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANDAN AKDIR

BALIKESİR, MAYIS - 2018

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK**



**NORMAL OKSİJEN VE HİPOKSİK KOŞULLARDA VEGF
SİTOKİNİNİN ADAMTS-2 VE ADAMTS-3 GENLERİNİN
İFADELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANDAN AKDIR

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Feray KÖÇKAR (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Dr. Öğr. Üy. Sümeyye AYDOĞAN TÜRKOĞLU

BALIKESİR, MAYIS - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Candan AKDIR tarafından hazırlanan "NORMAL OKSİJEN VE HIPOKSİK KOŞULLARDA VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS2 VE ADAMTS3 GENLERİNİN İFADELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ" adlı tez çalışmasının savunma sınavı 04.05.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

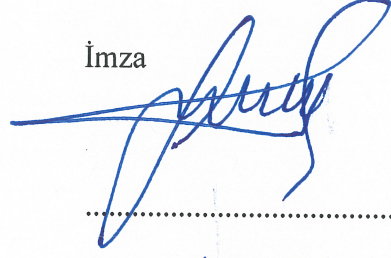
Jüri Üyeleri

Danışman
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

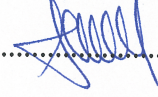
Üye
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ

Üye
Dr. Öğr. Üy. Sümeyye
AYDOĞAN TÜRKÖĞLU

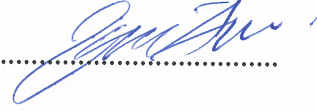
İmza



.....



.....



.....

Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

ÖZET

NORMAL OKSİJEN VE HİPOKSİK KOŞULLARDA VEGF SİTOKİNİNİN ADAMTS-2 VE ADAMTS-3 GENLERİNİN İFADELERİ ÜZERİNDE ETKİSİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

CANDAN AKDIR

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)
(EŞ DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜY. MELTEM ALPER)

BALIKESİR, MAYIS - 2018

Anjiyogenez süreci, hem normal şartlarda hem de hipoksik koşullarda VEGF gibi hücre proliferasyonunu sağlayan büyüme faktörleriyle beraber gerçekleşen bir süreçtir. Bu tez çalışmasının amacı, endotel hücre modeli olan HUVEC hücrelerinde normal ve düşük oksijen koşullarında VEGF sitokininin pro-kollajen N-propeptidaz üyeleri olan ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin regülasyonuna etkilerinin belirlenmesidir. ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin Saos-2, MG63, HUVEC hücre hatlarında mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Buna göre HUVEC hücre hattında en fazla ifade olan üyenin ADAMTS-3 olduğu belirlenmiştir. Hipoksik ve normoksik koşullar karşılaştırıldığında mRNA seviyeleri ve farklı promotor parçalarıyla yapılan geçici transfeksiyon deneyleriyle elde edilen transkripsiyonel aktivite çalışmalarından, hipoksik koşullarda bu genlerin ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir. VEGF uygulanan HUVEC hücrelerinde ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 promotor parçalarının transkripsiyonel aktivitelerinin normal oksijen koşullarında daha az hipoksik koşullarda daha fazla olduğu belirlenmiştir. VEGF artışının hangi hücre içi yolaktan gerçekleştirildiğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda normal oksijen ve hipoksik koşulların farklı hücre içi yolları kullandığı tespit edilmiştir. Bu doğrultuda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin normoksik koşullarda PI3K ve p38 yollarını kullandığını anlamlı sonuçlarla belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda ise VEGF regülasyonunun ADAMTS-2 geninde MAP kinaz, ADAMTS-3 geninde ise MAP kinaz, jnk ve p38 yollarıyla gerçekleştiği belirlendi. Hipoksik koşullarda ki ifadelerin normoksik koşullara göre fazla olması göz önüne alınarak EMSA deneyleri yapıldı. ADAMTS-2 promotorunun [-379/-348] bölgesinde ADAMTS-3 promotorunun ise [-969/-1000] bölgesinde Saos-2 hücrelerinde, [-644/628] bölgesinde hem Saos-2 ve HUVEC hücre hattında hem normoksik hemde hipoksik koşullara HIF-1 α transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesinin olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELELER: ADAMTS-2, ADAMTS-3, Hipoksi, VEGF, Transkripsiyonel aktivite

ABSTRACT

EFFECT OF VEGF CYTOKININE ON ADAMTS-2 AND ADAMTS-3 GENES EXPRESSION IN NORMAL OXYGEN AND HYPOXIC CONDITIONS

MSC THESIS

CANDAN AKDIR

BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC

(SUPERVISOR: PROF. DR. FERAY KÖÇKAR)

(CO-SUPERVISOR: ASSİST. PROF. DR. MELTEM ALPER)

BALIKESİR, MAY 2018

The angiogenesis is a process which occurs together with growth factors that provide cell proliferation, such as VEGF, under both normal conditions and hypoxic conditions. The aim of this thesis is to determine the effects of VEGF cytokine on the regulation of ADAMTS-2 and ADAMTS-3 genes, which are pro-collagen N-propeptidase members, in normal and low oxygen conditions in HUVEC cells, the endothelial cell model. The mRNA levels of the ADAMTS-2 and ADAMTS-3 genes were determined in the Saos-2, MG63, HUVEC cell lines. Compared with hypoxic and normoxic conditions, the transcriptional activity studies obtained by transient transfection experiments with different promoter fragments and mRNA levels showed that expression of these genes increased under hypoxic conditions. It has been determined that the transcriptional activity of the ADAMTS-2 and ADAMTS-3 promoter fragments in HUVEC cells treated with VEGF is more in hypoxic conditions, which is less pronounced in normal oxygen conditions. It was determined that the transcriptional activities of the ADAMTS-2 and ADAMTS-3 promoter fragments in HUVEC cells treated with VEGF were higher in hypoxic conditions than in normal oxygen conditions. In studies to determine which intracellular pathway of VEGF uptake was carry out, it was determined that normal oxygen and hypoxic conditions use different intracellular pathways. In this respect, ADAMTS-2 and ADAMTS-3 genes were identified with meaningful results using the PI3K and p38 pathways under normoxic conditions. . In hypoxic conditions, it was determined that VEGF regulation is via MAP kinase pathway in ADAMTS-2 gene and MAP kinase, jnk and p38 pathway in ADAMTS-3 gene. EMSA experiments were carried out considering that the expressions in hypoxic conditions were more than normoxic conditions. In the region of the ADAMTS-2 promoter [-379 / -348] in the Saos-2 cells, in the region of the ADAMTS-3 promoter [-969 / -1000] in the Saos-2 cells and in the region of ADAMTS-3 promoter[-644/628] in the Saos-2 and HUVEC cell lines was found to be the binding site of the HIF-1 α transcription factor in normoxic and hypoxic conditions.

KEYWORDS: ADAMTS-2, ADAMTS-3, Hypoxia, VEGF, Transcriptional activity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Vaskulogenez ve Anjiyogenez	1
1.1.1 Fizyolojik ve Fizyolojik Olmayan Anjiyogenez.....	1
1.1.2 Anjiyogenezin Aktivatörleri ve İnhibitörleri	2
1.1.3 Filizlenen ve Filizlenmeyen Anjiyogenez	2
1.1.4 Tümör Morfolojisi	4
1.2 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Ailesi.....	5
1.2.1 VEGF Ligantları	5
1.2.1.1 VEGF-A	5
1.2.1.2 VEGF-B	9
1.2.1.3 VEGF-C	9
1.2.1.4 VEGF-D	10
1.2.1.5 Plasental Büyüme Faktörü (PIGF)	10
1.2.1.6 VEGF-E	11
1.2.2 VEGF Reseptörleri	11
1.2.2.1 VEGF-R1 (Flt-1).....	11
1.2.2.2 VEGF-R2 (Flk-1 / KDR)	13
1.2.2.3 VEGF-R3 (Flt-4).....	15
1.2.2.4 Nöropilin -1 ve nöropilin -2	16
1.3 Plazminojen Aktivatörleri ve Matriks Metalloproteazlar	17
1.4 ADAMTS Gen Ailesi	18
1.4.1 ADAMTS'lerin Yapısal Organizasyonu	18
1.4.2 Lokalizasyon ve Fonksiyon	21
1.4.3 ADAMTS Gelişimi.....	22
1.4.3.1 ADAMTS-2 Geni.....	23
1.4.3.2 ADAMTS-3 Geni.....	24
1.5 Hipoksik Koşullar ve Anjiogenez	25
1.5.1 Hipoksi ile Uyarılabilir Transkripsiyon Faktörü (HIF) Ailesi.....	25
1.5.2 HIF-1'in Yapısı.....	26
1.5.3 HIF-1 Yolağının Düzenlenmesi.....	27
1.5.4 Tümörlerde HIF-1 α	28
1.5.5 HIF-1 İle Düzenlenen Tümör Anjiyogenezi	29
2. TEZİN AMACI.....	31
3. MATERYAL METOD.....	33
3.1 Materyal.....	33
3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar	33
3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar	35
3.2 Metot	36

3.2.1	Çalışma Ortamı ve Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu.....	36
3.2.2	Hücre Kültüründe Kullanılan Metodlar	37
3.2.2.1	Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması	37
3.2.2.2	FCS İnaktivasyonu ve Sterilizasyonu	37
3.2.2.3	Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması	37
3.2.2.4	Hücrelerin Büyümesi İçin Besiyer Ortamının Hazırlanması	37
3.2.2.5	Tripsin-EDTA (TE) Hazırlanması	38
3.2.2.6	Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılan Hücre Hatları	38
3.2.2.7	Hücre soyunun başlatılması	38
3.2.2.8	Hücrelerin büyütülmesi	39
3.2.2.9	Hücrelerin Pasajlanması.....	39
3.2.2.10	Canlı Hücrelerin Analizi (Tiripan Mavisi Boyama)	39
3.2.2.11	Hücrelerin -80 °C’de Saklanması	40
3.2.2.12	Hücre Kültüründe Yapılacak Deneylerin Dizaynı	40
3.2.3	RNA İle İlgili Metodlar	41
3.2.3.1	Hücre Peletlerinden RNA İzolasyonu	41
3.2.3.2	RNA Miktar Tayini	42
3.2.3.3	RNA Jel Elektroforezi.....	42
3.2.3.4	Komplementer DNA Eldesi (RT-PCR)	43
3.2.3.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
3.2.3.6	Agaroz Jel Elektroforezi	45
3.2.3.7	Real Time PCR	46
3.2.3.8	Sonuçların Analiz Edilmesi.....	47
3.2.4	Transkripsiyonel Aktivitenin Analiz Edilmesi İle İlgili Metodlar.....	47
3.2.4.1	Kalsiyum Klorür Presipitasyonu Kullanılarak Yapılan Geçici Transfeksiyon	47
3.2.4.2	Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Analizi	48
3.2.4.3	SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Analizi	48
3.2.5	Yolak İnhibisyon Analiz Metodu	49
3.2.6	EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) Metodu	49
3.2.6.1	Hücre Hattından Nükleer Ekstratlarının Çıkarılması.....	50
3.2.6.2	Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi.....	51
3.2.6.3	Oligonükleotitlerin Bağlanması	51
3.2.6.4	Bağlanma Reaksiyonunun Kurulması ve EMSA Jeline Yükleme Yapılması.....	51
3.2.6.5	Proteinlerin Membran Üzerine Transfer İşlemi	53
4.	BULGULAR	54
4.1	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Ekspresyon Primerleriyle Isı Grandiyent Optimizasyonu.....	54
4.2	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Farklı Hücre Hatlarında mRNA İfadelerinin Belirlenmesi.....	54
4.2.1	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerine Ait Promotor Parçalarının Normoksik Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi	58
4.3	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Hipoksik Koşullardaki mRNA İfadelerinin Belirlenmesi.....	61
4.4	ADAMT-2 ve ADAMTS-3 Genlerine Ait Promotor Parçalarının hipoksik koşullarda Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	63

4.4.1	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 promotorlarının EMSA deneyleri kullanılarak HIF-1 α transkripsiyon faktörünün fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi	64
4.5	VEGF Sitokininin ADAMTS-3 ve ADAMTS-2 Regülasyonuna Etkisinin Belirlenmesi	71
4.5.1	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde VEGF Sitokininin Normoksik Şartlarda mRNA ifadesinin Belirlenmesi	71
4.5.1.1	Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerine VEGF Etkisinin Belirlenmesi.....	72
4.5.1.2	VEGF Sitokininin Normoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi.....	74
4.5.1.3	VEGF Sitokininin Normoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Kullandığı Yolakların Belirlenmesi	76
4.5.1.4	VEGF Yolak İnhibitörlerinin Normoksik Koşullarda Promotor Parçalarına Etkisi	78
4.5.2	ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Hipoksik Koşullarda VEGF Sitokininin Etkisinin Belirlenmesi	79
4.5.2.1	VEGF Sitokininin Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi.....	81
4.5.2.2	VEGF Sitokininin Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Kullandığı Yolakların Belirlenmesi	82
4.5.2.3	VEGF Yolak İnhibitörlerinin Hipoksik Koşullarda Promotor Parçalarına Etkisi	84
5.	SONUÇ VE TARTIŞMA.....	87
6.	KAYNAKLAR.....	92
7.	EKLER.....	110

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Anjiyogenez basamaklarının özeti	4
Şekil 1.2: VEGF izoformları.....	8
Şekil 1.3: VEGF ligantları ve reseptörlerle ilişkisi.....	13
Şekil 1.4: ADAMTS gen yapısı.....	21
Şekil 1.5: Normoksik ve Hipoksik Şartlarda HIF-1 α	28
Şekil 1.6: Hipoksi altında tümör gelişimi	29
Şekil 2.1: Tez özeti.	32
Şekil 3.1: Kullanılan Hücre Hatları.	38
Şekil 3.2: Hemositometre	40
Şekil 4.1: ADAMTS2 ve ADAMTS3 genlerinin PCR jel görüntüsü.....	54
Şekil 4.2: MG63 hücre hattına ait RNA örnekleri.	55
Şekil 4.3: Saos-2 hücre hattına ait RNA örnekleri.	55
Şekil 4.4: HUVEC hücre hattına ait RNA örnekleri.....	56
Şekil 4.5: HUVEC cDNA kontrol PCR görüntüsü.....	56
Şekil 4.6: Farklı hücre hatlarında ADAMTS-2 geninin ekspresyonu.	57
Şekil 4.7: Farklı hücre hatlarında ADAMTS-3 geninin ekspresyonu.	57
Şekil 4.8: Klonlanan ADAMTS-2 promotor parçaları.	59
Şekil 4.9: ADAMTS-2 geninin normoksi koşullarda bazal promotor aktivitesi.	59
Şekil 4.10: Klonlanan ADAMTS-3 promotor parçaları.	60
Şekil 4.11: ADAMTS-3 geninin normoksik koşullarda bazal promotor aktivitesi.	60
Şekil 4.12: Hipoksik ortamdaki HIF-1 α ifadesi.....	61
Şekil 4.13: ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin hipoksik koşullarda ifadesi.	62
Şekil 4.14: ADAMTS-2 geninin normoksi/hipoksi karşılaştırmalı bazal promotor aktivitesi.	63
Şekil 4.15: ADAMTS-3 geninin normoksi/hipoksi karşılaştırmalı bazal promotor aktivitesi.	64
Şekil 4.16: ADAMTS-2 promotor bölgesinde olası HIF-1 α bağlanma bölgesine ait probun lokalizasyonu	65
Şekil 4.17: ADAMTS-3 promotor bölgesinde olası HIF-1 α bağlanma bölgesine ait problemlerin lokalizasyonu	66
Şekil 4.18: [-379/-348] ADAMTS-2 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	67
Şekil 4.19: [-183/-152] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	67
Şekil 4.20: [-1077/-1045] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	67
Şekil 4.21: [-969/-1000] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	68
Şekil 4.22: [-650/-619] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	68
Şekil 4.23: [-650/-619] ADAMTS-3 promotor bölgesinde HUVEC hücre hattına ait EMSA görüntüsü.....	69

Şekil 4.24: ADAMTS-2 genine VEGF sitokininin etkisi.....	71
Şekil 4.25: ADAMTS-3 genine VEGF sitokininin etkisi.....	72
Şekil 4.26: MG63 Hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin VEGF ifadesi.....	73
Şekil 4.27: Saos-2 hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin VEGF ifadesi.....	73
Şekil 4.28: Normoksik koşullarda ADAMTS-2 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.....	75
Şekil 4.29: Normoksik koşullarda ADAMTS-3 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.....	75
Şekil 4.30: ADAMTS-2 geninde normoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.....	76
Şekil 4.31: ADAMTS-3 geninde normoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.....	77
Şekil 4.32: VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik koşullarda en yüksek aktive olan ADAMTS-2 promotor parçasına etkisi.....	78
Şekil 4.33: VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik koşullarda en yüksek aktive olan ADAMTS-3 promotor parçasına etkisi.....	79
Şekil 4.34: VEGF sitokinin hipoksik koşullarda ADAMTS-2 mRNA'sına etkisi.....	80
Şekil 4.35: VEGF sitokinin hipoksik koşullarda ADAMTS-3 mRNA'sına etkisi.....	80
Şekil 4.36: Hipoksik koşullarda ADAMTS-2 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.....	81
Şekil 4.37: Hipoksik koşullarda ADAMTS-3 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.....	82
Şekil 4.38: ADAMTS-2 geninde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.....	83
Şekil 4.39: ADAMTS-3 geninde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.....	83
Şekil 4.40: ADAMTS-2 geninin 768 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.....	84
Şekil 4.41: ADAMTS-3 geninin 1380 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.....	85
Şekil 4.42: ADAMTS-3 geninin 171 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.....	85

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.	33
Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi (devamı).	34
Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi (devamı).	35
Tablo 3.4: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.....	35
Tablo 3.5: Çalışmalarda kullanılan cihazlar (devamı).	36
Tablo 3.6: 10 X FA agaroz jel elektroforezi jel tamponu.	43
Tablo 3.7: 1 X FA jel elektroforez tankı için hazırlanan tampon.	43
Tablo 3.8: RT-PCR koşulları.	44
Tablo 3.9: Polimeraz zincir reaksiyon koşulları.....	44
Tablo 3.10: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar.	45
Tablo 3.11: Kullanılan ekspresyon primerleri.....	46
Tablo 3.12: Real time PCR döngü koşulları.	46
Tablo 3.13: CaCl ₂ geçici transfeksiyonu için kullanılan solüsyonlar.	48
Tablo 3.14: Deney kapsamında kullanılan inhibitörler.	49
Tablo 3.15: Nükleer ekstrakt elde edileme kullanılan çözeltiler.	50
Tablo 3.16: Oligonükleotitlerin işaretlenmesinde kullanılan bileşikler.	51
Tablo 3.17: % 6'lık EMSA jeli bileşenleri.....	52
Tablo 3.18: EMSA bağlanma reaksiyon bileşikleri.	52
Tablo 4.1: ADAMTS-2 promotor parçasında HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine spesifik dizayn edilen prob.	65
Tablo 4.2: ADAMTS-3 promotor parçasında HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine spesifik dizayn edilen proplar.....	65

SEMBOL LİSTESİ

VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
HUVEC	: İnsan umbilikal damar endotel hücre
Saos-2	: Osteosarkoma
MG63	: Osteosarkoma
FIt-3	: Kök hücre faktörü benzeri tirozin kinaz-3
CSF-1R	: Koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü
Et-Br	: Etidyum bromür
HIF-1	: Hipoksi indükleyici faktör-1
ADAMTS	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADAMTS-3	: A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs3
ECM	: Ekstra Sellüler Matriks
TSR	: Trombospondin tip 1 dizi tekrar
MMP	: Matriks metalloproteinaz
TSR	: Trombospondin benzeri tekrar
VEGFR	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü
vWF	: Von-Willebrand faktörü
ARNT	: Aril hidrokarbon reseptör nükleer translokatorü
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
cDNA	: Komplementer DNA
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
PBS	: Phosphate-buffered saline
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
TE	: Tripsin EDTA
FCS	: Fetal calf serum
DMSO	: Dimetil sülfoksit
SEAP	: Secreted alkaline phosphatase
DNA	: Deoksi ribonükleik asit
EMSA	: Electromobility shift assay
DEPC	: Dietilpirokarbonat
UV	: Ultra-viyole
Ct	: Cycle Treshold
µg	: Mikro gram
µL	: Mikro litre
mL	: Mili litre
mM	: Mili molar
µM	: Mikro molar

ÖNSÖZ

Ulu önder M. K. ATATÜRK'ün dediği gibi “Kadınlarımız için asıl mücadele alanı, asıl zafer kazanılması gereken alan biçim ve kılıkta başarıdan çok; ışıkla, bilgi ve kültürle, gerçek faziletle süslenip donanmaktır.” Bu sebepten tezimi Türk kadınlarına ithaf ediyorum.

Üniversite hayatım boyunca etik olmanın ne kadar önemli olduğunu, asla vazgeçmeden, kendine inanarak her şeyin başara bilineceğini anlatan, bir aferin cümlesiyle bana dünyaları verebilen, yıllar sonra bile “her akşamın bir sabahı var” cümlesini hatırlayacağım kıymetlim, danışman hocam Prof. Dr. Feray Köçkar’a

Tez çalışmam boyunca bana ayrı bir göz olan, tüm kalbiyle beni anlayabilen, sevgisini sonsuz güvenle beraber içime işleyen sevgili eş danışmanım Yrd. Doc. Dr. Meltem Alper’e

Beni her zaman pozitif enerjileri ve gülücükleriyle karşılayan sevgili hocalarım Yrd. Doc. Dr. Hatice Yıldırım ve Yrd. Doc. Dr. Sümeyye A. Türkoğlu’na

Laboratuvarda stresli olduğumu anladıkları anda ortadan kaybolan ve beraber çalışmaktan büyük keyif aldığım sevgili çalışma arkadaşlarım’a

Her zaman başaracağıma inanan, destek olan, beraber geçirdiğimiz her saniye kahkaha dolu olduğumuz, kandan değil ama candan kardeşlerim Aylin Gülsoy, Emine Ayyıldız, Ebru Bağcı, Kübra Paspal, Nelin Hacıoğlu’na

Vefa borcumun asla son bulmayacağı eğitim hayatım boyunca aldığım burs ve desteklerinden dolayı merhum Türkan Saylan ve sevgili Umut Kumbasar’a

En iyi arkadaşım, can yoldaşım, sonsuz güvenim, en büyük desteğim sevgili nişanlım Barış Altuntaş’a

Varlıklarına şükrettiğim, bana olan inançları ve güvenleri sonsuz olan, istemeden yaptığım en iyi şeyin çocukları olmam dediğim, pamuk annem Emir Kadın Akdır ve en sağlam duvarım babam Hıdır Akdır, kalbimin en hassas noktaları olan kardeşlerim Caner Akdır ve Bahar Akdır’a

Sonsuz teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Candan Akdır

1. GİRİŞ

1.1 Vaskulogenez ve Anjiyogenez

Vasküler endotel ve destek hücrelerinin dallanmış dolaşım ağı, besin maddeleri ve sinyal moleküllerinin transportu ve hücrelerden, dokulardan ve organlardan karbon dioksit ve metabolik son ürünlerinin çıkarılması için gereklidir [1]. Neovaskularizasyon veya yeni kan damarı oluşumu iki bileşene ayrılır bunlar vaskulogenez ve anjiyogenezdir. Embriyonik veya klasik vaskulogenez, hemanjioblastlardan farklılaşarak kan hücreleri ve olgun endotel hücrelerinin oluştuğu yeni kan damarı oluşum sürecidir [2].

Embriyoda erken kan damarları, anjiyoblastların basit endotel tüplerinin ilkel ağına dönüşmesiyle gelişir [3]. İlkel damarlar işlevsel bir dolaşım sistemine dönüştürüldükçe, proliferasyon ile dallanma ve göç gerçekleşir. Buna karşılık anjiyogenez, kılcal damarla önceden var olan damarlardan yeni kan damarı oluşumu sürecidir. Bu işlem sırasında olgun endotel hücreleri bölünür ve yeni kılcal damarlara dâhil edilir.

1.1.1 Fizyolojik ve Fizyolojik Olmayan Anjiyogenez

Yetişkin insan vasküler endotel hücreleri tahmini 1 kg doku oluşturur ve her organın damarlarını sarar [1]. Yetişkin insanlarda, çoğu endotel hücresi bölünme eğiliminde değildir. Her 10.000 endotel hücresinden yalnızca biri hücre bölünmesi geçirir [4]. Bununla birlikte, yara iyileşmesi, doku onarımı, yumurtalık korpusu luteum oluşumu, hamilelik ve plasental gelişme sırasında endotel hücresi, mitozu ve anjiyogenezi artar.

Fizyolojik olmayan yaşla ilişkili gözün maküler dejenerasyonu diyabetik retinopati, endometriozis, sedef hastalığı, romatoid artrit, tümör büyümesi ve

metastazı gibi anjiyogenezli bozukluklar için anjiyogenezin inhibisyonu potansiyel bir tedaviyi teşvik eder [5].

1.1.2 Anjiyogenezin Aktivatörleri ve İnhibitörleri

Hem endojen aktive ediciler hem de inhibitörler tarafından düzenlenen anjiyogenez, sıkı kontrol altındadır [4]. Yaklaşık 30 bilinen endojen pro-anjiyogenik faktör vardır. VEGF/VEGF-R (Vasküler endotelial büyüme faktörü/VEGF reseptörü) ailesi vasküler gelişimin en çok çalışılan regülatörüdür. Anjiyopoietin/ Tie sistemi damar olgunlaşmasını kontrol eder [6]. Asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri de anjiyogenezde önemli rollere sahiptir [7]. En çok çalışılan negatif regülatör angiostatin, endostatin ve trombospondini içerir. Olgun hayvanlarda çoğu fizyolojik koşulda negatif düzenleyicilerin baskın olduğu ve anjiyogenezin baskılandığı bilinmektedir. Bazı patolojik koşullar altında örneğin, tümör progresyonu sırasında (vaskülatör anjiyogenik geçiş) pozitif regülatörleri baskındır ve anjiyogenez aktiftir [4].

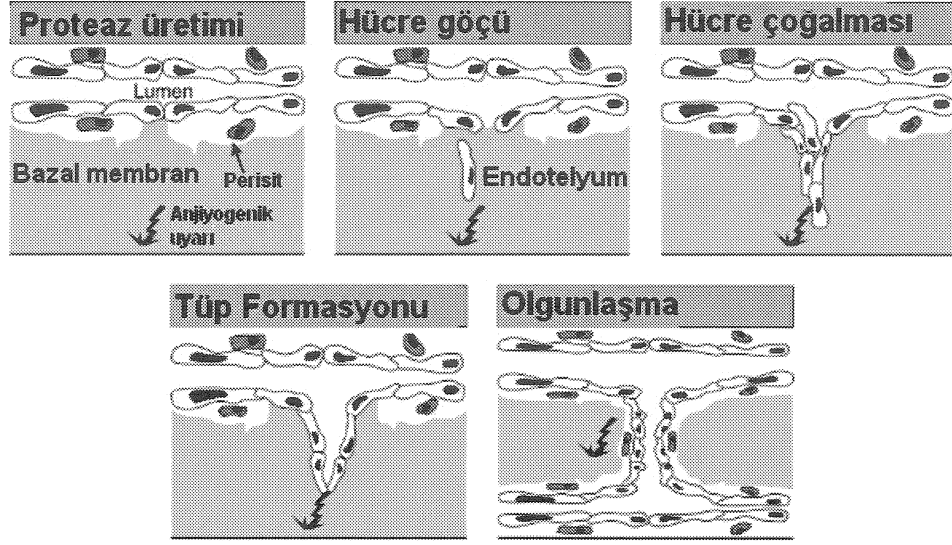
1.1.3 Filizlenen ve Filizlenmeyen Anjiyogenez

Anjiyogenez, düzenleyici ve efektör moleküller arasındaki etkileşimleri içeren karmaşık bir süreçtir.

Klasik anjiyogenez filizlenme ve kararlılık safhasında olmak üzere iki fazdır [8]. 1. faz olan filizlenme aşaması altı basamaktan oluşur: (i) Artmış vasküler permeabilite ve ekstravasküler fibrin birikimi (ii) Damar duvarının parçalara ayrılması (iii) Bazal membranın bozulması (iv) Hücre göçü ve hücre dışı matriks invazyonu (v) Endotelial hücre çoğalması (vi) Kılcal lümen oluşumu. 2. faz ise kararlılık aşamasıdır ve beş bileşenden oluşur: (i) Endotel hücresi proliferasyonunun inhibisyonu (ii) Hücre migrasyonunun durdurulması (iii) Bazal membranın yeniden yapılandırılması (iv) Birleşme kompleksinin olgunlaşması (v) Düz kas hücrelerinin ve perisitlerin yapıya katılması ve farklılaşması (Şekil 1.1)'da dâhil olmak üzere damar duvarı oluşumu [9].

Bu filizlenmeyen vasküler büyüme sırasında interstisyel hücrelerin bir kolonu önceden var olan bir damarın lümenine girer, lümeni böler ve iki damar oluşur [10]. Kolon fibroblastlar ve perisitler tarafından işgal edilir ve hücre dışı matriks proteinleri biriktirir. Bu süreç, endotel hücrelerinin çoğalmasını değil daha çok mevcut hücrelerin yeniden düzenlenmesini ve yeniden biçimlendirilmesini gerektirir. Filizlenmeye karşı bu büyüme mekanizmasının avantajı, kapsamlı hücre çoğalması, bazal membran bozulması ve çevredeki dokuların istilası gerekmediği için kan damarlarının metabolik olarak ekonomik bir süreçte üretilmesidir. Başka bir mekanizma ile gelişmekte olan tümörlerin doku ve organlarındaki damarları çevreleyebilir, bu damarları dâhil edebilir veya birlikte hareket edebilirler [11]. Birlikte hareket etmeleri tümörler akciğer veya beyin gibi vasküler organlarda ortaya çıktığı zaman veya metastaz yaparken önemlidir.

Tümör hücreleri, endotel hücreleri ile birlikte kılcal damarların luminal yüzeyini oluşturabilir, böylece bir mozaik damar oluştururlar [12]. Chang ve ark. tüysüz veya çıplak farelerde ve insan kolon karsinomlarının biyopsilerinde yaptıkları araştırmalarda insan kolon karsinom implantlarındaki (ksenograftlar) damarların yaklaşık % 15'ini hem endotel hem de tümör hücreleri ile kaplı mozaik kanalların oluşturduğunu bulmuştur [12]. Oküler melanomda ilk kez tanımlanan vaskülojenik taklitte, hücre dışı matriks bakımından zengin tübüler ağları olan vasküler kanallar gelişir [13]. Bu tübüler ağlar veya kanallar endotel hücrelerden yoksundur ancak dolaşımdaki kırmızı kan hücrelerini içerirler. Vaskülojenik taklit meme, akciğer, yumurtalık ve prostat karsinomasında tanımlanmıştır [14].



Şekil 1.1: Anjiyogenez basamaklarının özeti [15].

1.1.4 Tümör Morfolojisi

Normal damarlar, arterioller, kılcal damarlar ve kolayca ayırt edilebilen venüller ile hiyerarşik bir tarzda organize edilirken, tümör damarları anormal morfoloji sergiler [2, 16].

Algire ve Chalkley şeffaf çemberde gelişen tümörü *in vivo* olarak sıçana aktarmış ve tümör doku kapillerinin normal doku ile karşılaştırıldığında çaplarının 5 kat daha fazla olduğunu ispatlamıştır [17]. Bu kılcal damarlar, nadiren arteriollere veya venüllere farklılaşırlar. Dahası, tümör vasküler dokular üç boyutlu mikroskopta görüntülendiğinde, normal arteriyol, kılcal damar ve venül yapıda arterioller venüller şant, kör uçları anormal endotel hücre astarından yoksun olduğu görülmüştür [18]. Tümör damarları düzensiz damar lümen çapları sergilerken çok sayıda vasküler filiz içeren düzensiz demetler gelişir [19]. Tümör damarlarının anormal organizasyon ve yapısından dolayı tümörlerde kan akışı karmaşıktır [20].

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) sinyalleme, vaskülogenezi ve anjiyogenez için gereklidir. Asahara ve ark. yetişkin insan kanında endotel hücrelere farklılaşabilen endotel öncü hücrelerin varlığını tanımlamışlardır [21]. Bu öncü hücreler normal olarak kemik iliğinde bulunurlar ancak sitokin veya anjiyogenik büyüme faktörü sinyalleri ile dolaşıma mobilize edilebilirler [22]. Yetişkin

vaskülogenez sırasında hareketli öncü hücreler, damarlara entegre edilerek ve büyüme faktörleri salgılayarak damar formasyonu oluşumunu teşvik ederler. Kemik iliği kaynaklı endotel progenitör hücreleri, enfarktüs, iskemi veya doku travması durumlarında olgun endotel hücrelerine farklılaşıp yeni damarlar oluşturmak için diğer hücrelerle birleşebilirler [23].

1.2 Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) Ailesi

VEGF ailesi, anjiyogenezis, lenf anjiyogenezi ve vaskülogenezide rol oynar. VEGF ailesi beş üyeden oluşur: VEGF (veya VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) [5, 20]. Bu proteinlerin her biri, biyosentez sırasında parçalanmış bir sinyal sekansı içerir. Dahası, pre-mRNA'lar alternatif splicing ile VEGF, VEGF-B ve PlGF' nin birden fazla izoformunu oluştururlar. VEGF ailesi için üç reseptör protein-tirozin kinaz (VEGF-R1, VEGF-R2 ve VEGF-R3) ve iki enzimatik olmayan reseptör (nöropilin-1 ve -2) vardır. Dahası, birçok VEGF ailesinin ligantları plazma zarında ve hücre dışı matrikste bulunan heparan sülfat proteoglikanlara bağlanır. Bu reseptörlerin her biri protein tirozin kinazdır ve hücreler arası yedi immunoglobulin-benzeri domain, transmembran segment, juxtamembran segment, hücre içi 70–100 amino asitlik kinaz inserti bulunduran protein-tirozin kinaz domaini ve karboksil terminal kuyruk içerirler [24]. Bu üç VEGF reseptörü, hücreler arası immunoglobulin domaini ve kinaz inserti içeren trombosit türevi büyüme faktörü reseptörleri (α ve β), fibroblast büyüme faktörü reseptörleri (1–4), kök hücre faktörü reseptörü (Flt-3), koloni uyarıcı faktör-1 reseptörü (CSF-1R) ile ilişkilidir [24, 25].

1.2.1 VEGF Ligantları

1.2.1.1 VEGF-A

VEGF (VEGF-A), 1980'lerin başlarından başlayarak çeşitli gruplar tarafından çalışılmıştır. 1983'de Senger ve ark. gine domuzundan hepatoselüler karsinom dokusundan alınan proteini izole etmiş ve kısmen saflaştırmıştır. Ayrıca bu

proteinin vasküler geçirgenliği indükleme kabiliyeti olduğunu bulmuşlardır [26]. 1989'da Ferrara ve Henzel, sığır hipofiz folikülostelat hücreleri ortamdan proteini saflaştırmışlar, vasküler endotel hücrelerdeki mitotik aktivitesini araştırmışlardır. Amino terminal sekansının Ala-Pro-Met-Ala-Glu olduğunu bulmuşlardır [27]. Gospodarowicz ve arkadaşları da aynı çalışmayı yapmışlar ve aynı terminal sekansı bulmuşlardır [28].

Connolly ve arkadaşları, gine domuzu hepatosellular karsinom tarafından indüklenen ortamdan vasküler geçirgenlik faktörünü (VPF) saflaştırıp, geçirgenlik artırıcı özelliğini çalışmışlardır. Connolly ve arkadaşları bu faktörün amino terminalindeki 21 amino asitin hem vasküler geçirgenliği hem de vasküler endotel hücrelerin mitotik aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir. [29]. Ayrıca, 131I-VEGF / VPF'nin vasküler endotel hücrelerine yüksek afinite ile bağlandığını göstermişlerdir. Faktörün, vasküler endotel hücresi mitojenezinin artırılması için endotele spesifik olduğunu ve sığır düz kas hücrelerinin, insan ve fare fibroblastlarının, sığır kondrositlerinin, insan lenfositlerinin veya fare miyelomonositlerinin çoğalmasını uyaramadığını göstermişlerdir [29]. Ayrıca farklı araştırmacılar Ala-Pro-Thr-Thr-Glu [30]. amino terminal dizisiyle bu faktörün insan kordon bağı ven endotel hücresi (HUVEC) mitojenezini uyardığını, ancak fibroblastların mitojenezini uyarmadığını göstermişlerdir [31].

Connolly ve ark. ve Senger ve ark. indirgeyici olmayan koşullar altında denatüre edici jel elektroforeziyle saptanan VEGF molekül ağırlığının 34 - 42 kDa arasında olduğunu ve indirgeme koşulları altında olanın yaklaşık 17-24 kDa arasında olduğunu bildirmişlerdir [29, 32]. Bağımsız yapılan çalışmalar birleştirildiğinde, vasküler endotel mitojenik aktiviteyi (VEGF) ve vasküler permeabiliteyi (VPF) arttıran moleküllerin aynı olduğu anlaşılmıştır. VEGF vasküler endotel hücreler için mitojen ve hayatta kalma faktörüdür [31, 33, 34]. Ayrıca vasküler endotel hücre ve monosit hareketliliğini teşvik eder [35, 36]. Üstelik VEGF selektif ve geri dönüşümlü olarak, endoteli plazma ve plazma proteinlerine hasar vermeden geçirgenleştirir [2, 32]. Bu özelliklerin hepsi anjiyogenez için gereklidir. Bir N-bağlantı glikozilasyon bölgesi içeren VEGF, sekiz ekzon içeren tek bir genin pre-mRNA'sından alternatif splicing ile transkribe edilmesinden kaynaklanan dokuz izoformdan oluşur [20, 37, 38].

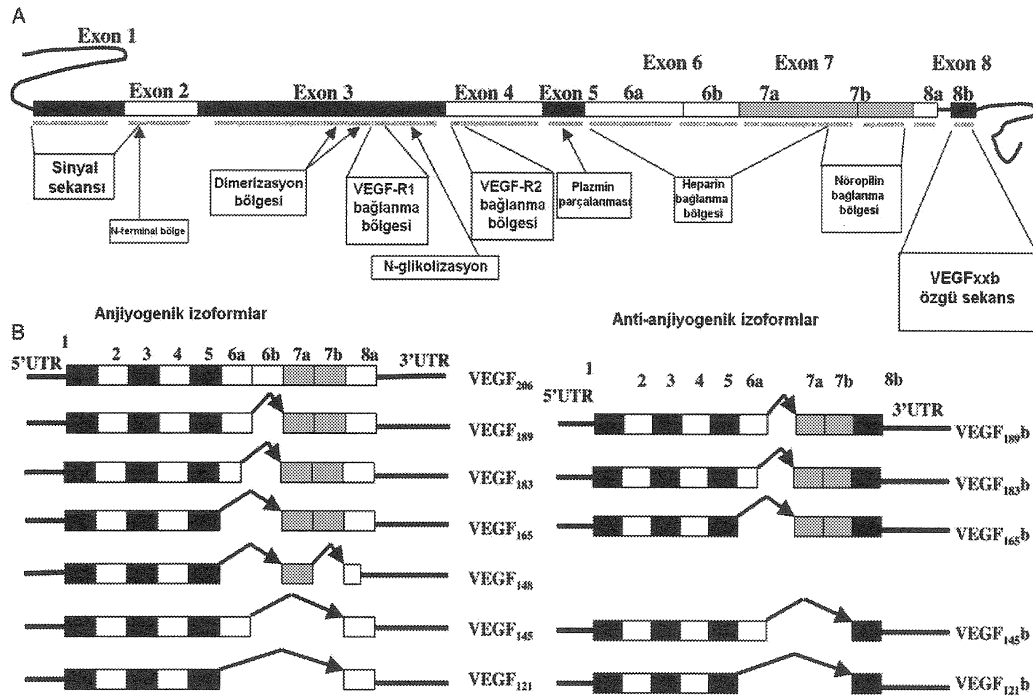
VEGF mRNA'sı ve proteini birçok dokuda ve organda ifade olmaktadır [39, 40]. Berse ve ark. erişkin kobaylarda VEGF mRNA'sının en yüksek seviyesinin vasküler bir organ olan akciğerde olduğunu bildirmiştir. Mide mukozası, karaciğer ve dalakta VEGF mRNA'sı düşük seviyelerini ifade edilirken, kobay adrenal, kalp ve böbrekte de yüksek düzeyde eksprese edildiğini bildirmişlerdir [39]. Üstelik VEGF mRNA ve proteini, göğüs, kolorektal, küçük hücreli olmayan akciğer ve prostat kansinomları dâhil çok çeşitli insan tümörlerinde ifade edilir [20].

