

T1047

+

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**SEREBRAL KAVERNOZ
MALFORMASYONLARDA
(CEREBRAL CAVERNOUS
MALFORMATION, CCM) MUTASYONA
UĞRAYAN KRİT1'İN ANJİOGENİK
SİNYAL YOLUNUN MOLEKÜLER
MEKANİZMASI**

Özlem GÜZELOĞLU KAYIŞLI

Doktora Tezi

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Güven LÜLECİ**

“Kaynakça Gösterilerek Tezinden Yararlanılabilir”

Antalya, 2004

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince “Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim alanında en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği” ilkesi gereğince yapılan yayımların listesi aşağıdadır (Orijinalleri ekte sunulmuştur).

1- KRIT1/cerebral cavernous malformation I protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, NDuka Amankular, Guven Luleci, Richard Lifton and Murat Gunel. Neurosurgery dergisine kabul edildi.

2- KRIT1/cerebral cavernous malformation I protein is expressed during early angiogenesis. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, Umit A. Kayisli, NDuka Amankular, Jennifer R Voorhees, Michael DiLuna, Maxwell Laurans, Guven Luleci and Murat Gunel. Journal of Neurosurgery dergisine kabul edildi.

3- Regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, Umit A. Kayisli, Rafat Al-Rejjal, Wenxin Zheng, Guven Luleci, Aydin Arici. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 88(10):5017–5026.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında doktora (PhD) tezi olarak kabul edilmiştir.

13 09 2004

Tarih

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Güven LÜLECI
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Üyeler:

Prof. Dr. Akın YEŞİLKAYA
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Murat GÜNEL
Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nörovasküler Cerrahi Bilim Dalı

Doç. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Salih ŞANLIOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Onay:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 27/02/2004 tarih ve 6/21 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Serebral kavernoza malformasyonlarının (SKM) genetik temelini anlamaya yönelik yapılan moleküler genetik çalışmalar sonucunda hastalıkla ilişkili üç (Cerebral Cavernous Malformation 1-3) lokus tanımlanmış ve CCM1 lokusu içerisinde yer alan KRIT1 geni klonlanmıştır. KRIT1 geninde meydana gelen mutasyonların otozomal dominant formda kalıtılan ve merkezi sinir sisteminde anormal vasküler yapıların oluşumu ile karakterize olan SKM'a neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan son çalışmalar ile KRIT1 gen ürününün mikrotübül ilişkili bir protein olduğu ve ICAP-1 α ile ilişkiye girdiğinin gösterilmesine rağmen, KRIT1 proteinin fonksiyonu hala tam olarak bilinmemektedir.

Bu nedenle bu çalışmada, ilk olarak moleküler yöntemler yardımıyla, KRIT1 proteininin insan dokularındaki dağılımı ve hücresel lokalizasyonu, *in vivo* ve *in vitro* anjiogenik model sistemlerinde KRIT1 ekspresyonu, daha sonra da KRIT1 proteininin anjiogenik faktörler ile regüle edilip edilmediği araştırıldı. SKM patofizyolojisine ışık tutmak için, *in vitro* KRIT1 ekspresyonu siRNA tekniğiyle inhibe edilerek, bu inhibisyona bağlı olarak proliferasyon, adezyon, apoptozis gibi hücresel olayların nasıl değiştiği incelendi. KRIT1'in hemen hemen tüm dokularda eksprese edildiği, kapiller ve arteriollerde mevcut olduğu görüldü. KRIT1'in endotelial hücreler dışında beyinde kan-beyin bariyerini oluşturan piramidal nöronlar, astrositler ve astrositik uzantılarda da eksprese edildiği gözlemlendi. *In vitro* anjiogenik sistemlerde KRIT1'in kapillarizasyona bağlı olarak ekspresyonunun arttığı, *in vivo* anjiogenik model sistem olarak kullanılan plasenta dokusunda ise KRIT1'in aktif anjiogenik ve vaskülogenik alanlarda eksprese edildiği, fakat damar olgunlaşmasına bağlı olarak KRIT1 ekspresyonunun azaldığı veya kaybolduğu görüldü. KRIT1 ekspresyonu inhibe edildiği zaman apoptozisin artmasına bağlı olarak endotelial hücrelerde proliferasyonun ve adezyonun azaldığı ayrıca KRIT1 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak kapiller benzeri yapıların oluşmadığı görüldü.

Bu bulgular 1) KRIT1'in, endotelial hücreler dışında astrositler, astrositik uzantılar ve nöronlarda da eksprese edilen bir protein olduğunu, 2) KRIT1'in normal damar gelişimde rol oynayan bir protein olduğu ve ekspresyonunun anjiogenik faktörler ile regüle edilmezken, ekstrasellüler matriks proteinleri ile regüle edilebildiğini, 3) KRIT1'in nüklear lokalizasyon sinyali bulunmasına rağmen, nükleusa göç etmediğini ve tirozin aminoasidi üzerinden fosforillenen bir fosfoprotein olduğunu, 4) KRIT1 ekspresyon düzeyindeki azalmanın hücre adezyon kapasitesini ve kapiller benzeri yapıların oluşumunu azalttığını göstermektedir. Böylece, KRIT1 gen ürününün, beyinde ekstrasellüler ve endotelial hücreler arasında iletişimi sağlayan ve anjiogenezisde kapiller yapıların oluşumunda görev alan bir protein olduğu sonucu çıkarılabilir.

ABSTRACT

Molecular genetic studies aimed at understanding the genetic basis of cerebral cavernous malformation (CCM) have been identified three loci, CCM1-3, that are associated with CCM, and KRIT1 gene located at CCM1 locus was cloned. Mutations in KRIT1 gene were demonstrated to cause CCM, an autosomal dominant disorder that is characterized with the formation of abnormal vascular structure in central nervous system. Although recent studies have suggested that KRIT1 is a microtubule-associated protein and interacts with ICAP1 α , the function of KRIT1 protein is still unclear.

We first investigated KRIT1 expression level and cellular localization both in diverse human tissue and its expression in vivo-in vitro angiogenic model system, and then whether KRIT1 is regulated by angiogenic factors by molecular techniques. To understand the pathophysiology of CCM, we inhibited KRIT1 expression in endothelial cells by siRNA, in vitro, then examined how the cellular changes such as proliferation, adhesion, and apoptosis are affected by blockage of KRIT1 expression. In our study, it was demonstrated that KRIT1 was expressed in a broad variety of human organs, it localized to the vascular endothelium of capillaries and arterioles. KRIT1 expression was seen in structure of blood-brain barrier such as astrocytes, astrocytic foot process as well as pyramidal neurons in addition to every endothelium studied. In vitro angiogenic system with the use of post-confluent endothelial cell cultures and 3D-collagen gels, KRIT1 expression was found to increase during the capillary like tube formations, and in placenta, the best established in vivo model of angiogenesis, KRIT1 expression was seen in angiogenic and vasculogenic areas of immature placenta villi, its expression was seen the decreased or lost in vascular structure depends on vessel maturation. When KRIT1 expression was inhibited, ratio of proliferation and the capacity of adhesion in endothelial cells was detected to decrease interestingly the endothelial cells depends on increased apoptotic ratio, and endothelial cells after inhibition of KRIT1 lost the ability of formation of capillary like tube structure in 3D angiogenic system.

In conclusion, our results suggest that, 1) KRIT1 is a protein expressed in mainly endothelial cells as well as astrocytes, astrocytic foot process, and pyramidal neurons, 2) KRIT1 plays an important role in normal vessel development, its expression is regulated by extracellular matrix proteins, but not angiogenic factors such as VEGF or bFGF, 3) although it has nuclear localization signal, we found that it does not translocate to nucleus, and it is a phosphorylated protein on tyrosine amino acid, 4) inhibition of KRIT1 expression causes the reduction of proliferation and adhesion capacity as well as formation of capillary like structures, of endothelial cells. We therefore conclude that KRIT1 is an essential protein, which provides the interaction between endothelial cell-cells or endothelial cells-extracellular matrix in brain is expressed during early angiogenesis by endothelial cells and might play a key role in vessel formation and/or development.

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleŐmesindeki katkılarından dolayı aşağıda belirtilen kiŐi ve kuruluŐlara itenlikle teşekkür ederim

Sayın danıŐman hocam Prof Dr. Güven LLECI ve ikinci danıŐmanım olarak Do Dr. Murat GNEL'e tezimin gerçekleşmesi için göstermiŐ oldukları maddi ve manevi destekten dolayı,

Sayın Günel, Lifton ve Arıcı laboratuvarları çalıŐanlarının göstermiŐ oldukları sıcak ilgi ve bilimsel katkılarından dolayı,

Anabilim Dalımız'daki Sayın hocalarıma ve tüm arkadaŐlarıma, tezimi Yale Universitesinde tamamlamama izin verdikleri ve bu süre içerisinde göstermiŐ oldukları toleranslarından dolayı,

Sevgili aileme bu zorlu yolda bana her zaman destek oldukları ve bana Şu ana kadar sağladıkları tüm imkanlardan dolayı,

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii-x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi-xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2-23
2.1 İn Vivo Vaskülojeniz ve Anjiogenez	2-4
2.1.1 Anjiogenezin Moleküler Regülatörleri	4
2.1.1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	4
2.1.1.2 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	5
2.1.1.3 Ekstrasellüler Matris	5
2.2 İn Vitro Anjiogenez	5
2.3 Plasental Anjiogenez	5-6
2.4 Kan-Beyin Bariyeri	6
2.4.1 Kan-Beyin Bariyerinin Yapısı ve Regülasyonu	6-7
2.4.1.1 Adherent Bağlantılar (AB)	7
2.4.1.2 Sıkı Bağlantılar	7-8
2.5 İnme (Stroke)	8-9
2.6 Vasküler Malformasyonlar	9-10
2.6.1 Arteriovenöz Malformasyonlar	10-11
2.6.2 Kapiller Malformasyonlar	11
2.6.3 Kalıtsal Hemorajik Telanjektaziler (HHT)	11
2.6.4 Venöz Malformasyonlar	12
2.7 Serebral Kavernoz Malformasyonlar	12
2.7.1 Klinik Bulgular	12
2.7.2 Tanı Yöntemleri	12-13
2.7.3 Hastalığın Epidemiyolojisi	14
2.7.4 Hastalığın Histopatolojisi	14-15
2.7.5 Hastalığın Tedavisi	15
2.7.6 Hastalığın Moleküler Genetiği	16
2.7.6.1 Serebral Kavernoz Malformasyonlarda Genetik Heterojenite	16-17
2.7.6.2 KRIT1 Geninin Tanımlanması	17
2.8 KRIT1 Proteininin Yapısı	17-18
2.8.1 FERM Domaini	18
2.8.2 Ankrin Tekrar Domaini	19
2.8.3 NPXY Domaini	19

2.9 KRIT1 Aracılı Hücresel Mekanizmalarda Görev Alan Moleküller	19
2.9.1 Rap1A (Krev1)	19
2.9.2 İntegrin Sitoplazmik Domain-Associated Protein 1 (ICAP1)	20
2.9.3 Mikrotübül	20-21
2.10 KRIT1 Aracılı Hücresel Mekanizmalar	21
2.10.1 Rap1A Aracılı Mekanizmalar	21-22
2.10.2 ICAP1 α Aracılı Mekanizmalar	23
GEREÇ ve YÖNTEM	24-44
3.1 Hücre Kültürü	24
3.2 Antikor Pürifikasyonu	24-25
3.3 İmmunofloresan Boyama Yöntemi	25-26
3.4 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi	26-27
3.5 RT-PCR	27-28
3.6 Hücre ve Dokudan Total Proteinlerin Elde Edilmesi	28-29
3.7 Western Blot Analizi	29-30
3.8 İmmunohistokimya Yöntemi	31-32
3.9 Kapiller Benzeri Tüp Yapılarının Oluşumunun İncelenmesi	32
3.9.1 Endotelial Hücreler Kültür Kaplarını Kapladıktan sonra (Post-konfluent) Kapiller Yapıların Oluşumunun İncelenmesi	32
3.9.2 Üç-Boyutlu (3-D) Kültür Sistemlerinde Kapiller Yapıların Oluşumunun İncelenmesi	32-33
3.10 İn Vitro Endotelial Hücre Deneyleri	33
3.10.1 Ekstrasellüler Matriks Proteinlerinin (ESM) KRIT1 Üzerine Etkisinin Araştırılması	33-34
3.10.2 Anjiyogenik Büyüme Faktörlerinin KRIT1 Üzerine Etkisinin Araştırılması	34
3.11 İmmunopresipitasyon	34-36
3.12 Nüklear ve Sitoplazmik Özütlere Eldesi	36-37
3.13 siRNA Primerlerinin Hazırlanması	37
3.14 RNA İnterferens (Post-transkripsiyonel Gen Silencing)	37-38
3.14.1 siRNA Transkripsiyon Kalıplarının Hazırlanması	38-39
3.14.2 Çift İplikli RNA (dsRNA) Sentezi	39
3.14.3 siRNA Pürifikasyonu	39-40
3.15 Transfeksiyon	40-41
3.16 Hücre Proliferasyon Deneyi	41
3.17 TUNEL Yöntemi	42
3.17.1 İn Vitro Endotelial Hücrelerde TUNEL Yöntemi	42-43
3.17.2 İn Vivo Hasta Dokularında TUNEL Yöntemi	43
3.18 Hücre Adezyon Deneyi	44
3.19 İstatiksel Analiz	44

BULGULAR	45-68
4.1 Antikor Özgüllüğünün Test Edilmesi	45
4.2 İn vitro Endotelial Hücrelerde KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	46
4.3 Fetal Dokularda RT-PCR ile KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	46-47
4.4 Yetişkin İnsan Dokularında KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	47-48
4.5 Farklı Dokulardaki Endotelial Hücrelerde KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	49-50
4.6 Ekstravasküler Dokularda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	51
4.7 Astroitik Uzantılarda (Astroitik Foot Processlerde) ve Nöronlarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	52-53
4.8 Endotelial Hücre Kültürlerinde Oluşan Kapiller Benzeri Yapılarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	53-54
4.9 Üç Boyutlu (3D) Kültür Ortamlarında KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	55-56
4.10 Ekstrasellüler Matriks Proteinleri ile KRIT1 Regülasyonunun Araştırılması	56
4.11 Anjiogenik Faktörler ile KRIT1 Regülasyonunun Araştırılması	57
4.12 KRIT1'in Plasentada Erken Anjiogenez Süresince Ekspresyonunun Araştırılması	57-58
4.13 Plasental Dokularda KRIT1 ve β 1 İntegrin Ekspresyonunun Araştırılması	59
4.14 Olgun Damarlarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması	60
4.15 KRIT1 Proteininin Fosforilasyonunun Araştırılması	61
4.16 KRIT1 Proteininin Hücresel Lokalizasyonunun Araştırılması	61-62
4.17 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması	62-63
4.18 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanmasıyla Gözlenen Morfolojik Farklılık	63
4.19 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Hücre Proliferasyonunun Araştırılması	64
4.20 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Endotelial Hücrelerde Apoptotik İndeksin Araştırılması	64-65
4.21 Serebral Kavernoz Malformasyonlu Hastalarda Vasküler Yapılarda İn Vivo Apoptotik İndeksin Araştırılması	66
4.22 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonucu Hücre Adezyonun Kapasitesinin Araştırılması	67
4.23 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonucu Kapiller Benzeri Yapıların Oluşumunun Araştırılması	67-68
TARTIŞMA	69-77
SONUÇLAR	78
KAYNAKLAR	79-94
ÖZGEÇMİŞ	95

EKLER

Ek 1. KRIT1/cerebral cavernous malformation I protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, NDuka Amankular, Guven Luleci, Richard Lifton and Murat Gunel. *Neurosurgery* dergisine kabul edildi.

Ek 2. KRIT1/Cerebral Cavernous Malformation I protein is expressed during early angiogenesis. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, Umit A. Kayisli, NDuka Amankular, Jennifer R. Voorhees, Michael DiLuna, Maxwell Laurans, Guven Luleci and Murat Gunel. *Journal of Neurosurgery* dergisine kabul edildi.

Ek 3. Regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium. **Ozlem Guzeloglu-Kayisli**, Umit A. Kayisli, Rafat Al-Rejjal, Wenxin Zheng, Guven Luleci, Aydin Arici. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 88(10):5017-5026

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- APS:** Amonyum persülfat
- AEC:** 3-amino 9-etilkarbazol
- BAEC:** Bovine Aortic Endothelial Cell
- BSA:** Bovine Serum Albumin
- DAP:** 3-3'-diaminobenzidin
- DAPI:** 4,6-diamidino-2-phenylindole
- DMEM:** Dulbecco's Modified Essential Medium
- DEPC:** Dietil prokarbonant
- DMSO:** Dimetil sulfoksit
- ECL:** Enhanced Chemiluminesent
- ECM:** Extracellular Matrix Protein
- EGTA:** Etilen bis (oksietilennitrilo) tetra asetikasit
- FBS:** Fetal Bovine Serum
- FERM:** Band 4.1, Ezrin, Radiksin, Moezin
- FGF:** Fibroblast Growth Factor
- KRIT1:** Krev1 Interaction Trapped gene 1
- ICAP:** Integrin cytoplasmic domain associated protein
- GAPDH:** Gliseraldehid dehidrogenaz
- HCl:** Hidroklorik asid
- MgCl₂:** Magnezyum klorür

MTS: 3,4,5-(dimetyylhiazol-2)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt

NaCl: Sodyum klorür

NaF: Sodyum Florid

PBS: Fosfat Buffer Salin

PMSF: Fenilmetansülfonilflorid

RT-PCR: Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

TBS: Tris Buffered Solusyon

TGF: Transforming Growth Factor

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamino

TUNEL: In situ terminal deoxynucleotidyl transferase (dTd) labeling

Tween 20: Polioksietilen-sorbitanmonolaurat

SiRNA: Small Interferenca RNA

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Şematik olarak anjiogenez basamakları.	3
Şekil 2.2. Şekilde kan beyin bariyerinin yapısı şematize edilmiştir	7
Şekil 2.3. Kan beyin bariyerindeki adherent ve sıkı bağlantılarda görevli proteinler şekilde görülmektedir	8
Şekil 2.4. Beynin anatomik yapısı ve beyin damarları şematize edilmiştir.	9
Şekil 2.5. Lezyonların MR görünümü.	13
Şekil 2.6. Kavernomların histopatolojik görünümü	15
Şekil 2.7. 7 nolu kromozomun idiogramı	16
Şekil 2.8. KRIT1 proteininin domain organizasyonu.	18
Şekil 2.9. Endotelial hücrelerde KRIT1 ve β -tübulin ilişkisi	21
Şekil 2.10. KRIT1 aracılı sinyal mekanizması	22
Şekil 3.1. İmmunopresipitasyon (IP) prensibi şematize edilmiştir.	35
Şekil 3.2. siRNA primerlerinin hazırlanması şematize edilmiştir	37
Şekil 3.3: siRNA tekniğinin çalışma prensibi şematize edilmiştir.	38

GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin, istemli hareketlerin denetlenmesi, duyuvarın birleştirilip yönlendirilmesi, yüksek düzeydeki zihinsel ve duygusal işlevlerin düzenlenmesi gibi vücuttaki bir çok fonksiyonu kontrol eden oldukça kompleks ve özelleşmiş bir organdır. Bu kompleks ve özelleşmiş fonksiyonların yerine getirilmesi için beyinin düzenli olarak kanlanması ve kan akımının kontrol altında tutulması gerekmektedir. İnme, travma dışındaki bir nedenle, beyine oksijen ve besin getiren kan damarlarının yırtılması veya kan akımının kısa veya uzun süreli yetmezliğine bağlı olarak ortaya çıkan vasküler bir bozukluk olarak tanımlanabilir. Amerika Birleşik Devletlerinde kanser ve kalp hastalıklarından sonra en sık görülen üçüncü hastalık olarak tanımlanmaktadır. İnmeye neden olan risk faktörleri arasında yaş, cinsiyet, aile öyküsü, etnik köken, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi bir çok faktörün bulunması nedeniyle oldukça kompleks ve patogenezi henüz tam olarak çözülememiş vasküler bir hastalıktır. İnmeye neden olan vasküler hastalıklar arteriovenöz malformasyonlar, kapiller malformasyonlar, venöz malformasyonlar, kalıtsal hemorajik telanjektaziler ve serebral kavernoza malformasyonlar (SKM) olarak beş ana sınıfta toplanmaktadır.

Serebral kavernoza malformasyonlar, merkezi sinir sistemindeki kan damarlarının normal damar elamanlarını kaybetmesi ve anormal gelişimi ve oluşumu ile ilişkili vasküler bir bozukluk olarak tanımlanabilir. Serebral kavernoza malformasyonlar vasküler malformasyonların %10-15'ini oluşturmaktadır. Hastalığın toplumdaki görölme sıklığının düşük olmasına rağmen, Hispanik Amerikalılar gibi bazı topluluklarda founder efekt nedeniyle görölme sıklığı artmaktadır. SKM'ler otozomal dominant formda kalıtıldığı gibi sporadik olarak da ortaya çıkmaktadır. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda serebral kavernoza malformasyon ile ilişkili Cerebral Cavernous Malformation 1-3 (CCM1, CCM2 ve CCM3) lokusları tanımlanmış ve CCM1 lokusu içerisinde yer alan KRIT1 (Krev1 Interaction Trapped gene) geni klonlanmıştır. KRIT1 geninde fonksiyon kaybına yol ačan mutasyonların serebral kavernoza malformasyonlara neden olduğu gösterilmesine rağmen, protein düzeyindeki bilgilerin eksikliği nedeniyle hastalığın patofizyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Son çalışmalar ile KRIT1'in mikrotübül ilişkili bir protein olduğu ve ICAP1 α ile ilişkiye girdiği gösterilmiştir. KRIT1'in β -tübülün ile olan ilişkisinin endotelial hücre organizasyonunda, ICAP1 α ile olan ilişkisiyle de integrin aracılı hücrenel olaylarda görev alabileceği ileri sürölmesine rağmen, her iki çalışmada da KRIT1 proteininin fonksiyonu konusunda yeterince bilgi elde edilememiştir. Bu araştırmada immunohistokimya, immunofloresan, Western blot, RT-PCR, hücre kültürü, siRNA, transfeksiyon ve TUNEL gibi moleküler teknikleri kullanarak, KRIT1 proteininin hücrenel lokalizasyonunun belirlenmesi, KRIT1'in vasküler gelişiminin ve vasküler bütünlüğünün korunmasındaki rolünün aydınlatılması, ve oluşturulan in vitro sistemler yardımıyla serebral kavernoza malformasyonların oluşumunda görevli hücrenel mekanizmaların tanımlanması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İnme (stroke), beyine oksijen ve besin getiren kan damarlarının travma dışındaki bir nedenle yırtılması veya o alanda pıhtının oluşması ile karakterize edilen vasküler bir bozukluk olarak tanımlanabilir. İnme, Amerika Birleşik Devletlerinde kanser ve kalp hastalıklarından sonra en sık görülen üçüncü hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hipertansiyon, sigara kullanımı, cinsiyet ve genetik gibi bir çok faktörün inmeye neden olduğu bilinmektedir (1-3). Serebral kavernoza malformasyonlar (SKM), beyinde kapiller damarların normal damar elamanlarını kaybetmesi ve anormal vasküler yapıların oluşması ile karakterize edilen ve inmeye neden olan vasküler bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır (4,5). Hastalığın toplumdaki sıklığının düşük olmasına rağmen, Hispanik Amerikalılar gibi bazı topluluklarda bu sıklığın %50'lere ulaşması, hastalığın patogenezinde genetik faktörlerin olduğunu göstermiştir. Yapılan moleküler çalışmalar ile hastalığın otozomal dominant formda geçiş gösteren bir hastalık olduğu ve hastalıkla ilişkili farklı kromozomlarda lokalize olan CCM1, CCM2 ve CCM3 olarak adlandırılan üç lokusun olduğu gösterilmiştir. CCM1 lokusu içerisinde yer alan KRIT1 geninde meydana gelen mutasyonların kavernomlara neden olduğu gösterilmesine rağmen (6), protein düzeyindeki bilgilerin eksikliği nedeniyle hastalığın patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.1 İn Vivo Vaskülogenez ve Anjiogenez

Yeni damarların oluşumu vaskülogenezis ve anjiogenezis ile gerçekleşir. Vaskülogenez, anjioblastların endotelial hücrelere farklılaşması ve proliferasyonunu takiben, de novo primitif vasküler yapıların oluşmasına kadar geçen süre olarak tanımlanabilir (7).

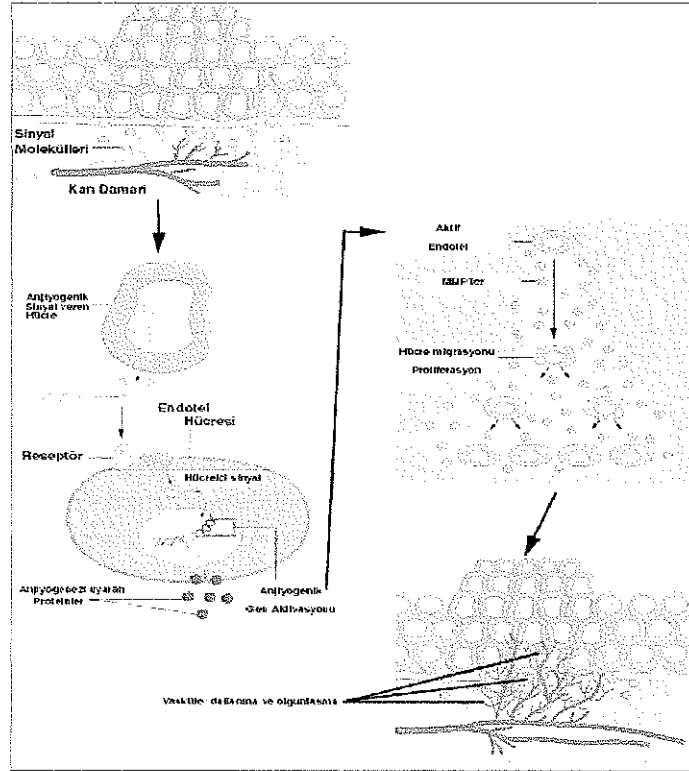
Vaskülogenezis 5 basamakda incelenebilir;

- 1- Mezodermal kökenli hücrelerin anjioblastlara farklılaşması,
- 2- Anjioblastların ekstrasellüler matris içerisine yerleşmesi,
- 3- Endotelial kord benzeri yapıların oluşması,
- 4- Damar lümeninin oluşumu,
- 5- Damar duvarındaki diğer yapıların biraraya gelmesi ve olgun damar oluşumu.

Anjiogenez ise, dokudaki mevcut damarlardan yeni damarların ortaya çıkmasına kadar geçen, moleküler ve hücreler olayları serisi olarak adlandırılır. Anjiogenezizi indükleyen hücre öncülleri, embriyonal dönemde gözlenen vaskülogenezden farklı olarak olgun damarların endotelial hücreleridir (8, 9).

Anjiogenezdeki moleküler mekanizmalar 8 basamakda incelenebilir; (Şekil 2.1)

- 1- Anjiogenik uyarı (fizyolojik veya patolojik olabilir): Anjiogenik faktörler endotelial hücre reseptörlerine bağlanır ve hücre içi anjiogenik sinyal yolunun aktivasyonuna yol açarak endotelial hücre farklılaşmasını indükler.
- 2- Farklılaşma: Endotelial hücreler gerek proliferasyon gerekse migrasyon yapabilecek yönde farklılaşırlar.
- 3- Anjiogenik olarak uyarılan aktif endotelial hücrelerden matriks metalloproteinaz proteinlerin (MMPs) salgılanması,
- 4- Bazal membranın yıkımı: Proteazların salınımına bağlı olarak bazal laminanın yıkılması ve böylece anjiogenezin yönünün belirlenmesi,
- 5- Endotelial hücrelerin anjiogenik uyarı yönündeki migrasyonu (kemokinler),
- 6- Kapiller yapının oluşması için yeterli hücre sayısına ulaşılması,
- 7- Vasküler tüp yönünde farklılaşma,
- 8- Kapiller ve vasküler ağ oluşumu ve vasküler yapıların olgunlaşması (9).



Şekil 2.1. Şematik olarak anjiogenez basamakları (9)

Anjiogenez, prenatal dönemde fizyolojik olarak, postnatal dönemde ise hem fizyolojik (yara iyileşmesi, mensturasyon) hem de patolojik (kanser, iskemi, kronik inflamasyon, arteriyoskleroz, vasküler malformasyonlar) durumlarda gözlenebilmektedir. Prenatal dönemde plasental ve embriyonal gelişimin tamamlanması için son derece önemlidir. Hem anjiogenez hem de vaskülogenezdeki damar oluşumu dinamik bir olaydır. Bu dinamik ve kompleks olayın, anjiogenik regülatörler ve ekstrasellüler matriks elamanlarına bağlı olarak gerçekleştiği gösterilmiştir (10).

2.1.1 Anjiogenezin Moleküler Regülatörleri

Anjiogenezis, pozitif ve negatif regülatörlerin kontrolü altında gerçekleşen oldukça kompleks bir mekanizmadır. Anjiogenezde görev alan pozitif ve negatif regülatörlerin her biri bulunduğu ortam ve ekspresyon profiline bağlı olarak bir çok role sahiptir. Anjiogenezde görevli moleküller Tablo 2.1'de görülmektedir. Anjiogenezde görevli bir çok faktör bulunmasına rağmen, bunlar içerisinde en çok çalışılan regülatörler arasında VEGF, FGF ve ESM proteinleri gelmektedir (11).

Tablo 2.1 Anjiogenezde görevli olan pozitif ve negatif regülatörler

Pozitif Regülatörler	Negatif Regülatörler
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	İnterferon alfa
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Thrombospondin-1
Ekstrasellüler Matriks Proteinleri (ESM)	Plasental proliferin ilişkili protein
Plasental Büyüme Faktörü (PGF)	Angiostatin
Transforming Büyüme Faktörü (TGF)	Genistein
Anjiogenin	Metalloproteinaz İnhibitörleri
İnterlökin-8 (IL-8)	Platelet faktör-4

2.1.1.1 Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF, ilk olarak *in vivo* çalışmalarda endoteliuma özgül mitojen ve en önemli anjiogenez indükleyicisi olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda, VEGF'in yeni oluşmuş kan damarlarında endotelial hücreleri apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir (12, 13). VEGF bu görevini fosfoinositol 3-kinaz (PIP3K/Akt) ve mitojen ile aktive olmuş protein kinaz (MAPK) yolu aracılığıyla, Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu indükleyerek gerçekleştirmektedir (14). Şimdiye kadar VEGF'in insanda alternatif splicing ile oluşan 5 farklı izoformu (VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) tanımlanmış ve izoformların her birinin heparin bağlama kapasitelerinin farklı olduğu bildirilmiştir (15).

2.1.1.2 Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

FGF ilk tanımlanan pro-anjiogenik faktördür ve şimdiye kadar 20 farklı FGF üyesi tanımlanmıştır (16). FGF biyolojik etkisini tirozin kinaz aktivitesine sahip olan FGF reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirir ve hem FGF hem de FGF reseptörünün endotel hücreler dışında bir çok hücrede de eksprese edildiği gösterilmiştir (17). FGF'nin, reseptörüne bağlanarak, Ras aracılı sinyal yollarını aktive ederek işlev gördüğü hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (18).

2.1.1.3 Ekstrasellüler Matris (ESM)

ESM, çok hücreli organizmaların tümünde bulunan, glikoprotein, proteoglikan ve kompleks karbohidratların kimyasal bağlar aracılığıyla bir araya gelerek oluşturdukları hücreler arası materyaldır. ESM proteinlerinin, hücre migrasyonu, farklılaşması, dokulara yapısal destek sağlama ve hücreler arası haberleşme gibi hücresel olaylarda görev aldığı gösterilmiştir. ESM çeşitliliği, matris içerisindeki moleküllerin miktarı, tipi, moleküllerin düzeni, ve bu moleküllerin birbiri ile olan etkileşimlerine göre sağlanmaktadır (19). Olgun damarlarda bulunan ESM proteinleri, fibröz proteinler ve glikoproteinlerin biraraya gelmesiyle oluşmuştur ve elastin, fibrillin, kollajen gibi ESM proteinlerinin damar gelişimi ve damar bütünlüğünün korunmasında, endotel hücre şeklinin devamı ve proliferasyonunda önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (20).

2.2 İn Vitro Anjiogenez

Anjiogenez birden çok hücreli mekanizmanın gerçekleştiği çok aşamalı bir olaydır. Bu yüzden in vitro anjiogenez çalışmalarında matris içerisinde tüp oluşumunun incelenmesi, anjiogenik olaylara daha fazla ışık tutmaktadır çünkü anjiogenezde büyüme faktörlerine ek olarak, ekstrasellüler matris proteinlerinin de önemli olduğu bir çok çalışmada gösterilmiştir (21). Vasküler yapının oluşması için gerekli olan hücre migrasyonu, proliferasyonu, proteaz üretimi ve hücre farklılaşması gibi olaylar, matris içerisindeki proteinlerin integrinler gibi hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasıyla gerçekleşir (21, 22). İn vitro anjiogenezin araştırılması, kapiller tüp oluşumunun incelenmesi gibi olaylar kollajen tip I veya fibrinden oluşan 3-boyutlu (3-Dimensional) kültür sistemlerinde detaylı incelenebilmektedir. Bu matris yapısının, anjiogenik olayların başlamasını hızlı bir şekilde indüklediği, bu nedenle daha fazla endotel hücrenin kapiller yapının oluşumuna katıldığı gösterilmiştir (23). Ayrıca, 3-D kültür sistemindeki endotel hücrelerin uyarılara karşı çok daha hassas olduğu ve kapillerizasyonun daha hızlı gerçekleştirildiği gösterilmiştir (24-26).

2.3 Plasental Anjiogenez

Embriyonik gelişim implantasyon ile başlar. Blastositin trofoektodermal katmanı proliferasyonla büyür ve farklılaşarak, dış yüzeyde çok nükleuslu sinsisyotrofoblastları

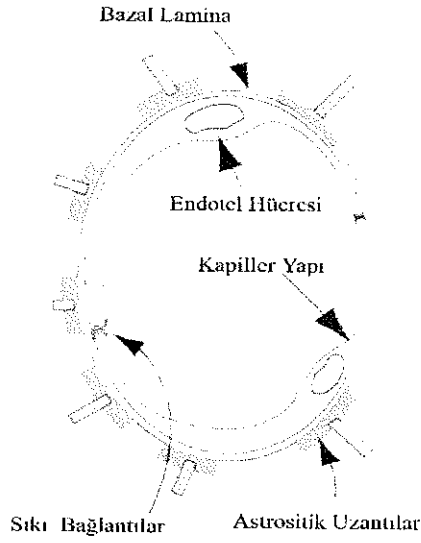
oluştururken, iç tarafta tek nükleuslu sitotrofoblastik hücre katmanını oluşturur. Placentada villus gelişimi embriyonik dönemin 12-18. günlerinde başlar. Plasental trofoblastik trabekulalar maternal kan içerisinde proliferer olur ve parmak yapısına benzeyen **primer villusları** oluşturur. İki gün sonra ise ekstra embriyonik mezensemden kaynaklanan konnektif dokunun primer villus içerisine invaze olmasıyla **sekonder villusları** geliştirirler. Böylece, gelişimin 18-20. günlerinde ilk kapiller benzeri yapılar gözlenebilir. Kapiller yapıların oluşumu ile villuslar **tersiyer villus** olarak adlandırılır (27). Gestasyon süresince plasental kapillerdeki endotelial hücreler birbirleri ile sıkı bağlantılar kurarak vasküler yapının devamında önemli rol oynarlar. Plasental vaskularizasyon fiziksel ve kimyasal sinyaller ile düzenlenen dinamik bir süreçtir (28).

2.4 Kan-Beyin Bariyeri (KBB)

KBB, merkezi sinir sistemi ile sistemik sirkülasyon arasında bulunan fiziksel ve metabolik bir bariyer olup, beyin dokusunda homeostazın korunmasına hizmet eden oldukça dinamik ve kompleks bir yapı olarak tanımlanabilir (29). Beyindeki endotelial hücreler arasında bulunan sıkı ve adherent bağlantılar yardımı ile beyinde kontrolsüz iyon, aminoasit, ve peptid geçişini engelleyen fiziksel bir bariyer oluşturulur ve bu bariyer sayesinde beyin parenkim dokusu korunmuş olur. Ensefalit, multiple sklerosis, hipertansiyon ve inme gibi bazı hastalıklarda, KBB'deki dengenin bozulması, nöronal fonksiyonların bozulmasına neden olmaktadır (30, 31).

2.4.1 Kan-Beyin Bariyerinin Yapısı ve Regülasyonu

KBB, endotelial hücreler, astrositik uzantılar ve perisitler tarafından oluşturulan oldukça kompleks bir sistemdir (Şekil 2.2). KBB'nin korunmasında en önemli görevi endotelial hücreler tarafından oluşturulan sıkı ve adherent bağlantılar üstlenirken, KBB'nin regülasyonunda astrositler önemli bir görev üstlenir (29, 30). Beyin kapillerinde astrositler, astrositik uzantılar olarak adlandırılan yapıları oluştururlar. Bu uzantılar sayesinde astrositlerden salınan humoral faktörler yardımı ile, sıkı ve adherent bağlantılar regüle edilerek, KBB'nin devamlılığının korunduğu in vivo ve in vitro çalışmalar ile gösterilmiştir (30-32).



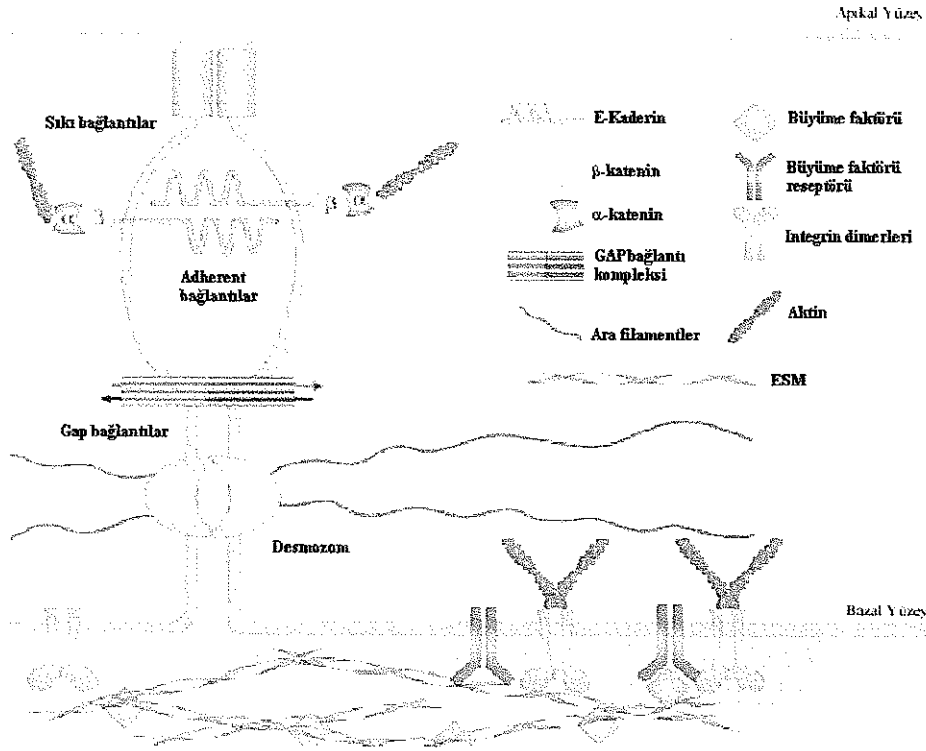
Şekil 2.2: Şekilde kan beyin bariyerinin yapısı şematize edilmiştir. Kan beyin bariyerinin oluşumunda en önemli görevi üstlenen endotel hücreler, sıkı bağlantılar ve astrositik uzantılar gözükmetedir (Histology and Cell Biology kitabından alınmıştır, 29).

2.4.1.1 Adherent Bağlantılar (AB)

Adherent bağlantılar bir çok dokuda adeziv hücre-hücre bağlantılarında bulunan KBB'inde bazolateral plazma zarında lokalize olan yapılardır. AB'ler hücre adezyon molekül ailesinin birer üyesi olan kadherin dimerlerinden oluşur (Şekil 2.3). Epitelyal ve endotel hücrelerde bulunan E-kadherinin, katenin proteinleri aracılığıyla aktine bağlanarak kalsiyum bağımlı hücre adezyonunda görev aldığı gösterilmiştir. Bu ilişki β -katenin ile gerçekleştirilir çünkü kadherinler β -katenin aracılığıyla α -katenine ve aktine bağlanırlar (Şekil 2.3). Kadherin proteinlerinin ekstrasellüler kısmında kalsiyum bağlama alanı bulunur. Ekstrasellüler kalsiyum düzeyindeki azalma veya β -kateninin kadherine bağlanamaması, kadherin-kadherin arasındaki bağlantının zayıflamasına, bu nedenle hücre iskeleti yapısının dağılmasına, dolayısıyla hücre-hücre arası adezyon kaybına yol açmaktadır (30, 31).

2.4.1.2 Sıkı Bağlantılar

Sıkı bağlantılar, endotel hücrelerin apikal zarları ile komşu hücreler arasında oluşturulur böylelikle iyon geçişi ve parasellüler difüzyon engellenir. Hücreler arasındaki sıkı bağlantılar kladin, okludin, zonula okludens proteinleri (ZO-1, ZO-2, ZO-3) olarak adlandırılan proteinler tarafından oluşturulur (Şekil 2.3). Kladin ve okludin çoklu transmembranal domainlerine sahiptir ve komşu hücreler ile heterodimerik köprü oluşturarak parasellüler difüzyonu engeller. Sıkı bağlantıların stabilizasyonu okludin, kladin, ve ZO proteinlerinin aktine bağlanımı ile gerçekleşir (32, 33).



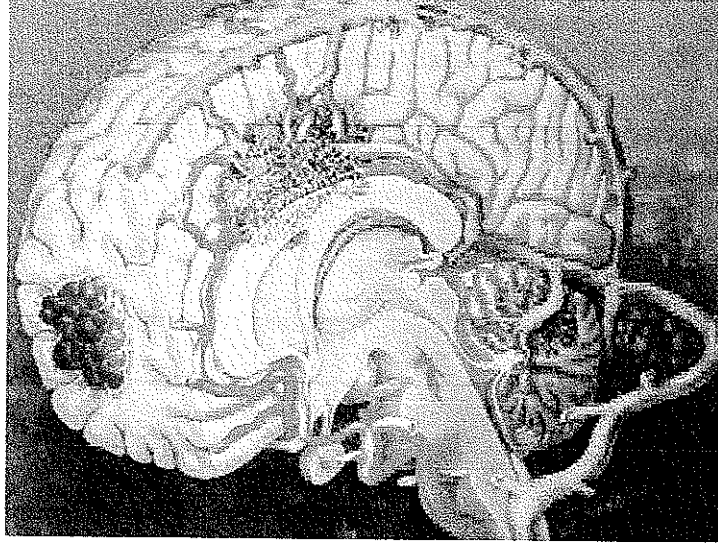
Şekil 2.3: Kan beyin bariyerindeki adherent ve sıkı bağlantılarda görevli proteinler şekilde görülmektedir (30)

2.5 İnme (Stroke)

Beyin, vücuttaki bir çok fonksiyonu kontrol eden oldukça kompleks bir organdır. Beynin kanlanması arteriyo karotis interna'lar ve vertebrobaziler arter sistemiyle sağlanır. Bu iki sistem arasında beyin bazalinde bulunan Willis poligonu olarak adlandırılan anastomoz sistemi bulunmaktadır (34). Beyin sapı ve serebellum vertebrobaziler sistem tarafından beslenirken, hemisferler arteriyo karotis internanın dalları olan arterio serebri media ve anterior ve arterio basalisin yan dalı olan arterio serebri posterior ile kanlanır. Kalbin pompaladığı kanın beşte biri karotis ve vertebrobaziler sistem ile beyine gelir. Beyin damarlarında meydana gelen bozukluklar, beyinin o bölgesinin kontrolü altında bulunan merkezlerin fonksiyonunu kaybetmesine neden olur (1, 34, Şekil 2.4).

İnme, genel olarak, beyine oksijen ve besin getiren kan damarlarının travma dışındaki bir nedenle yırtılması veya o alanda pıhtının oluşması ile karakterize edilen vasküler bir bozukluk olarak tanımlanabilir. Bu olaylar, beyine kısa süreli veya uzun süreli olarak oksijenin gitmemesine neden olur ve oksijen yetersizliği nedeni ile beyinin o bölgesindeki sinir hücreleri fonksiyonlarını yerine getiremez ve bir kaç dakika içerisinde ölüm gerçekleşir (1-3). Amerikan Kalp Derneğinin (American Heart

Association, AHA) verilerine göre, Amerika Birlesik Devletlerinde (ABD) kanser ve kalp hastalıklarından sonra üçüncü ölüm nedeni olarak inme bildirilmektedir ABD'de yılda 600.000'den fazla bireyin inmeden etkilendiği ve yaklaşık olarak 200.000'den fazla bireyin ise öldüğü rapor edilmiştir (3, 35).



Şekil 2.4: Beynin anatomik yapısı ve beyin damarları şematize edilmiştir (11).

Hemoraj veya tromboz gibi nedenler oksijen dağılımının bozulmasına dolayısıyla inmeye neden olur. Bunun dışında, yaş, cinsiyet, aile öyküsü, etnik köken, hipertansiyon, sigara kullanımı gibi bir çok faktör inmeyi etkilediğinden hastalığın patofizyolojisi hala tam olarak bilinmemektedir (3). Ancak inme ile ilgili hikayesi olan ailelerde ve ikiz çalışmalarında yapılan araştırmalar, vasküler hastalıklar ile genetik faktörler arasındaki bağlantının kurulmasına yardımcı olmuştur (36)

2.6 Vasküler Malformasyonlar

Vasküler malformasyonlar anjiogenik gelişim süresi içerisinde meydana gelen, belirli bir lokalizasyon özelliği gösteren bozukluklar olarak tanımlanabilir. Vasküler malformasyonlar, akciğer ve gastrointestinal sistem gibi visseral organlarda da görülmesine rağmen, en sık olarak beyinde karşımıza çıkmaktadır. Vasküler malformasyonların tıkanmalara, kanamalara veya kalp yetmezliğine neden olması nedeni ile hayati tehlikesi oldukça yüksektir. Vasküler malformasyonların çoğu sporadik olarak ortaya çıkabildiği gibi kalıtsal formda da ortaya çıkabilir (37)

Serebral vasküler malformasyonlar (SVM), merkezi sinir sisteminde ortaya çıkan, neoplastik olmayan fakat serebral dolaşımı etkileyen vasküler lezyonlar olarak

tanımlanabilir. SVM'lerin varlığı ilk olarak yüz yıl önce bildirilmiş (38), ancak hastalığın klinik ve patolojik profili, geçen 10 yıl içerisinde beyin görüntüleme ve histopatolojik yöntemler sayesinde anlaşılmıştır (39)

Serebral vasküler malformasyonlar çoğunlukla merkezi sinir sistemini tutan tüm vasküler bozuklukları kapsar. SVM'lerin büyük çoğunluğu embriyonik dönemdeki duraksamaya bağlı olarak ortaya çıktığı için, patolojinin tipine ve oluşum evresine göre farklı tipde histolojik ve klinik bulgularla karşımıza çıkmaktadır (40-44). SVM'lerin sınıflandırılması, karakteristik özellikleri, kalıtım modelleri ve hastalıklar ile ilişkili genler ve kromozomal lokalizasyonları Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2 : Vasküler malformasyonların karakteristik özellikleri (37)

Vasküler Malformasyonlar	Kalıtım Modeli	Gen	Kromozomal Lokalizasyon
I-Arteriovenöz Malformasyon			
	Somatik Mutasyon ?	?	?
II-Kapiller Malformasyon			
	OD ?	?	?
III-Kalıtımsal Hemorajik Telanjektaziler			
HHT1	OD	ALK1	9q33-34
HHT2	OD	ENG	12q13
IV-Venöz Malformasyon			
	OD	TIE-2	9p21-22
V-Serebral Kavernoöz Malformasyon			
CCM1	OD	KRIT1	7q11.2
CCM2	OD	?	7p15-p13
CCM3	OD	?	3q25.2-q27

OD: Otozomal Dominant, ?: Bilinmiyor, ALK1: Aktivin A reseptörünü, ENG: Endoglini ifade etmektedir

2.6.1 Arteriovenöz Malformasyonlar (AVM)

AVM'ler vasküler malformasyonlar içerisinde klinik olarak en kolay tanı konulabilen ve en sık karşımıza çıkan fakat klinik olarak en riskli grubu oluşturmaktadır (37, 45). AVM'ler bir yada daha fazla besleyici arterden gelen kan akımının kapiller ağ oluşturmada venlere bağlanması ile oluşur. Bu bağlanım normal olmadığı için venöz

sistemde yüksek kan basıncının oluşmasına neden olur (46). Lezyonlar, histopatolojik olarak incelendiğinde, anormal olarak genişlemiş, displastik fakat etrafında normal beyin parenkimi bulduran yapılar olarak görülür (47, 48) AVM'lerin en önemli patolojik bulgusu displazik arter ve bu artere direkt bağlanan intima tabakası incelmış ve arter özelliği kazanmış venöz yapıların bulunmasıdır (5, 49-51). AVM'ler sporadik formda her yaş grubunda görülmekte ancak en fazla 40'lı yaşlarda ortaya çıkmaktadır. Erkek ve kadında görülme sıklığı hemen hemen aynıdır. Literatürde ailesel geçiş gösteren nadir olgular bildirilse de şimdiye kadar bir kaç çalışma dışında hastalıkla ilgili aday bir gen veya lokus tanımlanmamıştır (52-56). Rhoten ve arkadaşları, AVM'li hastalarda yapmış oldukları çalışmada, bu hastalarda pre-proendotelin-1 geninin eksprese edilmediğini bildirmişler ve pre-proendotelin-1 geninin hastalıkla ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (57).

2.6.2 Kapiller Malformasyonlar

Genellikle baş ve boyun bölgesinde gözlenen vasküler bozukluklardır. Lezyonların oluşum nedeni bilinmemekle birlikte, erken embriyonik dönemde derideki kapiller yapıların anormal oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kapiller malformasyonda, damar çapı genişlediğinden kan akımı yüksektir ve bu yüzden deri yüzeyi kırmızı-pembe görünüm alır. Kapiller malformasyonlar beyinde ise sıklıkla beyaz maddede ve ponsda kapiller yapılarıdaki genişlemeye bağlı olarak ortaya çıkar ve ancak magnetik rezonans (MR) ve tomografi (CT) ile tanı konulmaktadır (35, 58). Sporadik olguların yanında ailesel geçiş gösteren olgular da bulunmaktadır. Ailesel kapiller malformasyonlu ailelerde yapılan linkaj çalışmaları sonucunda 5q13-22'de lokalize olan bir genin hastalıktan sorumlu olduğu düşünülmektedir (59).

2.6.3 Kalıtsal Hemorajik Telenjektaziler (HHT)

Kalıtsal Hemorajik Telenjektaziler (HHT) veya Osler-Rendu- Weber sendromu otozomal dominant geçiş gösteren multisistemik vasküler malformasyonlardır. Lezyonlar deride, ağızda ve gastrointestinal sistemde telenjektaziler şeklinde ortaya çıkabileceği gibi beyin, karaciğer, ve akciğer gibi organlarda arteriovenöz şantlar şeklinde görülmektedir (60). Yapılan linkaj çalışmalarında, 9q33-34'de lokalize olan HHT1 ve 12q13'de lokalize olan HHT2 lokuslarının HHT'ye neden olduğu bildirilmiştir. HHT1 lokusu ile ilişkili Endoglin (ENG) geni ve HHT2 lokusu ile ilişkili gen olarak da aktivin reseptör benzeri kinaz 1 (aktivin receptor like kinase 1, ALK) geni tanımlanmıştır (61-63). ENG ve ALK genlerinde meydana gelen mutasyonların HHT'ye neden olduğu gösterilmiştir. Her iki gende endotelial hücrelerde yoğun olarak eksprese edilir ve her iki proteinde TGF- β 1 aracılı sinyal yolunda görev alır (64-66). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, arteriovenöz farklılaşmada ve normal kapiller yapının devamlılığında önemli rol oynayan IGF- β 1 aracılı sinyal mekanizmasının bozulmasına neden olur (67, 68).

2.6.4 Venöz Malformasyonlar

Venöz malformasyonlar, anormal genişlemiş yapıdaki ven dranjlarının oluşturduğu malformasyonlardır (35) Vasküler malformasyonlar içerisinde daha az riske sahiptirler (69). Venöz malformasyonlar genellikle deride veya intramusküler yapılarda ortaya çıkar. Venöz malformasyonların görülme sıklığı 1/500-1/10000 olarak bildirilmiştir. Kalıtsal venöz malformasyonlu ailelerde yapılan çalışmalarda, TIE2 (Anjiopoetin-2 reseptörü) genindeki mutasyonların hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. TIE2, endotelial hücrelerde eksprese edilir ve damar olgunlaşmasında görev alan tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre yüzey reseptörüdür. TIE2 geninde meydana gelen aktive edici mutasyonlar reseptörün intrasellüler kinaz domaininde meydana gelir ve proteinin otofosforilasyonunu artırarak, hücre içerisinde TIE2 aracılı sinyalin daha da güçlenmesine neden olur (70).

