

**HILAL EREN GÖZEL**

**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.**

**DOKTORA TEZİ**



ISTANBUL-2018



**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**KAVERNOM DOKUSUNDA GENOM ÇAPLI MRNA  
EKSPRESYON ANALİZİ**

**HİLAL EREN GÖZEL**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SADRETTİN PENÇE**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI  
MOLEKÜLER TIP PROGRAMI**

**İSTANBUL-2018**

**TEZ ONAYI**

(Bu sayfa yerine,başarılı geçen Tez Sınava sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)





**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün saffhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Hilal Eren Gözel

## İTHAF

Hayat eşime ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını mümkün kılan danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Sadrettin Pençe'ye, yoğun işlerinin arasında bana her zaman vakit ayırıp yardımcı olan Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Ana Bilim Dalı başkanı sayın hocam Prof. Dr. İlhan Yaylım başta olmak üzere, sayın hocalarım Prof Dr. Arzu Ergen'e, Prof Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan'a, Prof Dr. Oğuz Öztürk'e, Prof Dr. Ümit Zeybek'e, benim için annemden farklı olmayan ve eşsiz bilgisi ile bana ışık tutan değerli hocam Doç. Dr. Fatma Özlen'e, Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan değerli hocalarım Dr. Öğr. Üyesi İlknur Keskin'e ve Dr. Öğr. Üyesi Seda Karabulut'a, biyoinformatik analizlerdeki yardımları, değerli katkıları ve bu tezin gerçekleşmesini sağlayan büyük emeği için Dr. Öğr. Üyesi Guvanchmyrat Ovezmyradov'a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez süresince bana hep destek olan canım ailem, eşim Furkan Gözel'e, annem Radife Eren, babam İbrahim Eren ve canım kardeşim Nihal Eren Yüksel'e, bu tezin bana kazandırdığı canım dostlarım ve meslektaşlarım Funda Pehlevan ve Ozan Tiryakioğlu'na, canım arkadaşlarım Bircan Kolbaşı ve Özge Biçeroğlu'na içten teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 55143

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	<b>HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.</b>
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	XVİ
ABSTRACT.....	XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Kan Damarları.....	2
2.1.1. Kapillerler .....	2
2.2. Serebral KavernoZ Malformasyon .....	3
2.2.1. SKM Proteinleri .....	6
2.2.1.1. CCM1 (KRIT1- Krev interaction trapped 1) .....	6
2.2.1.2. CCM2 (MGC4607, Malcavernin).....	8
2.2.1.3. CCM3 (PDCD10).....	9
2.2.1.4. Heterotrimetrik CCM1-CCM2-CCM3 Oluşumu: ‘CCM Kompleksi Sinyal Platformu’ .....	11
2.2.2. SKM Patogenezinde Rol Alan Mekanizmalar .....	11
2.2.3. SKM Teşhis ve Tedavisi .....	15
2.2.3.1. Mikrocerrahi ile Rezeksiyon.....	16
2.2.3.2. Stereotaktik Radyocerrahi.....	17
2.2.3.3. Konservatif Tedavi.....	18
2.3. Ribonükleik Asit (RNA) .....	18
2.3.1. mRNA Biyogenezi ve Transkripsiyon.....	19
2.3.1.1. Başlama .....	20
2.3.1.2. Elongasyon (Uzama).....	21