8.5 günlük embriyo aşamasında ölen VEGF'den yoksun fareler, VEGF'nin embriyonik vaskülojenezin en erken evrelerine katıldığını göstermektedir ve damar oluşumu ve kan adası oluşumunda bozukluklar sergilerler. Dahası, farede VEGF'in tek allelindeki kayıp vasküler deformasyona ve 11-12. günler arasında ölümlere sebep olur. Bu araştırmalar, heterozigot VEGF-eksikliğinde (VEGF +/-) embriyolarda kan damarlarının oluşumunun anormal olduğunu bildirmiştir. VEGF veya VEGF reseptör eksikliği bulunan embriyolarda homozigot öldürücü farklılık gösteren bu heterozigot letal fenotip, embriyonik damar gelişiminin VEGF tarafından ciddi ölçüde önemli bir doz bağımlı olarak düzenlendiğinin göstergesidir [41, 42].

VEGF-A'nın tek bir mRNA'dan köken alan 9 izoformu vardır (Şekil 1.2) Tüm VEGF izoformları basit tamponlu çözeltilerde hidrofildir ve serbestçe diffüz olabilir. Bununla birlikte, VEGF-165, VEGF-189 ve VEGF-206, hücrelerin plazma membranında bulunan anjiyogenik proteoglikanlara ve hücre dışı matriksde afiniteye sahip oldukları için, diffüz olmalarını sınırlayıcı heparan sülfat proteoglikan bağlayıcı domainler bulundurlar [43]. 6a, 6b ve 7 ekzonlarının her biri, VEGF'in diffüz etmesini sınırlayan heparan sülfat bağlama domaini kodlar. VEGF-121, bu bağlanma domaininden yoksundur ve *in vivo* olarak serbestçe diffüz olabilir.

En çok ifade edilen izoform olan VEGF-165, ekzon 6a ve 6b'den yoksundur Bununla birlikte, bir heparan sülfat-bağlayıcı segment, ekzon 7 ile kodlanmıştır. Ekzon 7 ile kodlanan 44 amino asidin 15'i temeldir. Sonuç olarak, % 50 ile % 70 arasında VEGF-165, hücre ve ekstraselüler-matriks ilişkili kalır, böylece bu izoform, *in vivo* olarak kısmen diffüz olabilir hale gelir [44]. Ekzon 6a, 6b ve 7 tarafından kodlanan bölgeleri içeren daha büyük izoformlar, heparan sülfat bağlayıcı domainine sahiptir ve serbestçe diffüz olamazlar. Bu izoformlar, hücre yüzeyinde ve hücre dışı matrikste tamamen kenetlenir.

En büyük insan öncü proteini 232 amino asit içermektedir. 26 rezidürlük sinyal dizisinin kaldırılması ile 206 amino asit içeren olgun protein, VEGF-206 üretilir. VEGF-165, çeşitli hücre tipleri, dokular ve tümör numunelerinin cDNA analizi yapıldığında, baskın izoform olduğu görülmüştür ve bunu 189 ve 121 izoformları izlemektedir. Fare VEGF izoformları, olgun proteinin 8. konumundaki glisin veya preproteinin 34. aminoasidin delesyonundan ötürü insan proteinlerinden daha kısadır. Sitokinler ve büyüme faktörleri de dâhil olmak üzere birçok birincil mesajcı, anjiyogeneze ve vaskülogeneze katılrsa da, VEGF ailesi bu işlemlerde büyük önem taşır.



Şekil 1.2: VEGF izoformları [45].

A: VEGF gen bölgeleri B: VEGF izoformları

1.2.1.2 VEGF-B

VEGF-B, yedi ekson içeren tek bir genden sentezlenen pre-mRNA'nın alternatif splicinginden kaynaklanan iki izoformdan oluşur. 21 amino asitlik sinyal peptidinin çıkarılmasından sonra, VEGF-B167 (167 amino asit) ve VEGF-B186 (186 amino asit) üretilmektedir. VEGF-B186, hücrelerden salgılanır ve serbestçe geçebilir. Baskın izoform olan VEGF-B167, heparan sülfat proteoglikana bağlanır ve *in vivo* da diffüz olamaz [46]. Her iki VEGF-B izoformu, disülfid bağlı homodimerler olarak bulunmaktadır. VEGF'nin VEGF-R2'ye bağlanma kabiliyeti ve VEGF-B'nin VEGF-R2'ye bağlanamaması, β 5- β 6 ilmekteki yapısal farklılıklara bağlı olabilir [47].

Embriyonik farelerde 14. günde, kalpte ve merkezi sinir sisteminde yüksek düzeyde bir VEGF-B mRNA oluşmaktadır. Yetişkin farelerde VEGF-B transkriptlerinin en yüksek seviyeleri beyin, kalp, böbrek ve testislerde bulunurken, düşük seviyeleri karaciğer, akciğer ve dalakta bulunmaktadır [48]. VEGF-B mRNA, göğüs karsinoması, fibrosarkom, Non-Hodgkins lenfoma ve birincil-metastatik melanoma da dâhil olmak üzere çeşitli insan kanserlerinde ifade olmaktadır [49].

1.2.1.3 VEGF-C

VEGF-C, büyüme faktörünün olgun formunu oluşturmak için karmaşık proteolitik işleme tabi tutulan bir prepro-protein olarak sentezlenir [50, 51]. 31 amino asitlik sinyal dizisi, 389 amino asitlik pro-proteinini vermek üzere 419 amino asit olan prepro-proteininden çıkarılır. İki VEGF-C öncülü, iki propeptidin C-terminalinden N-terminal propeptidine uzanan disülfid bağlarıyla bağlanmış bir anti paralel homodimer oluşturmaktadır. Salgılamadan önce, bu dimer, Steiner mekanizması tarafından proteolize tabi tutulur [52]. Bu işlem, subtilisin benzeri proprotein dönüştürücüler olan PC5, PC7 veya furini içerebilir. C-terminali 228-419 aminoasitlerin her biri karşıt N-terminusuna bağlı kalır. Henüz tanımlanmamış bir mekanizma ile ekstraselüler olarak oluşan işlemin son basamağı, olgun VEGF-C'yi üreten 32-111 aminoasitlerinin kaldırılmasıdır. Olgun dimerik VEGF-C, VEGF ve VEGF-B'de oluşan sekiz homolog sistein içerse de, VEGF-C, alt birimler arası disülfid bağlarından yoksun bir homodimer olarak mevcuttur. VEGF-C geni yedi

ekson içerir [53]. İnsan yetişkin kalp, yumurtalık, plasenta, iskelet kası ve ince bağırsak dokuları yüksek seviyelerde VEGF-C mRNA'sı içerir [46].

İnsan yetişkin, böbrek, akciğer, pankreas, prostat, dalak ve testis gibi dokularda az miktarda VEGF-C transkript üretmektedir. Dahası, fare embriyolarının mezenşimal hücreleri, özellikle de lenfatik damarların, aksiller, jugular ve ürogenital bölge ve gelişmekte olan mesenterium gibi embriyonik damarların filizlendiği bölgelerde VEGF-C transkriptlerini ifade etmektedir [54]. İşlenmemiş bir VEGF-C formu, lenf oluşumunda önemli bir katılımcı olan VEGF-R3'e bağlanır [50]. VEGF-C'nin tamamen işlenmiş formu hem VEGF-R2 hem de VEGF-R3'e bağlanır. VEGF-C, embriyogenez sırasında ve yetişkinlerde farklılaşmış lenfatik endotelin oluşumu sırasında lenfanjiyogenezise katılır [55]. Dahası, VEGF-C, meme, serviks, kolon, mide, akciğer, prostatın da dâhil olduğu insan tümörlerinin önemli bir bölümünde ifade edilir [56-58].

1.2.1.4 VEGF-D

VEGF-C gibi VEGF-D de, büyüme faktörünün olgun formunu oluşturmak için karmaşık proteolitik işleme tabi tutulan bir prepro-protein olarak sentezlenir [59]. VEGF-D'nin öncülü, VEGF-C için tarif edildiği gibi olgun ürünü vermek üzere amino ve karboks terminal uzantılarını içerir. Olgun VEGF-D, kovalent olmayan bir homodimerdir. VEGF-D'nin işlenmemiş bir formu, lenfanjiezinde önemli olan VEGF-R3'e bağlanmasına rağmen, tam olarak işlenmiş form, hem VEGF-R2 hem de VEGF-R3'e bağlanır [60, 61]. VEGF-C'nin ve belki de diğer faktörlerin VEGF-D'nin yerini alabileceği açıktır. Erişkin kolon, kalp, akciğer, iskelet kası ve ince bağırsak, yüksek seviyelerde VEGF-D transkriptleri içerirken, yumurtalık, pankreas, prostat, dalak ve testiste düşük seviyelerde bulunur [62].

1.2.1.5 Plasental Büyüme Faktörü (PlGF)

Plasental büyüme faktörü, VEGF ile % 42 amino asit sekansı özdeşliği paylaşan bir homodimerik glikoproteindir [63]. PlGF, VEGF için tarif edildiği gibi inter-ve intra-subunit disülfid bağ oluşumuna katılan VEGF ailesinin çekirdek sekiz

sistein aminoasidine sahiptir. PlGF'nin üçüncül yapısı VEGF'ye benzemektedir [64]. PlGF geni, yedi ekson içerir ve alternatif pre-mRNA splicinge dayalı dört izoformu (PlGF-131, -152, -203 ve -224) ifade etmektedir. Bazı amino asitler içeren PlGF-152 ve PlGF-224, negatif yüklü heparan sülfat proteoglikanlara bağlanır. PlGF izoformları öncelikli olarak plasentada görülür. PlGF, VEGF sinyalini arttırmaktadır [65].

1.2.1.6 VEGF-E

VEGF-E, Orf parapoks virüsü tarafından kodlanmaktadır [66]. VEGF-E, kemotaksi, proliferasyon ve kültürlenmiş vasküler endotel hücrelerinin filizlenmesini ve *in vivo* olarak anjiyojenezi uyarır.

VEGF-E, VEGF-R2'ye yüksek afinite ile bağlanır, ancak VEGF-R1'e bağlanmaz. Bu faktör, parapoksvirus ile infekte lezyonlarla ilişkili anjiyojenezi desteklemektedir. VEGF-E, VEGF'ye benzer vasküler geçirgenlik aktivitesine sahiptir [66].

1.2.2 VEGF Reseptörleri

1.2.2.1 VEGF-R1 (Flt-1)

VEGF-R1 (fms (Fms, kedi McDonough sarkom virüsüne işaret eden Flt-1) benzeri tirozin kinaz-1), VEGF, PlGF ve VEGF-B bu reseptöre bağlanır (Şekil 1.3) [67-69]. Yaklaşık 210 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahip olan VEGF-R1, gelişim safhasına ve reseptörü üreten endotel hücrelerinin konumuna bağlı olarak değişken fonksiyonlara sahiptir [70].

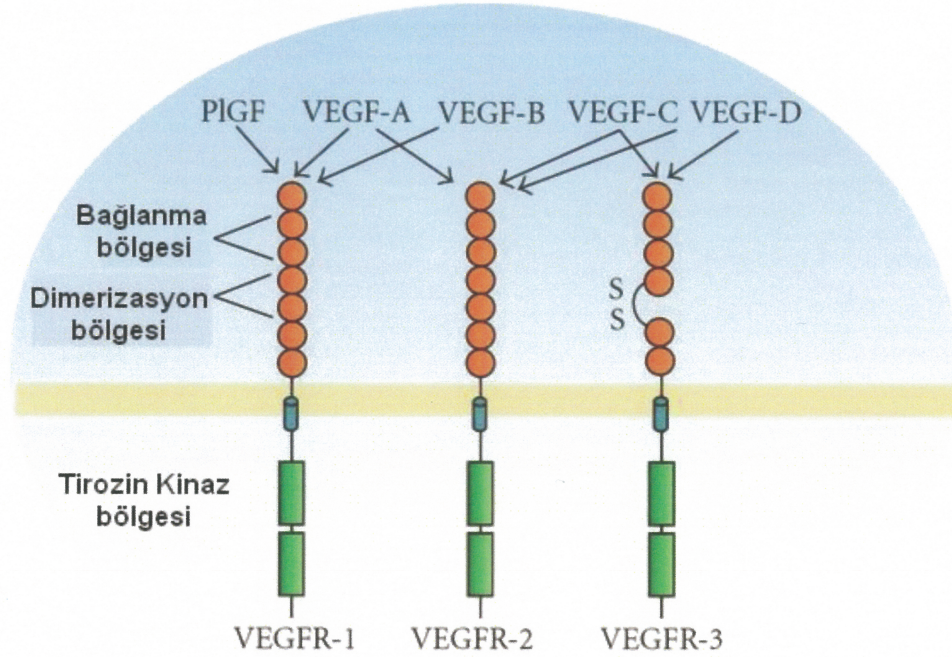
Fong ve ark. VEGF-R1'den yoksun farelerinin embriyonik dönemde öldüğünü göstermişlerdir [71]. Endotel hücreleri bu farelerde hem embriyonik hem de ekstra embriyonik bölgelerde oluşur, ancak hücreler organize olarak kan damarları oluşturamazlar. Bununla birlikte, Hiratsuka ve ark. VEGF-R1 hücre dışı ligandı bağlama ve transmembran segmentleri ifade eden fakat tirozin kinaz (TK) ve insert

domaininden (VEGF-R1-TK - / -) yoksun farelerin canlı olduğunu bulmuşlardır [72]. Bu gözlem, ligand bağlama domaininin gelişim sırasında reseptörün vazgeçilmez parçası olduğunu gösterir.

VEGF-R1, endotelin türetildiği, erken mezenşim de dâhil olmak üzere embriyonik hücrelerin populasyonlarında ifade edilmektedir. VEGF-R1, VEGF için VEGF-R2'den daha yüksek afiniteye sahiptir [67, 70, 73, 74]. VEGF-R2'nin tersine, VEGF-R1, VEGF uyarımı sonrasında zayıf tirozin kinaz fosforilasyon aktivitesine sahiptir. VEGF-R1'in aktivasyonu, direkt proliferatif veya hücre iskeleti etkilere sahip değildir [67]. Bununla birlikte, VEGF-R1'in aktivasyonu, endotel hücrelerinde plazminojen aktivatörü ve plazminojen etkinleştirici inhibitör-1 ürokinaz tipinin artmış ekspresyonunda rol oynar. Bu moleküller, hücre dışı matris bozunumunda ve hücre göçünde rol oynamaktadır [69]. Ayrıca, VEGF-R1, monosit kemotaksisinde rol oynar [36].

30 ekzon içeren insan VEGF-R1 geni, kromozom 13q12'de bulunur. VEGF-R1 pre-mRNA'sının alternatif splicingi ile VEGF'e bağlanabilen ve onun aktivitesini inhibe edebilen çözümlü reseptör izoformu (sVEGF-R1) üretilir. Sinyal peptidinin kesilmesinden sonra sVEGF-R1, yedi hücre dışı immüoglobülin domaininin ilk altısına karşılık gelen 661 amino asiti içerir [75]. İnsan plasentası tarafından üretilen ve annenin dolaşımına bırakılan aşırı sVEGF-R1, hipertansiyon ve proteinüriye yol açar [76, 77]. VEGF-R1'in otofosforilasyon seviyesi VEGF'in yanıtına göre değişir ve bu da reseptör aşırı ifade ettirildiğinde hücrede görülebilir [34]. Reseptör protein-tirozin kinazların aktivasyonu ve sinyal iletiminin başlaması, tirozin amino asitlerinin otofosforilasyonunu ile ilişkilidir [25]. Çoğu reseptör protein tirozin kinazlar, artmış enzim aktivitesine neden olan aktivasyon halkası olarak adlandırılan otofosforilasyona uğrar. Bununla birlikte, VEGF-R1 aktivasyon halkası otofosforilasyona ve aktivasyona uğramamaktadır. VEGF-R1'in C-terminal kuyruğundaki altı tirozin amino asidi (1169, 1213, 1242, 1309, 1327 ve 1333.tirozin aminoasitleri) fosforilasyon bölgesi olarak tanımlanmıştır [78, 79]. Fosfotirozin 1169, fosfolipaz C- γ 1 (PLC- γ 1)'ye bağlanarak aktive eder. Aktive olan PLC- γ 1 mitojen aktive edilen protein (MAP) kinaz sinyal transdüksiyon yolağının aktive edilmesini sağlar [120]. VEGF ve PlGF, VEGF-R1 reseptörünü aktive eder fakat fosforilasyon bölgeleri farklıdır. Örneğin, Autiero ve ark. İnsan VEGF-165'ün Tyr1213 fosforilasyonunu uyardığını, buna karşılık insan PlGF-152'nin yalnızca

Tyr1309 fosforilasyonunu, uyardığını keşfetmiştir [80]. VEGF-165 ve PlGF-152'nin her ikisi de VEGF-R1'e bağlansa da, bu sonuçlar bu reseptörü farklı şekilde aktive ettiğini göstermektedir. VEGF-165, VEGF-R1 fosforilasyonunu uyarmasına rağmen, fare primer kılcal endotel hücrelerinin gen ekspresyon profilini değiştirmez. Buna karşılık, fare PlGF tedavisi 50'den fazla genin ekspresyonunda değişiklikler meydana getirir. VEGF-165 ve PlGF, VEGF-R1'e bağlanmasına rağmen, her biri VEGF-R1'i benzeri olmayan bir şekilde aktive ettiğini gösteren farklı biyolojik etkiler gösterirler [80].



Şekil 1.3: VEGF ligantları ve reseptörlerle ilişkisi [81].

1.2.2.2 VEGF-R2 (Flk-1 / KDR)

VEGF-R2 (Flk-1 / KDR, Fetal karaciğer kinaz-1 / Kinaz Domaini-içeren Reseptör), VEGF'nin düşük molekül ağırlıklı formlarına (110-165 amino asitlerinden), VEGF-E, VEGF-C ve VEGF-D'nin tamamen işlenmiş formlarına bağlanır. VEGF-R2, yaklaşık 210 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir [67] ve VEGF ile uyarılmış endotel hücresi migrasyonu, proliferasyonu, sağkalımı ve artmış vasküler geçirgenliğin baskın mediyatörüdür [82-84].

Shalaby ve ark. Hematopoietik ve endotel hücre öncüllerinin gelişimindeki kusurlarının bir sonucu olarak VEGF-R2 yoksun farelerin embriyonik 8.5 ve 9. günler arasında öldüğünü bildirmişlerdir [85]. Yolk-sac kan adaları 7.5 günde bulunamamış, herhangi bir evrede embriyo veya yolk kesesinde organize kan damarları gözlenmemiştir ve hematopoietik progenitler ciddi şekilde azalmıştır. Bu bulgular, VEGF-R2'nin fare embriyosunda yolk-sac kan-adası oluşumu ve vaskülogenezi için esas teşkil ettiğini ve VEGF-R2'nin embriyonik endotel hücrelerinin en erken belirteçlerinden biri olduğu görüşüyle uyumlu olduğunu ortaya koymaktadır.

VEGF-R2'nin VEGF'ye VEGF-R1'den daha düşük afinitesi olmasına rağmen, VEGF-R2 ligandlarına yanıt olarak güçlü protein-tirozin kinaz aktivitesi sergilemektedir. VEGF, reseptör otofosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açan VEGF-R2'nin dimerizasyonunu indükler. Otofosforilasyon karşılıklı olarak meydana gelir: dimerin kinazı ikincideki tirozin aminoasidinin fosforilasyonunu katalize eder ve ikincisi de birincideki tirozin amino asidi fosforilasyonunu katalize eder. Kinaz domainlerinin aktivasyon halkası içindeki tirozin amino asitlerinin otofosforilasyonu katalitik aktiviteyi uyarırken, diğer lokasyonlarda tirozin amino asitlerinin otofosforilasyonu, fosfotirozini diziye spesifik olarak tanıyan modüler Src homoloji 2 (SH2) ve fosfotirozin bağlama (PTB) domainlerine yönelik bağlanma bölgesi oluşturur. Takahashi ve ark. Tyr1175 ve Tyr1214'ün VEGF-R2'deki iki önemli fosforilasyon bölgesi olduğunu göstermiştir [83]. Tirozin otofosforilasyonunun diğer bölgeleri 951, 1054 ve 1059. Tirozin aminoasitleridir [84, 86, 87]. VEGF-R2'nin aktivasyon halkası içindeki 1054 ve 1059. tirozin aminoasitlerinin oto-fosforilasyonu kinaz aktivitesinin artmasına neden olur [88].

VEGF-R2 fosforilasyonu, protein kinaz C aktivasyonuna yol açan PLC aktivasyonuna yol açar. Takahashi ve ark. PLC-ile Tyr1175'in etkileştiğini bulmuşlardır. [126]. Adaptör protein Shb, VEGF-R2 de dâhil olmak üzere çeşitli büyüme faktörü reseptörlerini içeren sinyal yolları ile ilgilidir. Shb, bir SH2 domaini, bir merkezi PTB domaini, dört merkezi olası tirozin fosforilasyon alanından ve bir prolin açısından zengin N terminalden oluşur [89].

Autiero ve ark. VEGF-R2'nin VEGF-R1 tarafından trans-aktive edildiğini keşfetmişlerdir. Dahası, VEGF-R1 ve VEGF-R2'nin trans-fosforilasyonunun

gerçekleştiğini ve reseptör sinyal yolları arasında çapraz-bağlantının olduğunu kanıtlamışlardır. Herhangi bir ligand yokluğunda, VEGF-R1, bu reseptörlerin kendiliğinden kompleksler oluşturduğunu gösteren anti-VEGF-R2 ile yapılan immünopresipitasyon deneylerinde saptanmışlardır. Ayrıca fare homodimerik VEGF-164 ve insan heterodimerik VEGF / PlGF'nin her birinin, yaklaşık % 140 oranında VEGF-R1 / VEGF-R2 kompleks oluşumunu arttırdıklarını bulmuşlardır [79]. VEGF ve VEGF-R'in ifadesi hipoksiya durumunda artmasına rağmen VEGF-R2'nin ifadesinde değişiklik olmamaktadır [90].

1.2.2.3 VEGF-R3 (Flt-4)

Yaklaşık 170 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip olan VEGF-R3, VEGF reseptör ailesinin üçüncü üyesidir [91, 92]. VEGF-R3, embriyo içindeki primer kılcak pleksusun yeniden modellenmesinde önemli bir rol oynamaktadır ve yetişkinlerde anjiyogeneze ve lenfanjiyogeneze katkıda bulunmaktadır. Bu reseptör, embriyonik vasküler endotel hücrelerinde bulunur ve gelişme sırasında üretimi azalır [93]. Dumont ve ark, VEGF-R3'ten yoksun farelerin, 9.5 embriyonik günde öldüğünü ve kan damarı gelişiminin hasarlı olduğunu göstermişlerdir. Bu durumda, vaskülojenез ve anjiyogeneze meydana gelmiştir, ancak büyük damarlar hasarlı lümenlerle anormal şekilde düzenlenmiştir ve perikard boşluğunda sıvı toplanmasına ve kardiyovasküler yetmezliğe yol açmıştır [94].

VEGF-R3 kinaz domaininin katalitik halkasındaki mutasyonlar, kusurlu kutanöz lenfatik damarların neden olduğu ekstremitelerin kronik şekilde şişmesi ile karakterize edilen insan kalıtsal lymphedema (Milroy hastalığı) yol açar [79]. VEGF-R3, altıncı immünoglobülin domaininde proteolitik kesime uğrar; orijinal zincirin iki bileşeni, disülfid bağı ile bağlı kalır [92].

Hipoksi, kültürdeki embriyonik kök hücrelerin farklılaşmasında VEGF-R3 ekspresyonunu artırır [95]. Dixelius ve ark, insan VEGF-R3'ünün C-terminali kuyruğunda otofosforilasyon bölgeleri olarak beş tirozin aminoasiti (1230, 1231, 1265, 1337 ve 1363) tespit etmişlerdir. Fosfotirozin 1337, Shc ve Grb2 için MAP kinaz sinyal transdüksiyon başında oluşan bağlanma yeri olarak işlev görür. İnsan primer lenfatik endotel hücrelerini kullanarak Dixelius ve ark. , VEGF-C uygulaması

ardından VEGF-R2'nin, VEGF-R3 ile birlikte immüno-çökeldiğini bulmuşlardır. Üstelik VEGFR3-tirozin aminoasitleri 1337 ve 1363, VEGF-R2/VEGF-R3 imüno-kompleksinde otofosforile edilmemiştir. Bu sonuçlar, iki reseptörün etkileşiminin, Shc ve Grb2 bağlanma bölgelerinin fosforilasyonunu önlediği ve sinyal iletim modelini etkilediğini önermektedir [96].

VEGF ve VEGF-D, (i) İmmünoprespitasyon ile saptanan VEGF-R2/VEGF-R3 kompleksinin oluşmasına ve (ii) Reseptörlerin artmış fosforilasyonuna yol açmıştır [96].

1.2.2.4 Nöropilin -1 ve nöropilin -2

Soker ve ark. HUVEC örneklerinde VEGF-R1 ve VEGF-R2'den farklı olan bir VEGF reseptörü tespit etmiştir [97]. Bu araştırmacılar bu reseptörü insan MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerinden saflaştırmışlar ve nöronal bir tanıma molekülü ve nöronal hücre adhezyon molekülü olan nöropilin-1 ile özdeş olduğunu göstermişlerdir [98, 99]. Chen ve ark.'nın çalışması nöropilin-2'nin keşfine yol açmıştır [100]. Çok sayıda gözlem, bu reseptörlerin tümör progresyonunda önemli bir rol oynadığını göstermektedir [101]. Bazı tümör tipinde ortaya çıkan nöropilinler, anjiyogenezi arttırarak veya tümör hücrelerini doğrudan etkileyerek tümör gelişimine aracılık edebilir.

Kitsukawa ve ark. Farelerdeki aşırı ekspresyonunun, embriyolarda aşırı kılcal ve kan damarı oluşumu, öldürücü hemoraji ile sonuçlandığını göstermiştir. Bu grup, nöropilin-1 (Np1)'den yoksun farelerin, kardiyovasküler sistemdeki ve sinir sistemindeki anomaliler nedeniyle 10.5-12.5 günlerde rahim içinde öldüğünü göstermiştir [102]. Anormallikler (i) Sinirsel vaskülarizasyonun bozulması, (ii) Büyük damarların transpozisyonu ve (iii) Yolk kesesinde vasküler ağların yetersiz gelişimini içermektedir [103].

Nöropilinler aynı zamanda VEGF izoformları için VEGF-R1, VEGF-R2 veya VEGF-R3'den bağımsız olarak reseptör olarak işlev görürler. VEGF-121 ne nöropilin-1 ne de nöropilin-2 için bir liganttır. Kültüre edilmiş HUVEC hücreleri nöropilin-2'nin baskın olduğu nöropilin-1 ve nöropilin-2'yi ifade etmektedir. İki reseptörün ekspresyon seviyeleri genellikle eşit değildir. Örneğin, melanoma ve

glioblastomadaki nöropilin-2 ifadesi, nöropilin-1 den fazladır [101]. Parikh ve ark. fosfatidilinositol (PI)3-kinaz inhibitörü, wortmanin ve hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinaz (Erk 1/2) inhibitörü U0126'nın HT29 hücrelerinde hem bazal hem epidermal büyüme faktörü tarafından uyarılan nöropilin-1 mRNA ekspresyonunu azalttığını bulmuşlardı [104].

Wey ve ark. Pankreatik karsinoma hücrelerinde nöropilin-1'in aşırı şekilde ifade edilmesini sağlamışlardır. Neuropilin-1 aşırı ekspresyonu, (i) Gemsitabine ve (ii) Pankreatik ve diğer maligniteleri tedavi etmek için kullanılan sitotoksik ilaç olan 5-fluorourasil'e duyarlılığı ve ayrılmaya bağlı apoptozu (anoikis) azaltır.

Nöropilin-1 aşırı ekspresyonunun, uyarılmamış Erk 1/2 fosforilasyonunu altı kat ve Jun N-terminal kinaz (Jnk) fosforilasyonunu dört kat arttırdığını bulmuşlardır. Bu sonuçlara bağlı olarak Erk veya Jnk sinyalizasyonunun aktivasyonunun, iki sitotoksik ajana karşı gözlenen kemodirencini açıklayabileceğini düşünmüşlerdir.

Büyüme faktörleri ve oksijen, nöropilin ifadesini düzenler. Örneğin, VEGF [105], epidermal büyüme faktörü [104, 106, 107], insülin benzeri büyüme faktörü-1 [104] ve hipoksi [108] nöropilin-1'in artmış ekspresyonuna ve serebral iskemi, hem nöropilin-1 hem de nöropilin-2'nin artmış ekspresyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir [109].

VEGF-R1, VEGF-R2 ve VEGF-R3 için eş reseptör olarak, nöropilinler protein-tirozin kinaz kaskadlarının bir parçası olarak işlev görürler.

1.3 Plazminojen Aktivatörleri ve Matriks Metalloproteazlar

Plazminojen aktivatörleri, plazmin ve matriks metalloproteazlar (MMPLer), anjiyogenezde rol oynamaktadır [110]. Plazminin enzimatik aktif bölgesi bir serin aminoasidi içermektedir ve böylece bir serin proteaz olarak tanımlanmaktadır. Plazmin, fibronektin, laminin ve proteoglikanların protein çekirdeği gibi birkaç hücre dışı proteinin hidrolizini katalize eder [73, 111]. Aktif plazmin, doku plazminojen aktivatörü (tPA) ya da ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü (uPA) tarafından proteolitik aktivasyonu takiben inaktif plazminojenden türemiştir [112]. Doku plazminojen aktivatörü, fibrinoliz için plazmin üretiminde önemli bir rol oynarken,

uPA, dokunun yeniden modellenmesi sırasında hücre dışı matrisin parçalanması için plazmin üretiminde önemli bir rol oynamaktadır [113]. uPA'nın aktivitesi plazminojen aktivatör inhibitörü-1 ve -2 ile ortadan kaldırılmaktadır. Plasminojen, ekstraselüler bölmede yaygın olarak bulunur.

İnsan matriks metalloproteazlar ailesi, iki ayrı gruba ayrılabilen çinkoya bağımlı 23 enzimden oluşur: salgılanan MMP'ler ve membran tipi MMP'ler (MT-MMP'ler). Salgılanan MMP'ler arasında MMP 1-3, MMP 7-13, MMP 19, MMP 20, MMP 23A, MMP 23B, MMP 24-28 bulunur ve membrana bağlı MMP'ler MMP 14-17 ve MMP 21'i içerir [114, 115]. Bu enzimler, bağ dokusu stromasında bazal membran ve çeşitli kollajen tipleri de dâhil olmak üzere çok sayıda hücre dışı matris proteinlerini parçalayabilirler. Aktif olmayan pro-enzimler olarak salgılanırlar ve plasmin dâhil olmak üzere çeşitli enzimler tarafından ekstraselüler olarak aktive edilirler. Metalloproteazların doku inhibitörleri (TIMPler) MMP aktivitesini düzenler [60].

1.4 ADAMTS Gen Ailesi

Memeli genomunda 19 ADAMTS geni tanımlanmıştır. ADAMTS'ler 1'den 20 ye kadar isimlendirilmiştir. Fakat ADAMTS-11 isimlendirmede daha önce ADAMTS-5 olarak isimlendirilen genle aynı olduğu için bulunmamaktadır [116, 117]. Aynı aile sınıfından olduğu matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve ADAM'lar (A Disintegrin Ve Metalloproteinaz) gibi ADAMTS'ler metzinin proteaz süper ailesine aittir ve çinko iyonuna bağımlı metalloproteinaz aktif bölgesine yakın korunan metionin amino asidinden adını almıştır [118, 119].

1.4.1 ADAMTS'lerin Yapısal Organizasyonu

Bütün ADAMTS'ler hücre dışı salgılanan enzimlerdir ve bileşik domain organizasyonuna sahip olup, amino terminalinden başlayarak, bir sinyal peptidi ve ardından değişken uzunluktaki bir pro-bölgesi; bir metalloproteinaz domaini; bir disintegrin benzeri domain; merkezi trombospondin tip 1 dizi tekrar (TSR) motifi; bir boşluk bölgesinin ardından sistein amino asidince zengin domain içerirler.

Prodomain, metzincinlerde genellikle gizli olarak bulunur ve enzimlerin doğrudan doğruya katlanmasını sağlar; ancak ADAMTS'lerde ek işlevlere sahiptirler. Genel olarak ADAMTS'ler, MMP'lerin aktivasyonunu kontrol eden sistein aminoasitlerinden yoksundur, ancak ADAMTS-15'te bunların aksine bu aminoasitler mevcuttur. Bütün ADAMTS'ler furin benzeri pro-protein dönüştürücüleri için (PPCs) en az bir (R/KXnR/K↓R) bölgesi içerirler ve bazılarının (örneğin pro-ADAMTS 1 ve -4) aktif enzimin salgılanmasını sağlayan trans golgi ağıyla PPC'ler tarafından aktivite gösterdiği gözlenmiştir [120]. Diğer ADAMTS öncülleri (örneğin pro-protein ADAMTS-5) furin tarafından golgide değil ekstraselüler olarak aktive edilir [121]. Oysaki pro-ADAMTS-9 şaperon ısı şok proteini gp96 / GRP94 ile kompleks halinde iken hücre yüzeyinde aktive olmaktadır [122].

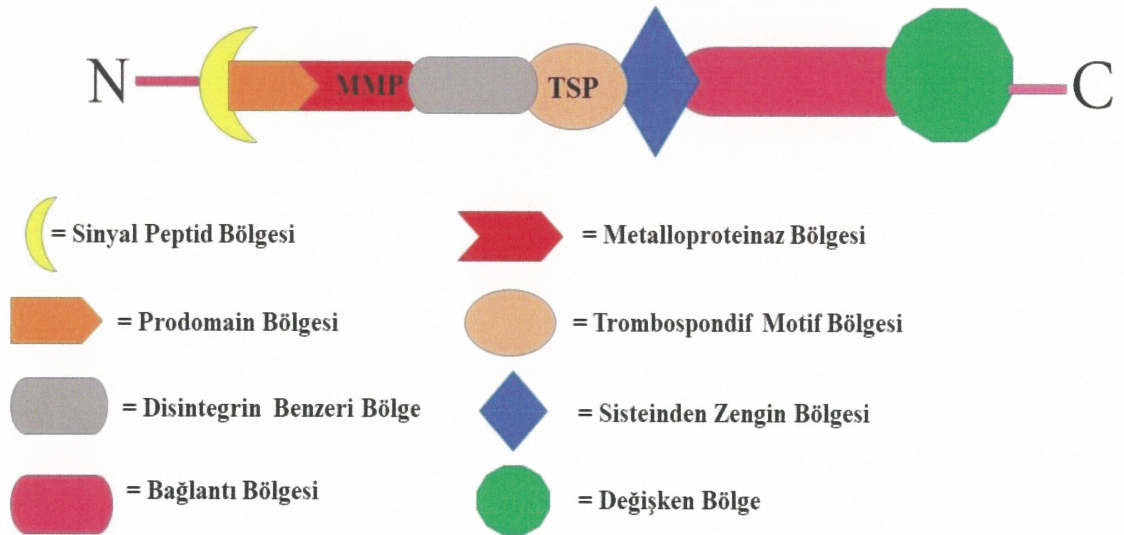
ADAM'ların aksine, 21 insan aile üyesinden 8 tanesinin işlevsel bir Zn bağlanma motifini kaybettiği ve dolayısıyla proteolitik olarak inaktif olduğu [123], tüm ADAMTS'lerin katalitik olarak işlevsel olduğu tahmin edilmektedir. ADAMTS metalloproteinaz domainlerinin tipik metzinin yapısını benimsemesi beklenir: üst kısımda beş iplikli bir β-tabakası içeren bir amino terminal alt-domainine sahip küresel bir yapı ve altta, Met-dönüşüm konumlandırıldığı α-helikslere oluşan ve katalitik Zn²⁺ altına bir hidrofobik yastık oluşturan bir karboksi terminal domain. [124]. ADAMTS metalloproteinaz domainlerinin ayırt edici bir özelliği, MMP'lerinkilerle karşılaştırıldığında yapıyı stabilize eden dört disülfid bağının varlığıdır (MMP'lerde yoktur) [125]. ADAM akrabalarının aksine, hiçbir ADAMTS'nin integrinlerle disintegrin benzeri domain aracılığı ile etkileşimde bulunduğu bildirilmemiştir ve ADAMTS'lerde bu alanın yanlış adlandırıldığı önerilmektedir. ADAMTS-1 [125] ve ADAMTS-4 ve 5 için kristal yapı verileri, disintegrin benzeri domainin metalloproteinaz aktif bölgesi yarığına karşı yığılmış, sistein açısından zengin bir bölge olduğunu ortaya koymaktadır ve katalitik domainin bir parçasıdır. ADAMTS-4 ve ADAMTS-5'in katalitik domainlerinin kristal yapılarından şaşırtıcı bir bulgu, dengede var olabilecek aktif alanların iki alternatif konformasyonunun tanımlanmasıdır: ek bir Ca²⁺ iyonuna bağlı olan ve bir 'açık' ve erişilemeyen Ca²⁺ iyonunun serbest bırakıldığı 'kapalı', yapı bulunur [126]. MMPler veya ADAM'lar için bu iki farklı konformasyonel durumun varlığı gözlemlenmemiştir.

Katalitik domain açısından, ADAMTS'ler, bir konsensüs HEXXHXBG (/ N /S) BXHD katalitik motif içerir. İçerisindeki üç histidin bir Zn^{+2} iyonu koordine eder [118], B polar olmayan aminoasidi temsil eder. ADAMTS'lerde, üçüncü histidinin 14 ila 20 amino asit öncesindeki metiyonin, tüm metzincin metalloproteinazların katalitik domainlerinde ortak olan 'Met-dönüş' ü olarak tanımlanır [118].

ADAMTS enzimlerinin, aktivitelerinin düzenlenmesi ve substrat bağlama fonksiyonlarında ECM ile birleşmeleri için karboksi terminal yardımcı domainlerine ihtiyaçları vardır. Tüm ADAMTS enzimlerindeki yardımcı domaini, trombospondinler 1 ve 2'nin tip I tekrarlarına benzer yaklaşık 50 aminoasit trombospondin benzeri tekrar (TSR) ve bunu takiben 100 amino asit'den biraz daha fazla sistein açısından zengin bir bölge 10 korunmuş sistein aminoasit (ADAMTS-12 hariç) [127]. tortusu içeren asit kalıntıları ve son olarak 103-160 amino asit uzunluğunda daha değişken bir sistein içermeyen ayırıcı bölgeden oluşur. Bir çok ADAMTS (ADAMTS-2, 3, 6, 7, 10, 12, 14, 16, 17, 18 ve 19) , PLAC (proteaz ve lacunin) modülüne sahiptir ve bu modül korunmuş altı sistein aminoasidi içerir.