2.7 Serebral Kaverno Malformasyonlar (SKM)

Kaverno anjiyom, kaverno malformasyon veya serebral kavernoma olarak adlandırılan serebral kaverno malformasyonlar, kapiller damarların normal damar elemanlarını kaybetmesi ve anormal vasküler yapıların oluşması ile karakterize edilen bir vasküler bozukluktur (4, 5) SKM'leri kapiller telanjektazilerden ayıran en temel özellik kavernomların etrafında normal beyin parenkim dokusunun bulunmamasıdır. Kavernleri besleyen herhangi bir ana arter olmadığı için lezyon içerisinde kan akımı oldukça düşüktür (71-74)

2.7.1 Klinik Bulgular

SKM'a özgül semptomatik bulguların başında, baş ağrısı, el ve ayaklarda his kaybı, görme ve denge problemleri gibi lokal nörolojik bozukluklar, hemoraj ve epilepsi nöbetlerine benzer ataklar gelmektedir (75). Bir çok SKM'li hastada bu klinik bulguların hiç biri gözlenmezken, bazılarında ise lezyonun büyüklüğüne ve lokalizasyonuna bağlı olarak semptomlar çok ağır olabileceği gibi hafif de olabilir. SKM'de gözlenen epilepsi benzeri nöbetler hemorajın yaratmış olduğu fiziksel baskı ve hemosiderin gibi hemoraja bağlı ürünlerin birikmesinden kaynaklanmaktadır. Hemorajlar SKM'deki klinik bulgular içerisinde en önemli olanıdır ve kanamaların büyük çoğunluğu intraparenkimal olarak meydana gelir. Kavernomlar dinamik yapılar olarak tanımlanabilir çünkü zamana bağlı olarak lezyonlar küçülebilir veya büyüyebilir (4, 76, 77).

2.7.2 Tanı Yöntemleri

Serebral Kaverno Malformasyonlarda kavernomları besleyen herhangi bir arter olmadığından kavernom içerisinde kan akımı oldukça düşüktür ve lezyonlar beyin kapillerlerini tuttuğu için standart angiografik teknikler ile görüntülenemez (78-80). Tomografi (CT), SKM'lerin tanısında anjiografik yöntemlere göre çok daha hassastır,

fakat SKM'ların tanısında ve hasta takibinde en etkin görüntüleme yöntemi magnetik rezonansdır (MR) (Şekil 2.5)

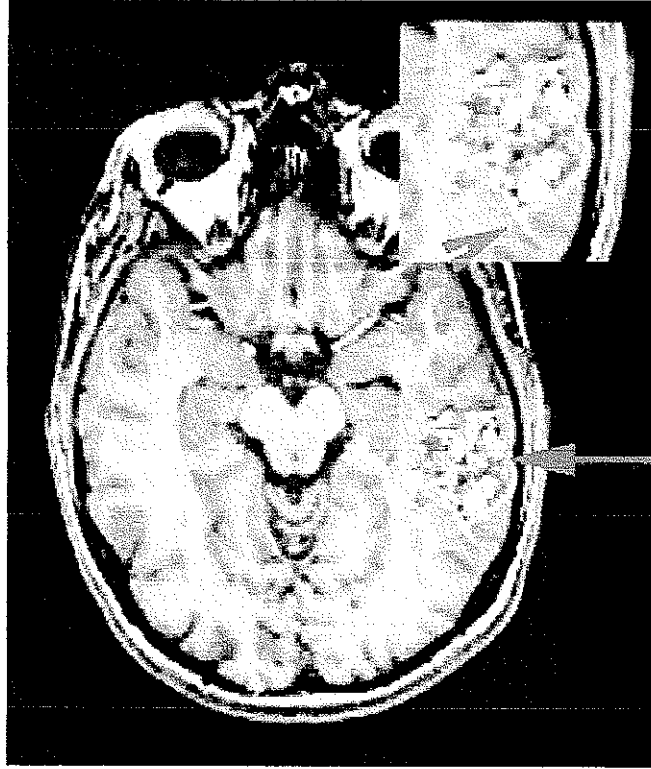
Klinik takip açısından kavernomların MR görüntüleri 4 tipe ayrılır;

Tip I: T1 ağırlıklı görüntülerde ortası yüksek yoğunluklu, T2 ağırlıklı görüntülerde ise ortası düşük yoğunluklu ve etrafındaki halka düşük yoğunluklu lezyonlar,

Tip II: T1 ve T2 ağırlıklı görüntülerde ortası retiküler ve karışık görünüm, T2 ağırlıklı görüntülerde ortası düşük yoğunluklu lezyonlar,

Tip III: T1 ve T2 ağırlıklı görüntülerde homojen görünümü olan lezyonlar,

Tip IV: Spin eko görüntülerde çok az görünen veya hiç görünmeyen, GRE görüntülerde ise lokal azalmış yoğunluk şeklinde görünen lezyonlardır (39).



Şekil 2.5: Lezyonların MR görünümü. Serebral kavernomlar MR'da pop-corn benzeri yapılar olarak gözükmedirler. Lezyonun olduğu alan ok ile gösterilmiştir (81).

2.7.3 Hastalığın Epidemiyolojisi

- Lezyonların Görülme Sıklığı

SKM'lerin asemptomatik olması, hastalığın ileri yaşlarda ortaya çıkması ve diğer vasküler malformasyonlarla birlikte görülmesinden dolayı toplumdaki sıklığını vermek oldukça zordur. Bununla birlikte, görüntüleme yöntemlerindeki hızlı gelişmeler ve MR'in rutin kullanıma girmesinden sonra yapılan retrospektif çalışmalar SKM'lerin düşünüldüğünden daha yaygın olduğunu göstermiştir (3, 82, 83). Berry ve arkadaşları, 6686 olgunun otopsisine dayalı yaptıkları retrospektif çalışmada hastalığın sıklığını %0.02 olarak bildirmişlerdir (84). MR'nin SKM'lerin tanısında rutine girmesinden sonra yapılan çalışmalarda ise bu oran %0.53 yükselmiştir (85) ve tüm vasküler malformasyonların %5-15'ini kapsamaktadır (82, 83, 85, 86).

Serebral kavernomların toplumda görülme sıklıkları her ne kadar düşük olsa bile belirli topluluklarda hastalığın görülme sıklığı değişmektedir. Örneğin, Caucasian popülasyonunda, hastalığın insidansı %10-20 arasında değişmekte iken, bu oran Hispanik-Amerikalılarda %50'lere ulaşmaktadır (87). Bu topluluklarda hastalığın çok daha yüksek sıklıkta görülmesinin nedeni, hastalığın oluşumunda genetik faktörlerin katkısının bulunmasından kaynaklanmaktadır çünkü bu popülasyonlarda founder bir mutasyonun bulunması ve founder efekten dolayı hastalığın görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (88).

- Cinsiyet ve Yaşın Önemi

Serebral malformasyonlar çocukluk döneminde ortaya çıkabildiği gibi yetişkin dönemde de ortaya çıkmaktadır. Yetişkin dönemde görülen SKM'larda kanama riski çok daha fazla olduğu için daha büyük risk taşımaktadır (89). Bu geniş aralığa rağmen hastalık en sık olarak 30-50'li yaşlarda görülmektedir (75) ve hastalığın görülme sıklığı kadın ve erkekte aynıdır. Erkekde hastalık ortalama 30'lu yaşlarda ortaya çıkarken, kadınlarda ise ortalama 40'li yaşlarda ortaya çıkmaktadır (82, 90).

- Lezyon Büyüklüğü ve Lokalizasyonu

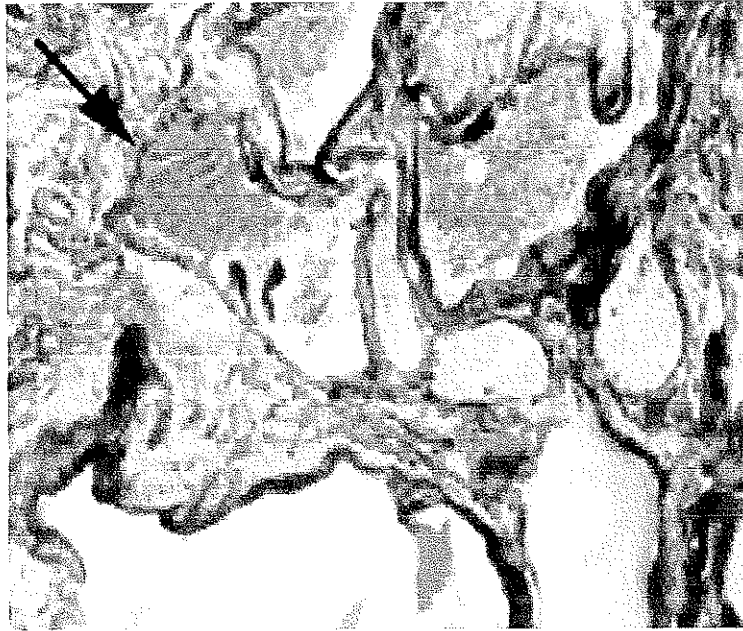
SKM'da lezyon büyüklüğü ve lezyonun lokalizasyonu hastalığın kliniğinde oldukça önemlidir. Lezyon büyüklüğü 0.1 cm ile 9 cm arasında değişmektedir (83, 90-93). Sporadik olgularda genellikle tek lezyon gözlenirken, ailesel geçişli olgularda lezyon sayısı artmaktadır (94, 95). Kavernomlar supratentoryal olmak üzere beynin herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir (4). Pons ve serebellum en yaygın infratentorial alanların başında yer alır. Özellikle ponsda posteriyor fossada görülme sıklığı %10-23 olarak bildirilmiştir (82, 90-92).

2.7.4 Hastalığın Histopatolojisi

SKM'ler makroskopik olarak normal beyin dokusundan kolaylıkla ayrılabilen, belirgin bir besleyici arteri olmayan koyu kırmızı-mor renkli böğürtlen benzeri

damarsal oluşumlardır SKM'lerin mikroskopik incelenmesinde ise, matriks içine gömülü genişlemiş, ince duvarlı sinusoidal görünümüne, sadece endotelial hücreler tarafından kuşatılmış normal damar elemanlarının ve normal beyin parenkiminin olmadığı yapılar olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.6, 96) SKM'ları oluşturan damar duvarında düz kas ve elastik mebran bulunmaz. Kanamaların fazla olması nedeni ile lezyon içerisinde hemosiderin yüklü makrofajlar ve kalsifikasyon alanları bulunmaktadır (4)

Bu lezyonlar, elektron mikroskopik düzeyde incelendiğinde beyinde önemli iki yapının olmadığı göze çarpmaktadır Birincisi, endotelial hücreler arasında bulunan sıkı (tight) bağlantıların olmaması (97), ikinci önemli mikroskopik bulgu ise, kan-beyin bariyerini oluşturan astrositik uzantıların (astrositik foot-end) endotelial hücrelere kadar uzanmadan gliotik sınırdan sonlanmasıdır (4, 98)



Şekil 2.6: Kavernomların histopatolojik görünümü. Kavernomlar normal damar elemanlarından ve konnektif dokudan yoksun sadece endotelial hücreler tarafından oluşmuş etrafında normal beyin parenkimasının olmadığı yapılar olarak gözlenir. Lezyon alanı ok ile gösterilmiştir (99)

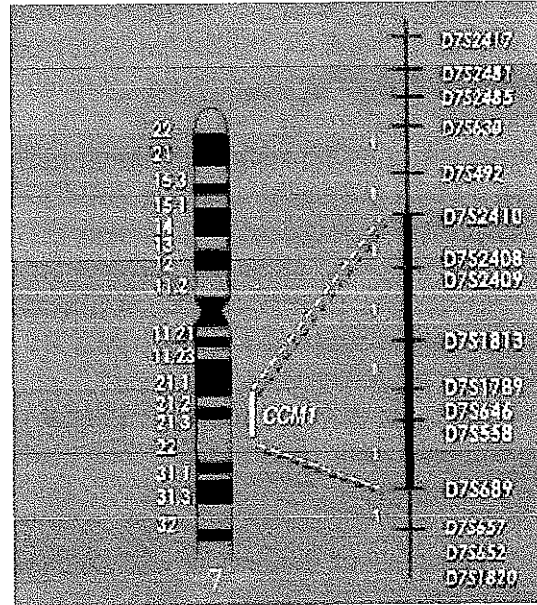
2.7.5 Hastalığın Tedavisi

Serebral kavernomlarda hastalık semptomatik olduğu gibi asemptomatik olarak da karşımıza çıktığından kesin bir tedavisi yoktur. Semptomatik olgularda epileptik nöbetler için anti-epileptik ilaçlar ve hemanjiyomların yarattığı baskıdan doğan baş ağrısı için ağrı kesiciler kullanılmaktadır. Kanama olduğu zaman ise, lezyon operasyon için tehlikeli bir yerde değilse cerrahi girişimler ile uzaklaştırılmaktadır (75, 100)

2.7.6 Hastalığın Moleküler Genetiği

Kavernomlar sporadik olarak ortaya çıkabildiği gibi kalıtsal olarak da görülmektedir (87, 101). Hispanik ailelerde yapılan moleküler çalışmalar ile, SKM'lerin otozomal dominant formda kalıtılan vasküler bir bozukluk olduğu ilk olarak üç farklı grub tarafından segragasyon analizi, linkaj ve pozisyonel klonlama gibi farklı teknikler kullanılarak gösterilmiştir (102-104)

Hastalıkla ilişkili genin D7S646, D7S558, D7S689 markerları arasında 7-cM'lik bir aralıkta yer aldığı Günel ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Şekil 2.7, 102). Dubovsky ve arkadaşlarının yapmış oldukları linkaj çalışmasında ise, SKM'den sorumlu gen bölgesinin 7q11-q22'de lokalize olduğu tanımlanmış ve bu bölge CCM1 olarak adlandırılmıştır (103). Böylece, kavernomlu ailelerde yapılan linkaj çalışmaları sonucunda hastalıkla ilişkili genin, 7 nolu kromozomun uzun kolunda yer aldığı gösterilmiştir (102, 103)



Şekil 2.7: 7 nolu kromozomun idiogramı CCM1 lokusunun hastalıkla ilişkisinin ortaya çıkmasında kullanılan markerlar şematize edilmiştir (102)

2.7.6.1 Serebral Kavernoz Malformasyonlarda Genetik Heterojenite

CCM1 lokusunun tanımlanmasını takiben yapılan mutasyonel çalışmalar, hastalığın oluşumundan sorumlu ilave genlerin olduğunu göstermiştir. Hispanik olmayan ailerde yapılan linkaj çalışmaları sonucunda, CCM1 lokusu dışında kavernom oluşumu ile ilişkili CCM2 (7p15-13) ve CCM3 (3q25 2-27) olarak adlandırılan ilave iki lokus daha tanımlanmıştır. Serebral kavernomların %40'nun CCM1, %20'sinin CCM2, %40'nun ise CCM3 lokusu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (105). Bu nedenle SKM'li

ailelerde CCM1 lokusuna ilaveten, CCM2 ve CCM3 lokuslarının da taranması gerektiği ortaya çıkmıştır.

2.7.6.2 KRIT1 Geninin Tanımlanması

Kavernomlar ile ilişkili üç ayrı lokus tanımlanmasına rağmen, sadece CCM1 lokusu içerisinde yer alan KRIT1 (*Krevl Interaction Trapped gene 1*) geni tanımlanabilmiştir. KRIT1 geni ilk olarak yeast two hybrid sistemi kullanılarak klonlanmış, bu genin aromatik yapıdaki aminoasidlerce zengin 529 aminoasidlik bir proteini kodladığı ve proteinin karboksi terminal bölgesinde 280 ile 433 aminoasidlik bölgenin Rap1A1 ile ilişkiye girdiği gösterilmiştir (106)

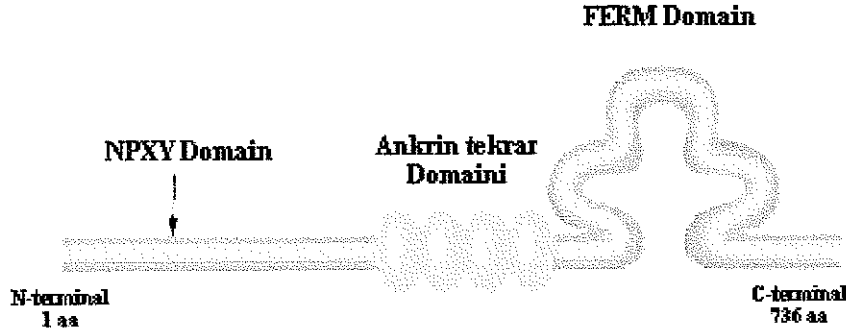
KRIT1 geninin klonlanmasını takiben, Couteulx ve arkadaşları Hispanik ailelerde, kalıtsal ve sporadik olgularda yaptıkları mutasyon analizlerinde hastaların %50'sinde 14. ekzondaki C→T değişimini (2105. nükleotid) founder mutasyon olarak (107) bildirmişlerdir. Daha sonra, Günel ve arkadaşlarının yine Hispanik ailelerde kalıtsal ve sporadik olgularda yapmış oldukları çalışmada ise hastaların %85'de 6. ekzondaki C→T değişimi (742. nükleotid) founder mutasyon olarak bildirilmiştir (6). Bu iki çalışma grubuna ilaveten, bir çok araştırmacı tarafından farklı popülasyonlarda ailesel ve sporadik olgularda mutasyon taramaları yapılmış ve yeni mutasyonlar bildirilmiştir (108-115). Eerola ve arkadaşları, SKM'a ek olarak hiperkeratik kapiller ve venöz malformasyon (HCCVM) gösteren ailelerde, KRIT1 geninin ekzon 1'inde 103. nükleotiddeki guaninin (G) delesyona uğradığını göstermişlerdir. Bu çalışma, KRIT1 gen ürününün hem serebral vaskülarizasyonda hem de kutaniyoz vaskülasyonda önemli olduğunu göstermiştir. SKM'lı hastalarda KRIT1 mutasyonları tüm ekzonlara dağılmış iken, SKM'ye ek olarak HCCM'lı hastalarda sadece ekzon 1'de mutasyonun bulunması genotip-fenotip ilişkisinin önemini göstermektedir (116). Yapılan mutasyon çalışmalarının hepsinde KRIT1 geninde meydana gelen mutasyonların premature mutasyonlar olduğu böylece güdük (truncated) ürün oluşturduğu gözlenmiştir (6, 108-117)

KRIT1 geni başlangıçta 529 aminoasidi kodlayan 12 ekzon ve 11 intronu olan bir gen olarak tanımlanmıştır (106), fakat daha sonra yapılan çalışmalar, ilave 4 ekzonun tanımlanmasıyla, genin 16 ekzon ve 15 introndan oluşan ve 736 aminoasidi kodlayan bir gen olduğu gösterilmiştir (118-120).

2.8 KRIT1 Proteininin Yapısı

KRIT1 proteinin hücresel fonksiyonu hakkında son üç yıla kadar çok fazla bilgi bulunmamaktaydı. Yapılan bir çok çalışmada sadece KRIT1 genindeki mutasyonlar bildirilmişti (107-117). KRIT1 proteininin tanımlanmış proteinlerle olan homolojisi araştırıldığında, hücre içi fonksiyonları yerine getirecek FERM, Ankrin tekrar domain ve NPXY gibi üç önemli domaine sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.8). Ayrıca,

KRIT1'in yapısında bu domainlere ek olarak 46-51 ve 569-572 aminoasidleri arasında iki tane potansiyel nuklear lokalizasyon sinyal dizisi (NLS) olduğu gösterilmiştir (119).



Şekil 2.8: KRIT1 proteininin domain organizasyonu. FERM domain, ankrin tekrar domaini ve N terminal bölgede ICAP1 α bağlanımı için gerekli olan NPXY domaini görülmektedir (121).

2.8.1 FERM Domaini

FERM (4.1, Ezrin, Radixin, Moesin) ailesi, plazma membran proteinleri ile hücre iskeleti arasında bir köprü olarak görev yapan, birbiri ile oldukça yakın benzerlik gösteren dört proteinden oluşmaktadır bu nedenle hem hücre iskeleti organizasyonunda hem de hücre içi sinyal iletiminde rol oynamaktadır (122, 123) FERM ailesine ait proteinlerin, aktin ve integral membran proteinleri arasındaki bağlantıyı regüle ederek hücre zarının işlevini ve yapısını etkilediği bilinmektedir. Bu bağlantı integral membran proteinlerinin sitoplazmik kuyruklarına FERM domainin bağlanması ile direkt olabileceği gibi, yardımcı proteinler yardımı ile indirekt yoldan da gerçekleşebilir (124). FERM domaininin kendi karboksi ve amino terminal bölgeleri arasındaki ilişki, proteinin kurmuş olduğu ilişkiyi baskılayabilir. Bunun en güzel örneğini ezrin oluşturmaktadır. Ezrinin, N-terminaline bağlanması proteinin karboksi terminal bölgede F-aktin ile kurmuş olduğu ilişkinin bloklanmasına neden olur (125-127) Ezrin fonksiyonu F-aktin bağlanımı ile ilişkilidir, bu yüzden ezrinin Rho proteinleri tarafından fosforilasyonu veya N-terminal bölgesine fosfoditilinositol-4,5-difosfatların bağlanması F-aktin ile olan ilişkisini baskılar (128-130).

KRIT1 proteininin C-terminalinde yer alan FERM domaininin henüz nasıl bir işleve sahip olduğu tam olarak bilinmemektedir. FERM domainin fonksiyonu konusunda iki hipotez bulunmaktadır: KRIT1, FERM domaini yardımıyla ya hücre zarı ve hücre iskeleti proteinleri arasında bir köprü oluşturup bir sinyal yolunu aktive edebilir ya da KRIT1'in gerçekleştirmiş olduğu mevcut protein-protein ilişkisini engelleyebilir (121). KRIT1 proteininin yapısındaki FERM domaininin rolünün ne olduğunun daha ayrıntılı araştırılması, serebral kavernoza malformasyonlarda lezyon oluşumunun aydınlatılması için oldukça büyük önem taşımaktadır.

2.8.2 Ankrin Tekrar Domaini

Ankrin tekrar dizileri en yaygın görülen protein motiflerden biridir ve protein-protein ilişkisinin kurulmasına yardımcı olur. Ankrin tekrar domainleri hem basit hem de kompleks organizmalarda (virus-insan) bulunmaktadır. Şu ana kadar 400'den fazla proteinin Ankrin tekrar domainlerine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu proteinler arasında CDK inhibitörleri, transkripsiyonel regülatörler, hücre iskeleti proteinleri ve gelişimsel proteinler yer almaktadır (131). KRIT1 proteininin yapısında Ankrin tekrar domainleri gibi protein-protein ilişkisinde görev alan bir domainin bulunması KRIT1'in bir çok protein ile ilişki kurabilme yeteneğinde olduğunu göstermektedir. Literatürde KRIT1 dışında hem ankrin hemde FERM domainine sahip başka bir protein tanımlanmamıştır (121).

2.8.3 NPXY Domaini

NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) domaini ilk olarak integrinlerin sitoplazmik domainlerinde tanımlanmıştır çünkü bu domain bir çok sitoplazmik proteine bağlanarak integrinlerin biyolojik işlevlerini yerine getirmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Çoğu integrinin beta kuyruğunda bir veya iki tane NPXY domaini bulunur. NPXY domaini, içerisindeki tirozin aminoasidi Src kinazlar tarafından fosforillendikten sonra fosfotirozin bağlayıcı domain (phosphotyrosine binding domain, PBD) içeren proteinler tarafından tanınarak bir çok sinyal yolunu aktive eder ve hücre migrasyonu, adezyonu, gibi hücre fonksiyonları düzenler (132, 133). PBD içeren proteinler arasında Numb, Dab1, Dab2, EPS8, Tensin, Dok1, Talin ve ICAP1 α gelmektedir (134). KRIT1'in N-terminal bölgesinde tanımlanan NPXY domaininin ICAP1 α 'ya bağlanarak hücre fonksiyonlarında görev aldığı düşünülmektedir (135, 136).

2.9 KRIT1 ile İlişkiye Giren Proteinler

2.9.1 Rap1A (Krev)

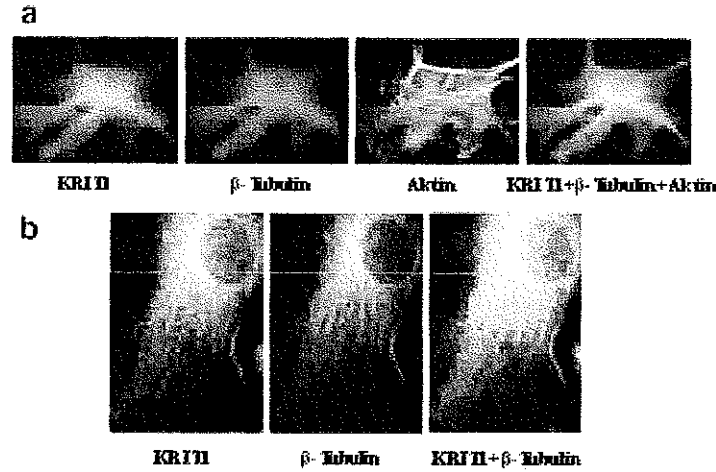
Rap1A (Krev), Rap1B ve Rap2 Rap ailesinin üyeleri olarak tanımlanmıştır. Her üç protein de Ras ailesi ile yüksek oranda homoloji göstermektedir. Ras proteininin, Rap proteinlerinden farkı Ras'da 61. amino asit glutamin iken, Rap'da treonin aminoasidi bulunmaktadır (137). Rap1A'nin mayadaki homologu olarak Bud1/Rsr, sirke sineğindeki homologu olarak ise Ras3 proteini tanımlanmıştır. Hem Bud1 hem de Ras3'ün GTPaz sinyal yolunu kontrol ederek hücre farklılaşması, migrasyonu ve embriyonik dönemde vücut morfolojisinin düzenlenmesi gibi hücre fonksiyonlarında işlev gördüğü gösterilmiştir (138). Memeli hücreleri Rap1A ile transfekte edildiğinde, transforme olmuş fenotipin baskılandığının gösterilmesi, Rap1A'nin bir tümör süpresör gen olarak tanımlanmasına neden olmuştur (139). Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda, Ras aracılı sinyal yolunun Rap1A düzeyi ile ilişkili olmadığı, bu yüksek homolojiye karşın Ras ve Rap1A'nın farklı sinyal yollarını kullanarak hücre fonksiyonları yerine getirdiği gösterilmiştir (140).

2.9.2 İntegrin Sitoplazmik Domain-Associated Protein 1 (ICAP1)

İntegrinler, hücre yüzey proteinleri ve ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanan transmembranal heterodimerik proteinlerdir. İntegrinlerin kendi ligandlarına bağlanımı, hücre içinde bir çok sinyal yolunu indükleyerek hücre migrasyonu, proliferasyonu, farklılaşma gibi hücreyel olayları aktive eder. İntegrinlerin sitoplazmik domainleri fokal adezyon kinazları (Focal Adhesion Kinase, FAK) aktive ettiği için hücre adezyonunda oldukça önemlidir (10). Chang ve arkadaşları yeast two hybrid sistemini kullanarak $\beta 1$ integrinin sitoplazmik domaininin ICAP1 α ile ilişkiye girdiğini göstermişlerdir. ICAP1'nin alternatif splicing ile oluşan ICAP1 α ve ICAP1 β olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. ICAP1 α , fosfoproteindir ve fosforilasyonu integrin bağımlı hücre-ekstrasellüler matriks ilişkisi ile regüle edilmektedir (141). ICAP1 α , $\beta 1$ integrine bağlanırken, ICAP1 β ise $\beta 1$ integrin ile ilişkiye girmedeği gösterilmiştir. İntegrin $\beta 1$ ile ICAP1 α arasındaki bu ilişki, diğer integrinler ile karşılaştırıldığında, çok daha özgül olduğundan bu bağlantının kurulabilmesi için $\beta 1$ integrinin C-terminalinde bulunan korunmuş NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) motifine ihtiyaç olduğu görülmüştür (142). KRIT1'in N-terminal bölgesinde yer alan NPXY domainin ICAP1 α bağlanımı için gerekli olduğu gösterilmiştir. $\beta 1$ integrinde olduğu gibi KRIT1'de ICAP1 β ile ilişkiye girmeyip, ICAP1 α ile ilişkiye girer. Bu nedenle, KRIT1'in ICAP1 α ile $\beta 1$ integrin arasındaki ilişkiyi engellediği ileri sürülmektedir (135, 136).

2.9.3 Mikrotübüller

Mikrotübüller, globular ünitelerin polimerizasyonu ile oluşan fibriller yapıdaki proteinlerdir ve hücre içerisinde intrasellüler veziküler transport, membran organellerinin organizasyonu, kromozom segragasyonu, hücre şeklinin ve hareketinin belirlenmesi gibi önemli hücreyel aktivitelerde görev alırlar. Mikrotübüllerin en önemli özelliği dinamik yapılarının olmasıdır. Mikrotübüller α ve β tübülün alt ünitelerinin bir araya gelmesiyle oluşan heterodimerik yapılardır (143). Tübülün, GTP bağlayan bir proteindir ve her tübülün alt birimi iki GTP molekülünü bağlar. GTP, α -tübüline geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve hidrolize olmazken, β alt birime geri dönüşümlü olarak bağlanır ve GDP'ye hidrolize olur (144). Mikrotübül dinamiğini regüle eden proteinler mikrotübülleri stabilize eden ve destabilize eden proteinler olarak iki gruba ayrılır. Mikrotübülleri stabilize eden proteinlere Mikrotübül İlişkili Proteinler (Mikrotübül associated proteinler, MAPs) ve destabilize eden proteinlere de Op18 örnek olarak verilebilir (145, 146). Günel ve arkadaşlarının endotelial hücrelerde yapmış oldukları çalışmada, KRIT1'in β -tübülün ile ilişkiye giren bir mikrotübül ilişkili protein (MAP) olduğu immunofloresan (Şekil 2.9) ve immunopresipitasyon yöntemleri ile gösterilmiş ve KRIT1 ve β -tübülün arasındaki bu ilişkinin endotelial hücre şeklinin korunmasına yardımcı olduğu ileri sürülmüştür (81). KRIT1 ve β -tübülün arasındaki bağlanıma benzer model EB1 ve β -tübülün arasında gösterilmiştir (147, 148).



Şekil 2.9: Endotelyal hücrelerde KRIT1 ve β -tübülün ilişkisi a) Endotelyal hücreler KRIT1, aktin ve β -tübülün ile birlikte boyandığında, KRIT1, β -tübülün ile benzer boyanma modeli gösterirken, aktinden farklı bir model göstermektedir b) Daha büyük büyütmedeki görünümü (81)

2.10 KRIT1 Aracılı Hücresel Mekanizmalar

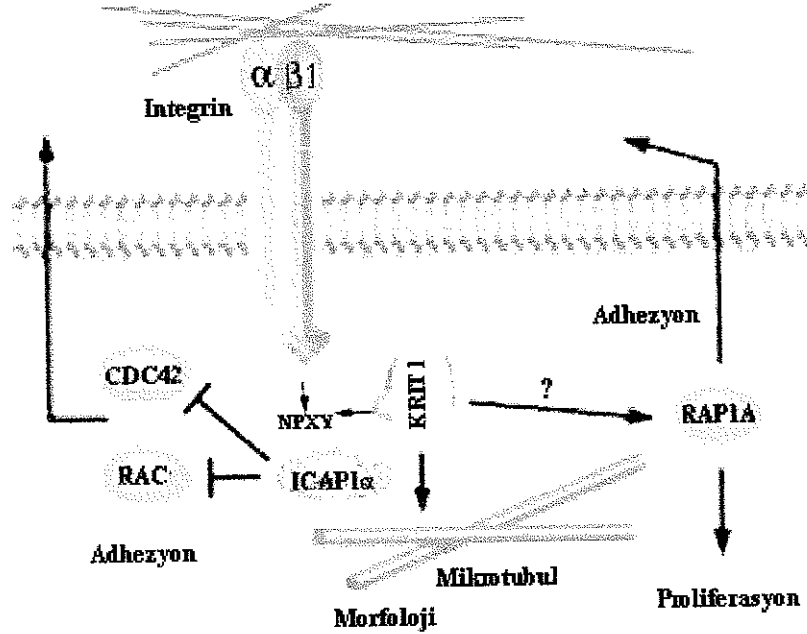
KRIT1 proteininin tam fonksiyonu henüz bilinmediğinden, KRIT1 aracılı sinyal yolu da tam olarak aydınlatılamamıştır. KRIT1 proteinindeki motifler ve ilişkiye girdiği proteinlere bakıldığında KRIT1'in birden fazla sinyal yolunu kullanarak hücresel olaylarda görev yaptığı ileri sürülmektedir (Şekil 2.10). KRIT1 aracılı hücresel mekanizmalar KRIT1'in ICAP1 α 'ya, Rap1A'a yada β -tübüline bağlanmasıyla gerçekleşir. KRIT1'in bu proteinlere bağlanmasının hücre adezyonunu, proliferasyonunu yada hücre morfolojisini etkilediği ileri sürülmektedir (121)

2.10.1 Rap1A Aracılı Mekanizmalar

KRIT1 ilk olarak Rap1A1 ile olan ilişkisi nedeniyle, Rap1A bağımlı hücre proliferasyonunun bir regülatörü olarak tanımlanmıştır (KRIT1) çünkü Rap1A'nın Ras overekprese eden murin fibroblastlarının transforme olmuş formunu geriye çevirdiği bildirilmiştir (139). Bu çalışmayı takiben, KRIT1'in CHO-K1 hücrelerinin kimyasal olarak indüklenmiş reverse-transformasyon süresince transkripsiyonel olarak aktif olduğu gösterilmiştir (149). Sonuçta, Rap1A'nın aralarındaki yüksek homolojiye rağmen, Ras antagonisti olarak görev yaptığı ve KRIT1'in Rap1A ve Ras arasındaki ilişkiyi düzenlediği ileri sürülmüştür. SKM'li hastalarda KRIT1 geninde meydana gelen mutasyonlar KRIT1'in Rap1A ve Ras arasındaki regülatör etkisinin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Böylece, bu moleküler ilişkinin bozulması Ras sinyal yolunun aktivasyonuna bağlı olarak hücre proliferasyonuna neden olduğu ileri sürülmektedir (121, 138) KRIT1-Rap1A için öne sürülen bu model, Rap1A'yı aktif olarak eksprese

eden in vivo ve in vitro modellerde detaylı olarak araştırıldığında, Rap1A'nın Ras yolunu inhibe etmek yerine aktive ettiği gösterilmiştir (150)

KRIT1 ve Rap1A ilişkisine en güzel örnek olarak Tuberin-Rap1A ilişkisi verilebilir. Tuberin GTPaz aktive edici bir proteindir ve TSC2 olarak adlandırılan bir gen tarafından kodlanır. TSC2'de meydana gelen mutasyonlar, otozomal dominant formda kalıtılan benign nörokütanöz tümörlere neden olur. Tuberin-Rap1A ilişkisi model olarak alındığında, TSC2'de meydana gelen somatik mutasyonlar veya heterozigosite kaybının Rap1A'nın sürekli aktivasyonuna neden olduğu ve kontrolsüz hücre büyümesine bağlı olarak tümör geliştiği ileri sürülmektedir (151, 152). Aynı şekilde, SKM'larda lezyon oluşumunda da KRIT1'in Rap1A aracılı sinyal yolunda tümör süpresor olarak görev yaptığı ve KRIT1 genindeki mutasyonların Rap1A'yı aktive ederek, kontrolsüz endotelial hücre proliferasyonuna bağlı olarak da kavernom oluşturduğu ileri sürülmüştür (121). Buna karşın, daha sonra yapılan immunopresipitasyon çalışmalarından KRIT1 ile Rap1A ilişkisinin çok zayıf olduğu gösterilmiştir (135). Serebral malformasyonların histopatolojik yapısı ayrıntılı incelendiğinde endotelial hücrelerde proliferasyondan ziyade hücre organizasyonu veya hücre adezyonunda bir bozukluk olduğu görülmektedir.



Şekil 2.10. KRIT1 aracılı sinyal mekanizması KRIT1 NPXY domaini aracılığıyla ICAP1α'ya bağlanım için β1-integrin ile yarış içerisinde. Böylece integrin aracılı hücre adhezyonu baskılanmış olur (121).

2.10.2 ICAP1 α Aracılı Mekanizmalar

İki farklı grup tarafından yeast two hybrid sistemi kullanılarak KRIT1'in ICAP1 α ile ilişkiye girdiği gösterilmiş ve bu protein-protein ilişkisi ortaklaşa-immunopresipitasyon ve GST afinite presipitasyon yöntemleri ile konfirme edilmiştir (135, 136). ICAP1 α , fosfotirozin domaini içeren 200 aminoasidlik bir protein olup, (153), integrinin beta domaininin sitoplazmik bölgesinde yer alan NPXY domainine bağlanarak hücre adezyonu, yayılması ve proliferasyonu gibi olaylarda görev almaktadır (154, 155).

ICAP1 α , β 1-integrine bağlanarak sitoplazmadan hücre içine, hücre içinden de hücre dışına bilgi akışını sağlar. β 1-integrin aracılığıyla gerçekleştirilen bu bilgi akışı, KRIT1 ile de gerçekleştirilebilir çünkü β 1-integrine benzer olarak KRIT1 içerisinde de ICAP1 α 'nın bağlanımı için gerekli olan NPXY domaini bulunmaktadır ve KRIT1 ve β 1-integrin ICAP1 α 'a bağlanmak için yarış içerisinde dirler (135-136). KRIT1'in ICAP1 α 'a bağlanımı, ICAP1 α 'dan β 1-integrinin ayrılmasına dolayısıyla β 1-integrin ile gerçekleştirilen adezyon gibi hücre içi olayların baskılanmasına neden olduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, ICAP1 α 'nin, integrin ve KRIT1 dışında Rho GTPaz üyelerinden Cdc42 ve Rac1 ve de metastazda görev alan NM23-H2 (NDP kinaz B) ile de ilişkiye girdiği gösterilmiştir (155, 156). ICAP1 α , Cdc42 ve Rac1'den GDP'nin ayrılmasını engelleyerek hücre yayılmasını engeller. KRIT1 geninde meydana gelen mutasyonlar nedeniyle hücre içerisinde KRIT1 proteininin azalması veya yokluğu KRIT1-ICAP1 α arasındaki dengenin bozulmasına ve hücre içerisinde serbest ICAP1 α artışına neden olacağı ve ICAP1 α 'nında Rho GTPaz'ları baskılayarak hücre adezyonu ve yayılmasına neden olduğu düşünülmektedir (121).

GEREÇ ve YÖNTEM

Western blot analizi için kullanılan taze dokular ve immunohistokimya için kullanılan parafin dokular Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümünden, gebeliğin farklı dönemlerine ait plasental doku örnekleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından, Serebral malformasyonlu hastaların parafin dokuları ise Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalından sağlandı

3.1 Hücre Kültürü

Bovine aortik endotelial hücreler (Bovine Aortic Endothelial Cells, BAECs), Cos7, insan endotelial hücreleri (Human Endothelial Cells) ve HeLa hücre hatları farklı firmalardan dondurulmuş olarak satın alındı.

Kullanılan Solüsyonlar:

BAEC Besi Ortamı:

- Yüksek Glikozlu (4500 mg/L) DMEM (Gibco)
- %10'luk (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco)
- %1'lik (v/v) Penisilin-Streptomisin Karışımı (Gibco)
- %1'lik (v/v) Na-pirüvat (Gibco)
- %1'lik (v/v) HEPES (Gibco)

Cos7 Besi Ortamı:

- Düşük Glikozlu (1000 mg/L) DMEM (Gibco)
- %10'luk (v/v) FBS (Gibco)
- %1'lik (v/v) Penisilin-Streptomisin Karışımı (Gibco)
- %1'lik (v/v) Na-pirüvat (Gibco)
- %1'lik (v/v) HEPES (Gibco)

Hazırlanan tüm besi ortamları steril koşullar altında hazırlanıp, 0.2 µ'luk Milipor filtreler ile filtre edildikten sonra, +4°C'de saklandı

Dondurulmuş olarak gelen hücreler 37°C'lik su banyosu içerisinde çözüldükten sonra, hemen T-75'lik kültür kaplarına alınarak üzerlerine 10 ml besi ortamı eklendi ve 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde üremeye bırakıldı. 24 saat sonunda ortamdaki DMSO ve hücre kabına yapışmayan ölü hücreler besi ortamı ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Her 48 saatte bir besi ortamı değiştirildi ve hücreler kültür kabını kaplayıncaya kadar üretildi. BAE, insan endotelial ve HeLa hücreleri için BAEC besi ortamı kullanılırken, Cos7 hücre hattı için Cos7 besi ortamı kullanıldı.

3.2 Antikor Pürifikasyonu

KRIT1 proteinin farklı bölgelerine karşı 3 farklı peptid Zymed firmasının önerileri doğrultusunda, peptid 1 (259-275 aa) DYSKIQIPKQEKWQRS, peptid 2 (473-490 aa) QELPYHKPLQHVVDWPE ve peptid 3 (724-736 aa)

GGGKLNQQLMATERSNS dizelerinden oluşan peptidler olarak dizayn edildi ve firmaya gönderildi. Zymed firması tarafından pürifiye edilen anti-peptid antikorlar laboratuvarımıza gönderildi. Antikor özgünlüğü, KRIT1 eksprese eden BAE hücre hatlarına ve KRIT1 eksprese etmeyen Cos7 hücrelerine KRIT1 geni transfekte edildikten sonra Western blot ile test edildi. Çalışmamızda peptid 1 ve 3 karşı oluşturulan poliklonal antikorlar kullanıldı.

3.3. İmmunofloresan Boyama Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

10X PBS (Fosfat buffer saline) Tamponu:

- 14,4 g Na₂HPO₄ 2H₂O (Merck)
- 3 g KH₂PO₄ (Merck)
- 2 g KCl (Sigma)
- 8 g NaCl (Sigma)

Yukarıdaki kimyasallar 1 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve 3X ve 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

%4 (v/w) Paraformaldehid (PFA) Solüsyonu:

24 gram toz paraformaldehid 360 ml distile su içerisine eklendi ve 60°C'de ısıtıcı üzerinde çözülmeye kadar karıştırıldı. Süt görünümündeki solüsyonun pH'sı 2N NaOH ile 7,2'ye ayarlandı ve üzerine 240 ml 3X PBS eklendikten sonra filtre edilerek +4°C'de saklandı.

Permiabilizasyon Solüsyonu:

500 ml 1X PBS içerisine 1000 µl Triton X-100 (Sigma) eklendi ve solüsyon oda ısısında saklandı.

%5'lik (v/v) Serum içeren Bloklama Solüsyonu:

1000 µl 1X PBS içerisine 50 µl keçi veya at serumu (Vector Lab) eklendi ve solüsyon +4°C'de saklandı.

Negatif tavşan veya fare IgG Solüsyonu:

1 ml bloklama solüsyonu içine primer antikor konsantrasyonu ile aynı olan tavşan veya fare IgG'leri (Vector) eklendi ve solüsyon +4°C'de saklandı.

İmmunofloresan boyaması için 4-gözlü chamber slaytlarda kültüre edilen endotelial hücreler etüvden alındıktan sonra, 1X PBS ile 2 defa 5'şer dakika oda ısısında yıkandı ve %4'lük PFA ile +4°C'de 20 dakika fikse edildi. Fiksasyon aşamasından sonra slaytlar PBS ile 2 defa 5 dakika yıkandı. Permiabilizasyon solüsyonu ile hücreler 10 dakika oda ısısında bekletildi ve PBS ile iki defa yıkandı. Yıkama işlemlerinden sonra özgül olmayan bağlanımı bloke etmek için %5'lik bloklama solüsyonu ile oda ısısında 1 saat bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, slaytlar üzerine uygun primer antikorlar eklenerek oda ısısında 1 saat veya +4°C'de gece boyu bekletildi. İmmunofloresan boyama için kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları Tablo 3.1'de verilmiştir. Negatif kontrol olarak,

primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olan normal tavşan veya fare IgG'leri kullanıldı. Primer antikor aşamasından sonra, slaytlar PBS ile 3 defa 10 dakika yıkandıktan sonra, floresan işaretli sekonder antikorlar ile (Cy2 veya Cy3, ImmunoResearch) 30 dakika oda ısısında bekletildi. Kullanılan sekonder antikorlar ve dilüsyonları Tablo 3.1'de verilmiştir. Yıkama işlemlerinden sonra, nükleusları görüntülemek amacıyla slaytlar 10 dakika oda ısısında 4',6-diamidino 2-fenilindole, dihidroklorid (DAPI, Sigma) ile boyandı. PBS ile 10 dakika 2 defa oda ısısında yıkandıktan sonra slaytlar floresan koruyucu vasat ile kapatıldı ve floresan mikroskobu altında uygun dalga boyunda ve uygun filtreler kullanılarak incelendi.

Tablo 3.1. İmmunoflorasan boyama için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları

Primer Antikor	Primer Antikor Dilüsyon Oranı	Sekonder Antikor	Sekonder Antikor Dilüsyon Oranı
KRIT1	1/100	Anti-rabbit	1/500
β 1 İntegrin	1/100	Anti-mouse	1/500
β -Tubulin	1/500	Anti-mouse	1/500
Aktin	1/500	Anti-mouse	1/500

3.4 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Kullanılan Solüsyonlar:

Trizol (Invitrogen)
 Glikojen (1 μ g/ μ l, Invitrogen)
 Kloroform (Baker)
 İzopropanol Alkol (Baker)
 RNaz İnhibitörü (40 unite/ μ l, Roche)
 Oligo (dT)₁₂₋₁₈ mer primer (0.5-1 μ g/ μ l, Invitrogen)
 Reverse Transcriptase M-MuLV (20 unit/ μ l, Roche)
 dNTP Karışımı (20 mM, Roche)

Dietil prokarbonat (DEPC) solüsyonu:

200 μ l DEPC 100ml bidistile su içine eklendi ve otoklavda steril edildikten sonra oda ısısında saklandı.

Reverse Transkriptaz (RT) Tamponu:

75 mM KCl
 50 mM Tris-HCl (pH=8)
 3 mM MgCl₂
 10 mM Dihidrotreitol

Hücrelerden besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra her 35-mm kültür kabı için 1 ml Trizol solüsyonu eklendi ve RNaz'dan yoksun steril kültür kazıyıcıları ile hücreler kültür kaplarından uzaklaştırıldı. Solüsyon mikrosantrifüj tübüne alındıktan

sonra üzerine 200 µl kloroform eklendi ve hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 3 dakika oda ısısında bekletildi. Örnekler 12.000 rpm'de +4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpde en üst kısımda oluşan temiz ve viskoz faz çok dikkatli bir şekilde mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 500 µl izopropanol ve 3 µl glikojen eklenerek oda ısısında 10 dakika bekletildikten sonra 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Dökelti uzaklaştırıldıktan sonra, oluşan RNA çökeltisi üzerine 1000 µl %70'lik etil alkol ilave edildi ve 8.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Dökelti atıldıktan sonra, tüplerin etrafındaki alkol kurutma kağıdı ile uzaklaştırıldı ve çökelti oda ısısında kurutuldu. RNA çökeltisi üzerine 20 µl DEPC solüsyonu eklenerek örnekler sulandırıldı. Örneklerin RNA kalitesi ve miktarları spektrofotometrik (Bio-Rad) olarak 260 nm ve 280 nm dalga boyunda okunarak belirlendikten sonra cDNA eldesi için aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

cDNA reaksiyonu

RNA	2-3 µg
Oligo dT (12-18 mer)	1 µl
RNaz İnhibitörü	1 µl
DEPC	8 µl

Yukarıdaki kimyasalları içeren tüpler mikropipet yardımı ile çok iyi karıştırıldıktan sonra, 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve üzerine aşağıda hazırlanan karışım eklendi.

5X RT-Tamponu	4 µl
10 mM dNTP	1 µl
Reverse transkriptaz	1 µl

Reaksiyon tüpleri 37°C'de 1 saat "thermal cycler"da (Promega) inkübe edildi. Örnekler buzdolabında saklandı.

3.5 RT-PCR

Kullanılan Solüsyonlar

PCR Tamponu:

1 M Tris-Cl
0.75 M NH ₄ SO ₄
1 M MgCl ₂

10X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu:

2216 g Tris
110 g Borik Asid
18.6 g EDTA

1 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

%1.5'lik (v/w) Agaroz Solüsyonu:

1.5 g agaroz 100 ml 1X TBE içerisinde çözüldükten sonra, mikrodalgada kaynatıldı. Jel oda ısısında yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine son konsantrasyonu 0.5 mg/ml olacak şekilde etidiyum bromür ilave edildi.

RT-PCR için cDNA'ların 260 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Bio-Rad) miktar tayini yapıldıktan sonra aşağıda verilen reaksiyon koşullarına göre KRIT1 ve aktin için özgül primerler (Tablo 3.2) kullanılarak RT-PCR reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3.2. KRIT1 ve aktin için kullanılan özgül primer dizileri

Primer Adı	Primer Dizisi
HKRIT1F	5' AATGGCAGAGAAGCATGAGC '3
HKRIT1R	5' GCAGCTTCTTCCCAGTTGTT '3
HKRIT2F	5' ACTGGGAAGAAGCTGCAAAA '3
HKRIT2R	5' CTGTGAAAATGCTGCTCCA '3
Aktin F	5' TTGCTGATCCACATCTGCTG '3
Aktin R	5' GACAGGATGCAGAAGGAGAT '3

RT-PCR için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı.

10X PCR Tamponu	2,5 µl
10 nM dNTP	2 µl
50 pmol Primer F	1 µl
50 pmol Primer R	1 µl
5 unite Taq Polimeraz	0,2 µl
1 µg/µl cDNA	2 µl
Steril Su	16,3 µl

Hazırlanan PCR karışımı pipet yardımı ile çok iyi karıştırıldıktan sonra, "thermal cycler"da (Promega) KRIT1 ve aktine özgül olarak hazırlanan PCR programında çoğaltıldı. PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

3.6 Hücre ve Dokudan Total Proteinlerin Elde Edilmesi

Hücre ve dokulardan elde edilen proteinlerin miktarları Bradford yöntemi ile tespit edildi (157).

Kullanılan Solüsyonlar:

Proteaz İnhibitör Kokteyli:

- 1 mM Na₃VO₄ (CalbioChem)
- 10 mg/ml Leupeptin (CalbioChem)
- 10 mg/ml Aprotinin (CalbioChem)
- 4 mM PMSF (CalbioChem)

Yukarıdaki kimyasallar 1 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve -80°C'de saklandı.

Lizis Tamponu:

- 50 mM HEPES (pH=7.4, Sigma)
- 50 mM NaCl (Sigma)
- 10% (v/v) Gliserol (Sigma)
- 1% (v/w) Triton X-100 (Sigma)
- 1.5 mM MgCl₂ (Merck)
- 1 mM EGDA (Sigma)
- 100 mM NaF (Sigma)
- 10 mM Sodyum pirofosfat

Yukarıdaki kimyasallar 10 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve endrof tip tüplere aktararak -20°C'de saklandı.

1X PBS Tamponu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı

Kültür kapları etüvden alınarak buz üzerine konuldu ve üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, soğuk 1X PBS ile 2 defa yıkandı ve -80°C'de saklandı. Kültür kapları -80°C'den alınıp, 35 mm'lik kültür kapları için üzerlerine 300 µl proteaz inhibitörü içeren lizis tamponu eklendi ve hücre kazıyıcısı ile hücreler kaldırıldı. Hücre süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine alınarak buz üzerinde 20 dakika bekletildikten sonra, 10.000 rpm'de 15 dakika soğuk odada santrifüj edildi. Dökelti temiz mikrosantrifüj tüplerine alınarak, protein miktarları belirlendi.

Taze dokular ise proteinaz inhibitörü eklenmiş soğuk PBS ile yıkanarak kandan temizlendi. Ortalama 30-40 mg doku olacak şekilde steril bisturi ile kesildikten sonra kalan dokular sıvı nitrojende donduruldu. Alınan dokuların üzerine 500 µl proteinaz kokteyli içeren lizis tamponu eklendi ve buz içerisinde homojenize edildi. Doku süspansiyonu mikrosantrifüj tüplerine alınarak buz üzerinde 30 dakika bekletildikten sonra, 10.000 rpm'de 15 dakika soğuk odada santrifüj edildi. Dökelti mikrosantrifüj tüplerine alınarak, protein miktarları belirlendi.

3.7 Western Blot Analizi**Kullanılan Solüsyonlar:****10X Yürütme Tamponu:**

- 25 mM Tris (Sigma)
- 192 mM Glisin (Sigma)
- %0.1 (v/w) SDS (Sigma)

1 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve oda ısısında saklandı. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

Bloklama Solüsyonu:

- 7.5 g yağsız süt tozu 150 ml TBS-I içerisinde çözüldü ve +4°C'de saklandı

10X TBS Tamponu:

24,4 g Tris
80 g NaCl

1 litre bidistile su içerisinde çözöldü ve oda ısısında saklandı. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

TBS-T Solüsyonu:

1 litre 1X TBS içerisinde 1000 µl Tween-20 eklendi ve oda ısısında saklandı.

Transfer Tamponu:

14,4 g Glisin (Sigma)
3,05 g Tris (Sigma)
200 ml Methanol (Baker)

800 ml bidistile su eklenerek hazırlandı ve +4°C'de saklandı.