2.3.1.3. Terminasyon (Sonlanma).....	21
2.3.2. mRNA ve Hastalıklar.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Doku Örnekleri.....	29
3.1.1. Kavernom Doku Örnekleri.....	29
3.1.2. Kontrol Grubu Örnekleri.....	29
3.2. Kesit Alma.....	30
3.3. Histolojik Boyama.....	30
3.4. Görüntüleme.....	31
3.5. Dokulardan RNA İzolasyonu.....	31
3.5.1. Total RNA Miktar Tayini.....	32
3.6. Mikroarray Analizi.....	32
3.6.1. RNA'nın ve Poli-A RNA Kontrollerinin Hazırlanması.....	33
3.6.2. Tek Zincir cDNA Sentezi.....	34
3.6.3. cDNA Pürifikasyonu.....	35
3.6.4. Promotor Sentezi.....	35
3.6.5. <i>In vitro</i> Transkripiyon.....	36
3.6.6. senseRNA Pürifikasyonu.....	36
3.6.7. Saflaştırılmış senseRNA Miktar Tayini.....	37
3.6.8. Çift Zincir cDNA Sentezi.....	37
3.6.9. Çift Zincirli cDNA Pürifikasyonu.....	37
3.6.10. Saflaştırılmış Çift Zincirli cDNA Miktar Tayini.....	38
3.6.11. Çift Zincirli cDNA'nın Terminal Etiketlenmesi.....	38
3.6.12. Array Hibridizasyonu.....	38
3.6.13. Yıkama, Boyama, Tarama.....	39
3.7. Veri Analizi.....	39
3.7.1. Verilerin Programa Yüklenmesi, Normalizasyonu ve Gen Listelerinin Belirlenmesi.....	39
3.7.2. Ayırt Edici Gen Ekspresyonu Analizi.....	41
3.7.3. Venn Diyagramının Oluşturulması.....	41
3.7.4. Yolak Analizleri.....	41
3.7.5. Verilerin Kümelenmesi (Clustering) ve Görselleştirilmesi.....	41
3.7.6. Protein-Protein Etkileşim Ağı Analizi.....	41

3.7.7. Ayırt Edici Genlere Odaklı Veritabanı ve Literatür Taraması.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Histolojik Boyama .....	43
4.2. Total RNA'nın Nanodrop ile ölçülmesi.....	44
4.3. Saflaştırılmış senseRNA Miktar Tayini.....	44
4.4. Saflaştırılmış Çift Zincirli cDNA Miktar Tayini .....	45
4.5. Data Eldesi ve Sonuçların İşlenmesi.....	45
5. TARTIŞMA .....	70
KAYNAKLAR .....	80
HAM VERİLER .....	105
FORMLAR .....	106
ETİK KURUL KARARI .....	107
PATENT HAKKI İZİNİ .....	110
TELİF HAKKI İZİNİ.....	111
ÖZGEÇMİŞ .....	112

**TABLolar LİSTESİ**

Tablo 3-1: Hasta grubuna ait dokuların özellikleri .....	29
Tablo 3-2: Kontrol grubuna ait dokuların özellikleri.....	30
Tablo 3-3: Masson kitinde kullanılan histolojik boyalar .....	30
Tablo 3-4: Masson kiti işlem basamakları ve süreleri .....	31
Tablo 3-5: Poli-A kontrol stok seri sulandırımı.....	34
Tablo 3-6: R konsolunda yapılan işlemler ve uygulanan R komutları .....	40
Tablo 4-1: Nanodrop ile tayin edilen total RNA miktarları.....	44
Tablo 4-2: Nanodrop ile tayin edilen total senseRNA miktarları.....	44
Tablo 4-3: Nanodrop ile tayin edilen total cDNA miktarları.....	45
Tablo 4-4: $p<0,05$ değeri için CvsH, CvsE ve CvsEvsH gruplarında anlamlılık gösteren genler .....	46
Tablo 4-5: Farklı gruplara ait ortak genlerin listesi .....	55