Bu temel organizasyon ADAMTS-4 tarafından açıkça görülmektedir ve diğer aile üyeleri çeşitli karboksi terminal modülleri çeşitlidir ve bir veya daha fazla TSR içerirler (Şekil 1.4). Esas TSR'nin karboksi terminal bölgesi yardımcı domain olarak adlandırılır ve ADAMTS aile üyeleri arasında belirgin farkları oluşturur. ADAM'ların aksine ADAMTS'ler, epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri, transmembran ve sitoplazmik modüllerden yoksundur. ADAMTS'lerden farklı olarak bir başka aile yedi ADAMTS benzeri gen (ADAMTSL)'ler, ADAMTS'nin yardımcı alanlarına benzeyen ancak katalitik alanlarının eksik olduğu proteinleri kodlar. ADAMTSL-1, ADAMTSL-6'yı ve papilini içeren bu ADAMTSL proteinleri, ADAMTS'lerin aktivitelerini düzenlemek için işlev görebilir [117, 128]. 19 ADAMTS proteini domain organizasyonu ve bilinen işlevleri bakımından temelde sekiz 'sınıf' ta birleştirilebilir. Aggrekanaz ve proteoglikanaz (ADAMTS-1, 4, 5, 8, 15 ve ADAMTS-9 ve 20) aggrekan, versikant, brevican ve neurocanı içeren hiyalüron bağlayıcı kondroitin sülfat proteoglikan (CSPG) ekstraselüler proteinlerini parçalayabilirler [129]. Bu alt grup aynı zamanda ADAMTS-1 ve ADAMTS-8'in anti-anjiyojenik faktörler olarak özdeşleştirilmesine dayanarak "anjiyojeninhibitor" olarak isimlendirilmiştir [130]; Bununla birlikte, ADAMTS'lerin diğer sınıflarının anjiyogenez üzerinde de etkisi vardır. Bir başka grup ise (ADAMTS-2, 3 ve 14), üçlü

sarmal kollajen fibrillerinin olgunlaşması için gerekli olan pro-kollajen N-propeptidazlardır [131]. ADAMTS-13, von-Willebrand faktörü (vWF) parçalan proteazdır (vWFPCP). Bu proteaz süreci büyük multimerik vWF hedef proteinlerinin sıvı akışkan stres altında kan pıhtılaşması için optimum boyutta getirilmesidir [132]. Başka bir sınıfta (ADAMTS-7 ve 12) kıkırdak oligomerik matris protein parçalama proteinleri (aynı zamanda trombospondin-5 olarak bilinir) bulunur [133, 134]. Bu sınıf ADAMTS ailesinde kondroitin sülfat zincirlerinde musin domaini içeren bu iki enzim üzerinde proteoglikan içermesi ile benzersizdir [135]. Geriye kalan üç alt sınıf her biri bir çift enzim içeren (ADAMTS-6 ve 10; ADAMTS-16 ve 18; ADAMTS-17 ve 19)'ler fizyolojik alt tabakaları tanımlanamamış olduğu için orfan olarak isimlendirilmektedir. Fonksiyonları bilinen ADAMTS'lerde olduğu gibi, birçok orfan enziminin de, kalıtsal insan genetik bozukluklar ve edinilmiş hastalıklarla olan ilişkilerinden ortaya çıkan önemli fizyolojik rollere sahiptir. Benzer etkiye sahip ve benzer domainleri paylaşan ADAMTS proteinlerinin gen duplikasyon sürecinde evrimsel olarak oluştuğu öne sürülmektedir [136-140].



Şekil 1.4: ADAMTS gen yapısı.

1.4.2 Lokalizasyon ve Fonksiyon

ADAMTS proteazlar doku gelişimi ve oluşumunda önemli rol oynar. Bu enzimlerin düzenlenmesinde hata olduğunda veya enzim mutasyona uğradığında hastalıklar ortaya çıkmaktadır. ADAMTS'ler artirit [129, 141], kanser [142-146],

aterosiklorozis [147] ve merkezi sinir sistemi hastalıkları ile ilişkilidir [148]. Ayrıca birçok ADAMTS geni mutasyonu otozomal resesif Mendel kalıtımı hastalığı ile de ilişkilidir [128]. ADAMTS-2 inaktivasyonunda Ehlers-Danlos sendromu tip VIIC ortaya çıkmaktadır [149]. ADAMTS-13 genindeki resesif mutasyonlar trombotik trompositopenik purpura (TTP) durumundan sorumludur ve platelet birikimine sebep olmaktadır [150]. Weill-Marchesani sendromu (WMS) ADAMTS-10 [151]. ADAMTS-17 [152] mutasyonları ile ortaya çıkmaktadır. Mikrokornea, myopik khororetinal atrofi ve telechanthus (MMCAT) ADAMTS-18 mutasyonları [153, 154]. Birçok ADAMTS genleri transkripsiyonel olarak sitokinler, büyüme hormonları, inflamatuvar ajanlar tarafından regüle edilmektedir.

1.4.3 ADAMTS Gelişimi

Aggrekanazlar/proteoglikanlar için temel gelişimsel bir rol CSPG versikanın parçalanmasıdır. Versikan, morfogenez sırasında dinamik yeniden modellemeye izin verirken, yapısal bir destek sağlayan gevşek, hidrasyonlu, hiyalüronik açıdan zengin bir matrise yol açtığı için embriyogenez sırasında önemli bir ECM (Ekstra Sellüler Matriks) bileşenidir. Birçok hücre tipinin yapışmasını, migrasyonunu ve çoğalmasını etkiler; versikandan yoksun fare, kardiyak kusurlar nedeniyle ölür [155]. *In vivo* parçalama, amino terminali olan 70-kDa G1 hiyalüronan bağlanma domaininin, 'versikine' olarak adlandırılan karboksil terminusundaki bir DPEAAE neo-epitopu ile serbest bırakır [156]. DPEAAE'ye karşı antikorlar ADAMTS-1, 4, 5, 9, 15 ve 20'nin çeşitli bağlamlarda versikanalardan oluştuğunu göstermiştir [157-159]. Versikan parçalanmasındaki gelişimsel bozukluklar, ADAMTS-1, 5, 9 ve 20'de hasarı olan farelerde görülen fenotipleri desteklemektedir. Kalp oluşumu sırasında, başlangıçta olgunlaşmamış versikanca zengin ECM'nin yerini bir kollajen, proteoglikan ve elastin içeren matris alır. ADAMTS-9 yoksun fare gastrulasyondan önce ölür, ancak hemizigot ADAMTS-9 +/- fareleri, DPEAAE neo-epitopunun azaltılmış algılanmasını ve bozulmamış versikanın birikiminin yansması olan kalp malformasyonlarına sahiptir [160]. ADAMTS-5 - / - fareleri geç fetal evrelerle genişleyen kalp kapakçıklarına sahiptir ve bu da azalan versikan parçalanması ile korelasyon gösterir [161]. ADAMTS-5, erken versikanca zengin matrisin temizlenmesi için kalp gelişimi sırasında gereklidir. ADAMTS-5'in versikanın

parçalanması için benzer bir gerekliliği cilt gelişiminde görülür [162]. Bununla birlikte, otopod gelişiminde interdigital bağlantı gerilemesi, sindaktiliğe yol açan başarısızlık veya parmakların ve ayak parmağının bağlantısı da dâhil olmak üzere diğer morfojenetik olaylarda dramatik olarak farklı bir sonuç görülür. ADAMTS-5, ADAMTS-9 ve ADAMTS-20 için boş alellerin kombinasyonunu taşıyan fareler), ağdaki gerilemesine başarısızlık ve bunun yanında azalan versikan parçalanma ve apoptozu gösterir [163]. Bu nedenle, ADAMTS-5, 9 ve 20'nin kombine proteolitik aktiviteleri, versikon proteolizi ve ağ gerilemesi için gerekli olan bir eşiğin üzerinde tutmak için gereklidir. Tek bir proteaz, ADAMTS-20 yokluğuyla kombine edildiğinde, heterozigotluk ile in vivo versikant seviyelerini azaltmaya ve % 100 penetrant sindaktiliğe neden olmuştur [164]. ADAMTS-1 tarafından versikan parçalanması, bu enzimin ovülasyon ve kalp gelişimi üzerindeki rollerinin altını çizmektedir. ADAMTS-1 yoksun farelerde perinatal ölüm, yaşamını sürdüren hayvanlarda az büyüme ve uretra, yağ ve adrenal dokuda anomaliler ve dişi farelerde kısırılık görülmesi bu enzimin organogenez ve ovülasyondaki önemini belirtmektedir [165, 166]. ADAMTS enziminin kalp gelişimi üzerine katılımı, insanlarda kardiyomyopati ve kalp yetmezliğine de neden olabileceğini düşündürmektedir.

1.4.3.1 ADAMTS-2 Geni

ADAMTS ailesine ait ADAMTS-2'nin birincil görevi tip I, II, III ve V prokollojenlerin amino propeptitlerini parçalamamaktır. Bu yüzden "aminoprokollojen peptidaz" olarak tanımlanmıştır [167] ADAMTS-2 proteini, inaktif zimojenler olarak fizyolojik olarak sentezlenir ve N-terminal propeptidi bir proprotein dönüştürücü olan furin ile ayrılır. Bu post-translasyonel modifikasyon, aktivasyonu için gereklidir [168].

ADAMTS-2 eksikliği insanlarda resesif kalıtım gösteren bağ doku hastalığı olan dermatosparaksise (Ehlers–Danlos sendrom tip VIIC) neden olmaktadır [169, 170]. Bu kalıtsal bağ dokusu bozukluğu, yanlış işlenmiş aminoprokollojenin birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkar ve hastalığın temel özelliği aşırı cilt kırılabilirliğidir [167, 171]. ADAMTS-2, kalp dokusu da dâhil olmak üzere çeşitli yetişkin dokularında eksprese edilir ve aynı zamanda çoklu biyolojik süreçlerde yer alır. Akut miyokard enfarktüsü geçiren hastalardan alınan koroner lezyon

örneklerinde ADAMTS-2'nin artmış ekspresyonu gözlemlenmiştir. ADAMTS-2'nin akut miyokard enfarktüsü ve kardiyovasküler hastalık patogeneğinde potansiyel bir rol oynadığını gösterilmiştir [170].

ADAMTS-2'nin *in vivo* ve *in vitro* olarak nükleolin vasıtasıyla anti-anjiyojenik özellikler gösterdiğini ve bunun da hücre zarı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [167]. Akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında nükleolin düzeylerinin belirgin şekilde yükseldiğini ve bu nükleolin aşırı ifadesinin DNA metil transferaz 1'in aşırı ifadesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur [172]. ADAMTS-2, anti-anjiyojenik özelliklerinden ötürü tümör baskılayıcı protein olarak rapor edilmiştir, hematopoietik dokuda farklı bir işlevin gerçekleştirilmesi ve ADAMTS-2'yi içeren kromozomal yeniden düzenlenmesiyle bu işlevin bozulabileceği mümkündür. Propeptid domainini kodlayan 1-3 ADAMTS-2 geni ekzonları der üzerinde tutulurken geriye kalan ADAMTS-2 kodlama ekzonları, TCRD lokusuna der bitişik olarak aktarıldığı ve aşırı eksprese edildiği bulunmuştur. Bu nedenle ADAMTS-2 geninin yeniden düzenlenmesinin aktif bir proteinin üretiminden sorumlu olabileceği düşünülmüştür [168].

Yapılan diğer bir çalışmada IL-6'nın kemik kanser hücresinde ADAMTS-2 genini transkripsiyonel olarak düzenlediği, mRNA ve protein düzeyinde ifadeyi arttırdığı gösterilmiştir [173].

1.4.3.2 ADAMTS-3 Geni

ADAMTS-3, prokollajen II N-propeptidaz aktivitesine sahip protein olarak tanımlanmıştır. Ayrıca ADAMTS-3 proteolitik parçalanma vasıtasıyla VEGF-C'yi aktive edebildiği göstermiştir [174, 175].

ADAMTS-3 ve ADAMTS-2, benzer bir alan yapısı ve % 61'lik bir genel dizi özdeşliği taşımaktadır. İnsan derisi ve deri fibroblastları, ADAMTS-3'ten 30 kat daha yüksek ADAMTS-2 mRNA düzeylerini gösterirken, ADAMTS-3 mRNA, insan kıkırdığındaki ADAMTS-2 mRNA'sından 5 kat daha yüksek bulunmuştur. Hem ADAMTS-2 hem de ADAMTS-3 prokollajen II'yi işlemektedir, ancak ADAMTS-3, kıkırdakta daha çok ifade olmaktadır. *In situ* hibridizasyon (ISH) analizi yapıldığında, ADAMTS-3'un gelişmekte olan fare beyninin belirli bölgelerinde,

kemik ve tendon gibi bağ dokularında da yüksek oranda ekspre edildiği ortaya konmuştur [176].

Ogino ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada ADAMTS-3, serebral korteks ve hipokampusta Reelin'i parçalayan ve pasifleştiren proteaz olarak tanımlanmıştır. ADAMTS-3, embriyonik ve postnatal serebral korteks ve hipokampüsün eksitatör nörönlerinde eksprese edilmektedir. ADAMTS-3 yoksun farelerde Tau fosforilasyonu azalmış ve dendritik dallanma ve uzama artmıştır. ADAMTS-3'ün inhibisyonu Reelin aktivitesini arttırdığını ve şizofreni ve Alzheimer hastalığı gibi nöropsikiyatrik ve nörodejeneratif bozuklukların önlenmesi veya tedavisi için potansiyel bir terapötik strateji olabileceğini önermişlerdir [177].

ADAMTS-3 inaktivasyonu deri ödemi ve karaciğer gelişimi ile embriyonik ölüme yol açmıştır, ancak prokollajen işlemi değişmemiştir. Tek inaktif alleli olan farelerde (ADAMTS-3 +/-) üreme ile ilgili problem olmazken, her iki alleli de inaktif olan farelerde (ADAMTS-3/-) E15.0 embriyonik gelişim periyodunda ölüm gerçekleşmiştir. Embriyonik lenfojeniz ve plasenta anjiyogenezisi için ADAMTS-3 gereklidir. Ayrıca ADAMTS-3, erişkin dönemde kanser ve metastaz yayılımı da dâhil olmak üzere birçok patolojik koşulda görölen anormal lenfojeniz sırasında lenfatik homeostaz ile ilgilidir. ADAMTS-3'ün beyindeki ifadesi ve sinir kök hücrelerinin aktivasyonundaki VEGF-C/VEGF-R3 yolağındaki etkisi, ADAMTS-3'ün nörogenizdeki potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmektedir [174].

ADAMTS-2 geninde yapılan IL-6 alışması doğrultusunda yapılan çalışmada kemik kanser hücrelerinde ADAMTS-3 geninde IL-6 tarafından düzenlendiği ve mRNA ve protein düzeyinde artış sağladığı belirlenmiştir [173].

1.5 Hipoksik Koşullar ve Anjiogenez

1.5.1 Hipoksi ile Uyarılabilir Transkripsiyon Faktörü (HIF) Ailesi

Oksijen (O₂) homeostazı omurgalı yaşamı için çok önemli bir faktördür [178]. Düşük O₂ seviyelerinde hipoksi indükleyici faktör-1 (HIF-1) tarafından anjiogenez, glukoz metabolizması hücre poliferasyonu ve fizyolojik yanıtın

düzenlenmesi ile ilgili pek çok genin transkripsiyonu indükler [178]. Hipoksiya anormal damarlaşmayla birlikte kanser hücrelerinin çoğalması sayesinde tümörün merkezinde oluşur [179]. Hipoksiyanın memeli hücrelerinde HIF-1 tarafından düzenlendiği anlaşılmıştır. [180].

HIF-1'in tetiklediği hedef genler, anjiyogenez, glukoz metabolizması, hücre proliferasyonu, invazyonu ve metastazda rol oynar [181]. HIF hedef genler tarafından kodlanan proteinler, O₂ verimini arttıran ve O₂ tüketimini azaltan proteinler olmak üzere iki belirgin kategoriye ayrılır. Böylece HIF aracılı yollar gelişim, fizyoloji ve hastalıkta kritik hale gelir. Özellikle, insan tümörlerinin büyük çoğunluğu bu gen ürünlerinin aşırı ekspresyonuna sahiptir [181].

1.5.2 HIF-1'in Yapısı

HIF-1 transkripsiyon faktörü, üç hipoksi ile uyarılan alfa alt birimden (HIF-1 α / 2 α / 3 α) biri ve kararlı olarak yapısal olarak eksprese edilen beta alt birimden (HIF-1 β , aril hidrokarbon reseptör nükleer translokatorü (ARNT) olarak da bilinir) oluşan heterodimerdir. HIF-1 α , a basic-helix-loop-helix (bHLH)-PER (Period) ARNT-SIM (single minded) (PAS) süper ailesinin üyesidir ve O₂ ile değişen alt ünitesi hipoksiya da yaygın olarak eksprese olur [182].

HIF-1 α 'nın amino (NH₂) terminal ucunda (amino asit 1-390) DNA bağlanma ve dimerizasyon için gerekli olan basic-helix-loop-helix(bHLH) ve PAS bölgelerini içerir. Öte yandan, karboksi terminal ucu, oksijene bağımlı bozunma domaini (ODDD), inhibe edici domain (ID, transaktivasyon alanlarının negatif regülatörü) ve iki transaktivasyon domaini (N-TAD ve C-TAD) içerir [183]. Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) alanları 17-33 numaralı rezidü (NLS-N) ve 718-721 numaralı rezidü (NLS-C) 'lerde bulunmaktadır [184].

Hipoksi sırasında, N-TAD, HIF-1 α 'yı stabilize ederken C-TAD, HIF-1 α hedef genlerinin CREB-bağlayıcı protein (CBP)/p300 ko-aktivatörü ile birlikte transkripsiyonunu modüle eder [184]. HIF-1 hedef genlerinde heterodimerlerin hipoksiya responsive elemente (HRE, 50-(A/G)CGTG-30 konsensus sekans içerir) bağlanarak, transkripsiyonun aktifleşmesini sağlar [184].

Normoksiyada, HIF-1 α nın ODDD domaininin LXXLAP motifinde bulunan iki prolin amino asidi (P402 ve P564) prolil-4-hidroksilaz (PHDs) tarafından hidroksillenir [185]. PHD enziminin aktivitesi O₂ ye bağımlıdır [186]. ODDD domaininin Lizin-532 amino asidi bir asetil transferaz enzimi, arest defektif 1 (ARD-1) tarafından asetillenir [187]. Bu değişiklikler, 574. pozisyondaki Lösin'de bulunan (L574) bir E3 ubikitin ligaz olan von Hippel-Lindau proteininin (pVHL) β -domainine bağlanarak HIF-1 α alt biriminin 26S proteazomal yıkımına yol açar [188]. HIF-1 α nın 803. Pozisyonundaki asparjin amino asidi (N803) HIF-1 inhibe eden faktör (FIH-1) olan asparjinil hidroksilaz tarafından O₂-bağımlı yolda hidroksillenir. Bu hidroksillenme C-TAD ve CBP/p300 domainleri arasındaki bağlantıyı bloke ederek HIF-1 α tarafından yürütülen gen transkripsiyonu durdurur. Kofaktör olarak askorbat ve Fe₂ gerektirir [189].

1.5.3 HIF-1 Yolağının Düzenlenmesi

Genel olarak, HIF-1 α büyüme faktörü kaskadları ve sinyal yolları ile sentezlenir. Normal O₂ koşulları altında, PHDs aktifleşerek prolil hidroksilazyona sebep olurlar. Böylece of HIF-1' α değrede olur [190]. Hipoksik koşullarda HIF-1 α kararlılığı ve transkripsiyonel aktivitesi birçok yolak ve post_translasyonel modifikasyonlar (hidrosilasyon, asetilasyon, ubikutinilasyon, fosforilasyon, sumolizasyon, S-nitrosation) ile düzenlenir (Şekil 1.5) [191].

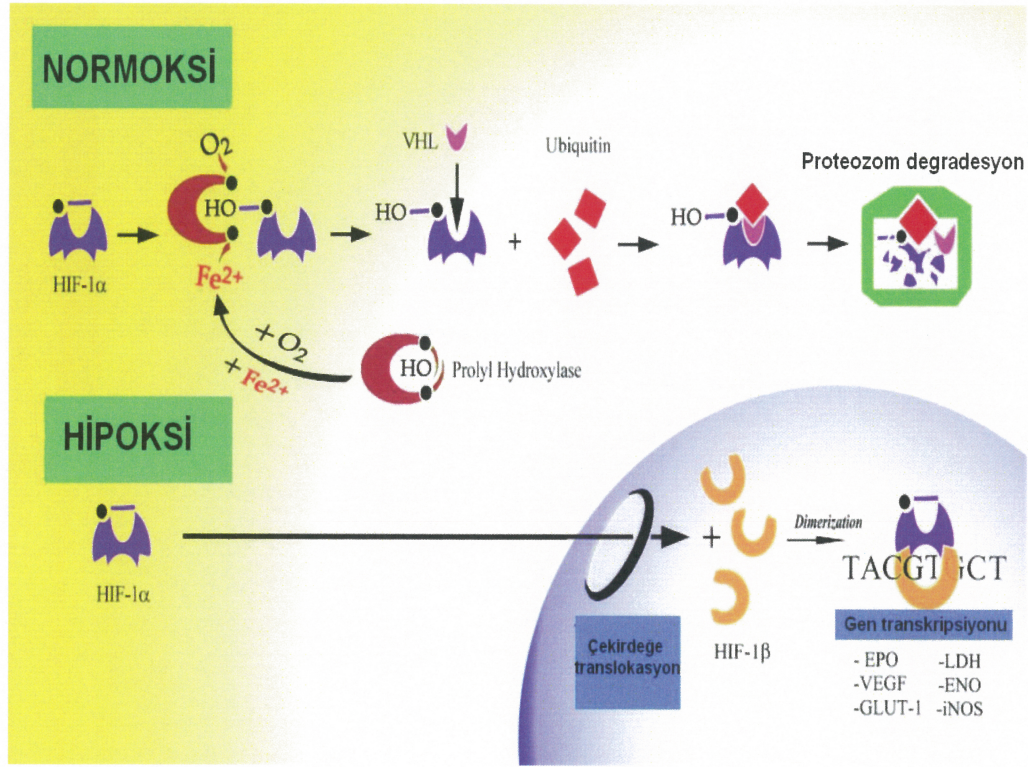
Rapamisininin mekanistik hedefi (mTOR) [192] ve fosfatidil inositol 4,5-bisfosfat-3-kinaz (PI3K) [193]. HIF-1 α translasyonunu arttırabilir. Ek olarak, bazı büyüme faktörleri ile RAS'ı aktive ederek RAS/RAF/MEK/ERK kinaz yolağını stimüle edebilir. Koaktivatör CBP/p300 ERK tarafından fosforile edilir ve HIF-1 α /p300 kompleksinin oluşumu sağlar, böylece HIF-1' α transkripsiyonu aktive olur [192].

Ayrıca, trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF) [194], insülin [195] ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) [196], HIF-1 α translasyonunu indükler.

Strese tepki veren histon deasetilaz ailesi olan sirtuenler DNA onarımını, transkripsiyon metabolizmasını ve metastazı etkilediği bildirilmiştir [197]. Bu nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı enzimler, HIF aktivitesini

düzenleyen bir potansiyel sergilediği bulunmuş ve böylece HIF yanıtları ile hücrel stres arasında ilişki olduğu düşünülmüştür [197]. Hipoksi sırasında, hücrel NAD^+ azalır ve sirtuin-1 (Sirt-1) seviyelerini düşer, HIF-1 α asetilasyonunu artırır ve dolayısıyla HIF-1 α hedef gen ekspresyonunu teşvik eder. Poly (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP1 NAD^+ -bağımlı bir enzimdir ve HIF-1 α trans-aktivasyonu ile etkileşimde bulunup onu teşvik eder [198].

Nitrik oksit (NO) nitrik asit sentetaz (NOS) ekspresyonunu artırır. NOS'un da insan oral skuamöz hücre karsinomunda HIF-1 α protein kararlılığını arttırdığı bulunmuştur [199].



Şekil 1.5: Normoksik ve Hipoksik Şartlarda HIF-1 α [200].

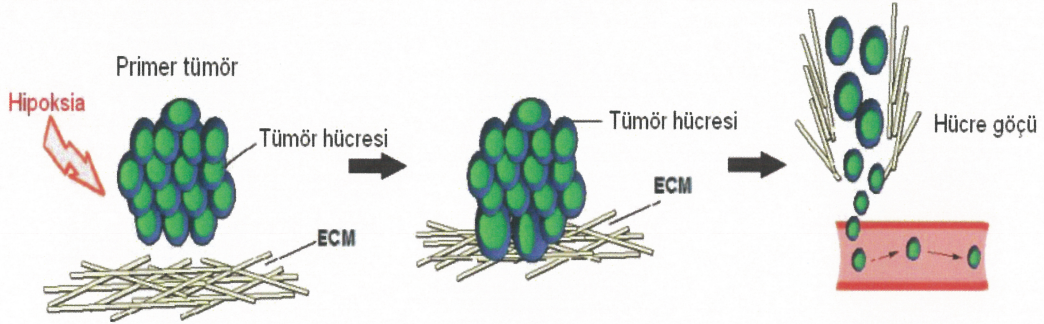
1.5.4 Tümörlerde HIF-1 α

Kanser hücrelerinde, artmış O_2 tüketimiyle ve düşük O_2 verme ve difüzyon nedeniyle hipoksik hale gelir. Yetersiz ve kaotik vaskülarizasyon nedeniyle tümörlerin hücrel O_2 dengesinde yüksek oranda bozulma vardır. Hipoksiya, tümör çevresinin belirgin karakteristik bir özelliğidir ve büyüyen bir tümörün agresivitesini

artırır [201]. Katı tümörlerin yaklaşık % 60'ı , <% 1 O₂'ye sahiptir ve bu da tümör içi hipoksiye yol açar.

Tümör hücreleri, HIF-1 α 'yı görevlendirerek O₂ gerilimindeki bu değişiklikleri engeller. HIF-1 α 'nın upregülasyonu, anjiyogenez, glikoz metabolizması, hücre çoğalması / canlılığı, invazyon ve metastaz gibi birçok önemli kanser özelliklerini harekete geçirir ve tümör sağkalımı ve progresyonunda önemli bir role sahiptir (Şekil 1.6). HIF-1 çeşitli tümör gelişim yollarını düzenler [202]. DNA mikroarray deneyleri ile insanlardaki tüm genlerin % 2'sinden fazlasının HIF-1 tarafından doğrudan veya dolaylı olarak regüle edildiği bulunmuştur.

Klinik ortamda, hastaların biyopsi örneklerinden yapılan immünohistokimyasal (IHC) analizler sonucunda, yaygın insan kanserinde dramatik HIF-1 aşırı ekspresyonu sergilendiği, metastaz ve mortalite oranlarının artmasına yol açtığı görülmüştür.



Şekil 1.6: Hipoksi altında tümör gelişimi [203].

1.5.5 HIF-1 İle Düzenlenen Tümör Anjiyogenezi

Hipoksik tümör mikro ortamındaki anjiyojenik geçiş, artmış O₂ tüketimine ve artmış difüzyon mesafesinin bir sonucu olarak O₂ dağıtımının kısıtlamaya bağlanabilir. Hipoksinin vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) indüklediğinin keşfi, hipoksi ve anjiyogenez arasında önemli bir bağlantı oluşturur [204]. Son zamanlarda, bakırın hepatik ve meme kanseri hücrelerinde HIF-1 α ve VEGF ekspresyonunu indüklediği bildirilmiştir [205]. Pankreas kanserinde, HIF-1 α 'nın aktivasyonuna müdahalesi, VEGF salınımını tetikler ve daha sonra kan

damarlarının oluşumuna müdahale eder [206]. HIF-1 α , anjiyogenezde önemli olduğu için bu yolun susturulması / engellenmesi, hücrelerin invaziv bir fenotip varlığında bile kolonileşme yeteneğini azaltabilir.

HIF-1 α sinyal yolağı, kollajen prozil-4-hidroksilazlar (P4Hs), matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve matriks metaloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP-1) gibi faktörleri düzenler [207].

Hipoksi sırasında birçok miRNA uyarılmaktadır ve bu miRNA'lar anjiyogenezde kritik rol oynamaktadır [208]. MiR-429, tümör hücrelerinde hipoksi öncesi aşamada uyarılır ve HIF-1 mRNA düzeylerini regüle eder [209].

HIF tarafından düzenlenen genlerin stimülasyonu, tümörlerde artmış metastaz ile ilişkilendirilmiştir [209]. HIF izoformlarının invazyon ve metastaz üzerine farklı etkiler gösterdiği rapor edilmiştir [210].

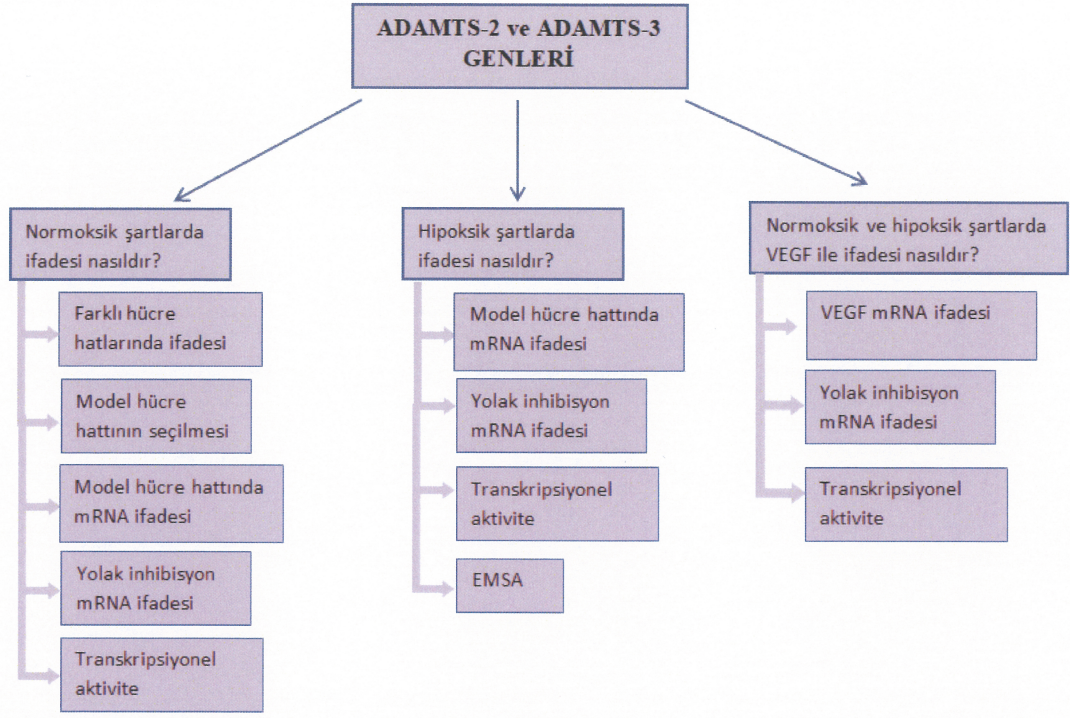
İnvaziv hücrelerin en dikkat çekici özelliklerinden biri, epitelyal hücrelere temasın bozulması, mezenşimal özelliklerin ve hareketliliğin sağlanması ile sembolize edilen epitelyal mezenşimal geçiş (EMT)'dir. HIF-1, birçok EMT düzenleyicisinin ekspresyonunu yönetir ve böylece tümör metastazına katkıda bulunan faktörlerden biri olarak hareket eder. Birçok rapor kanserdeki HIF-1 α ifadesinin invazyonu arttırdığını ve e-kadherin kaybını indüklediğini ortaya koymuştur [211]. Buna ek olarak, HIF-1, TCF3, ZFH1A ve ZFH1B gibi E-kadherin ekspresyonunu bastıran genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu sağlar. Aynı zamanda hücre iskeletini oluşturan ve hücre-hücre yapışmasını sağlayan diğer proteinleri harekete geçirir [212].

Tümör invazyon ve metastazının derecesi, ECM'yi parçalayan ve yeniden şekillendiren MMP ve lizil oksidazın (LOX) HIF-1 tarafından düzenlenen transkripsiyonel aktivasyonuna bağlıdır [213]. Dahası, HIF-1 hedef genleri, kanser hücrelerinin kan damarı içinde dolaşımını teşvik eden VEGF gibi geçirgenlik faktörlerini içerir. Buna ek olarak, salgılanan ANGPT-L4 ve hücre yüzeyi L1 hücre adhezyon molekülü (L1CAM) proteinleri malign hücrelerin metastatik bölgelere ekstrasvazyonuna neden olur [214].

2. TEZİN AMACI

Bu tez çalışmasında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin olası HRE promotor bölgelerinin belirlenmesi ve VEGF sitokininin bu genler üzerinde ki ifadelerinin normoksik ve hipoksik şartlarda saptanması amaç edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda;

- (i) ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin normoksik şartlarda Saos-2, MG63, HUVEC hücre hatlarında endojen mRNA ifadeleri belirlendi. Sonuçlara göre tez kapsamında çalışılacak hücre hattı olarak HUVEC hücre hattı seçildi.
- (ii) VEGF sitokininin normoksik ve hipoksik şartlarda HUVEC hücre hattında endojen mRNA ifadeleri belirlendi.
- (iii) ADAMTS-3 ve ADAMTS-2 promotor parçalarının normoksik ve hipoksik şartlarda transkripsiyonel aktiviteleri transfeksiyon metodu kullanılarak analiz edildi. Hangi promotor parçalarının aktive olduğu saptandı. Bu doğrultuda VEGF sitokini olaya dâhil edildiğinde hangi promotor parçasında artış olduğu belirlendi.
- (iv) Yolak inhibisyon deneyleri ile normoksik ve hipoksik şartlarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinde VEGF sitokininin hangi yolakları kullandığı belirlendi.
- (v) ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin promotor verisinden olası HRE bölgelerine uygun EMSA primerleri dizayn edildi. Saos-2 ve HUVEC hücre hattında ADAMTS-3 ve ADAMTS-2 HRE promotor bölgesine spesifik bağlanma bölgesi belirlemek amacıyla EMSA tekniği kullanıldı.



Şekil 2.1: Tez özeti.

3. MATERYAL METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmaları boyunca kullanılan kimyasal malzemeler bilgi güvenlik formları dikkate alınarak uygun koşullarda muhafaza edildi. Bu kimyasallar kullanım aşamasında kanserojen olma ya da çevreye zarar verebilme durumlarına göre gerekli önlemler alındı. Bu kapsamda kullanılan kimyasal listesi Tablo 3.1, 3.2 ve 3.3’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi.

DNA Çalışmaları İçin Kullanılan Malzemeler	
Agaroz	Sigma
Etidyum Bromür	Sigma
6 x DNA Yükleme Boyası	Thermo Scientific
Taq Polimeraz	Fermentas
1 kb DNA Belirteç	Thermo Scientific
2.5 Mm dNTP mix	Thermo Scientific
MgCl ₂ (25 Mm)	Fermentas
Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Kullanılan Malzemeler	
Filtreli Fetal Sığır Serum (FCS)	Gibco
Dulbecco’s Modified Eagle’s Medyum	Gibco
Sığır Serum Albumini (BSA)	Sigma
Tripan blue solüsyonu	Sigma
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck
Kobalt Klorür (CoCl ₂)	Sigma
Fosfat Tampon Tabletleri (PBS)	Sigma

Tablo 3.2: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi (devamı).

CaCl ₂	Sigma
Steril Falkon	İsolab
EDTA	Sigma
Tris Base	Sigma
Sodyum Klorür	Sigma
25 cm ² ve 75 cm ² 'lik Flask	Corning
10-25 mL'lik Tek Kullanımlık Pipet	Corning
0,22 ve 0,45 Mikron Filtre	Sartorius
Transkripsiyonel Aktivite İçin Kullanılan Malzemeler	
Lusiferaz ve Seap Substratları	Takara Clontech
HEPES	Sigma
Ready-To-Glow Secreted Luciferase Rep. Assay	Takara Clontech
RNA Çalışmaları İçin Kullanılan Malzemeler	
GeneJET™ RNA Purification Kit	Thermo Scientific
Reverse Transkriptaz	Thermo Scientific
%99 Formaldehit	Sigma
2-Merkaptoetanol	Sigma
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma
OligoDT	Fermentas
Ribolock İnhibitörü	Fermentas
SYBR Green PCR Master Mix	Roche
MOPS	Merc
Reaksiyon Tamponu	Fermentas
Yolak İnhibisyon Deneyleri İçin Kullanılan Malzemeler	
Wortmanin İnhibitörü	Cell Signaling
Mek İnhibitörü	Sigma
JNK İnhibitörü	Santacruz
PD169316 İnhibitörü	Sigma

Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan kimyasal malzemelerin listesi (devamı).

Aktinomisin İnhibitörü	Biochemica
Sikloheksamid İnhibitörü	Sigma
DNA-Protein Çalışmaları (EMSA) İçin Kullanılan Malzemeler	
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	NEB
LightShift Chemiluminescent EMSA Kit	Pierce
Naylon Membran	Pierce

3.1.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar kullanım kılavuzları dikkate alınarak kullanılıp rutin olarak bakımları yapılmış ve Tablo 3.4 ve 3.5'de belirtilmiştir.

Tablo 3.4: Çalışmalarda kullanılan cihazlar.

CO ₂ 'li İnkübatör	Nuair
Laminar Air Flow	Telstar BIOII, İspanya
-80 °C Ultralow Freezer	Thermo
Buz Makinası	Fiocchetti Frigoriferi Scientific, İtalya
Etüv	WTB, Almanya, Nüve, Türkiye
Isıtmalı Manyetik Karıştırıcı	Velp Scientific, İspanya
Elektroforez	Apelex, İngiltere
PH Metre	WTW, Almanya
Otoklav	Hirayama, Japonya
Santrifüj	Sigma Laborzentrifugen, Almanya
Sıcak Su Banyosu	Consort, İngiltere
Isı Kontrollü Çalkalamalı İnkübatör	GFL, Almanya
Saf Su Cihazı	Destilasyon 3,1 (Comecta Sa.)
Çalkalamalı İnkübatör	Shel-Lab, Amerika
Buzdolabı	Arçelik, Türkiye

Tablo 3.5: Çalışmalarda kullanılan cihazlar (devamı).

Vorteks	Elektromag, Türkiye
Hassas Terazi	Sartorius, Almanya
Otomatik Pipetler	Thermo
DNA Elektroforezi	Minicell Primo
UVP Jel Görüntüleme	UVP
Mikro Santrifüj	Thermo
PCR	Thermo
Luminometre	Thermo
Elektroforez Güç Kaynağı	Consort, İngiltere
Soğutmalı Santrifüj	Sigma
Light Cycler 485	Roche Diagnostics
RNA Elektroforez	Apelex, İngiltere
μ Drop™ Plate	Thermo, Multiskango

3.2 Metot

3.2.1 Çalışma Ortamı ve Kullanılacak Malzemelerin Sterilizasyonu

Çalışma ortamında bulunan cam malzemeler temiz otoklavı yapılarak 121 °C'de 20 dakika steril edildi. Otoklavlanmış malzemeler 80 °C ısıdaki kurutma cihazında kurutuldu. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan malzemeler periyodik şekillerde, Sodyum Hipoklorit, ticari olarak satın alınan ve % 1 olarak hazırlanarak kullanılan Biocon-A, ve % 70'lik alkol ile steril edildi. Kültür odasında bulunan hepa filtreli klima çalışma süreci boyunca açık konumda kullanıldı. Çalışmaya başlamadan bir saat öncesinde laminar flow açılarak içerisindeki sterilizasyonu sağlandı.

3.2.2 Hücre Kültüründe Kullanılan Metodlar

Hücre kültüründe kullanılan bütün malzemeler her hücre hattı için farklı şekillerde optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra rutin uygulamaya geçirildi.

3.2.2.1 Hücre Kültüründe Kullanılan Malzemelerin Hazırlanması

Malzemelerin hazırlıklarında ticari olarak satıl alınan malzemelerin kullanım klavuzları dikkate alındı. Hazırlanan çözeltilerin hücre kültüründe kullanılacağı için sterilizasyona çok dikkat edildi.