4X Yükleme Tamponu:

62,5 mM Tris pH=6.8
%2 (v/w) SDS (Sigma)
%10 (v/v) Gliserol (Sigma)
200 mM Merkaptoethanol (Sigma)
%0.1 (v/w) Bromophenol blue (Sigma)

Yukarıdaki kimyasallar 10 ml bidistile su içerisinde çözöldükten sonra, 5 ml'lık falkon tüplerine aktarılarak -20°C'de saklandı. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

%7.5 Poliakrilamid Jel (Hazır Jel, BioRad)**Stripping Solüsyonu (Pierce)****Enhanced Chemiluminesent Solüsyonu (ECL, NEN)****GAPDH Antikoru (Santa Cruz)****Nitrosellüloz Membran (Bio-Rad)**

Doku ve hücrelerden elde edilen proteinlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra, her mikrosantrifüj tüpünde 20 µg protein olacak şekilde miktarları hesaplandı. Her örnek üzerine eşit miktarda yükleme tamponu ilave edildikten sonra, 95°C'de 5 dakika denatüre edildi ve %7.5'lük poliakrilamid jellere yüklendi. Örnekler üst jelden çıkıncaya kadar 120 V'da yürütöldü ve alt jele geldiklerinde voltaj 100 V'a düşürölerek yaklaşık 1 saat elektroforeze (Bio-Rad) tabii tutuldu. Elektroforez sonrası jel plakalardan ayrıldı ve transfer sistemine alınarak nitrosellüloz membrana 32 mA'de bir gece veya 100 mA'de 6 saat transfer edildi. Transfer sonrası, membran bloklama solüsyonu içerisinde 1 saat oda ısısında bekletildi. Bloklama aşamasından sonra, 10 ml bloklama solüsyonu içerisinde 1/1000 dilüsyon ile hazırlanan primer antikorlar ile 1 saat oda ısısında veya bir gece +4°C'de bekletildi. Primer antikör aşamasını takiben membran üç defa 20 dakika TBS-T ile oda ısısında yıkandı. Böylece ortamda zayıf bağlanan veya bağlanmamış

antikorlar uzaklaştırıldı. Yıkama aşamalarından sonra, bloklama solüsyonu içerisinde hazırlanan biotin ile işaretli anti-rabbit antikoru (Vector) ile oda ısısında 1 saat bekletildi ve TBS-I ile 3 defa 20 dakika yıkandı. Yıkama aşamalarından sonra, membran immunotespit için 1/1 oranında hazırlanan ECL ile yaklaşık 1 dakika inkübe edildikten sonra bir pens yardımı ile çok fazla kurutulmadan saran wrap üzerine alındı ve karanlık odada otoradiyografiye (Kodak Film) maruz bırakıldı (158) Membran daha sonra striping solüsyonu ile 20 dakika oda ısısında bekletilerek membrana bağlanan antikorlar uzaklaştırıldı ve iki defa 10'ar dakika PBS ile yıkandı. Her kuyucuğa eşit miktarda protein yüklendiğini göstermek amacıyla aynı membran GAPDH antikoru ile inkübe edildi ve yukarıda anlatılan işlemler uygulandı. Her kuyucukdaki KRIT1 ve GAPDH bandlarının dansitometrik değerleri okunarak Sigma Plot programında grafikleri çizildi.

3.8 İmmunohistokimya Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

1X PBS Tamponu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı

Sitrik Asid Tamponu:

1,05 g sitrik asid (Baker) 500 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2 N NaOH ile pH=6'ya ayarlandı.

%3'lük H₂O₂ Solüsyonu:

2.7 ml bidistile su üzerine 2.7 ml metanol ve 0.6 ml %30'lük H₂O₂ ilave edilerek hazırlandı

Bloklama Solüsyonu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı

Negatif tavşan veya fare IgG Solüsyonu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı

Streptavidin-peroksidaz kompleksi (ABC, Vector Lab)

3-amino 9-etilkarbazol (AEC, Vector Lab)

3-3'-diaminobenzidin (DAP, Vector Lab)

İmmunohistokimya boyaması için 5-µm kalınlığında lam üzerine alınan parafin kesitler, 60°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra, 2'şer defa 20 dakikalık ksilol ve 5 dakika %100, %90 ve %70'lık alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edildi. Alkol serilerinden sonra kesitler, 5 dakika su içerisinde dehidrate edildikten sonra 1X PBS ile iki defa yıkandı ve taze hazırlanan sitrik asit tamponunda 2 defa 5 dakika mikrodalgaya maruz bırakıldı. Kesitler mikrodalga sonrası oda ısısında soğutulduktan sonra, PBS ile 5 dakika oda ısısında yıkandı. Daha sonra,

dokulardaki endojenik peroksidaz aktivitesi %3'luk H₂O₂ solüsyonu ile oda ısısında 10 dakika bekletilerek yok edildi. Kesitler üç defa PBS ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanımları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 30 dakika bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine primer antikor eklenerek oda ısısında 1 saat veya +4°C'de gece boyu bekletildi. Kullanılan primer antikorlar ve dilüsyonları Tablo 3.3'de verilmiştir. Negatif kontrol olarak, primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olan normal tavşan veya fare IgG'leri kullanıldı. Kesitler yıkama aşamalarını takiben, biotin ile işaretlenmiş anti-rabbit veya mouse IgG ile 30 dakika inkübe edildi. Sekonder antikorlar ve dilüsyonları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Sekonder antikor aşamasından sonra, kesitler üzerine yarım saat önceden hazırlanan ve oda ısısında bekletilen streptavidin-peroksidaz kompleksi eklendi ve 30 dakika oda ısısında bekletildi. Yıkama aşamalarını takiben, kesitler üzerine AEC veya DAP solüsyonu ilave edilerek kromojenik reaksiyon ışık mikroskobu altında kontrol edildi. Kromojenik reaksiyon çeşme suyu ile durduruldu ve örnekler hematoksilin ile boyandıktan sonra immunohistokimya için özgül kapatma vasatı ile kapatıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi.

Tablo 3.3. Immunohistokimya için kullanılan primer ve sekonder antikorlar ve dilüsyon oranları

Primer Antikor	Primer Antikor Dilüsyon Oranı	Sekonder Antikor	Sekonder Antikor Dilüsyon Oranı
KRIT1	1/100	Anti-rabbit	1/250
β1 İntegrin	1/100	Anti-mouse	1/250
PECAM	1/50	Anti-mouse	1/250

3.9 Kapiller Benzeri Tüp Yapılarının Oluşumunun İncelenmesi

In vitro kapiller benzeri tüp yapılarının oluşumu post-konfluent ve 3-boyutlu kültür sistemlerinde incelendi.

3.9.1 Endotelyal Hücreler Kültür Kaplarını Kapladıktan sonra (Post-konfluent) Kapiller Yapıların Oluşumunun İncelenmesi

Kullanılan Solüsyonlar:

%4 Paraformaldehid (PFA) Solüsyonu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

1X PBS Tamponu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Chamber slaytlarda büyütülen BAE hücreleri kültür kaplarını kapladıktan sonra, in vivo endotelyal hücreler tarafından oluşturulan kapiller benzeri yapılarda olduğu gibi, in vitro sistemde de 4 veya 5. günlerde kapiller benzeri yapılar oluşmaya başlar ve ilerleyen günlerde ise kapillarizasyon artar. Kapillarizasyonun 4,

5 ve 10. günlerinde alınan slaytlar, 1X PBS ile yıkandıktan sonra %4'lük PFA solüsyonu ile fikse edildi. Slaytlar 3.3'de anlatılan immunofloresan boyama yöntemi ile KRIT1 antikoru ile boyandı ve immunofloresan mikroskop altında incelendi. Bu sistemde kapillarizasyona katılan hücre oranı düşük olduğu için ekspresyon çalışmaları 3 boyutlu kültür sistemlerinde gerçekleştirildi

3.9.2 Üç Boyutlu (3-D) Kültür Sistemlerinde Kapiller Yapıların Oluşumunun İncelenmesi

Kullanılan Solüsyonlar:

Kollajen Tip I (Upstate)

5X DMEM (Chemicon)

İn vitro vasküler yapıların oluşumu sırasında KRIT1 ekspresyon düzeyinin değişip değişmediğini araştırmak için endotel hücreler kollajen jel içerisine ekilerek, 3 boyutlu kültür ortamı oluşturuldu (159)

Endotel hücreler tripsinize edildikten sonra 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi Hücreler hemositometrede sayıldıktan sonra bir mililitrede 1×10^6 hücre olacak şekilde dilüe edildi Bu arada buz üzerinde, kollajen tip I solüsyonu mililitrede 2.5 mg olacak şekilde 5X DMEM içerisinde hazırlandı Solüsyonun pH'sı 1N NaOH ile pH=7'ye ayarlandı. Endotel hücreler hazırlanan bu kollajen solüsyonu içerisine eklendi ve çok yavaş bir şekilde 1000 μ l'lik mikropipet yardımı ile solüsyon içerisinde hava kabarcığı oluşturmadan karıştırıldı Hücre-kollajen karışımından 35-mm'lik kültür kaplarına 1 ml eklendi ve 37°C'de %5'lik CO₂ etüvde 1 saat kollajenin polimerize olması sağlandı Bir saat sonunda hücrelerin üzerine BAE besiyeri eklendi Tüp yapıları her 8 saatte bir inverted mikroskop (Zeiss) altında kontrol edildi ve her 24 saatte bir kültürlerin dijital kamera (Canon) ile fotoğrafları çekildi 72 saat sonra kültürlerden RNA ve protein elde edilerek RT-PCR ve Western blot ile KRIT1 ekspresyonundaki değişim araştırıldı Kapiller benzeri yapıların oluşumu aşağıdaki basamaklara göre 1 ile 5 arasında değişen rakamlarla değerlendirmeye tabi tutuldu.

- hücrelerin birbirleriyle ilişki kurması (1),
- kapiller tüplerin oluşumu (2),
- ikinci kapiller tüplerin filizlenmesi (3),
- poligonal şekilde kapiller yapıların oluşumu (4),
- kompleks kapiller yapıların oluşumu (5).

3.10 İn Vitro Endotelyal Hücre Deneyleri

3.10.1 Ekstrasellüler Matriks Proteinlerinin (ESM) KRIT1 Üzerine Etkisinin Araştırılması

Kullanılan Solüsyonlar:

1X PBS Tamponu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

Fibronektin Solüsyonu (1 µg/cm²):

1 mg toz fibronektin (Sigma) üzerine 1 ml steril distile su eklendi ve çözülmesi için 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Solüsyon 50 ml steril 1X PBS ile dilüe edildi. 100 mm'lik kültür kaplarına 2.4 ml eklenerek steril koşullarda 45 dakika oda ısısında bekletildi ve aliminyum folyoya sarılarak -20°C'de saklandı.

Poli-L-lizin Solüsyonu (0.1 mg/ml):

5 mg toz Poli-L-lizin (Sigma) 50 ml steril bidistile su içerisinde çözüldü. 100 mm'lik kültür kaplarına 2.4 ml eklenerek steril koşullarda 2 saat oda ısısında bekletildi ve aliminyum folyoya sarılarak -20°C'de saklandı.

Kollajen tip I Solüsyonu (6 µg/cm²):

5 mg toz kollajen tip I (Sigma) üzerine 5 ml 0.25 N asetik asid solüsyonu eklendi ve soğuk odada bir gece çözülmesi için bekletildi. Ertesi gün solüsyonun pH'sı 0.5 N NaOH ile ayarlandıktan sonra steril 1X PBS ile 35 ml'e tamamlandı. 100 mm'lik kültür kaplarına 5 ml eklenerek steril koşullarda 2 saat oda ısısında bekletildi ve aliminyum folyoya sarılarak -20°C'de saklandı.

Endotelyal hücreler T75'lik flask içerisinde %80-90'lık hücre yoğunluğuna geldiklerinde, %0.25'lik Tripsin-EDTA (Gibco) ile hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldıktan sonra, kollajen tip I, fibronektin ve poli-L-lizin gibi farklı ekstrasellüler matriks proteinleri ile kaplanmış kültür kaplarına ekildi ve 37°C'de %5'lik CO₂ etüvde kültüre edildi. 72 saat sonra kültürler etüvden alınarak protein izolasyonu gerçekleştirildi ve farklı ESM proteinlerinin KRIT1 ekspresyonu üzerine etkisi Western blot ile araştırıldı.

3.10.2 Anjiogenik Büyüme Faktörlerinin KRIT1 Üzerine Etkisinin Araştırılması

Endotelyal hücreler kültür kapları içerisinde %80-90'lık hücre yoğunluğuna geldiklerinde, %0.25'lik Tripsin-EDTA (Gibco) ile hücreler kaldırıldı ve hücre sayımı yapıldıktan sonra hücreler 60-mm kültür kaplarına ekildi. Hücreler %70'lik hücre yoğunluğuna ulaştıklarında, kültürler steril 1X PBS ile yıkandıktan sonra serum içermeyen besiyeri ile 24 saat daha kültüre devam edildi. Böylece kültür ortamındaki diğer büyüme faktörlerinin etkisi minimum düzeye indirilerek, uyarılara karşı maksimum cevap sağlanmış oldu. Ertesi gün hücreler rekombinant VEGF (Chemicon) ve bFGF (Upstate) gibi büyüme faktörleri ile doz (0.2, 2, 20 ng/ml) ve zaman (30 dakika, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 saat) bağımlı olarak uyarıldı ve 37°C'de %5'lik CO₂ etüvde kültüre devam edildi. İnkübasyon süreleri sonrası

kültürler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra protein izolasyonu gerçekleştirildi ve büyüme faktörlerinin KRIT1 ekspresyonu üzerine etkileri Western blot yöntemi ile araştırıldı.

3.11 İmmunopresipitasyon

Kullanılan Solüsyonlar:

Proteinaz İnhibitor Kokteyli (CalbioChem):

3.7'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

1X PBS Tamponu:

3.3'de anlatıldığı gibi hazırlandı.

4X Yükleme Tamponu:

3.8'de anlatıldığı gibi hazırlandı ve steril su ile 2X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı.

İmmunopresipitasyon Tamponu:

- 10 mM PIPES (pH=6.8, Sigma)
- 50 mM NaCl (Merck)
- 3 mM MgCl₂ (Merck)
- 300mM Sukroz (Sigma)
- %5 (v/v) Triton-X 100 (Sigma)

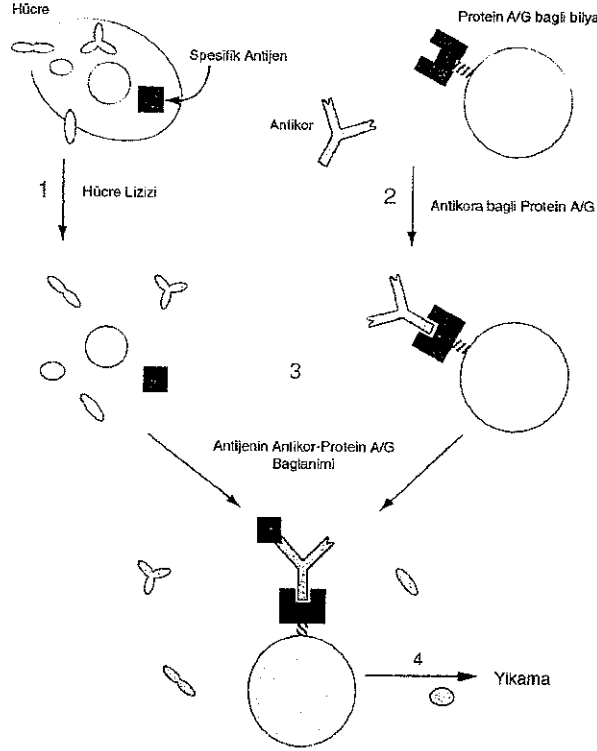
Yukarıdaki kimyasallar 500 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve 0.45 µ'luk Milipor filtrelerden geçirildikten sonra oda ısısında saklandı.

Agaroz A/G (Santa Cruz)

İmmunopresipitasyon (IP) tekniği, non-kovalent olarak mağnetik bilyalara bağlı agaroz A/G'ye bağlanan antikörün hücre lizati içerisindeki kendi antijenine bağlanması prensibine dayanır (160) İmmunopresipitasyonun çalışma prensibi Şekil 3.1'de görülmektedir.

100 mm'lik kültür kaplarında üretilen endotelial hücreler, kültür kabını kapladıklarında etüvden alındı ve üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırıldıktan sonra kültür kapları buz üzerine konularak 3 defa soğuk 1X PBS ile yıkandı. Daha sonra üzerlerine 1 ml proteinaz inhibitör kokteyli içeren soğuk immünopresipitasyon tamponu eklendi ve steril hücre kazıyıcıları kullanılarak, hücreler kültür kaplarından kazındı. Her bir kültür kabındaki hücre süspansiyonu buz içerisinde tutulan mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 30 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 10 dakika +4°C'de santrifüj edildi. Dökelti buz içerisinde soğutulmuş temiz ependrof tip tüplere alındı ve üzerlerine 50 µl agaroz A/G ilave edildi ve çalkalayıcı üzerinde 4 saat soğuk odada bekletildi (Şekil 3.1'deki 1. basamak). Bu inkübasyon sırasında ayrı mikrosantrifüj tüplerine 100 µl immünopresipitasyon tamponu, 30 µl agaroz A/G ve antikör ilave edilerek +4°C'de bekletildi (Şekil 3.1'deki 2. basamak). 4 saatin sonunda, basamak 1'deki lizize uğramış hücreleri içeren tüpler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve dökelti basamak 2'deki

agaroza bağlanmış antikor içeren ependrof tip tüplere aktarıldı ve gece boyu karıştırıcı üzerinde soğuk odada bekletildi (Şekil 3.1'deki 3 basamak) Ertesi sabah örnekler 14.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, çökelti üzerine 1 ml soğuk immunopresipitasyon tamponu eklendi ve 15 dakika buz içerisinde bekletildikten sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 defa tekrar edildikten sonra (Şekil 3.1'deki 4. basamak), son santrifüj sonrası oluşan çökelti üzerine 50 µl 2X yükleme tamponu eklendi. Örnekler 95°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra hemen buz üzerine alındı ve 7.000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Çökelti mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra, örnekler Western blot yapılıncaya kadar -20°C'de saklandı.



Şekil 3.1. İmmunopresipitasyon (IP) prensibi şematize edilmiştir. IP 4 basamakdan oluşmaktadır 1-antijenin açığa çıkarılması 2-Antikor agaroz ilişkisi 3-İmmunopresipitasyon 4-Yıkama işlemleri (Currents Protocols in Molecular Biology'den alınmıştır)

3. 12 Nüklear ve Sitoplazmik Özütlerin Eldesi

Kullanılan Solüsyonlar:

Sitozolik Ekstraksiyon Tamponu (CEB-A):

- 1 ml stok CEB-A (Hazır solüsyon)
- 2 µl proteinaz inhibitor kokteyli
- 1 µl DTT

Yukarıdaki solüsyonlar karıştırılarak, -20°C'de saklandı

Nükleer Ekstraksiyon Tamponu (NEB):

- 1 ml NEB (Hazır solüsyon)
- 2 µl proteinaz inhibitör kokteyli
- 1 µl DTT

Yukarıdaki solüsyonlar karıştırılarak, -20°C 'de saklandı

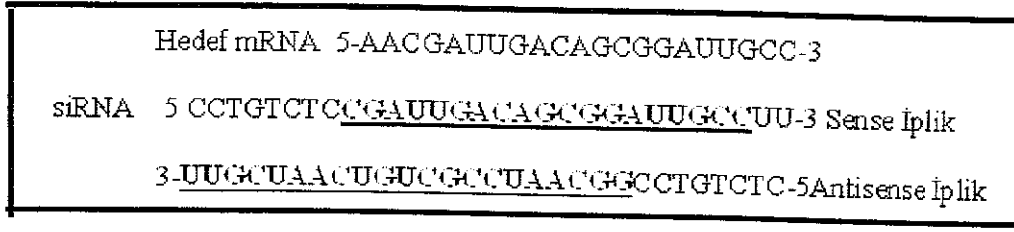
Nükleer Ekstraksiyon kiti (Bio Vision)

Endotelyal hücreler kültür kabında belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra hücreler tripsinize edildi ve hücreler 600 g 'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika santrifüj ettirilerek çöktürüldü. Bundan sonraki tüm işlemler için kullanılan tüm malzemelerin soğuk olması gerekmektedir. Her bir mikrosantrifüj tüpü üzerine 200 µl CEB-A solüsyonu eklendi ve 15 saniye vorteksde karıştırıldıktan sonra buz içerisinde 10 dakika bekletildi. Sürenin sonunda her tüp üzerine 11 µl CEB-B solüsyonu eklendi ve 5 saniye vorteksde karıştırıldıktan sonra buzda 1 dakika bekletildi ve 16000 g 'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti hemen soğuk ve temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Nükleer proteinleri içeren çökelti üzerine 100 µl NEB solüsyonundan eklendi ve 15 saniye vorteksde karıştırıldıktan sonra buz içerisinde 40 dakika bekletildi. Her 10 dakikada bir tüpler karıştırıldı. Tüpler 16.000 g 'de 10 dakika santrifüj edildi ve üstteki nükleer özütü içeren dökelti temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak -80°C 'de kullanılmaya kadar saklandı. Nükleer ve sitoplazmik özütlerde KRIT1 varlığı Western blot ile analiz edildi.

3.13. siRNA Primerlerinin Hazırlanması

KRIT1 genini post-transkripsiyonel düzeyde baskılamak için kullanılan siRNA tekniğinin başarılı ve efektif olması için en önemli işlem siRNA primerlerinin hazırlanmasıdır (161). Primerleri hazırlamak için genin başlangıç kodonundan (AUG) başlayarak tüm gendeki AA dizileri bulundu ve AA dizilerden sonra gelen 19 baz çiftlik (bp) nükleotidlik dizisi kayıt edildi. Hazırlanan her primer çiftinin genomdaki tanımlanmış diğer genler ile homoloji gösterip göstermediği uygun genom database programı kullanılarak araştırıldı. Eğer primer çifti tanımlanan diğer genler ile homoloji göstermiyor ve GC içeriği %50'den az ise siRNA tekniği için kullanıldı.

Anlamsız (antisense) siRNA ipliği hedef dizinin reverse komplementeri iken, siRNA'nın anlamlı (sense) ipliği hedef mRNA dizisinin aynısıdır fakat tek fark 5' uçunda AA dizisi yoktur (Şekil 3.2). Hem anlamlı hemde anlamsız oligonükleotidlerin 3' ucuna I7 promotor primerine komplementer olan 8 nükleotidlik 5'- CCTGTC-3' dizisi eklendi. Hazırlanan anlamlı ve anlamsız primerler Keck firması tarafından sentezlendi. Toz halde gelen anlamlı ve anlamsız siRNA primerleri RNaz ve DNaz gibi nükleazlardan yoksun steril su ile dilüe edildi ve konsantrasyonu 200 µM olacak şekilde ayarlandı.



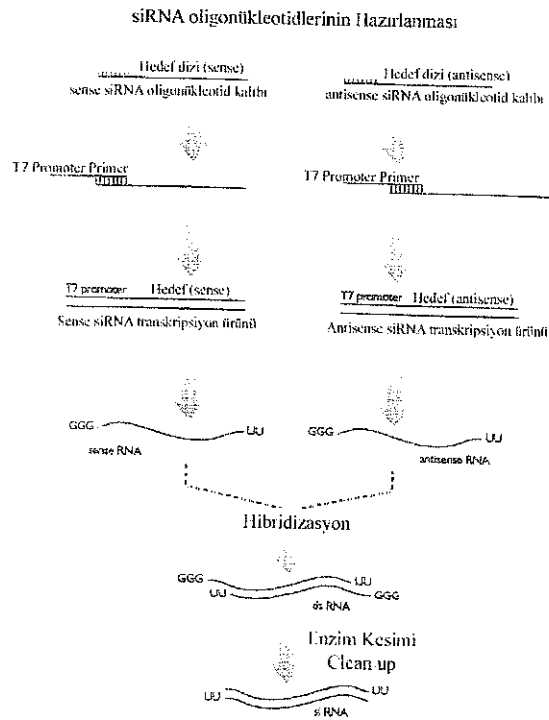
Şekil 3.2. siRNA primerlerinin hazırlanması şematize edilmiştir (162)

3.14 RNA İnterference (Post-transkripsiyonel Gen Silencing)

Kullanılan Kit:

Silencer siRNA Construction Kit (Ambion)

RNA interference (RNAi), komplementer çift iplikli RNA'lar (dsRNA) kullanarak post-trankripsiyonel düzeyde ilgilenilen genin spesifik olarak baskılanması prensibine dayanır (162). siRNA tekniğinin prensibi Şekil 3 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3: siRNA tekniğinin çalışma prensibi şematize edilmiştir (Elbashir SM ve arkadaşlarının çalışmasından alınmıştır,161).

3.14.1 siRNA Transkripsiyon Kalıplarının Hazırlanması

İyi bir transkripsiyon kalıbı elde etmek için ilk olarak anlamlı ve anlamsız oligonükleotidlerin 5' ucuna eklenmiş olan T7 promotor dizilerine komplementer olan T7 promotor primeri ile, oligonükleotidler çift iplikli DNA'lara dönüştürüldü. Bu işlem iki basamakdan oluştu. İlk basamak, T7 promotor primerlerinin anlamlı ve anlamsız oligonükleotidlere yapışması, ikinci basamak olarak da Klenow DNA polimeraz yardımı ile sentezin tamamlanması şeklinde idi.

Bu işlemlerin gerçekleşmesi için aşağıdaki kimyasallar anlamlı ve anlamsız oligonükleotidler için ayrı PCR tüplerinde gerçekleştirildi.

T7 Promotor Primer	2 µl
Hibridizasyon Tamponu	6 µl
anlamlı/anlamsız oligo	2 µl

Anlamlı ve anlamsız oligonükleotid tüpleri 70°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra, tüplerin sıcaklığının oda ısısına gelmesi için beklenildi. Bu bekleme zamanı içerisinde anlamlı ve anlamsız oligonükleotid tüplerine eklenilmek üzere aşağıdaki karışım hazırlandı ve oda ısısına gelen tüplerin üzerine eklendi.

10X Klenow Buffer	2 µl
10X dNTP	2 µl
Su	4 µl
Exo-Klenow	2 µl

Reaksiyon tüpleri 37°C'de 30 dakika inkübe edildi ve örnekler -20°C'de bir sonraki aşamaya kadar saklandı.

3.14.2 Çift İplikli RNA (dsRNA) Sentezi

Aynı PCR tüplerinde çift iplikli hale dönüştürülen anlamlı ve anlamsız oligonükleotidler, T7 RNA polimeraz enzimi yardımı ile transkribe edilerek tek zincirli RNA oligonükleotidlerine dönüştürüldü. İn vitro transkripsiyon için gerekli koşullar aşağıda görüldüğü gibi aynı PCR tüplerinde hazırlandı ve tüpler 37°C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası anlamlı ve anlamsız transkripsiyon ürünleri aynı tüp içerisinde toplandı ve gece boyu 37°C'de tek iplikli anlamlı ve anlamsız RNA oligonükleotidlerinin hibridizasyonu ile çift iplikli RNA zincirleri oluşturuldu.

anlamlı/anlamsız dsDNA kalıbı	2 µl
Su	4 µl
2X dNTP	10 µl
10X T7 reaksiyon tamponu	2 µl
T7 RNA Polimeraz	2 µl

3.14.3 siRNA Pürifikasyonu

Kullanılan Solüsyonlar:

1X TBE Tamponu:

3 5' de anlatıldığı gibi hazırlandı

%10 (v/w) Amonyum Persülfat (APS, Sigma) Solüsyonu:

1 g toz APS 10 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

%40 (v/w) akrilamid:bisakrilamid Solüsyonu (Baker)

N, N, N, N-tetrametiletildiamine (TEMED, Sigma)

Enzim Kesim Reaksiyon Solüsyonu:

Kesim Tamponu	6 µl
Su	48 5 µl
RNaz	3 µl
DNaz	2 5 µl

Jel Solüsyonu:

10X TBE	1 5 ml
%40 Akrilamid:bisakrilamid	4 5 ml
Su	9 ml
%10 APS	150 µl
TEMED	15 µl

İn vitro pürifikasyon ile oluşturulan dsRNA'ların 5' uçunda T7 promotoruna komplementer öncü diziler (leader dizi) bulunmaktadır. Bu yüzden bu öncü dizilerin transfeksiyon öncesi uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla öncü diziler ribonükleazlar (RNaz) ile uzaklaştırılırken, ortamda in vitro transkribe olmayan çift iplikli DNA'lar ise DNaz enzimi yardımı ile aşağıdaki reaksiyon koşulları uygulanarak uzaklaştırıldı. Reaksiyon karışımı mikropipet yardımı ile çok iyi karıştırıldı ve 37°C'de 2 saat inkübe edilerek enzim kesimi gerçekleştirildi. Örnekler filtre sistemi ile pürifiye edildikten sonra, aşağıdaki gibi hazırlanan %12'lik poliakrilamid jelde yürütüldükten sonra spektrofotometrede okunarak konsantrasyonu belirlendi.

3.15 Transfeksiyon

Kullanılan Solüsyonlar:

Transfeksiyon Besi Ortamı:

- Yüksek Glikozlu DMEM (Gibco)
- %20'lük (v/v) Fetal Bovine Serum (Gibco)
- %1'lik (v/v) Na-piruvat (Gibco)
- %1'lik (v/v) HEPES (Gibco)

OptiMEM (%0.5 FBS içeren DMEM, Gibco)

Oligofektamin (Invitrogen)

50 nM siRNA

Oligofektamin, ökaryotik hücrelere oligonükleotidlerin transfeksiyonu için en uygun lipid türevli solüsyonlardan biridir. Transfeksiyondan bir gün önce endotelial hücreler tripsinize edildi ve her kuyucukda 1×10^5 hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi 24 saat sonra hücreler transfeksiyon için uygun yoğunluğa ulaşmış oldu.

Transfeksiyon işlemi üç basamaktan oluştu.

I. basamak: siRNA ile OptiMEM karışımının hazırlanması

Bu işlemde 50 nM'luk siRNA'dan 2 µl alınarak 185 µl OptiMEM içerisinde dilüe edildi ve oda ısısında 20 dakika bekletildi.

II. basamak: Oligofektamin ile OptiMEM karışımının hazırlanması

Bu basamakta oligofektamin solüsyonundan 4 µl alınarak, 15 µl OptiMEM içerisinde oldukça hassas bir şekilde karıştırıldı ve 10 dakika oda ısısında bekletildi.

III. basamak: siRNA ve Oligofektamin karışımlarının hazırlanması

I ve II basamakta hazırlanan siRNA ve Oligofektamin karışımları birleştirilerek, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Bu 20 dakikalık süre içerisinde kültürlerin üzerindeki besi ortamı alınarak kültürler iki defa OptiMEM ile yıkandı ve her kuyucuğa 800 µl OptiMEM eklendi. Süre sonunda hazırlanan siRNA-Oligofektamin karışımında her kuyucuğa 200 µl ilave edildi ve 37°C'de inkübasyona tabii tutuldu. Transfeksiyondan 4 saat sonra kültürlerin üzerine 2 ml transfeksiyon besi ortamı ilave edilerek kültüre devam edildi.

3.16 Hücre Proliferasyon Deneyi

Endotelial hücrelerde KRIT1 siRNAsı ile transfeksiyon sonrası proliferasyonu araştırmak için Cell Titer 96 Aqueous radyoaktif olmayan hücre proliferasyon kiti (Promega) kullanıldı. Kitin en önemli özelliği canlı hücre miktarını kolorimetrik olarak vermesi idi. Kit, tetrazolium compound [3-(4,5-dimetylthiazol-2yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)2-(4-sulfophenyl) 2H-tetrazolium, (MTS)] ve phenazine methosulfate (PMS) içermektedir. Bu nedenle, MTS metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan dehidrogenaz enzimleri tarafından formazana dönüştürülür. Besi ortamında eriyebilme özelliği olan formazan 490 nm dalga boyunda okunarak kültürdeki canlı hücre sayısı belirlenebilir.

KRIT1 ve kontrol siRNA'sı ile transfekte edilen endotelial ve HeLa hücrelerinde proliferasyon indeksini belirlemek için hücreler 96 kuyucuk içeren kültür kaplarına mililitrede 20.000 hücre olacak şekilde ekildi. Transfeksiyondan 5

gün sonra hücreler deneye alındı. Proliferasyon deneyine başlamadan önce hücreler steril 1X PBS ile 2 defa yıkandı ve üzerlerine fenol kırmızısı ve serum içermeyen besi ortamı ilave edildi ve 6 saat daha kültüre devam edildi. Süre sonunda 1:100 oranında hazırlanan PMS:MTS solüsyonundan her kuyucuğa 10'ar µl olacak şekilde paylaştırıldı. Hücreler 37°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra, 490 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak okundu ve optik yoğunluk birimi ortalaması hesaplandı.

3.17 TUNEL Yöntemi

3.17.1 İn Vitro Endotelial Hücrelerde TUNEL Yöntemi

Kullanılan Solüsyonlar:

1X PBS Solüsyonu:

3 3'de açıklandığı gibi hazırlandı

%4 (v/v) Formaldehid Solüsyonu:

75 ml 1X PBS ile 25 ml 16%'lık metanol içermeyen-formaldehid (Baker) karıştırıldı. Solüsyonun pH'sı 1 N NaOH ile 7.4'e ayarlandı ve buzdolabında saklandı

20X SSC Tamponu:

175.3 g NaCl

88.2 g Sodyum Sitrat

1 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve HCl asit ile pH=7'ye ayarlandıktan sonra 2X şeklinde dilüe edilerek kullanıldı

Equilibration Tamponu:

200 mM Potasyum Kakodilat (pH=6.6, Sigma)

25 mM Iris (Sigma)

0.2 mM DTT (Sigma)

0.25 mg/ml Bovine serum albimun (BSA, Sigma)

Yukarıdaki kimyasallar 2 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve -20°C'de saklandı

Nükleotid Karışımı:

50 µM Floresa-12-dUTP (Promega)

100 µM dATP (Promega)

10 mM Iris (Sigma)

1 mM EDTA (Sigma)

yukarıdaki kimyasallar 2 ml bidistile su içerisinde çözüldü ve -20°C'de karanlıkta saklandı

Permiabilizasyon Solüsyonu:

10 ml 1X PBS içerisine 200 µl Triton-X 100 ilave edildi ve oda ısında saklandı

TdT İnkubasyon Tamponu:

90 µl Equilibration Tamponu

10 µl Nükleotid Karışımı

2 µl TdT Enzim (Promega)

Uç kimyasal istenilen oranlarda, deney sırasında taze olarak hazırlandı

DAPI (1 mg/ml, Sigma)

İn vitro koşullarda endotelial hücrelerde apoptozisi göstermek için DeadEnd Fluorometric TUNEL kiti kullanıldı. Kit, hücre popülasyonunda apoptozise uğrayan ve apoptozis için özgül olan DNA kırıklarının 3-OH ucuna, terminal deoksिनükleotid transferaz (TdT) enziminin floresan işaretli 12-dUTP'nin katılımı ile apoptotik hücrelerin floresan mikroskop altında tespit edilmesine imkan tanır (163).

Chamber slaytlara ekilen KRIT1 ve kontrol siRNA'sı ile transfekte edildikten 5 gün sonra, slaytlar etüvden alınarak üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırıldı ve bir defa 1X PBS ile yıkandı. Slaytlar, taze hazırlanmış 4%'luk formaldehid ile +4°C'de 25 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası 2 defa 5'şer dakika PBS ile yıkandı ve permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dakika oda ısısında permeabilize edildi. PBS ile yıkama aşamalarından sonra, slaytlar 10 dakika equilibration tamponu ile oda ısısında bekletildi. Buz üzerinde hazırlanan nükleotid karışımı slaytlar üzerine dağıtıldı ve etrafı alüminyum folyo ile sarılarak, 37°C'de etüvde 1 saat inkübe edildi. İnkubasyon sonrası slaytlar 2X SSC ile 15 dakika oda ısısında yıkandıktan sonra PBS ile 5 dakika 3 defa yıkandı. Slaytlar kurutulmadan üzerlerine floresan kapatma vasatı kondu ve lamel ile kapatılarak floresan mikroskop altında analiz edildi. Mikroskop altında kontrol ve transfekte slaytlardaki TUNEL + ve TUNEL - hücreler sayılarak pozitif ve negatif hücre oranları hesaplandı.

3.17.2 İn Vivo Hasta Dokularında TUNEL Yöntemi**Kullanılan Solüsyonlar:****Permeabilizasyon Solüsyonu:**

0.1% TritonX-100

0.1% sodyum sitrat solüsyonu

1 litre bidistile su içerisinde hazırlandı ve buzdolabında saklandı.

İn vitro olarak KRIT1 geninin baskılanması sonucunda apoptozisin arttığını gözlemledikten sonra bu veriyi in vivo olarak teyid etmek amacıyla serebral vasküler malformasyonlu hastalara ait parafin dokular kullanıldı. Parafin dokularda apoptotik hücreler Roche tarafından üretilen TUNEL kiti kullanılarak gösterildi. DNA kırıkları enzimatik alkalın fosfataz işaretlemesi ile belirlendi.

5-µm kalınlığında lam üzerine alınan parafin kesitler, 20 dakika ksilol ve 5'şer dakika %100, %90, %70'lık alkol serilerinden geçirildikten sonra 5 dakika distile su içerisinde bekletildi. Kesitler, 1X PBS ile 5 dakika yıkandıktan sonra, permeabilizasyon solüsyonu ile 5 dakika +4°C'de permeabilize edildi. 1X PBS ile

yıkama işleminden sonra, kesitlerin üzerine TUNEL solusyonu eklenerek 1 saat 37⁰C'ta inkübe edildi Daha sonra kesitler tekrar PBS ile yıkandı ve üzerlerine streptavidin-alkalin fozfataz enzimi ilave edilerek oda ısısında 30 dakika bekletildi PBS ile yıkama işlemlerinden sonra, kesitler üzerine Fast-Red solüsyonu eklendi ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Dokular tekrar PBS ile yıkandıktan sonra TUNEL pozitif hücreler ışık mikroskobu altında incelendi

3.18 Hücre Adezyon Deneyi

KRIT1 ve kontrol siRNA'sı ile tranfekte edilen hücreler arasında adezyonda bir fark olup olmadığını araştırmak amacıyla transfeksiyondan 5 gün sonra hücreler tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi Dökelti atıldıktan sonra hücre çökeltisinin üzerine 1 ml besi ortamı eklenerek çok iyi karıştırıldıktan sonra hemositometrede kontrol ve KRIT1 transfekte hücreler sayıldı. Mililitrede eşit hücre olacak şekilde hesaplandıktan sonra hücreler fibronektin kaplı 96-kuyucuklu kültür kaplarına (Biocoat) ekildi. 15, 30, 45, 60, 90 ve 120 dakikanın sonunda her kuyucukdaki yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandıktan sonra üzerlerine 100 µl kolorimetrik solüsyon eklenerek spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda okundu

3.19 İstatiksel Analiz

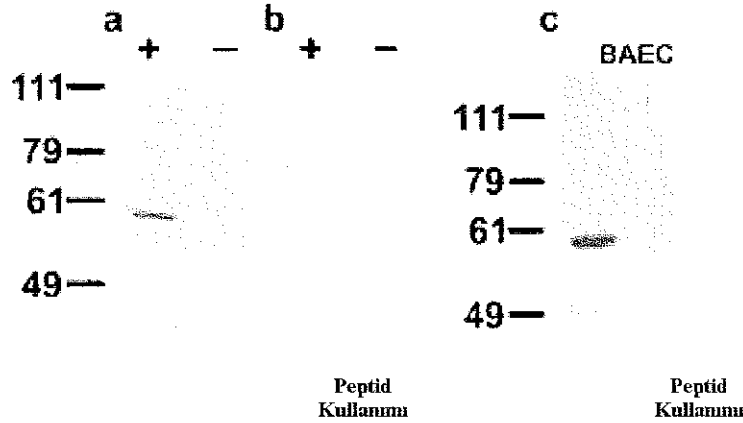
Hücre proliferasyon, adezyon, Western blot, RT-PCR ve tüp formasyon deneyi sonuçları Komogorov-Smirnov testine göre oluşturuldu Deney çiftleri arasındaki istatiksel farklılıklar ANOVA ve post hoc Tukey testleri ile yapıldı P<0.05 istatiksel olarak anlamlı olarak alındı Tüm istatistik hesaplamalar Sigma STAT programı ile gerçekleştirildi (version 2.0, Jandel Scientific Corporation).

BULGULAR

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından sağlanan taze insan dokularında, *in vivo* ve *in vitro* anjiogenik modellerde KRIT1 ekspresyonu Western blot, RT-PCR, immunofloresan ve immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak belirlenmiştir. *In vitro* sistemlerde KRIT1 gen ekspresyonunu baskılamak için siRNA tekniği kullanılmış ve siRNA ile transfekte edilen hücrelerde proliferasyon indeksi MTS, apoptotik indeks TUNEL ve adezyon indeksinde hücre adezyon deneyleri ile araştırılmıştır.

4.1 Antikor Özgüllüğünün Test Edilmesi

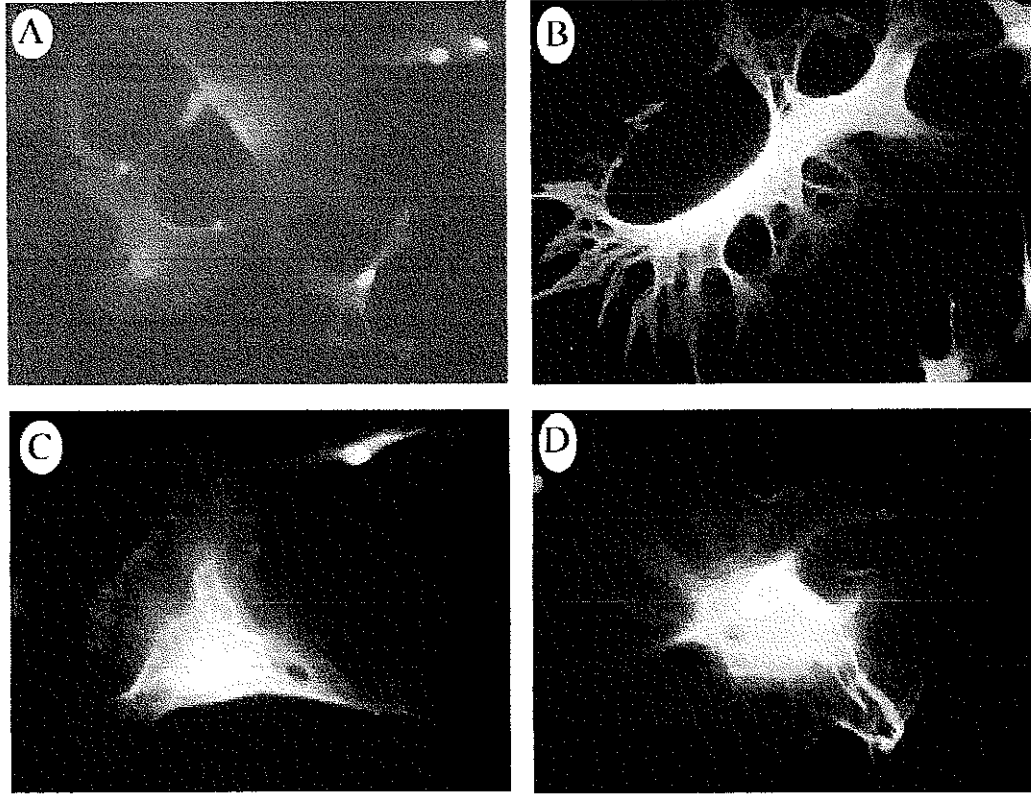
İnsan KRIT1 proteinin farklı bölgelerine karşı üretilen poliklonal antikorlar ile çalışmaya başlamadan önce antikorların özgüllüğü test edildi. Antikor optimizasyonu için KRIT1 eksprese eden BAE hücreleri ve KRIT1 eksprese etmeyen Cos7 hücreleri kullanıldı. Cos7 hücrelerine KRIT1 geni transfekte edildikten sonra hücrelerden total protein elde ederek örnekler Western blota tabii tutuldu. Western blot sonucu KRIT1 proteinine ait özgül band 58 kDa ağırlığında elde edildi. BAE ve Cos7 hücrelerinde gözlenen 58 kDa ağırlığındaki özgül band peptid kullanımı ile ortadan kaldırıldı, çünkü KRIT1 antikoru kendi peptidi ile inkübe edilerek bloke edildiğinden kendi antijeni olan KRIT1 proteinine bağlanamadığından özgül band gözlenmedi (Şekil 4.1)



Şekil 4.1: KRIT1 antikor özgüllüğünün Western blot ile gösterilmesi a) KRIT1 geni ile transfekte edilen Cos7 hücrelerinde (+) 58 kDa ağırlığında band gözlemlendi fakat transfekte edilmeyen Cos7 hücrelerinde (-) herhangi bir band gözlenmedi b) KRIT1 geni ile transfekte edilen (+) Cos7 hücrelerinde gözlenen özgül band peptid kullanımı ile ortadan kaldırıldı c) BAE hücrelerindeki özgül KRIT1 bandı. Bu band peptid kullanımı ile ortadan kaldırılarak antikor özgüllüğü test edildi.

4.2 İn vitro Endotelyal Hücrelerde KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

Bovine aortik endotelyal hücrelerde KRIT1 ekspresyonu floresan işaretli antikolar kullanarak immunofloresan tekniği ile araştırıldı. Endotelyal hücrelerde KRIT1 ekspresyonunun oldukça farklı bir boyanma modeli verdiği gözlemlendi. Hücre adezyonunun veya hücre-hücre etkileşimin olduğu alanlarda KRIT1 ekspresyonunun çoğunlukla membranda lokalize olduğu, hücrenin normal durumunda ise ekspresyonun hücre içerisinde daha yoğunlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.2)

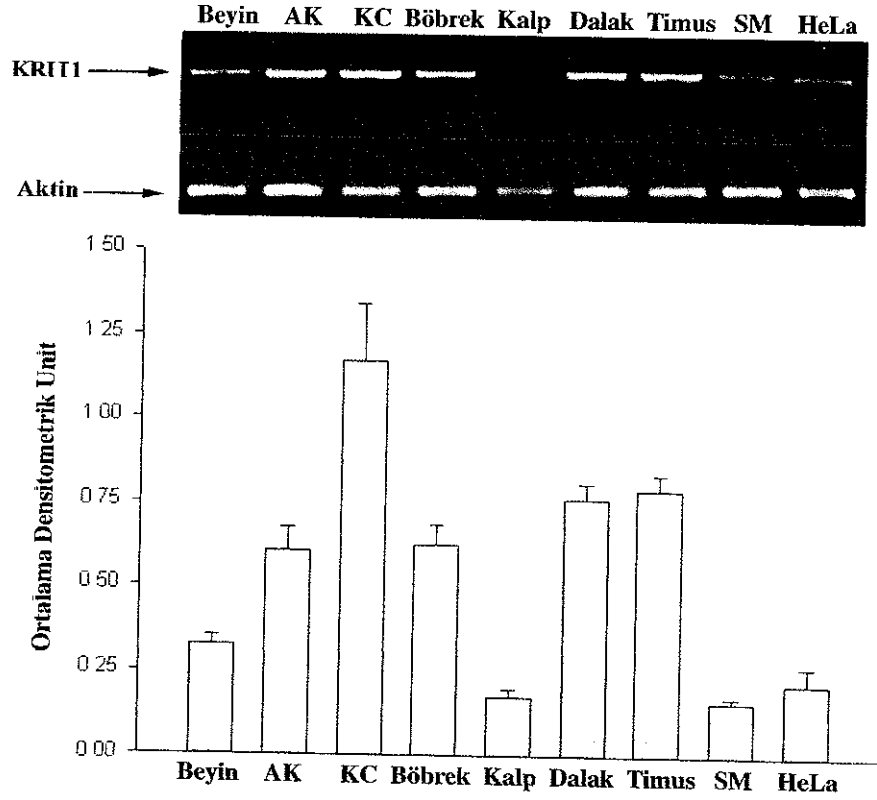


Şekil 4.2: Bovine aortik endotelyal hücrelerde immunofloresan yöntemi ile KRIT1 ekspresyonunun gösterilmesi A: KRIT1 boyanma modeli Boyanmanın hücre membranına yakın olduğu alanlarda yoğunlaştığı gözlenmektedir B ve D: KRIT1 ve β tübülün boyanması C: KRIT1 ve $\beta 1$ integrin boyanması Kırmızı: KRIT1, Yeşil: β tübülün ve $\beta 1$ integrin Sarı: KRIT1 ve β tübülün veya $\beta 1$ integrin ile birlikte ekspresyonun olduğu alanlar

4.3 Fetal Dokularda RT-PCR ile KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

İnsan fetal dokularından elde edilen RNA'lar cDNA'ya çevrildikten sonra KRIT1 ekspresyonu RT-PCR ile araştırıldı. Fetal dokularda KRIT1'in farklı ekspresyon düzeyine sahip olduğu gözlemlendi. Fetal dokular içerisinde en yüksek KRIT1 ekspresyonu

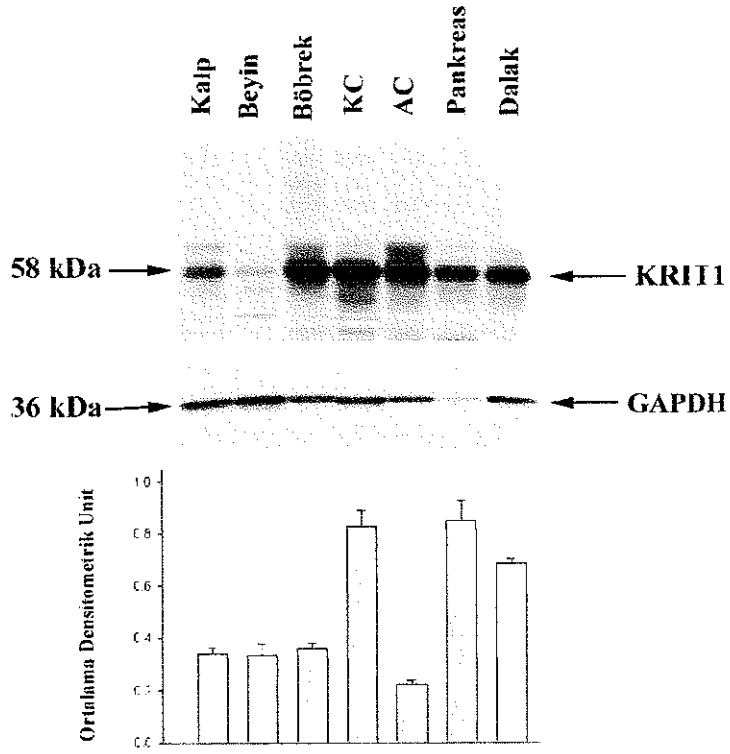
karaciğerde gözlenirken, dalak, timus, böbrek ve akciğerde ekspresyon düzeyleri benzer oranda yüksek bulundu. Beyindeki ekspresyon düzeyinin, kalp ve iskelet kasına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3). Elde edilen sonuçlar dancitometrik olarak değerlendirildi.



Şekil 4.3: Fetal dokularda KRIT1 ekspresyonu. Fetal dokularda KRIT1 ekspresyonu RT-PCR ile araştırıldı. İnternal kontrol olarak aktine özgül primerler kullanıldı. En yüksek ekspresyon karaciğerde, en düşük ekspresyon ise iskelet kasında ve kalpde gözlemlendi. AK: Akciğer, KC: Karaciğer, SM: İskelet Kası.

4.4 Yetişkin İnsan Dokularında KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

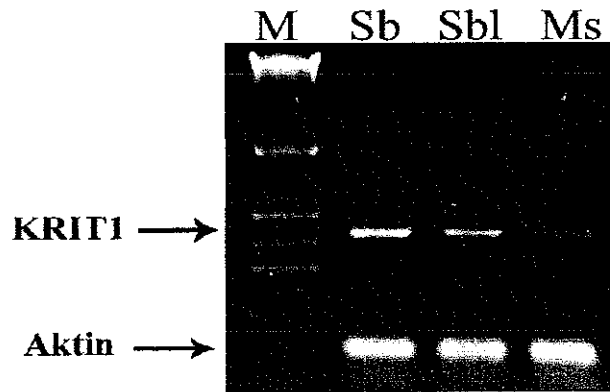
Yetişkin insan dokularındaki KRIT1 proteinin ekspresyonu Western blot yöntemi kullanılarak araştırıldı. En yüksek KRIT1 ekspresyonu dalak, pankreas, ve karaciğerde gözlenirken, kalp, böbrek ve beyinde ise daha az olduğu görüldü. En düşük KRIT1 ekspresyonunun ise akciğer dokusunda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: Yetişkin insan dokularında KRIT1 ekspresyonu Yetişkin insan dokularında KRIT1 ekspresyonu Western blot ile araştırıldı. Her kuyucuğa eşit protein yüklenilip yüklenilmediğini kontrol etmek için GAPDH antikorunu kullanıldı.

AK: Akciğer, KC: Karaciğer.

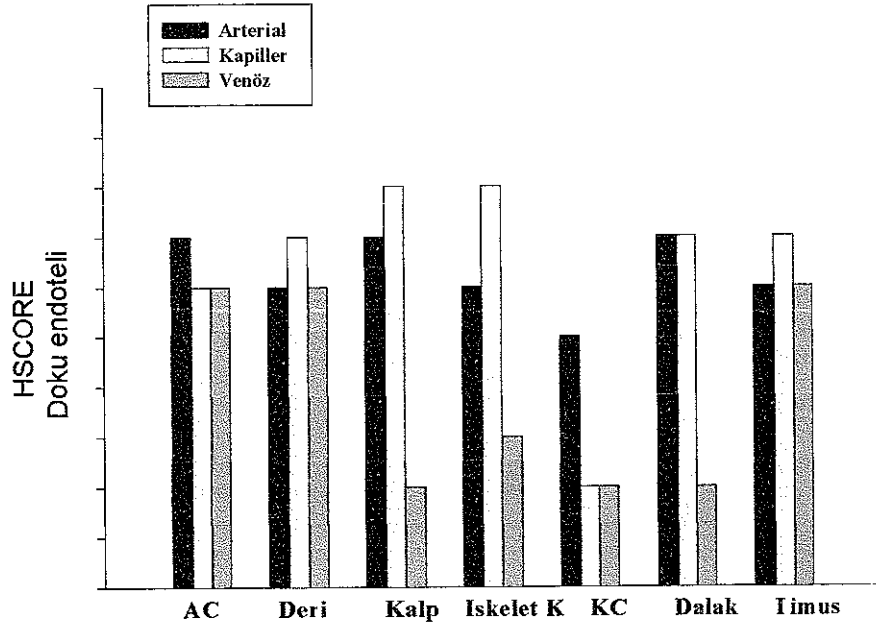
KRIT1 ekspresyonunun beyinin farklı bölgelerinde değişip değişmediğini kontrol etmek için, farklı bölgelerden alınan dokularda KRIT1 ekspresyonu RT-PCR ile araştırıldı. En yüksek KRIT1 ekspresyonunun serebrumda, en düşük ekspresyonun ise medulla spinalisde olduğu gözlemlendi (Şekil 4 5)



Şekil 4.5: Beyinin anatomik bölgelerine göre KRIT1 ekspresyonunun dağılımı. Sb: Serebrum, Sbl: Serebellum ve Ms: Medulla spinalis

4.5 Farklı Dokulardaki Endotelial Hücrelerde KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

Yetişkin ve fetal döneme ait insan dokularındaki KRIT1 ekspresyonu Western blot ve RT-PCR ile belirlendikten sonra, immunohistokimyasal yöntemler ile KRIT1 proteininin hücresel lokalizasyonu araştırıldı. Antikor özgüllüğü, kullanılan antikor konsantrasyonunun iki katı oranında peptid kullanımı ile gösterildi. Çalışılan tüm dokuların endotelial hücrelerinde KRIT1'in ifade edildiği görüldü. Her organdaki KRIT1 immunoreaktivitesi, araştırmacı dışında deney sistemi hakkında bilgisi olmayan birbirinden bağımsız iki farklı araştırmacı tarafından analiz edildi. Üç araştırmacıdan elde edilen analiz sonuçlarına göre tüm dokulardaki KRIT1 immunoreaktivitesi HSCORE değerlerine göre belirlendi (Şekil 4.6) KRIT1, hemen hemen tüm organların kapiller ve arteriol endotelinde eksprese edilirken, venöz damarların endotelial hücrelerinde zayıf eksprese edildiği gözlemlendi.

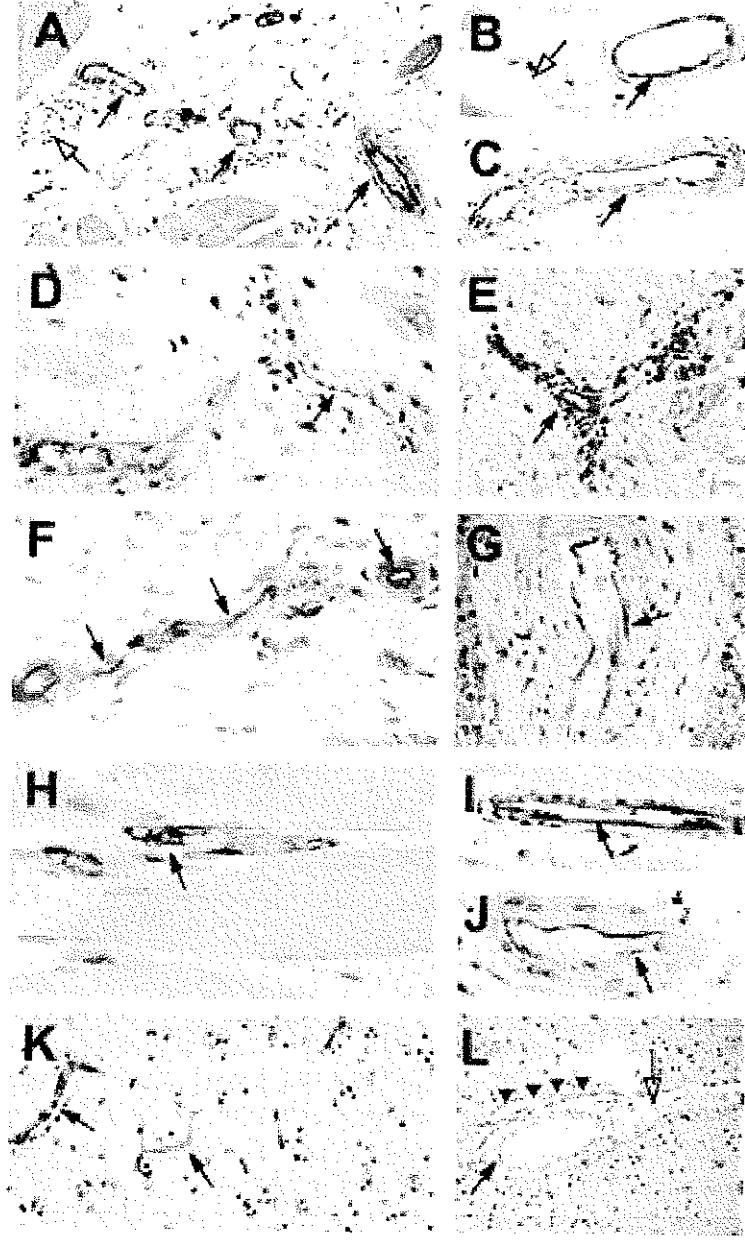


Şekil 4.6: Yetişkin insan dokularındaki vasküler yapılardaki KRIT1 immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi.

AC: Akciğer, KC: Karaciğer, K: Kas

Kalpdeki KRIT1 ekspresyonu en yoğun olarak arterlerde gözlenirken venlerde boyanma görülmedi (Şekil 4.7 A-D). Deride subdermal vasküler yapılarda (Şekil 4.7 E) ve dalakta ki vasküler yapılarda KRIT1 ekspresyonunun güçlü olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7 F, G). İskelet kasında miyositlerde oldukça zayıf immunoreaktivite gözlenirken, kapiller ve arteriollerde KRIT1 immunoreaktivitesinin daha güçlü olduğu görüldü (Şekil 4.7 H, I)

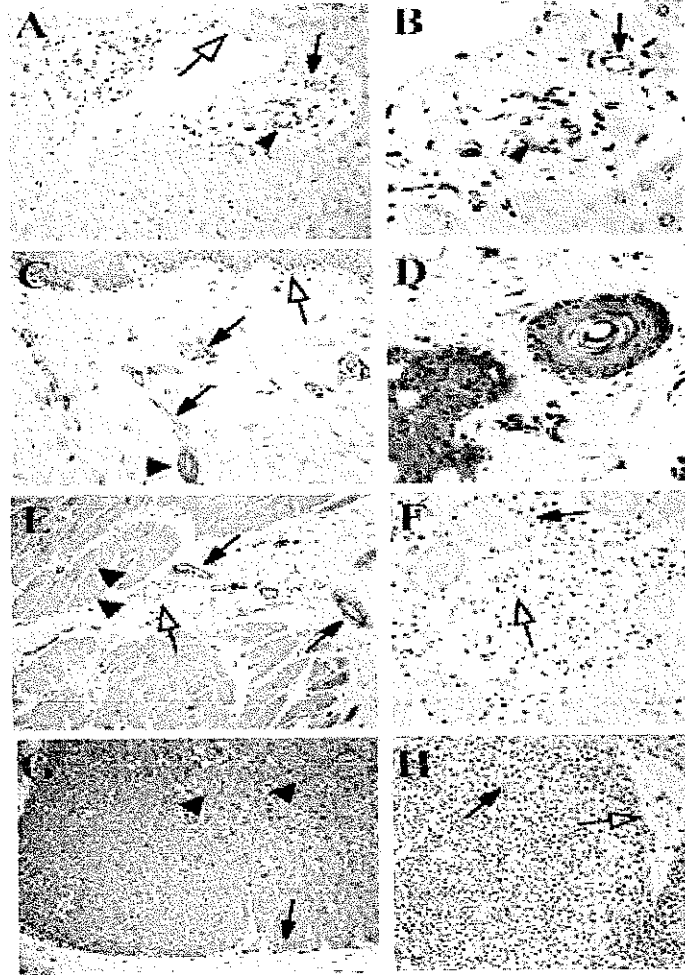
Diğer dokularda olduğu gibi serebrovasküler yapılarda da yoğun KRIT1 immunoreaktivitesi serebral kapiller ve arteriöl yapılarda gözlenirken, venöz yapılarda zayıf ekspresyon görüldü (Şekil 4.7 J, K, L)



Şekil 4.7 A-L: Yetişkin insan dokusuna ait endotel hücrelerinde KRIT1 immunoreaktivitesi
A) Kalp arteriyel endotelyumunda, KRIT1 immunoreaktivitesi güçlü iken (kapalı ok), venlerde zayıf idi (açık ok) B-D) A bölümünde gözlenen yapıların daha büyük büyütmesi E) Derideki, F, G) timusdaki, H-J) iskelet kasındaki K) beyinde kapiller yapılardaki ve L) arteriollerdeki KRIT1 immunoreaktivitesi

4.6 Ekstravasküler Dokularda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

KRIT1 ekspresyonu beyin dışındaki diğer dokuların endotelial yapılarında da gözlenmesine ilave olarak, bazı dokularda belirli hücre gruplarının yoğun olarak boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.8)

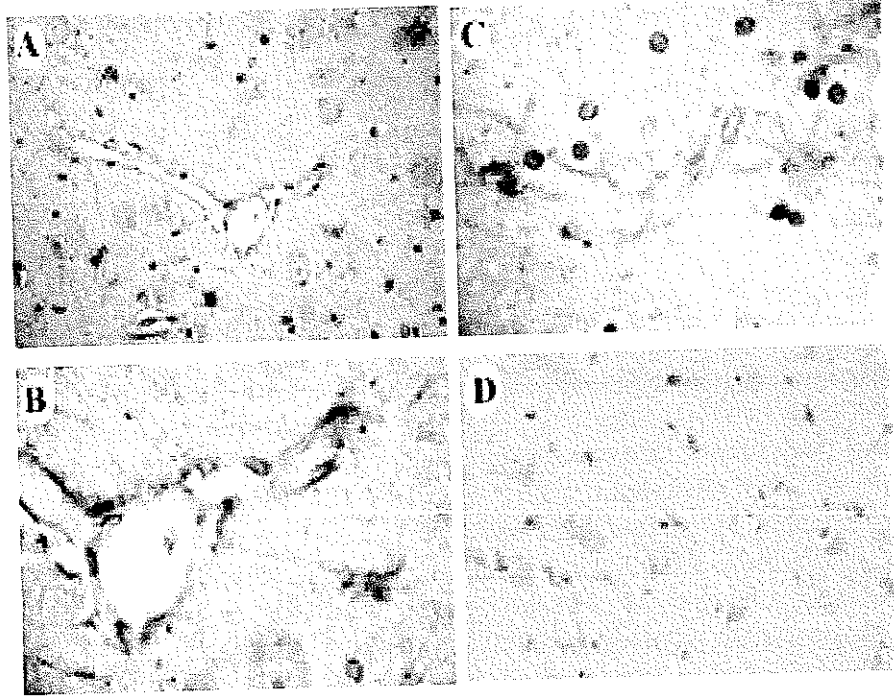


Şekil 4.8: Ekstraserebral dokularda KRIT1 immunoreaktivitesi

A) Karaciğerde KRIT1 immunoreaktivitesi safra kanalı epitelinde (ok başı) ve hepatik arterin endotelial hücrelerinde (kapalı ok) gözlenirken, ven endotelinde (açık ok) gözlenmedi. Hepatositlerde ise oldukça zayıf bir boyanma gözlemlendi. B) Karaciğer hepatik arter ve safra kanalının daha büyük büyütmesi. C) Deride kapiller yapılarda (kapalı ok) ve saç köklerinde (ok ucu) yoğun boyanma gözlenirken, stratum bazalede (açık ok) oldukça zayıf boyanma gözlemlendi. D) Derideki saç folikülünün büyük büyütmesi. E) Kardiyal miyositler (ok ucu) ve arterial endotelium (kapalı ok) KRIT1 ile boyanırken, venöz yapılarda (ok başı) boyanma görülmedi. F) Böbrek glomerulusunda boyanma gözlenmez iken (açık uç), proksimal tubullerde zayıf immunoreaktivite (kapalı ok) gözlemlendi. G) Timusdaki kapiller ve korteks (kapalı ok) ve H) dalaktaki beyaz pulpadaki kapiller (kapalı ok) ve epitelyal (açık ok) yapılarda yoğun KRIT1 ekspresyonu gözlemlendi.

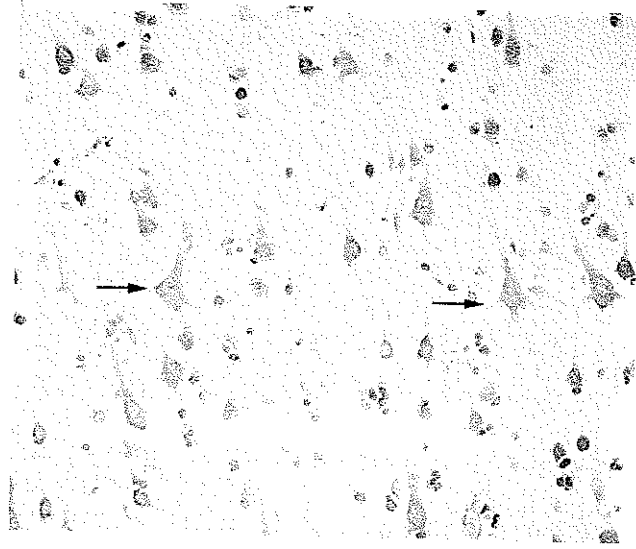
4.7 Astrositik Uzantılarda (Astrositik Foot Processlerde) ve Nöronlarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

Serebral yapılarda KRIT1 immunoreaktivitesi vasküler yapılara ek olarak, astrosit ve nöronlarda da gözlemlendi. Immunoreaktivitenin gözlemlendiği diğer önemli yapılar ise kan-beyin bariyerinin regülasyonunda görev alan astrositik uzantılardır (Şekil 4.9). Bu uzantılar detaylı incelendiğinde hem endotelial hücrelerde hem astrositlerde hemde astrositik uzantılarda KRIT1 immunoreaktivitesinin yüksek olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.9: Astrositik uzantılarda (Astrositik foot process) KRIT1 immunoreaktivitesi. A-C) Astrositik uzantıların kan damarlarına uzandığı alanlarda güçlü immunoreaktivite gözlenmektedir. B) A'da gözlenen astrositik uzantıların daha büyük büyütmesi. D) Serebral yapıdaki diğer astrositlerdeki KRIT1 immunoreaktivitesi.

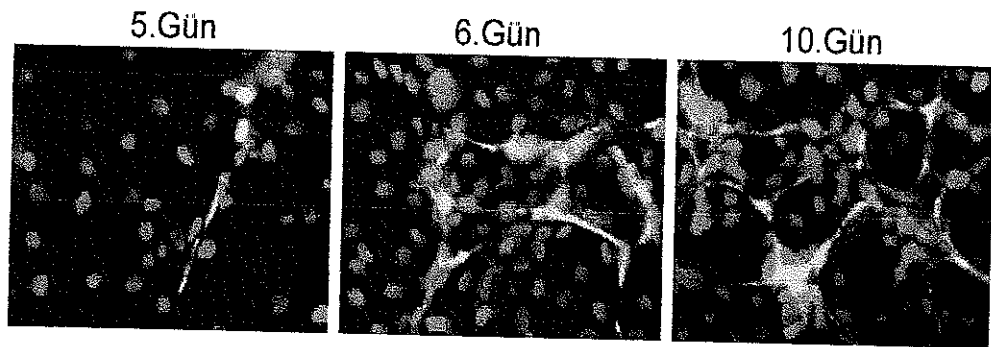
Serebral korteks içerisinde endotelial hücreler ve astrositik yapılara ilaveten, KRIT1 immunoreaktivitesi piramidal nöronlarda da gözlemlendi. Korteksin katmanları detaylı incelendiğinde en güçlü KRIT1 ekspresyonunun 3 ve 5 katmanlardaki piramidal nöronlarda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 2.10: Serebral korteksin 3. katmanındaki piramidal nöronlardaki KRIT1 immunoreaktivitesi

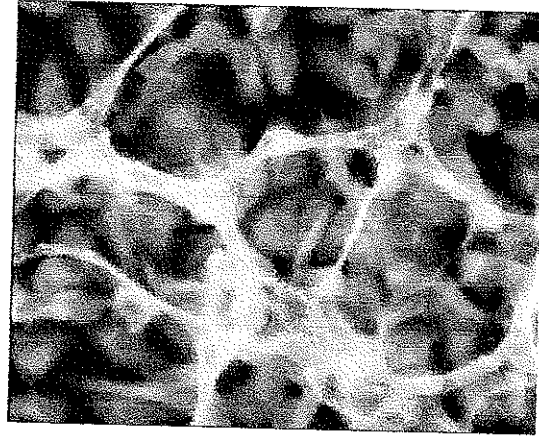
4.8 Endotelial Hücre Kültürlerinde Oluşan Kapiller Benzeri Yapılarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

İn vitro kültür ortamında kapiller benzeri yapılar endotelial hücre-hücre ilişkisinin bir sonucu olarak oluşur. Hücreler kültür kaplarında belli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra oluşan kapiller benzeri yapılarda immunofloresan yöntemi ile KRIT1 ekspresyonu araştırıldı. Kapillarizasyon oluşumuna bağlı olarak, kültürler 5, 6 ve 10. günlerde durdurularak fikse edildikten sonra, KRIT1 ile boyandı. Kapiller benzeri yapılarda KRIT1 protein ekspresyonunun kapillarizasyona bağlı olarak arttığı gözlemlendi (Şekil 4.11 ve 4.12).



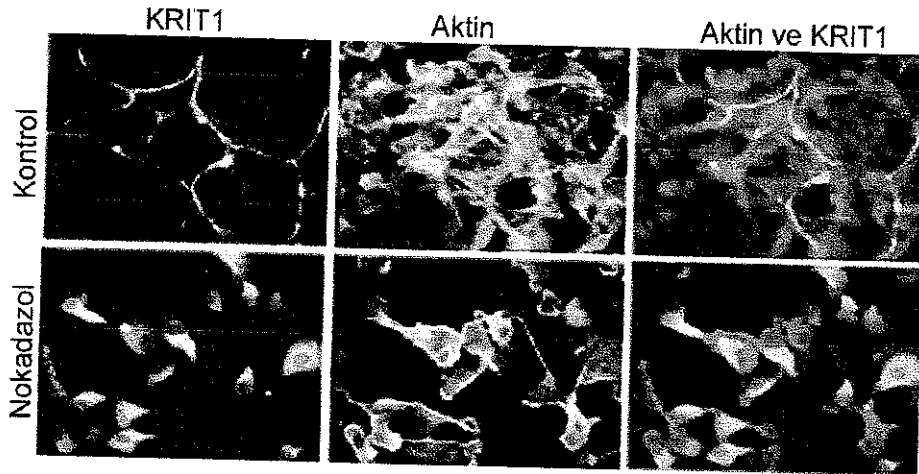
Şekil 4.11: Endotelial hücreler tarafından kapiller benzeri yapıların oluşumu ve bu yapılardaki KRIT1 ekspresyonu.

Yeşil renk: kapiller yapılardaki KRIT1 ekspresyonu, Mavi renk: DAPI ile nükleer boyanma



Şekil 4.12: Endotelyal hücreler tarafından oluşturulan kapiller benzeri yapılarda KRIT1 ekspresyonunun daha büyük büyütmede görünümü
Yeşil renk: kapiller yapılardaki KRIT1 ekspresyonu, Kırmızı renk: Aktin ekspresyonu, Mavi renk: DAPI ile nükleer boyanma.

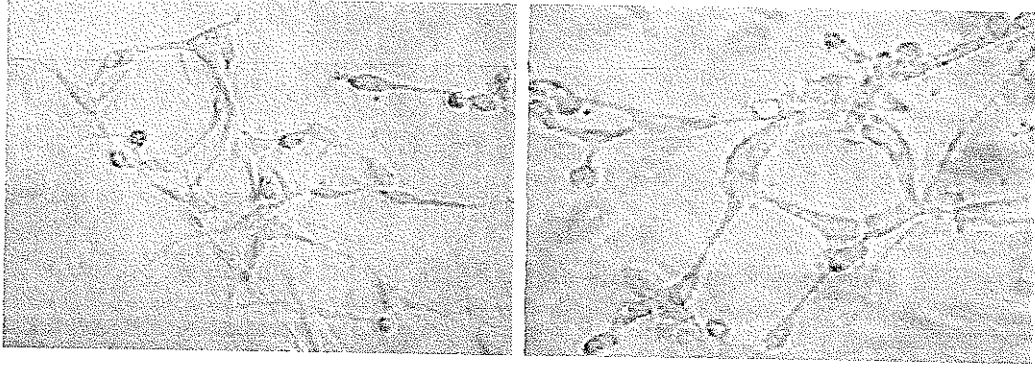
Endotelyal hücreler tarafından oluşturulan bu kapiller benzeri yapılar mikrotübül inhibitörü olan nokadazol ile muamele edildiğinde kapiller yapıların bozulduğu ve buna bağlı olarak da KRIT1 ekspresyonunun dağıldığı görüldü (Şekil 4.13) Bu bulgular bize, KRIT1'in anjiogenezisin en önemli ve ilk basamaklarından olan kapiller benzeri yapılarda eksprese edildiğini ve muhtemelen bu yapıların oluşumunda ve stabilizasyonunda görev aldığını göstermektedir.



Şekil 4.13: Kültürün 6. gününde normal ve nokadazol ile muamele edilmiş endotelyal hücrelerinin görünümü
Yeşil renk: kapiller yapılardaki KRIT1 ekspresyonu, Kırmızı renk: aktin ekspresyonu, Mavi : DAPI ile nükleer boyanma.

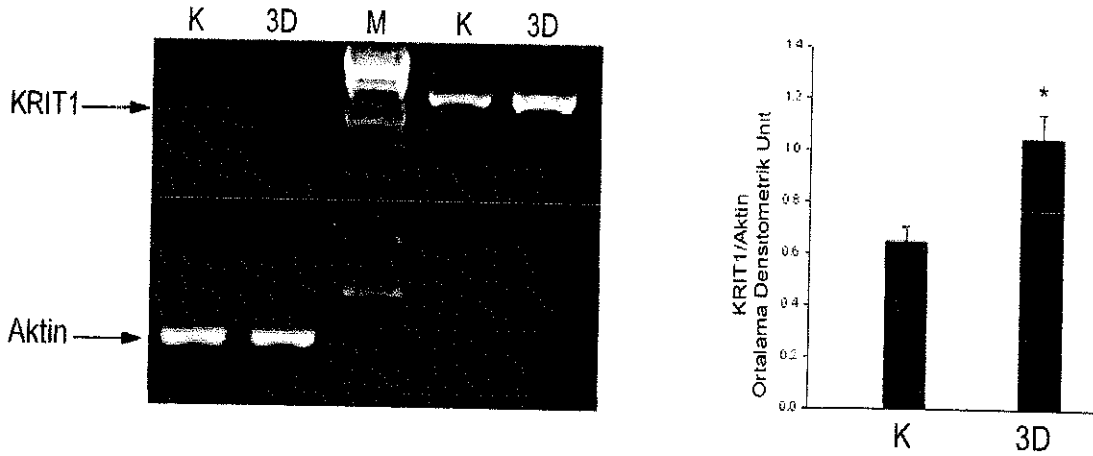
4.9 Üç Boyutlu (3D) Kültür Ortamlarında KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

Endotelial hücreler kollajen tip I veya fibrin içeren bir matriks içine ekildiklerinde 24 saat sonra birbirleri ile hücre-hücre ilişkisi kurarak kapiller yapıları oluşturmaya başlar ve 72 saatin sonunda ise tamamen kapiller ağ yapısının oluştuğu gözlenir (Şekil 4 14)



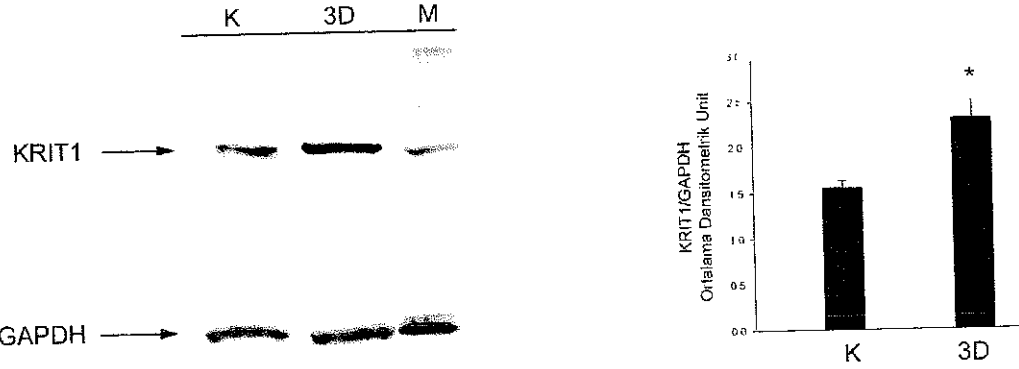
Şekil 4.14: Üç boyutlu kültürlerde 72 saat sonra kompleks kapiller yapıların görünümü.

Kapiller yapılarda KRIT1 ekspresyonunun artışı immunofloresan yöntem ile araştırıldıktan sonra, RNA ve protein düzeyindeki değişim RT-PCR ve Western blot teknikleri kullanılarak araştırıldı. RNA izolasyonunu takiben KRIT1 ve aktine özgül primerler kullanarak RT-PCR gerçekleştirildi. Kapiller yapıların oluşumuna bağlı olarak 3D'lı kültür ortamında KRIT1 ekspresyonun kontrol grubuna göre %56 oranında yüksek olduğu bulundu (Şekil 4 15)



Şekil 4.15: 3 boyutlu kültür ortamında KRIT1 ekspresyonunun RT-PCR ile araştırılması. Matriks içerisinde kültüre edilen endotelial hücrelerde KRIT1 ekspresyonun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. İnternal kontrol olarak aktin kullanıldı. n=3, P< 0.05, K: Kontrol, 3D: 3 boyutlu kültür sistemleri.

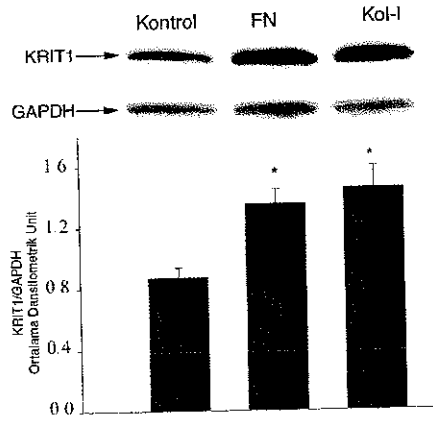
Üç boyutlu kültür ortamında KRIT1 ekspresyonundaki artış protein düzeyinde araştırıldığında, 3D ortamdaki KRIT1 ekspresyonun kontrol grubuna göre %48 oranında daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: 3 boyutlu kültür ortamında KRIT1 ekspresyonunun Western blot ile araştırılması GAPDH, eşit miktarda protein yüklenip yüklenmediğini kontrol etmek için kullanıldı n=3, P<0.05, K: Kontrol, 3D: 3 boyutlu kültür sistemleri.

4.10 Ekstrasellüler Matris Proteinleri ile KRIT1 Regülasyonunun Araştırılması

Ekstrasellüler matris proteinlerinin (ESM), angiogenezin stimülasyonunda oldukça önemli rol oynamalarından dolayı, ESM proteinleri ile KRIT1 ekspresyonunun regülasyonu Western blot yöntemi ile araştırıldı. Endotelial hücrelerin kollajen tip I ve fibronektine adezyonu, KRIT1 ekspresyonunda artışa neden oldu (Şekil 4.17) Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fibronektin ile kaplanmış kültürlerde %25 oranında, kollajen tip I ile kaplanmış kültür kaplarında %35 oranında KRIT1 ekspresyonunda artış olduğu gözlemlendi (P<0.05).



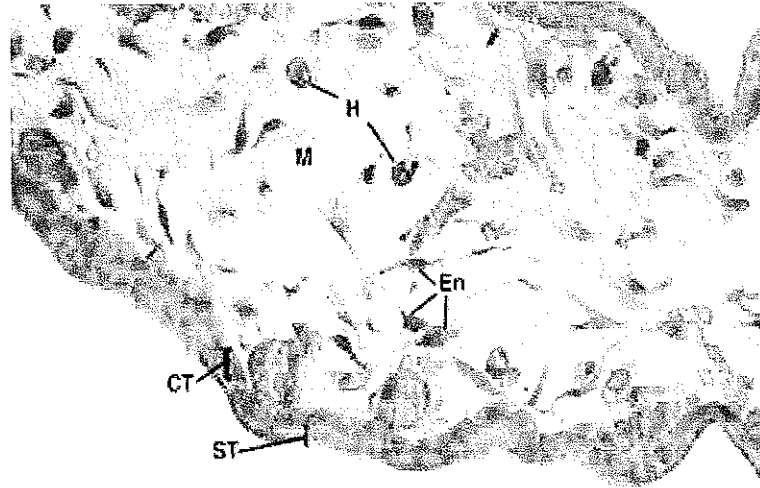
Şekil 4.17: Ekstrasellüler matris proteinleri ile KRIT1 ekspresyonunun regülasyonu. Endotelial hücrelerin fibronektin ve kollajen tip I ile kaplanmış kültür kaplarına adezyonu KRIT1 ekspresyonunda artışa neden olduğu gözlemlendi FN: fibronektin, Kol-I: kollajen tip I ile kaplanmış kültür kapları.

4.11 Anjiogenik Faktörler ile KRIT1 Regülasyonunun Araştırılması

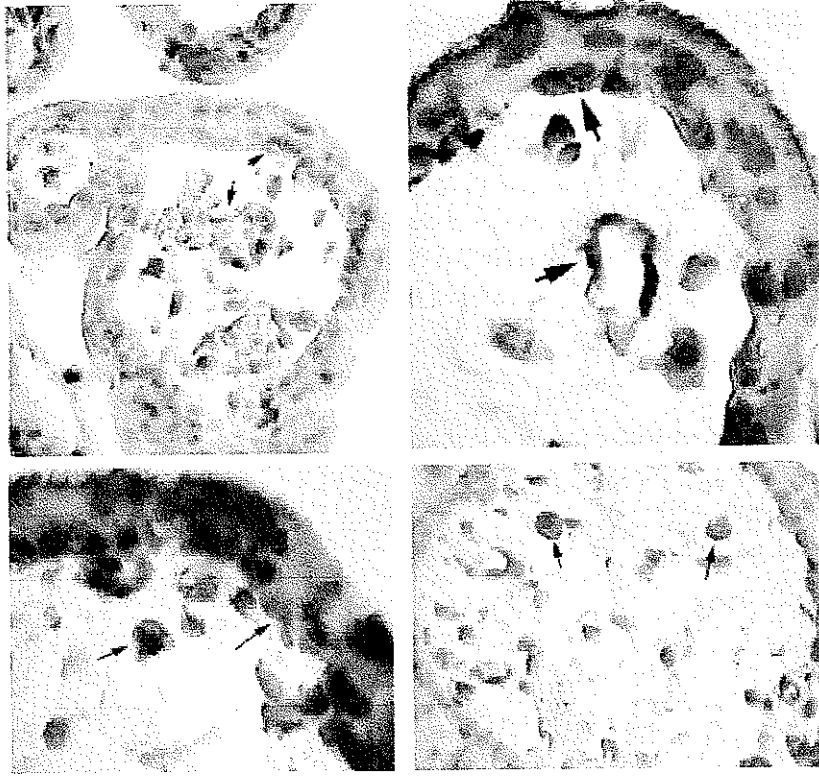
VEGF ve bFGF en iyi bilinen anjiogenik faktörlerin başında geldiğinden, VEGF ve bFGF gibi anjiogenik faktörlerin KRIT1 ekspresyonu üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmak amacıyla, endotelial hücreler 0, 2, 20 ng/ml rekombinant VEGF ve bFGF ile kısa (30 dakika-6 saat) ve uzun süreli (24-72 saat) olarak muamele edildiler. Bu süreler sonunda hücrelerden protein elde edilerek Western blot ile KRIT1 ekspresyonundaki değişime bakıldı. Doz ve zaman bağımlı olarak anjiogenik faktörler ile muamele edilmiş gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, KRIT1 ekspresyonunda herhangi bir değişim olmadığı gözlemlendi.

4.12 KRIT1'in Plasentada Erken Anjiogenez Süresince Ekspresyonunun Araştırılması

İn vitro anjiogenik sistemlerde bulduğumuz sonuçları in vivo anjiogenik sistemde de göstermek amacıyla farklı gebelik dönemlerine ait plasental dokularda KRIT1 ekspresyonu immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak araştırıldı. Anjiogenik basamakları kolaylıkla görülebilme imkanı olduğu için plasenta en iyi in vivo model sistemlerinden biridir. Birinci dönemi vaskülogenezis ve anjiogenezin başladığı bir dönemdir. Gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemleri ise oluşan damar yapılarının olgunlaşma sürecini kapsar. Bu amaçla ilk olarak gebeliğin erken dönemlerine ait plasenta dokularında KRIT1 ekspresyonu araştırıldığında, plasental villus içerisinde en yoğun KRIT1 immunoreaktivitesi Hofbauer hücreleri ve anjiogenik kord gibi anjiogenezin aktif olduğu alanlarda gözlemlendi. Villus içerisindeki anjiogenik alanlara ilaveten, sitotrofoblast (cytotrophoblast) hücreler KRIT1 ile immunoreaktivite verirken, sinsisyotrofoblastlarda (syncytiotrophoblast) herhangi bir boyanma gözlemlenmedi (Şekil 4.18 ve 4.19)

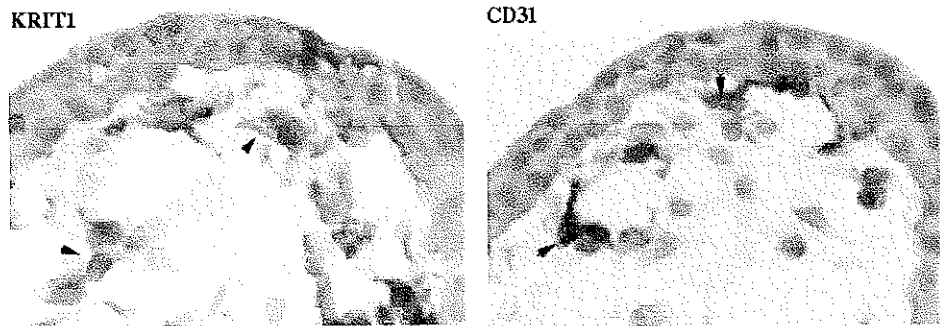


Şekil 4.18: Olgunlaşmamış plasenta dokusunda KRIT1 ekspresyonu. Yoğun KRIT1 immunoreaktivitesi villus içerisindeki endotelial hücreler (En) ve Hofbauer hücrelerinde (H) gözlemlendi. Sitotrofoblast (CT) hücreleri KRIT1 ile boyanırken, sinsisyotrofoblastlarda (ST) herhangi bir boyanma gözlemlenmedi. M: Mezenşimal doku.



Şekil 4.19: Gebeliğin birinci dönemindeki farklı plasenta dokularındaki KRIT1 immunoreaktivitesi. Güçlü KRIT1 boyanması endotelial hücreler, Hofbauer hücreleri ve anjiogenik alanlarda gözlenmektedir. Oklar KRIT1 immunoreaktivitesinin olduğu alanları göstermektedir.

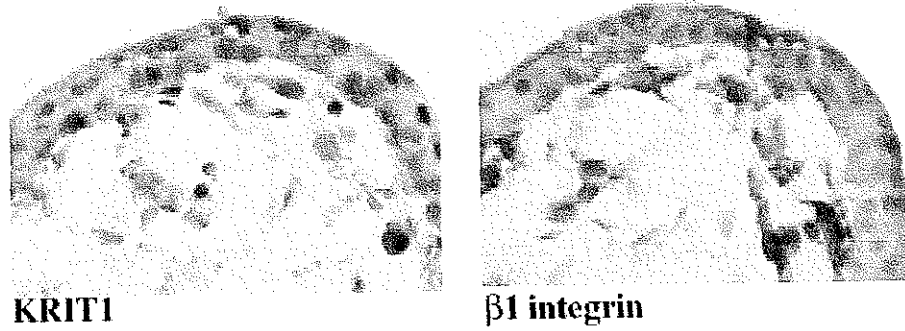
Gebeliğin birinci dönemine ait plasenta dokularındaki yoğun KRIT1 immunoreaktivitesinin anjiogenik alanlarda olduğu gözlemlendi. Bu alanların gerçek anjiogenik alanlar olup olmadığı endotelial hücreler için özgül bir yüzey reseptörü olan CD-31 (PECAM) ile boyanarak gösterildi (Şekil 4.20).



Şekil 4.20: Olgunlaşmamış plasenta dokusunda anjiogenik alanların CD31 ile gösterilmesi.

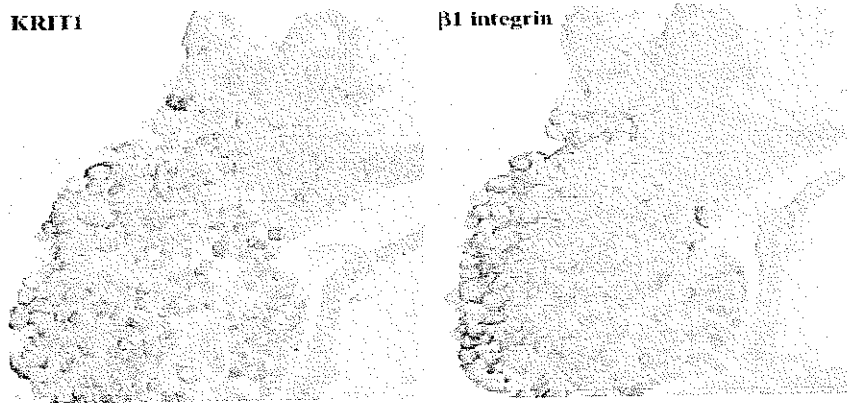
4.13 Plasental Dokularda KRIT1 ve β 1 İntegrin Ekspresyonunun Araştırılması

Erken gebelik plasenta dokularında KRIT1 ve β 1 integrinin potansiyel olarak birlikte lokalize olduklarını göstermek için, plasental dokular β 1 integrin ve KRIT1 antikolarıyla boyandı. Villus içerisinde hem KRIT1 hemde β 1 integrinin boyanma modelinin benzer olduğu görüldü. Her iki proteinin de endotelial hücreler ve villus sitotrofoblastlarda eksprese edildiği gözlemlendi (Şekil 4.21). Sitotrofoblastlar hücre-hücre ilişkisinin oldukça güçlü olduğu adhesif hücrelerdir. Sitotrofoblastlara karşılık hücre adezyonunun olmadığı sinsisyotrofoblastlarda KRIT1 ve β 1 integrin immunoreaktivitesi gözlemlenmedi.



Şekil 4.21: Olgunlaşmamış plasenta dokularında KRIT1 ve β 1 integrin ekspresyonu. Villus içerisinde benzer anjiogenik alanlarda ve sitotrofoblastlarda KRIT1 ve β 1 integrinin birlikte eksprese edildiği gözlemlendi.

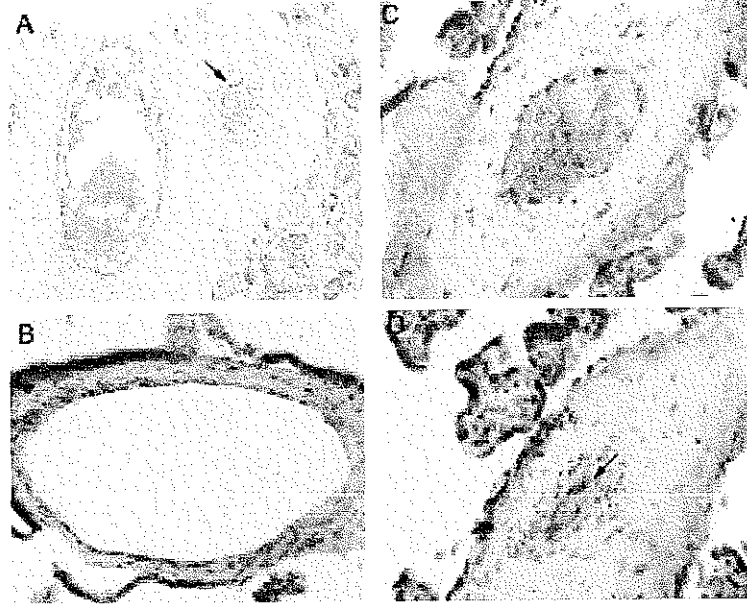
Villus içerisindeki anjiogenik alanlara ilaveten, yoğun β 1 integrin ve KRIT1 ekspresyonu invazif yeteneği güçlü olan ekstra-trofoblastik hücrelerde de gözlemlendi (Şekil 4.22).



Şekil 4.22: Ekstra-trofoblast hücre kolonlarındaki distal hücrelerde benzer KRIT1 ve β 1 integrin ekspresyonu.

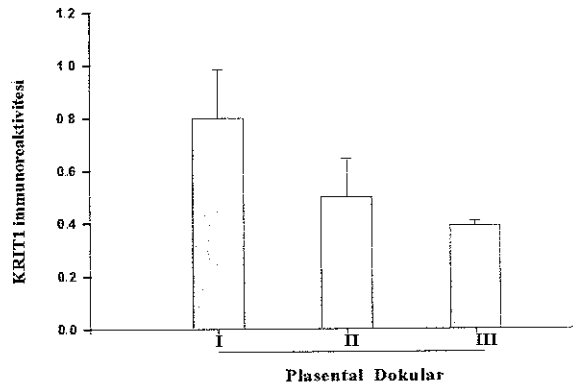
4.14 Olgun Damarlarda KRIT1 Ekspresyonunun Araştırılması

Gebeliğin birinci döneminde anjiogenezis en yüksek düzeyde olduğu ve bu dönemde KRIT1 ekspresyonunun anjiogenik alanlarda oldukça güçlü olduğu görülmüştü. Gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemlerinde ise damar olgunlaşmasına bağlı olarak KRIT1 immunoreaktivitesinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.21 ve 4.22). Damar olgunlaşmasına bağlı olarak kapiller ve arteriollerde KRIT1 ekspresyonu devam ederken, olgun damar endotelinde KRIT1 immunoreaktivitesinin çok azaldığı hatta kaybolduğu görüldü.



Şekil 4.23: Gebeliğin 2. ve 3. dönemlerine ait plasenta örneklerinde KRIT1 ekspresyonu. A-B) Gebeliğin 3. ve C-D) 2. dönemindeki vasküler yapılarıdaki KRIT1 immunoreaktivitesini göstermektedir.

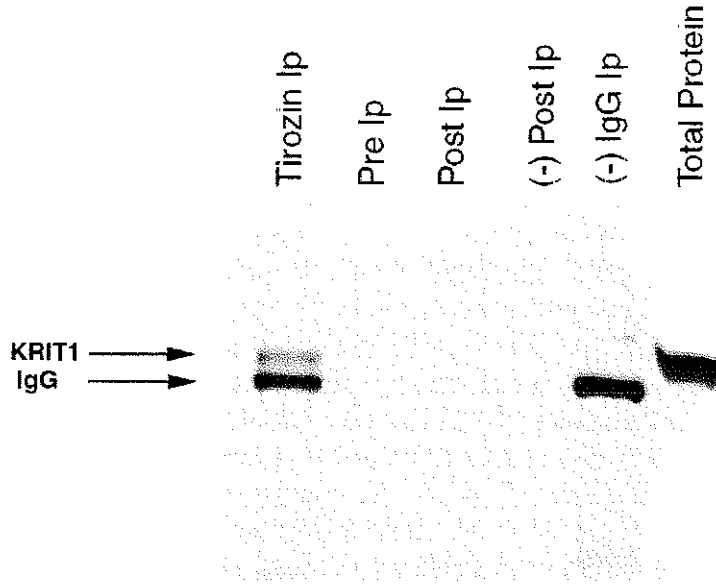
Ok KRIT1 immunoreaktivitesinin olduğu alanları göstermektedir.



Şekil 4.22: Farklı gebelik dönemlerine ait plasental dokularda anjiogenik alanlarda KRIT1 immunoreaktivitesinin HSCORE değerlendirilmesi.

4.15 KRIT1 Proteininin Fosforilasyonunun Araştırılması

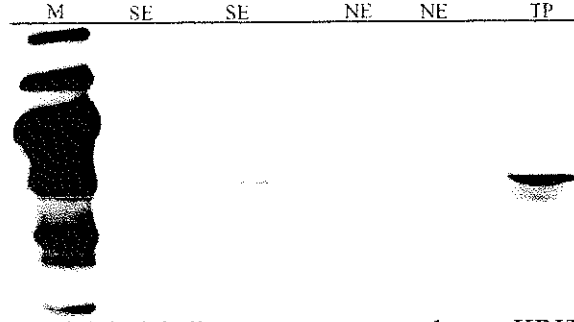
KRIT1 proteininin fosforillenip fosforillenmediğini anlamak için serin, treonin ve tirozin aminoasitlerine özgül antikorlar kullanılarak immunopresipitasyon gerçekleştirildi. Fosfo-serin ve fosfo-treoninde KRIT1 için özgül bir band alınmaz iken, fosfo-tirozinde KRIT1 için özgül band gözlemlendi. Bu da bize KRIT1'in tirozin üzerinden fosforillenen bir protein olduğunu göstermektedir (Şekil 4.23). KRIT1 proteininin yapısına bakıldığında potansiyel fosforilasyon alanının NPXY domaini olduğu tahmin edilmektedir.



Şekil 4.23: KRIT1 proteini tirozin aminoasiti üzerinden fosforillenen bir fosfoproteindir (-) negatif kontrole ait post Ip'yi, (-) IgG Ip: negatif kontrol Ip'yi, IgG: Immunglobulin ağır zincirini ifade etmektedir. Negatif kontrol olarak fosforillenmeyen bir protein ile yapılan immunopresipitasyon kullanılırken, pozitif kontrol olarak ise total protein yüklendi. Negatif kontrolda sadece IgG ağır zinciri band verirken, total proteinde KRIT1'e spesifik band gözlenmektedir.

4.16 KRIT1 Proteinin Hücresel Lokalizasyonunun Araştırılması

KRIT1 proteininin yapısında 46-51 (KKKRKK) ve 569-572 (KKHK) aminoasitler arasında iki tane potansiyel nükleer lokalizasyon sinyali bulunmaktadır. Bu potansiyel sinyallerin varlığından dolayı KRIT1 proteininin sitoplazmadan nükleusa geçerek nükleusda farklı bir görev üstlenip üstlenmediğini araştırmak için endotelial hücrelerden nüklear ve sitoplazmik özütler elde ederek KRIT1 antikorunu ile Western blot gerçekleştirildi. Sonuçta sadece sitoplazmik özütlerde sinyal gözlenirken, nüklear ekstraktlarda KRIT1 için özgül bir band olmadığı görüldü (Şekil 4.24).

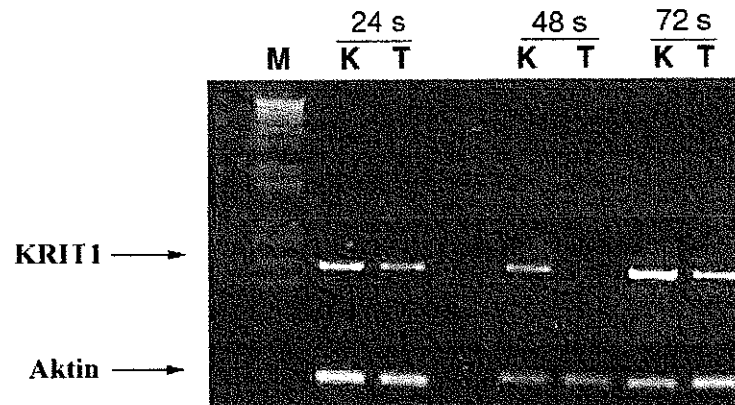


Şekil 4.24: KRIT1 proteininin lokalizasyonunun araştırılması. KRIT1 protein bandı sitoplazmik ekstraktlarda gözlenirken, nüklear ekstraktlarda bulunmadı.

SE: Sitoplazmik ekstraktı, NE: nüklear ekstraktı, TP: pozitif kontrol olarak yüklenen total proteini, M: protein markerini ifade etmektedir.

4.17 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması

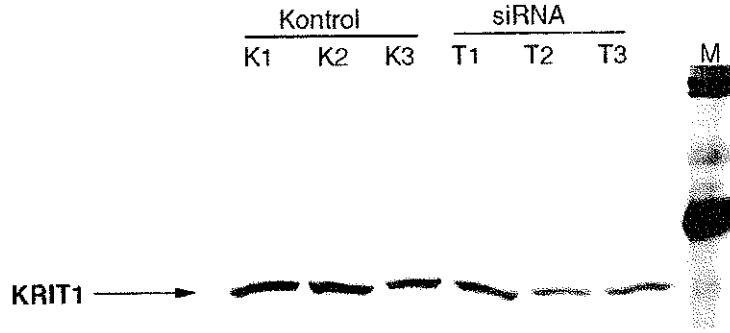
Endotelial hücrelerde *in vitro* KRIT1 ekspresyonunun baskılanması için ilk olarak antisense oligonükleotid yöntemi denendi fakat oligonükleotid kullanımı ile yeterli düzeyde azalma elde edilemediği için kullanılmadı. Bu amaçla *in vitro* memeli sistemlerinde oldukça yeni fakat çok daha efektif bir yöntem olan siRNA (small RNA interference) olarak adlandırılan teknik kullanıldı. Ekspresyonun baskılanmasında en önemli basamak en özgül siRNA primerlerinin bulunmasıdır. Bu amaçla KRIT1 geninin farklı bölgelerine karşı dizayn edilen siRNA'ların her biri kültür sisteminde ayrı ayrı denererek en etkili olan siRNA primer çifti kullanıldı. Her bir siRNA *in vitro* olarak sentez edilip pürifiye edildikten sonra %12'lik poliakrilamid jelde elektroforeze tabii tutuldu. Endotelial ve HeLa hücreleri kontrol siRNA'sı ve KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 24, 48, ve 72. saatlerini takiben, hücrelerden RNA ve protein ekstraksiyonu gerçekleştirildi. 24, 48, ve 72 saatlerde RNA düzeyinde azalma gözlenmesine rağmen, protein düzeyinde herhangi bir azalma görülmedi (Şekil 4.25)



Şekil 4.25: siRNA tekniği ile KRIT1 ekspresyonunda RNA düzeyinde azalma. Transfeksiyonu takiben 24, 48, ve 72. saatlerdeki KRIT1 ekspresyonu RT-PCR ile kontrol edildi. 24 saati takiben azalma gözlenirken en fazla azalmanın 48. saatte olduğu gözlemlendi. Aktin internal kontrol olarak kullanıldı.

M: Moleküler marker.

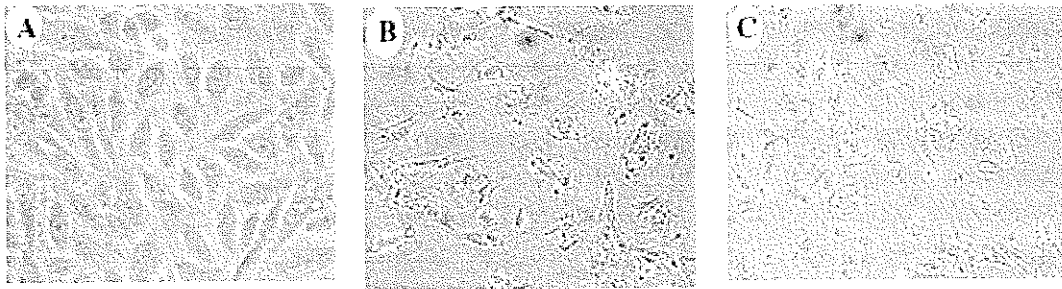
Protein düzeyinde azalma elde edilememesi nedeniyle hücreler birinci transfeksiyondan 24 saat sonra yeniden ikinci defa transfekte edilerek, 3, 4, 5 ve 6. günlerde protein düzeyine bakıldığında azalmanın en fazla 5 günde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26). Endotelial hücrelerde 5. günde gözlenen azalmaya bağlı olarak yapılan tüm fonksiyonel çalışmalar (proliferasyon, adhezyon, apoptozis gibi) transfeksiyonun 5 gününde hem endotelial hemde HeLa hücrelerinde gerçekleştirildi. Kontrol ve KRIT1 siRNA'sı transfekte edilerek aynı fonksiyonel deneyler KRIT1 ekspresyon etmeyen Cos7 hücrelerinde gerçekleştirildi



Şekil 4.26: siRNA tekniği ile KRIT1 ekspresyonunda protein düzeyinde azalma İkinci transfeksiyonu takiben 5 günde alınan protein örneklerinde KRIT1 ekspresyonu Western blot ile kontrol edildi. Eşit miktarda protein yüklenip yüklenmediği Ponceu S ile kontrol edildi. M: Protein marker.