3.2.2.2 FCS İnaktivasyonu ve Sterilizasyonu

Gibco firmasından alınan FCS 56 °C'de bir saat su banyosunda inaktive edildi. Yarım saat oda ısısında bekledikten önerilen büyüklükteki filtre kullanılarak laminar flow içinde küçük hacimlere bölündü ve -20 °C'ye kaldırıldı.

3.2.2.3 Fosfat Tamponu (PBS) Hazırlanması

Sigma firmasından fosfat tableti şeklinde alınarak, önerilen tablet sayısı 250 mL saf su içerisinde çözünerek 120°C'de 20 dakika otoklav yapılarak steril halde kullanıldı.

3.2.2.4 Hücrelerin Büyümesi İçin Besiyer Ortamının Hazırlanması

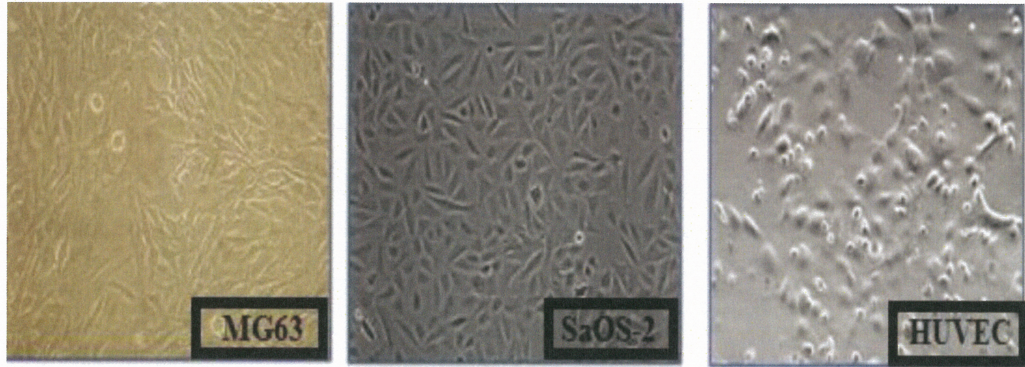
Hücreler, high glukoz DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) ile büyütüldü. Büyütülürken son konsantrasyonu % 1 olacak şekilde antibiyotik (anti-anti) eklendi. Firmadan gelen DMEM içerisinde L-glutamin varlığı ya da yokluğuna göre son konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde L-glutamin eklendi. Hazırlanan DMEM içerisinde hücrelerin büyümesi için % 10 oranında steril FCS ilave edilerek besiyer hazırlandı ve +4 °C'de saklandı.

3.2.2.5 Tripsin-EDTA (TE) Hazırlanması

Tez kapsamında kullanılan hücre hatları yüzeye yapışkan olarak büyüyen hücreler olduklarından hücre büyütülmesi ve deney kurulabilmesi için hücre büyütme için kullanılan flaskların yüzeyinden kaldırılmak zorundadır. Bu kapsamda hücre hücre bağlarını koparmak ve yüzeyden kaldırmak için tripsin EDTA kullanıldı. Bunun için 0.5 MM EDTA, % 0.05 Tripsin ve 1 X PBS içerisinde çözüldü ve otoklav yapıldı. Otoklav işleminden sonra 0.2 µM olan filtreden geçirildi ve küçük hacimlere bölündü. -20 °C’de saklandı.

3.2.2.6 Hücre Kültürü Deneylerinde Kullanılan Hücre Hatları

Tez kapsamında Saos-2 (osteosarkoma), MG63 (osteosarkoma) ve HUVEC (insan umbilikal damar endotel hücre) hücre hatları kullanıldı (Şekil 3.3). Hücre hatları ATCC’den ticari olarak satın alınıp kültür edildi.



Şekil 3.1: Kullanılan Hücre Hatları.

3.2.2.7 Hücre soyunun başlatılması

-80 °C da cryovial tüplerde saklanan hücreler 37 °C sıcaklıktaki su banyosuna alındı ve ısı şoku ile çözülmesi sağlandı. Çözülen hücreler 15 cm’lik falkon içerisine % 10’luk FCS’li DMEM ile alındı ve 1000 rpm’de ve 5 dk boyunca santrifüj edildi. Üstte kalan Üst faz ortamdan uzaklaştırıldı. Kalan pellet FCS’li DMEM ile çözülüp

flaska alındı. Flaska alınan hücreler etiketlenip 37 °C, % 5 CO₂ olan inkübatör cihazına kaldırıldı.

3.2.2.8 Hücrelerin büyüülmesi

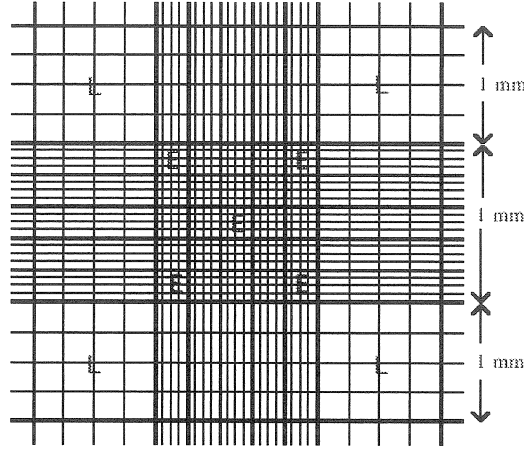
Hücre soyu büyüülürken total hacmi 5 mL olan 25 cm²'lik flasklar kullanıldı. Genel büyüütme ise hacmi 15 mL olan 75 cm²'lik flasklarda yapıldı. Medyum olarak % 10'luk FCS 'li DMEM kullanıldı ve her gün hücrelerin büyüme durumu kontrol edildi. Hücrelerin strese girmemesi için uygun zaman da pasajlama ile hücreler çoğaltıldı.

3.2.2.9 Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler flask yüzeyini % 80 ve üstünü doldurduğu zaman içerisinde bulunan medyum uzaklaştırıldı ve PBS ile yıkama yapıldı. 75 cm²'lik flask için 3 mL, 25 cm²'lik flask için 1 mL Tripsin-EDTA (TE) ile hücreler muamele edilip tutunduğu flask yüzeyinden kaldırıldı ve % 1 antibiyotik ve % 10 FCS içeren DMEM eklenerek hücreler toplandı. 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırılıp pelet medyum ile çözdürüldü ve flasklara ekildi. Etiketlenip inkübatöre kaldırıldı.

3.2.2.10 Canlı Hücrelerin Analizi (Tiripan Mavisi Boyama)

Canlı hücre ve ölü hücreleri ayırt etmekte kullanılan hemositometre, üstünde 25 eşit küçük kareye ayrılmış, 1 mm² alan, 0,1 mm derinliği olan bir lamdır (Şekil 3.2). 20 mL DMEM ile homojen olarak çözülen hücreden yine iyice pipetaj yapıp 1 mL ayrıldı ve bu 1 mL hücreden, 10 µL hücre alınarak eşit hacimde trypan blue (1:1 seyreltme oranında) ile boyandı. Ölü hücreler mavi renk boyandı ve geri kalan canlı hücrelerin sayımı yapıldı. Sayımdan sonra hemositometre formülü ile 1 mL de ki hücre sayısı hesaplandı. Daha sonra total hacimde bulunan hücre sayısına çarpılarak elde bulunan hücrelerin sayısına ulaşıldı.



Şekil 3.2: Hemositometre

Hemositometre ile toplam hücre sayısı aşağıdaki formülle bulundu:

$$\text{Total canlı hücre sayısı/mL} = \text{Sayılan hücre sayısı} \times 2 \times 10^4$$

3.2.2.11 Hücrelerin -80 °C’de Saklanması

Hücreler flask yüzeyini % 80-90 oranında dolduktan sonra medyumunu uzaklaştırıldı ve soğuk PBS ile 2 kere yıkandı. Tripsin edta ile tripsinizasyon yapıldı ve hücrelerin zarar görmemesi için TE ile süresi çok iyi kontrol edilerek FCS’li DMEM ile inaktive edilip bütün medyum toplandı ve 15 mL hacimli falkona aktarıldı. 1000 rpm’de ve 5 dk boyunca santrifüj ile hücreler çöktürüldü. Üst faz uzaklaştırıldı. Pellet 100 µL DMSO ve 900 µL FCS ile homojen bir şekilde çözüldü ve cryovial tüplerde etiketlenerek -80 °C’de saklandı.

3.2.2.12 Hücre Kültüründe Yapılacak Deneylerin Dizayını

Hücre kültüründe hücreler kültür edildikten sonra sağlık durumları kontrol edilerek Bölüm 3.2.2.5’de anlatıldığı gibi hücrelerin sayımı yapıldı.

Normoksi deney planı için son hacmi 5 mL DMEM ve 2.000.000 hücre olacak şekilde 25 cm²’lik flaslara hücreler ekildi ve inkübatöre kaldırıldı. İnkübe

olan hücreler ertesi sabah BSA'lı DMEM'e alındı. 1 saat BSA'lı DMEM'de kalan hücrelere kontrol grubu dışında 20 ng/mL olacak şekilde VEGF uygulandı. Planlanan saat dilimlerinde pelletler alındı.

Hipoksi deney planı için yine aynı şekilde hücreler sayılıp ekim yapıldı. BSA'lı DMEM'e alınan hücrelere 1 saat sonra son konsantrasyonu 150 µM CoCl₂ uygulandı. 45 dk inkübe olan hücrelere kontrol grubu dışında 20 ng/mL VEGF uygulandı.

Yolak inhibisyon deney planı için ise, BSA'lı DMEM'e alınan hücreler 1 saat sonunda son konsantrasyonlarına dikkat edilerek inhibitörler uygulandı. 45 dk sonra ise 20 ng/mL VEGF uygulandı. Bunun yanı sıra hipoksi yolak inhibisyon deney olanı için ise BSA'lı DMEM'e alındıktan sonra sırasıyla 45 dk arayla CoCl₂, inhibitör, VEGF uygulandı.

3.2.3 RNA İle İlgili Metodlar

RNA çalışmalarında kullanılacak olan tamponların tamamı RNAz içermeyen su ile hazırlandı. Kullanılan suyun RNAz'dan arındırılması gerekir ve bunu da 1 mL Dietilpirokarbonat (DEPC)'ın 999 mL dH₂O'da çözülüp 37 °C'de 12 saat bekletildikten sonra 121 °C'de 20 dakika otoklavlanarak sağlandı.

3.2.3.1 Hücre Peletlerinden RNA İzolasyonu

Ortam RNAz kontaminasyonu yaşamamak için DEPC'li dH₂O ile temizlendi. Kullanılan pipetlerin RNAz uzaklaştırılmış olmasına dikkat edildi. Pellet halinde -80 °C saklanan deney ürünleri RNA izolasyonları için buz üzerinde çalışılmasına dikkat edildi ve ilk olarak peletler PBS tamponu ile çözüldü. GeneJET RNA izolasyon kiti (Thermo Scientific) protokolünde önerildiği şekilde RNA izolasyonu yapıldı ve -80 °C'de uzun vadeli saklandı.

3.2.3.2 RNA Miktar Tayini

İzolasyonu yapılan RNA örneklerinin miktarları ve saflıklarının tayini için spektrofotometre ve μ Drop™ Plate (Thermo, Multiskango) ölçümü alındı. Spektrofotometre yönteminde kör değer için 200 μ L dH₂O, RNA ölçümleri için 195 μ L dH₂O ve ilgili RNA konuldu. Saptanan saflıklarının ve absorbans değerleri değerlendirilmesi için formüller aşağıda belirtildi.

$$\text{DNA miktarı} = A_{260} \times 40 \times 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$\text{Saflık} = A_{260} / A_{280}$$

Analizler için kullanılan örneğin miktarı oldukça az olabilir bu yüzden μ Drop™ Plate gibi bir cihaz mikrolitre bazında sonuçlar için kullanışlıdır. Normal küvette ışık yolu 10 mm kabul edilirken, daha küçük hacimin sahip olduğu alanın daha az olması sebebiyle microdrop'ta ışık yolu 0.49 mm'dir. μ Drop™ Plate'e 2 μ L'lik DNA örneği direk seyreltilmeden konulur. Işık yolunun daha kısa olması sebebiyle konsantrasyon hesabı yapılırken şu formül kullanılır:

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = \text{Abs}_{260} \times 50 \mu\text{g/mL} \times (10 \text{ mm}/0.49 \text{ mm})$$

3.2.3.3 RNA Jel Elektroforezi

Jel dökülmeden önce tüm elektroforez tankı ve aparatları % 1'lik SDS ile muamele edildikten sonra DEPC'li su ile bekletildi. Sonra saf etanol ile yıkandı ve etüve kaldırıp kuruması beklendi. 0.5 g agaroz, 5 mL 10 X FA jel tampon (Tablo 3.6) ve 45 mL DEPC'li su mikrodalga fırında kaynatıldı. Üzerindeki buhar çıkması bittiğinde 900 μ l formaldehit ve 1 μ L etidyum bromür eklenerek tanka döküldü. Jelin donması beklendi. Tankı 1 X FA jel tamponu dolduruldu (Tablo 3.7). Kaset tankı yerleştirildi. 3 μ L RNA örneği ve 3 μ L 2 X yükleme boyası ile boyandı ve jele yüklenme yapılmadan önce 70 °C'de 10 dk ısı ile denatüre edilip daha sonra 10 dk buzda bekletildi. Örnekler jele yüklenerek 90 V yürütüldü. Elektroforez sonucunda agaroz jel UV ışığı altında değerlendirildi.

Tablo 3.6: 10 X FA agaroz jel elektroforezi jel tamponu.

10 X FA jel tamponu	Stok Sol.	Son Konsant. (10X)
MOPS (Ph:7)	1 M	0,2 M
EDTA (Ph:8)	0.5 M	0.05 M
NaAc	1 M	0,01 M
Hazırlanan çözelti DEPC'li dH ₂ O ile hazırlanıp pH:7.0 olarak dengelendikten sonra steril edilir.		

Tablo 3.7: 1 X FA jel elektroforez tankı için hazırlanan tampon.

FA Tank Tamponu	Son Konsantrasyon
10 X FA Jel tamponu	1 X
% 37'lik (12.3 M) Formaldehit	0.25 M
DEPC'li dH ₂ O	1 L'ye tamamlanır.

3.2.3.4 Komplementer DNA Eldesi (RT-PCR)

RNA örneklerinden miktarları belirlendikten sonra 1000 ng olacak şekilde RNA kalıbı kullanılarak RT-PCR yapıldı. RT-PCR aşağıdaki tabloya uygun olarak her deney grubu için yapıldı. RT-PCR sıcaklık ve süre bakımından iki farklı basamak olarak yapıldı. İlk basamakta reverse transkriptaz (RT) enzimi kullanılarak cDNA sentezlenmesi gerçekleştirildi. Tablo 3.8'de reaksiyon koşulları belirtilen şekilde yapıldı. Yapılan cDNA'ların 1 µL'si kullanılarak ikinci basamakta human β-2 mikroglobulin primerleriyle kontrol PCR reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: RT-PCR koşulları.

Reaksiyon Bileşenleri	Son konsantrasyon
RNA kalıp	1000 ng
OligodT	1 µL
Steril H ₂ O	x
65 C'de 5 dakika	
5X Reaksiyon tamponu	1 x
Ribolock RNAz inhibitör	20 U/µL
dNTP mix	1 mM
Revers Transkriptaz	10 U/µL
Son hacim	20 µL
42 °C'de 60 dakika	
70 °C'de 10 dakika	

3.2.3.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA eldesinden sonra human β -2 mikroglobilin primerleri ile cDNA kontrolü için Tablo 3.9'da gösterilen reaksiyon oluşturuldu. Optimize edilmiş reaksiyon basamaklarıyla PCR cihazı çalıştırıldı.

Tablo 3.9: Polimeraz zincir reaksiyon koşulları.

β -2 mikroglobilin	Örnek	N.K	P.K
cDNA Kalıp	1 µL	-	1 µL
Taq Tamponu	5 µL	5 µL	5 µL
MgCl ₂	4 µL	4 µL	4 µL
İleri Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Geri Primer	1 µL	1 µL	1 µL
Taq Polimeraz	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
dH ₂ O	37.5 µL	38.5 µL	37.5 µL
Son Hacim	50 µL	50 µL	50 µL

3.2.3.6 Agaroz Jel Elektrofrezisi

Deney planlarının kapsamında yapılan PCR reaksiyonunun görüntülenmesi amacıyla %1'lik Agaroz jel hazırlandı. Jel dökülecek tanka, tank tarakları ve lastikleri takıldı. Daha sonra agaroz jel için ticari olarak satın alınan Agaroz 0.75 g tartıldı ve 75 mL 0.5 X TBE tamponu ile karıştırılarak kaynatıldı ve homojen olması sağlandı. Oda ısısında geldiğinde içerisine son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde Et-Br eklendi. İyi karışması sağlandıktan sonra jel tankına döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Örnekler yükleme boyasıyla boyandı ve kuyucuklara yüklendi (Kullanılan bileşikler ve kullanım koşulları Tablo 3.10'da belirtildi). 90 V'da 40 dk yürütülüp görüntü alındı.

Tablo 3.10: Agaroz jel elektrofrezinde kullanılan solüsyonlar.

DNA Büyüklük Belirteci	100 µL DNA büyüklük belirteci, 200 µL Yükleme boyası ve 200 µL dH ₂ O'da çözülerek hazırlandı.
Etidyum Bromür Stok Solüsyonu	Ticari olarak satın alındıktan sonra son konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde dH ₂ O ile çözülerek hazırlandı ve ışık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklandı.
5X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu	54 g Tris Base, 20 mL 0.5 M EDTA ve 27.5 g Borik Asit, tartıldı. Üzeri dH ₂ O ile 1 L'ye tamamlandı ve pH 8.00 ayarlandı. 121 °C'de 20 dk otoklav yapıldı.
0.5 X TBE Tamponu	5 X TBE tamponu 10 kat sulandırılarak pH'sı ayarlanıp otoklavlandı.

3.2.3.7 Real Time PCR

Light Cycler 485 (Roche Diagnostic) kullanılarak Real time PCR çalışmaları yapıldı. 10 µL son hacimde olan reaksiyon 5 µL SYBR® Green PCR Master Mix, 100 ng/µL'lik ileri ve geri primerleri stoğundan 0.5'er µL, 3 µL dH₂O ve 1 µL cDNA kullanılarak yapıldı. Buna göre üç tekrarlı olarak her bir cDNA için ADAMTS-2, ADAMTS-3, HIF1 alfa ve İnsan β-2 Mikroglobilin genleri için analiz yapıldı. İnsan β-2 Mikroglobilin geni analizde sonuçların normalizasyonunu sağlamak amacıyla kullanıldı. Döngü koşulları Tablo 3.12'da ve primer dizileri Tablo 3.11'de belirtilmektedir.

Tablo 3.11: Kullanılan ekspresyon primerleri.

H β -2 ileri	5' TTTCTGGCCTGGAGGCTATC 3'
H β -2 geri	5' CATGTCTCGATCCCACTTAACT 3'
HIF-1α ileri	5' CCACCTATGACCTGCTTGGT 3'
HIF-1α geri	5' TGTCCTGTGGTGACTIONTGTCC 3'
ADAMTS-2 ileri	5' CTGTGGCGACGAGGTGCG 3'
ADAMTS-2 geri	5' GGTGCACACATAGTCCCGTCC 3'
ADAMTS-3 ileri	5' GGAACACTGCACCAAAACCT 3'
ADAMTS-3 geri	5' TGTCTCCCAAACATGGTTCA 3'

Tablo 3.12: Real time PCR döngü koşulları.

Basamak	Döngü	Tm	Süre
1	1	95°C	10 dk
2	35	95°C	10 sn
		55°C	15 sn
		72°C	10 sn
3	1	72°C	1 dk

3.2.3.8 Sonuçların Analiz Edilmesi

Livak metoduna göre Real Time PCR sonuçları danieliz edildi [154]. ADAMTS2, ADAMTS-3, HIF-1 α için elde edilen Ct değerleri, normalizatör olarak kullanılan insan β -2 Mikroglobulin'nin Ct ortalamasından çıkarıldı. Çıkarılan sonucun kuvveti 2 tabanın alındı. Sitokin uygulananmamış kontrol grupları '1' birim olarak belirlendi. Deney grupları bu sitokin uygulanmamış kontrol gruplarının değerine bölündü ve bu bölüm sonucunda 1'in katı şeklinde sonuçlar elde edildi. İstatistiksel analizler MiniTab14 (One Way ANOVA) ile gerçekleştirildi. $p \leq 0.05$ ve $p \leq 0.01-0.001$ olduğu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.2.4 Transkripsiyonel Aktivitenin Analiz Edilmesi İle İlgili Metodlar

3.2.4.1 Kalsiyum Klorür Presipitasyonu Kullanılarak Yapılan Geçici Transfeksiyon

Hücreler sağlık durumları kontrol edilerek en geç pasaj 5 de 12 kuyucuklu plakalara her kuyuda 250.000 hücre olarak şekilde ekildi ve bir gece inkübe edildi. 45 μ L son hacim olacak şekilde hesaplar yapılarak 2 mM CaCl₂ transfekte edilecek DNA parçasıyla reaksiyona sokuldu. Bu karışıma son konsantrasyonu 45 μ L olacak şekilde 2 X HEPES pipet yardımıyla ilk oluşturulan reaksiyona eklendi. 2 X HEPES eklenirken pastör pipetinin yardımıyla hava kabarcıkları oluşturuldu. Daha sonra iyice pipetaj yapıldı ve 1 saat presipitasyon oluşması için beklendi. 1 saat sonunda presipitasyon oluşumu kontrol edilerek endorf içinden 90 μ L her kuyuya pipet yardımıyla damlatıldı. Plaka hafif bir şekilde hareket ettirilerek damlatılan karışımın yayılması sağlandı ve plakalar 24 saat inkübatörde bekletildi.

24 saat sonunda plakada ki her kuyu önce PBS ile yıkandı. Yıkanan kuyulara son hacim 1mL olacak şekilde BSA'lı DMEM eklendi. 1 saat inkübatörde bekletildi. 1 saat bekleyen plakalar çıkarılıp 20 ng/mL VEGF uygulandı. 48 ve 72 saat inkübe olan örnekler salınan alkalin fosfat ve lusiferaz aktivitesi luminometre cihazı ile analiz edildi.

Tablo 3.13: CaCl₂ geçici transfeksiyonu için kullanılan solüsyonlar.

2 X HEPES	29.4 g CaCl ₂ , 100 mL dH ₂ O ile hazırlandı. Otoklavlanıp filtreden geçirildi. +4 °C de saklandı.
2 Mm CaCl₂	3.2 g NaCl, 0,08 g Na ₂ HPO ₄ , 2.6 g HEPES 200 mL dH ₂ O ile hazırlandı. pH 7.05-7.12 arasına getirildi ve otoklavlandı. Filtreden geçirilerek -20 °C de saklandı.

3.2.4.2 Salınan Sistem Lusiferaz Aktivitesinin Analizi

Transfeksiyon deneylerinin kurulduğu 12 kuyucuklu plakalardan 48 ve 72 saat sonunda etiketlemeye dikkat edilerek 100 µL medyum ependorflara alındı. Her kuyu için ayrı ayrı alınan bu ependorflardan 10 µL, 384 kuyucuklu plakaya eklendi. Ticari olarak satın alınan kitin içindeki 10 X Lusiferaz substrat, 1 X Reaksiyon tamponu ile sulandırılıp kullanıldı. 384 kuyucuklu plakalara eklenen medyum üzerine 1 µL eklenerek zaman kaybeden luminometre ile analiz edildi.

3.2.4.3 SEAP (Salınan Alkalın Fosfataz) Aktivitesinin Analizi

Her kuyu için ayrı ayrı alınan medyum örneklerinden 384 kuyucuklu plakaya 5µL olacak şekilde eklendi. 5 X dilisyon tamponun protokülün önerdiği şekilde 1 X'e sulandırılıp her kuyuya 15 µL uygulandı. Plaka alüminyum folyo ile su kaçmayacak şekilde iyice sarılıp su banyosunda 65 °C'de 30 dakika bekletildi. Bu süre bittikten sonra oda ısısına gelmesi beklendi. Daha sonra SEAP substrat solüsyonundan her kuyuya 20 µL eklendi ve 30 dakika oda ısısında bekletilip bu süre sonunda luminometre ile analiz edildi.

3.2.5 Yolak İnhibisyon Analiz Metodu

İnhibisyon deneyleri için 25 cm²'lik flaslara 2.000.000 hücre olarak şekilde ekim yapıldı. 1 gece inkübe edilen hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra her flaska 5 mL BSA'lı DMEM eklendi. 1 saat sonra inhibitörler uygulandı. İnhibitör uygulamasından 45 dakika sonra 20 ng/mL VEGF uygulandı. 6 saat sonra hücre peletleri alındı. Daha sonra RNA izolasyonu ve RT-PCR yapıldı. Tablo 3.14'de belirtildiği gibi inhibitörler kullanıldı.

Tablo 3.14: Deney kapsamında kullanılan inhibitörler.

İnhibitör	Son konsantrasyon	Özelliği
Wortmanin	1 µM	PI3K İnhibitörü
JNK (SP600125)	20 µM	Jun N Terminal Kinaz İnhibitörü
PD169316 (TGF-VEGF)	10 µM	p38 Map-kinaz İnhibitörü

3.2.6 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) Metodu

EMSA protein ve nükleik asitlerin kompleks oluşturmalarını analiz etmek için kullanılan bir yöntemdir. Nitel ve nicel olarak analiz yapılmaktadır. Protein-nükleik asit kompleksinin nükleik asitlere göre denatüre olmayan jelde hızlarının yavaşlığı tekniğin temelini oluşturmaktadır [215].

Tablo 3.15: Nükleer ekstrakt elde etmesinde kullanılan çözeltiler.

Solüsyon	Hazırlanışı
Tampon A	10 mM HEPES (pH: 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM PMSF, 0.5mM DTT
Tampon C	20 mM HEPES (pH: 7.9), 420 mM NaCl, 11.5 mM MgCl ₂ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF
TEN	40 mM Tris-Cl (pH: 7.5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl

3.2.6.1 Hücre Hattından Nükleer Ekstratlarının Çıkarılması

Normoksi ve hipoksi şartlar oluşturulmuş 75 cm²'lik flasklarda hücreler büyütüldü. Sağlıkları kontrol edildi. Flask yüzeyi iki defa soğuk PBS ile muamele edilerek DMEM tamamen uzaklaştırmak amaçlı yıkandı. Daha sonra 3 mL taze hazırlanmış TEN Tampon eklenerek 5-10 dakika hücrelerin kalkma durumuna göre buzda bekletildi (Tablo 3.15). Bekleme sonunda hücreler hücre kazıyıcı ile flaskta tutunan hiçbir hücre kalmayacak şekilde kaldırıldı ve 2 mL'lik ependorflara alındı. +4 °C'de 15.000 rpm'de 20 saniye santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı ve alttaki pelet 1,5 mL soğuk PBS ile çözdürüldü. +4 °C'de 15.000 rpm'de ve 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst faz uzaklaştırıldı. Ependorfta kalan pelet 50 µL A tamponu ilave edilerek pipetaj yapıldı ve 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Süre sonunda süspanse halinde olan karışım insülin iğnesiyle olabildiğince iyice liziz olması sağlandı. Elde edilen lizat +4 °C'de 15.000 rpm'de ve 20 saniye boyunca santrifüj edildi. Elde edilen pelete 60 µL C tamponu eklenerek köpük benzeri bir yapı oluşturana kadar pipetaj yapıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. Daha sonra +4 °C'de 15.000 rpm'de ve 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst faz kısmı 20 µL olacak şekilde ependorflara paylaştırıldı ve -80 °C'ye kaldırıldı.

3.2.6.2 Oligonükleotitlerin İşaretlenmesi

Oligonükleotitlerin işaretlenmesinde HRE bölgeleri için tasarlanan EMSA primerleri NEB'in protokolüne göre TdT enzimi kullanılarak biyotinlendi (Tablo 3.16).

Tablo 3.16: Oligonükleotitlerin işaretlenmesinde kullanılan bileşikler.

İçeriği	Son Konsantrasyon	Hacim
CoCl ₂	2.5 mM	5 µL
DNA	5 pmol	2.5 µL
Terminal Transferaz	20 U/µL	0.5 µL
TdT Tampon	10 X	5 µL
Biotin-11-UTP	5 µM	2.5 µL
dH ₂ O	-	34.5 µL
Son Hacim	-	50 mL

3.2.6.3 Oligonükleotitlerin Bağlanması

Oligonükleotitlerin bağlanma reaksiyonunda HRE bölgesi için tasarlanan primerlerin hem biyotinli hemde biyotinsiz olarak bağlanması ayrıca transkripsiyon faktörü olarak kullanılan HIF-1 α primerinin biyotinsiz olarak bağlanması 95 °C'de 5 dakika daha sonra oda ısısında 2 saat bekletilerek gerçekleştirildi.

3.2.6.4 Bağlanma Reaksiyonunun Kurulması ve EMSA Jeline Yükleme Yapılması

Tablo 3.17'da belirtildiği gibi % 6'lık EMSA jeli hazırlanıp 1 gece 5 X TBE tamponu içerisinde bekletildi. Ertesi sabah Tablo 3.18'da belirtilen bağlanma reaksiyonu kurularak 90 dakika oda ısısında bekletildi. Bu bekleme sürecinde jel 100 V'da 1 saat ön yürütme yapıldı ve iyon dengesiyle beraber porların iyice açılması sağlandı. Süre sonunda oda ısısında bekleyen örnekler DNA yükleme boyasıyla boyanarak jele yüklendi ve 100 V'da önerilen yere kadar yürütüldü.

Tablo 3.17: % 6'lık EMSA jeli bileşenleri.

Bileşenler	Son Konsantrasyon
% 50'lik Gliserol	% 4
5 X TBE Tamponu	0.5 X
TEMED	% 0.001
% 10 Amonyum Persülfat	% 0.1
% 40 Poli-Akrilamid	% 6
dH ₂ O	4404 µL
Son Hacim	6000 µL

Tablo 3.18: EMSA bağlanma reaksiyon bileşikleri.

Bileşenler	Reaksiyonlar		Son Konsantrasyon
	Serbest R.	Yarışma R.	
Distile dH ₂ O	X µL	X µL	-
KCl	1 µL	1 µL	40 mM
EDTA	1 µL	1 µL	0.1 mM
Nükleer Ekstrat	X	X	Konsantrasyona bağlı
10 X Bağlanma Tamponu	2 µL	2 µL	1 X
1 µg/µL Poly-dIdC	3 µL	3 µL	50 ng/µL
Prob	2 µL	2 µL	20 fmol/µL
Transkripsiyon Faktörü	-	6µL	100 pmol/µL
Son Hacim	20 µL	20 µL	-

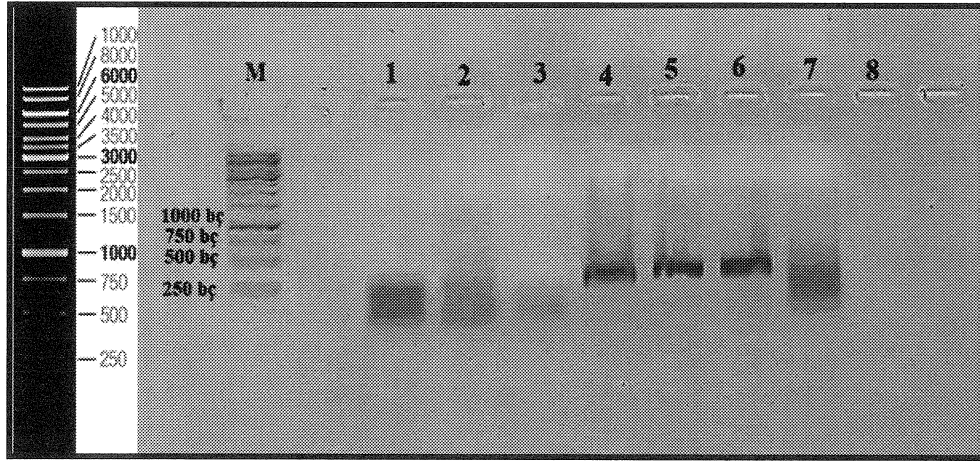
3.2.6.5 Proteinlerin Membran Üzerine Transfer İşlemi

Jelde örneklerin yürümesi tamamlandıktan sonra membran üzerine transfer işlemi gerçekleştirildi. Bu işlemde naylon membran kullanıldı. Membran 8 X 10 cm büyüklüğünde kesildi ve 10 dakika 0.5 X TBE tamponunda ıslatıldı. Bu ıslatılma sırasında transferde kullanılacak olan sünger ve kurutma kâğıtları da ayrı bir yerde aynı tampon ile ıslatıldı. Süre sonunda kasetim eksi yönünden başlamak şartıyla 1-sünger, 2-kurutma kâğıdı, 3- jel, 4-membran, 5-kurutma kâğıdı, 6-sünger olacak şekilde sandviç hazırlandı ve kaset sıkıca kapatıldı. Tankın içine soğuk transfer tamponu eklenerek +4 °C'de 100 V'da 1 buçuk saat bekletildi. Süre bittikten sonra Cross-Link dediğimiz UV ışığı altında DNA'nın membrana sıkıca bağlanmasını sağlayan işlem membranı streç filme içinde eser miktarda tampon ile 15 dakika yapıldı. Bu süre sonunda ticari olarak satın alınan Thermo markalı Kemoluminans nükleik asit belirleme modülü kitinin önerdiği protokole göre bloklama, yıkama ve dengeleme işlemleri yapılarak membran karanlık odada filme basıldı.

4. BULGULAR

4.1 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Ekspresyon Primerleriyle Isı Gradiyent Optimizasyonu

mRNA ekspresyon çalışmaları için, kullanılacak ADAMTS-2, ADAMTS-3 genlerine ait ekspresyon primerleri ile ısı gradiyent optimizasyonu yapıldı (Şekil 4.1). Bunun için HUVEC hücre hattından elde edilmiş cDNA kullanıldı. PCR optimizasyonu sonrasında primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarının 55 °C olduğu tespit edildi.



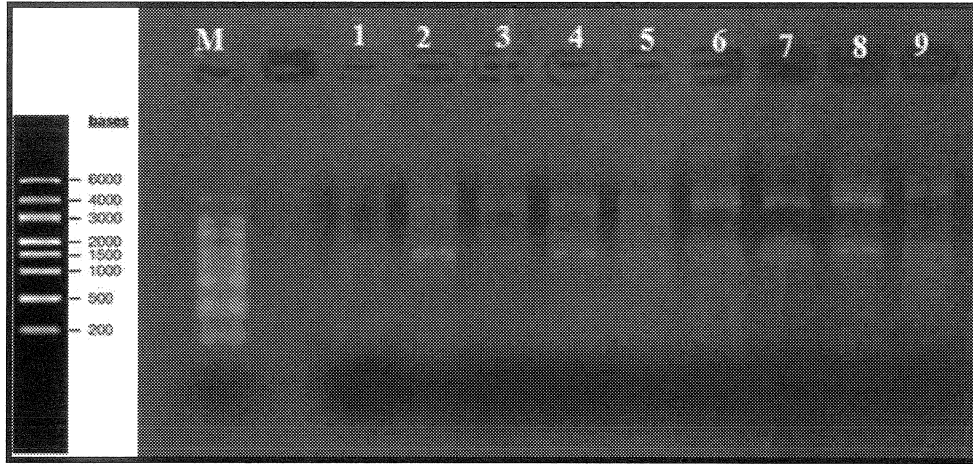
Şekil 4.1: ADAMTS2 ve ADAMTS3 genlerinin PCR jel görüntüsü.

M: 1kb DNA belirteci **1:** 65°C ADAMTS2 **2:** 65°C ADAMTS3 **3:** 60°C ADAMTS2 **4:** 60°C ADAMTS3 **5:** 55°C ADAMTS2 **6:** 55°C ADAMTS3 **7:** Pozitif Kontrol (hB2) **8:** Negatif Kontrol

4.2 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Farklı Hücre Hatlarında mRNA İfadelerinin Belirlenmesi

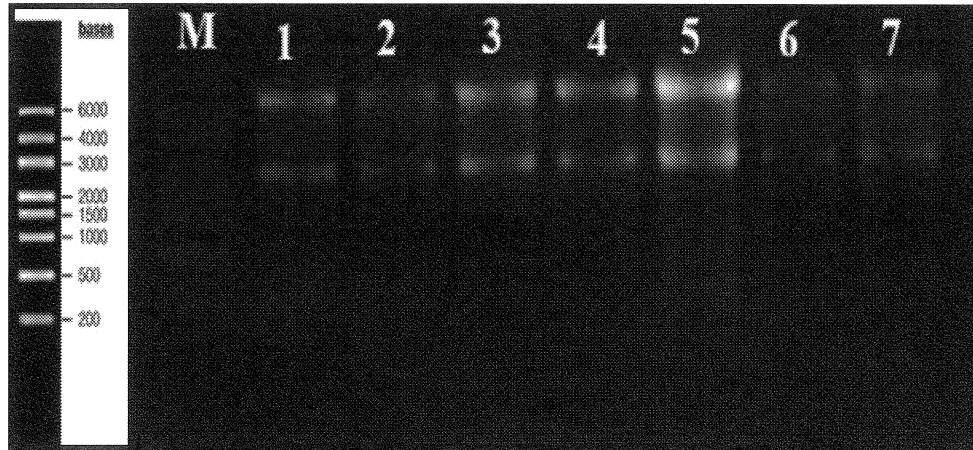
Çalışma amacıyla seçilen Saos-2, MG63 ve HUVEC hücre hatlarıyla Bölüm 3.2.2.12'de belirtildiği gibi hücreler sayılarak eşit oranda deney kuruldu. Bölüm 3.2.3.1' de anlatıldığı gibi RNA izolasyonu yapıldı ve Bölüm 3.2.3.2'de anlatıldığı

gibi miktar tayini yapıldı. Bölüm 3.2.3.3'deki RNA elektroforez tekniği ile RNA'lar kontrol edildi (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4). Bölüm 3.2.3.4'deki gibi cDNA hazırlandı ve Bölüm 3.2.3.5'de anlatılan ve normalizasyon primeri olan human β -2 mikroglobulin geninin ekspresyon primeri ile PCR yöntemi kullanılarak cDNA'lar kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezinde PCR ürünü yüklenerek, görüntülenmiştir. Bu tekniği yapmamızın amacı, elde edilen cDNA ların kalitesinin kontrolüdür. Temsili olarak, deney düzeneğindeki cDNA lar Şekil 4.5'de gösterilmiştir.



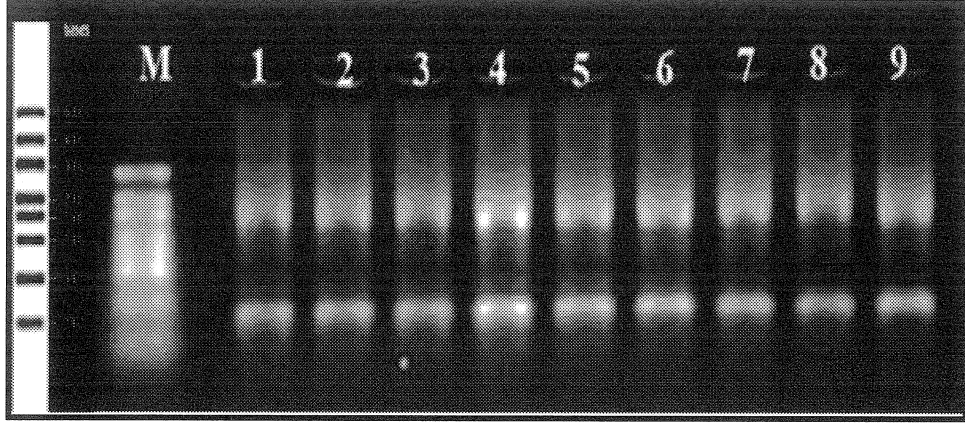
Şekil 4.2: MG63 hücre hattına ait RNA örnekleri.