4.18 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanmasıyla Gözlenen Morfolojik Farklılık

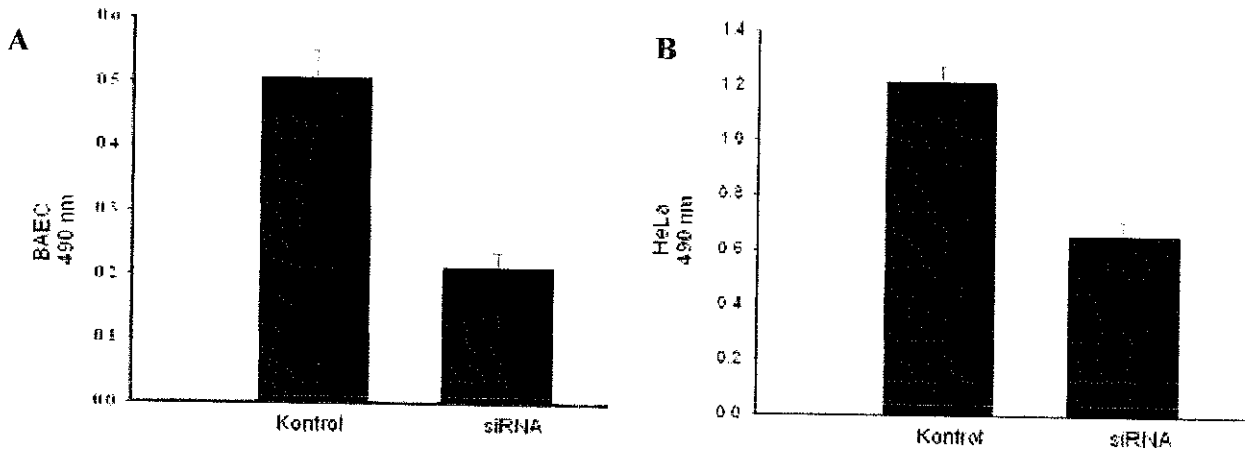
KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edilen ve edilmeyen kontrol hücrelerinde gözlenen en önemli özelliklerden biri endotelial hücrelerde gözlenen morfolojik farklılıklarıdır. KRIT1 ile transfekte hücreler kültürde çok daha geniş, yayılmış, endotelial hücrelere özgül olan yanyana gelmiş muntazam (cobble stone) yapısını kaybetmiş, hücre-hücre etkileşimi azalmış hücreler olarak göze çarparken, kontrol hücrelerinde bu durum gözlenmemiştir (Şekil 4.27)



Şekil 4.27: KRIT1 ekspresyonunun baskılanması sonrası kültürde gözlenen morfolojik farklılıklar. A) Kontrol grubundaki endotelial hücre morfolojisi B ve C) KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edilmiş hücrelerdeki bozulmuş endotel yapıları.

4.19 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Hücre Proliferasyonunun Araştırılması

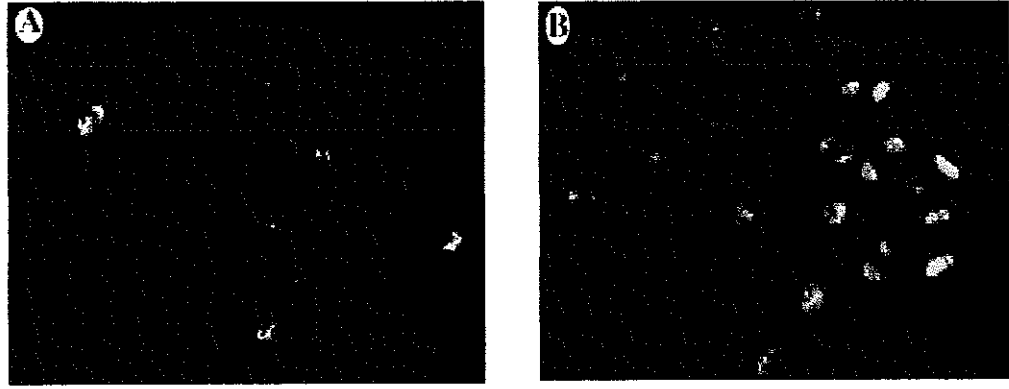
BAE ve HeLa hücreleri kontrol ve siRNA'sı ile transfekte edildikten sonra transfeksiyonun 5. günündeki hücreler PBS ile yıkandıktan hemen sonra serum ve fenol kırmızısı içermeyen besi ortamı içerisine alınarak yaklaşık 8 saat daha kültüre devam edildi. Kontrol ve KRIT1 transfekte hücrelerdeki proliferasyon indeksi 490 nm dalga boyunda okunduğunda KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edilen hücrelerde, kontrol grubuna göre proliferasyon indeksinin BAE hücrelerinde %58, HeLa hücrelerinde ise %45 oranında azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.28A-B). Hem endotelial hücrelerde hemde HeLa hücrelerindeki KRIT1 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak gözlenen proliferasyondaki bu azalma $p < 0.05$ 'e göre istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



Şekil 4.28: Endotelial ve HeLa hücrelerinde hücre proliferasyonu. A) BAE hücreleri B) HeLa hücreleri KRIT1 siRNA'sı ile baskılandığında hücre proliferasyonundaki azalma görülmektedir. Barlar her grup için 12 farklı değerlerin ortalama \pm SEM değerlerini göstermektedir.

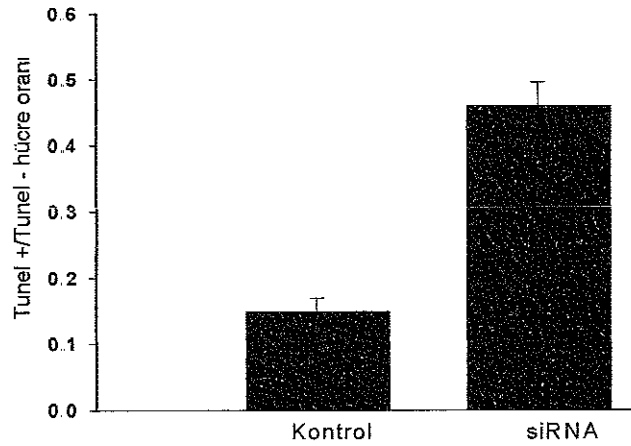
4.20 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonrası Endotelial Hücrelerde Apoptotik İndeksinin Araştırılması

KRIT1 ekspresyonunun siRNA ile baskılanması sonucu proliferasyon indeksinde gözlenen azalmanın apoptozisin indüklenmesi ile mi yoksa başka mekanizmalar aracılığıyla mı gerçekleştiğini anlamak amacıyla transfeksiyonun 5. günündeki kontrol ve transfekte hücrelerde TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks belirlendi. Slaytlar floresan mikroskop altında, apoptotik cisimcikler, nükleer parçalanma ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptozun morfolojik göstergeleri dikkate alınarak değerlendirildi (Şekil 4.29). Bu değerlendirmeler doğrultusunda KRIT1 siRNA'sı ile transfekte hücrelerde apoptozisin artışı gözlemlendi.



Şekil 4.29: Endotelyal hücrelerde apoptotik indeksin belirlenmesi Kontrol (A) grubuna göre KRIT1 siRNA'sı ile transfekte hücrelerde (B) apoptotik indeksin artmış olduğu gözlemlendi. Kontrol ve transfekte grubda TUNEL+ hücreler TUNEL – hücelere oranlandığında KRIT1 ile transfekte grubda TUNEL+ hücre oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

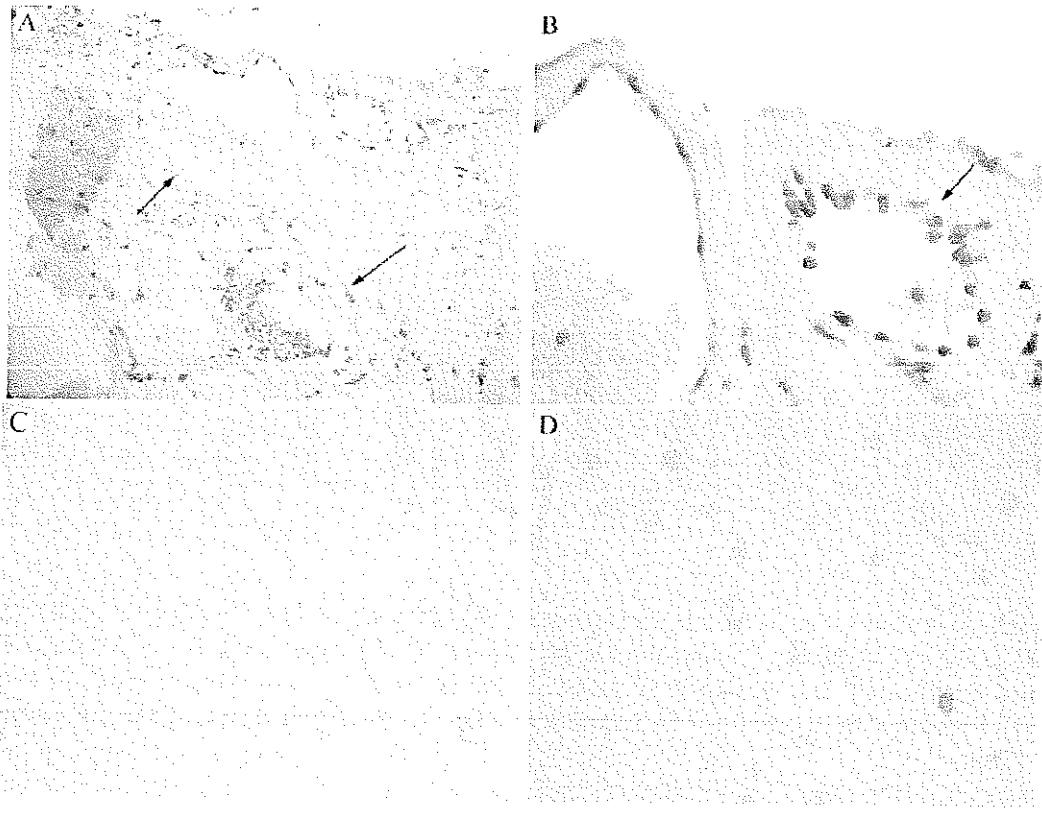
Kontrol ve KRIT1 siRNA'sı ile transfekte hücrelerde TUNEL pozitif ve negatif hücreler sayılarak apoptotik indeks hesaplandı (Şekil 4.30). KRIT1 ile transfekte edilen kültürlerde TUNEL pozitif hücre oranının kontrol grubuna göre artmış olduğu bulundu. KRIT1 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak gözlenen apoptozisdeki bu artış $p < 0.05$ 'e göre istatistiksel olarak da anlamlı bulundu.



Şekil 4.30: siRNA ile transfekte hücrelerdeki apoptotik indeks. KRIT1 ile transfekte edilen kültürlerde TUNEL pozitif hücre oranının kontrol grubuna göre artmış olduğu bulundu.

4.21 Serebral Kavernozy Malformasyonlu Hastalarda Vasküler Yapılarda İn Vivo Apoptotik İndeksin Araştırılması

KRIII ekspresyonun siRNA ile baskılanması sonucu proliferasyon indeksinde gözlenen azalmanın apoptozisin artmasından kaynaklandığı in vitro olarak gösterildikten sonra, in vivo olarak bulunan sonuçları teyid etmek amacıyla serebral kavernozy malformasyonlu hastalardan alınan parafin dokularda TUNEL yöntemi ile apoptotik indeks araştırıldı. Kontrol grubu olarak normal herhangi bir serebral vasküler malformasyonu olmayan bireyler kullanıldı (Şekil 4.31). Slaytlar ışık mikroskobu altında vermiş oldukları immunoreaktivite oranına göre değerlendirildi. Bu değerlendirmeler doğrultusunda serebral kavernozy hastalarda vasküler yapılarda beklenenin aksine apoptozisin çok daha arttığı gözlemlendi.

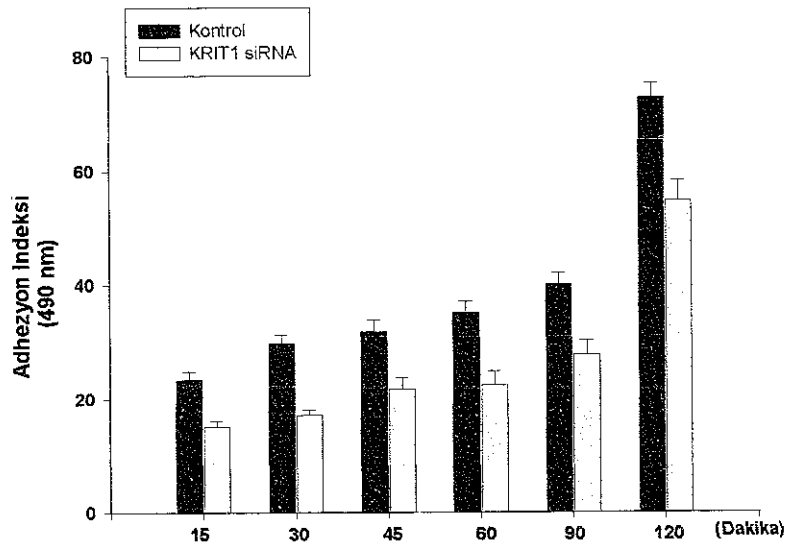


Şekil 4.31: Serebral vasküler malformasyonlu hastalarda TUNEL yöntemi ile apoptozisin gösterilmesi A ve B: Serebral kavernozy hasta bireylerine ait dokular. Lezyonların olduğu alanlarda endotel hücrelerde ve lezyon çevresinde apoptozisin daha fazla arttığı gözlenmektedir. C ve D: Normal bir bireye ait beyin dokusundaki apoptotik indeksin daha az olduğu görülmektedir.

Oklar lezyon alanındaki apoptotik hücreleri göstermektedir

4.22 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonucu Hücre Adezyon Kapasitesinin Araştırılması

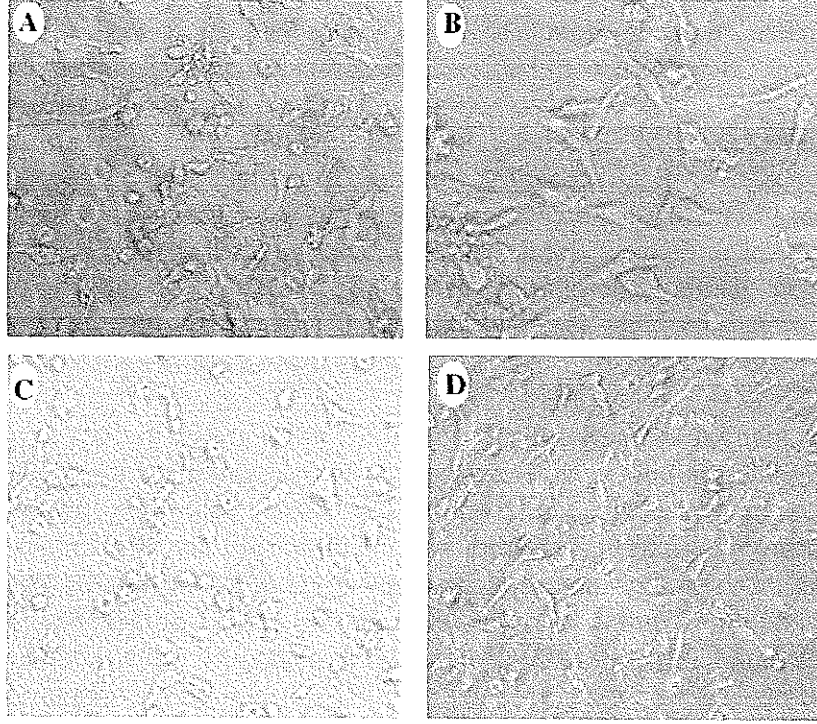
Endotelyal ve HeLa hücreleri kontrol ve siRNA ile transfekte edildikten 5 gün sonra tripsinize edilerek aynı sayıdaki hücreler fibronektin ile kaplanmış 96 gözlü kültür kaplarına ekildi. Hücre adezyonu 15 ve 120 dakikalık zaman aralığında incelendi. Adezyon süresi tamamlandığında kültür kabına yapışmayan hücreler alındı. PBS ile yıkandı ve üzerine serum ve fenol kırmızısından yoksun besi ortamı eklenerek kültüre devam edildi. Kültür kapları üzerine Commassi mavisini eklenerek kolorimetrik olarak spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda okundu. Kontrol grubuna göre KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edilen hücrelerde adezyon yeteneğinin azaldığı gözlemlendi (Şekil 4 32)



Şekil 4.32: Endotelyal hücrelerde adezyon kapasitesinin araştırılması. Endotelyal hücreler KRIT1 siRNA'sı ile transfekte edilerek KRIT1 ile baskılanan ve baskılanmayan hücrelerdeki adezyon kapasitesi araştırıldı. 15-120 dakikalık zaman aralığındaki tüm zamanlarda kontrol grubuna göre belirgin bir azalma gözlemlendi ve bu azalma $p < 0.05$ 'e göre anlamlı bulundu.

4.23 KRIT1 Ekspresyonunun Baskılanması Sonucu Kapiller Benzeri Yapıların Oluşumunun Araştırılması

Kontrol ve transfekte hücreler kollajen matriks içerisinde tüp oluşumu için kültüre edildiler. Kontrol hücreleri 72 saatin sonunda kapiller yapıları oluştururken, transfekte hücrelerde kapiller benzeri yapıların oluşmadığı gözlemlendi (Şekil 4 33). Kontrol hücrelerinde anjiogenik kapasite 4 ve 5 idi. siRNA ile KRIT1 ekspresyonunun baskılandığı transfekte hücrelerde ise anjiogenik kapasite 2 ve 3 olarak skorlandı. Transfekte hücreler kontrol hücrelerine göre kıyaslandığında anjiogenik kapasitedeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 4 33)



Şekil 4.33: siRNA ile transfeksiyon sonrası kapiller yapının oluşumu KRT11 siRNA'sı ile transfekte endotelial hücrelerde kapiller yapıların oluşmadığı gözlemlendi A ve B: Kontrol hücrelerinde kapiller yapıların tamamıyla oluştuğu gözlenirken, C ve D: siRNA ile transfekte edilmiş endotelial hücrelerin kapiller yapılar oluşturamadığı görüldü.

TARTIŞMA

Serebral Kavernozy Malformasyonlar (SKM), merkezi sinir sistemindeki kan damarlarının anormal gelişimi ve oluşumu ile ilişkili vasküler bir hastalıktır (4). Serebral kavernomların popülasyondaki görülme sıklığı oldukça düşüktür ve tüm vasküler malformasyonların %10-15'ini oluşturmaktadır. SKM'ler sporadik olabildiği gibi kalıtsal olarak da ortaya çıkması, Hispantik Amerikalılar gibi bazı topluluklarda founder efekt nedeniyle hastalığın görülme sıklığını daha da artırmaktadır (6, 87). Geniş serilerde yapılan MR çalışmalarıyla, kavernomların oldukça dinamik lezyonlar olduğu, sporadik olgularda tek bir lezyon gözlenmesine rağmen, kalıtsal geçiş gösteren olgularda lezyon sayısının arttığı ve hemorajların ailesel olgularda sporadik olgulara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (164).

Hastalığın toplumdaki görülme sıklığının düşük olmasına rağmen, hastalık için uygun tedavi yönteminin olmaması ve semptomların ağır olduğu bireylerde yaşam kalitesinin düşmesi gibi nedenlerden dolayı hastalığın oluşumundan sorumlu olan gen/genlerin araştırılması zorunlu olmuştur. Bu amaçla, serebral kavernomlu ailelerde yapılan linkaj çalışmaları sonucunda, kavernomlarla ilişkili otozomal dominant formda kalıtılan CCM1, CCM2 ve CCM3 olarak adlandırılan üç lokus tanımlanmıştır. Linkaj çalışmalarını takiben, 1995 yılında üç farklı grup tarafından farklı moleküler teknikler kullanılarak, serebral kavernomların oluşumundan sorumlu ve CCM1'de lokalize olan KRIT1 geni tanımlanmıştır (102-104). KRIT1 geninin klonlanmasını takiben, çalışmalar mutasyon taraması üzerine yoğunlaşmış, bir çok araştırma grubu tarafından sporadik ve kalıtsal geçiş gösteren olgularda KRIT1 genindeki mutasyonların kavernomlara neden olduğu gösterilmiştir (107-115, 165, 166).

Şimdiye kadar yapılan moleküler çalışmalarda, KRIT1 genindeki mutasyonların SKM lezyonlarına neden olduğu gösterilmesine rağmen, KRIT1 geninde meydana gelen bu mutasyonların hangi moleküler mekanizmaları kullanarak, SKM lezyonlarını oluşturduğu konusunda kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Lezyon oluşumu konusunda iki farklı görüş ileri sürülmektedir. Bir grup araştırmacı, mutasyonların haploinsufficiency sonucu oluştuğunu, diğer grup ise, lezyonların lokal yapısı ve beyin dışında retina, deri ve vertebrada da gözlenmesi nedeniyle heterozigosite kaybının (loss of heterozygosity) sonucu oluştuğu görüşünü desteklemektedirler (121, 167).

KRIT1 geni işlevi henüz tam olarak bilinmeyen bir proteini kodlamaktadır ve proteinin işlevini anlamaya yönelik yapılan çalışmalar, lezyon oluşumunun patofizyolojisinin anlaşılmasında önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Serebral kavernomların oluşumuna neden olan moleküler mekanizmaları anlamak için, KRIT1 proteinin hücresel işlevini araştırmak, subsellüler lokalizasyonunu ve ekspresyon profilini belirlemek gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda, serebral kavernozy malformasyonların patogeneze ışık tutmak amacıyla, ilk olarak KRIT1 proteininin

insan dokusundaki hücrel lokalizasyonu, yetişkin ve fetal dokulardaki ekspresyon dağılımı araştırıldı.

KRIT1'in insan dokularında hücrel düzeydeki dağılımı, ilk olarak bu çalışmada immunohistokimyasal yöntemler ile belirlenmiştir. Araştırmada, kalp, deri, iskelet kası, timus, dalak, karaciğer ve beyin gibi farklı insan dokuları kullanılmış ve KRIT1 immunoreaktivitesinin hemen hemen tüm organların kapiller ve arteriol endotelinde mevcut olduğu gösterilmiştir. KRIT1'in serebral yapılardaki endotelial hücrelerdeki güçlü immunoreaktivitesine ilaveten, beyinde astrositler, piramidal nöronlar gibi bazı hücrelerde de eksprese edildiği gözlenmiştir. Denier ve arkadaşları tarafından KRIT1 mRNA ekspresyonu, embriyonik ve yetişkin dönemdeki fare dokularında in situ hibridizasyon tekniği kullanılarak araştırılmış ve embriyonik dönemde en yoğun KRIT1 ekspresyonunun 7 ve 9. günlerde nöronal tüpde ve intestinal sistemdeki epitelyal hücrelerde olduğu, yetişkin dönemde ise yoğun KRIT1 sinyalinin akciğerde, deride, pankreasda, dalakta ve beyinde olduğu gösterilmiştir (168). Bu çalışmaya ek olarak, Sawatzki-Kehrer ve arkadaşları, KRIT1'in işlevini anlamak amacıyla, KRIT1 ve Rap1A'nın ekspresyon paternini embriyonik ve yetişkin fare dokularında in situ hibridizasyon ve Northern blot teknikleriyle araştırmışlardır. Embriyonik dönemde yoğun KRIT1 ve Rap1A ekspresyonunun gelişmekte olan sinir hücrelerinde olduğu gösterilmiş, fakat diğer sistemlerde KRIT1 ve Rap1A ekspresyon düzeyleri arasında bir ilişki kurulamamıştır. Yetişkin fare dokusunda ise yoğun KRIT1 ekspresyonunun beyin, dalak, karaciğer, testis ve kalpde olduğu gösterilmiştir (169). Bu iki çalışmada da fare dokuları kullanılmasına rağmen, çalışmamıza benzer olarak KRIT1'in nöronal ve epitelyal sistemlerde lokalize olduğu bildirilmiş, fakat iki çalışmada da in situ hibridizasyon tekniğinin kullanılması nedeniyle, proteinin hücrel düzeyde lokalizasyonu konusunda net bir bilgiye ulaşamamıştır. Bu nedenle çalışmamız, insanda KRIT1'in astrosit, astrositik uzantılar, piramidal nöronlar, endotelial ve epitelyal hücrelerde eksprese olduğunu immunohistokimyasal teknikler ile gösteren ilk çalışma olması nedeni ile önemlidir.

Yetişkin insan dokularında KRIT1 ekspresyonu ilk olarak Eerola ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (118). Eerola ve arkadaşlarının çalışmasına ek olarak çalışmamızda ilk defa fetal dokularda KRIT1 ekspresyonu araştırıldı. Eerola ve arkadaşları beyin, akciğer, kas, timus, dalak, böbrek, karaciğer ve kalp gibi insan dokularında KRIT1 ekspresyonunu Northern blot tekniğiyle araştırmışlar ve KRIT1'in hemen hemen tüm insan dokularında farklı düzeylerde eksprese edildiğini, en yoğun KRIT1 sinyalinin ise beyin, kalp, böbrek, pankreas ve karaciğerde olduğunu göstermişlerdir (118). Çalışmamızda ise yetişkin insan dokularındaki KRIT1 ekspresyonu Western blot, fetal dokulardaki KRIT1 ekspresyonu ise RT-PCR tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Yetişkin insan dokuları içerisinde en yüksek KRIT1 ekspresyonu dalak, pankreas ve karaciğerde gözlenirken, kalp, böbrek ve beyinde ise KRIT1 ekspresyonunun daha az olduğu görülmüştür. Fetal dokular içerisinde ise, en yüksek KRIT1 ekspresyonu karaciğerde gözlenirken, dalak, timus, böbrek ve akciğerdeki KRIT1 ekspresyon düzeylerinin benzer oranda yüksek olduğu gözlenmiştir.

Hem bizim çalışmamızda hemde Eerola ve arkadaşlarının çalışmasında pankreas ve karaciğerde KRIT1 ekspresyonunun çok yüksek olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda kalp, beyin ve böbrekteki KRIT1 ekspresyonunun daha az gözlenmesinin nedeni her iki çalışmada da farklı tekniklerin kullanılmasından kaynaklanabilir çünkü Eerola ve arkadaşları KRIT1 ekspresyonunu mRNA düzeyinde Northern blot tekniği ile araştırırken, biz protein düzeyinde Western blot tekniği ile araştırdık. Her iki çalışmada da, KRIT1'in insanda oldukça geniş ekspresyon modeline sahip bir protein olduğu sadece beyin ve vasküler yapılar ile sınırlı olmadığı gösterilmiştir. KRIT1 mutasyonlarının beyin dışında deride, retinada, medulla spinalis ve vertebradaki vasküler bozukluklarda da gözlenmesi, KRIT1'in geniş ekspresyon modeline sahip bir protein olduğunu doğrulamaktadır (111, 116).

Beyin dışında diğer dokularda da lezyonların görülmesi, bazı paradoksların doğmasına neden olmuştur, çünkü KRIT1 ekspresyon dağılımına bakıldığında herhangi bir doku sınırlaması olmamasına rağmen, lezyonların neden daha sıklıkla beyinde gözleendiği sorusunu yanıtsız bırakmıştır. Eğer KRIT1 bütün dokuların vasküler yapılarında eksprese ediliyorsa, merkezi sinir sisteminde endotelial hücreler dışında vasküler defektin oluşumuna katkıda bulunan başka hücre tiplerinin de olması gerekmektedir. Beyinde SKM lezyonlarının oluşumuna katkıda bulunan hücre tiplerinin olup olmadığını, immunohistokimyasal yöntemleri kullanarak araştırdığımızda, endotelial hücreler dışında, astrositler, piramidal nöronlar ve astrosidik uzantılarda da KRIT1'in eksprese edildiği görüldü.

Beyinde özgül bir hücre grubunda, KRIT1 immunoreaktivitesinin gözlenmesi bu hücrelerin kaverno oluşumuna katkı sağlayıp sağlamadığı sorusunu akla getirmektedir. Bu soruyu yanıtlamak için serebral anjiogenezin detaylı incelenmesi gerekmektedir çünkü serebral anjiogenezin en erken dönemlerinde bile endotelial hücrelerin astrositler, perisitler gibi perivasküler hücreler ile ilişkiye girerek anjiogeneze katkıda bulunduğu gösterilmiştir (170, 171). Beyinde hücreler arasında gerçekleşen bu multisellüler ilişki sayesinde kan ve beyin arasında oldukça selektif bir bariyer oluşturularak, beyindeki fizyolojik denge korunmuş olur (31, 172). Astrositler beyin fonksiyonlarının yerine getirilmesinde aktif görev alan hücrelerdir ve bu etkiyi salgıladıkları nörotrofinler ve sitokinler ile gerçekleştirirken, astrositik uzantılar ile kan beyin bariyerinin regülasyonuna katılırlar (173). Astrositler ile endotelial hücrelerin birlikte kültüre edilmesine dayalı in vitro kültür sistemlerinde, astrositlerin endotelial hücre farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (174-176). Endotelial hücrelerin ve astrositlerin birbirleri ile bağlantı kurmasının kapiller benzeri yapıların oluşumu ve organizasyonu için gerekli olduğu, ayrıca astrositler tarafından salgılanan bir takım faktörlerin kapiller yapıların bütünlüğünün korunmasına yardımcı olduğu bildirilmiştir (177-179). Hem Clatterbuck ve arkadaşlarının hem de Wong ve arkadaşlarının yapmış oldukları elektron mikroskopik çalışmalarda, serebral kaverno hastalarda lezyon çevresinde normal beyin parenkim dokusunun olmadığı ve bu hastalarda astrositik uzantıların endotelial hücrelere kadar uzanamadığı gösterilmiştir (97, 98). Mevcut literatür bilgileri ile çalışmamız arasındaki bilgi bağlantısı kurulduğunda, aslında

hastalığın neden daha sıklıkla serebral yapılarda ortaya çıktığı sorusuna açıklık getirmektedir, çünkü astrositlerde ve astrositik uzantılarda KRIT1 ekspresyonunun yokluğu kan-beyin bariyerinin regülasyonunda bozulmaya yol açarak, lezyon oluşumuna katkıda bulunduğu düşüncesindeyiz.

SKM'lerin patofizyolojisinin aydınlatılmasında αv ve $\beta 8$ integrin knock out fareler model sistem olarak önerilmektedir, çünkü bu farelerde Serebral kavernoza benzer vasküler bozukluklar olduğu gösterilmiştir. McCharty ve arkadaşları oluşturdukları αv integrin knock out farelerin serebral damarlarında genişlemeler ve hemorajlar olduğunu ve bu farelerde hemorajların oluşumundan sorumlu hücresele olaylara detaylı bakıldığında defektin endotel hücrelerde, perisitlerde ve de endotel hücreleri çevreleyen nöronal hücreler arasında olabileceğini ileri sürmüşlerdir (180). Aynı çalışmaya benzer çalışmayı, Zhu ve arkadaşları $\beta 8$ integrin knock out farelerde göstermişlerdir (181). Hem $\beta 8$ hem de αv integrin knock out farelerin serebral hemorajdan dolayı erken embriyonik dönemde öldüğü görülmüştür. $\beta 8$ ve αv integrinin hemen hemen tüm dokularda vasküler yapılarda eksprese edilmesine rağmen, knock out farelerde gözlenen bu ağır fenotipin merkezi sinir sistemi ile sınırlı kalması ilginçtir. $\beta 8$ and αv integrin-null farelerde yapısal olarak normal endotel-perisit ilişkisi ve normal endotel-endotel bağlantılarının olmasına rağmen, serebral kavernoza benzer yapıda genişlemiş, vasküler kanalların olduğu görülmüştür (180, 181). İntegrin moleküllerindeki bozukluklarında kavernoza benzer lezyonlar oluşturması, KRIT1 ve integrin sinyali arasında bir bağlantının olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Serebral kavernoza benzer yapıda yoğunlukla merkezi sinir sisteminde görülmesi serebral yapıda özgül integrin ve KRIT1 ekspresyonu arasındaki bağlantı hipotezini güçlendirmektedir. Son çalışmalarla direkt yoldan olmasa bile KRIT1'in, ICAP1 α 'ya bağlanarak $\beta 1$ integrin aracılı sinyal yolunda yer aldığı gösterilmiştir (135, 154). Olgunlaşmamış plasenta dokusunda KRIT1 ve $\beta 1$ integrinin benzer hücrelerde lokalize olduğunu göstermemiz, $\beta 1$ integrin aracılı sinyal mekanizmasının, serebral kavernoza benzer malformasyonların oluşumuna katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır.

Serebral kavernoza benzer malformasyonların moleküler temeli ile ilgili bazı bilgiler elde edildikten sonra, çalışmalar, hastalığın oluşumundaki hücresele mekanizmaların ortaya çıkarılması ve bu mekanizmaları etkileyen diğer moleküller üzerine yoğunlaşmıştır. Şimdiye kadar, KRIT1'in hücresele işlevinin anlaşılması konusunda temel olan iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri, Zawistowski ve arkadaşları tarafından KRIT1 ile ICAP1 α ilişkisinin yeast two hybrid sistemi ve immunopresipitasyon teknikleriyle gösterilmesi (136), diğeri de Günel ve arkadaşları tarafından KRIT1'in endotel hücrelerde ifade edildiğinin ve mikrotübül ilişkili bir protein olduğunun immunofloresan ve immunopresipitasyon tekniğiyle gösterilmesidir (81). Zawistowski ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, KRIT1 proteininin N terminal bölgesindeki 272 aminoasidik bir bölge hedef olarak alınmış ve insan beyni, HeLa ve 293T cDNA'ları KRIT1 ile ilişkiye giren proteinler açısından tarandığında, KRIT1'in ICAP1 α ile ilişkiye girdiği gösterilmiştir (136). Bu çalışmada, KRIT1-

ICAP1 α ilişkisinin ICAP1 α 'nın β 1 integrinle olan ilişkisini baskıladığı, bu nedenle hücre adezyonunu ve ekstrasellüler matriks proteinleri ile olan ilişkisini etkilediği ileri sürülmüştür (136, 141). Hem Zawistowski ve arkadaşları hem de Günel ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalar, KRIT1 proteini hakkında önemli bilgiler vermesine rağmen, KRIT1'in anjiyogenik rolü konusunda bilgi vermede yetersiz kalmıştır. Serebral kavernoöz malformasyonlar, vasküler malformasyonlar içerisinde histopatolojik olarak kolaylıkla ayırt edilebilen oldukça özgün bir fenotipe sahiptir. Merkezi sinir sistemindeki mikrovasküler yapılarda bozuklukların oluşumu ile karakterize olan bu hastalıkta, KRIT1 proteininin vasküler yapıların gelişiminde ve/veya oluşumunda görev aldığı hipotezinden yola çıkarak, bu çalışmada *in vivo* ve *in vitro* anjiyogenik model sistemlerde normal damar gelişimi ve olgunlaşması süresince KRIT1 ekspresyonu araştırıldı.

Kültür kabını kaplayan (post-konfluent) endotelial hücreler belirli bir süre sonra, besi ortamında bulunan faktörler ve hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimine bağlı olarak kapiller benzeri yapılar oluşturmaya başlarlar ve bu kapillarizasyon ilerleyen günlere doğru artış gösterir. Bu kültür sisteminin, ucuz, daha az zahmetli ve immunositokimyasal veya immunofloresan tekniklerinin kolaylıkla uygulanabilir olması gibi avantajlarına karşın, kültür sisteminde endotelial hücrelerin sadece %20-30'unun kapillarizasyona katılması ve uzun süren kültürasyon süresinin endotelial hücre morfolojisini etkilemesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (182). Kültür kabını kaplayan endotelial hücrelerde kapiller benzeri yapıların oluşumu bir çok çalışmada gösterilmiştir. Çalışmamızda da bu sistemin avantajlarını ve dezavantajlarını göz önünde bulundurarak, immunofloresan tekniği ile kapillarizasyona bağlı olarak KRIT1 ekspresyonunun kapiller benzeri yapılarda arttığı gösterildi.

Endotelial hücre morfogenezinin ve kapiller benzeri yapıların oluşumunun incelenmesinde, 3 boyutlu kültür sistemleri en iyi *in vitro* anjiyogenik model sistemlerini oluşturmaktadır. Kollajen tip I veya fibrinden oluşan matriks, endotelial hücre farklılaşması için gerekli tüm moleküllere sahiptir (183, 184). 3-D kültür sistemleri gen ekspresyon analizinde daha çok tercih edilmektedir çünkü zengin matriks içeriği nedeniyle, kültür sistemindeki endotelial hücrelerin büyük çoğunluğu kapillarizasyona katılmaktadır (23, 185). Bizde çalışmamızda ilk olarak, post-konfluent endotelial hücrelerde immunofloresan tekniğine ilave olarak, 3 boyutlu kültür sistemleri oluşturduktan sonra, RNA ve protein düzeyinde KRIT1 ekspresyonunda bir değişim olup olmadığını RT-PCR ve Western blot teknikleri ile araştırdık ve kapiller benzeri yapıların oluşumuna bağlı olarak, KRIT1 ekspresyonunun hem RNA hemde protein düzeyinde arttığını gösterdik. Bu bilgiler bize, KRIT1 proteininin anjiyogenezin en erken evrelerinden olan kapillarizasyonda görevli bir protein olduğunu göstermiştir.

In vivo anjiyogenezin incelenmesinde kullanılan en yaygın model sistemlerinin başında *civciv allontois membranlar* (CAM), hayvanlarda deri altına disk implantasyonu, insan ve hayvan plasenta ve korpus luteumu gelmektedir (11). Bu model sistemlerin her biri farklı anjiyogenik çalışmalarda farklı anjiyogenik

mekanizmaların aydınlatılmasında kullanılmıştır. Biz de *in vitro* anjiogenik modellerde elde ettiğimiz verileri, *in vivo* modellerde de göstermek amacıyla bu model sistemlerden olan insan plasenta dokusunu kullandık. Plasenta dokusunda, KRIT1 proteininin ekspresyon modelini belirleyerek, anjiogenezis ve damar olgunlaşmasına bağlı olarak KRIT1 ekspresyonundaki değişimi immunohistokimyasal yöntemler yardımı ile araştırdık. Gebeliğin ilk dönemindeki (4-8. hafta) plasenta örneklerinde en yoğun KRIT1 immunoreaktivitesinin primitif anjiogenik hücre kordlarında, endotelial hücrelerde ve anjiogenezis için gerekli parakrin fonksiyonu sağlayan Hofbauer hücrelerinde olduğu görüldü. Gebeliğin ikinci ve üçüncü dönemindeki (17-30. hafta) plasenta örnekleri incelendiğinde ise, damar olgunlaşmasına bağlı olarak, KRIT1 immunoreaktivitesinin azaldığı, immunoreaktivitenin sadece mikrovasküler ve arteriyal endotelial hücrelerde olduğu gözlemlendi. Bu da bize, KRIT1'in, erken anjiogenezis süresince ekspre edilen, fakat ekspresyonu damar olgunlaşmasıyla kaybolan bir protein olduğunu göstermiştir.

Olgunlaşmamış plasenta dokusunda, KRIT1 ve $\beta 1$ integrinin ekstravillüs ve invazif sitotrofoblastlar, endotel ve Hofbauer hücreleri gibi benzer hücre tipinde birlikte eksprese olduğu görülmüştür. Villüs içerisinde, sitotrofoblastlar ve ekstravillüs kolonların proksimal hücreleri $\alpha 6\beta 4$ integrini eksprese ederken, distal kolundaki sitotrofoblast hücrelerin çoğunlukla $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ ve αv integrinleri eksprese ettikleri gösterilmiştir (186). KRIT1 ve $\beta 1$ integrinin birlikte lokalizasyonu, anjiogenezis süresince KRIT1'in integrin sinyal yolunda yer aldığını düşündürmektedir. Anjiogenezis süresince, integrinler hücre-hücre adezyonunda, hücre-ekstrasellüler matriks adezyonunda ve endotelial hücre migrasyonu ve invazyonunda önemli rol oynayan hücre yüzey reseptörleri olarak tanımlanmışlardır (187-189). Özellikle, $\alpha 1\beta 1$ ve $\alpha 2\beta 1$ integrin heterodimerlerinin endotelial hücrelerden salınan VEGF ile indüklendiği ve hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu başlatarak kapiller benzeri yapıların oluşumunu indüklediği gösterilmiştir (189, 190). Anjiogenezis süresince $\beta 1$ integrinin önemli hücrel olaylarda görev alması ve olgunlaşmamış plasenta dokusunda KRIT1 ve $\beta 1$ integrinin benzer anjiogenik hücrelerde lokalize olduğunu gözlenmesi, anjiogenik mekanizmalardaki bir defekt sonucu ortaya çıkan serebral kavernoöz malformasyonların oluşumunda $\beta 1$ integrin aracılı sinyal mekanizmalarının da direkt olmasa bile indirekt yoldan katkıda bulunabileceği görüşümüzü desteklemektedir.

Anjiogenezis birden çok hücrel mekanizmanın gerçekleştiği çok aşamalı bir olaydır. Anjiogenik olayların indüklenmesinde anjiogenik büyüme faktörleri ve ekstrasellüler matriks proteinleri oldukça önemli rol oynamaktadırlar (21, 191). Şimdiye kadar çalışılan ve en iyi bilinen anjiogenik faktörler arasında VEGF ve bFGF gelmektedir. Bu amaçla her iki büyüme faktörleriyle endotelial hücreler zaman ve doz bağımlı olarak indüklenmiş, fakat her iki büyüme faktörüne karşın, endotelial hücrelerde KRIT1 ekspresyonunda herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür. Buna karşılık, endotelial hücreler kollajen tip I veya fibronektin gibi ekstrasellüler matriksler ile kaplanmış kültür kaplarına ekildiğinde KRIT1 ekspresyonunda artış olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgularımız da bize KRIT1'in büyüme faktörleri aracılığıyla

regüle edilmezken, ekstrasellüler matriks proteinleriyle regüle edilen bir protein olduğunu göstermektedir.

Fosforilasyon ve defosforilasyon olayları hücrel fonksiyonların yerine getirilmesinde yer alan son derece önemli olaylardır. Hücreye gelen uyarılar hücre içerisinde bir takım sinyal yollarının aktivasyonuna veya inaktivasyonuna neden olur. Bu olayların gerçekleşmesi için bir takım proteinlerin fosforilasyonu veya defosforilasyonu gerekmektedir (143, 144). Bu amaçla bizde çalışmamızda, KRIT1 proteini ile ilişkili sinyal yollarını tanımlamada ilk adım olarak KRIT1 proteininin serin, trionin veya tirozin aminoasidleri üzerinden fosforile edilip edilemediğini immunopresipitasyon tekniği ile araştırdık. KRIT1 proteini serin veya trionin aminoasidleri üzerinden fosforillenmediğini, tirozin aminoasidi üzerinden fosforillendiğini gösterdik. KRIT1 proteinin yapısı dikkatlice incelendiğinde, tirozin aminoasidinden oldukça zengin olduğu ve potansiyel fosforilasyon alanının ise Asn-Pro-X-Tyr (NPXY domaini) dizileri olduğu düşünülmektedir. KRIT1 proteinin ICAP1 α gibi PTB domainine sahip proteinler ile ilişkiye girmesi, ilişki için KRIT1 fosforilasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir

Post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunun baskılanması, bugün moleküler biyolojinin en yeni ve en çok çalışılan konularının başında gelmektedir. Gen ekspresyonunun baskılanmasında antisense oligonükleotid, antikör kullanımı ve RNA interference (RNAi) gibi tekniklerden yararlanılmaktadır (192). siRNA tekniği, antisense oligonükleotid ve antikör kullanım tekniklerine göre çok daha özgül ve etkili bir teknik olarak tanımlanabilir, çünkü bu teknik ile istenilen düzeyde gen ekspresyonunda azalma gözlenmekte ve özgül olarak sadece ilgilenilen gen baskılanmaktadır (193). Çift iplikli RNA'lar ile gen ekspresyonunun baskılanması ilk olarak Fire ve Mello tarafından *C. elegans*da gösterilmiştir (194) Aynı mekanizma maya ve *Drosophila*da da çalışmasına rağmen, memeli sisteminde viral cevap oluşturması nedeniyle kullanılamamıştır. 2001 yılında Elbashir ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma ile 21 nükleotidlik çift iplikli RNA'ların (small RNA interference, siRNA) memeli sistemlerinde viral cevap oluşturmaksızın, özgül olarak gen ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (162). Memeli sistemlerinde siRNA gibi efektif bir teknik ile gen ekspresyonunun baskılanması, kanser gibi bir çok hastalıkta gen spesifik tedavilerin geliştirilmesine imkan tanımıştır (195). SKM lezyonlarına model oluşturmak amacıyla, *in vitro* endotelial hücrelerde KRIT1 ekspresyonunu baskılamak için memeli sistemlerinde etkili bir teknik olan siRNA tekniği kullanılmış ve KRIT1 ekspresyonunda mRNA düzeyinde ikinci günde, protein düzeyinde ise 5. günde azalma olduğu gözlenmiştir. RNA düzeyinde 48 saat sonra azalma gözlenirken, protein düzeyindeki azalmanın 5. günde gerçekleşmesi KRIT1 proteininin yarılanma ömrünün uzun olabileceğini gösterebilir

KRIT1, Rap1A'le olan ilişkisi nedeniyle bir tümör supresör gen olarak düşünülmüş ve bu ilişkide tuberin-Rap1A ilişkisi model olarak alınmıştır (196). Hücre içerisinde KRIT1 düzeyindeki azalmanın, Ras ve Rap1A arasındaki regülatör etkinin

ortadan kalkmasına ve Ras yolunun aktivasyonuna neden olduğu ve proliferasyondaki artışa bağlı olarak da kavernomların oluştuğu ileri sürülmüştür. KRIT1-Rap1A ilişkisi gözönüne alındığında, kavernomlarda yapılan bir çok çalışmada, endotelial hücrelerde proliferatif kapasitenin arttığı yönünde bilgiler bulunmaktadır (121). Sure ve arkadaşları SKM'lu hastalarda endotelial hücrelerin proliferasyon kapasitesini proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antikoru kullanarak immunohistokimyasal yöntemler ile belirlemişler ve çalışılan hasta dokularının %85'inde endotelial hücrelerde PCNA immunoreaktivitesinin pozitif olduğunu bildirmişlerdir (197). Bu çalışmada, PCNA'nın diğer bir proliferasyon markeri olan Ki67'ye oranla protein yarı ömrünün çok daha uzun olması ve PCNA'nın dinlenme halindeki tüm hücrelerde bulunmasına rağmen, Ki67'nin G0 fazındaki hücrelerde eksprese edilmediği bilgisi göz ardı edilmiştir (144). Aynı çalışma grubu kavernomlu hasta bireylerde yapmış oldukları bir başka çalışmada, 13 hastanın 11'inde endotelial hücrelerde PCNA immunoreaktivitesinin pozitif olduğunu, fakat hastaların hiç birinde Ki67 antikoru (MIB-1) ile immunoreaktivite gözlenmediğini bildirmişlerdir (198). Bu bilgiler de bize, kavernomlarda proliferatif kapasitenin düşünüldüğü gibi yüksek değil düşük olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada da, siRNA tekniği ile KRIT1 protein düzeyindeki azalmanın endotelial hücrelerde proliferasyon indeksinde azalmaya neden olduğunu gösterdik.

siRNA tekniği ile endotelial hücrelerde KRIT1 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak hücrelerde proliferasyon kapasitesinde azalma olduğu gözlendi. Proliferasyon indeksindeki bu azalmanın endotelial hücrelerde, apoptotik indeksin artmasından mı yoksa proliferatif mekanizmaların baskılanmasından mı kaynaklandığını araştırmak için, in vitro endotelial hücrelerde apoptozis indeksi TUNEL yöntemiyle incelendi ve KRIT1 ekspresyonunun baskılanmasına bağlı olarak hücrelerde apoptozisin arttığı gözlendi. İn vitro endotelial hücrelerden elde ettiğimiz bu sonuçları in vivo veriler ile teyid etmek amacıyla, SKM'lu hastaların parafin dokularında TUNEL yöntemi kullandığımızda lezyon içerisindeki endotelial hücrelerin ve lezyon çevresindeki hücrelerin apoptozize uğradığı görüldü. Elde ettiğimiz in vivo ve in vitro sonuçlarımız Takagi ve arkadaşlarının bulgularını desteklemektedir. Takagi ve arkadaşları, SKM'lu hastaların parafin dokularında apoptozisi göstermek için in situ end labeling (ISEL), Caspase-3 antikoru ile immunohistokimya ve DNA fragmentasyonu gibi tekniklerden yararlanmışlar ve çalışılan tüm dokularda apoptozisin bir belirteci olan DNA fragmentasyonunun olduğunu ve parafin dokularda ise ISEL-pozitif hücrelerin endotelium, subendotelium ve matris içerisinde dağıldığını gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, lezyonlarda Caspase-3 immunoreaktivitesinin ISEL pozitif hücre dağılımına benzer bir model gösterdiğini bildirmişlerdir (199). Sure ve arkadaşlarının SKM lezyonlarında proliferasyon indeksinin düşük olduğunu göstermeleri (198) ve Takagi ve arkadaşlarının da lezyonlarda endotelial apoptozisin olduğunu göstermeleri (199), bizim hem in vivo kavernomal lezyonlardaki endotelial hücrelerin apoptozize uğradığı sonucumuzu hem de in vitro KRIT1'in baskılanmasıyla endotelial hücrelerdeki artmış apoptozis bulgumuzu desteklemektedir.

Hücresel adezyon çoğunlukla ekstrasellüler matriks proteinleri ve integrinler aracılığıyla regüle edilen bir olaydır (200). SKM lezyonlarının histopatolojisi, genişlemiş tek katlı endotelial hücrelerde proliferasyondan ziyade endotelial hücre organizasyonunda ve/veya adezyonda bir defektin olduğunu düşündürmektedir. Bu amaçla, KRIT1 ekspresyonunun siRNA tekniğiyle baskılanmasına bağlı olarak endotelial hücrelerde adezyon kapasitesinde bir değişiklik olup olmadığını araştırdık ve KRIT1 ekspresyonundaki azalmanın hücre adezyon kapasitesinde azalmaya neden olduğunu gözlemledik. Degani ve arkadaşları tarafından yapılan in vitro çalışmada, ICAP1 α 'nin Cdc42 ve Rac1 ile ilişkiye girdiği ve ICAP1 α 'nin hücre adezyonu sırasında bu GTPaz'ların aktivasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (201) Clatterbuck ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise, SKM hasta dokuları elektron mikroskopik olarak incelendiğinde, endotelial hücreler arasında hücre-hücre adezyonunda görevli sıkı bağlantıların olmadığı, hücreler arasında mikron düzeyinde boşluklar olduğu bildirilmiştir (98). Clatterbuck ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmaya benzer olarak, bizde çalışmamızda KRIT1 ekspresyonu baskılanmış endotelial hücrelerin çok daha genişlemiş ve sıkı hücresel bağlantılarını kaybetmiş olduğunu bulduk. Mevcut literatür bilgileri ışığında ve SKM'lerinin patogenezi düşünüldüğünde, KRIT1 mutasyonlarına bağlı olarak hücre içerisinde protein düzeyindeki azalmanın, hücrede daha fazla serbest ICAP1 α oluşumuna neden olduğu ve ICAP1 α düzeyindeki bu artışın ise Cdc42 ve Rac1 aracılı gerçekleşen hücre adezyonunun inaktivasyonuna neden olabileceği görüşündeyiz.

In vitro endotelial hücrelerde KRIT1 ekspresyonunun baskılanması endotelial hücrelerde kapiller benzeri yapıların oluşumunu azalttığını gözlemledik. KRIT1 ekspresyonundaki azalma sonucu adezyon yeteneğini kaybeden endotelial hücrelerin birbirleriyle ve ekstrasellüler matriks proteinleriyle ilişkileri azalmakta, hücre-hücre, hücre-matriks arasındaki adezyonun azalması sonucu, hücreler hızla apoptozise gitmekte ve in vitro kapiller benzeri yapıları oluşturamamaktadır. Buda bize KRIT1'in baskılanmasının defektif bir anjiogenezis oluşturduğunu göstermektedir çünkü endotelial hücreler anjiogenezisin ilk basamaklarından olan kapillarizasyondaki problem yüzünden anjiogenezisi tamamlayamamaktadır. Çalışmamız, in vitro KRIT1 gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzeyde baskılandığını gösteren ilk çalışma olması nedeniyle önemlidir. In vitro olarak KRIT1 gen ekspresyonunu baskılanmasıyla hücresel mekanizmalardaki değişimi gösterdikden sonraki amacımız, in vivo siRNA tekniğiyle veya knock-out fareler oluşturarak KRIT1 aracılı sinyal yollarını tanımlamak ve hastalığın patogenezi tamamlamayı aydınlatmak, böylece hastalığın önlenmesine yönelik tedavi imkanları geliştirmektir.