M: RNA belirteci 1-3: Kontrol Grubu RNA 4: 1 saat grubu RNA 5: 3 saat grubu RNA 6: 6 saat grubu RNA 7: 24 saat grubu RNA 8: 48 saat grubu RNA 9: 72 saat grubu RNA



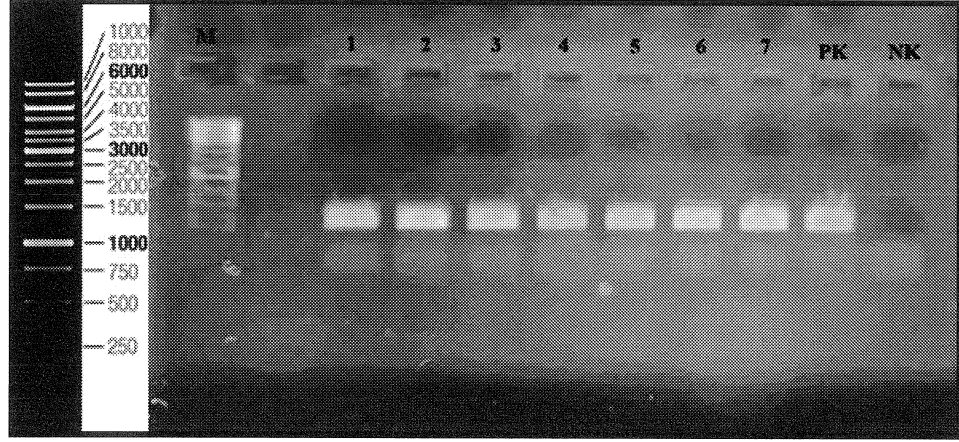
Şekil 4.3: Saos-2 hücre hattına ait RNA örnekleri.

M: RNA belirteci 1: Kontrol Grubu RNA 2: 1 saat grubu RNA 3: 3 saat grubu RNA 4: 6 saat grubu RNA 5: 24 saat grubu RNA 6: 48 saat grubu RNA 7: 72 saat grubu RNA



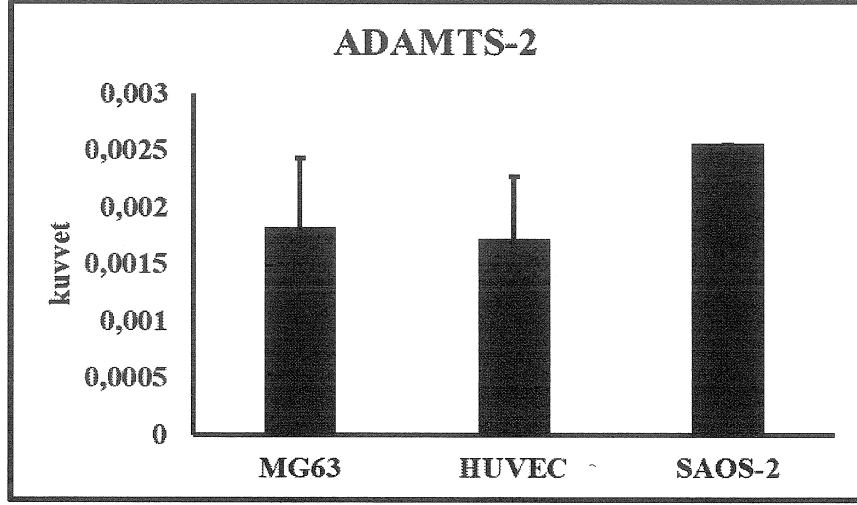
Şekil 4.4: HUVEC hücre hattına ait RNA örnekleri.

M: RNA belirteci **1-3:** Kontrol Grubu RNA **4:** 1 saat grubu RNA **5:** 3 saat grubu RNA **6:** 6 saat grubu RNA **7:** 24 saat grubu RNA **8:** 48 saat grubu RNA **9:** 72 saat grubu RNA

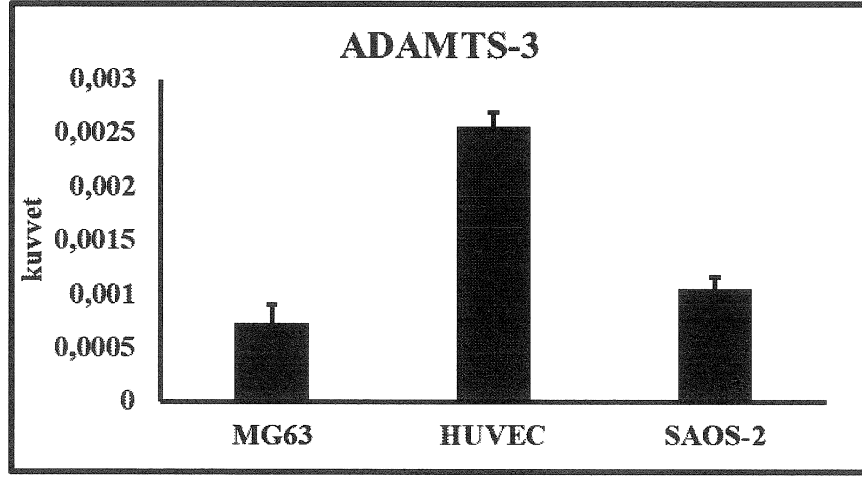


Şekil 4.5: HUVEC cDNA kontrol PCR görüntüsü.

Tüm Real time PCR deneylerine geçmeden evvel, cDNA kontrol PCR'ı rutin olarak yapıldı. Bölüm 3.2.3.7'da anlatılan Real-Time PCR ile üç tekrarlı olacak şekilde ADAMTS2, ADAMTS3 ve human β -2 mikroglobilin ekspresyon primerleriyle analiz yapıldı ve istatistiksel analizi için Minitab 10 programı kullanıldı.



Şekil 4.6: Farklı hücre hatlarında ADAMTS-2 geninin ekspresyonu.



Şekil 4.7: Farklı hücre hatlarında ADAMTS-3 geninin ekspresyonu.

ADAMTS-2 geninin farklı hücre hatlarındaki endojen ifadeleri kantitatif olarak hesaplandığında sırayla Saos-2, MG63 ve HUVEC hücre hatlarında ifade olduğu belirlendi.

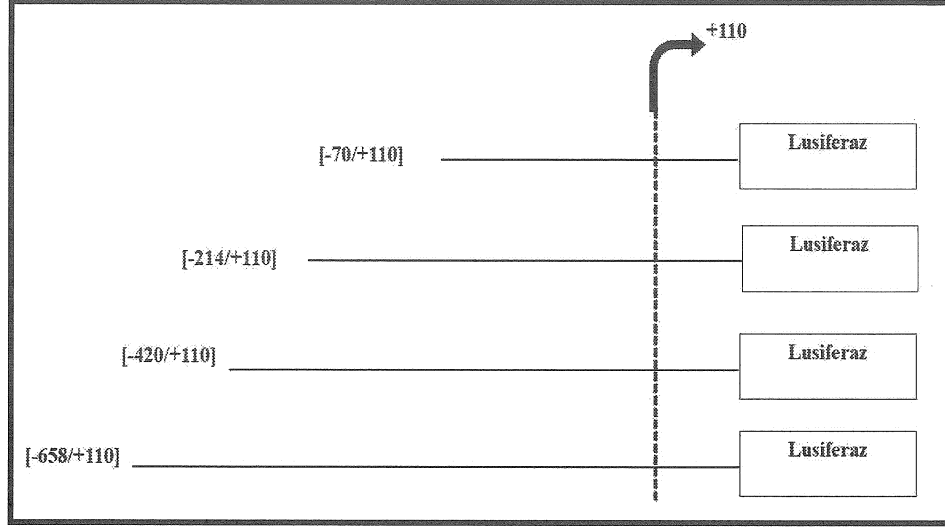
ADAMTS-3 geninin farklı hücre hatlarında endojen ifadeleri kantitatif olarak hesaplandığında sırayla en fazla HUVEC, Saos-2, ve MG63 hücre hatlarında ifade olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 ile koordineli olarak yapılacak olan çalışmalarda HUVEC hücre hattının anjiyogeneze daha yatkın olması deney planı için bir avantaj sağlayacağı düşünüldüğünden model olarak seçildi ve deney planlaması bu duruma göre yapıldı.

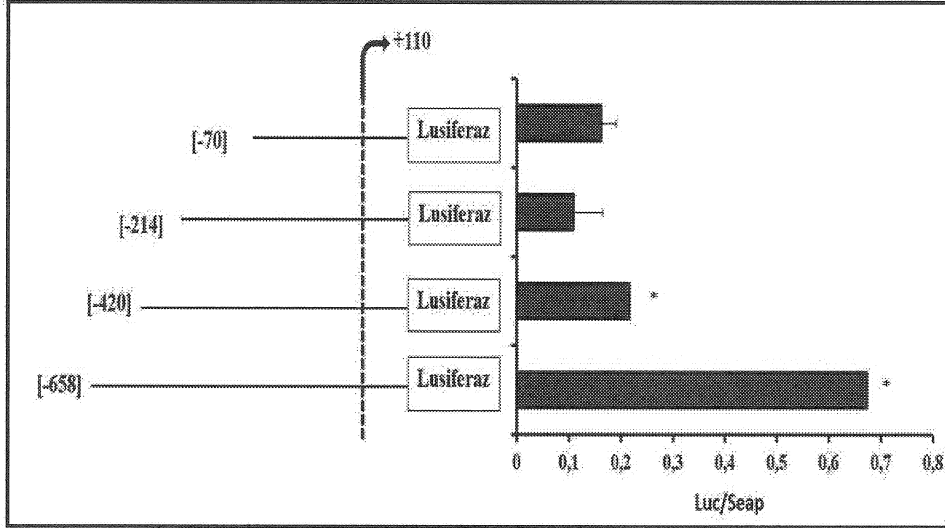
4.2.1 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerine Ait Promotor Parçalarının Normoksik Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Seçilen HUVEC modelinde ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 ün transkripsiyonel olarak aktif olup olmadığı tüm promotor parçaları için denenmiştir.

ADAMTS-2 genine ait PCR yöntemiyle klonlanmış promotor parçaları Yrd. Doc. Dr. Meltem Alper tarafından hazırlandı. ADAMTS-3 geninin klonlanmış parçaları ise Dr. A. Tuğşen Aydemir tarafından hazırlandı. Klonlanan bu promotor parçaları CaCl₂ geçici transfeksiyon metodu kullanılarak bazal aktiviteleri ölçülüp karşılaştırıldı. Her iki gen için klonlanan promotor parçaları pMetluc haberci vektörüne klonlandı. Transfeksiyon sırasında her iki gen içinde hazırlanan promotor parçaları 1 µg olarak kullanıldı. Transfeksiyon başarısının ölçülmesi içinde 0.5 µg SEAP vektörü kullanıldı. Bölüm 3.2.4'de anlatıldığı gibi deney yapıldı ve sonuç analizi sırasında lusiferaz sonuçları seap sonuçları ile normalize edildi. Bu sistemde salınan enzimler kullanılmaktadır. SEAP ölçümü transfeksiyon etkinliği için kullanılmaktadır. Lusiferaz değerleri, SEAP değerlerine oranlanarak, göreceli lusiferaz aktivitesi hesaplanmıştır.

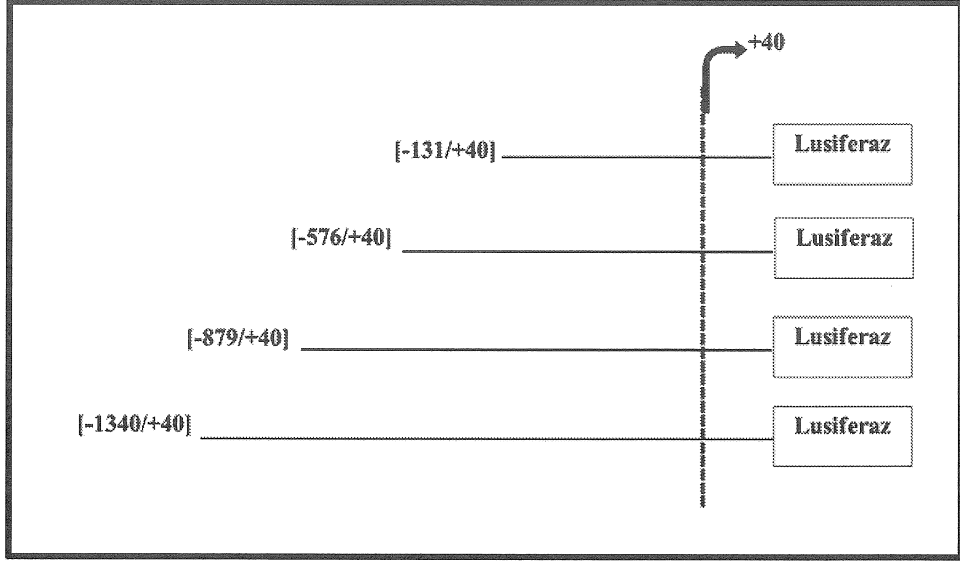


Şekil 4.8: Klonlanan ADAMTS-2 promotor parçaları.

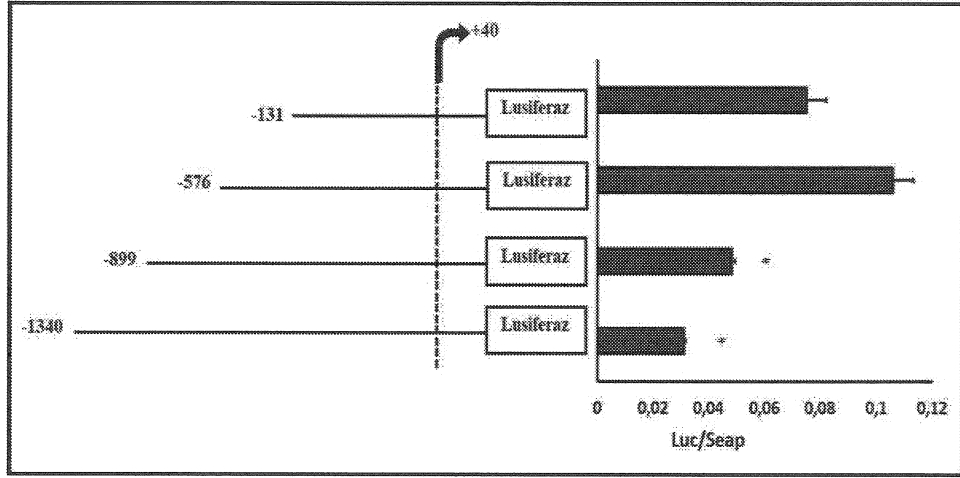


Şekil 4.9: ADAMTS-2 geninin normoksi koşullarda bazal promotor aktivitesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.10: Klonlanan ADAMTS-3 promotor parçaları.



Şekil 4.11: ADAMTS-3 geninin normoksik koşullarda bazal promotor aktivitesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

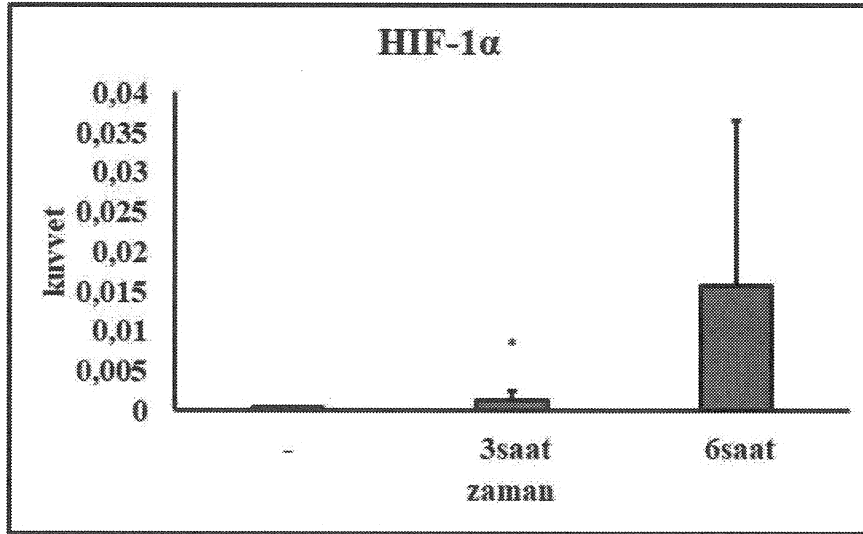
Klonlanan ADAMTS-2 promotor parçalarının bazal aktiviteleri karşılaştırıldığında 768 bç'lik [-658/+110] parçasının en fazla aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.8 ve 4.9).

Klonlanan ADAMTS-3 promotor parçalarının bazal aktiviteleri karşılaştırıldığında en fazla aktivite olan parçanın 616 bç'lik [-576/+40] olduğu belirlendi (Şekil 4.10 ve 4.11).

ADAMTS-2 promotor parçalarının HUVEC hücrelerinde transkripsiyonel aktivitesi, ADAMTS-3 promotorundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

4.3 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinin Hipoksik Koşullardaki mRNA İfadelerinin Belirlenmesi

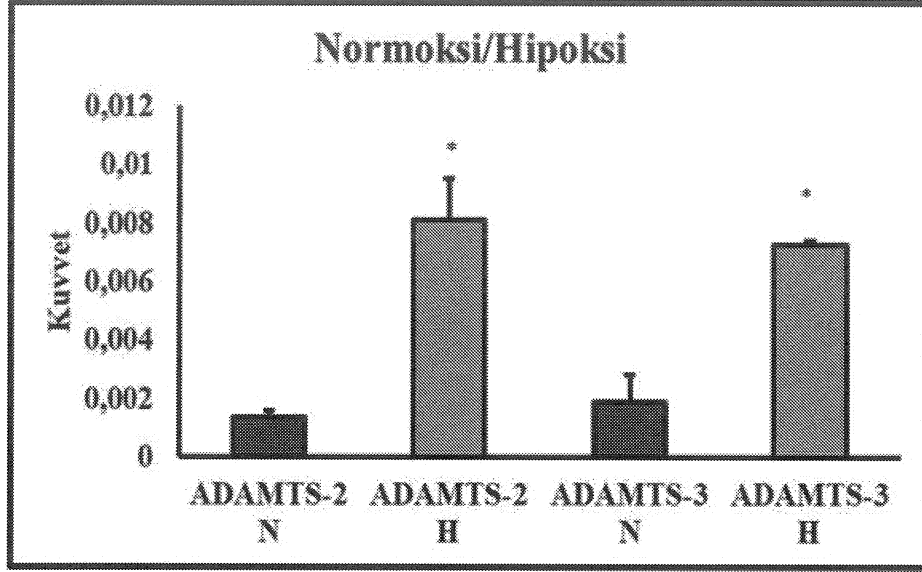
Kimyasal hipoksi model oluştururken son konsantrasyonu 150 μ M olacak şekilde CoCl_2 uygulanır. Hücrelerin hipoksik koşullarda olması demek düşük oksijen varlığına sahip olması demektir. Hipoksik durumda olan tümör dokusu oksijen ihtiyacını sağlamak için anjiyogenez basamaklarına girer ve yeni damar oluşturarak oksijen ihtiyacını karşılar. Tümör dokusunun iç tarafında kalan kısım hipoksik açıdan maksimum seviyede olur çünkü diğer kısımları diğer organ ve dokulardan oksijen ihtiyacını karşılayabilir. Hürelere CoCl_2 eklenmesiyle normal oksijen koşullarında aktive olan prolin hidroksilazlar inaktif duruma gelir. Bunun sonucunda HIF-1 α hidroksillenmeden aktif hale geçer ve hipoksi ile düzenlenen genlerin ifadelerini etkiler [216, 217].



Şekil 4.12: Hipoksik ortamdaki HIF-1 α ifadesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

Hipoksik ortam oluşturularak HUVEC hücre hattında yapılan deney grubunda mRNA düzeyinde HIF-1 α 'nın zamana bağılı olarak artış gösterdiği belirlendi. Bu sonuç kimyasal indüklenmiş hipoksi modelinin başarıyla oluştuğunu göstermektedir (Şekil 4.12).



Şekil 4.13: ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin hipoksik koşullarda ifadesi.

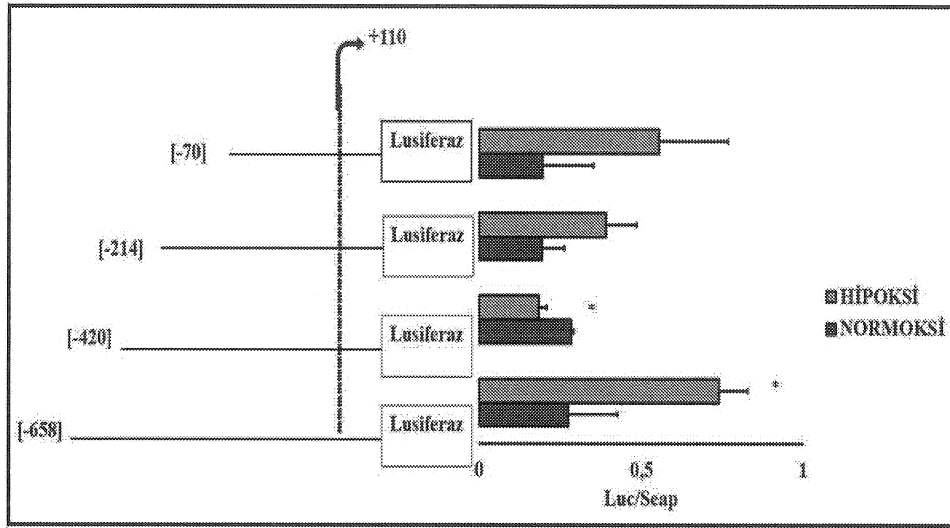
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

Normoksik etkileri belirlenen promotor parçalarının hipoksik şartlarda etkilerinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.2.12'de anlatıldığı gibi hipoksik ortam oluşturularak deney yapıldı. Daha sonra Bölüm 3.2.4'de belirtilen transkripsiyonel aktivite belirlenmesinde kullanılan metodlar ile ölçüldü ve analizleri yapıldı (Şekil 4.13).

ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 mRNA'larının ekspresyon seviyelerinin hipoksi durumunda arttığı belirlendi.

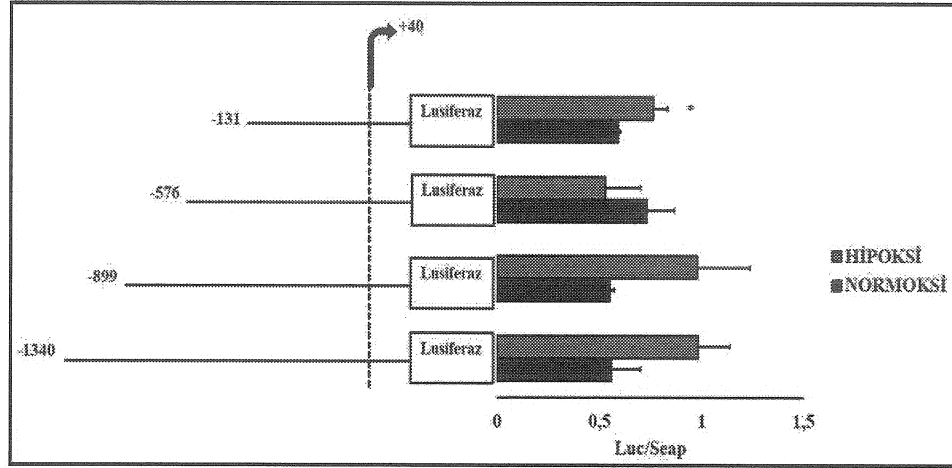
4.4 ADAMT-2 ve ADAMTS-3 Genlerine Ait Promotor Parçalarının hipoksik koşullarda Bazal Aktivitelerinin Belirlenmesi

Normoksik koşullarda elde edilen sonuçlar doğrultusunda hipoksik koşullar yaratılarak Bölüm 3.2.2.12’de anlatıldığı gibi hipoksik koşullarda deney kuruldu ve Bölüm 3.2.5’de belirtilen transripsiyonel aktivitelerin belirlenmesi için gerekli basamaklar gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar normoksik koşullarda elde edilen sonuçlarla kıyaslandı ve hipoksik-normoksik koşulların promotor parçalarında meydana getirdiği farklılıklar değerlendirildi.



Şekil 4.14: ADAMTS-2 geninin normoksi/hipoksi karşılaştırmalı bazal promotor aktivitesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.15: ADAMTS-3 geninin normoksi/hipoksi karşılaştırmalı bazal promotor aktivitesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

Bazal aktivitelerini normoksik ve hipoksik koşullarda kıyasladığımızda her iki gene ait promotor parçalarında hipoksik koşullarda arttığı belirlendi.

Normal ve düşük oksijen koşullarında, bazal aktiviteleri karşılaştırmak için kurulan deneyde 48 saat inkübasyon sonucunda ADAMTS-2 genine ait promotor parçalarından hipoksik durumda, 768 bç büyüklüğünde olan promotor parçasında en yüksek etkinin olduğu belirlendi (Şekil 4.14).

Normal ve düşük oksijen koşullarında, bazal aktiviteleri karşılaştırmak için hipoksik koşullarda kurulan deneyde 48 saat inkübasyon sonucunda ADAMTS-3 genine ait promotor parçalarından 1380 bç büyüklüğünde olan promotor parçasında en yüksek etkinin olduğu belirlendi (Şeki 4.15).

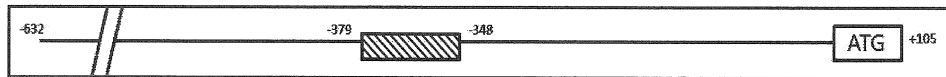
4.4.1 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 promotorlarının EMSA deneyleri kullanılarak HIF-1 α transkripsiyon faktörünün fonksiyonel bağlanma analizinin belirlenmesi

ADAMTS-2 ve ADAMTS3 genlerine ait promotor dizileri analiz edildikten sonra olası HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerine göre problr dizayn edildi. Bu deneyde öncelikle Saos-2 hücre hattına ait normoksi ve hipoksi nükleer

ekstratlar çıkarıldı ve -80 °C’de saklandı. Nükleer ekstratların taze kullanılmasını özen gösterildi. Spesifik olarak dizayn edilen problemler TdT enzimi yardımıyla biyotinlendi. Bu biyotinlenen problemler 95 °C’de beş dakika tutularak anneleme işlemi gerçekleştirildi. Bu biyotinlenen problemlerin biyotinsiz halleri ve HIF-1 α transkripsiyon faktörü biyotinsiz olarak anneleme yapıldı. EMSA bağlanma reaksiyonu kuruldu. Bu reaksiyonda son konsantrasyonu 8 μ g olacak şekilde nükleer ekstratlar kullanıldı ve Bölüm 3.2.6.4’de anlatılan basamaklar gerçekleştirildikten sonra jelle yüklemeye yapıldı ve jel 100 voltta yürütüldü. Bu basamaklar sonunda Bölüm 3.2.6.5’de anlatılan transfer işlemi gerçekleştirildi. Daha sonra EMSA kitinin önerdiği basamaklar yapıldıktan sonra görüntüleme yapıldı ve HIF-1 α transkripsiyon faktörünün promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadığı belirlendi.

Tablo 4.1: ADAMTS-2 promotor parçasında HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine spesifik dizayn edilen problem.

TF	MOTİF	BAĞLANMA BÖLGESİ
Hipoksi indükleyici faktör	ACGT	[-379/-348]
[-379/-348] F 5' GCTCTCTAGGTGGGGACGTTCCGGCCGGCGCC 3' R 5' GGCGCCGGCCGAACGTCCCCACCTAGAGAGC3'		

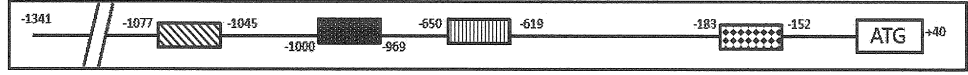


Şekil 4.16: ADAMTS-2 promotor bölgesinde olası HIF-1 α bağlanma bölgesine ait problemin lokalizasyonu

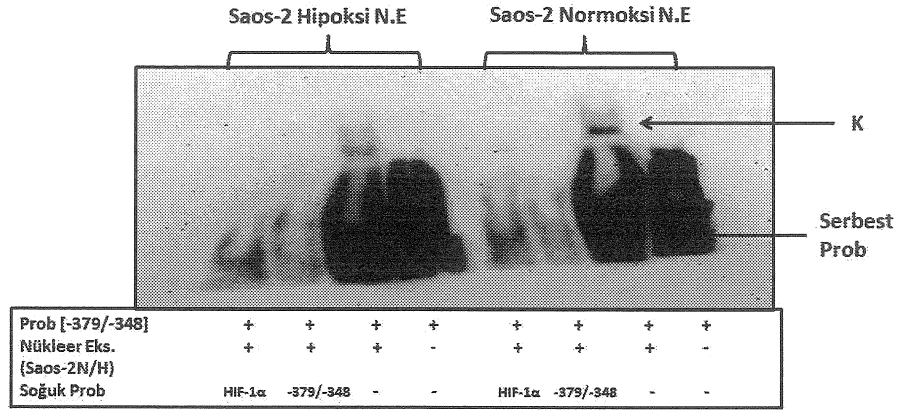
Tablo 4.2: ADAMTS-3 promotor parçasında HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesine spesifik dizayn edilen problemler.

TF	MOTİF	BAĞLANMA BÖLGESİ
Hipoksi indükleyici faktör	CGTG	[-650/-619], [-969/-1000], [1068 – 1052], [-1077/-1045]
	AGTG	[-183/-152]

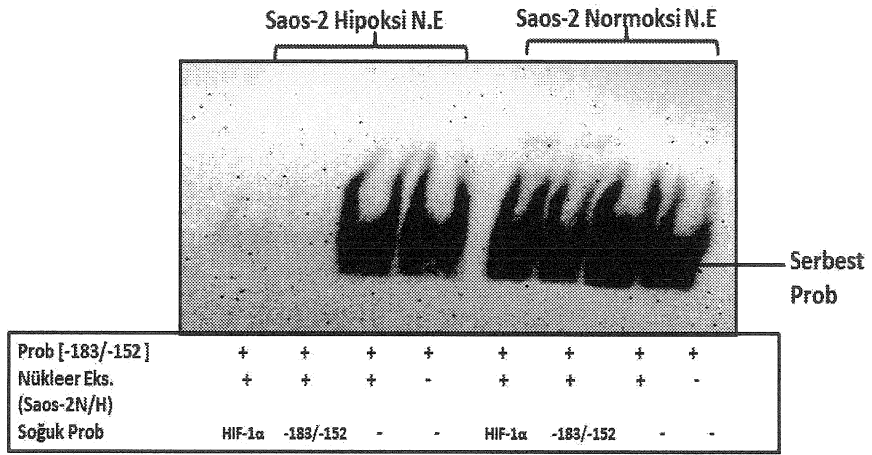
[-183/-152]	F 5' GGTGAGAAGGTGAAGTGGAAAAA ACTGCAGAG 3' R 5' CTCTGCAGTTTTTTTCCACTTCACCTTCTCACC 3'
[-650/-619]	F 5' CGGGCCCCGCATGACGTGGGCGCCACGGCGGG 3' R 5' CCCGCCGTGGCGCCACGTCATGCGGGGCCCG 3'
[-969/-1000]	F 5' GACACCCCTGCCAAAACGTGGGAGGTGACTG 3' R 5' CAGTCACCTCCCACGTTTTTGGCAGGGGGTGTC 3'
[-1077/-1045]	F 5' GTGAGTCAAGGAAAGGACGTGGTATCTTTTAAA 3' R 5' TTAAAAGATACCACGTCCTTTCCTTGACTCAC 3'



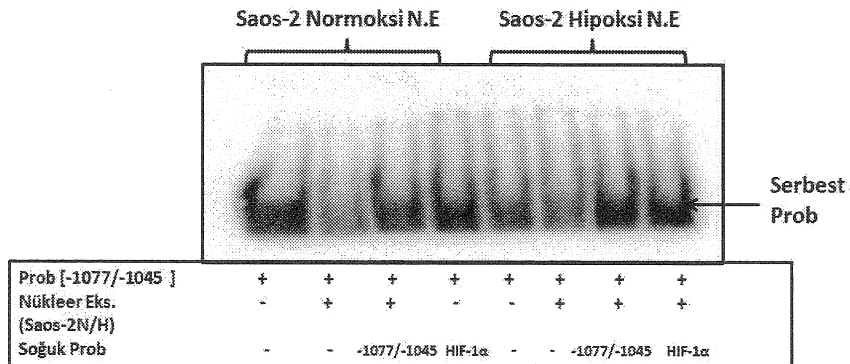
Şekil 4.17: ADAMTS-3 promotor bölgesinde olası HIF-1 α bağlanma bölgesine ait problemlerin lokalizasyonu



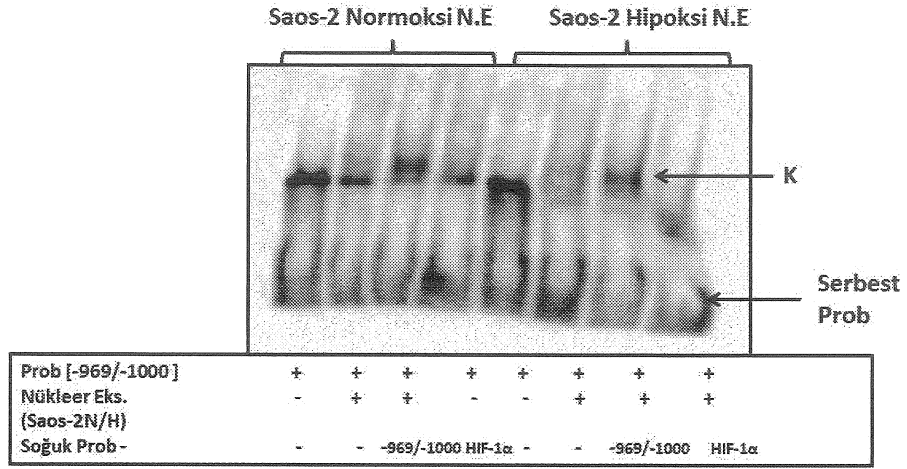
Şekil 4.18: [-379/-348] ADAMTS-2 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.



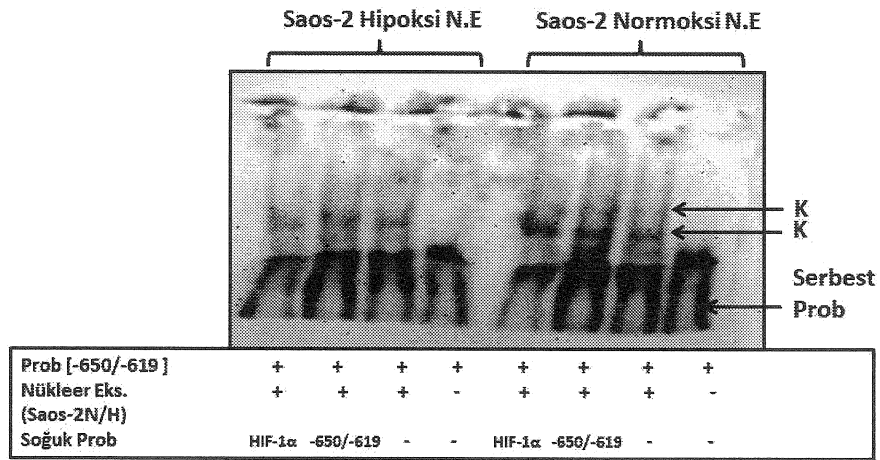
Şekil 4.19: [-183/-152] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.



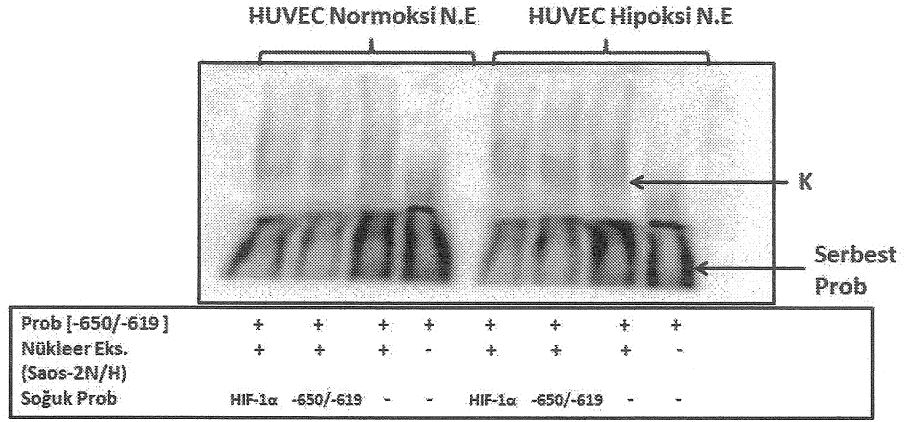
Şekil 4.20: [-1077/-1045] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.



Şekil 4.21: [-969/-1000] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.



Şekil 4.22: [-650/-619] ADAMTS-3 promotor bölgesinde Saos-2 hücre hattına ait EMSA görüntüsü.



Şekil 4.23: [-650/-619] ADAMTS-3 promotor bölgesinde HUVEC hücre hattına ait EMSA görüntüsü.

EMSA deneylerinde yorumlanan görüntüler sonucunda ADAMTS-2 promotor bölgesine ait olan [-379/-348] bölgede Saos-2 hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda HIF-1 α transkripsiyon bölgesine ait promotor bağlanma alanının olduğu belirlendi. EMSA deneyleri Saos-2 nükleer ekstratı ile yapıldı. Biotinlenmiş [-379/-348]'lik bölge prob olarak kullanıldı. Buna göre tek bir DNA protein kompleksi olduğu gözlemlendi. Bu kompleks hem normal oksijen koşullarında hem de hipoksik koşullarda bulundu. Yarışma deneyleriyle oluşan bu kompleksin spesifitesi değerlendirildi. Buna göre yarışma deneylerinde etiketsiz -379/-348 lik bölge kullanıldı (Bu proba soğuk prob ismi verilir). Soğuk probun dâhil edilmesi, oluşan kompleksi ortadan kaldırdı. Buda bandın tesadüfen değilde DNA protein etkileşimiyle oluşmuş özgün bir kompleks olduğunu gösterdi. Diğer yarışma deneyi etiketsiz HIF-1 α bağlanma bölgesiyle gerçekleştirildi. Bu probunda dahil edilmesi kompleks oluşumunu yok etti. Bu durumda oluşan kompleksin HIF-1 α transkripsiyon faktörü ile oluşturulmuş bir kompleks olduğu sonucuna varıldı. Sonuç olarak HIF-1 α ADAMTS-2 promotorunun [-379/-348]'lik bölgesine bağlandığı belirlendi (Şekil 4.18).

ADAMTS-3 promotor bölgesine ait [-183/-152] ve [-1077/-1045] bölgelerinde yapılan deneyler doğrultusunda kompleks oluşmadığı belirlendi (Şekil 19 ve Şekil 20). [-969/-1000] bölgesinde düşük moleküler ağırlıklı bir kompleks olduğu görüldü (Şekil 21). Bu kompleks HIF-1 α konsensus dizisiyle yarışmaya sokunca kayboldu. Buda bize HIF-1 α 'nın bu bölgeye bağlandığını gösterdi.