SONUÇLAR

Bu tezde, KRIT1'in hücresel işlevinin anlaşılmasına yönelik elde ettiğimiz sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir:

- 1- KRIT1'in hemen hemen tüm fetal ve yetişkin dokularda farklı düzeylerde eksprese edildiği ve ilk olarak bu çalışmada KRIT1'in kan beyin bariyerini oluşturan astrosit, astrositik uzantılar ve endotelial hücrelerde ekspre edildiği gösterildi.
- 2- Araştırmada ilk olarak, KRIT1 proteininin in vitro ve in vivo anjiogenik modellerdeki ekspresyon profili ve KRIT1'in anjiogenik büyüme faktörleri ile regüle edilmediği, fakat endotelial hücrelerin ekstrasellüler matriks proteinlerine adezyonunun KRIT1 ekspresyonunu arttırdığı gösterildi.
- 3- Çalışmamızda ilk olarak KRIT1 ekspresyonu in vitro olarak baskılandı ve KRIT1 ekspresyonundaki bloklanmaya bağlı olarak hücre proliferasyonu azalırken, hücre ölümünün arttığı gözlemlendi.
- 4- KRIT1 ekspresyonundaki azalmanın endotelial hücrelerin adezyon yeteneklerini azalttığı ilk olarak gösterildi.
- 5- Serebral kavernomlu hastalara ait dokularda lezyon içerisinde endotelial hücrelerin apoptozise gittiği gösterildi.

KAYNAKLAR

- 1- Korkut Yaltkaya, Sevin Balkan, Yurttas Oğuz (1994) Nöroloji Ders Kitabı. Palme Yayıncılık, Ankara
- 2- Adams RD. (1989) Principles of Neurology. 4th edition, Mc Graw Hill, 617-693.
- 3- www.strokeassociation.org web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 4- Rigamonti D, Hsu FPK, Monsein LH. (1996) Cavernous malformations and related lesions. In Wilkins RH, Rengachary SS eds Neurosurgery Update II New York, McGraw hill 2503-2508.
- 5- Wilkins RH. (1985) Natural history of intracranial vascular malformations. Neurosurgery 16:421-430.
- 6- Laurans MS, DiLuna ML, Shin D, Niazi F, Voorhees JR, Nelson-Williams C, Johnson EW, Siegel AM, Steinberg GK, Berg MJ, Scott RM, Tedeschi G, Enevoldson IP, Anson J, Rouleau GA, Ogilvy C, Awad IA, Lifton RP, Gunel M (2003) Mutational analysis of 206 families with cavernous malformations. J Neurosurg 99(1):38-43.
- 7- Risau W, Flamme I. (1995) Vasculogenesis. Annu Rev Cell Dev Biol 11:73-91
- 8- Isner JM, Asahara T (1999) Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. J Clin Invest 103:1231-1236.
- 9- NIH ait <http://press2.nci.nih.gov/sciencebehind-angiogenesis-angio00.htm> web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 10- Rupp PA, Little CD (2001) Integrins in vascular development. Circ Res. 89(7):566-572.
- 11- <http://www.angiogenesis.org> sayfası kaynak olarak kullanılmıştır
- 12- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. (1995) 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):1024-1028.
- 13- Ferrara N (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. Kidney Int. 56(3):794-814.
- 14- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. Nat Med. 9(6):669-676.
- 15- Veikkola T, Alitalo K (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. Semin Cancer Biol. 9(3):211-220

- 16- Shing Y, Folkman J, Sullivan R, Butterfield C, Murray J, Klagsbrun M. (1984) Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* 223(4642):1296-1299.
- 17- Vlodavsky I, Bar-Shavit R, Ishai-Michaeli R, Bashkin P, Fuks Z. (1991) Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism. *Trends Biochem Sci* 16(7):268-271
- 18- Cross M.J, Claesson-Welsh L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22(4):201-207.
- 19- Bornstein P, Sage EH. (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14(5):608-616.
- 20- Brooke BS, Karnik SK, Li DY. (2003) Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol* 13(1):51-56.
- 21- van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. (2001) Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 936:426-437.
- 22- Kuzuya M, Satake S, Ramos MA, Kanda S, Koike T, Yoshino K, Ikeda S, Iguchi A. (1999) Induction of apoptotic cell death in vascular endothelial cells cultured in three-dimensional collagen lattice. *Exp Cell Res* 248(2):498-508.
- 23- Bell SE, Mavila A, Salazar R, Bayless KJ, Kanagala S, Maxwell SA, Davis GE. (2001) Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. *J Cell Sci* 114(15):2755-2773.
- 24- Sankar S, Mahooti-Brooks N, Bensen L, McCarthy TL, Centrella M, Madri JA. (1996) Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 97(6):1436-1446
- 25- Kuzuya M, Kinsella JL. (1994) Induction of endothelial cell differentiation in vitro by fibroblast-derived soluble factors. *Exp Cell Res* 215(2):310-318.
- 26- Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. (1999) Direct actions of angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest* 79(2):213-223.
- 27- Ulrich Drews (2000) *Renkli Embriyoloji Atlası* Ed. Yener Aytakin, Erdoğan Gürsoy, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul.
- 28- Charnock-Jones DS, Burton GJ. (2000) Placental vascular morphogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(6):953-968.

- 29- Kierszenbaum AL. (2002) *Histology and Cell Biology: an introduction to pathology* Mosby Press, Missouri
- 30- Brown RC, Davis TP. (2002) Calcium modulation of adherents and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke*. 33(6):1706-1711
- 31- Wolburg H, Lippoldt A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation *Vascul Pharmacol*. 38(6):323-337.
- 32- Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.
- 33- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999) Endothelial claudin: claudin-5/TM6CF constitutes tight junction strands in endothelial cells *J Cell Biol*. 147(1):185-94
- 34- Doğan Taner (1998) *Fonksiyonel nöroanatomi*. ODTU Geliştirme Vakfı, METU, Ankara
- 35- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. (1994) *Pathologic Basis of Disease* WB Saunders, Philadelphia. 1295-1350.
- 36- Broderick J, Brott T, Kothari R, Miller R, Khoury J, Pancioli A, Gebel J, Mills D, Minneci L, Shukla R. (1998) The Greater Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study: preliminary first-ever and total incidence rates of stroke among blacks. *Stroke*. 29(2):415-421.
- 37- Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB (2001) Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biol*. 20(5-6):327-335.
- 38- Olivecrona H, Ladenheim J. (1957) *Congenital Arteriovenous aneurysms of the caroid and vertebral artery systems*. Berlin, Springer-Verlag, 91.
- 39- Perl J, Ross, J. (1993) Diagnostic Imaging of Cavernous Malformations. In: Awad IA, Barrow, D., ed. *Cavernous Malformations*. Park Ridge: AANS, 37-48
- 40- Martin N, Vinters H. (1990) Pathology and grading of intracranial vascular malformations, in Barrow DL (ed): *Intracranial vascular malformations*. Park Ridge, IL, The American Association of Neurological Surgeons 1-30.
- 41- McCormick WF. (1984) Pathology of vascular malformations of the brain. In Wilson CB, Stein BM (ed). *Intracranial arteriovenous malformations*. Baltimore: Williams and Wilkins pg 44-63 .
- 42- McCormick WF. (1966) Pathology of vascular malformations. *J Neurosurgery*. 24:807-816.

- 43- De nova lesions in familial form of cerebral cavernous malformations: clinical and MR features in 29 non-Hispanic families. (2000) *Surg Neurol.* 53:475-483
- 44- Wilkins HW. (1993) Natural history of arteriovenous malformations: in intracranial vascular malformations ed by Barrow DL AANS publication 31-45.
- 45- Selman WR, Tarr RW, Ratcheson RA (1997) Intracranial arteriovenous malformations: Patient evaluation and considerations for treatment. In Batjler HH, Caplan KR, Friberg L, Philadelphia, NY: Lippincott-Raven 679-690.
- 46- Ojemann RG, Heros RC, Crowell RM. (1988) *Surgical Management of Cerebrovascular Disease.* Baltimore: Williams & Wilkins.
- 47- Vinuela F, Duckwiler G, Guglielmi G (1997) Principles of interventional neuroradiology In: batjler HH, Caplan LR, Friberg L, Greenlee RG, Kopitnik IA, Young WI eds. *Cerebrvascular disease* Phidelphia, NY, Lippincott-Raven publisher, 691-705 pg
- 48- Yasargil MG. *Microsurgery Cilt III B* (1988) Arteriovenous malformation of the brain: Clinical considerations, general and special operative techniques. New York, George Thime Verlag 419-434
- 49- Cunha E, Sa MJ, Stein Bmö Solomon Ra, McCormick PC. (1992) The treatment of associated intracranial aneurysms and AVM. *J Neurosurgey* 60:37-43.
- 50- McCormick WF, Boulter TR. (1966) Vascular malformations of the duramater. *J Neurosurgery* 25:309-311.
- 51- Barrow DL, Johnson DW. (1999) Historical Perspective and Classification of Spinal Vascular Malformations. In: Barrow DL, A. AI, eds. *Spinal Vascular Malformations* Park Ridge: AANS, 1-7.
- 52- Jellinger K. (1986) Vascular malformations of the central nervous system. *Neurosurgery Rev.* 9:177-216.
- 53- Perret G, Nishioka H. (1990) Arteriovenous malformations: An analysis of 545 cases of cranio-cerebral arteriovenous malformations and fistulae reported to cooperative study. *J Neurosurgey.* 25:467-490.
- 54- Kamiryo T, Nelson PK, Bose A, Zalzal P, Jafar JJ. (2000) Familial arteriovenous malformations in siblings. *Surg Neurol* 53:255-259.
- 55- Herzig R, Burval S, Vladyka V, et al (2000) Familial occurrence of cerebral arteriovenous malformation in sisters: case report and review of the literature. *Eur J Neurol* 7:95-100.
- 56- Amin-Hanjani S, Robertson R, Arginteanu MS, Scott RM (1998) Familial intracranial arteriovenous malformations. Case report and review of the literature. *Pediatr Neurosurg.* 29:208-213.

- 57- Rhoten RL, Comair YG, Shedid D, Chyatte D, Simonson MS. (1997) Specific repression of the preproendothelin-1 gene in intracranial arteriovenous malformations. *J Neurosurg.* 86(1):101-108.
- 58- <http://www.cincinnatihospital.com> web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 59- Breugem CC, Alders M, Salieb-Beugelaar GB, Mannens MM, Van der Horst CM, Hennekam RC. (2002) A locus for hereditary capillary malformations mapped on chromosome 5q. *Hum Genet.* 110(4):343-347.
- 60- Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. (1990) Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J. Invest. Dermatol.*, 95, 422-427.
- 61- Johnson DW, Berg JN, Gallione CI, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME. and Marchuk DA. (1995) A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res.*, 5, 21-28
- 62- Vincent P, Plauchu H, Hazan J, Faure S, Weissenbach J. and Godet J. (1995) A third locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12q. *Hum. Mol. Genet.*, 4, 945-949
- 63- Johnson DW, Berg JN, Baldwin MA, Gallione CI, Marondel I, Yoon SJ, Stenzel TT, Speer M, Pericak-Vance MA, Diamond A et al (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat. Genet.*, 13;189-195.
- 64- McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CI, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J et al. (1994) Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type I. *Nat. Genet.*, 8;345-351.
- 65- Gougos A, Letarte M. (1990) Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 265;8361-8364.
- 66- Attisano L, Carcamo J, Ventura F, Weis FM, Massague J, Wrana JL. (1993) Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, 75;671-680
- 67- Guttmacher AE, Marchuk DA, White RI Jr. (1995) Hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med.* 333(14):918-924.
- 68- Urness LD, Sorensen LK, Li DY. (2000) Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet.* 26(3):328-331
- 69- Jafar JJ, Awad IA, Rosenwasser RH. *Vascular malformations of the central nervous system.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999:xvii, 540.

- 70- Vikkula M, Boon LM, Carraway KL, et al. (1996) Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 87:1181-1190
- 71- Alexander E, Loeffler JS. (1992) Radiosurgery for intracranial vascular malformations: techniques, results, and complications. *Clinical Neurosurgery* 39:273-291.
- 72- Cirilillo SF, Dillon WP, Fink ME, Edwards MS. (1994) Progression of multiple cryptic vascular malformations associated with venous drainage. 81:477-481.
- 73- Rigamonti D, Drayer BP, Johnson PC, Hadley MN, Zabramski J, Spetzler RF (1987) The MRI appearance of cerebral vascular malformations. *J of Neurosurgery* 67:518-524.
- 74- Steinberg G, Marks M. (1993) Lesions mimicking cavernous malformations. In Awad I, Barro D ed *Cavernous Malformations*. Park Ridge:AANS, 151-162.
- 75- Robinson JR, Awad IA, Magdinec M, Paranandi L. Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain. (1993) *Neurosurgery* 2:730-5; discussion 735-736.
- 76- Kondziolka D, Lunsford DL, Kestle JRW. (1995) The natural history of cerebral cavernous malformations. *J Neurosurgery* 83:820-824.
- 77- Kraemer DL, Award IA (1994) Vascular malformations and epilepsy: clinical considerations and basic mechanisms. *Epilepsia* 35:S30-S40.
- 78- Chin D, Harper C. (1983) Angiographically occult cerebral vascular malformations with abnormal computed tomography. *Surg Neurol.* 20(2):138-142
- 79- Cohen HC, Tucker WS, Humphreys RP, Perrin RJ (1982) Angiographically cryptic histologically verified cerebrovascular malformations. *Neurosurgery* 10(6 Pt 1):704-714
- 80- El-Gohary EG, Tomita T, Gutierrez FA, McLone DG. (1987) Angiographically occult vascular malformations in childhood. *Neurosurgery* 20(5):759-766
- 81- Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP. (2002) KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 99, 10677-10682.
- 82- Robinson JR, Awad IA, Little JR. (1991) Natural history of the cavernous angioma. *J Neurosurg* 75:709-714.
- 83- Del Curling O, Kelly DL, Elster AD, Craven TE. (1991) An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *J Neurosurg* 75:702-708.

- 84- Berry R, Alpers B, White J. (1966) The site, structure and frequency of intracranial angiomas and arteriovenous malformations. In Millikian C ed Association for Research in Nervous and Mental Disease: Williams and Wilkins, 4-72
- 85- Otten P, Pizzolato, G.P., Riliet, B., Berney, J. (1989) 131 cases of cavernous angioma (cavernomas) of the CNS, discovered by retrospective analysis of 24,535 autopsies. *Neurochirurgie* 35:82-83.
- 86- Sage MR, Brophy, B.P., Sweeney, C., Phipps, S., Perrett, L.V., Sandhu, A., Albertyn, L.E. (1993) Cavernous haemangiomas (angiomas) of the brain: clinically significant lesions. *Australasian Radiology*. 37:147-155.
- 87- Hayman LA, Evans RA, Ferrell RE, Fahr LM, Ostrow P, Riccardi VM. (1982) Familial cavernous angiomas: natural history and genetic study over a 5- year period. *Am J Med Genet* 1982; 11:147-60.
- 88- Gunel M, Awad IA, Finberg K, et al (1996) A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med* 334:946-951
- 89- www.angiomaalliance.org web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 90- Requena I, Arias M, Lopez IL, Pereiro I, Barba A, Alonso A, Monton E. (1991) Cavernomas of the central nervous system: clinical and neuroimaging in 47 patients. *J Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*. 54:590-594.
- 91- Hsu F, Rigamonti D. (1993) Epidemiology of cavernous malformations. In Awad I, Barrows D ed Cavernous Malformations. Park Ridge:AANS, 13-23.
- 92- Lobato R, Perez C, Rivas J, Cordobes F. (1988) Clinical, radiological and pathological spectrum of intracranial vascular malformations. *J Neurosurgery* 68:518-531.
- 93- Simard Jm, Garcia BF, Ballinger Wj, Mickle JP, Quisling RG (1986) Cavernous angioma: a review of 126 collected and 12 new clinical cases. *Neurosurgery* 18:162-172.
- 94- Leszek W, Zimmer AM, Beck T, Hahn H, Bernal R, Rapp RR, Zimmer A. (1997) Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice p 293. *Nature Genetics* 16:293-297.
- 95- Wood NW, White RJ, Kernohan JW. (1957) Cavernous hemangioma of the cerebrum. *Br J Surg* 38:245-246.
- 96- Russell DS, Rubenstein, L.J. (1989) Pathology of Tumors of the Nervous system. Baltimore: Williams and Wilkins, 730-736.
- 97- Wong JH, Awad IA, Kim JH. (2000) Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. *Neurosurgery*. 46(6):1454-1459.

- 98- Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D. (2001) Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incomplete blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 71:188-192.
- 99- Notelet L, Chapon F, Khoury S, Vahedi K, Chodkiewicz JP, Courtheoux P, Iba-Zizen MT, Cabanis EA, Lechevalier B, Tournier-Lasserre E, Houtteville JP. (1997) Familial cavernous malformations in a large French kindred: mapping of the gene to the CCM1 locus on chromosome 7q. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 63(1): 40-45
- 100- Barrow D, Krisht A. (1993) Cavernous malformations and hemorrhage In: Awad IA BD, ed Cavernous Malformations. Park Ridge: AANS, 65-80.
- 101- Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP, Johnson PC, Hoenig-Rigamonti K, Knight JT, Spetzler RF (1988) Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence *N Engl J Med*. 319(6): 343-347.
- 102- Gunel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP. (1995) Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21 *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:6620-6624
- 103- Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, et al (1995) A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q *Hum Mol Genet* 4:453-458.
- 104- Johnson EW, Iyer LM, Rich SS, Orr HT, Gil-Nagel A, Kurth JH, Zabramski JM, Marchuk DA, Weissenbach J, Clericuzio CL, et al. (1995) Refined localization of the cerebral cavernous malformation gene (CCM1) to a 4-cM interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. *Genome Res*. 5(4):368-380.
- 105- Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM. et al (1998) Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet*, 7, 1851-1858.
- 106- Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. (1997) Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene*. 15(9):1043-1049.
- 107 Laberge-le Couteulx, X.S., Jung, H.H., Labauge, P., Houtteville, J.P., Lescoat, C., Celillon, M., Marechal, E., Joutel, A., Bach, J.F. and Tournier-Lasserre, E (1999) Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat. Genet.*, 23, 189-193.
- 108- Sahoo, T., Johnson, E.W., Thomas, J.W., Kuehl, P.M., Jones, T.L., Dokken, C.G., Touchman, J.W., Gallione, C.J., Lee-Lin, S.Q., Kosofsky, B. et al. (1999) Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations. *Hum. Mol. Genet.*, 8, 2325-2333.

- 109- Davenport WJ, Siegel AM, Dichgans J, et al. (2001) CCM1 gene mutations in families segregating cerebral cavernous malformations. *Neurology* 56:540-543.
- 110- Chen DH, Lipe HP, Qin Z, Bird TD. (2002) Cerebral cavernous malformation: novel mutation in a Chinese family and evidence for heterogeneity. *J Neurol Sci* 196:91-96.
- 111- Couteulx SL, Brezin AP, Fontaine B, Tournier-Lasserre E, Labauge P. (2002) A novel KRIT1/CCM1 truncating mutation in a patient with cerebral and retinal cavernous angiomas. *Arch Ophthalmol.* 120:217-218.
- 112- Lucas M, Solano F, Zayas MD, et al. (2000) Spanish families with cerebral cavernous angioma do not bear 742C-->T Hispanic American mutation of the KRIT1 gene. *Ann Neurol* 47:836.
- 113- Verlaan DJ, Davenport WJ, Stefan H, Sure U, Siegel AM, Rouleau GA. (2002) Cerebral cavernous malformations: mutations in Krit1. *Neurology* 58:853-857
- 114- Verlaan DJ, Siegel AM, Rouleau GA. (2002) Krit1 missense mutations lead to splicing errors in cerebral cavernous malformation. *Am J Hum Genet* 70:1564-1567
- 115- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Dietz HC. (2000) Mutations in KRIT1 in familial cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 46:1272-127.
- 116- Eerola I, Plate KH, Spiegel R, Boon LM, Mulliken JB, Vakkula M. (2000) KRIT1 is mutated in hyperkeratotic cutaneous capillary venous malformation associated with cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 9(9):1351-1355.
- 117- Marini V, Ferrara L, dorcaratto A, Viale G, Origone P, Mareni C, Garre C. (2003) Identification of a novel KRIT1 mutation in an Italian family with cerebral cavernous malformation by the protein truncated test. *J Neurol Sci* 212(1-2):75-78.
- 118- Eerola I, McIntyre B, Vakkula M. (2001) Identification of eight novel 5'-exons in cerebral capillary malformation gene-1 (CCM1) encoding KRIT1. *Biochim Biophys Acta* 1517:464-467.
- 119- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Dietz HC. (2000) Cloning of the murine KRIT1 cDNA reveals novel mammalian 5' coding exons. *Genomics* 70(3): 392-395.
- 120- Sahoo I, Goenaga-Diaz E, Serebriiskii IG, et al. (2001) Computational and Experimental Analyses Reveal Previously Undetected Coding Exons of the KRIT1 (CCM1) Gene. *Genomics* 71:123-126
- 121- Marchuk D, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. (2003) Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet* 12(1): R97-R112.
- 122- Tsukita S, Yonemura S, Tsukita S. (1997) ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci.* 22(2):53- 58.

- 123- Tsukita S, Yonemura S. (1997) ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction *Curr Opin Cell Biol.* 9(1):70-75.
- 124- Bretscher A, Edwards K, and Fehon RG. (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3, 586-599.
- 125- Gary R, Bretscher A. (1995) Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell*, 6, 1061-1075
- 126- Berryman M, Gary R, Bretscher A. (1995) Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J Cell Biol.*, 131, 1231-1242.
- 127- Bretscher A, Gary R, Berryman M. (1995) Soluble ezrin purified from placenta exists as stable monomers and elongated dimers with masked C-terminal ezrin-radixin-moesin association domains. *Biochemistry*, 34, 16830-16837.
- 128- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S. (1998) Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell. Biol.*, 140, 647-657.
- 129- Niggli V, Andreoli C, Roy C, Mangeat P. (1995) Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett*, 376, 172-176
- 130- Hirao M, Sato N, Kondo T, Yonemura S, Monden M, Sasaki T, Takai Y, and Tsukita S. (1996) Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J. Cell. Biol.*, 135, 37-51.
- 131- Sedgwick SG, Smerdon SJ. (1999) The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* 24(8):311-316.
- 132- Sakai T, Jove R, Fassler R, Mosher DF. (2001) Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(7):3808-13.
- 133- Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. (1999) Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIb beta3 signalling and platelet function. *Nature* 401(6755):808-811.
- 134- Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, Garcia-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B, McGlade CJ, Liddington RC, Ginsberg MH. (2003) Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2272-2277.

- 135- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC (2001) Interaction between *krit1* and *icap1alpha* infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet.* 10(25):2953-2960.
- 136- Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. (2002) KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 11(4):389-396.
- 137- Pizon V, Chardin P, Lerosey I, Olofsson B, Tavitian A. (1988) Human cDNAs *rap1* and *rap2* homologous to the *Drosophila* gene *Dras3* encode proteins closely related to *ras* in the 'effector' region. *Oncogene.* 3(2):201-204.
- 138- Kalatia RN. (2001) Advances in molecular genetics and pathology of cerebrovascular disorders. *Trends Neurosci.* 24(7):392-400.
- 139- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M. (1989) A *ras*-related gene with transformation suppressor activity. *Cell.* 1989 56(1):77-84.
- 140- Asha H, de Rooter ND, Wang MG, Hariharan IK (1999) The *Rap1* GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO J.* 18(3):605-615.
- 141- Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol.* 1997, 138(5):1149-1157.
- 142- Bouvard D, Vignoud L, Dupe-Manet S, Abed N, Fournier HN, Vincent-Monegat C, Retta SF, Fassler R, Block MR. (2003) Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 alpha. *J Biol Chem.* 278(8): 6567-6574
- 143- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (2000) *Molecular Cell Biology*, Fourth edition, WH Freeman and Company, New York.
- 144- Cooper GM. *The Cell* (1997) A Molecular Approach. ASM press, Washington DC.
- 145- Walczak CE. (2000) Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 12(1):52-6.
- 146- Gelfand VI, Bershadsky AD (1991) Microtubule dynamics: mechanism, regulation, and function. *Annu Rev Cell Biol.* 7:93-116
- 147- Juwana JP, Henderikx P, Mischo A, Wadle A, Fadle N, Gerlach K, Arends JW, Hoogenboom H, Pfreundschuh M, Renner C. (1999) EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *Int J Cancer.* 81(2):275-284.
- 148- Bu W, Su LK. (2001) Regulation of microtubule assembly by human EB1 family proteins. *Oncogene.* 20(25):3185-3192.

- 149- Bachrati CZ, Downes CS and Rasko I (1999) Chemical reverse transformation of CHO-K1 cells induces changes in expression of a candidate tumour suppressor and of a gene not previously characterised as transformation related. *Eur J Cell Biol.*, 78, 561-566.
- 150- Sebzda, E., Bracke, M., Tugal, T., Hogg, N. and Cantrell, D.A. (2002) Rap1A positively regulates T cells via integrin activation rather than inhibiting lymphocyte signaling. *Nat Immunol.*, 3, 251-258.
- 151- Wienecke R, Konig A, DeClue JE. (1995) Identification of tuberin, the tuberous sclerosis-2 product. Tuberin possesses specific Rap1GAP activity. *J Biol Chem.* 270(27):16409-16414
- 152- Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR. (1997) The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6(11):1991-1996.
- 153- Chang DD, Hoang BQ, Liu J. and Springer TA. (2002) Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. *J Biol. Chem.*, 277, 8140-8145.
- 154- Zhang XA. and Hemler ME. (1999) Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem.*, 274, 11-19.
- 155- Degani S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta SF, Silengo L, Eva, A. and Tarone G. (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J. Cell Biol.*, 156, 377-387.
- 156- Fournier, H.N., Dupe-Manet, S., Bouvard, D., Lacombe, M.L., Marie, C., Block, M.R. and Albiges-Rizo, C. (2002) Integrin cytoplasmic domain-associated protein Ialpha (ICAP-1alpha) interacts directly with the metastasis suppressor nm23-H2, and both proteins are targeted to newly formed cell adhesion sites upon integrin engagement. *J Biol. Chem.*, 277: 20895-20902
- 157- Bradford MM. (1975) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- 158- Roda A, Pasini P, Guardigli M, Baraldini M, Musiani M, Mirasoli M (2000) Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius J Anal Chem*, 366:752-759.
- 159- Haas TL, Davis SI, Madri JA (1998) Three dimensional type I collagen lattice induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MMP-1 ve MMP-2 in microvascular endothelial cells. *J Biol. Chem.* 273:3604-3610
- 160- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Currents Protocols in Molecular Biology*, section:10.6, Masachusetts.

- 161- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNA mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-498
- 162- Instruction Manual of Silencer siRNA Construction Kit, Ambion Company.
- 163- Gavioli Y et al (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119:493-501.
- 164- Labauge P, Brunereau L, Levy C, Laberge S, Houtteville JP. (2000) The natural history of familial cerebral cavernomas: a retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology.* 42(5):327-32
- 165- Marini V, Ferrera L, Dorcaratto A, Viale G, Origone P, Mareni C, Garre C. (2003) Identification of a novel KRIT1 mutation in an Italian family with cerebral cavernous malformation by the protein truncation test. *J Neurol Sci.* 212(1-2):75-78.
- 166- Reich P, Winkler J, Straube A, Steiger HJ, Peraud A (2003) Molecular genetic investigations in the CCM1 gene in sporadic cerebral cavernomas. *Neurology.* 60(7):1135-1138.
- 167- Clatterbuck, R.E., Cohen, B., Gailloud, P., Murphy, K. and Rigamonti, D. (2002) Vertebral hemangiomas associated with familial cerebral cavernous malformation: segmental disease expression. *J. Neurosurg.*, 97, 227-230.
- 168- Denier C, Gasc JM, Chapon F, Domenga V, Lescoat C, Joutel A, Tournier-Lasserre E (2002) KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 mRNA is preferentially expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult. *Mech Dev.* 117(1-2):363-367
- 169- Kehrer Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H. (2002) Mutation and expression analysis of the KRIT1 Gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathol (Berl).* 104(3):231-240.
- 170- Janzer RC, Raff MC. (1987) Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 1987 325(6101):253-257.
- 171- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. (2001) Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *409(6821):714-720.*
- 172- Rubin LL, Staddon JM (1999) The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 22:11-28.
- 173- Chow J, Ogunshola O, Fan SY, Li Y, Ment LR, Madri J. (2001) Astrocyte-derived VEGF mediates survival and tube stabilization of hypoxic brain microvascular endothelial cells in vitro. *Developmental Brain Research* 130:123-132.

- 174- Didier N, Romero IA, Creminon C, Wijkhuisen A, Grassi J, Mabondzo A. (2003) Secretion of interleukin-1beta by astrocytes mediates endothelin-1 and tumour necrosis factor-alpha effects on human brain microvascular endothelial cell permeability. *J Neurochem.* 86(1):246-254.
- 175- Zhang C, Harder DR. (2002) Cerebral capillary endothelial cell mitogenesis and morphogenesis induced by astrocytic epoxyeicosatrienoic Acid. *Stroke.* 33(12):2957-2964.
- 176- Beckner ME, Jagannathan S, Peterson VA. (2002) Extracellular Angio-Associated Migratory Cell Protein Plays a Positive Role in Angiogenesis and Is Regulated by Astrocytes in Coculture. *Microvascular Research* 63:259-269.
- 177- Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.* 16(10):1274-1276
- 178- Didier N, Banks WA, Creminon C, Dereuddre-Bosquet N, Mabondzo A. (2002) HIV-1-induced production of endothelin-1 in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Neuroreport.* 2002 Jul 2;13(9):1179-1183.
- 179- Abbruscato TJ, Davis IP. (1999) Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain Res* 842(2):277-286.
- 180- McCarty JH, Monahan-Earley RA, Brown LF, Keller M, Gerhardt H, Rubin K, Shani M, Dvorak HF, Wolburg H, Bader BL et al. (2002) Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking alphav integrins. *Mol Cell Biol.* 22, 7667-7677.
- 181- Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF. (2002) beta8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development.* 129, 2891-2903.
- 182- [www. Biocoatlab.com](http://www.Biocoatlab.com) web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 183- Ilan N, Mahooti S, Madri JA. (1998) Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J Cell Sci.* 111 (24):3621-31.
- 184- Papapetropoulos A, Cardena GG, Dengler TJ, Maisonpierre PC, Yancopoulos GD, Sessa WC. (1999) Direct actions of Angiopoietin-1 on human endothelium: evidence for network stabilization, cell survival, and interaction with other angiogenic growth factors. *Lab Invest.* 79:213-223.
- 185- Davis GE, Camarillo CW. (1995) Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. *Exp Cell Res* 216(1):113-23.

- 186- Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation. *Am J Pathol*.1991, 138(3):537-43
- 187- Davis GE, Camarillo CW. (1995) Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins, mechanical forces, and matrix guidance pathways. *Exp Cell Res* 216:113-123.
- 188- Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, et al. (1998) Integrin alphavbeta3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* 140:1255-1263
- 189- Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, et al. (2002) The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 160:195-204, 2002
- 190- Bloch W, Forsberg E, Lentini S, et al (1997) Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* 139:265-278
- 191- Bornstein P, Sage EH. (2002) Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14(5):608-616
- 192- Paddison PJ, Hannon GJ.(2002) RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell*. 2(1):17-23.
- 193- www.ambion.com web sayfası kaynak olarak kullanılmıştır.
- 194- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *C. Elegans*. *Nature* 391:806-811.
- 195- Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W (2001) Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(25):14428-14433.
- 196- Maheshwar MM, Cheadle JP, Jones AC, Myring J, Fryer AE, Harris PC, Sampson JR. (1997) The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet* 6(11):1991-1996.
- 197- Sure U, Butz N, Siegel AM, Mennel HD, Bien S, Bertalanffy H. (2001) Treatment-induced neoangiogenesis in cerebral arteriovenous malformations. *Clin Neurol Neurosurg*. 103(1):29-32
- 198- Sure U, Butz N, Schlegel J, Siegel AM, Wakat JP, Mennel HD, Bien S, Bertalanffy H. (2001) Endothelial proliferation, neoangiogenesis, and potential de novo generation of cerebrovascular malformations. *J Neurosurg* 94(6):972-977.
- 199- Takagi Y, Hattori I, Nozaki K, Ishikawa M, Hashimoto N. (2000) DNA fragmentation in central nervous system vascular malformations. *Acta Neurochir (Wien)* 142(9):987-994

200- Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbin J, Madri JA, Guan JL, Fu XY (2001) Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem.* 276(22):19512-19523.

201- Degani S, Balzac F, Brancaccio M, Guazzone S, Retta SF, Silengo L, Eva A, Tarone G. (2002) The integrin cytoplasmic domain-associated protein ICAP-1 binds and regulates Rho family GTPases during cell spreading. *J Cell Biol.* 156(2):377-387.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Karaman'da doğdu. 1980-1985 tarihleri arasında İlköğretimi Karalgazi ilköğretim okulunda, 1985-1988 tarihleri arasında Ortaöğrenimini Anafartalar Ortaokulunda ve Lise eğitimini ise 1988-1990 tarihleri arasında Karaman Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini, 1990-1994 yılları arasında İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünde tamamladı ve birincilikle mezun oldu. Yüksek Lisans Eğitimini 1995-1998 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında doktora programına başladı. Halen aynı bölümde Temel Genetik programında doktorasını yapmaktadır. 2000-2002 yılları arasında Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Reprodüktif Endokrinoloji bölümünde kısa süreli olarak çalıştı. 2002-2003 yılları arasında bütünleştirilmiş doktora programı kapsamında tezinin bir kısmını Yale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nörovasküler Cerrahi ve Genetik bölümünde tamamladı. Science Citation Index'e kayıtlı 5 makale ve çoğu uluslararası kongrelerde olmak üzere 30 kongre bildirisi bulunmaktadır. 1998'de NATO-ASI, Young Scientific Fellowship, 1999'da EMBO Short-term, Young Scientific Fellowship, 2001'de International Congress of Human Genetics, Young Scientific Fellowship ödüllerini kazandı. 2 Uluslararası ve bir Ulusal poster birincilik ödülü bulunmaktadır. 1995 yılından beri Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

EKLER

KRIT1/CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION 1 PROTEIN LOCALIZES TO VASCULAR ENDOTHELIUM, ASTROCYTES, AND PYRAMIDAL CELLS OF THE ADULT HUMAN CEREBRAL CORTEX

Ozlem Guzeloglu-Kayisli, M.Sc

Yale Neurovascular Surgery Program, Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, and Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey

Nduka M. Amankulor, B.A.

Yale Neurovascular Surgery Program, Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Jennifer Voorhees

Yale Neurovascular Surgery Program, Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Güven Luleci, Ph.D.

Department of Medical Biology and Genetics, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey

Richard P. Lifton, M.D., Ph.D.

Department of Genetics, Howard Hughes Medical Institute, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Murat Gunel, M.D.

Yale Neurovascular Surgery Program, Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Reprint requests:

Murat Gunel, M.D., Department of Neurosurgery, TMP 4, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06510
Email: murat.gunel@yale.edu

Received, May 21, 2003

Accepted, November 17, 2003

OBJECTIVE: Mutations in *KRIT1* cause familial cerebral cavernous malformation, an autosomal dominant disorder affecting primarily the central nervous system vasculature. Although recent studies have suggested that Krev-1 interaction trapped 1 (KRIT1) is a microtubule-associated protein that interacts with integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α , the function of KRIT1 remains elusive.

METHODS: We used Western blotting and immunohistochemistry with specific KRIT1 polyclonal antibodies to investigate KRIT1 protein expression in diverse cerebral and extracerebral tissues.

RESULTS: Immunostaining demonstrates that although KRIT1 is expressed in a broad variety of human organs, it localizes to the vascular endothelium of each, specifically to capillaries and arterioles. KRIT1 antibody fails to stain fenestrated capillaries in the kidney, the liver, or the red pulp of the spleen, where endothelial cells do not adhere to one another. In contrast, intense staining is observed in the thymus and the white pulp of the spleen, where specialized blood-organ barriers are formed. Other cell types, including various epithelia, cardiac myocytes, and hepatocytes, also stain with KRIT1.

CONCLUSION: Although KRIT1 expression is seen in every endothelium studied, cerebral cavernous malformation lesions are seen almost exclusively in the central nervous system, suggesting that additional cell type(s) contribute to the pathophysiology of cerebral cavernous malformations. Here, we demonstrate that KRIT1 is also present in cells and structures integral to the cerebral angiogenesis and formation of the blood-brain barrier, namely, endothelial cells and astrocytic foot processes, as well as pyramidal neurons in the cerebral cortex.

KEY WORDS: Astrocytes, Blood-brain barrier, Cerebral cavernous malformation, Endothelium, KRIT1

Neurosurgery 54:943-949, 2004

DOI: 10.1227/01.NEU.0000114512.59624.A5

www.neurosurgery-online.com

Cerebral cavernous malformation (CCM) is a disease of the central nervous system (CNS) vasculature causing signs and symptoms that include headache, seizures, focal neurological deficits, and, rarely, frank hemorrhage. Histopathology of these lesions demonstrates malformed endothelial cells within capillary beds that appear as "caverns," without intervening smooth muscle, and lacking normal neural parenchyma (21). Ultrastructural analysis suggests that the blood vessels of these lesions are devoid of the junctions typical of the blood-brain

barrier (BBB) in the intracerebral vasculature (6, 27). Symptoms are believed to be the result of chronic hemorrhage caused by incompetent capillaries. Lesions are typically confined to the CNS, although in rare cases they have been identified in the skin and retina (4, 5, 7).

Genetic studies of familial CCM have revealed that mutations at three different loci (*CCM1* on 7q, *CCM2* on 7p, and *CCM3* on 3q) can cause CCM (8). Further studies identified the *CCM1* gene on 7q21 as Krev-1 interaction trapped 1 (KRIT1) (2, 4, 7, 9, 11, 16, 17, 22, 24, 25, 30). As the name suggests, KRIT1 was

initially identified because of an interaction with Krev-1/Rap1A, a 21 kDa guanosine triphosphatase with significant homology to the Ras family (14, 23). Recent investigations aimed at understanding the function of KRIT1 protein have demonstrated that it encodes a microtubule-associated protein (2) that also interacts with integrin cytoplasmic domain-associated protein-1a (ICAP-1a) (28, 29), whereas the interaction with Krev-1/Rap1A has been questioned (28).

These data fail to provide a mechanism to explain CCM pathogenesis (18) or the existence of lesions predominantly within the intracranial vasculature. The specific, tissue-wide expression pattern of the KRIT1 protein is unknown, leaving open the question of which cell type(s) contribute to the observed pathology. We now report the localization of KRIT1 in human adult tissue; we demonstrate that KRIT1 is expressed in diverse capillary and arterial endothelial cells and localizes to structures important in cerebral angiogenesis that form the BBB.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Collection and Preparation

Human adult tissues were obtained from the Department of Pathology, Yale University School of Medicine (Human Investigation Committee Protocol No. 7680). Each tissue was divided into sections for analysis by Western blotting and immunohistochemistry. Protein extraction was performed immediately after tissue collection by use of T-PER tissue protein extraction reagent (Pierce, Rockford, IL) supplemented with a protease inhibitor cocktail; tissue to be used for immunohistochemical analysis was fixed overnight in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, cut to a thickness of 5 to 7 μm , and mounted on poly-L-lysine-coated slides.

Antibody Characterization

Affinity-purified antibodies specific for KRIT1 by Western blotting, immunohistochemistry, and immunoprecipitation were prepared and characterized as previously described (12). Two antibodies were raised against different epitopes of the KRIT1 protein. Serum 1 is directed against amino acid residues 724 to 736, which constitute the C-terminus of the protein (GGGKLNQQLMATERNS); serum 2 is directed against amino acid residues 259 to 275 (DYSKIQIPKQEKWQRS). The two antibodies gave indistinguishable localization of KRIT1. Mouse anti-human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) primary antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) and anti-mouse IgG were used for visualization of KRIT1 and GAPDH signals on Western blot (Vector Laboratories, Burlingame, CA), and biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody was used to visualize KRIT1 signal on immunohistochemistry (Vector Laboratories).

Western Blot Analysis

Protein concentration was determined by a detergent-compatible protein assay (Pierce). For sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 20- μg protein samples were fractionated by electrophoresis on a 7.5% Tris-HCl acrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Blots were blocked in 5% nonfat dried milk in phosphate-buffered saline with 0.05% Tween-20, incubated with primary antibody followed by horseradish peroxidase goat anti-rabbit secondary antibody, and visualized by chemiluminescence (20). Membranes were subsequently stripped and reprobed with mouse anti-human GAPDH antibody to confirm that equal amounts of protein were loaded.

Immunohistochemistry

Tissue sections were deparaffinized and rehydrated in an alcohol gradient before analysis by a standard streptavidin-biotin technique. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H_2O_2 . Slides were blocked with 5% normal goat serum, incubated overnight with human polyclonal rabbit anti-KRIT1 antibody at 4°C, and incubated for 30 minutes at 25°C with secondary biotinylated goat anti-rabbit IgG. Slides were incubated with the streptavidin-peroxidase complex by use of the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories). Chromogenic reactions were completed with 3-amino-9-ethylcarbazole to yield a positive red stain or 3,3'-diaminobenzidine to yield a positive brown stain (Vector Laboratories). Slides were counterstained with hematoxylin before mounting and visualization by light microscopy. All immunostaining with anti-KRIT1 antibody was competed with a twofold molar excess of the immunizing peptide. Subsequent incubation with secondary antibody and evaluation as above yielded no signal.

RESULTS

KRIT1 Expression in Human Tissue

We investigated KRIT1 protein expression in adult human tissues by probing a Western blot of various human protein lysates with specific polyclonal KRIT1 antibodies (12). KRIT1 was expressed in all tissues studied, including the heart, brain, kidney, liver, pancreas, and spleen (Fig. 1).

KRIT1 Is Expressed by Endothelial Cells

We next determined the distribution of KRIT1 protein within adult human tissue by immunohistochemical staining of paraffin-embedded sections using a previously characterized specific polyclonal antibody (12); see Materials and Methods. Specificity of staining was demonstrated by competition with a twofold molar excess of the immunizing peptide (data not shown).

KRIT1 was present within the vascular structures of every organ studied, staining the endothelial cell cytoplasm (Fig. 2). Specifically, in each organ, KRIT1 was expressed primarily by

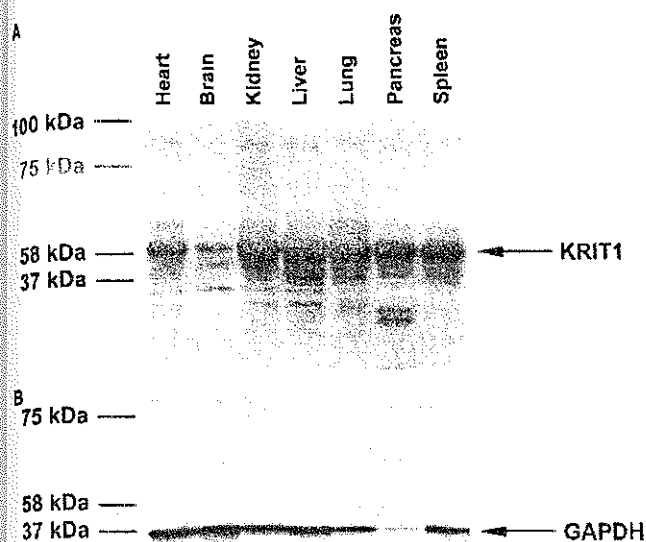


FIGURE 1. KRIT1 is expressed in diverse human tissues. Expression of KRIT1 protein in human tissue was evaluated by Western blot probed with antibodies specific for KRIT1 (from, Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP: KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10677-10682, 2002 [12]). Equal amounts of protein were loaded in each lane, and blots were probed for KRIT1 (A), stripped, and then probed for GAPDH (B). A protein the size of KRIT1 (58 kDa) is expressed strongly in kidney, liver, and lung; moderately in pancreas, spleen, and heart; and weakly in brain.

endothelial cells in small vessels, including capillary beds and arterioles, and is rarely observed in veins. KRIT1 markedly stained the endothelium within organs with an extensive vascular supply, such as brain (Fig 2).

In the heart, intense staining for KRIT1 was observed in arteries, whereas expression in veins was absent (Fig 2, A-D). In the skin, the subdermal vascular structures also stained with KRIT1 antibodies (Fig 2E). The same staining pattern was also seen in the thymus, where the endothelium stained and the muscular layer lacked expression of KRIT1 (Fig 2, F and G). In skeletal muscle, whereas myocytes expressed KRIT1 weakly, the microvasculature and arterioles expressed the protein in abundance (Fig 2, H and I).

Staining of the cerebrovasculature indicated that endothelial cells of capillary beds and arterioles expressed the KRIT1 protein more intensely than their venous counterparts (Fig 2, K and L). In microvessels and arterioles, endothelium was stained (Fig 2, J and L), whereas the smooth muscle cells were not (Fig 2, J and L). Most interestingly, KRIT1 was expressed by cellular foot processes surrounding the adventitia of brain vessels (Fig 2, K and L, and see below).

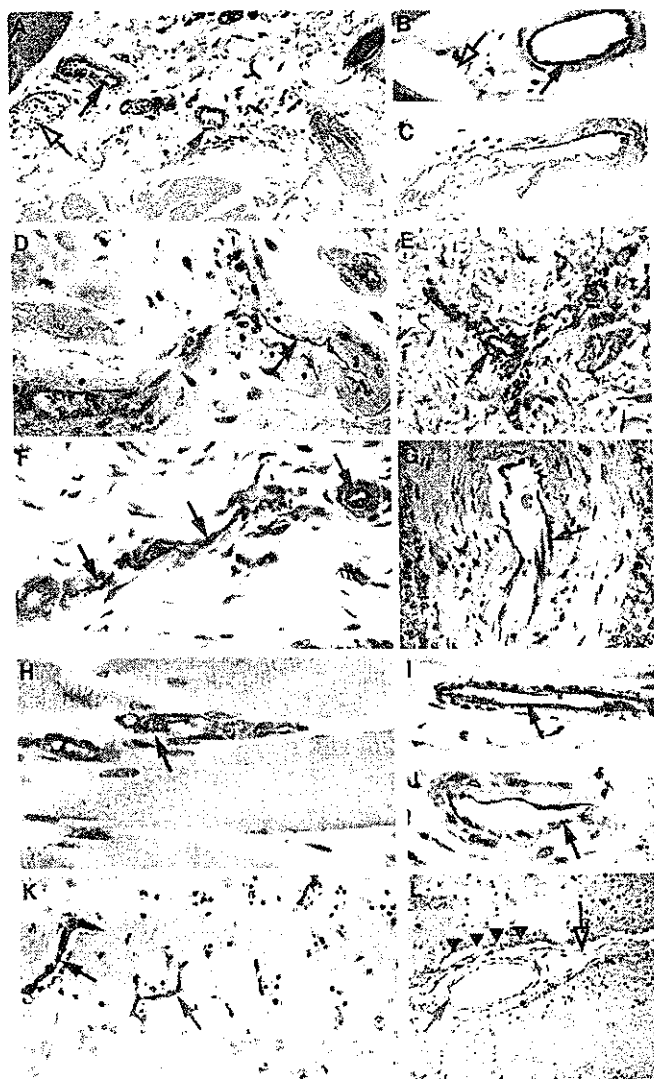
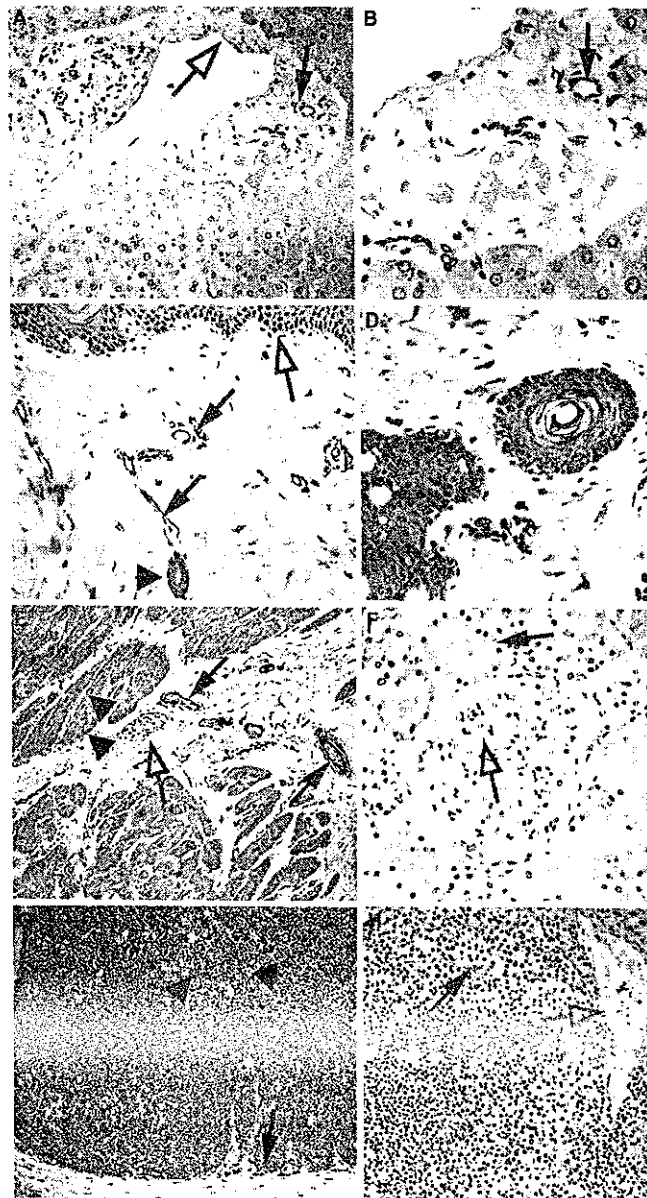


FIGURE 2. KRIT1 localizes to vascular endothelium of various organs. Paraffin sections of human tissue were stained with anti-KRIT1 antibody (brown); sections were counterstained slightly with hematoxylin. A, in heart arterial endothelium, antibodies to KRIT1 yield an intense positive signal (solid arrows), whereas the corresponding vein lacks signal altogether (open arrow). B to D, higher magnification of cardiac vasculature showing that, as is seen in A, venous structures do not express KRIT1 in the endothelial cells, whereas the endothelial cells of small arteries express KRIT1. E to J, endothelial cells stain for KRIT1 (solid arrows) in skin vessels (E), thymus (F and G), and skeletal muscle (H and I). Within arterial structures, KRIT1 does not stain tunica media, where smooth muscle cells are located (G and J). K, lower magnification of a section of brain gray matter shows strong KRIT1 expression in the capillary endothelium (solid arrows) along with a subset of other cells. L, KRIT1 expression is also seen within the intima (solid arrow) of small arteries in the brain as well as the astrocytic foot processes (arrowheads) in contact with these vessels. Venous endothelium stains minimally with KRIT1 (open arrow) (original magnification: A, $\times 20$; B-D, $\times 60$; E, $\times 40$; F, $\times 80$; G, $\times 60$; H, $\times 80$; I and J, $\times 60$; K, $\times 40$; L, $\times 20$).

FIGURE 3 KRIT1 localizes to various epithelia in extracerebral tissues. Paraffin sections of human tissue were stained with anti-KRIT1 antibody (brown). **A**, KRIT1 is present in bile duct epithelium (arrowhead) and endothelial cells of the hepatic artery (solid arrow) but hepatic vein endothelium (open arrow) is not stained. The hepatocytes also showed weak staining for KRIT1. **B**, higher magnification of the portal triad showing the KRIT1 staining in the bile duct epithelium (arrowhead) and endothelial cells of the hepatic artery (solid arrow). **C**, endothelial cells of arterioles and capillaries (solid arrows) in the subpapillary plexus of the dermis stain positively for KRIT1, as do hair follicles (arrowhead). Weak staining is also observed in the stratum basale (open arrow). **D**, higher magnification of a hair follicle showing strong staining for KRIT1 in the epithelium. **E**, cardiac myocytes (arrowheads) and the arterial endothelium (solid arrow) stain for KRIT1 but their venous counterparts do not (open arrow). **F**, the leaky endothelial and podocyte processes in the kidney glomerulus (open arrow) do not stain for KRIT1. However, the epithelium of the proximal convoluted tubule stains weakly for KRIT1 (solid arrow). **G**, the epithelium of the cortex (arrow) in the thymus and the capillary endothelium (arrowheads) express KRIT1. However, the epithelium of the spleen (solid arrow) did not. **H**, the venous endothelium (open arrow) expresses KRIT1 (original magnification: **A**, $\times 40$; **B**, $\times 60$; **C**, $\times 40$; **D**, $\times 60$; **E** and **F**, $\times 40$; **G**, $\times 10$; **H**, $\times 20$).



3C). Epithelial cells of sweat glands, the ducts of these glands, and hair follicles also expressed KRIT1 (Fig 3D). The epidermis, which lacks a significant vascular supply, did not express KRIT1, except for weak expression within the stratum basale. This cuboidal layer of cells lies at the junction between the dermis and epidermis and is joined to the basement membrane by hemidesmosomes (Fig 3C). Cardiac myocytes also weakly expressed KRIT1 (Fig 3E). In the kidney (Fig 3F), the glomerular capsule did not express KRIT1 in either the endothelial cells or the podocyte foot processes. The epithelial cells of the proximal convoluted tubules surrounding the glomerulus expressed KRIT1.

Blood vessels in the thymus parenchyma have a sheath of reticuloepithelial cells external to the basal lamina of their endothelium, establishing the blood-thymus barrier. These vessels showed intense staining for KRIT1 (Fig 3G). In the spleen (Fig 3H), KRIT1 staining was seen within the closed circulation, in which arterial vessels connect directly to spleen sinusoids. In contrast, in open circulation, which is characterized by blood vessels opening directly into the red pulp spaces, with blood flowing freely through these spaces, no KRIT1 staining was seen.

KRIT1 Staining in Extracerebral Tissues

In addition to the staining of endothelium, we observed KRIT1 expression in select cell types and various epithelia. In the liver (Fig 3, A and B), KRIT1 staining was absent in the portal vein but present in arteriolar branches of the hepatic artery that ran through the portal tract. Also, the protein was expressed weakly by the fenestrated capillaries of hepatic sinusoids within the liver parenchyma. Interestingly, KRIT1 staining was also seen in the bile duct epithelium and weakly in hepatocytes (Fig 3B).