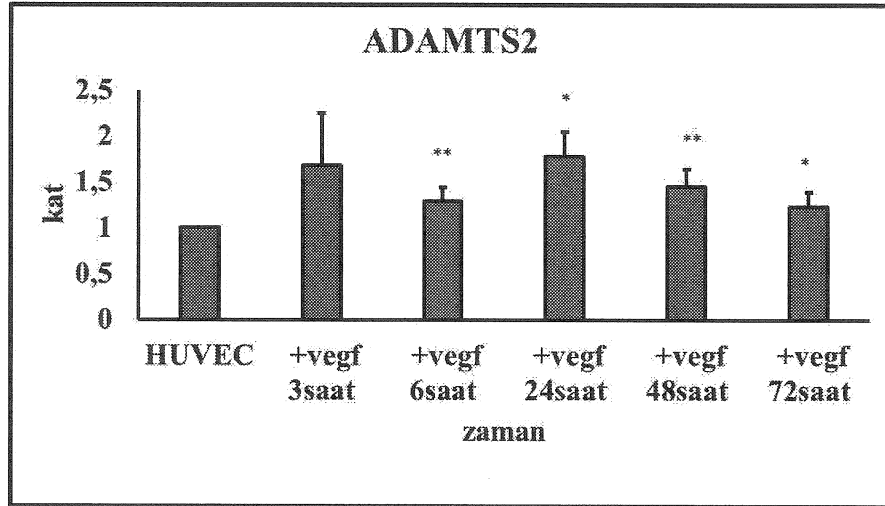
[-650/-619] bölgesinde Saos-2 hücresinde, hem normoksik hem hipoksik koşullarda bir bağlanmanın gerçekleştiği görüldü. Buna göre normoksik koşullarda iki kompleks hipoksik koşullarda tek kompleks olduğu belirlendi (Şekil 22). Yarışma deneylerinde komplekslerin çok hafif kaybolduğu görüldü. Bu da bize yarışma deneyinin iyi gerçekleşmediğini ifade etmektedir. Potansiyel anlamda HIF-1 α transkripsiyon faktörünün bu bölgelere bağlanabilir olduğunu ancak detaylı bir teğitine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Bu deneyler Saos-2 hücre hattında gerçekleştirildi. Ancak dokuya spesifik transkripsiyonel regülasyon gereği aynı EMSA çalışma modelimiz olan HUVEC hücrelerinde tekrar edildi. Görüldüğü üzere HUVEC hücrelerinde hem normoksik hem de hipoksik koşullarda iki kompleks dikkat çekmektedir. Probon soğuk oligosuyla yapılan yarışma deneylerinde ve HIF-1 α ile yapılan yarışma deneylerinde özellikle üstteki kompleksin bağlanması

azalmaktadır. Özellikle HIF-1 α da ki bu gözlem HIF-1 α 'nın spesifik olarak bu bölgeye bağladığını ifade etmektedir. Sonuç olarak ADAMTS-3 promotorunda HIF-1 α [-650/-619] bölgesine fiziksel olarak bağlandığı belirlendi (Şekil 23).

4.5 VEGF Sitokininin ADAMTS-3 ve ADAMTS-2 Regülasyonuna Etkisinin Belirlenmesi

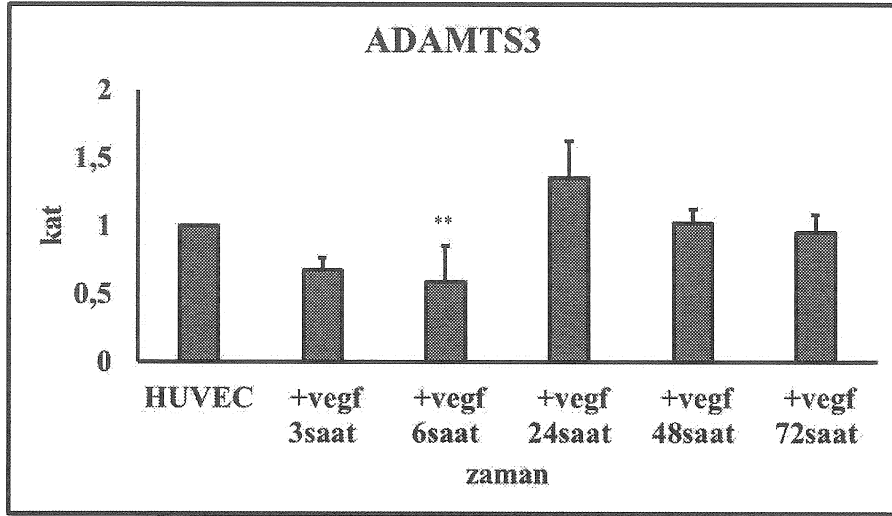
4.5.1 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde VEGF Sitokininin Normoksik Şartlarda mRNA ifadesinin Belirlenmesi

Bölüm 3.2.2.12'de anlatılan normoksik şartlarda deney kuruldu. Daha sonra Bölüm 3.2.3'de belirtilen RNA tabanlı teknikler yapıldı ve VEGF uygulanan hücrelerde kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında ifadelerindeki değişiklik analiz edildi. Bu kapsam da;



Şekil 4.24: ADAMTS-2 genine VEGF sitokininin etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.25: ADAMTS-3 genine VEGF sitokininin etkisi.

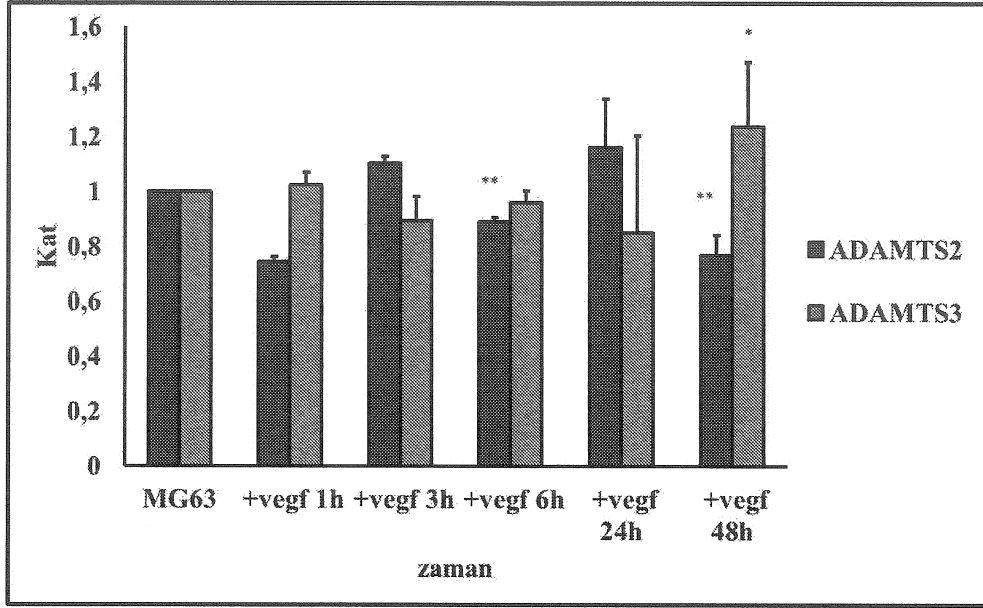
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

ADAMTS-2 geninin HUVEC hücre hattında ifadesinin kontrol grubuna göre farklı zaman dilimlerinde arttığı belirlendi. Yani ADAMTS-2 geninin HUVEC hücre hattında VEGF ile büyümesini teşvik ettiği analiz edildi (Şekil 4.16).

ADAMTS-3 geninin HUVEC hücre hattında VEGF ile olan ilişkisine bakıldığında ise kontrol grubuna göre 24 saatte artış olduğu belirlendi (Şekil 4.17).

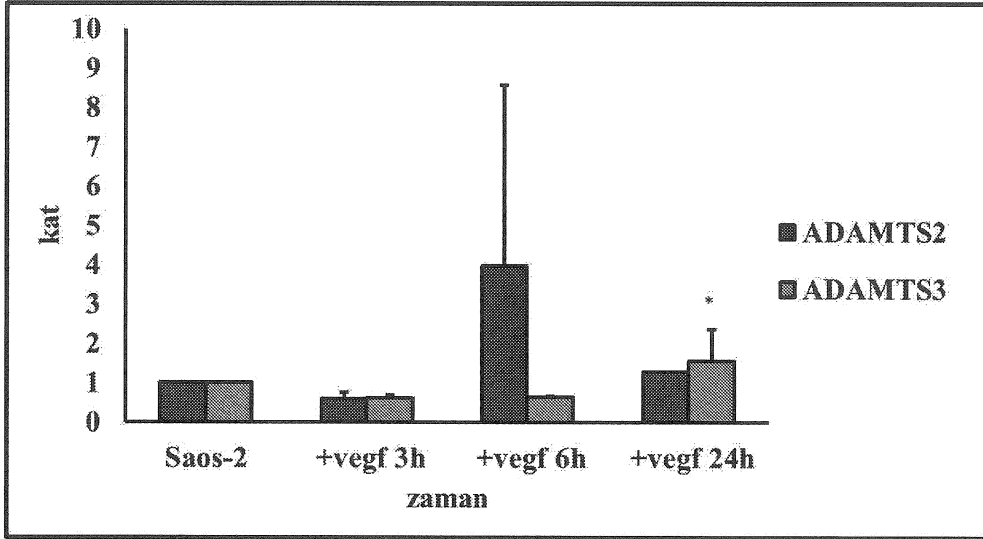
4.5.1.1 Farklı Hücre Hatlarında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerine VEGF Etkisinin Belirlenmesi

Ana model olan HUVEC hücre hattının yanı sıra yan model olarak kullanılan osteosarkoma modeli hücre hatları olan Saos-2 ve MG63 hücre hatları ile VEGF sitokininin etkisine bakılmıştır.



Şekil 4.26: MG63 Hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin VEGF ifadesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.27: Saos-2 hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin VEGF ifadesi.

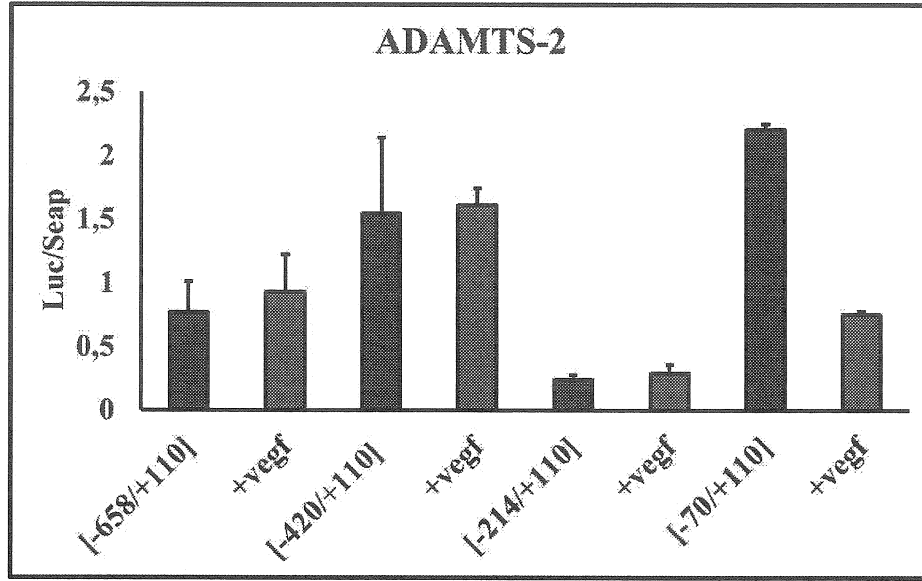
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

MG63 ve Saos-2 hücre hatlarıyla yapılan çalışmada mRNA düzeyinde bakıldığında HUVEC hücre hattına kıyasla çok anlamlı artışların olmadığı belirlendi

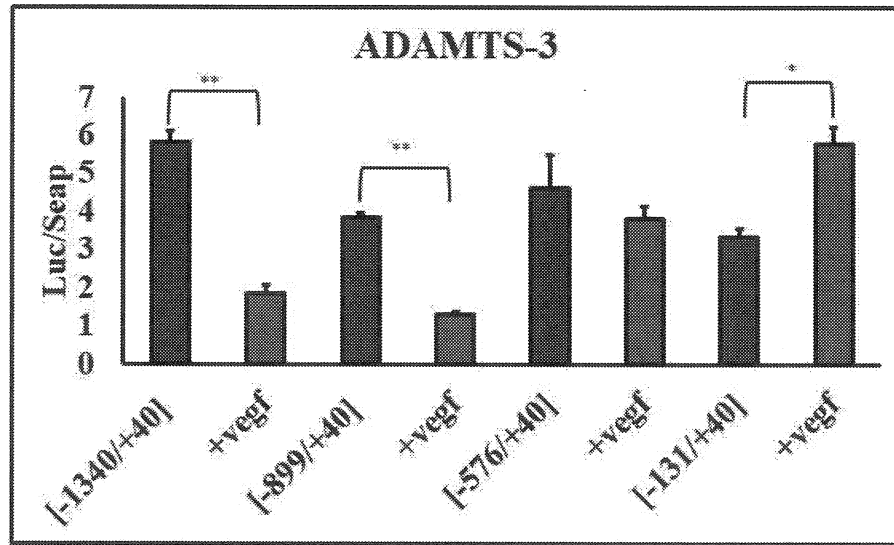
(Şekil 4.19 ve 4.20). Ancak Saos-2 hücre hattında VEGF sitokinin ADAMTS-2 mRNA ifadesini arttırdığı belirlenmiştir.

4.5.1.2 VEGF Sitokininin Normoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi

VEGF sitokinin normoksik şartlarda ilgili promotor parçalarının aktivitelerine etkisinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.4’de belirtilen adımlar gerçekleştirildi.



Şekil 4.28: Normoksik koşullarda ADAMTS-2 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.



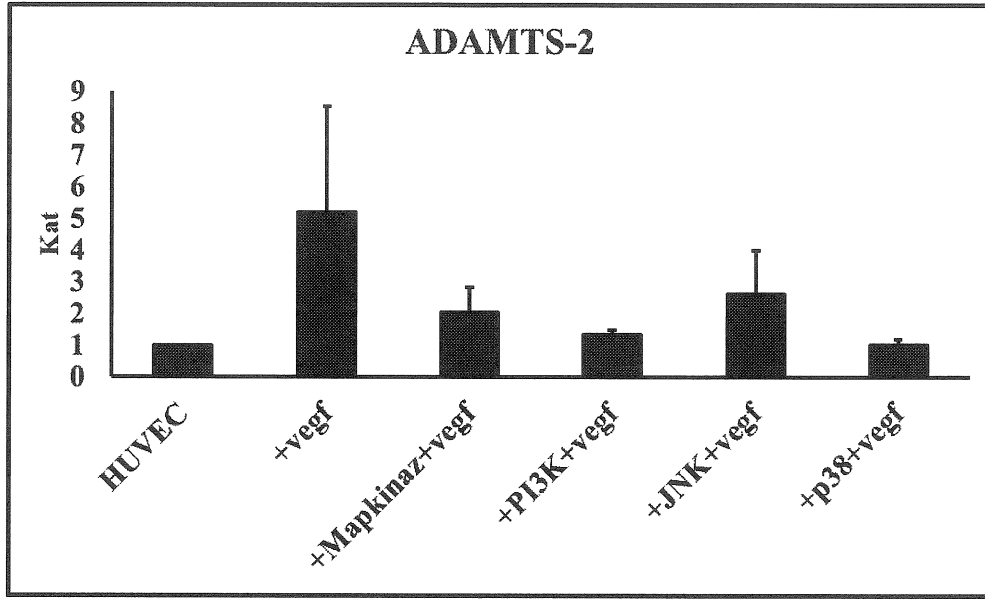
Şekil 4.29: Normoksik koşullarda ADAMTS-3 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

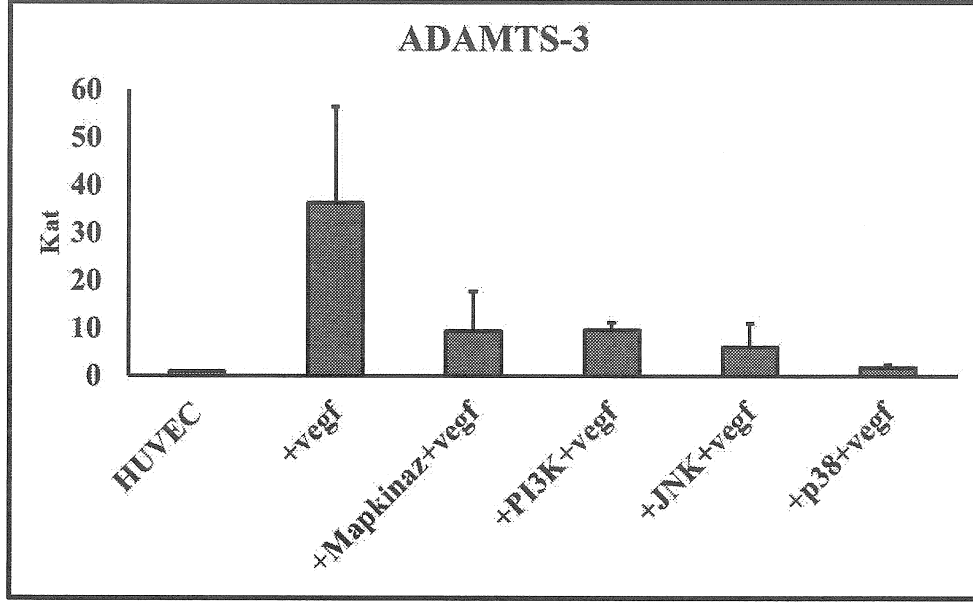
Yapılan analizler sonucunda ADAMTS-2 genine ait promotor parçalarından VEGF ile 768 bç'lik parçanın etkilenmediği belirlendi (Şekil 4.20). ADAMTS-3 için ise 171 bç'lik [-131/+110] parçanın en fazla aktivite gösterdiği (Şekil 4.21) sonuç olarak da VEGF sitokininin ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 promotor parçalarını farklı regülasyon mekanizmalarıyla etkilediği belirlendi.

4.5.1.3 VEGF Sitokininin Normoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Kullandığı Yolakların Belirlenmesi

Sitokinler hücre fonksiyonları için belirli yolaklar üzerinden aktive olmaktadır. Bu yolaklar kullanılan farklı hücre hatları, genler ve sitokinlerden vb. dolayı farklı şekillerde bir akış sağlar. Bu akış sayesinde hücre çoğalması, göçü, anjiyogenez, otofaji, apoptoz gibi süreçlere girerler.



Şekil 4.30: ADAMTS-2 geninde normoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolakların belirlenmesi.



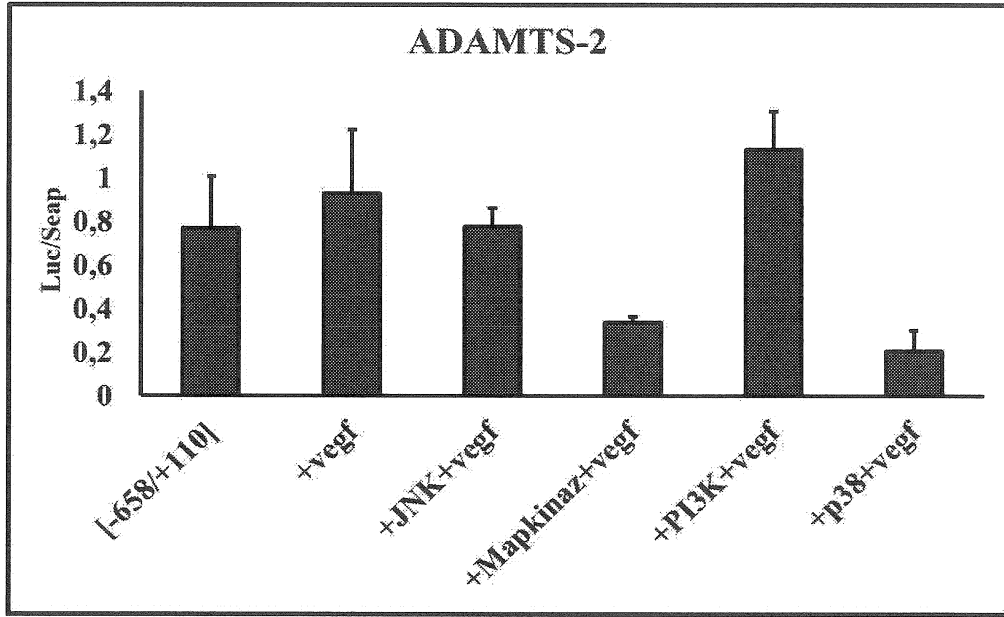
Şekil 4.31: ADAMTS-3 geninde normoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.

ADAMTS-2 geninin VEGF sitokinine ait yolak inhibitörleriyle yapılan deney grubunda VEGF sitokini HUVEC hücre hattında ADAMTS-2 mRNA'sını artırmıştır. Bu arttırmanın hangi hücredeki hangi yollar üzerinden gerçekleştirildiğinin anlaşılması için farklı yolların inhibitörleri kullanılmıştır. Buna göre, map kinaz inhibitörü, PI3K inhibitörü, JNK inhibitörü ve p38 inhibitörleri VEGF'in yaptığı bu artışı ADAMTS-2 mRNA üzerinde engellemişlerdir. Buda bize VEGF'in belirtilen bu yollar üzerinden kombine olarak bu artışı sağladığını göstermektedir (Şekil 4.22).

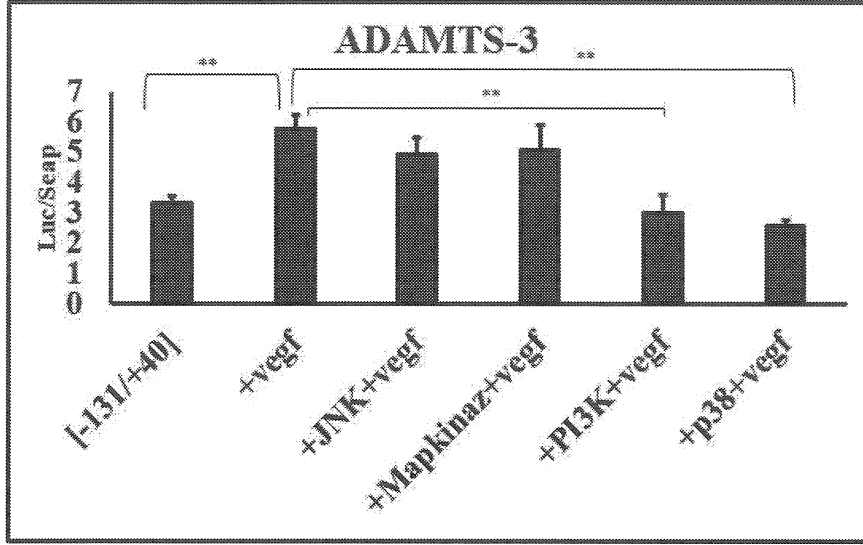
VEGF sitokini ADAMTS-3 mRNA'sı da artmaktadır. Buna göre, Map kinaz inhibitörü, PI3K inhibitörü, JNK inhibitörü ve p38 inhibitörleri VEGF'in yaptığı bu artışı ADAMTS-2 mRNA üzerinde engellemişlerdir. Buda bize VEGF'in ADAMTS-3 gen ifadesini de ADAMTS-2 gen ifadesine benzer bir şekilde belirtilen bu yollar üzerinden kombine olarak bu artışı sağladığını göstermektedir (Şekil 4.23).

4.5.1.4 VEGF Yolak İnhibitörlerinin Normoksik Koşullarda Promotor Parçalarına Etkisi

VEGF yolak inhibisyon deneyleriyle promotor parçalarının HUVEC hücre hattında hangi yolları kullanarak regülasyon yaptığının belirlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda literatür analizleri baz alındı ve çeşitli hücre içi yolak inhibitörleri kullanıldı. Bölüm 3.2.5’de anlatıldığı gibi deney yapıldı. Deney sonuçları sonucunda 72 saatte en iyi sonuçların olduğu belirlendi.



Şekil 4.32: VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik koşullarda en yüksek aktive olan ADAMTS-2 promotor parçasına etkisi.



Şekil 4.33: VEGF yolak inhibitörlerinin normoksik koşullarda en yüksek aktive olan ADAMTS-3 promotor parçasına etkisi.

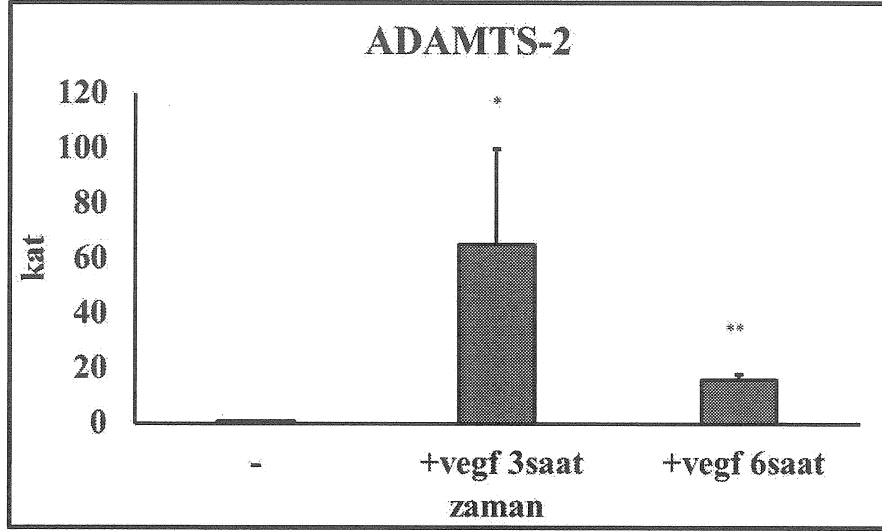
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

ADAMTS-2 geninin klonlanan promotor parçalarının HUVEC hücre hattında hangi yolakları kullanarak regülasyon sağladığı sorusuyla yola çıkarak JNK, Map kinaz, PI3K, p38 inhibitörleri ile yapılan çalışmada, 72 saat inkübe olan deney grubunun bazal aktivitesi en iyi olan 720 bç'lik promotor parçası seçildi ve bu promotor parçasında Mek ve p38 yolaklarını inhibe ederek regüle olduğu belirlendi (Şekil 4.24).

ADAMTS-3 geninine ait promotor parçalarında ise bazal aktivitesi en fazla olan 171 bç'lik parçanın VEGF ile ilişkisine baktığımızda PI3K ve p38 yolaklarını anlamlı şekilde inhibe ettiği belirlendi (Şekil 4.25).

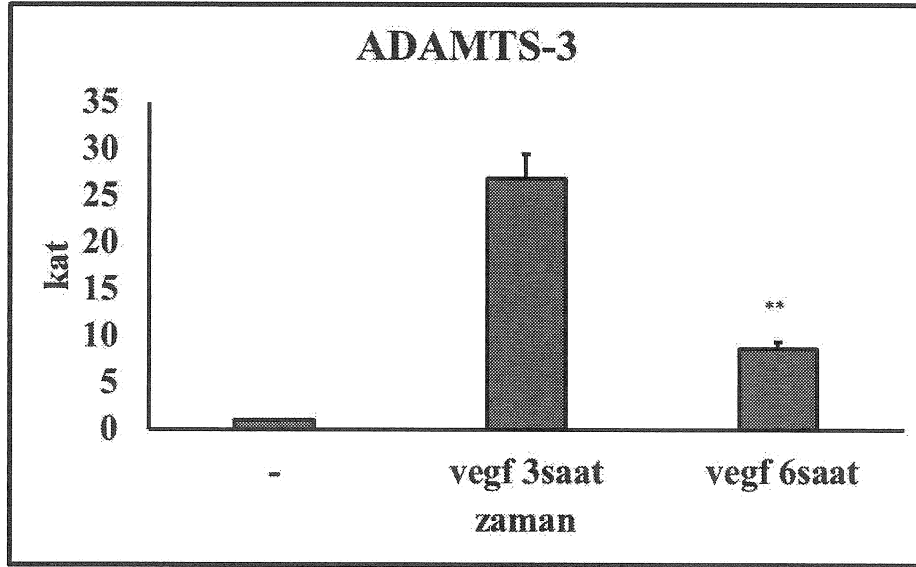
4.5.2 ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Hipoksik Koşullarda VEGF Sitokinin Etkisinin Belirlenmesi

Hipoksik ortamda VEGF sitokinin anjiyogenik etkisinin olduğu literatür analizlerinde saptanmış ve bu doğrultuda HUVEC hücre hattıyla ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin ifadelerine nasıl etki ettiği saptanması amaçlanmıştır.



Şekil 4.34: VEGF sitokinin hipoksik koşullarda ADAMTS-2 mRNA'sına etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.35: VEGF sitokinin hipoksik koşullarda ADAMTS-3 mRNA'sına etkisi.

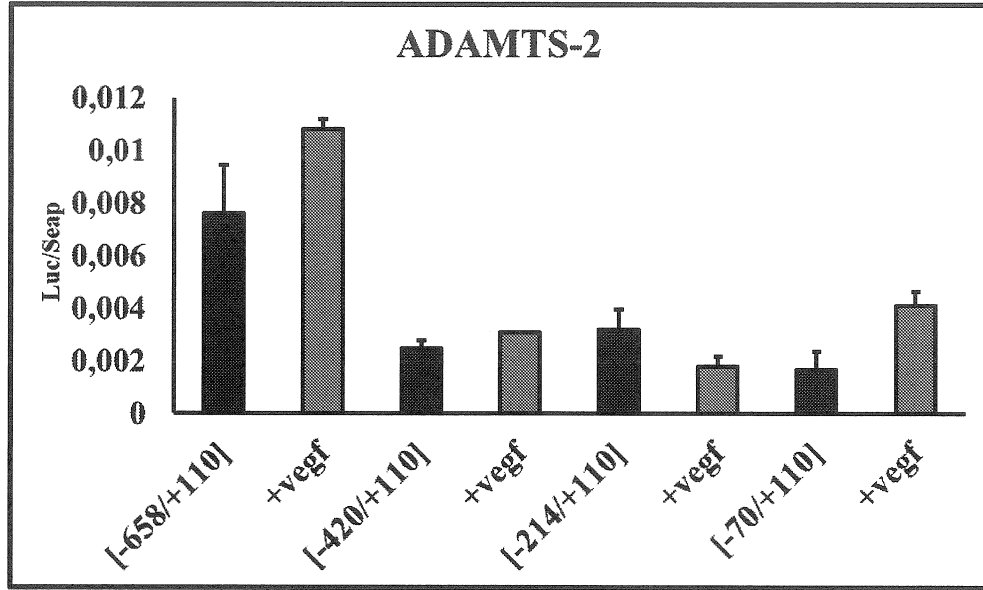
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

ADAMTS-2 geninde HUVEC hücre hattında yapılan hipoksik deneyde VEGF sitokinin 3.saatte maksimum etki ettiği belirlendi (Şekil 4.26).

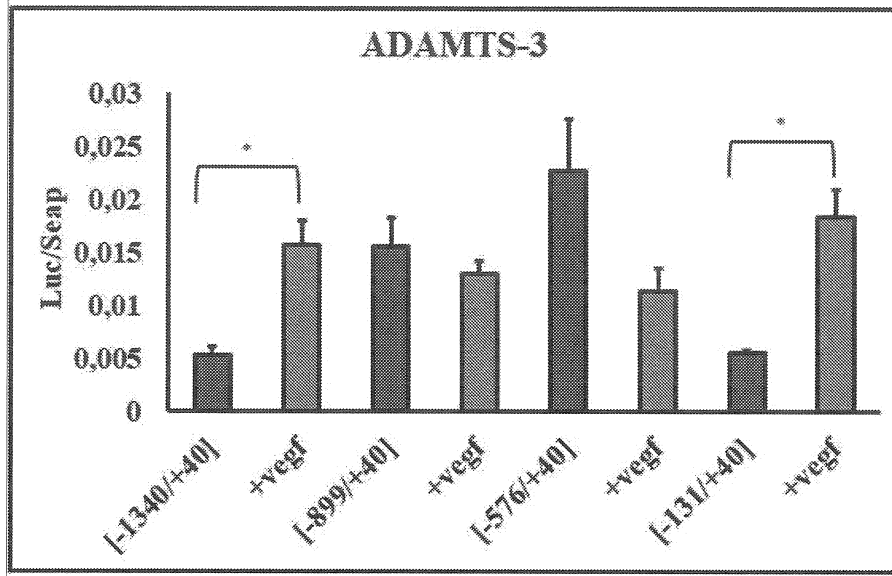
ADAMTS-3 geninde HUVEC hücre hattında yapılan hipoksik deneyde VEGF sitokinin 3. Saatte maksimum etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4.27).

4.5.2.1 VEGF Sitokininin Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Promotor Parçalarına Etkisinin Belirlenmesi

Normoksik koşullarda belirlenen sonuçların hipoksik koşullarda etkilerinin belirlenmesi doğrultusunda 20 ng/mL VEGF uygulanan deney grubuyla aynı deney yapıldı ve kimyasal hipoksik ortam oluşturuldu.



Şekil 4.36: Hipoksik koşullarda ADAMTS-2 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.



Şekil 4.37: Hipoksik koşullarda ADAMTS-3 gen promotor parçalarına VEGF etkisi.

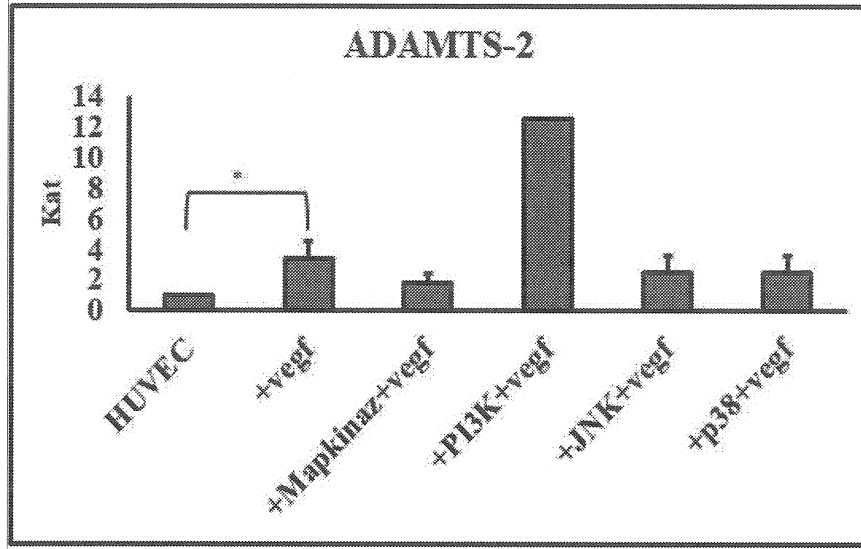
(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

Hipoksik ortamda yapılan deney sonucunda ADAMTS-2 için, en yüksek etkinin 768 bç ve 180 bç 'lik promotor parçalarında olduğu belirlendi (Şekil 4.28).

Hipoksik koşullarda, ADAMTS-3 genine ait promotor parçalarının VEGF ile olan ilişkisine bakıldığında 1380 bç ve 171 bç'lik promotor parçalarında VEGF ile bir artış olduğu belirlendi (Şekil 4.29).

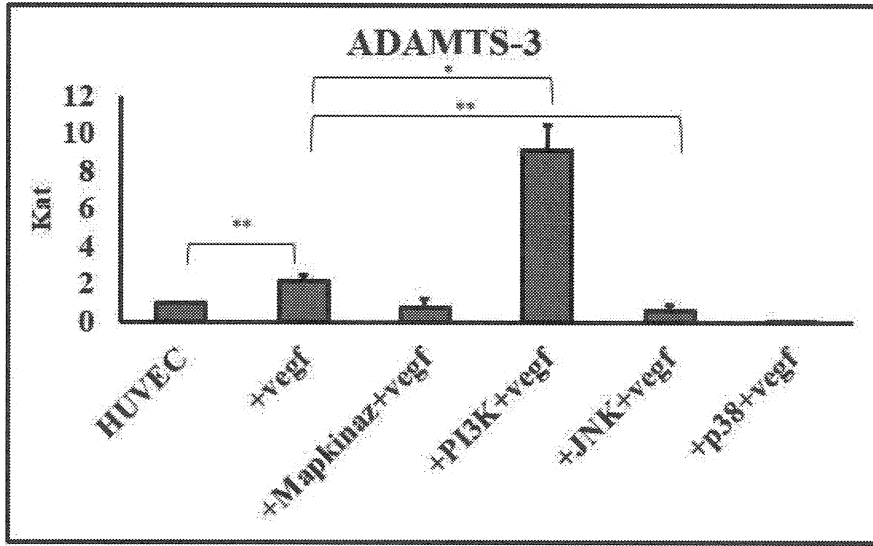
4.5.2.2 VEGF Sitokininin Hipoksik Koşullarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 Genlerinde Kullandığı Yolakların Belirlenmesi

Hipoksik koşullarda HUVEC hücre hattında ifadesi belirlenen ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin normoksik koşullardan farklı bir inhibitör varlığını belirlenmek amacıyla deney kuruldu.



Şekil 4.38: ADAMTS-2 geninde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.39: ADAMTS-3 geninde hipoksik koşullarda VEGF sitokininin kullandığı yolların belirlenmesi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

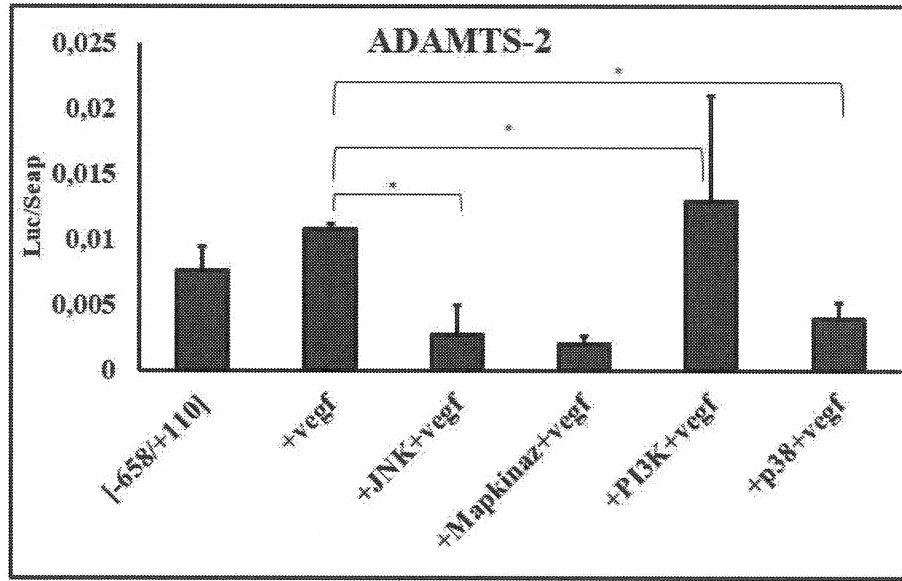
Normoksik koşullarda da analiz edilen ADAMTS-2 geninin VEGF sitokinine ait yolak inhibitörleriyle yapılan deney grubunda VEGF sitokini HUVEC hücre hattında hipoksik koşullarda da ADAMTS-2 mRNA'sını artırmıştır. Bu artırımın hangi hücredeki hangi yollar üzerinden gerçekleştirildiğinin anlaşılması için farklı yolak inhibitörleri kullanıldığında map kinaz inhibitörü ve p38 inhibitörleri VEGF'in

yaptığı bu artışı ADAMTS-2 mRNA üzerinde engellemişlerdir. Buda bize VEGF'in belirtilen bu yollar üzerinden kombine olarak bu artışı sağladığını göstermektedir (Şekil 4.30).

VEGF sitokini de ADAMTS-3 mRNA'sı da artmaktadır. Buna göre, Map kinaz inhibitörü, JNK inhibitörü ve p38 inhibitörleri VEGF'in yaptığı bu artışı ADAMTS-2 mRNA üzerinde engellemişlerdir. Buda bize VEGF'in ADAMTS-3 gen ifadesini de ADAMTS-2 gen ifadesine benzer bir şekilde belirtilen bu yollar üzerinden normoksik ve hipoksik koşullarda kombine olarak bu artışı sağladığını göstermektedir (Şekil 4.31).

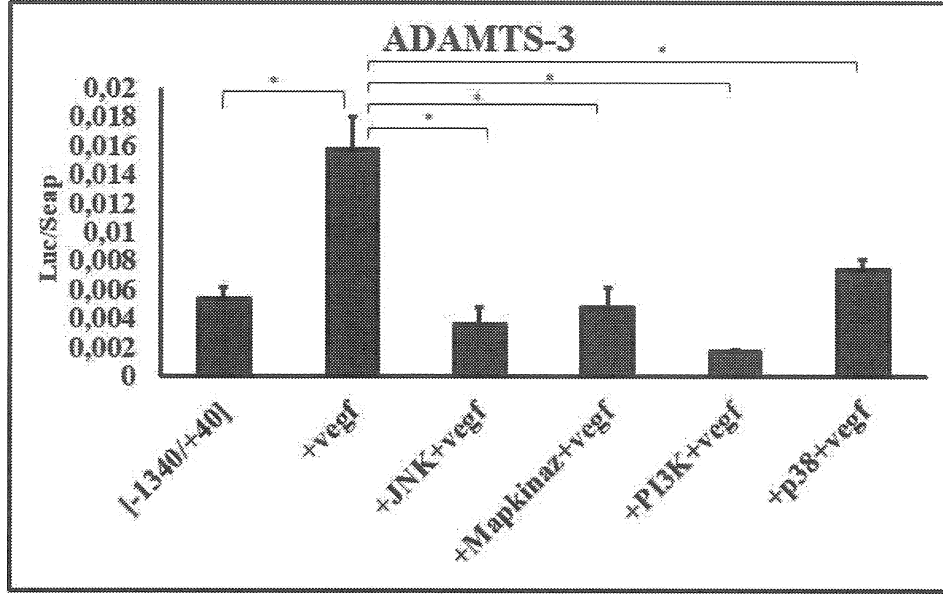
4.5.2.3 VEGF Yolak İnhibitörlerinin Hipoksik Koşullarda Promotor Parçalarına Etkisi

Bazal ve VEGF aktiviteleri belirlenen promotor parçalarının bu düzenlenme basamaklarını hangi yollar üzerinden bu işlemi gerçekleştirdiği araştırıldı.



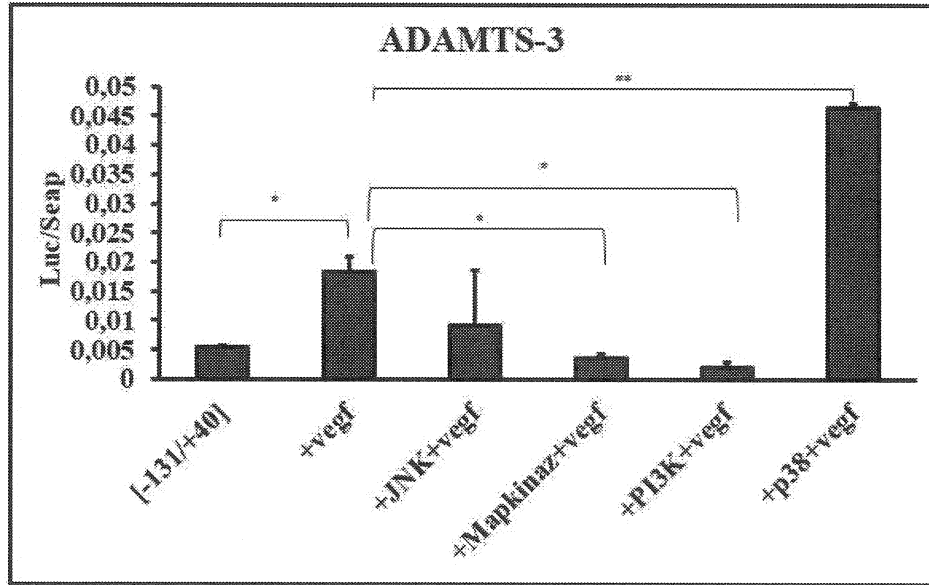
Şekil 4.40: ADAMTS-2 geninin 768 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.41: ADAMTS-3 geninin 1380 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)



Şekil 4.42: ADAMTS-3 geninin 171 bç'lik promotor parçasına VEGF yolak inhibitörlerinin etkisi.

(* $p \leq 0.05$ -0.01 arası değerler, ** $p \leq 0.01$ 'den düşük olan değerler)

ADAMTS-2 genine ait 768 bç'lik promotor parçasının ise JNK, Map kinaz ve PI3K yolaklarını kullandığı belirlendi (Şekil 4.32).

ADAMTS-3 genine ait bazal aktiviteleri ve VEGF ile aktiviteleri en yüksek olan 1380 bç ve 171 bç'lik promotor parçaları VEGF yolak inhibitörleriyle bakıldığında 1380 bç parçanın JNK, Map kinaz, PI3K, p38 yolaklarını kullandığı belirlendi (Şekil 4.33).

ADAMTS-3 genine ait 171 bç'lik promotor parçasının ise JNK, Map kinaz ve PI3K yolaklarını kullandığı belirlendi (Şekil 4.34).

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Son zamanlarda tümör beslenmesi ve bu beslenme kapsamında hücrenel düzeyde meydana gelen değişiklikler hakkında yapılan çalışmalara ağırlık verilmiştir. Bu doğrultuda elde edilen sonuçlarla beraber anjiyogenez adı verilen damarlaşmayı sağlayan basamaklar aydınlatılmıştır. Her ne kadar araştırmalar devam etsede araştırılacak çok fazla detay mevcuttur. Anjiyogenezin damarlaşma sürecinde yardım aldığı diğer yapılar aydınlatılmalıdır.

Bu tez çalışmasının amacı, kısmi olarak transkripsiyonel regülasyonu aydınlatılmış olan ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin HUVEC hücrelerinde hipoksik koşullar altında ve VEGF sitokininin yapmış olduğu etkilerin belirlenmesidir.

Daha önceden belirli büyüklükte hazırlanan ve normoksik koşullarda çalışmaları olan, ADAMTS-3 genine ait promotor parçalarını PCR tekniği ile klonlayan Dr. A.Tuğşen Aydemir, 171 bç [-131/+40], 616 bç [-576/+40], 939 bç [-899/+40] ve 1380 bç [-1340/+40] promotor parçalarının transkripsiyonel aktivite değerlendirdiğinde Saos-2 ve MG63 hücre hatlarında tüm promotor parçalarının aktivite gösterdiğini belirlemiştir [218]. Bu iki hücre hattı içinde en fazla bazal aktivite gösteren parçanın 616 bç'lik TS3 [-576/+40] promotor parçası olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçla promotor bölgesinin yaklaşık 576 bç'lik bir uzaklıkta transkripsiyon başlangıç noktasının bulunabileceğini belirlenmesini sağlanmıştır. Bu tez kapsamında da insan endotel hücre modeli olan HUVEC hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin promotor aktiviteleri çalışılmıştır. Buna göre, HUVEC hücrelerinde normoksik koşullarda bütün promotor parçalarının aktive gösterdiği ancak en fazla bazal aktivite gösteren ADAMTS-3 promotor parçasının 616 bç'lik [-576/+40] olduğu belirlenmiştir. Dr. Öğr. Üy. M. Alper, ADAMTS-2 genine ait TS2 [-70/+110], TS2 [-214/+110], TS2 [-420/+110], TS2 [-658/+110] promotor parçalarını PCR tekniği ile klonlamıştır [173]. Bu doğrultuda tez kapsamında yapılan normoksik koşullar altında ADAMTS-2 genine ait promotor parçaları HUVEC hücre hattında araştırılmıştır. Bütün promotor parçaları aktivite

gösterirken, 768 bç'lik [-658/+110] promotor parçasının en fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

ADAMTS-2 geninin anti-anjiyogenik özelliği olduğu düşünülerek yapılan çalışmalar mevcuttur [167]. Dubail J. ve ark.'ca yapılan çalışmada ADAMTS-2 geni endotel hücrelerinde aşırı ifade ettirilmiş ve damarlaşma mekanizmasını bu şekilde azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. ADAMTS-3 geninin ise VEGF sitokini ile beraber kollojen sentezlenmesinde yardımcı bir faktör olarak bulunabileceği düşünülmekte ve çalışmalar yapılmaktadır [219]. Bu genler ayrıca embriyonik lenfogenez ve plasental damarlaşma dâhil anjiyogenezde rol oynamaktadır. Bu bilgilerin doğrultusunda tez çalışmasında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerine HUVEC hücre hattında 20 ng/mL VEGF uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda normoksik şartlarda ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 için mRNA ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu artışın normal oksijen koşullarında minimal seviyede olduğu tesbit edilmiştir. Transkripsiyonel aktivite açısından VEGF ile regülasyonu bakıldığında ise, yine ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 en büyük promotor parçalarının en fazla aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Damarlaşma sürecinde hücrenin oksijen yokluğu altında hipoksi denen sürece girdiği ve bununda anjiyogenez sürecini hızlandırdığı belirlenmiştir. Tümörleşme sürecinde tümörlü hücrenin agresif şekilde çoğalması nedeniyle tümör dokusunun dış yüzeylerinin oksijen ihtiyacını diğer dokulardan sağlarken tümör hücresinin iç kısmı hipoksik ortam bakımından zengin hale gelir. Bu süreçte oksijene bağımlı transkripsiyon faktörü (HIF-1), tümör hücrelerinin hayatta kalmalarını sağlar. Bu durumda vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve diğer birkaç sitokin ile (EPO, GLUT-1, ENO, iNOS, LDH) gen transkripsiyonu artar [220].

Normoksik ifadesinin belirlenmesinden sonra normoksik koşullarda ekspre olan bu genlerin hipoksik durumlarda VEGF ile nasıl bir ilişkisi olduğu sorusuyla yola çıkarak hipoksik deneyler kurulmuştur. ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 mRNA düzeyinde ki seviyeleri hipoksik ve normoksik durumlarda kıyaslanmıştır. Kimyasal indüklenmiş hipoksik durumlarda, HUVEC hücre hattında ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin anlamlı bir şekilde mRNA düzeyinde artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu da bize ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin hipoksik süreçte

etkili bir gen olduğunu bu bağlamda yürütülecek çalışmaların odak noktası olabileceğini göstermektedir.

Aynı zamanda hipoksik koşullarda VEGF sitokininin etkisi transkripsiyonel aktivitesi bakımından da değerlendirilmiştir. VEGF sitokininin ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 transkripsiyonel aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Hipoksik olarak bakıldığında ise bütün promotor parçalarının bazal aktivitelerinin olduğunu ancak en fazla aktivitenin 768 bç'lik [-658/+110] parçada olduğu belirlenmiştir. Bu bulgudan sonra VEGF ile regülasyonu bakıldığında ise 1380 bç ve 171 bç'lik promotor parçalarının VEGF ile regüle olduğu ve VEGF'in bu genler üzerine yaptığı artışın normal oksijen koşullarına göre çok yüksek olduğu belirlenmiştir.

ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin hipoksik ve normoksik koşullarda VEGF ile regüle olmasından sonra bu regülasyonda hangi yolları kullandığı ile ilgili deney dizaynı yapıldı. Normoksik koşullarda ADAMTS-2 geninin VEGF regüle ederken, PI3K ve p38 yollarını kullandığı tespit edilmiştir. ADAMTS-3 geninin ise VEGF regüle ederken ise aynı şekilde bu yolları kullandığı belirlenmiştir. Hipoksik koşullarda ise ADAMTS-2 geninin VEGF ile regülasyonunu map kinaz yolağı üzerinden ADAMTS-3 geninde ise map kinaz, jnk ve p38 yollarını kullandığı belirlendi.

Bu bulgudan sonra VEGF ile regülasyonu bakıldığında ise 1380 bç ve 171 bç'lik promotor parçalarının VEGF ile regüle olduğu belirlenmiştir. Bu regülasyondan sorumlu yollar incelendiğinde ise 1380 bç'lik parçada Jnk, map kinaz, PI3K, p38 yollarını anlamlı bir şekilde inhibe ederek regüle ettiği belirlenmiştir. 171 bç'nin ise map kinaz ve PI3K yollarını anlamlı bir şekilde inhibe ettiğini ayrıca JNK ve p38 yollarını kullanmadığı belirlenmiştir.

ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genine ait promotor parçası üzerinde bulunan transkripsiyon faktörlerinden biri olan HIF belki de HUVEC hücrelerinin hipoksidedeki bu regülasyonu sağlamaktadır. Bu kapsamda EMSA deneyleriyle böyle bir bağlanmanın varlığı araştırıldı ve ADAMTS-2 promotorunda [-379/-348] bölgesinde ADAMTS-3 promotorunda ise [-644/628] bölgesinde Saos-2 hücrelerinde hem normoksik hemde hipoksik koşullarda HIF-1 α transkripsiyon faktörü bağlanması bölgelerinin varolduğu belirlendi. Buda bize HIF-1 α 'nın ADAMTS-2 promotorunun

[-379/-348]'lik bölgesine bağlandığı gösterdi. ADAMTS-3 promotor bölgesine ait [-183/-152] ve [-1077/-1045] bölgelerinde yapılan deneyler doğrultusunda kompleks oluşmadığı bunun aksine [-969/-1000] bölgesinde düşük moleküler ağırlıklı bir kompleks oluştuğu bu kompleksin HIF-1 α konsensus dizisiyle yarışma sonunca kaybolup özgün olarak bu bölgeye bağlandığını gösterdi. ADAMTS-3 promotoruna ait diğer [-650/-619] bölgesinde ise normoksik koşullarda iki kompleks oluştuğu hipoksik koşullarda ise tek bir kompleksin oluştuğu belirlendi. Çalışma modeli olarak seçilen HUVEC hücre hattıyla ise bu bölge tarandığında hem normoksik hemde hipoksik koşullarda [-650/-619] bölgede iki kompleks belirlendi ve bu kompleks soğuk prob ile yarışmaya sokulduğunda kompleksin bağlanmasının azaldığını dolayısıyla HUVEC hücre hattında ADAMTS-3 promotorunda HIF-1 α 'nın [-650/-619] bölgesinde bağlandığı belirlendi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin mRNA'sı ve transkripsiyonel aktivitesi hipoksik koşullar altında arttığı ilk olarak gösterilmiştir. Aynı zamanda VEGF sitokininin ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 mRNA'larını ve transkripsiyonel aktivitelerini normal oksijen koşullarında ve düşük oksijen koşullarında arttırdığı ilk olarak tespit edilmiştir. Hipoksik koşullarda elde edilen VEGF sitokinine karşı cevabın daha dikkat çekici olduğu görülmüştür. Hücre içi VEGF sitokininin ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 mRNA'larında oluşturduğu artışın hangi hücre içi yolak sistemini kullanarak yaptığı sorusunda farklı yolak inhibitörlerinin oluşturdukları etkilerle değerlendirilmiştir. Normal oksijen koşullarında ve düşük oksijen koşullarında VEGF sitokininin farklı hücre içi yollarını kullanarak bu artışı gerçekleştirdiği mRNA ve transkripsiyonel aktivite açısından tespit edilmiştir. ADAMTS-2 ve ADAMTS-3 genlerinin hipoksik koşullarda belirlenen sonuçlar doğrultusunda bu genlere ait promotor bölgesinde HIF-1 α 'nın DNA protein etkileşimini sağlayıp sağlamadığı bu bölgeye spesifik dizayn edilen prolarla araştırıldığında Saos-2 hücre hattında bazı problemlerin ve HUVEC hücre hattında ise [-650/-619] bölgesinde HIF-1 α 'nın bağlandığı bununda regülasyonu sağlamış olabileceği ilk defa belirlendi.

Gelecekteki çalışmalarda mRNA ve transkripsiyonel aktivite açısından gösterilen bu etkilerin protein düzeyinde doğrulanması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Cines, D.B., Pollak, E.S., Buck, C.A., Loscalzo, J., Zimmerman, G.A., McEver, R.P., Pober, J.S., Wick, T.M., Konkle, B.A., Schwartz, B.S., Barnathan, E.S., McCrae, K.R., Hug, B.A., Schmidt, A.M., and Stern, D.M. Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders, *Blood*, 91(10), 3527-61.(1998).
- [2] Dvorak, H.F. Angiogenesis: Update 2005, *J Thromb Haemost*, 3(8), 1835-42.(2005).
- [3] Coultas, L., Chawengsaksophak, K., and Rossant, J. Endothelial Cells and Vegf in Vascular Development, *Nature*, 438(7070), 937-45.(2005).
- [4] Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis, *Cell*, 86(3), 353-64.(1996).
- [5] Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress, *Endocr Rev*, 25(4), 581-611.(2004).
- [6] Eklund, L. and Olsen, B.R. Tie Receptors and Their Angiopoietin Ligands Are Context-Dependent Regulators of Vascular Remodeling, *Exp Cell Res*, 312(5), 630-41.(2006).
- [7] Relf, M., LeJeune, S., Scott, P.A., Fox, S., Smith, K., Leek, R., Moghaddam, A., Whitehouse, R., Bicknell, R., and Harris, A.L. Expression of the Angiogenic Factors Vascular Endothelial Cell Growth Factor, Acidic and Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Growth Factor Beta-1, Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor, Placenta Growth Factor, and Pleiotrophin in Human Primary Breast Cancer and Its Relation to Angiogenesis, *Cancer Res*, 57(5), 963-9.(1997).
- [8] Pepper, M.S. Manipulating Angiogenesis. From Basic Science to the Bedside, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(4), 605-19.(1997).
- [9] Auguste, P., Lemiere, S., Larrieu-Lahargue, F., and Bikfalvi, A. Molecular Mechanisms of Tumor Vascularization, *Crit Rev Oncol Hematol*, 54(1), 53-61.(2005).
- [10] Patan, S., Munn, L.L., and Jain, R.K. Intussusceptive Microvascular Growth in a Human Colon Adenocarcinoma Xenograft: A Novel Mechanism of Tumor Angiogenesis, *Microvasc Res*, 51(2), 260-72.(1996).
- [11] Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. Vessel Cooption, Regression, and Growth in Tumors Mediated by Angiopoietins and Vegf, *Science*, 284(5422), 1994-8.(1999).
- [12] Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., and Munn, L.L. Mosaic Blood Vessels in Tumors: Frequency of Cancer Cells in Contact with Flowing Blood, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14608-13.(2000).
- [13] Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. Vascular Channel Formation by Human Melanoma Cells in Vivo and in Vitro: Vasculogenic Mimicry, *Am J Pathol*, 155(3), 739-52.(1999).

- [14] Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Hess, A.R., and Seftor, R.E. Vasculogenic Mimicry and Tumour-Cell Plasticity: Lessons from Melanoma, *Nat Rev Cancer*, 3(6), 411-21.(2003).
- [15] Koch, A.E. and Distler, O. Vasculopathy and Disordered Angiogenesis in Selected Rheumatic Diseases: Rheumatoid Arthritis and Systemic Sclerosis, *Arthritis Res Ther*, 9 Suppl 2, S3.(2007).
- [16] Less, J.R., Skalak, T.C., Sevick, E.M., and Jain, R.K. Microvascular Architecture in a Mammary Carcinoma: Branching Patterns and Vessel Dimensions, *Cancer Res*, 51(1), 265-73.(1991).
- [17] Algire, G.H., Chalkley, H.W., Earle, W.E., Legallais, F.Y., Park, H.D., Shelton, E., and Schilling, E.L. Vascular Reactions of Normal and Malignant Tissues in Vivo. Iii. Vascular Reactions' of Mice to Fibroblasts Treated in Vitro with Methylcholanthrene, *J Natl Cancer Inst*, 11(3), 555-580.(1950).
- [18] Jain, R.K. Molecular Regulation of Vessel Maturation, *Nat Med*, 9(6), 685-93.(2003).
- [19] Gerwins, P., Skoldenberg, E., and Claesson-Welsh, L. Function of Fibroblast Growth Factors and Vascular Endothelial Growth Factors and Their Receptors in Angiogenesis, *Crit Rev Oncol Hematol*, 34(3), 185-94.(2000).
- [20] Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis, *Pharmacol Rev*, 56(4), 549-80.(2004).
- [21] Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis, *Science*, 275(5302), 964-7.(1997).
- [22] Zammaretti, P. and Zisch, A.H. Adult 'Endothelial Progenitor Cells'. Renewing Vasculature, *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3), 493-503.(2005).
- [23] Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinckel, R., Helisch, A., and Schaper, W. Bone Marrow-Derived Cells Do Not Incorporate into the Adult Growing Vasculature, *Circ Res*, 94(2), 230-8.(2004).
- [24] Fantl, W.J., Johnson, D.E., and Williams, L.T. Signalling by Receptor Tyrosine Kinases, *Annu Rev Biochem*, 62, 453-81.(1993).
- [25] Hubbard, S.R. and Till, J.H. Protein Tyrosine Kinase Structure and Function, *Annu Rev Biochem*, 69, 373-98.(2000).
- [26] Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. Tumor Cells Secrete a Vascular Permeability Factor That Promotes Accumulation of Ascites Fluid, *Science*, 219(4587), 983-5.(1983).
- [27] Karpanen, T., Heckman, C.A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., and Alitalo, K. Functional Interaction of Vegf-C and Vegf-D with Neuropilin Receptors, *Faseb j*, 20(9), 1462-72.(2006).
- [28] Ito, Y., Yasuda, K., Takeda, N., Goto, S., Hayashi, M., Inoue, H., Aoyama, K., and Miura, K. Characterization of Insulin Receptors in the Bovine Adrenal Cortex and Medulla, *Endocrinol Jpn*, 39(2), 217-22.(1992).
- [29] Connolly, D.T., Heuvelman, D.M., Nelson, R., Olander, J.V., Eppley, B.L., Delfino, J.J., Siegel, N.R., Leimgruber, R.M., and Feder, J. Tumor Vascular Permeability Factor Stimulates Endothelial Cell Growth and Angiogenesis, *J Clin Invest*, 84(5), 1470-8.(1989).

- [30] Plouet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. Isolation and Characterization of a Newly Identified Endothelial Cell Mitogen Produced by Att-20 Cells, *Embo j*, 8(12), 3801-6.(1989).
- [31] Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., and Keshet, E. Vascular Endothelial Growth Factor Acts as a Survival Factor for Newly Formed Retinal Vessels and Has Implications for Retinopathy of Prematurity, *Nat Med*, 1(10), 1024-8.(1995).
- [32] Senger, D.R., Connolly, D.T., Van de Water, L., Feder, J., and Dvorak, H.F. Purification and N_h2-Terminal Amino Acid Sequence of Guinea Pig Tumor-Secreted Vascular Permeability Factor, *Cancer Res*, 50(6), 1774-8.(1990).
- [33] Ferrara, N. and Henzel, W.J. Pituitary Follicular Cells Secrete a Novel Heparin-Binding Growth Factor Specific for Vascular Endothelial Cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 161(2), 851-8.(1989).
- [34] Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V., and Ferrara, N. Vascular Endothelial Growth Factor Regulates Endothelial Cell Survival through the Phosphatidylinositol 3'-Kinase/Akt Signal Transduction Pathway. Requirement for Flk-1/Kdr Activation, *J Biol Chem*, 273(46), 30336-43.(1998).
- [35] Clauss, M., Gerlach, M., Gerlach, H., Brett, J., Wang, F., Familletti, P.C., Pan, Y.C., Olander, J.V., Connolly, D.T., and Stern, D. Vascular Permeability Factor: A Tumor-Derived Polypeptide That Induces Endothelial Cell and Monocyte Procoagulant Activity, and Promotes Monocyte Migration, *J Exp Med*, 172(6), 1535-45.(1990).
- [36] Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marme, D. Migration of Human Monocytes in Response to Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Is Mediated Via the Vegf Receptor Flt-1, *Blood*, 87(8), 3336-43.(1996).
- [37] Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. The Human Gene for Vascular Endothelial Growth Factor. Multiple Protein Forms Are Encoded through Alternative Exon Splicing, *J Biol Chem*, 266(18), 11947-54.(1991).
- [38] Guttmann-Raviv, N., Kessler, O., Shraga-Heled, N., Lange, T., Herzog, Y., and Neufeld, G. The Neuropilins and Their Role in Tumorigenesis and Tumor Progression, *Cancer Lett*, 231(1), 1-11.(2006).
- [39] Berse, B., Brown, L.F., Van de Water, L., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. Vascular Permeability Factor (Vascular Endothelial Growth Factor) Gene Is Expressed Differentially in Normal Tissues, Macrophages, and Tumors, *Mol Biol Cell*, 3(2), 211-20.(1992).
- [40] Maharaj, A.S., Saint-Geniez, M., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult, *Am J Pathol*, 168(2), 639-48.(2006).
- [41] Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. Abnormal Blood Vessel Development and Lethality in Embryos Lacking a Single Vegf Allele, *Nature*, 380(6573), 435-9.(1996).
- [42] Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. Heterozygous Embryonic Lethality Induced by Targeted Inactivation of the Vegf Gene, *Nature*, 380(6573), 439-42.(1996).

- [43] Robinson, C.J. and Stringer, S.E. The Splice Variants of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) and Their Receptors, *J Cell Sci*, 114(Pt 5), 853-65.(2001).
- [44] Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., and Ferrara, N. Dual Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioavailability by Genetic and Proteolytic Mechanisms, *J Biol Chem*, 267(36), 26031-7.(1992).
- [45] Nowak, D.G., Woolard, J., Amin, E.M., Konopatskaya, O., Saleem, M.A., Churchill, A.J., Lodomery, M.R., Harper, S.J., and Bates, D.O. Expression of Pro- and Anti-Angiogenic Isoforms of Vegf Is Differentially Regulated by Splicing and Growth Factors, *J Cell Sci*, 121(20), 3487-3495.(2008).
- [46] Olofsson, B., Pajusola, K., von Euler, G., Chilov, D., Alitalo, K., and Eriksson, U. Genomic Organization of the Mouse and Human Genes for Vascular Endothelial Growth Factor B (Vegf-B) and Characterization of a Second Splice Isoform, *J Biol Chem*, 271(32), 19310-7.(1996).
- [47] Iyer, S., Scotney, P.D., Nash, A.D., and Ravi Acharya, K. Crystal Structure of Human Vascular Endothelial Growth Factor-B: Identification of Amino Acids Important for Receptor Binding, *J Mol Biol*, 359(1), 76-85.(2006).
- [48] Lagercrantz, J., Farnebo, F., Larsson, C., Tvrdik, T., Weber, G., and Piehl, F. A Comparative Study of the Expression Patterns for Vegf, Vegf-B/Vrf and Vegf-C in the Developing and Adult Mouse, *Biochimica et biophysica acta*, 1398(2), 157-163.(1998).
- [49] Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkilä, P., Jääskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., von Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K., and Joensuu, H. Vascular Endothelial Growth Factors Vegf-B and Vegf-C Are Expressed in Human Tumors, *The American Journal of Pathology*, 153(1), 103-108.(1998).
- [50] Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. A Novel Vascular Endothelial Growth Factor, Vegf-C, Is a Ligand for the Flt4 (Vegfr-3) and Kdr (Vegfr-2) Receptor Tyrosine Kinases, *Embo j*, 15(2), 290-98.(1996).
- [51] Joukov, V., Sorsa, T., Kumar, V., Jeltsch, M., Claesson-Welsh, L., Cao, Y., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. Proteolytic Processing Regulates Receptor Specificity and Activity of Vegf-C, *Embo j*, 16(13), 3898-911.(1997).
- [52] Zhou, A., Webb, G., Zhu, X., and Steiner, D.F. Proteolytic Processing in the Secretory Pathway, *J Biol Chem*, 274(30), 20745-8.(1999).
- [53] Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V., and Alitalo, K. Genomic Organization of Human and Mouse Genes for Vascular Endothelial Growth Factor C, *J Biol Chem*, 272(40), 25176-83.(1997).
- [54] Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., and Alitalo, K. Vegf-C Receptor Binding and Pattern of Expression with Vegfr-3 Suggests a Role in Lymphatic Vascular Development, *Development*, 122(12), 3829-37.(1996).
- [55] Lymboussaki, A., Olofsson, B., Eriksson, U., and Alitalo, K. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) and Vegf-C Show Overlapping Binding Sites in Embryonic Endothelia and Distinct Sites in Differentiated Adult Endothelia, *Circ Res*, 85(11), 992-9.(1999).
- [56] Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N.G., and Khatib, A.M. The Secretory Proprotein

- Convertases Furin, Pc5, and Pc7 Activate Vegf-C to Induce Tumorigenesis, *J Clin Invest*, 111(11), 1723-32.(2003).
- [57] Su, J.L., Yang, P.C., Shih, J.Y., Yang, C.Y., Wei, L.H., Hsieh, C.Y., Chou, C.H., Jeng, Y.M., Wang, M.Y., Chang, K.J., Hung, M.C., and Kuo, M.L. The Vegf-C/Flt-4 Axis Promotes Invasion and Metastasis of Cancer Cells, *Cancer Cell*, 9(3), 209-23.(2006).
- [58] Han, F.H., Li, H.M., Zheng, D.H., He, Y.L., and Zhan, W.H. The Effect of the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf)-C and Vegf Receptor-3 on the Clinical Outcome in Patients with Gastric Carcinoma, *Eur J Surg Oncol*, 36(12), 1172-9.(2010).
- [59] Stacker, S.A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R.J., Moritz, R., Karpanen, T., Alitalo, K., and Achen, M.G. Biosynthesis of Vascular Endothelial Growth Factor-D Involves Proteolytic Processing Which Generates Non-Covalent Homodimers, *J Biol Chem*, 274(45), 32127-36.(1999).
- [60] Yamada, Y., Nezu, J., Shimane, M., and Hirata, Y. Molecular Cloning of a Novel Vascular Endothelial Growth Factor, Vegf-D, *Genomics*, 42(3), 483-8.(1997).
- [61] Rocchigiani, M., Lestingi, M., Luddi, A., Orlandini, M., Franco, B., Rossi, E., Ballabio, A., Zuffardi, O., and Oliviero, S. Human Figf: Cloning, Gene Structure, and Mapping to Chromosome Xp22.1 between the Piga and the Grpr Genes, *Genomics*, 47(2), 207-16.(1998).
- [62] Achen, M.G., Jeltsch, M., Kukk, E., Makinen, T., Vitali, A., Wilks, A.F., Alitalo, K., and Stacker, S.A. Vascular Endothelial Growth Factor D (Vegf-D) Is a Ligand for the Tyrosine Kinases Vegf Receptor 2 (Flk1) and Vegf Receptor 3 (Flt4), *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2), 548-53.(1998).
- [63] Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. Isolation of a Human Placenta Cdna Coding for a Protein Related to the Vascular Permeability Factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 9267-71.(1991).
- [64] Iyer, S., Leonidas, D.D., Swaminathan, G.J., Maglione, D., Battisti, M., Tucci, M., Persico, M.G., and Acharya, K.R. The Crystal Structure of Human Placenta Growth Factor-1 (Plgf-1), an Angiogenic Protein, at 2.0 Å Resolution, *J Biol Chem*, 276(15), 12153-61.(2001).
- [65] Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T., DiPalma, T., Dewerchin, M., Noel, A., Stalmans, I., Barra, A., Blacher, S., VandenDriessche, T., Ponten, A., Eriksson, U., Plate, K.H., Foidart, J.M., Schaper, W., Charnock-Jones, D.S., Hicklin, D.J., Herbert, J.M., Collen, D., and Persico, M.G. Synergism between Vascular Endothelial Growth Factor and Placental Growth Factor Contributes to Angiogenesis and Plasma Extravasation in Pathological Conditions, *Nat Med*, 7(5), 575-83.(2001).
- [66] Meyer, M., Clauss, M., Lepplé-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.J., and Dehio, C. A Novel Vascular Endothelial Growth Factor Encoded by Orf Virus, Vegf-E, Mediates Angiogenesis Via Signalling through Vegfr-2 (Kdr) but Not Vegfr-1 (Flt-1) Receptor Tyrosine Kinases, *Embo j*, 18(2), 363-374.(1999).
- [67] Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C.H. Different Signal Transduction Properties of Kdr and Flt1, Two

- Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor, *J Biol Chem*, 269(43), 26988-95.(1994).
- [68] Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., and Ferrara, N. Placenta Growth Factor. Potentiation of Vascular Endothelial Growth Factor Bioactivity, in Vitro and in Vivo, and High Affinity Binding to Flt-1 but Not to Flk-1/Kdr, *J Biol Chem*, 269(41), 25646-54.(1994).
- [69] Olofsson, B., Korpelainen, E., Pepper, M.S., Mandriota, S.J., Aase, K., Kumar, V., Gunji, Y., Jeltsch, M.M., Shibuya, M., Alitalo, K., and Eriksson, U. Vascular Endothelial Growth Factor B (Vegf-B) Binds to Vegf Receptor-1 and Regulates Plasminogen Activator Activity in Endothelial Cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11709-14.(1998).
- [70] de Vries, C., Escobedo, J.A., Ueno, H., Houck, K., Ferrara, N., and Williams, L.T. The Fms-Like Tyrosine Kinase, a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *Science*, 255(5047), 989-91.(1992).
- [71] Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. Role of the Flt-1 Receptor Tyrosine Kinase in Regulating the Assembly of Vascular Endothelium, *Nature*, 376(6535), 66-70.(1995).
- [72] Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. Flt-1 Lacking the Tyrosine Kinase Domain Is Sufficient for Normal Development and Angiogenesis in Mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9349-54.(1998).
- [73] Peters, K.G., De Vries, C., and Williams, L.T. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Expression During Embryogenesis and Tissue Repair Suggests a Role in Endothelial Differentiation and Blood Vessel Growth, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(19), 8915-9.(1993).
- [74] Quinn, T.P., Peters, K.G., De Vries, C., Ferrara, N., and Williams, L.T. Fetal Liver Kinase 1 Is a Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor and Is Selectively Expressed in Vascular Endothelium, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(16), 7533-7.(1993).
- [75] Kendall, R.L. and Thomas, K.A. Inhibition of Vascular Endothelial Cell Growth Factor Activity by an Endogenously Encoded Soluble Receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22), 10705-9.(1993).
- [76] Clark, D.E., Smith, S.K., He, Y., Day, K.A., Licence, D.R., Corps, A.N., Lammoglia, R., and Charnock-Jones, D.S. A Vascular Endothelial Growth Factor Antagonist Is Produced by the Human Placenta and Released into the Maternal Circulation, *Biol Reprod*, 59(6), 1540-8.(1998).
- [77] Robinson, C.J., Johnson, D.D., Chang, E.Y., Armstrong, D.M., and Wang, W. Evaluation of Placenta Growth Factor and Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 Receptor Levels in Mild and Severe Preeclampsia, *Am J Obstet Gynecol*, 195(1), 255-9.(2006).
- [78] Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. The Phosphorylated 1169-Tyrosine Containing Region of Flt-1 Kinase (Vegfr-1) Is a Major Binding Site for Plcgamma, *Biochem Biophys Res Commun*, 238(2), 487-91.(1997).
- [79] Olsson, A.K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. Vegf Receptor Signalling - in Control of Vascular Function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(5), 359-71.(2006).
- [80] Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., Kliche, S., Fellbrich, G., Ballmer-Hofer, K., Maglione, D., Mayr-Beyrle, U., Dewerchin,

- M., Dombrowski, S., Stanimirovic, D., Van Hummelen, P., Dehio, C., Hicklin, D.J., Persico, G., Herbert, J.M., Communi, D., Shibuya, M., Collen, D., Conway, E.M., and Carmeliet, P. Role of Plgf in the Intra- and Intermolecular Cross Talk between the Vegf Receptors Flt1 and Flk1, *Nat Med*, 9(7), 936-43.(2003).
- [81] Lastraioli, E., Romoli, M.R., and Arcangeli, A. Immunohistochemical Biomarkers in Gastric Cancer Research and Management, *Int J Surg Oncol*, 2012, 868645.(2012).
- [82] Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T.F., Pelletier, N., and Ferrara, N. Analysis of Biological Effects and Signaling Properties of Flt-1 (Vegfr-1) and Kdr (Vegfr-2). A Reassessment Using Novel Receptor-Specific Vascular Endothelial Growth Factor Mutants, *J Biol Chem*, 276(5), 3222-30.(2001).
- [83] Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. A Single Autophosphorylation Site on Kdr/Flk-1 Is Essential for Vegf-a-Dependent Activation of Plc-Gamma and DNA Synthesis in Vascular Endothelial Cells, *Embo j*, 20(11), 2768-78.(2001).
- [84] Bernatchez, P.N., Soker, S., and Sirois, M.G. Vascular Endothelial Growth Factor Effect on Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Platelet-Activating Factor Synthesis Is Flk-1-Dependent, *J Biol Chem*, 274(43), 31047-54.(1999).
- [85] Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. Failure of Blood-Island Formation and Vasculogenesis in Flk-1-Deficient Mice, *Nature*, 376(6535), 62-6.(1995).
- [86] Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J.H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A., and Claesson-Welsh, L. Vegf Receptor-2 Y951 Signaling and a Role for the Adapter Molecule Tsad in Tumor Angiogenesis, *Embo j*, 24(13), 2342-53.(2005).
- [87] Shibuya, M. and Claesson-Welsh, L. Signal Transduction by Vegf Receptors in Regulation of Angiogenesis and Lymphangiogenesis, *Exp Cell Res*, 312(5), 549-60.(2006).
- [88] Kendall, R.L., Rutledge, R.Z., Mao, X., Tebben, A.J., Hungate, R.W., and Thomas, K.A. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Kdr Tyrosine Kinase Activity Is Increased by Autophosphorylation of Two Activation Loop Tyrosine Residues, *J Biol Chem*, 274(10), 6453-60.(1999).
- [89] Holmqvist, K., Cross, M.J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. The Adaptor Protein Shb Binds to Tyrosine 1175 in Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Receptor-2 and Regulates Vegf-Dependent Cellular Migration, *J Biol Chem*, 279(21), 22267-75.(2004).
- [90] Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J., and Ferrara, N. Differential Transcriptional Regulation of the Two Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Genes. Flt-1, but Not Flk-1/Kdr, Is up-Regulated by Hypoxia, *J Biol Chem*, 272(38), 23659-67.(1997).
- [91] Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., and Alitalo, K. Flt4 Receptor Tyrosine Kinase Contains Seven Immunoglobulin-Like Loops and Is Expressed in Multiple Human Tissues and Cell Lines, *Cancer Res*, 52(20), 5738-43.(1992).