In the skin, endothelial cells of arterioles and capillaries in the dermis stained for KRIT1, a most striking finding among the small vessels that compose the subpapillary plexus (Fig

3C). Epithelial cells of sweat glands, the ducts of these glands, and hair follicles also expressed KRIT1 (Fig 3D). The epidermis, which lacks a significant vascular supply, did not express KRIT1, except for weak expression within the stratum basale. This cuboidal layer of cells lies at the junction between the dermis and epidermis and is joined to the basement membrane by hemidesmosomes (Fig 3C). Cardiac myocytes also weakly expressed KRIT1 (Fig 3E). In the kidney (Fig 3F), the glomerular capsule did not express KRIT1 in either the endothelial cells or the podocyte foot processes. The epithelial cells of the proximal convoluted tubules surrounding the glomerulus expressed KRIT1.

KRIT1 Localizes to Astrocytic Foot Processes in the Brain

In the brain, as noted above (Fig 2L), cellular processes surrounding the adventitia of brain vessels also stained for KRIT1. These structures are the foot process of astrocytes, important for the formation of the BBB (Figs 2L and 4). Examination of brain sections reveals that specific KRIT1 staining was confined to a subset of astrocytes that send foot processes to microvessels (Fig 4, b and c).

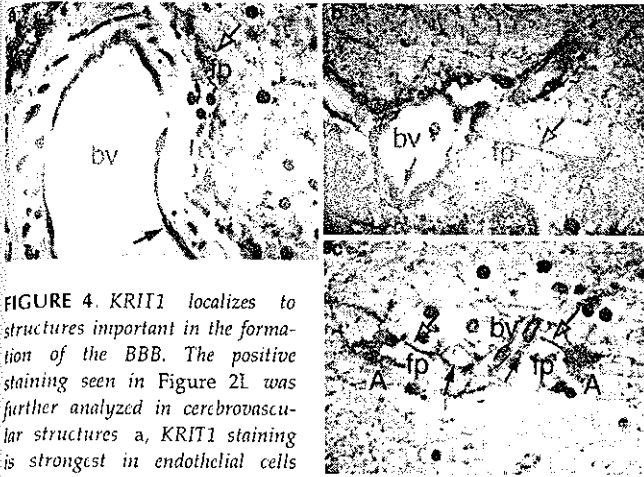


FIGURE 4. KRIT1 localizes to structures important in the formation of the BBB. The positive staining seen in Figure 2I was further analyzed in cerebrovascular structures a, KRIT1 staining is strongest in endothelial cells within the intima of microvessels (solid arrow) and astrocyte foot processes in contact with this vessel (open arrow) b and c, KRIT1 staining is seen in endothelial cells lining the cerebral microvasculature (solid arrows), perivascular astrocytes and astrocytic foot processes (open arrows), which form the brain-blood barrier bv, blood vessel; A, astrocyte; fp, foot process (original magnification: a-c $\times 80$)

Neuronal KRIT1 Staining

In addition to a subgroup of astrocytes, KRIT1 specifically stained a subset of neuronal cells in the cerebral cortex (Fig 5, A and B). KRIT1 was found in large pyramidal neurons, particularly those in layers 3 and 5. The pyramidal neuron is the principal cell type in the mammalian brain; its function is poorly understood, but it is thought to play an important role in communicating function through long tracts (26).

DISCUSSION

Despite its identification as a gene causing CCM, little is known about the function of KRIT1. We have shown that although KRIT1 is expressed in most human organs, this expression is not ubiquitous. Instead, KRIT1 localizes specifically to the vascular endothelium of virtually every tissue. The protein is also seen in several other cell types, including various epithelia as well as astrocytes and pyramidal cells of the cerebral cortex. Although these results are consistent with previous reports of the distribution of KRIT1 messenger ribonucleic acid in embryonic and adult mouse tissues (10, 13), this is the first report that localizes KRIT1 specifically to structures important in the formation of the BBB.

Despite KRIT1 expression in endothelium of many organs, CCM lesions are observed primarily in the CNS. This apparent paradox suggests that the lesions of CCM are not attributable simply to an endothelial defect and that contributions from additional cell types are likely. A potential clue to the identity of these cell types may be found in our results that show KRIT1 expression specifically in astrocytes whose foot processes invest in intracranial vessels; these foot processes are a major component of the BBB.



FIGURE 5. Immunolocalization of KRIT1 in the cerebral cortex. Paraffin sections of human cerebral cortex were stained with anti-KRIT1 antibodies (red). KRIT1 protein is present not only in astrocytes but also in large pyramidal neurons (A), which are most commonly located in cortex layers 3 and 5. B, higher magnification of these neurons reveals cytoplasmic KRIT1 staining (original magnification: A, $\times 40$; B, $\times 100$)

The mammalian BBB is a unique feature of the cerebral vasculature and is a complex capillary endothelial system that provides a tight diffusion barrier between the vasculature and the brain parenchyma (26). Anatomic examination of the BBB reveals vascular junctions known as tight junctions and adherens junctions on the endothelial cells that are in close proximity to astrocytes, pericytes, and the basal lamina. Although many of the factors responsible for formation of the BBB remain unknown, it is clear that the migration of astrocytes and the subsequent formation of astrocytic foot processes to contact endothelial cells are essential for this process.

In this regard, it is noteworthy that CCM lesions show an absence of tight junctions at endothelial cell interfaces and also lack investment with pericytes and astrocytic foot processes (6, 27). These observations suggest that reduced or absent KRIT1 expression in astrocytes may contribute to loss of the normal BBB and results in the porous lesions seen in CCM. This possibility could be tested directly by selective knockout of KRIT1 in astrocytes in animal models.

Our results and observations suggest that KRIT1 may play a role in intercellular communication between endothelial cells and brain parenchymal components such as astrocytes. Recent experiments involving the *in vivo* manipulation of molecules mediating signaling between the brain microvasculature and the brain parenchyma support such a model of

CCM pathogenesis Targeted disruption of murine $\beta 8$ (31) and αv integrins (19) results in embryonic lethality or prenatal death caused by cerebral hemorrhage The severe phenotype seen with these knockouts is CNS-specific despite widespread expression of these two proteins in other endothelia Moreover the resulting lesions show dilated and leaky vascular channels that are similar to the abnormalities observed in CCM, although these $\beta 8$ - and αv -null lesions display ultrastructurally normal endothelium-pericyte associations and normal interendothelial cell junctions (19, 31) These observations raise the question of whether there is a link between KRIT1 and integrin signaling Furthermore, the CNS specificity of these phenotypes suggests that integrin specificity may be responsible for the specific CNS localization of CCMs

Recent experimental data do indirectly support KRIT1 involvement in integrin signaling KRIT1 has recently been shown to bind ICAP1 α , a negative regulator of $\beta 1$ integrin-mediated adhesion (1) Ostensibly, ICAP1 α interacts with NPXY domains located on $\beta 1$ integrin and KRIT1 (3, 28, 29) There is evidence to suggest that KRIT1 and $\beta 1$ integrin compete for ICAP1 α and that the specific ICAP1 α bound state with $\beta 1$ integrin might modulate the ability of $\beta 1$ integrin to signal downstream (28, 29) Although these data suggest a link between integrin and KRIT1 signaling, specific experiments showing that KRIT1 affects integrin signaling have not yet been performed

Examination of CCM lesions reveals abnormal cell-cell interactions in addition to abnormal endothelial cell-parenchyma interactions Although signaling through integrins could explain interactions between endothelial cells, other mechanisms responsible for such interactions could be affected by KRIT1 One such alternative mechanism for KRIT1 function involves other cellular junctions, such as the adherens junction It is important to note that Krev-1/rap1A, a small guanosine triphosphatase that was used in a two-hybrid screen to identify KRIT1 (23), was recently found to regulate the adherens junction (15) If KRIT1 does indeed interact with Krev-1/rap1A, it is reasonable to hypothesize that KRIT1 might also be involved in Krev-1/rap1A-mediated regulation of the adherens junction

CONCLUSIONS

Whatever the specific mechanisms, it is becoming clear that KRIT1 has a role in mediating cellular responses to cell adhesion processes In this article, we show that KRIT1 localizes to areas that are important for the formation of cell adhesion complexes and that it might be important for regulating interactions between brain parenchyma and endothelial cells What is certain is that loss of KRIT1 disrupts the communication between endothelial cells and matrix in brain parenchyma and cerebral endothelium, leading to defective angiogenesis These findings position KRIT1 at the nexus of CNS angiogenic signaling and the formation and maintenance of the BBB

REFERENCES

- Bouvard D, Vignoud L, Dupe-Manet S, Abed N, Fournier HN, Vincent-Monegat C, Retta SF, Fassler R, Block MR: Disruption of focal adhesions by integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 α *J Biol Chem* 278:6567-6574 2003
- Cave-Riant F, Dunier C, Labauge P, Cecillon M, Maciazek J, Joutel A, Liberge-Le Couteux S, Tournier-Lasserre E: Spectrum and expression analysis of KRIT1 mutations in 121 consecutive and unrelated patients with cerebral cavernous malformations. *Eur J Hum Genet* 10:733-740, 2002
- Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J: ICAP-1, a novel $\beta 1$ integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of $\beta 1$ integrin *J Cell Biol* 138:1149-1157, 1997
- Chen DH, Lipe HP, Qin Z, Bird TD: Cerebral cavernous malformation: Novel mutation in a Chinese family and evidence for heterogeneity *J Neurol Sci* 196:91-96, 2002
- Clatterbuck RE, Cohen B, Gailloud P, Murphy K, Rigamonti D: Vertebral hemangiomas associated with familial cerebral cavernous malformation: Segmental disease expression—Case report *J Neurosurg* 97:227-230, 2002
- Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D: Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:188-192, 2001
- Couteux SL, Brezin AP, Fontaine B, Tournier-Lasserre E, Labauge P: A novel KRIT1/CCM1 truncating mutation in a patient with cerebral and retinal cavernous angiomas *Arch Ophthalmol* 120:217-218, 2002
- Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CTC, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP: Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke cerebral cavernous malformation at 7p15-13 and 3q25.2-27 *Hum Mol Genet* 7:1851-1858, 1998
- Davenport WJ, Siegel AM, Dichgans J, Drigo P, Mammi I, Pereda P, Wood NW, Rouleau GA: CCM1 gene mutations in families segregating cerebral cavernous malformations *Neurology* 56:540-543, 2001
- Denier C, Gasc JM, Chapon F, Domenga V, Lescoat C, Joutel A, Tournier-Lasserre E: Krit1/cerebral cavernous malformation 1 mRNA is preferentially expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult *Mech Dev* 117:363-367, 2002
- Eerola I, Plate KH, Spiegel R, Boon LM, Mulliken JB, Vakkula M: KRIT1 is mutated in hyperkeratotic cutaneous capillary-venous malformation associated with cerebral capillary malformation *Hum Mol Genet* 9:1351-1355, 2000
- Gund M, Liaras MS, Shin D, DiLuna ML, Voerhes I, Choate K, Nelson-Dunn CE, Durrant DJ, Kessler JL, Kessler JL, Kessler JL: Cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10677-10682, 2002
- Kehrer-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, Richter HP, Hameister H: Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1) *Acta Neuropathol (Berl)* 104:231-240, 2002
- Kitayama H, Sugimoto Y, Matsuzaki T, Ikawa Y, Noda M: A ras-related gene with transformation suppressor activity *Cell* 56:77-84, 1989
- Knox AL, Brown NH: Rap1 GTPase regulation of adherens junction positioning and cell adhesion *Science* 295:1285-1288, 2002
- Laberge-Le Couteux S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E: Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas *Nat Genet* 23:189-193, 1999
- Lucas M, Solano F, Zayas M D, Garcia-Moreno JM, Gamero MA, Costa AF, Izquierdo G: Spanish families with cerebral cavernous angioma do not bear 742C \rightarrow T Hispanic American mutation of the KRIT1 gene *Ann Neurol* 47:836, 2000 (letter)
- Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS: Vascular morphogenesis: Tales of two syndromes. *Hum Mol Genet* 12:R97-R112, 2003
- McCarty JH, Monahan-Earley RA, Brown LF, Keller M, Gerhardt H, Rubin K, Shani M, Dvorak HF, Wolburg H, Bader BL, Dvorak AM, Hynes RO: Defective associations between blood vessels and brain parenchyma lead to cerebral hemorrhage in mice lacking αv integrins. *Mol Cell Biol* 22:7667-7677, 2002

10. Roda A, Pasini P, Guardigli M, Baraldini M, Musiani M, Mirasoli M: Bio- and chemiluminescence in bioanalysis. *Fresenius J Anal Chem* 366:752-759, 2000.
11. Russell DS, Rubenstein LJ: *Pathology of Tumors of the Nervous System*. Baltimore. Williams & Wilkins, 1989 pp 730-736
12. Sahoo T, Johnson EW, Thomas JW, Kuehl PM, Jones JL, Dokken CG, Touchman JW, Gallione CJ, Lee-Lin SQ, Kosofsky B, Kurth JH, Louis DN, Mettler C, Monjeon L, Gil-Nigel A, Rich SS, Zabramski JM, Bergsaki MS, Green ED, Marchuk DA: Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet* 8:2325-2333, 1999
13. Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA: Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* 15:1043-1049, 1997
14. Verlaan DJ, Davenport WJ, Stefan H, Sure U, Siegel AM, Rouleau GA: Cerebral cavernous malformations: Mutations in Krit1. *Neurology* 58:853-857, 2002.
15. Verlaan DJ, Siegel AM, Rouleau GA: Krit1 missense mutations lead to splicing errors in cerebral cavernous malformation. *Am J Hum Genet* 70:1564-1567, 2002
16. Wolburg H, Lippoldt A: Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation. *Vasc Pharmacol* 38:323-337, 2002
17. Wong JH, Awad IA, Kim JH: Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: A preliminary report. *Neurosurgery* 46:1454-1459, 2000
18. Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA: KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: A new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389-396, 2002
19. Zhang J, Clatterback RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC: Interaction between krit1 and icap1 α infers perturbation of integrin β 1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953-2960, 2001
20. Zhang J, Clatterback RE, Rigamonti D, Dietz HC: Mutations in KRIT1 in familial cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 46:1272-1279, 2000
21. Zhu J, Motejlek K, Wang D, Zang K, Schmidt A, Reichardt LF: β 8 integrins are required for vascular morphogenesis in mouse embryos. *Development* 129:2891-2903, 2002

Acknowledgments

We thank Maxwell Laurans, M.D., Michael DiLuna, M.D. (Yale University Department of Neurosurgery), Matthew State, M.D., Ph.D. (Yale University Department of Pathology and Genetics), Long Kim, M.D. (Yale University, Department of Pathology), and Umit A. Kayisli, Ph.D. and Necdet Demir, Ph.D. (Department of Histology and Embryology, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey) for helpful discussions. We also thank Ozgun Gokce for technical support. This work was supported by the National Institutes of Health (Grant R01-NS36194-05 to RPL). RPL is an investigator of the Howard Hughes Medical Institution. This study is part of OG-K's Ph.D. thesis.

COMMENTS

In this article, the authors describe the cellular distribution of Krev-1 interaction trapped 1 (KRIT1) using immunohistochemistry. Mutations affecting this gene product are associated with the development of cerebral cavernous malformations (CCMs). This study shows that KRIT1 is distributed in the endothelial cells of most human organs, with the exceptions being those areas in which the endothelial cells are only loosely connected. In the brain, there is striking localization to capillary and arteriolar endothelium and astrocytic foot processes, areas associated with blood-brain barrier (BBB) structure. The implications of this localization as well as the other

chemical associations of KRIT1 strongly suggest an important role in intercellular communication and adherence. The implications for mechanisms of development of the hemorrhages associated with CCMs, then, are obvious. There are clearly other factors that allow the development of CCMs, and the hope is that these factors will be investigated. The presence of KRIT1 in pyramidal cells is intriguing and presumably has some relation to pathfinding of cell adhesion. This excellent article again demonstrates the importance of understanding the cell biological bases for neurological disease.

Charles J. Hodge, Jr.
Syracuse, New York

Guzeloglu-Kayisli et al report the localization of KRIT1 in human adult tissue. They demonstrate that KRIT1 is expressed in diverse capillary and arterial endothelial cells and localizes to structures that are important in cerebral angiogenesis and form the BBB. This report includes important information about KRIT1. This report is the first in which KRIT1 has been found to localize specifically to structures important in the formation of BBB.

Yasushi Takagi
Nobuo Hashimoto
Kyoto, Japan

Guzeloglu-Kayisli et al present their ongoing work to elucidate the pathophysiological mechanisms by which KRIT1 depletion is responsible for the formation of CCMs. In this article, they show, for the first time, KRIT1 cellular localization in a wide variety of human tissues. Most important, they show that in the brain, KRIT1 localizes not only to endothelial cells but also to astrocytic foot processes. This fact has led the authors to hypothesize that KRIT1 may be critical in establishing a competent BBB. Previous support for this contention includes the fact that CCM lesions show an absence of tight junctions at endothelial cell interfaces, that CCM-like lesions result from germline deletion of specific integrins, and that KRIT1 may play a significant role in integrin signaling. Furthermore, KRIT1 may play an important role, through Krev-1-*rap1A* interaction, in the development and/or maintenance of the adherens junction, another important component of the BBB. Together, these data begin to suggest that the absence of KRIT1 in certain families with CCM may predispose them to isolated, "leaky" lesions of the BBB devoid of intervening brain parenchyma. This lack of intervening parenchyma might be partially explained not only by the identification of KRIT1 in astrocytes but also in certain large pyramidal neurons, as the authors demonstrate here. Much additional work clearly is required to complete the story, but the effort and focus of this group inspires confidence that an answer is forthcoming.

E. Sander Connolly, Jr.
New York, New York

Krev1 Interaction Trapped-1/Cerebral Cavernous Malformation-1 protein expression during early angiogenesis

OZLEM GUZELOGLU-KAYISLI, M.S., UMIT A. KAYISLI, PH.D., NDUKA M. AMANKULOR, B.A., JENNIFER R. VOORHEES, OZGUN GOKCE, MICHAEL L. DILUNA, M.D., MAXWELL S. H. LAURANS, M.D., GUVEN LULECI, PH.D., AND MURAT GUNEL, M.D.

Yale Neurovascular Surgery Program and Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut; and Department of Medical Biology and Genetics and Department of Histology and Embryology, Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey

Object Molecular genetic studies of cerebral cavernous malformation (CCM) have identified three loci (CCM1-3) that can lead to CCM when mutated. Examination of the *CCM1* locus established *KRIT1* (*Krev1 Interaction Trapped gene 1*) as the *CCM1* gene. Despite the identification of *KRIT1* as the gene mutated in *CCM1*, little has been learned regarding its function. The authors recently demonstrated specific *KRIT1* expression in endothelial cells. Based on this result and the fact that the CCM phenotype features defects in microvasculature, we hypothesized that *KRIT1* may take an active part in normal angiogenesis.

Methods In this study, the authors investigated the spatial and temporal expression of *KRIT1* during normal vessel development and maturation by examining *KRIT1* protein in both in vitro and in vivo angiogenic systems with the use of postconfluent endothelial cell cultures along with placental tissues from different developmental stages.

Conclusions The results demonstrate that *KRIT1* is expressed during capillary-like tube formation in the early stages of angiogenesis in vitro. Histological examination of placental tissue, a well-established in vivo model of angiogenesis, shows *KRIT1* expression in active angiogenic and vasculogenic areas of the immature placental villi. As the placenta matures, *KRIT1* expression is restricted to microvascular and small arterial endothelial cells with little or no expression seen in the intima of large vessels. It can therefore be concluded that *KRIT1* is expressed during early angiogenesis by endothelial cells and may play a key role in vessel formation and/or development.

KEY WORDS • cavernous angioma • cerebral cavernous malformation • *KRIT1* • angiogenesis

CEREBRAL cavernous malformation is a vascular disorder of the CNS typically defined by grossly dilated vascular channels lined by only a single layer of endothelium without normal vessel wall elements such as smooth muscle or intervening neural parenchyma.^{1,19,21}

Since its initial description, CCM has been recognized to be a heritable vascular disorder with an autosomal-dominant inheritance pattern.^{15,16,20} Multilocus genome wide analysis on these *CCM* families have ultimately identified the loci (*CCM1* on 7q, *CCM2* on 7p, and *CCM3* on 3q) that, when mutated, lead to CCM.⁶ Subsequent positional cloning experiments identified one of the genes

located in the *CCM1* region. *KRIT1*, as the *CCM1* gene,^{4,5,7,17,18,22,26,29} The *KRIT1* gene was initially identified and cloned in a yeast two-hybrid screen by using Krev1 (Rap1a) as bait.²³ Recent studies aimed at understanding the function of the *KRIT1* protein have demonstrated that it encodes a microtubule-associated protein¹² and that it also interacts with ICAP-1 α .^{27,28} These data place *KRIT1* at the cross-roads of signaling between the cytoskeleton and the ECM, potentially mediating the complex interaction between the extracellular and intracellular milieu.

Our recent immunohistochemical results demonstrate that *KRIT1* specifically localizes to the vascular endothelium of a variety of human organs, specifically to capillaries and arterioles.¹³ Furthermore, we demonstrate that *KRIT1* is present in cells and structures integral to cerebral angiogenesis and the formation of the blood-brain barrier, namely endothelial cells and astrocytic foot processes. These findings suggest that *KRIT1* may be important in CNS angiogenesis and may mediate the communication between cerebral microvessels and CNS

Abbreviations used in this paper: CCM = cerebral cavernous malformation; CNS = central nervous system; DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole; ECM = extracellular matrix; ICAP = integrin cytoplasmic domain-associated protein; IgG = immunoglobulin G; *KRIT1* = Krev1 Interaction Trapped 1; PBS = phosphate-buffered saline.

parenchymal cells. To further investigate these findings and to understand the potential role of KRIT1 in angiogenesis, we examined the expression of KRIT1 in well-established *in vitro* and *in vivo* models of angiogenesis.

Previous studies have established the placenta as an ideal *in vivo* model with which to study angiogenic mechanisms. During placental development, there are two processes involved in blood vessel formation. The first process, vasculogenesis, occurs when a primitive vascular network is constructed from pluripotent mesenchymal progenitors *in vivo*. Angiogenesis, which follows vasculogenesis, is characterized by capillary sprouts arising from preexisting vasculogenic centers. Endothelial cells play a dynamic role in both angiogenesis and vasculogenesis. Differentiation of multipotential mesenchymal cells, migration and proliferation of endothelial cells, and formation of cell-cell connections are the most important steps for successful vasculogenesis.¹⁴ Thereafter, the vessel structure is transformed into mature vasculature through angiogenic remodeling.²⁵ Placental development begins at the time of implantation when the trophoblastic layer of the blastocyst wall proliferates and differentiates into an outer multinucleated layer (the syncytiotrophoblast) and an underlying population of uninucleate progenitor cytotrophoblast cells. Tongues of trophoblast penetrate the maternal endometrium, and acquire a mesodermal core.¹ Hemangioblastic cells, the endothelial progenitor cells, are first recognizable within these mesodermal cores as clusters or cords of closely approximated cells. Throughout the first trimester, the placental capillary endothelial cells are of the continuous nonfenestrated type and are joined by tight junctions. Toward the end of gestation, capillaries are referred to as sinusoids.

We hypothesized that KRIT1 plays a specific role in endothelial cell-cell interactions or endothelial cell-ECM interactions during early stages of angiogenesis and takes an active part in normal vascular development and formation of vascular networks.

Materials and Methods

Cell Culture

Bovine aortic endothelial cells (BioWhittaker Walkersville MD) were cultured in high glucose Dulbecco modified Eagle medium (Gibco BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 mM HEPES, 10 mM sodium pyruvate, and 1% antibiotics/antimycotics, and were allowed to replicate to confluence.

Antibodies Reagents and Chemicals

Affinity-purified KRIT1-specific antibodies were prepared and characterized as previously described.¹² Two antibodies were raised against two different epitopes of the KRIT1 protein. Sera 1 detects amino acid residues 724-736, which constitute the COOH terminus of the protein (GGGKLNQQLMATERNRS); sera 2 binds to amino acid residues 259-275 (DYSKIQIPKQEKWQRS). Anti-human CD31 (PECAM) and anti-human β 1 integrin antibodies were purchased from Novacastra (Newcastle, UK) and Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), respectively. Other antibodies including biotinylated horse anti-mouse IgG and biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), Cy2-conjugated affinity-pure donkey anti-mouse IgG, and Cy3-conjugated affinity-pure donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) were used as secondary antibodies.

Tissue Collection

Human placental tissues at various developmental stages (first, second, and third trimester) were collected from clinically and physiologically healthy pregnant women. Pregnancy ages of placental samples used in this study were calculated from the 1st day of the last menstrual period. Informed consent was received from each patient before placental samples were obtained at Akdeniz University School of Medicine, Antalya, Turkey. All samples were identified by number and in no case was the identification of the patient possible. The tissues were fixed in Bouin fixative and embedded in paraffin for immunohistochemical analysis. Embedded tissues were cut 5 to 7 μ m thick and mounted on gelatin-coated slides.

Immunofluorescence Staining of Endothelial Cells

Bovine aortic endothelial cells plated on microscope slides were grown 5, 6, and 10 days past confluence. At appropriate time points, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.2% Triton X-100 in PBS. The slides were blocked with 10% normal donkey serum in PBS for 1 hour at room temperature, washed, and then incubated with polyclonal rabbit anti-KRIT1 for 1 hour at room temperature. Following additional washing steps, the slides were incubated with Cy3-conjugated affinity-pure donkey anti-rabbit IgG for KRIT1 and then stained with DAPI. For actin staining, cells were incubated with 1 μ mol Phalloidin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) conjugated to rhodamine.

Immunohistochemical Analysis

Sections were deparaffinized and rehydrated in an alcohol gradient. For the detection of KRIT1, CD31, and β 1 integrin expression, immunohistochemistry was performed using a standardized method based on the streptavidin-biotin technique as follows: sections were rinsed with PBS for 10 minutes. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in 3% H₂O₂ for 20 minutes followed by another PBS wash. To augment antigen exposure, slides were placed in 10 mmol citrate buffer in a microwave oven for 10 minutes. Thereafter sections were incubated with 5% normal goat serum and 5% normal horse serum followed by incubation with polyclonal rabbit anti-KRIT1, monoclonal mouse anti-CD31, or monoclonal mouse anti- β 1 integrin antibodies overnight in a cold room. Normal rabbit IgG and normal mouse IgG isotypes were applied as negative controls in place of primary antibodies. After several rinses in PBS, biotinylated goat anti-rabbit IgG and biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Inc.) were applied for 30 minutes. Following several PBS rinses, slides were incubated with streptavidin-peroxidase complex for the appropriate time by using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories, Inc.). Subsequently the chromogenic reaction was performed with 3-amino-9-ethyl carbazole (Vector Laboratories, Inc.) and the reaction was terminated by washing the slides in tap water. Slides were counterstained slightly with hematoxylin prior to permanent mounting and then evaluated under a light microscope.

Results

Expression of KRIT1 on Capillary-Like Tubes Formed by Endothelial Cells in an *In Vitro* Angiogenesis System

To investigate whether KRIT1 is involved in endothelial cell-cell interactions leading to capillary tube formation, a crucial step in early angiogenesis, KRIT1 expression was examined in postconfluent bovine aortic endothelial cell cultures. After these cells reach confluence they start to form tube or channel-like structures *in vitro*, which grossly resemble capillaries formed by endothelial cells *in vivo*. These channels, which form as early as 5 days after plating, appear as a layer on top of the confluent cells and increase in complexity over time (Fig. 1). We found that KRIT1 is expressed in these capillary-like tubes, suggesting that

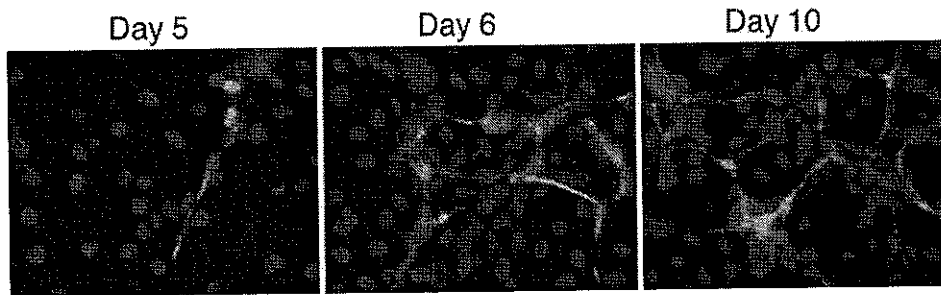


FIG 1 Photomicrographs showing capillary-like tube formation by endothelial cells. Endothelial cells cultured on microscope slides were grown 5, 6, and 10 days past confluence. Capillary-like tubes start to form at Day 5 after cells reach confluence. The branching and organization of the tubes becomes more complex with time and by Day 10, the cells form distinct, highly intricate capillary-like tubes. Green-KRIT1 and Blue-DAPI, original magnification $\times 40$.

KRIT1 function might be involved in forming and/or stabilizing these tubes.

Expression of KRIT1 During Early Angiogenesis in Placenta

A well-known angiogenic tissue, placenta was used as an *in situ* system to confirm the results obtained with the *in vitro* angiogenesis system. Authors of studies have established placenta as a useful model to study angiogenesis.⁹ We immunostained samples of first trimester placenta with KRIT1 antibody to determine its expression pattern during early placental development (Fig. 2). Within the villi, the most striking staining pattern for KRIT1 was seen in areas of active angiogenesis, including vascular structures of different villous types, Hofbauer cells, angiogenic cell cords, and cells presumed to be differentiating endothelial cells forming microtubular networks (Fig. 2). These cells were confirmed to be of endothelial origin with the use of anti-mouse CD31 antibody (data not shown); however, multipotential mesenchymal progenitor cells showed weaker or no staining in the same villous when compared with these cells (Fig. 2).

The specificity of the staining was confirmed by appropriate controls including twofold peptide competition and secondary antibody alone, which revealed no staining (data not shown).

Expression of KRIT1 by the Invasive Cell Column of the Early Placenta

We then used costaining with $\beta 1$ integrin antibody to demonstrate potential colocalization between KRIT1 and $\beta 1$ integrin. Authors of previous studies showed KRIT1 binding to ICAP-1 α , a modulator of $\beta 1$ integrin-mediated signal transduction.^{27,28} Serial sectioning for immunohistochemical analyses revealed that KRIT1 and $\beta 1$ integrin have a very similar staining pattern and appear to colocalize to the same cell types. Both proteins are expressed mainly in endothelial cells and villous cytotrophoblasts (Fig. 3), which are known to have strong cell-cell interactions and more adhesive cells. In marked contrast, no staining was seen within the syncytiotrophoblast cell layer, which has no cell adhesions.⁹ In addition to the endothelial cells within the villi, we found strong KRIT1 and $\beta 1$ integrin coexpression by the distal cells of the extravillous trophoblast cell column, the inva-

sive cell types of the placenta. In contrast, the proximal extravillous trophoblast cells have weak or no immunoreactivity for KRIT1 or $\beta 1$ integrin (Fig. 3).

Expression of KRIT1 by Mature Blood Vessels

To investigate the temporal expression of KRIT1 throughout the maturation of the placenta, with special attention to endothelial cells, we performed immunohistochemical analysis. The strongest KRIT1 immunoreactivity was in placental villi of first trimester with levels decreasing in the second and third trimesters (Fig. 4). Even though KRIT1 is expressed by endothelial cells through the duration of placental maturation, the highest levels are seen in early angiogenic centers. Expression of KRIT1 decreases as placental villous tree development and angiogenesis advance through pregnancy and is lost within large blood vessels (Fig. 4). Throughout maturation, microvessels, including capillaries and small arteries, continue to express KRIT1, whereas KRIT1 is only expressed by a small number of endothelial cells in mature large vessels (Fig. 4).

Discussion

Cerebral cavernous malformation is a vascular disorder associated with the defective development and formation of CNS blood vessels. Our previous results demonstrate specific expression of KRIT1 in endothelial cells of microvessels and small arteries along with other cells important in the formation of cerebral vasculature, such as astrocytes and astrocytic foot processes.¹³ These results may explain why CCM lesions are CNS specific.

In this study, we confirm our previous results showing that KRIT1 is expressed by endothelial cells during capillary-like tube formation *in vitro*. Furthermore, we show that KRIT1 is expressed during early angiogenesis *in vivo* and that its expression is lost as blood vessels develop during placental maturation. Examination of the first trimester immature placenta reveals the strongest immunoreactivity for KRIT1 in primitive angiogenic cell cords, presumptive endothelial cells, Hofbauer cells, and complex cells with paracrine function required for successful angiogenesis.⁹ Interestingly, analysis of mature placental vessels shows KRIT1 expression only by microvascular and small arterial endothelial cells and does not reveal any expression

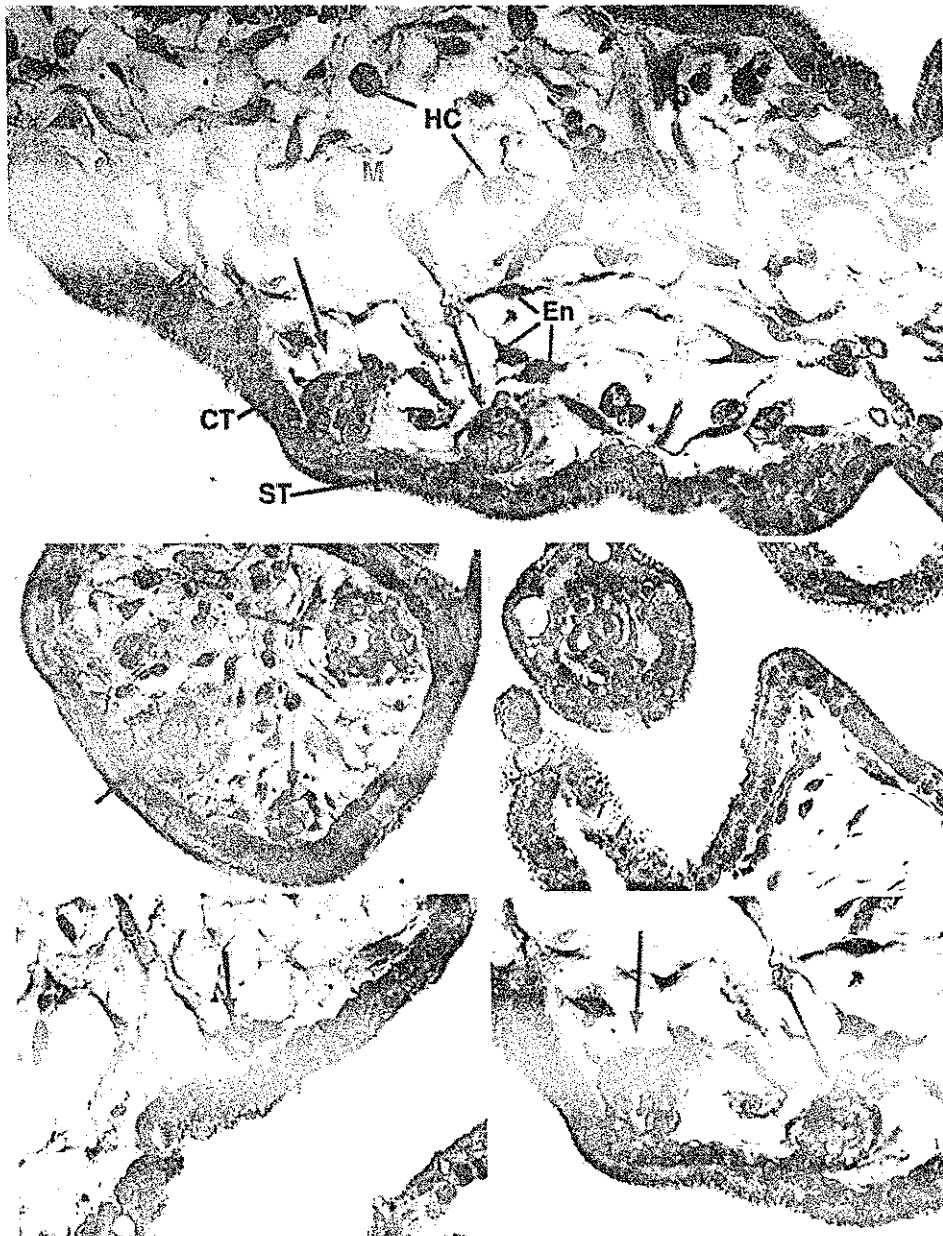


FIG 2. Photomicrographs showing KRIT1 expression in immature placental tissue. In first trimester chorionic villi, endothelial cells on newly forming vessels (arrows) as well as Hofbauer cells stain strongly for KRIT1. The cytotrophoblast cell layer also stains for KRIT1 and the syncytiotrophoblast layer does not. CT = cytotrophoblast; En = endothelial cell; HC = Hofbauer Cell; m = Mesenchyme; ST = syncytiotrophoblast. Original magnification $\times 40$ (upper), $\times 20$ (center left), $\times 60$ (center right and lower).

within either the smooth-muscle cells or any other vessel wall elements

In addition to endothelial cells, our results show that KRIT1 staining is also seen on the villous and extravillous cytotrophoblast cells where it colocalizes with $\beta 1$ integrin. Overall, three cell types within the maturing placenta, endothelial cells within the mesenchyme and lining the intima of vessels, Hofbauer cells, and cytotrophoblast cells, show KRIT1 and $\beta 1$ integrin colocalization.

In anchoring villi, villous cytotrophoblasts and proximal cells of the extravillous column express dominantly

$\alpha 6 \beta 4$ integrin. On the other side, distal column cytotrophoblasts switch the integrin expression prominently to $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha 1 \beta 1$, and αv subtypes. Moreover, an unusual ECM is observed in the distal part of the column. This part of the column is rich in fibronectin and carries a characteristic oncofetal glycopeptide.¹¹

Consistent with these results, we show that when early placental slices are immunostained, KRIT1 and $\beta 1$ integrin expression is exclusively found in the endothelial cells of the mesenchyme and the invasive (extravillous) cytotrophoblast. As the placenta matures throughout preg-

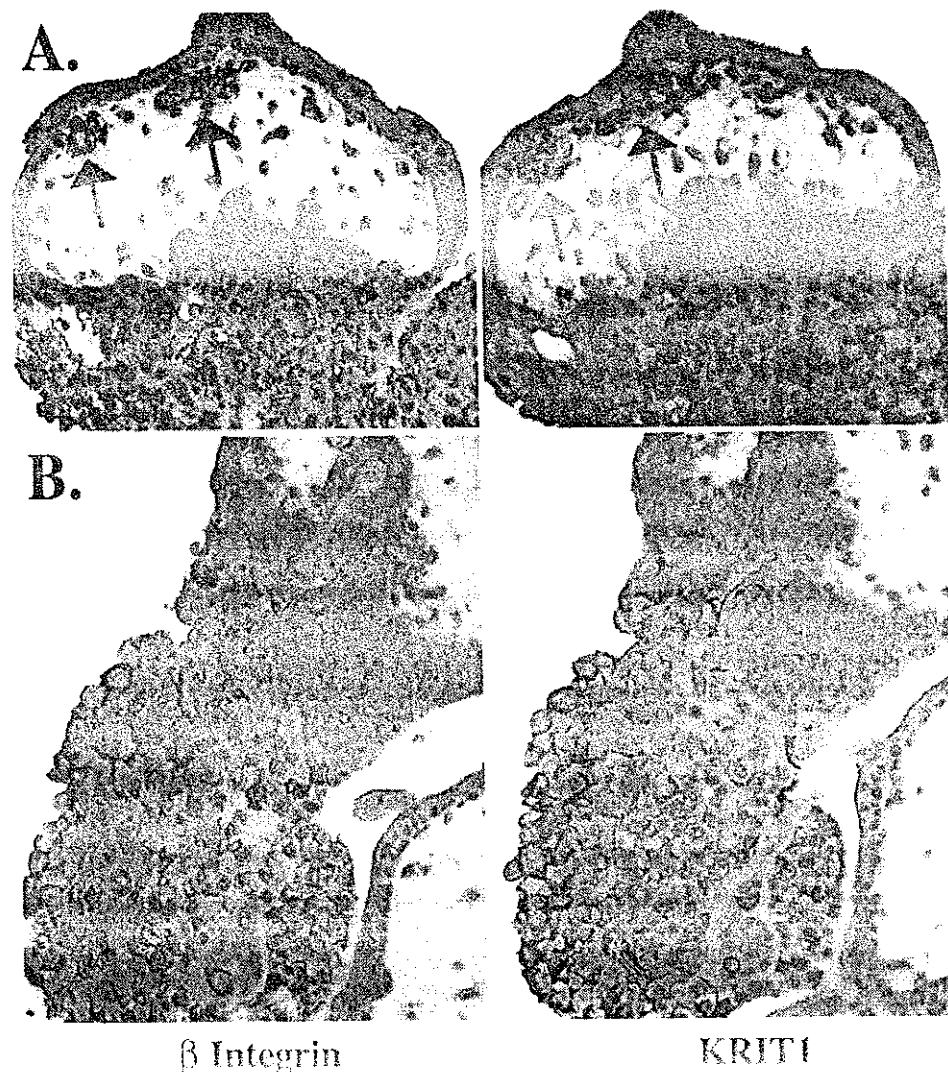


FIG. 3. Photomicrographs demonstrating KRIT1 colocalizing with $\beta 1$ integrin. A: In first trimester chorionic villi, both KRIT1 and integrin $\beta 1$ immunoreactivity is observed in endothelial cells (arrows) and villous cytotrophoblasts. B: The invasive cell column of the early placenta expresses KRIT1, which colocalizes with $\beta 1$ integrin. Both molecules show the strongest signal in the invasive cell column whereas proximal extravillous trophoblasts show no expression for KRIT1. Original magnification $\times 20$.

nancy, KRIT1 and $\beta 1$ integrin expression is seen occasionally in the endothelial cells lining the intima of vessels, with continued weak expression by the cytotrophoblast. This finding that KRIT1 and $\beta 1$ integrin colocalize during placental development has important pathophysiological implications. Authors of recent studies have demonstrated that KRIT1 interacts in vitro with ICAP-1, a modulator of the $\beta 1$ integrin signaling pathway that plays a role in responding to ECM-cell and cell-cell interactions.^{27,28}

These findings may implicate involvement of KRIT1 in integrin signaling during angiogenesis. Interestingly, during angiogenesis, integrins are expressed by endothelial cells because they are crucial players in the regulation of endothelial cell adhesion, migration, and formation of the primitive tubes of the vascular tree.^{8,10,23} Integrins also play a key role in cell-cell adhesion, cell-ECM adhesion, and

endothelial cell migration and invasion. Specifically, integrin heterodimers $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ are induced by vascular endothelial growth factor in endothelial cells and cause the cells to migrate and form tubes.²³ Furthermore, $\beta 1$ integrin complexes are crucial in supporting endothelial cell proliferation for the formation of new vessels from vascular cores, and $\beta 1$ integrin null cells fail to form blood vessels.² These results have important implications in the pathogenesis of CCM, suggesting that *KRIT1* mutations impair capillary formation or maintenance due to failure of $\beta 1$ integrin to respond to the appropriate ECM signals, potentially originating from astrocytes.

Conclusions

The findings reported here provide new insight into the

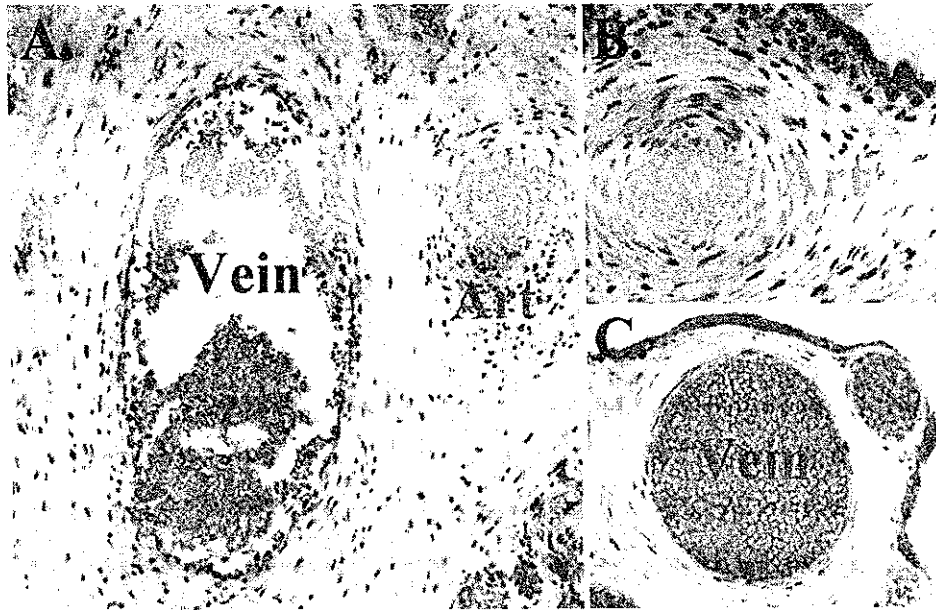


FIG 4. Photomicrographs showing KRIT1 expression for second and third trimester placenta containing only mature vessels. The KRIT1 staining is strongest in the newly forming vasculature (see Fig 2) and is weak within mature vessels. In the villous stroma of the first trimester samples (see Fig 2), KRIT1 immunoreactivity is stronger than in that of the second and third trimester samples. A-C: As vessels mature, KRIT1 expression became localized to small arteries (Ar) (A and B) and capillaries, and no staining was observed on venous structures (Vein) (A and C). Original magnification $\times 10$ (A), $\times 40$ (B) and $\times 20$ (C).

temporal and spatial expression pattern of KRIT1 in *in vitro* and *in vivo* angiogenic models. Although these results do not establish KRIT1 as necessary and/or sufficient for early angiogenesis, they represent necessary steps in an attempt to understand the function of KRIT1. Further work should be aimed at finding other molecules that interact with KRIT1 to identify which signaling pathways are affected by KRIT1 expression. These studies will be necessary to determine whether the cellular processes involved in the pathogenesis of CCM. Moreover, each novel component of this pathway will be a potential target for therapeutic intervention.

Acknowledgment

This study is part of O. Guzeloglu-Kayisli's Ph.D. thesis.

References

- Barrow D, Kiisht A: Cavemous malformations and hemorrhage. in Awad IA, Barrow DL (eds): **Cavemous Malformations**. Park Ridge: AANS 1993. pp 65-80
- Bloch W, Forsberg E, Lentini S, et al: Beta 1 integrin is essential for teratoma growth and angiogenesis. *J Cell Biol* **139**: 265-278, 1997
- Charnock-Jones DS, Burton GJ: Placental vascular morphogenesis. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **14**: 953-968, 2000
- Chen DH, Lipe HP, Qin Z, et al: Cerebral cavernous malformation: novel mutation in a Chinese family and evidence for heterogeneity. *J Neurol Sci* **196**:91-96, 2002
- Couteulx SL, Brezin AP, Fontaine B, et al: A novel KRIT1/CCM1 truncating mutation in a patient with cerebral and retinal cavernous angiomas. *Arch Ophthalmol* **120**:217-218, 2002
- Craig HD, Gunel M, Cepeda O, et al: Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet* **7**:1851-1858, 1998
- Davenport WJ, Siegel AM, Dichgans J, et al: CCM1 gene mutations in families segregating cerebral cavernous malformations. *Neurology* **56**:540-543, 2001
- Davis GE, Camarillo CW: Regulation of endothelial cell morphogenesis by integrins: mechanical forces and matrix guidance pathways. *Exp Cell Res* **216**:113-123, 2005
- Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor N, Voorhees J, et al: KRIT1 in the chorionic villi of the human placenta. *Acta Anat (Basel)* **119**:18-26, 1984
- Eliceiri BP, Klemke R, Stromblad S, et al: Integrin α 3 β 3 requirement for sustained mitogen-activated protein kinase activity during angiogenesis. *J Cell Biol* **140**:1255-1263, 1998
- Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ: Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? *Am J Pathol* **138**:537-543, 1991
- Gunel M, Laurans MS, Shin D, et al: KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**:10677-10682, 2002
- Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor N, Voorhees J, et al: KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery* **54**. 2004 (unverified)
- Hanahan D: Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* **277**:48-50, 1997
- Hayman LA, Evans RA, Ferrell RE, et al: Familial cavernous angiomas: natural history and genetic study over a 5-year period. *Am J Med Genet* **11**:147-160, 1982
- Kidd HA, Cumings JN: Cerebral angiomata in an Icelandic family. *Lancet* **I**:747-748, 1947
- Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, et al: Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* **23**:189-193, 1999

18. Lucas M, Solano F, Zayas MD, et al: Spanish families with cerebral cavernous angioma do not bear 742C→T Hispanic American mutation of the KRIT1 gene. *Ann Neurol* **47**:836, 2000
19. Maraire JN, Awad IA: Intracranial cavernous malformations: lesion behavior and management strategies. *Neurosurgery* **37**: 591-605, 1995
20. Michael JC, Levin PM: Multiple telangiectases of brain: a disorder of hereditary factors in their development. *Arch Neurol Psychiatry* **36**:514-536, 1936
21. Robinson JR Jr, Awad IA, Magdinec M, et al: Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain. *Neurosurgery* **32**:730-736, 1993
22. Sahoo T, Johnson EW, Thomas JW, et al: Mutations in the gene encoding KRIT1, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (CCM1). *Hum Mol Genet* **8**: 2325-2333, 1999
23. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, et al: The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* **160**:195-204, 2002
24. Serebrniiskii I, Estojak J, Sonoda G, et al: Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene* **15**: 1043-1049, 1997
25. Suri C, McClain J, Thurston G, et al: Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* **282**:468-471, 1998
26. Verlaan DJ, Davenport WJ, Stefan H, et al: Cerebral cavernous malformations: mutations in Krit1. *Neurology* **58**:853-857, 2002
27. Zawistowski JS, Serebrniiskii IG, Lee MF, et al: KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet* **11**:389-396, 2002
28. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, et al: Interaction between krit1 and icap1alpha alters perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* **10**:2953-2960, 2001
29. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, et al: Mutations in KRIT1 in familial cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* **46**:1272-1279, 2000

Manuscript received September 2, 2003.

Accepted in final form November 4, 2003.

This work was supported by the National Institutes of Health Grant No. R01-NS36194-05.

Address reprint requests to Murat Gunel M.D., Department of Neurosurgery, TMP 4, Yale University School of Medicine, 333 Cedar St, New Haven, Connecticut 06510; email: murat.gunel@yale.edu

Regulation of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on Chromosome 10) Expression by Estradiol and Progesterone in Human Endometrium

OZLEM GUZELOGLU-KAYISLI, UMIT A. KAYISLI, RAFAT AL-REJJAL, WENXIN ZHENG, GUVEN LULECI, AND AYDIN ARICI

Division of Reproductive Endocrinology, Departments of Obstetrics and Gynecology (O.G.-K., U.A.K., R.A.-R., A.A.) and Pathology (W.Z.), Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520-8063; and Departments of Medical Biology and Genetics (O.G.-K., G.L.) and Histology and Embryology (U.A.K.), School of Medicine, Akdeniz University, Antalya 07070, Turkey

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) is a tumor suppressor gene, mutated frequently in a variety of human tumors. PTEN regulates cell growth, apoptosis, and proliferation. Phosphorylation in PTEN tail causes its inactivation and decreases its degradation. There is little known about the regulation of PTEN by ovarian steroids. We hypothesized that PTEN expression in human endometrium is variable throughout the menstrual cycle and early pregnancy, and that ovarian steroids regulate PTEN expression because PTEN is critical in many steroid-sensitive tissues such as endometrium, prostate, and breast. In the present study, we have observed a direct regulation of PTEN by ovarian steroids. Estradiol increased PTEN phosphorylation at 5–15 min. After 24-h treatment, progesterone induced a significant in-

crease in PTEN protein levels, assessed by Western blot. Furthermore, we evaluated for the first time a comparison between menstrual cycle and early pregnancy, immunohistochemically. Endometrial PTEN expression revealed temporal and spatial changes throughout the menstrual cycle and during early pregnancy. We conclude that estradiol may down-regulate PTEN activity by increasing its phosphorylation, but progesterone is likely to regulate the PTEN pool by decreasing its phosphorylation and increasing its protein level. Presented data, therefore, suggest that ovarian steroids regulate the endometrial PTEN pool. We propose that PTEN might be one of the signaling proteins that estrogen and progesterone are acting to affect endometrial cell proliferation and/or apoptosis (*J Clin Endocrinol Metab* 88: 5017–5026, 2003)

PTEN (PHOSPHATASE AND TENSIN homolog deleted on chromosome 10) was identified as a candidate tumor suppressor gene by three independent groups in 1997 (1–3). PTEN is also called MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers), and TEP1 (IGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) (2, 3). PTEN gene is frequently mutated in many human tumor types such as endometrial, prostate, glioblastoma, and breast cancers (4, 5). Moreover, germline mutations in PTEN gene cause the autosomal dominant inherited hamartoma syndrome associated with increased cancer risks such as Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome (6).

PTEN gene encodes a 403-amino acid protein, which is a member of the tyrosine phosphatase family. There is a strong correlation between its phosphatase and tumor suppressor activity that has been demonstrated previously in many advanced cancers *in vitro* (7–9).

PTEN inhibits the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by removing the phosphate in D3-phosphate group of phosphoinositide-3, 4, 5-triphosphate (PIP₃). Dephosphorylation of PIP₃ is a critical determinant for controlling cell growth, proliferation, and survival. Inhibition of PIP₃ causes blocking of Akt signaling, which in turn, ends up

with an increased activity on proapoptotic molecules such as Bad and Caspase-9 (10). Therefore, PTEN plays important roles in cell survival and apoptosis because it inhibits cell cycle progression by down-regulating cyclin D1 and activates proapoptotic molecules through Akt-dependent and independent pathways (11, 12).