- [92] Galland, F., Karamysheva, A., Pebusque, M.J., Borg, J.P., Rottapel, R., Dubreuil, P., Rosnet, O., and Birnbaum, D. The Flt4 Gene Encodes a Transmembrane Tyrosine Kinase Related to the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, *Oncogene*, 8(5), 1233-40.(1993).
- [93] Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van Hinsbergh, V.W., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., and Alitalo, K. Expression of the Fms-Like Tyrosine Kinase 4 Gene Becomes Restricted to Lymphatic Endothelium During Development, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(8), 3566-70.(1995).
- [94] Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., and Alitalo, K. Cardiovascular Failure in Mouse Embryos Deficient in Vegf Receptor-3, *Science*, 282(5390), 946-9.(1998).
- [95] Nilsson, I., Rolny, C., Wu, Y., Pytowski, B., Hicklin, D., Alitalo, K., Claesson-Welsh, L., and Wennstrom, S. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 in Hypoxia-Induced Vascular Development, *Faseb j*, 18(13), 1507-15.(2004).
- [96] Dixelius, J., Makinen, T., Wirzenius, M., Karkkainen, M.J., Wernstedt, C., Alitalo, K., and Claesson-Welsh, L. Ligand-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 (Vegfr-3) Heterodimerization with Vegfr-2 in Primary Lymphatic Endothelial Cells Regulates Tyrosine Phosphorylation Sites, *J Biol Chem*, 278(42), 40973-9.(2003).
- [97] Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *Cell*, 92(6), 735-45.(1998).
- [98] Takagi, S., Hirata, T., Agata, K., Mochii, M., Eguchi, G., and Fujisawa, H. The A5 Antigen, a Candidate for the Neuronal Recognition Molecule, Has Homologies to Complement Components and Coagulation Factors, *Neuron*, 7(2), 295-307.(1991).
- [99] Takagi, S., Kasuya, Y., Shimizu, M., Matsuura, T., Tsuboi, M., Kawakami, A., and Fujisawa, H. Expression of a Cell Adhesion Molecule, Neuropilin, in the Developing Chick Nervous System, *Dev Biol*, 170(1), 207-22.(1995).
- [100] Chen, H., Bagri, A., Zupicich, J.A., Zou, Y., Stoeckli, E., Pleasure, S.J., Lowenstein, D.H., Skarnes, W.C., Chedotal, A., and Tessier-Lavigne, M. Neuropilin-2 Regulates the Development of Selective Cranial and Sensory Nerves and Hippocampal Mossy Fiber Projections, *Neuron*, 25(1), 43-56.(2000).
- [101] Bielenberg, D.R., Pettaway, C.A., Takashima, S., and Klagsbrun, M. Neuropilins in Neoplasms: Expression, Regulation, and Function, *Exp Cell Res*, 312(5), 584-593.(2006).
- [102] Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. Overexpression of a Membrane Protein, Neuropilin, in Chimeric Mice Causes Anomalies in the Cardiovascular System, Nervous System and Limbs, *Development*, 121(12), 4309-18.(1995).
- [103] Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. Neuropilin-Semaphorin Iii/D-Mediated Chemorepulsive Signals Play a Crucial Role in Peripheral Nerve Projection in Mice, *Neuron*, 19(5), 995-1005.(1997).
- [104] Parikh, A.A., Fan, F., Liu, W.B., Ahmad, S.A., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bielenberg, D., Bucana, C.D., Klagsbrun, M., and Ellis, L.M. Neuropilin-1

- in Human Colon Cancer: Expression, Regulation, and Role in Induction of Angiogenesis, *Am J Pathol*, 164(6), 2139-51.(2004).
- [105] Oh, H., Takagi, H., Otani, A., Koyama, S., Kemmochi, S., Uemura, A., and Honda, Y. Selective Induction of Neuropilin-1 by Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf): A Mechanism Contributing to Vegf-Induced Angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 383-8.(2002).
- [106] Parikh, A.A., Liu, W.B., Fan, F., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bruns, C.J., Bucana, C.D., Evans, D.B., and Ellis, L.M. Expression and Regulation of the Novel Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Neuropilin-1 by Epidermal Growth Factor in Human Pancreatic Carcinoma, *Cancer*, 98(4), 720-9.(2003).
- [107] Akagi, M., Kawaguchi, M., Liu, W., McCarty, M.F., Takeda, A., Fan, F., Stoeltzing, O., Parikh, A.A., Jung, Y.D., Bucana, C.D., Mansfield, P.F., Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. Induction of Neuropilin-1 and Vascular Endothelial Growth Factor by Epidermal Growth Factor in Human Gastric Cancer Cells, *British Journal of Cancer*, 88(5), 796-802.(2003).
- [108] Ottino, P., Finley, J., Rojo, E., Ottlecz, A., Lambrou, G.N., Bazan, H.E., and Bazan, N.G. Hypoxia Activates Matrix Metalloproteinase Expression and the Vegf System in Monkey Choroid-Retinal Endothelial Cells: Involvement of Cytosolic Phospholipase A2 Activity, *Mol Vis*, 10, 341-50.(2004).
- [109] Fujita, H., Zhang, B., Sato, K., Tanaka, J., and Sakanaka, M. Expressions of Neuropilin-1, Neuropilin-2 and Semaphorin 3a Mrna in the Rat Brain after Middle Cerebral Artery Occlusion, *Brain Res*, 914(1-2), 1-14.(2001).
- [110] Pepper, M.S. Role of the Matrix Metalloproteinase and Plasminogen Activator-Plasmin Systems in Angiogenesis, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(7), 1104-17.(2001).
- [111] Mignatti, P. and Rifkin, D.B. Biology and Biochemistry of Proteinases in Tumor Invasion, *Physiol Rev*, 73(1), 161-95.(1993).
- [112] Flaumenhaft, R. and Rifkin, D.B. The Extracellular Regulation of Growth Factor Action, *Molecular Biology of the Cell*, 3(10), 1057-1065.(1992).
- [113] Duffy, M.J. The Urokinase Plasminogen Activator System: Role in Malignancy, *Curr Pharm Des*, 10(1), 39-49.(2004).
- [114] Overall, C.M. and Kleifeld, O. Tumour Microenvironment - Opinion: Validating Matrix Metalloproteinases as Drug Targets and Anti-Targets for Cancer Therapy, *Nat Rev Cancer*, 6(3), 227-39.(2006).
- [115] Roy, R., Zhang, B., and Moses, M.A. Making the Cut: Protease-Mediated Regulation of Angiogenesis, *Exp Cell Res*, 312(5), 608-622.(2006).
- [116] Kelwick, R., Desanlis, I., Wheeler, G.N., and Edwards, D.R. The Adamts (a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs) Family, *Genome Biology*, 16(1), 113.(2015).
- [117] Apte, S.S. A Disintegrin-Like and Metalloprotease (Reprolysin-Type) with Thrombospondin Type 1 Motif (Adamts) Superfamily: Functions and Mechanisms, *J Biol Chem*, 284(46), 31493-31497.(2009).
- [118] Gomis-Ruth, F.X. Catalytic Domain Architecture of Metzincin Metalloproteases, *J Biol Chem*, 284(23), 15353-7.(2009).
- [119] Roskoski, R., Jr. Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Signaling in Tumor Progression, *Crit Rev Oncol Hematol*, 62(3), 179-213.(2007).
- [120] Rodriguez-Manzaneque, J.C., Milchanowski, A.B., Dufour, E.K., Leduc, R., and Iruela-Arispe, M.L. Characterization of Meth-1/Adamts1 Processing Reveals Two Distinct Active Forms, *J Biol Chem*, 275(43), 33471-9.(2000).

- [121] Longpre, J.M., McCulloch, D.R., Koo, B.H., Alexander, J.P., Apte, S.S., and Leduc, R. Characterization of Proadamts5 Processing by Proprotein Convertases, *Int J Biochem Cell Biol*, 41(5), 1116-26.(2009).
- [122] Koo, B.H., Longpre, J.M., Somerville, R.P., Alexander, J.P., Leduc, R., and Apte, S.S. Regulation of Adamts9 Secretion and Enzymatic Activity by Its Propeptide, *J Biol Chem*, 282(22), 16146-54.(2007).
- [123] Edwards, D.R., Handsley, M.M., and Pennington, C.J. The Adam Metalloproteinases, *Mol Aspects Med*, 29(5), 258-89.(2008).
- [124] Gomis-Ruth, F.X. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases, *Mol Biotechnol*, 24(2), 157-202.(2003).
- [125] Gerhardt, S., Hassall, G., Hawtin, P., McCall, E., Flavell, L., Minshull, C., Hargreaves, D., Ting, A., Pauptit, R.A., Parker, A.E., and Abbott, W.M. Crystal Structures of Human Adamts-1 Reveal a Conserved Catalytic Domain and a Disintegrin-Like Domain with a Fold Homologous to Cysteine-Rich Domains, *J Mol Biol*, 373(4), 891-902.(2007).
- [126] Mosyak, L., Georgiadis, K., Shane, T., Svenson, K., Hebert, T., McDonagh, T., Mackie, S., Olland, S., Lin, L., Zhong, X., Kriz, R., Reifenberg, E.L., Collins-Racie, L.A., Corcoran, C., Freeman, B., Zollner, R., Marvell, T., Vera, M., Sum, P.-E., Lavallie, E.R., Stahl, M., and Somers, W. Crystal Structures of the Two Major Aggrecan Degrading Enzymes, Adamts4 and Adamts5, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 17(1), 16-21.(2008).
- [127] Adams, J.C. and Lawler, J. The Thrombospondins, *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(10), a009712.(2011).
- [128] Dubail, J. and Apte, S.S. Insights on Adamts Proteases and Adamts-Like Proteins from Mammalian Genetics, *Matrix Biol*, 44-46, 24-37.(2015).
- [129] Stanton, H., Melrose, J., Little, C.B., and Fosang, A.J. Proteoglycan Degradation by the Adamts Family of Proteinases, *Biochimica et biophysica acta*, 1812(12), 1616-29.(2011).
- [130] Vazquez, F., Hastings, G., Ortega, M.A., Lane, T.F., Oikemus, S., Lombardo, M., and Iruela-Arispe, M.L. Meth-1, a Human Ortholog of Adamts-1, and Meth-2 Are Members of a New Family of Proteins with Angio-Inhibitory Activity, *J Biol Chem*, 274(33), 23349-57.(1999).
- [131] Colige, A., Vandenberghe, I., Thiry, M., Lambert, C.A., Van Beeumen, J., Li, S.W., Prockop, D.J., Lapiere, C.M., and Nusgens, B.V. Cloning and Characterization of Adamts-14, a Novel Adamts Displaying High Homology with Adamts-2 and Adamts-3, *J Biol Chem*, 277(8), 5756-66.(2002).
- [132] Fujikawa, K., Suzuki, H., McMullen, B., and Chung, D. Purification of Human Von Willebrand Factor-Cleaving Protease and Its Identification as a New Member of the Metalloproteinase Family, *Blood*, 98(6), 1662-6.(2001).
- [133] Bai, X.-H., Wang, D.-W., Kong, L., Zhang, Y., Luan, Y., Kobayashi, T., Kronenberg, H.M., Yu, X.-P., and Liu, C.-j. Adamts-7, a Direct Target of Pthrp, Adversely Regulates Endochondral Bone Growth by Associating with and Inactivating Gp Growth Factor, *Molecular and Cellular Biology*, 29(15), 4201-4219.(2009).
- [134] Liu, C.J., Kong, W., Xu, K., Luan, Y., Ilalov, K., Sehgal, B., Yu, S., Howell, R.D., and Di Cesare, P.E. Adamts-12 Associates with and Degrades Cartilage Oligomeric Matrix Protein, *J Biol Chem*, 281(23), 15800-8.(2006).
- [135] Somerville, R.P., Longpre, J.M., Apel, E.D., Lewis, R.M., Wang, L.W., Sanes, J.R., Leduc, R., and Apte, S.S. Adamts7b, the Full-Length Product of

- the Adamts7 Gene, Is a Chondroitin Sulfate Proteoglycan Containing a Mucin Domain, *J Biol Chem*, 279(34), 35159-75.(2004).
- [136] Huxley-Jones, J., Apte, S.S., Robertson, D.L., and Boot-Handford, R.P. The Characterisation of Six Adamts Proteases in the Basal Chordate *Ciona Intestinalis* Provides New Insights into the Vertebrate Adamts Family, *Int J Biochem Cell Biol*, 37(9), 1838-45.(2005).
- [137] Nicholson, A.C., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Jr., and Van Meir, E.G. Functional Evolution of Adamts Genes: Evidence from Analyses of Phylogeny and Gene Organization, *BMC Evol Biol*, 5, 11.(2005).
- [138] Angerer, L., Hussain, S., Wei, Z., and Livingston, B.T. Sea Urchin Metalloproteases: A Genomic Survey of the Bmp-1/Tolloid-Like, Mmp and Adam Families, *Dev Biol*, 300(1), 267-81.(2006).
- [139] Brocker, C.N., Vasiliou, V., and Nebert, D.W. Evolutionary Divergence and Functions of the Adam and Adamts Gene Families, *Hum Genomics*, 4(1), 43-55.(2009).
- [140] Brunet, F.G., Fraser, F.W., Binder, M.J., Smith, A.D., Kintakas, C., Dancevic, C.M., Ward, A.C., and McCulloch, D.R. The Evolutionary Conservation of the a Disintegrin-Like and Metalloproteinase Domain with Thrombospondin-1 Motif Metzincins across Vertebrate Species and Their Expression in Teleost Zebrafish, *BMC Evol Biol*, 15, 22.(2015).
- [141] Lin, E.A. and Liu, C.J. The Role of Adamtss in Arthritis, *Protein Cell*, 1(1), 33-47.(2010).
- [142] Rocks, N., Paulissen, G., El Hour, M., Quesada, F., Crahay, C., Gueders, M., Foidart, J.M., Noel, A., and Cataldo, D. Emerging Roles of Adam and Adamts Metalloproteinases in Cancer, *Biochimie*, 90(2), 369-79.(2008).
- [143] Wagstaff, L., Kelwick, R., Decock, J., and Edwards, D.R. The Roles of Adamts Metalloproteinases in Tumorigenesis and Metastasis, *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1861-72.(2011).
- [144] Kumar, S., Rao, N., and Ge, R. Emerging Roles of Adamtss in Angiogenesis and Cancer, *Cancers*, 4(4), 1252.(2012).
- [145] Noel, A., Gutierrez-Fernandez, A., Sounni, N.E., Behrendt, N., Maquoi, E., Lund, I.K., Cal, S., Hoyer-Hansen, G., and Lopez-Otin, C. New and Paradoxical Roles of Matrix Metalloproteinases in the Tumor Microenvironment, *Front Pharmacol*, 3, 140.(2012).
- [146] Cal, S. and López-Otín, C. Adamts Proteases and Cancer, *Matrix Biology*, 44-46, 77-85.(2015).
- [147] Salter, R.C., Ashlin, T.G., Kwan, A.P., and Ramji, D.P. Adamts Proteases: Key Roles in Atherosclerosis?, *J Mol Med (Berl)*, 88(12), 1203-11.(2010).
- [148] Gottschall, P.E. and Howell, M.D. Adamts Expression and Function in Central Nervous System Injury and Disorders, *Matrix Biol*, 44-46, 70-6.(2015).
- [149] Nusgens, B.V., Verellen-Dumoulin, C., Hermanns-Le, T., De Paepe, A., Nuytinck, L., Pierard, G.E., and Lapiere, C.M. Evidence for a Relationship between Ehlers-Danlos Type Vii C in Humans and Bovine Dermatosparaxis, *Nat Genet*, 1(3), 214-7.(1992).
- [150] Levy, G.G., Nichols, W.C., Lian, E.C., Foroud, T., McClintick, J.N., McGee, B.M., Yang, A.Y., Siemieniak, D.R., Stark, K.R., Gruppo, R., Sarode, R., Shurin, S.B., Chandrasekaran, V., Stabler, S.P., Sabio, H., Bouhassira, E.E., Upshaw, J.D., Jr., Ginsburg, D., and Tsai, H.M. Mutations in a Member of

- the Adamts Gene Family Cause Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, *Nature*, 413(6855), 488-94.(2001).
- [151] Dagonneau, N., Benoist-Lasselin, C., Huber, C., Faivre, L., Mégarbané, A., Alswaid, A., Dollfus, H., Alembik, Y., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., and Cormier-Daire, V. Adamts10 Mutations in Autosomal Recessive Weill-Marchesani Syndrome, *Am J Hum Genet*, 75(5), 801-806.(2004).
- [152] Morales, J., Al-Sharif, L., Khalil, D.S., Shinwari, J.M., Bavi, P., Al-Mahrouqi, R.A., Al-Rajhi, A., Alkuraya, F.S., Meyer, B.F., and Al Tassan, N. Homozygous Mutations in Adamts10 and Adamts17 Cause Lenticular Myopia, Ectopia Lentis, Glaucoma, Spherophakia, and Short Stature, *Am J Hum Genet*, 85(5), 558-68.(2009).
- [153] Aldahmesh, M.A., Khan, A.O., Mohamed, J.Y., Alkuraya, H., Ahmed, H., Bobis, S., Al-Mesfer, S., and Alkuraya, F.S. Identification of Adamts18 as a Gene Mutated in Knobloch Syndrome, *J Med Genet*, 48(9), 597-601.(2011).
- [154] Peluso, I., Conte, I., Testa, F., Dharmalingam, G., Pizzo, M., Collin, R.W., Meola, N., Barbato, S., Mutarelli, M., Ziviello, C., Barbarulo, A.M., Nigro, V., Melone, M.A., Simonelli, F., and Banfi, S. The Adamts18 Gene Is Responsible for Autosomal Recessive Early Onset Severe Retinal Dystrophy, *Orphanet J Rare Dis*, 8, 16.(2013).
- [155] Mjaatvedt, C.H., Yamamura, H., Capehart, A.A., Turner, D., and Markwald, R.R. The Cspg2 Gene, Disrupted in the Hdf Mutant, Is Required for Right Cardiac Chamber and Endocardial Cushion Formation, *Dev Biol*, 202(1), 56-66.(1998).
- [156] Nandadasa, S., Foulcer, S., and Apte, S.S. The Multiple, Complex Roles of Versican and Its Proteolytic Turnover by Adamts Proteases During Embryogenesis, *Matrix Biol*, 35, 34-41.(2014).
- [157] Sandy, J.D., Westling, J., Kenagy, R.D., Iruela-Arispe, M.L., Verscharen, C., Rodriguez-Mazaneque, J.C., Zimmermann, D.R., Lemire, J.M., Fischer, J.W., Wight, T.N., and Clowes, A.W. Versican V1 Proteolysis in Human Aorta in Vivo Occurs at the Glu441-Ala442 Bond, a Site That Is Cleaved by Recombinant Adamts-1 and Adamts-4, *J Biol Chem*, 276(16), 13372-8.(2001).
- [158] Russell, D.L., Doyle, K.M., Ochsner, S.A., Sandy, J.D., and Richards, J.S. Processing and Localization of Adamts-1 and Proteolytic Cleavage of Versican During Cumulus Matrix Expansion and Ovulation, *J Biol Chem*, 278(43), 42330-9.(2003).
- [159] Kintakas, C. and McCulloch, D.R. Emerging Roles for Adamts5 During Development and Disease, *Matrix Biol*, 30(5-6), 311-7.(2011).
- [160] Kern, C.B., Wessels, A., McGarity, J., Dixon, L.J., Alston, E., Argraves, W.S., Geeting, D., Nelson, C.M., Menick, D.R., and Apte, S.S. Reduced Versican Cleavage Due to Adamts9 Haploinsufficiency Is Associated with Cardiac and Aortic Anomalies, *Matrix Biol*, 29(4), 304-16.(2010).
- [161] Dupuis, L.E., McCulloch, D.R., McGarity, J.D., Bahan, A., Wessels, A., Weber, D., Diminich, A.M., Nelson, C.M., Apte, S.S., and Kern, C.B. Altered Versican Cleavage in Adamts5 Deficient Mice; a Novel Etiology of Myxomatous Valve Disease, *Dev Biol*, 357(1), 152-64.(2011).
- [162] Hattori, N., Carrino, D.A., Lauer, M.E., Vasanji, A., Wylie, J.D., Nelson, C.M., and Apte, S.S. Pericellular Versican Regulates the Fibroblast-Myofibroblast Transition: A Role for Adamts5 Protease-Mediated Proteolysis, *J Biol Chem*, 286(39), 34298-310.(2011).

- [163] McCulloch, D.R., Nelson, C.M., Dixon, L.J., Silver, D.L., Wylie, J.D., Lindner, V., Sasaki, T., Cooley, M.A., Argraves, W.S., and Apte, S.S. Adamts Metalloproteases Generate Active Versican Fragments That Regulate Interdigital Web Regression, *Dev Cell*, 17(5), 687-98.(2009).
- [164] Silver, D.L., Hou, L., Somerville, R., Young, M.E., Apte, S.S., and Pavan, W.J. The Secreted Metalloprotease Adamts20 Is Required for Melanoblast Survival, *PLoS Genet*, 4(2), e1000003.(2008).
- [165] Shindo, T., Kurihara, H., Kuno, K., Yokoyama, H., Wada, T., Kurihara, Y., Imai, T., Wang, Y., Ogata, M., Nishimatsu, H., Moriyama, N., Oh-hashii, Y., Morita, H., Ishikawa, T., Nagai, R., Yazaki, Y., and Matsushima, K. Adamts-1: A Metalloproteinase-Disintegrin Essential for Normal Growth, Fertility, and Organ Morphology and Function, *Journal of Clinical Investigation*, 105(10), 1345-1352.(2000).
- [166] Mittaz, L., Russell, D.L., Wilson, T., Brasted, M., Tkalcevic, J., Salamonsen, L.A., Hertzog, P.J., and Pritchard, M.A. Adamts-1 Is Essential for the Development and Function of the Urogenital System, *Biol Reprod*, 70(4), 1096-105.(2004).
- [167] Dubail, J., Kesteloot, F., Deroanne, C., Motte, P., Lambert, V., Rakic, J.M., Lapiere, C., Nusgens, B., and Colige, A. Adamts-2 Functions as Anti-Angiogenic and Anti-Tumoral Molecule Independently of Its Catalytic Activity, *Cell Mol Life Sci*, 67(24), 4213-32.(2010).
- [168] Tota, G., Coccaro, N., Zagaria, A., Anelli, L., Casieri, P., Cellamare, A., Minervini, A., Minervini, C.F., Brunetti, C., Impera, L., Carluccio, P., Cumbo, C., Specchia, G., and Albano, F. Adamts2 Gene Dysregulation in T/Myeloid Mixed Phenotype Acute Leukemia, *BMC Cancer*, 14, 963.(2014).
- [169] Le Goff, C., Somerville, R.P., Kesteloot, F., Powell, K., Birk, D.E., Colige, A.C., and Apte, S.S. Regulation of Procollagen Amino-Propeptide Processing During Mouse Embryogenesis by Specialization of Homologous Adamts Proteases: Insights on Collagen Biosynthesis and Dermatosparaxis, *Development*, 133(8), 1587-96.(2006).
- [170] Wang, X., Chen, W., Zhang, J., Khan, A., Li, L., Huang, F., Qiu, Z., Wang, L., and Chen, X. Critical Role of Adamts2 (a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2) in Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload, *Hypertension*, 69(6), 1060-1069.(2017).
- [171] Colige, A., Ruggiero, F., Vandenberghe, I., Dubail, J., Kesteloot, F., Van Beeumen, J., Beschin, A., Brys, L., Lapiere, C.M., and Nusgens, B. Domains and Maturation Processes That Regulate the Activity of Adamts-2, a Metalloproteinase Cleaving the Aminopropeptide of Fibrillar Procollagens Types I-III and V, *J Biol Chem*, 280(41), 34397-408.(2005).
- [172] Shen, N., Yan, F., Pang, J., Wu, L.C., Al-Kali, A., Litzow, M.R., and Liu, S. A Nucleolin-Dnmt1 Regulatory Axis in Acute Myeloid Leukemogenesis, *Oncotarget*, 5(14), 5494-509.(2014).
- [173] Alper, M. and Kockar, F. Il-6 Upregulates a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 2 (Adamts-2) in Human Osteosarcoma Cells Mediated by Jnk Pathway, *Mol Cell Biochem*, 393(1-2), 165-75.(2014).
- [174] Janssen, L., Dupont, L., Bekhouche, M., Noel, A., Leduc, C., Voz, M., Peers, B., Cataldo, D., Apte, S.S., Dubail, J., and Colige, A. Adamts3 Activity Is Mandatory for Embryonic Lymphangiogenesis and Regulates Placental Angiogenesis, *Angiogenesis*, 19(1), 53-65.(2016).

- [175] Jeltsch, M., Jha, S.K., Tvorogov, D., Anisimov, A., Leppanen, V.M., Holopainen, T., Kivela, R., Ortega, S., Karpanen, T., and Alitalo, K. Ccbe1 Enhances Lymphangiogenesis Via a Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin Motifs-3-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor-C Activation, *Circulation*, 129(19), 1962-71.(2014).
- [176] Fernandes, R.J., Hirohata, S., Engle, J.M., Colige, A., Cohn, D.H., Eyre, D.R., and Apte, S.S. Procollagen Ii Amino Propeptide Processing by Adamts-3. Insights on Dermatosparaxis, *J Biol Chem*, 276(34), 31502-9.(2001).
- [177] Ogino, H., Hisanaga, A., Kohno, T., Kondo, Y., Okumura, K., Kamei, T., Sato, T., Asahara, H., Tsuiji, H., Fukata, M., and Hattori, M. Secreted Metalloproteinase Adamts-3 Inactivates Reelin, *J Neurosci*, 37(12), 3181-3191.(2017).
- [178] Semenza, G.L. Oxygen Sensing, Hypoxia-Inducible Factors, and Disease Pathophysiology, *Annu Rev Pathol*, 9, 47-71.(2014).
- [179] Rankin, E.B. and Giaccia, A.J. Hypoxic Control of Metastasis, *Science*, 352(6282), 175-80.(2016).
- [180] Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M., and Antonarakis, S.E. Hypoxia-Inducible Nuclear Factors Bind to an Enhancer Element Located 3' to the Human Erythropoietin Gene, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(13), 5680-5684.(1991).
- [181] Balamurugan, K. Hif-1 at the Crossroads of Hypoxia, Inflammation, and Cancer, *Int J Cancer*, 138(5), 1058-66.(2016).
- [182] Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Basic-Helix-Loop-Helix-Pas Heterodimer Regulated by Cellular O₂ Tension, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), 5510-5514.(1995).
- [183] Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., and Semenza, G.L. Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1, *J Biol Chem*, 271(30), 17771-8.(1996).
- [184] Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., and Poellinger, L. Signal Transduction in Hypoxic Cells: Inducible Nuclear Translocation and Recruitment of the Cbp/P300 Coactivator by the Hypoxia-Inducible Factor-1alpha, *Embo j*, 17(22), 6573-6586.(1998).
- [185] Epstein, A.C.R., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.-M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. C. Elegans Egl-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases That Regulate Hif by Prolyl Hydroxylation, *Cell*, 107(1), 43-54.(2001).
- [186] Jewell, U.R., Kvietikova, I., Scheid, A., Bauer, C., Wenger, R.H., and Gassmann, M. Induction of Hif-1alpha in Response to Hypoxia Is Instantaneous, *Faseb j*, 15(7), 1312-4.(2001).
- [187] Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J., and Kim, K.W. Regulation and Destabilization of Hif-1alpha by Arid1-Mediated Acetylation, *Cell*, 111(5), 709-20.(2002).
- [188] Huang, L.E., Pete, E.A., Schau, M., Milligan, J., and Gu, J. Leu-574 of Hif-1alpha Is Essential for the Von Hippel-Lindau (Vhl)-Mediated Degradation Pathway, *J Biol Chem*, 277(44), 41750-5.(2002).
- [189] Berta, M.A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., and Brahimi-Horn, M.C. Sumoylation of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Reduces Its

- Transcriptional Activity, *Biochem Biophys Res Commun*, 360(3), 646-52.(2007).
- [190] Ke, Q. and Costa, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (Hif-1), *Mol Pharmacol*, 70(5), 1469-80.(2006).
- [191] Kuschel, A., Simon, P., and Tug, S. Functional Regulation of Hif-1alpha under Normoxia--Is There More Than Post-Translational Regulation?, *J Cell Physiol*, 227(2), 514-24.(2012).
- [192] Agani, F. and Jiang, B.H. Oxygen-Independent Regulation of Hif-1: Novel Involvement of Pi3k/Akt/Mtor Pathway in Cancer, *Curr Cancer Drug Targets*, 13(3), 245-51.(2013).
- [193] Sun, Q., Chen, X., Ma, J., Peng, H., Wang, F., Zha, X., Wang, Y., Jing, Y., Yang, H., Chen, R., Chang, L., Zhang, Y., Goto, J., Onda, H., Chen, T., Wang, M.R., Lu, Y., You, H., Kwiatkowski, D., and Zhang, H. Mammalian Target of Rapamycin up-Regulation of Pyruvate Kinase Isoenzyme Type M2 Is Critical for Aerobic Glycolysis and Tumor Growth, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(10), 4129-34.(2011).
- [194] Lau, C.K., Yang, Z.F., Ho, D.W., Ng, M.N., Yeoh, G.C., Poon, R.T., and Fan, S.T. An Akt/Hypoxia-Inducible Factor-1alpha/Platelet-Derived Growth Factor-Bb Autocrine Loop Mediates Hypoxia-Induced Chemoresistance in Liver Cancer Cells and Tumorigenic Hepatic Progenitor Cells, *Clin Cancer Res*, 15(10), 3462-71.(2009).
- [195] Biswas, S., Mukherjee, R., Tapryal, N., Singh, A.K., and Mukhopadhyay, C.K. Insulin Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1 α Transcription by Reactive Oxygen Species Sensitive Activation of Sp1 in 3t3-L1 Preadipocyte, *PLoS One*, 8(4), e62128.(2013).
- [196] Sinha, S., Koul, N., Dixit, D., Sharma, V., and Sen, E. Igf-1 Induced Hif-1alpha-Tlr9 Cross Talk Regulates Inflammatory Responses in Glioma, *Cell Signal*, 23(11), 1869-75.(2011).
- [197] Yoon, H., Shin, S.H., Shin, D.H., Chun, Y.S., and Park, J.W. Differential Roles of Sirt1 in Hif-1alpha and Hif-2alpha Mediated Hypoxic Responses, *Biochem Biophys Res Commun*, 444(1), 36-43.(2014).
- [198] Elser, M., Borsig, L., Hassa, P.O., Erener, S., Messner, S., Valovka, T., Keller, S., Gassmann, M., and Hottiger, M.O. Poly(Adp-Ribose) Polymerase 1 Promotes Tumor Cell Survival by Coactivating Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Gene Expression, *Mol Cancer Res*, 6(2), 282-90.(2008).
- [199] Quintero, M., Brennan, P.A., Thomas, G.J., and Moncada, S. Nitric Oxide Is a Factor in the Stabilization of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha in Cancer: Role of Free Radical Formation, *Cancer Res*, 66(2), 770-4.(2006).
- [200] LaManna, J.C., Chavez, J.C., and Pichiule, P. Structural and Functional Adaptation to Hypoxia in the Rat Brain, *J Exp Biol*, 207(Pt 18), 3163-9.(2004).
- [201] Vaupel, P. and Mayer, A. Hypoxia in Tumors: Pathogenesis-Related Classification, Characterization of Hypoxia Subtypes, and Associated Biological and Clinical Implications, *Adv Exp Med Biol*, 812, 19-24.(2014).
- [202] Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G., and Semenza, G.L. Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Cell Responses to Hypoxia by Hif-1, *Blood*, 105(2), 659-69.(2005).
- [203] Rajabi, M. and Mousa, S.A. The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment, *Biomedicines*, 5(2).(2017).

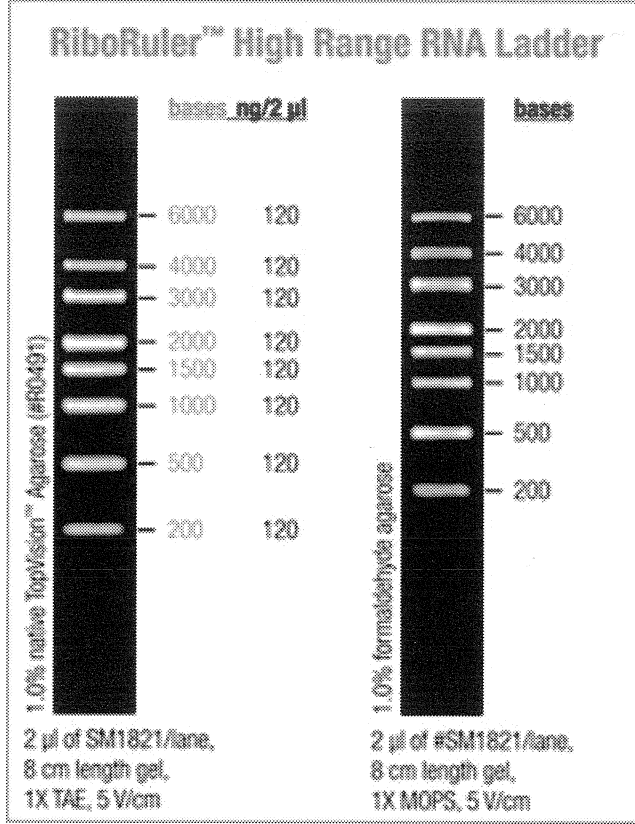
- [204] Morfoisse, F., Kuchnio, A., Frainay, C., Gomez-Brouchet, A., Delisle, M.B., Marzi, S., Helfer, A.C., Hantelys, F., Pujol, F., Guillermet-Guibert, J., Bousquet, C., Dewerchin, M., Pyronnet, S., Prats, A.C., Carmeliet, P., and Garmy-Susini, B. Hypoxia Induces Vegf-C Expression in Metastatic Tumor Cells Via a Hif-1alpha-Independent Translation-Mediated Mechanism, *Cell Rep*, 6(1), 155-67.(2014).
- [205] Rigracciolo, D.C., Scarpelli, A., Lappano, R., Pisano, A., Santolla, M.F., De Marco, P., Cirillo, F., Cappello, A.R., Dolce, V., Belfiore, A., Maggiolini, M., and De Francesco, E.M. Copper Activates Hif-1 α /Gper/Vegf Signalling in Cancer Cells, *Oncotarget*, 6(33), 34158-34177.(2015).
- [206] Azoitei, N., Becher, A., Steinestel, K., Rouhi, A., Diepold, K., Genze, F., Simmet, T., and Seufferlein, T. Pkm2 Promotes Tumor Angiogenesis by Regulating Hif-1 α through Nf-Kb Activation, *Molecular Cancer*, 15(1), 3.(2016).
- [207] Rey, S. and Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Mechanisms of Vascularization and Vascular Remodelling, *Cardiovascular Research*, 86(2), 236-242.(2010).
- [208] Greco, S. and Martelli, F. Micrnas in Hypoxia Response, *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(8), 1164-1166.(2014).
- [209] Bartoszewska, S., Kochan, K., Piotrowski, A., Kamysz, W., Ochocka, R.J., Collawn, J.F., and Bartoszewski, R. The Hypoxia-Inducible Mir-429 Regulates Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression in Human Endothelial Cells through a Negative Feedback Loop, *Faseb j*, 29(4), 1467-79.(2015).
- [210] Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. Hif1alpha and Hif2alpha: Sibling Rivalry in Hypoxic Tumour Growth and Progression, *Nat Rev Cancer*, 12(1), 9-22.(2011).
- [211] Zhang, S., Zhou, X., Wang, B., Zhang, K., Liu, S., Yue, K., Zhang, L., and Wang, X. Loss of Vhl Expression Contributes to Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma, *Oral Oncol*, 50(9), 809-17.(2014).
- [212] Krishnamachary, B., Zagzag, D., Nagasawa, H., Rainey, K., Okuyama, H., Baek, J.H., and Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor-1-Dependent Repression of E-Cadherin in Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor-Null Renal Cell Carcinoma Mediated by Tcf3, Zfhx1a, and Zfhx1b, *Cancer Res*, 66(5), 2725-31.(2006).
- [213] Wong, C.C., Gilkes, D.M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S.I., Wong, C.M., Khoo, U.S., Ng, I.O., Wirtz, D., and Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factor 1 Is a Master Regulator of Breast Cancer Metastatic Niche Formation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(39), 16369-74.(2011).
- [214] Zhang, H., Wong, C.C., Wei, H., Gilkes, D.M., Korangath, P., Chaturvedi, P., Schito, L., Chen, J., Krishnamachary, B., Winnard, P.T., Jr., Raman, V., Zhen, L., Mitzner, W.A., Sukumar, S., and Semenza, G.L. Hif-1-Dependent Expression of Angiopoietin-Like 4 and L1cam Mediates Vascular Metastasis of Hypoxic Breast Cancer Cells to the Lungs, *Oncogene*, 31(14), 1757-70.(2012).
- [215] Hellman, L.M. and Fried, M.G. Electrophoretic Mobility Shift Assay (Emsa) for Detecting Protein-Nucleic Acid Interactions, *Nat Protoc*, 2(8), 1849-61.(2007).

- [216] Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., and Millhorn, D.E. Cobalt Inhibits the Interaction between Hypoxia-Inducible Factor-Alpha and Von Hippel-Lindau Protein by Direct Binding to Hypoxia-Inducible Factor-Alpha, *J Biol Chem*, 278(18), 15911-6.(2003).
- [217] Torii, S., Okamura, N., Suzuki, Y., Ishizawa, T., Yasumoto, K., and Sogawa, K. Cyclic Amp Represses the Hypoxic Induction of Hypoxia-Inducible Factors in Pc12 Cells, *J Biochem*, 146(6), 839-44.(2009).
- [218] Aydemir, A.T., Alper, M., and Kockar, F. Sp1-Mediated Downregulation of Adamts3 Gene Expression in Osteosarcoma Models, *Gene*.(2018).
- [219] Kadonaga, J.T., Jones, K.A., and Tjian, R. Promoter-Specific Activation of Rna Polymerase Ii Transcription by Sp1, *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), 20-23.(1986).
- [220] Ziello, J.E., Jovin, I.S., and Huang, Y. Hypoxia-Inducible Factor (Hif)-1 Regulatory Pathway and Its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia, *Yale J Biol Med*, 80(2), 51-60.(2007).

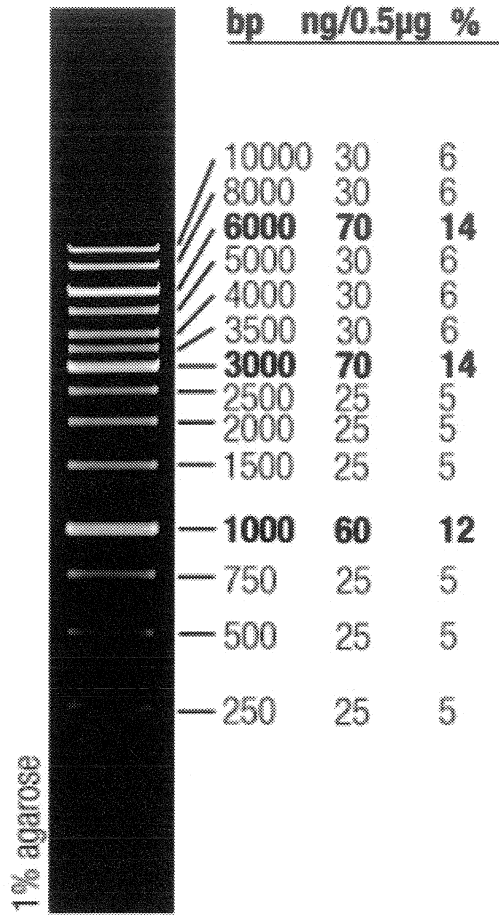
EKLER

7. EKLER

EK-1 RNA Büyüklük Belirteci



EK-2 DNA Büyüklük Belirteci



0.5 µg/lane, 8 cm length gel,
1X TAE, 7 V/cm, 45 min

ÖZGEÇMİŞ



Candan AKDIR

E-Mail: candanakdr@gmail.com

Kişisel Bilgiler

Doğum tarihi: :10/07/1992

Doğum yeri: Ankara/TÜRKİYE

Eğitim Bilgileri

Yüksek Lisans: Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (2016-2018)

Lisans : Balıkesir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Pedagojik Formasyon Eğitimli Biyoloji Bölümü (2011-2015)

Staj : Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Doç.Dr.Özgür Şahin Araştırma Laboratuvarı (2015)

Uzmanlık Ana Bilim Dalı Genetik, Moleküler Biyoloji

Bilgisayar

EndNote, Minitab14, ImageJ, GraphPad Prism, Bioedit,
Microsoft word, Microsoft Excel, Power point for
windows

Dereceler

1. Balıkesir Üniversitesi Şeref Öğrencisi-2013
2. Balıkesir Üniversitesi Şeref Öğrencisi-2014
3. Balıkesir Üniversitesi Şeref Öğrencisi-2015
4. Balıkesir Üniversitesi Bölüm Üçüncüsü Mezuniyet Derecesi-2015 (3.40/4.00)

Üyelikler

- Moleküler Kanser Araştırma Derneği MOKAD (2016-Devam ediyor)
Hücre Ölüm Derneği (2016-Devam ediyor)

Katıldığı Kurslar

1. Tübitak Biyoloji Lisans Öğrencilerine Proje Eğitimi 2014
2. Pedogojik Formasyon Programı - Balıkesir Üniversitesi 2015
3. Tübitak Destekli Girişimcilik Eğitimi 2016
4. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası Yeditepe Üniversitesi 2017

Katıldığı Ulusal ve Uluslararası Öğrenci Kongreleri

1. İstanbul Üniversitesi SEM BİYOGEM 2013
2. Ankara Üniversitesi 1. Uluslararası Adli Biyoloji ve Genetik Kongresi 2014
3. IV. International Congress of The Molecular Biology Association of Turkey
November 27-29 2015 METU-Ankara
4. Gebze Teknik Üniversitesi Genetik Günleri 2016
5. Uludağ Üniversitesi Kanseri Genetiği Ve Moleküler Biyolojide Güncel Gelişmeler
Sempozyumu 2017
6. Boğaziçi Üniversitesi EMBO Genç Bilim İnsanları Formu 2018
7. Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik I. Kariyer Günleri 2018
8. I. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi 27-29 Nisan 2018,
Burhaniye