The critical importance of PTEN during development was recognized in mice with homozygous- and heterozygous-targeted deletions of the PTEN gene. Whereas PTEN knockout mice die during early embryogenesis between d 6.5 and 9.5 because of abnormal patterning of ectodermal and mesodermal germ layers, defective placentation, and overgrowth of the cephalic and caudal regions, heterozygous mice develop normally but exhibit an increased risk for a wide range of tumors including endometrial cancer (13, 14). Moreover, in human endometrial cancer, PTEN mutation rate was reported to be approximately 50–80% (15, 16).

Endometrium is capable of blastocyst implantation, regulation of trophoblast invasion, control of infectious agents, and efficient disposal of blood and desquamated cellular debris with menstruation. All of these endometrial events are carried out by mechanisms of proliferation, differentiation, and apoptosis, which are regulated by ovarian steroids.

Mutter *et al.* (17) have recently reported the changes in endometrial PTEN expression in both mRNA and protein level throughout the menstrual cycle, showing cyclic-related changes. In this study, we hypothesized that PTEN expression in human endometrium is variable throughout the men-

Abbreviations: GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; HBSS, Hank's balanced salt solution; HSCORE, histologic score; PIP₃, phosphoinositide-3, 4, 5-triphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10; TBS, Tris-buffered saline; TBS-T, TBS with Tween 20.

strual cycle and during early pregnancy, and ovarian steroid hormones (estrogen and progesterone) regulate PTEN expression. In addition to expanding the previous study's results to early pregnancy tissues, the present study also investigates PTEN levels and its phosphorylation in endometrial cells in response to sex steroids. The last 50 amino acid residue (354-403) in C-terminal domain of PTEN was referred as PTEN tail and is necessary to maintain stability and to determine its subcellular localization (18). Recently, Vazquez *et al.* (18) have shown that phosphorylation of the PTEN tail inhibits PTEN activity and decreases its degradation. Therefore, we also investigated the regulation of PTEN phosphorylation by ovarian steroids in cultured human endometrial cells, *in vitro*. Regulation of PTEN expression by ovarian steroids may help to protect the balance between proliferative and antiproliferative actions in normal endometrium.

Materials and Methods

Tissue collection

Endometrial tissue was obtained from human uteri after hysterectomy conducted for benign diseases other than endometrial disease or from endometrial biopsies ($n = 22$). Decidual tissues from first trimester ($n = 10$) were collected from clinically normal pregnancies, which were voluntarily terminated by dilation and curettage. Informed consent in writing was obtained from each patient before surgery; consent forms and protocols were approved by the Human Investigation Committee of Yale University and Akdeniz University. The mean age of patients was 41 (range 32-48) yr. The day of the menstrual cycle was established from the patient's menstrual history and was verified by histological examination of the endometrium. None of the tissues used in the study were from women using exogenous steroids, and all were from premenopausal women. All the endometrial tissues were from women with regular menstrual cycles. Samples were grouped according to menstrual cycle phases: early proliferative (d 1-5), mid-proliferative (d 6-10), late proliferative (d 11-14), early secretory (d 15-18), mid-secretory (d 19-23), and late secretory (d 24-28). Tissues were embedded in paraffin for immunohistochemistry. Some endometrium samples were placed in Hanks' balanced salt solution (HBSS) and transported to the laboratory for separation and culture of endometrial stromal and glandular cells.

Cell lines

Ishikawa cells (a well-differentiated endometrial adenocarcinoma cell line) were provided kindly to us by Dr R. Hochberg (Department of Obstetrics and Gynecology, Yale University School of Medicine) from a frozen stock. Thawed cells were maintained in T75 flasks (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) until the passage as described previously (19). RL-95 cells were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA).

Isolation and culture of human endometrial stromal and glandular cells

Endometrial stromal and glandular cells were separated and maintained in monolayer culture, as described previously (20). Endometrial tissue was rinsed in HBSS to remove blood and debris. Briefly, endometrial tissue was digested by incubation of tissue minces in HBSS (Sigma, St. Louis, MO) that contained HEPES (25 mmol, Sigma), penicillin (200 U/ml, Sigma), streptomycin (200 mg/ml, Sigma), collagenase (1 mg/ml, 15 U/mg, Sigma), and deoxyribonuclease (0.1 mg/ml, 1500 U/mg, Sigma) for 30 min at 37°C with agitation. The dispersed endometrial cells were separated by filtration through a wire sieve (73- μ m diameter pore, Sigma). The endometrial glands (largely undispersed pieces) were retained by the sieve, whereas the dispersed stromal cells passed through the sieve into the filtrate.

Stromal cells were plated in Ham's F12/DMEM (1:1 vol/vol; Sigma) containing fetal bovine serum (10% vol/vol, Life Technologies, Inc.

Rockville, MD) and antibiotics-antimycotics (1% vol/vol, Life Technologies, Inc.) in T-75 plastic flasks (Falcon, Bedford, MA). Cells were plated in plastic flasks (75 cm², Falcon), maintained at 37°C in a humidified atmosphere (5% CO₂ in air), and allowed to replicate to confluence. Thereafter, the stromal cells were passed by standard methods of trypsinization and plated in culture dishes (100-mm diameter) and were allowed to replicate to confluence, which takes approximately 7-10 d. Endometrial stromal cells after first passage were characterized previously (20), and were found to contain 0-7% epithelial cells, no endothelial cells, and 0-2% macrophages. In present experiments, cultures were confirmed to have similar purity. Experiments were commenced 1-3 d after confluence was attained. The confluent cells were treated with serum-free, phenol red-free media (Sigma) for 24 h before treatment with steroids.

Endometrial glandular cells (largely intact glands and sheets of surface epithelium) were collected by back washing the sieve and plated in six-well plates, previously coated with growth factor-reduced matrigel (Collaborative Research, Boston, MA). Cells were maintained in DMEM containing 10% fetal bovine serum, 1% antibiotics-antimycotics and D-valine (substituted for L-valine to inhibit stromal cell growth, Life Technologies, Inc.) (21). Glandular cells reach confluence in 5-7 d. Endometrial glandular cells in culture were characterized using cytokeratin-7 antibody and were found to contain 0.1-2% leukocytes, 1-4% stromal cells, and no endothelial cells. If cultures were contaminated with more than 10% other cells than glandular cells, these cultures were excluded from the study. Experiments with glandular cells were conducted 1-3 d after confluence was attained. Only pure glandular cells were treated with sex steroids. Cells were treated with serum-free, phenol red-free media for 24 h before treatment with steroids. Stromal and glandular cells were treated with 17 β -estradiol (1×10^{-8} M) and progesterone (1×10^{-8} M) for various times for Western blot analysis and immunocytochemistry staining.

Immunohistochemistry and immunocytochemistry

Paraffin-embedded tissue samples were cut and mounted on Super-Frost Plus slides (Erie Scientific Co., Portsmouth, NH). Following deparaffinization, slides were rinsed with PBS for 10 min. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation in 3% H₂O₂ for 20 min and followed by a rinse in PBS. For antigen retrieval, slides were placed in 10 mM of citrate buffer, microwaved twice for 5 min, and rinsed in PBS. Sections were incubated with 5% normal serum to block nonspecific staining for 30 min at room temperature. Thereafter, sections were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antihuman PTEN antibodies [1/100, Cell Signaling (Beverly, MA) and Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)]. Antibodies' specificity were tested in PTEN-mutant Ishikawa and RL-95 cells. For negative control slides, normal mouse IgG isotype (Vector Laboratories, Burlingame, CA) was used instead of primary antibodies for PTEN. The sections were washed in Tris-buffered saline (TBS), incubated with biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories), and then incubated with streptavidin-peroxidase complex using the Vectastain ABC Elite kit (Vector Laboratories). Subsequently, the chromogenic reaction was carried out with 3-amino-9-ethyl carbazole (Vector Laboratories) and the reaction was terminated with tap water. Slides were counterstained with hematoxylin before permanent mounting and then evaluated under a light microscope.

To investigate whether intracellular localization of PTEN and phospho-PTEN is different, we performed immunofluorescence staining in endometrial stromal cells plated on chamber slides (Falcon). Cells were treated with estradiol (1×10^{-8} M) for 5 and 15 min, and slides were then fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C for 20 min and washed three times with TBS for 5 min at room temperature. After blocking step, chamber slides were incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antihuman PTEN (1/100) and rabbit polyclonal antihuman phospho-PTEN (1/100) antibodies (Cell Signaling). Mouse antihuman PTEN antibody detects the total level of endogenous PTEN protein in cells. Specificity of this antibody was tested by Birle *et al.* (22) and has been shown that it detects endogenous levels of PTEN when only phosphorylated at Ser380 residue. For negative control slides, normal mouse IgG isotype and normal rabbit IgG (Vector Laboratories) were used instead of primary antibodies for PTEN and phospho-PTEN, respectively. Following the overnight incubation of primary antibody, chamber slides were

incubated with Cy-3 conjugated antimouse IgG and Cy-2 conjugated rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA), counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole and mounted with fluorescence specific media (Vector Laboratories). For each experiment, all slides were stained in a single batch and were exposed to identical staining.

The intensity for PTEN immunoreactivity in endometrial tissues was semiquantitatively evaluated as positively stained cells according to the following categories: -, no staining; 1+, weak but detectable; 2+, moderate or distinct; 3+, intense. For each tissue, at histologic score (HSCORE) value was derived by summing the percentages of cells that stained at each intensity category and multiplying that by the weighted intensity of the staining, using the formula [$HSCORE = \sum P_i (i + 1)$], where P_i represents the intensity scores and P_i is the corresponding percentage of the cells. In each slide, five different areas were evaluated under a microscope with $\times 40$ original magnification, the percentage of the cells for each intensity within these areas was determined at different times by two investigators who were blinded to treatments, and the average score was used.

Preparation of nuclear extracts

Nuclear extracts from endometrial stromal cells grown to confluence in 60-mm plates were performed using a nuclear extraction kit (Aktiv Motif, Carlsbad, CA). Briefly, cells were washed with ice-cold PBS and phosphatase inhibitors, removed from the dish by scraping with a cell lifter, and transferred to prechilled tubes. Cell suspensions were centrifuged at 4°C for 5 min at 500 rpm. Pellets were resuspended in hypotonic buffer and incubated for 15 min on ice, after adding a detergent centrifuged again at 4°C for 30 sec at $14,000 \times g$. The pellet was resuspended in a lysis buffer and incubated for 30 min on ice on a rocking platform. The suspension was centrifuged at 4°C for 10 min at $14,000 \times g$, and the supernatant (nuclear fraction) was aliquoted and frozen at -80°C . An aliquot of each sample was used to quantify the nuclear protein amount via Coomassie protein assay (Pierce, Rockford, IL). Five micrograms of nuclear extract sample were loaded into each well and assayed according to manufacturer's directions (Aktiv Motif) using a microplate reader.

Western blot analysis

Total protein from the cells was extracted using I-PER tissue protein extraction reagent (Pierce), supplemented with protease inhibitor cocktail (1 mM Na_2VO_4 , 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride; Calbiochem, San Diego, CA). The protein concentration was determined by Bradford assay (Pierce). Twenty micrograms of protein were loaded into each lane, separated electrophoretically by SDS-PAGE using 10% Tris-HCl Ready Gels (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Bio-Rad). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk in TBS-T buffer (0.05% Tween-20 in TBS) for 1 h to reduce the nonspecific binding. Then the membrane was incubated with mouse monoclonal antihuman PTEN antibody (Cell Signaling) overnight at 4°C, then washed three times with TBS-T for 20 min. The membrane was incubated for 1 h with peroxidase-labeled antimouse IgG (Vector Laboratories) and subsequently washed with TBS-T three times for 20 min. Immunodetection was developed with chemiluminescent detecting reagents (NEN Life Science Products, Boston, MA), and subsequently the membrane was exposed to BioMax film (Kodak, Rochester, NY).

After the membrane was stripped/stripping solution (Pierce), the same membrane was reprobed with rabbit polyclonal antihuman phospho-PTEN antibody (Cell Signaling), followed by the other steps as described above. Equal loading of proteins in each lane was confirmed by probing the membrane with mouse monoclonal antihuman glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Immunoblot bands for PTEN, phospho-PTEN, and GAPDH were quantified using a laser densitometer. Each PTEN and phospho-PTEN band was normalized to the value obtained from the same lane blotting GAPDH.

Statistical analysis

Levels of Western blot densitometries and HSCORE of immunohistochemistry were normally distributed as tested by Kolmogorov-Smir-

nov test and were analyzed by ANOVA and *post hoc* Tukey test for pairwise comparisons. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Statistical calculations were performed using Sigmaplot for Windows, version 2.0 (Jandel Scientific Corp., San Rafael, CA). Each experiment was repeated at least three times using cells prepared from three different endometrial tissues.

Results

Expression of PTEN in human endometrium and decidua throughout the menstrual cycle and during early pregnancy

We first tested the specificity of the antibodies. Total protein from PTEN-mutant Ishikawa and RL-95 cells was extracted and assessed by Western blot analysis. No specific PTEN band was detected in either Ishikawa or RL-95 cells (Fig 1).

Endometrial tissues (early proliferative, $n = 5$; mid-proliferative, $n = 4$; late proliferative, $n = 3$; early secretory, $n = 3$; mid-secretory, $n = 4$; late secretory, $n = 3$) and decidual tissues ($n = 10$) were evaluated by immunohistochemistry for PTEN staining.

Immunohistochemistry revealed stronger PTEN staining in stromal cells than glandular cells throughout the menstrual cycle (Fig 2, A and B, and Fig 3). During the proliferative phase, PTEN immunoreactivity in stromal cells was mainly in the cell nucleus and less in the cytoplasm (Fig 2A). Compared with proliferative phase, during secretory phase and early pregnancy this immunoreactivity was mainly in the cytoplasm (Fig 2, A-C). In general, during the proliferative phase PTEN expression was either weak or not detectable in the glandular epithelium, except for a strong immunoreactivity in early proliferative phase samples. On the other hand, during the secretory phase PTEN immunoreactivity was increased in the glandular epithelium (Fig 2, A and B, and Fig 3). The staining in glandular cells was heterogeneous. Specifically, some glandular segments remained either negative or weakly positive for PTEN expression, whereas other segments were more positive (Fig 2B).

During early pregnancy, the immunoreactivity for PTEN was stronger in both stromal and glandular cells compared

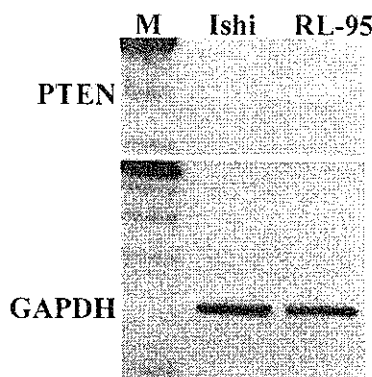


FIG 1. Western blot analysis of PTEN in Ishikawa (Ishi) and RL-95 cells. Total protein was extracted, and 20- μg protein from each cell line was loaded. No bands were detected for PTEN in these cells. M, Molecular weight marker.

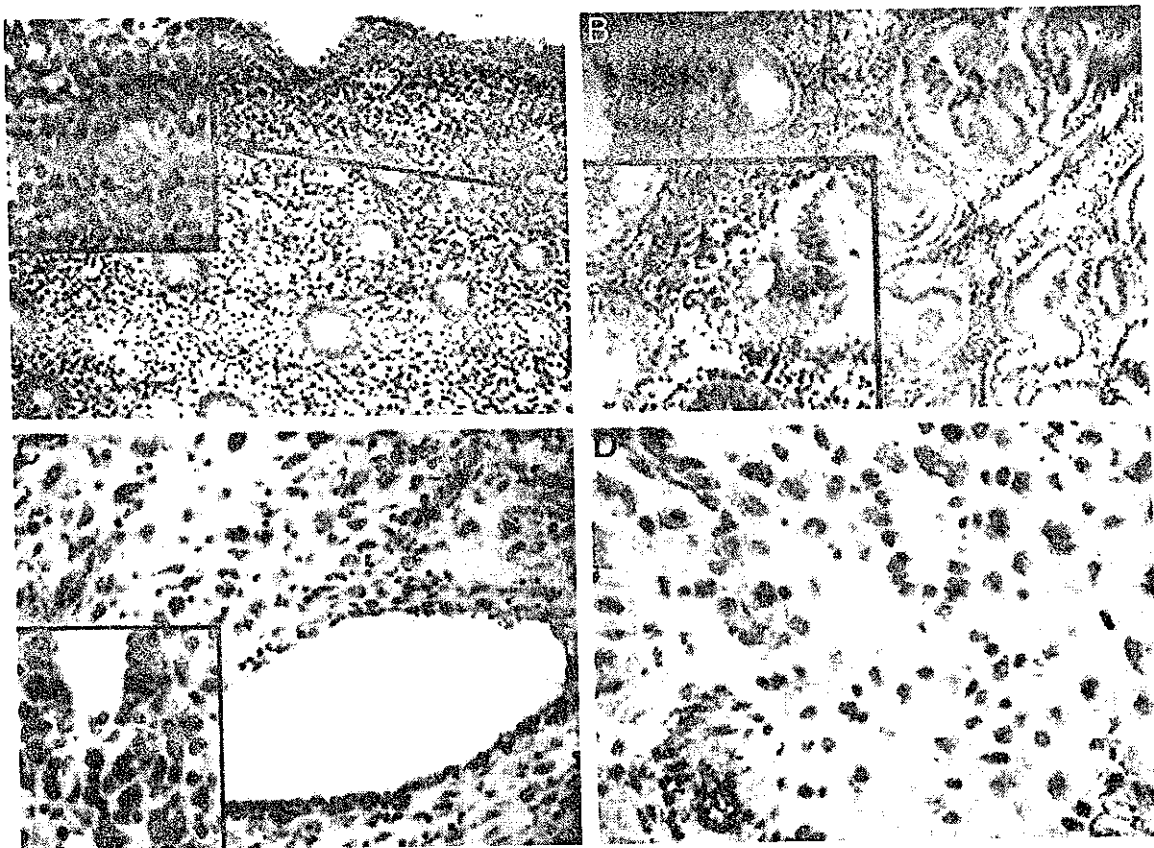


FIG 2 A-D, Immunolocalization of PTEN in human endometrium and decidua. PTEN expression in mid-proliferative phase (A) and late secretory phase (B) endometrium. Mainly nuclear staining is seen in stromal cells in proliferative phase (A). Increased cytoplasmic expression of PTEN in stromal and glandular cells is observed in secretory phase (B). The strongest immunoreactivity for PTEN is observed in decidual cells compared with proliferative and secretory phase endometrial epithelial and stromal cells (C). Negative control where normal mouse IgG isotype was used instead of primary antibody (D).

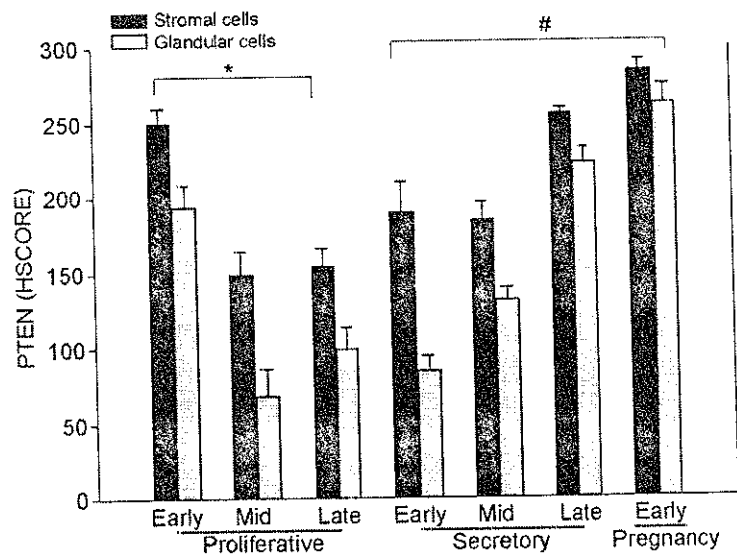


FIG 3 PTEN immunostaining intensity and distribution in endometrial stromal and glandular cells according to menstrual cycle phases and early pregnancy. PTEN HSCORE for stromal cells was higher compared with glandular cells in all samples. Stronger immunoreactivity for PTEN during early pregnancy is observed compared with menstrual cycle phases. *, $P < 0.05$ between early proliferative phase vs. mid- and late-proliferative phases; #, $P < 0.05$ between early pregnancy vs. early and mid-secretory phases.

with nonpregnant endometrium, and the staining was mostly cytoplasmic (Fig. 2, A-C, and Fig. 3). Among all groups, the strongest immunoreactivity was observed in glandular and decidual cells of early pregnancy with a gradual increase as pregnancy advanced (Fig. 2C).

Regulation of PTEN and its phosphorylation in endometrial stromal and glandular cells

If endometrial PTEN expression shows the cyclic manner changes throughout menstrual cycles and early pregnancy,

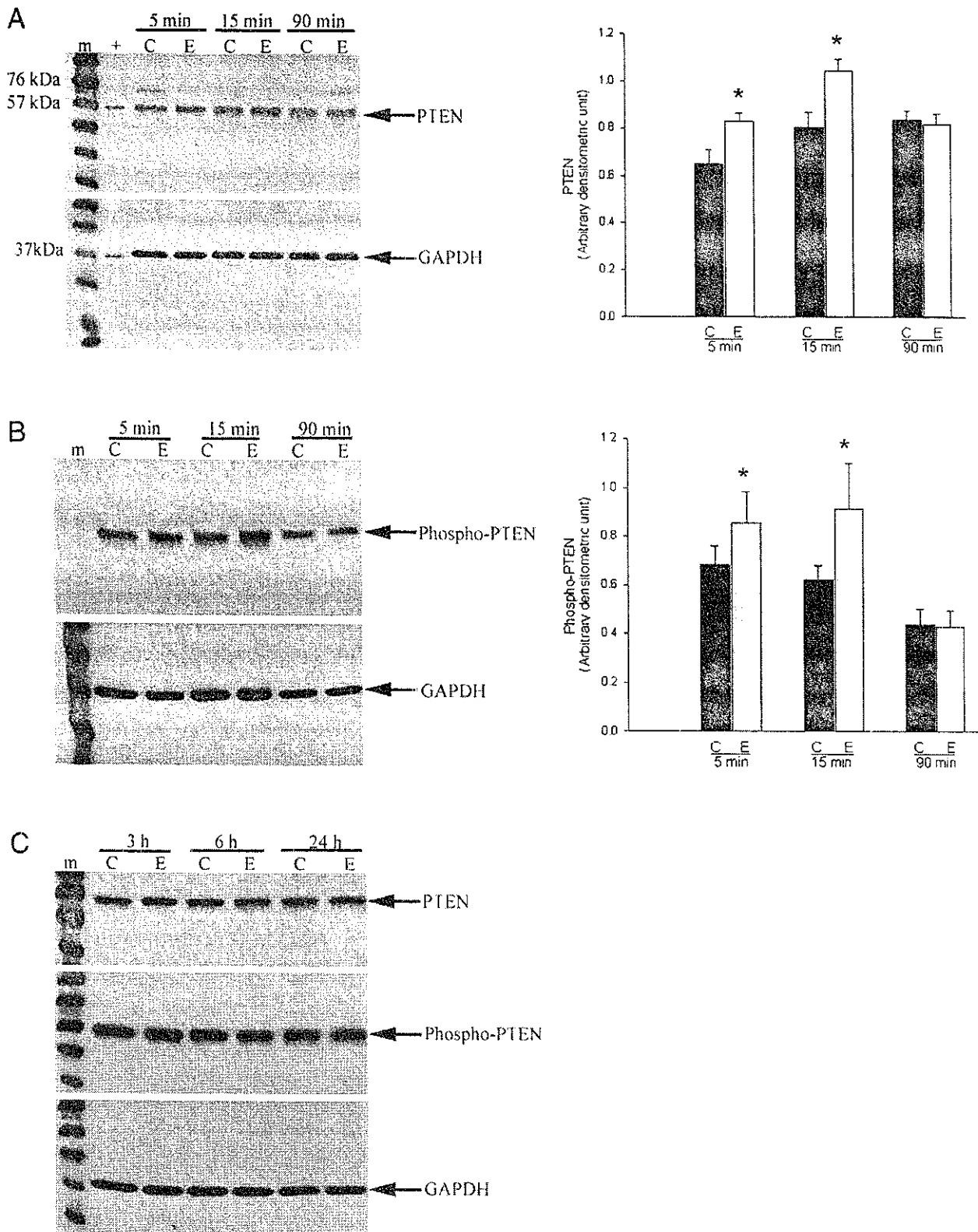


FIG 4. A–C, Western blot analyses of PTEN and phospho-PTEN in cultured human endometrial stromal cells. C, Control; E, estradiol. A, Short-term treatment of cells with estradiol resulted in 28% and 30% increase in the PTEN levels at 5 and 15 min, respectively, compared with control. Estradiol treatment resulted in 29% and 46% increase in the phospho-PTEN levels at 5 and 15 min, respectively, compared with control. Graphs represent mean \pm SEM; *, $P < 0.05$ control vs. E_2 . C, Long-term treatment 3–24 h with estradiol did not affect phospho-PTEN levels, whereas the PTEN level showed statistically insignificant decrease at only 24 h in endometrial stromal cells compared with untreated cells. PTEN and phospho-PTEN levels were normalized to GAPDH protein level.

its expression and/or its phosphorylation may be regulated by ovarian steroids in a short-term and/or long-term manner. To investigate this hypothesis, endometrial stromal and glandular cells were treated with estradiol (1×10^{-8} M) and progesterone (1×10^{-8} M) for short (5–90 min) and long (3–24 h) time courses. PTEN and phospho-PTEN protein levels were assessed by Western blot analysis. In endometrial stromal cells treated with estradiol, PTEN levels were 28% and 30% higher at 5 and 15 min, respectively, compared with control cells ($P < 0.05$) (Fig. 4A). Phospho-PTEN levels reached a peak following 15 min of treatment with estradiol. Increased PTEN levels in estradiol-treated cells were associated with elevated levels of PTEN phosphorylation. PTEN phosphorylation in estradiol-treated cells was 29% and 46% higher at 5 and 15 min, respectively, than that observed in

control cells ($P < 0.05$) (Fig. 4B). Long-term estradiol treatment (3–24 h) did not affect phospho-PTEN level, but a nonsignificant decrease was observed in the PTEN protein level after 24 h (Fig. 4C). Short-term treatment (5–30 min) of endometrial stromal cells with progesterone (10^{-8} M) decreased both PTEN and phospho-PTEN levels when compared with control, which was not statistically significant. PTEN level was 11–26% and phospho-PTEN level was 9–15% lower in cells treated with progesterone compared with control cells at 5 and 30 min, respectively (Fig. 5A). On the other hand, long-term progesterone treatment (10^{-8} M) induced a 23–76% increase in PTEN level and a 50–37% increase in phospho-PTEN levels at 6–24 h, respectively ($P < 0.05$) (Fig. 5B).

Endometrial glandular cells treated with estradiol alone

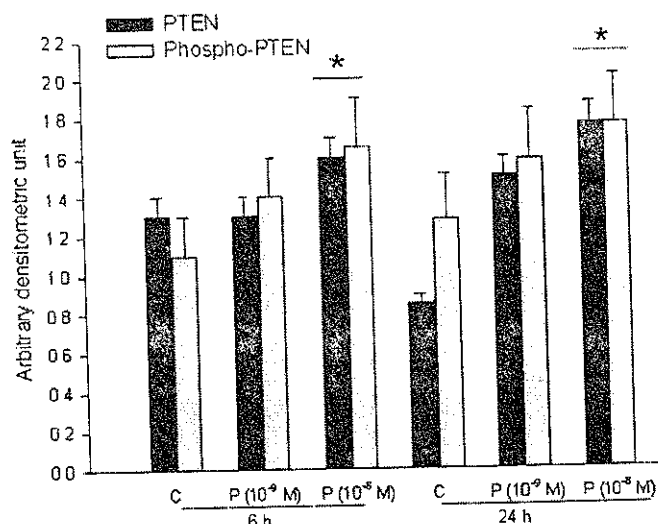
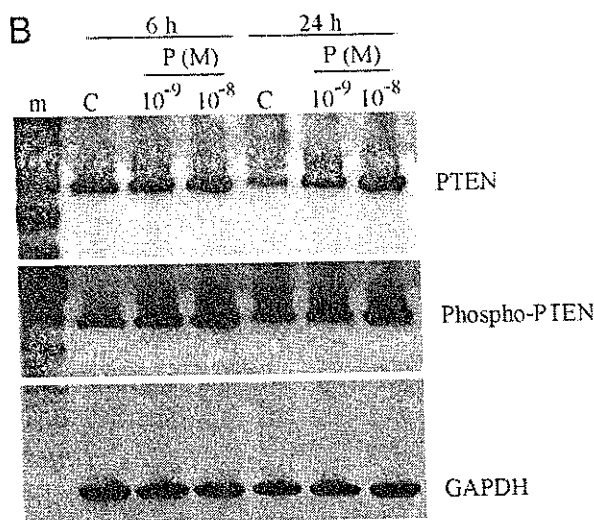
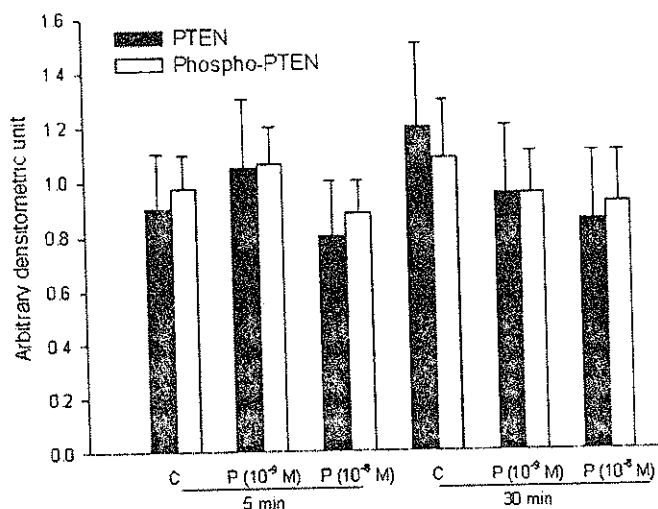
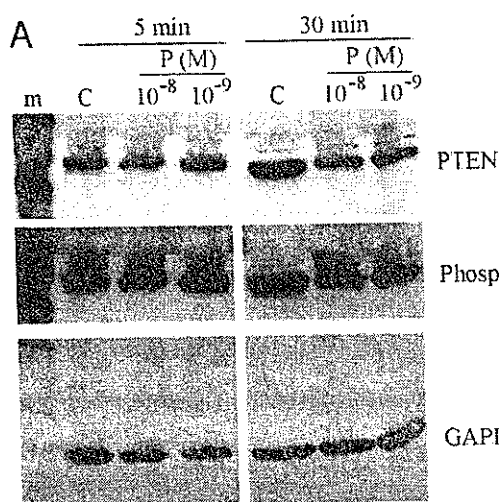


FIG. 5. A and B, Immunoblot analyses of PTEN and phospho-PTEN in cultured human endometrial stromal cells. C, Control; P, progesterone; m, molecular weight marker. A, Short-term treatment of cells with progesterone results in a decrease, which was not statistically significant in the PTEN and phospho-PTEN levels in 5 and 30 min when compared with vehicle (control). PTEN and phospho-PTEN levels were normalized to GAPDH protein level. B, Long-term treatment of cells with progesterone results in a significant increase in PTEN and phospho-PTEN levels in 6 and 24 h. * $P < 0.05$ when compared with control.

and progesterone alone for 15 min showed results similar to those observed in stromal cells (Fig. 6). Estradiol treatment induced a marked increase in both PTEN and phospho-PTEN levels, whereas progesterone induced a not significant decrease in PTEN and phospho-PTEN levels

In vitro localization of PTEN and phospho-PTEN in endometrial stromal cells

To investigate the specific localization of phosphorylated and normal forms of PTEN in the cell, we performed immunofluorescence staining using mouse antihuman-PTEN and rabbit antihuman-phospho-PTEN antibodies in endometrial stromal cells cultured in chamber slides. Immunofluorescence analysis revealed that phospho-PTEN is mostly localized in the nucleus, whereas normal PTEN is mainly in the cytoplasm (Fig. 7, A–C). Endometrial stromal cells plated onto eight-well chamber slides were incubated with estradiol (1×10^{-8} M) for 5–15 min, and cells were analyzed by immunofluorescence staining. Following 15-min estradiol treatment compared with control, there was an increase in nuclear PTEN immunoreactivity and a decrease in cytosolic PTEN immunoreactivity. Double immunofluorescence analysis revealed that nuclear staining is related to phospho-PTEN (Fig. 7, D–F).

We further analyzed phospho-PTEN levels using endometrial stromal cell nuclear extracts treated 5 and 15 min with estradiol (10^{-8} M) or vehicle. Following protein quantification, 5 μ g nuclear extracts were analyzed by Western blot. Similar to immunofluorescence findings, nuclear PTEN level in estradiol-treated cells was significantly higher than those in vehicle-treated cells in 5 and 15 min ($P < 0.05$) (Fig. 8).

Discussion

PTEN, a novel tumor suppressor gene encoding a protein tyrosine phosphatase, has been studied because of being frequently deleted or mutated in a variety of cancers (23). In endometrial cancer, particularly, PTEN mutations appear at a higher frequency than other cancers (15). Since its discovery in 1997, many studies have been performed on its biological and biochemical roles. The main function of PTEN is to negatively regulate Akt activation by preventing its phosphorylation. Thus, PTEN takes part in controlling the cellular processes including apoptosis, cell cycle, cell spreading, and migration (24). Although many studies have demonstrated critical roles of PTEN in cell survival, growth, and cell cycle, its transcriptional and translational regulation mechanisms are still unclear. Understanding the mechanisms of PTEN regulation may be a very important insight for treatment of PTEN-mutated cancers, and it may provide a novel therapeutic approach for many hormone-dependent diseases.

Normal endometrium is hormonally regulated in a cyclic manner and undergoes highly dynamic changes throughout the menstrual cycle and during early pregnancy. Estrogen and progesterone play important roles in the regulation of these changes (25). Mutter *et al.* (17) have recently reported the changes in endometrial PTEN expression throughout the menstrual cycle. Consistent with the data of that study, our immunohistochemical results revealed that PTEN expression in normal and decidualized endometrial tissues is under the cyclic influence of estrogen and progesterone and has a complex and cell-specific distribution and subcellular localization. Stronger PTEN immunoreactivity observed in endometrial stromal cell nuclei compared with its cytosol during the proliferative phase may be related to its increased phosphorylation because our immunofluorescence staining

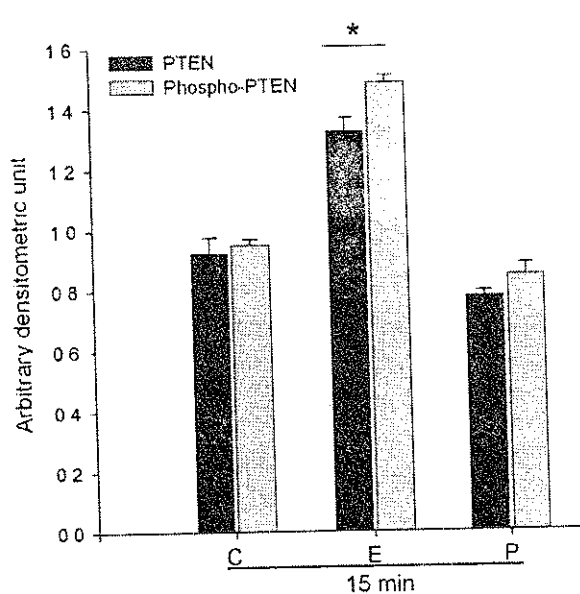
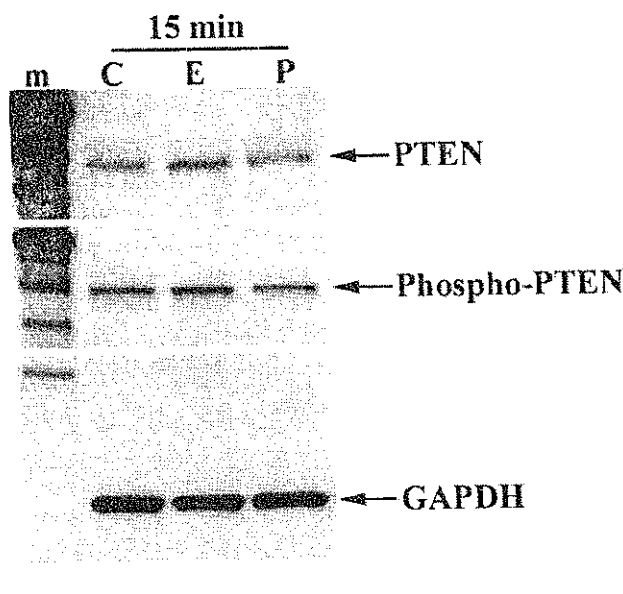


FIG. 6 Western blot analysis of PTEN and phospho-PTEN expression in cultured human endometrial glandular cells. C, Control; E, estradiol (10^{-8} M); P, progesterone (10^{-8} M); m, molecular weight marker. Fifteen minutes of progesterone treatment of cells results in an insignificant decrease in PTEN and phospho-PTEN levels, whereas treatment with estradiol results in significant increase in PTEN and phospho-PTEN levels. PTEN and phospho-PTEN levels were normalized to GAPDH protein level. *, $P < 0.05$ E₂ vs control and P.

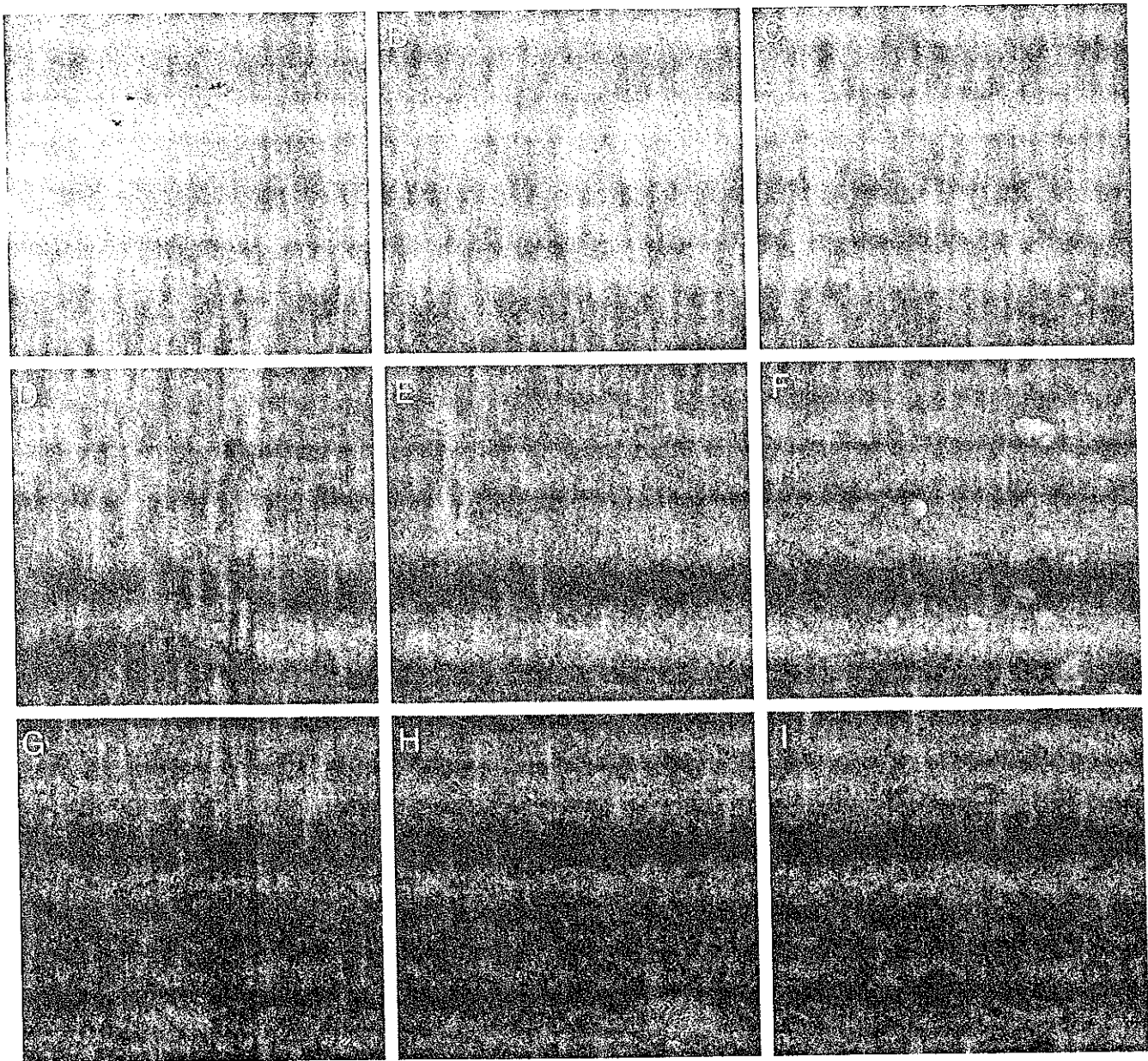


FIG 7 A-I, *In vitro* immunolocalization of PTEN in endometrial stromal cells. Immunofluorescence of endometrial stromal cells cultured in chamber slides for PTEN (A and D), and phospho-PTEN (B and E). In the composite image (C and F), PTEN staining is green and phospho-PTEN staining is red; yellow indicates colocalization. PTEN staining reveals a cytoplasmic pattern, whereas phospho-PTEN reveals mostly nuclear localization. Fifteen minutes of estradiol-treatment (D-F) increases nuclear immunoreactivity compared with control (A-C). Negative controls where normal mouse IgG isotype (G) and normal rabbit IgG (H) were used instead of primary antibodies. 4',6-Diamidino-2-phenylindole staining was used as nuclear dye (I).

for phospho-PTEN showed a nuclear pattern. The finding that there are no significant changes in PTEN immunoreactivity during mid- and late-proliferative phases suggests that estrogen may not have a stimulatory effect on PTEN expression *in vivo* in a long-term manner. On the other hand, nuclear localization of PTEN is poorly understood, and may be related to another yet unknown function besides its known cytoplasmic roles. It is well known that the proliferative phase of human endometrium is characterized by a low number of apoptotic cells, and endometrium stromal cells are less sensitive to apoptotic stimuli compared with epithelial

cells (26). One of the mechanisms under the less sensitivity against apoptotic stimuli in stromal cells is likely to be related to the regulation of PTEN activity by estrogen.

Higher PTEN immunoreactivity in endometrial stromal and glandular cells during late secretory and early proliferative phases could be related to decreased cell proliferation and increased apoptosis of these cells. Moreover, further increase in PTEN expression in decidual and glandular cells during early pregnancy supports this hypothesis because during the process of implantation and early pregnancy numerous cells undergo apoptosis. Endometrial cell apoptosis

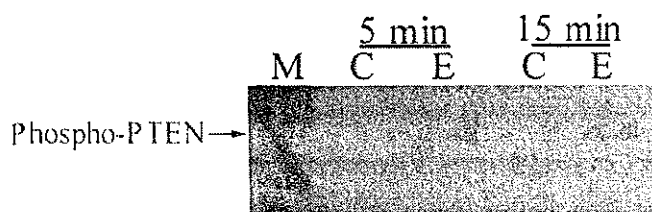


FIG. 8. Western blot analysis of phospho-PTEN in endometrial stromal cells. Nuclear proteins were extracted from endometrial stromal cells incubated with estradiol (1×10^{-8} M) or vehicle (control) for 5 and 15 min. Higher phospho-PTEN level is seen in estradiol-treated cells. C, Control; E, estradiol; M, molecular weight marker.

seems to play an important role in the regulation of endometrial decidualization and trophoblast invasion (27).

Interestingly, PTEN expression is not homogenous in glandular cells. Specifically, in the same section, some glands are either negative or weakly positive, whereas others are strongly positive for PTEN immunoreactivity. Recently, similar staining pattern for Fas and proliferating cell nuclear antigen expression in glandular cells were reported by Demir *et al.* (28). One possibility is that immunohistochemically PTEN-negative glands may have somatic PTEN mutations because endometrium is one of the highest tissues of ratio of somatic PTEN mutations. This may be important for early stage detection of endometrial cancer. A relationship between PTEN-null glands and the incidence of endometrial cancer was recently reported by Mutter *et al.* (29). Loss of PTEN occurs in approximately 50% of all endometrial carcinomas, increasing to 83% for tumors with adjacent premalignant lesions (29). In the present study, we are reporting for the first time the expression of PTEN during early pregnancy and comparing its expression throughout menstrual cycle. In terms of our *in vivo* findings, it seems that PTEN expression may be regulated by ovarian steroids throughout the menstrual cycle and early pregnancy, and our *in vitro* results support this hypothesis. Moreover, increased PTEN expression in secretory phase of endometrium is likely to be regulated by progesterone because *in vitro* progesterone treatment stimulates PTEN in endometrial stromal cells. Our *in vitro* results suggest that in endometrial cells progesterone but not estrogen regulates PTEN expression in a long-term manner.

PTEN is comprised of an N-terminal domain known as phosphatase domain, a C-terminal domain that contains the lipid-binding C2 domain, PEST (proline, glutamic acid, serine) domains that regulate protein stability, and the PDZ (pSD-95/Dlg and ZO1) domain, which is important in protein-protein interactions (30). Vazquez *et al.* (31) have suggested that PTEN is phosphorylated in a specific C-terminal region, referred as PTEN tail, which is rich in serine and threonine residues. PTEN tail is important for PTEN phosphatase activity and is also necessary for maintaining PTEN stability. Two different groups have recently shown that phosphorylated PTEN is less active but more stable, whereas dephosphorylation of PTEN increases its activity and its interaction with PDZ domain-containing binding partners, thus its degradation (22, 31).

Our results demonstrate that, although estrogen does not affect PTEN expression by a long-term manner, it regulates

PTEN level by affecting its phosphorylation in a short-term manner. Increased phosphorylation of PTEN tail in the presence of estrogen may regulate both its stability and activity, and may affect its nuclear localization, confirming our *in vivo* findings. Nuclear PTEN localization has been shown by numerous other studies (32–34). A balance between PTEN phosphorylation and dephosphorylation regulates its activity. Unfortunately, there are no studies describing a role for phospho-PTEN in the nucleus. Dephosphorylation of PTEN tail would result in an increase in PTEN activity but also in its rapid degradation by Proteasoma. As pointed out above, PTEN phosphorylation affects both its stability and cellular localization of PTEN and/or its ability interacting with other intercellular proteins. One hypothesis is that estrogen may activate a kinase related to the phosphorylation of PTEN. Miller *et al.* (35) have shown that PTEN is phosphorylated by protein kinase casein kinase II, which also phosphorylates estrogen receptor α (36). Thus, estrogen-activating casein kinase II may cause a decrease of PTEN activity, but an increase of estrogen receptor α activity. Estrogen may lead to a decreased cytoplasmic activity of PTEN by increasing the PTEN phosphorylation, which in turn would cause increased Akt phosphorylation by phosphatidylinositol 3-kinase (37). Therefore, we propose that PTEN is one of the pathways by which estrogen may be acting to affect endometrial stromal cell proliferation and/or apoptosis.

In conclusion, endometrial PTEN expression has temporal and spatial changes throughout the menstrual cycle and during early pregnancy. Changes in the endometrial PTEN pool are likely to be regulated by estrogen and progesterone in both long-term and short-term manner. Estrogen may down-regulate PTEN activity by increasing its phosphorylation, which requires further studies to prove. This in turn may result in increased PIP₃, which initiates activation of second messengers involved in cell proliferation and survival. On the other hand, progesterone is likely to regulate the PTEN pool by decreasing its phosphorylation and increasing its protein level in short-term and long-term manners, respectively. We propose that PTEN might be one of the signaling proteins that estrogen and progesterone are acting to affect endometrial cell proliferation and/or apoptosis. It should be interesting to further investigate the molecular mechanisms of PTEN phosphorylation after estrogen treatment in the future therapy for estrogen-dependent diseases such as endometriosis.

Acknowledgments

Received March 10, 2003. Accepted July 14, 2003.

Address all correspondence and requests for reprints to: Aydin Arici, M.D., Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520-8063. E-mail: aydin.arici@yale.edu

References

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SL, Puc J, Miliareis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Iltmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997 PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 28:1943–1947.
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DH

- Iavtigian SV 1997 Identification of a candidate tumour suppressor gene MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15:356-362
- 3 Li DM, Sun H 1997 TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor β . *Cancer Res* 57:2124-2129
 - 4 Ali IU, Schriml M, Dean M 1999 Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J Natl Cancer Inst* 91:1922-1932
 - 5 Bonneau D, Longy M 2000 Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mutat* 16:109-122
 - 6 Maehama I, Taylor GS, Dixon JE 2001 PTEN and myotubular in: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 70:247-279
 - 7 Myers MP, Pass I, Baity IH, Van der Kaay J, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK 1998 The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13513-13518
 - 8 Han SY, Kato H, Kato S, Suzuki I, Shibata H, Ishii S, Shiiba K, Matsuno S, Kanamaru R, Ishioka C 2000 Functional evaluation of PTEN missense mutations using in vitro phosphoinositide phosphatase assay. *Cancer Res* 60:3147-3151
 - 9 Furnari FB, Lin H, Huang HS, Cavenee WK 1997 Growth suppression of glioma cells by PTEN requires a functional phosphatase catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12479-12484
 - 10 Leslie NR, Downes CP 2002 PTEN: the down side of PI 3-kinase signaling. *Cell Signal* 14:285-295
 - 11 Tsugawa K, Jones MK, Sugimachi K, Sarfeh IJ, Iarnawski AS 2002 Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing. *Front Biosci* 7:e245-e251
 - 12 Weng L, Brown J, Eng C 2001 PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositide-3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways. *Hum Mol Genet* 10:237-242
 - 13 Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP 1998 Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet* 19:348-355
 - 14 Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW 1998 High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* 8:1169-1178
 - 15 Hale GE, Hughes CL, Cline JM 2002 Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal window of risk, and isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3-15
 - 16 Sun H, Enomoto I, Fujita M, Wada H, Yoshino K, Ozaki K, Nakamura I, Murata Y 2001 Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 115:32-38
 - 17 Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Eng C 2000 Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 85:2334-2338
 - 18 Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers WR 2000 Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 20:5010-5018
 - 19 Kayisli UA, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A 2002 Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5539-5544
 - 20 Arici A, Head JR, MacDonald PC, Casey MI 1993 Regulation of interleukin-8 gene expression in human endometrial cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 94:195-204
 - 21 Gilbert SF, Migeon BR 1975 D-valine as a selective agent for normal human and rodent epithelial cells in culture. *Cell* 5:11-17
 - 22 Birlle D, Bottini N, Williams S, Huynh H, deBelle I, Adamson E, Mustelin T 2002 Negative feedback regulation of the tumor suppressor PTEN by phosphoinositide-induced serine phosphorylation. *J Immunol* 169:286-291
 - 23 Mutter GL 2001 PTEN: a protean tumor suppressor. *Am J Pathol* 158:1895-1898
 - 24 Waite KA, Eng C 2002 Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet* 70:829-844
 - 25 Tseng L, Mazella J 2002 Endometrial cell specific gene activation during implantation and early pregnancy. *Front Biosci* 7:d1566-d1774
 - 26 Rango UJ, Classen Linke CA, Krusche B 1998 The receptive endometrium is characterized by apoptosis in the glands. *Hum Reprod* 13:3177-3189
 - 27 Simon C, Dominguez F, Remohi J, Pellicer A 2001 Embryonic regulation of endometrial molecules in human implantation. *Ann NY Acad Sci* 943:1-16
 - 28 Demir R, Kayisli UA, Celik-Ozenci C, Korgun E, Demir-Weusten A, Arici A 2002 Structural differentiation of human uterine luminal and glandular epithelium during early pregnancy: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Placenta* 23:672-684
 - 29 Mutter GL, Ince FA, Baak JP, Kust GA, Zhou XP, Eng C 2001 Molecular identification of latent precancers in histologically normal endometrium. *Cancer Res* 61:4311-4314
 - 30 Wu X, Hepner K, Castelino-Prabhu S, Do D, Kaye MB, Yuan XJ, Wood J, Ross C, Sawyers CL, Whang YE 2000 Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4233-4238
 - 31 Vazquez F, Grossman SR, Takahashi Y, Rokas MV, Nakamura N, Sellers WR 2001 Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex. *J Biol Chem* 276:48627-48630
 - 32 Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feuer S, Lees JA, Heitz PU, Eng C 2000 Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. *Am J Pathol* 157:1097-1103
 - 33 Lachyankar MB, Sultana N, Schonhoff CM, Mitra P, Poluha W, Lambert S, Quesenberry PJ, Litofsky NS, Recht LD, Nabi R, Miller SJ, Ohta S, Neel BG, Ross AH 2000 A role for nuclear PTEN in neuronal differentiation. *J Neurosci* 20:1404-1413
 - 34 Whiteman DC, Zhou XP, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C 2002 Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 99:63-67
 - 35 Miller S, Lou D, Seldin D, Lane W, Neel B 2002 Direct identification of PTEN phosphorylation sites. *FEBS Lett* 528:145-153
 - 36 Arnold SE, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC 1995 Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55:63-72
 - 37 Shiojima I, Walsh K 2002 Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90:1243-1250