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: CCM1'in yapısı ve domainleri.....	6
Şekil 2-2: CCM2'nin yapısı ve domainleri.....	8
Şekil 2-3: CCM3'ün yapısı ve domainleri.....	10
Şekil 2-4: mRNA'nın yaşam döngüsü.....	19
Şekil 2-5: mRNA uç-birleştirme mekanizması aşamaları .....	22
Şekil 3-1: Gereç ve yöntem iş akış şeması .....	28
Şekil 3-2: Mikroarray analiz basamakları.....	33
Şekil 4-1: Kavernom dokularının Masson boya ile boyanması .....	43
Şekil 4-2: CvsE grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu .....	48
Şekil 4-3: CvsH grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu.....	49
Şekil 4-4: CvsEvsH grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu.....	50
Şekil 4-5: CvsE grubuna ait ısı haritası .....	51
Şekil 4-6: CvsH grubuna ait ısı haritası.....	52
Şekil 4-7: CvsEvsH grubuna ait ısı haritası.....	53
Şekil 4-8: CvsE, CvsH ve CvsEvsH gruplarındaki genlere ait Venn diyagramı.....	54
Şekil 4-9: CvsE grubu yolak analizi .....	56
Şekil 4-10: CvsH grubu yolak analizi.....	57
Şekil 4-11: CvsEvsH grubu yolak analizi.....	57
Şekil 4-12: Wikipathway veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları.....	58
Şekil 4-13: KEGG veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları .....	59
Şekil 4-14: Reactome veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları.....	60
Şekil 4-15: Panther veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları.....	61
Şekil 4-16: Pathway seçeneğine göre yapılan ORA analizinin farklı veritabanlarına göre gruplararası karşılaştırılması.....	62
Şekil 4-17: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin görev aldıkları biyolojik süreçler .....	63
Şekil 4-18: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin hücredeki yerleri .....	64
Şekil 4-19: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin moleküler işlevleri .....	65
Şekil 4-20: Gruplararası Geneontology sonuçlarının benzerliklerinin karşılaştırılması .....	66



Şekil 4-21: CvsE bağlantı analizi.....	67
Şekil 4-22: CvsH bağlantı analizi .....	68
Şekil 4-23: CvsEvsH bağlantı analizi .....	69



**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

ABCA-7: ATP-Binding Cassette, Sub-Family A, Member 7

AKT: Protein kinaz B

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

APE1: Apurinik/apirimidinik endonükleaz 1

ARD: Ankyrin repeat domain

AS-NMD: Alternatif splayzing bağımlı Anlamsız mutasyon-aracılı mRNA bozulması

ATP: Adenozin trifosfat

BMP6: Endogenöz kemik morfojenetik protein 6 (endogenous bone morphogenetic protein 6)

CCM: Serebral Kavernöz Malformasyonlar (Cerebral Cavernous Malformations)

CHM: Ortak Hispanik Mutasyon (Common Hispanic Mutation)

CPSF: Kesim ve poliadenilasyon spesifite faktör (Cleavage and the polyadenylation specificity factor)

CstF: Kesim stimülasyon faktörü (cleavage stimulation factor)

CTD: Karboksi-terminal domaini (Carboxy-terminal domain)

CTP: Sitidin trifosfat (Cytidine triphosphate)

CvsE: Kontrol grubu ile epileptik grubun karşılaştırılması

CvsEvsH: CvsE ve CvsH gruplarının kontrol ile karşılaştırılması

CvsH: Kontrol grubu ile hemorajik (kanamalı) grubun karşılaştırılması

CYR61: Sisteince zengin anjiyogenik indüsr 61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61)

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSE: Aşağıdaki dizi elementi (Downstream sequence element)

EJC: Ekson-ekson birleşim kompleksi (exon-exon junction complex)

EndMT: Endotelyal-Mezenkimal Geçiş (Endothelial-mesenchymal transition)

ESE: Ekzonik splayzing enhansır

EZH2: Enhancer of zeste homologue 2

FAT-H domain: C-terminal fokal adezyon hedefleyen-homoloji (Focal adhesion targeting-homology) domain

FOXO1: AKT – dependent forkhead box protein O1

GBM: Glioblastoma

GO: Gene ontology

GTP: Guanozin trifosfat (Guanosine triphosphate)

HCE: Human Capping Enzim

HCE: Human Capping Enzyme

HEG1: Heart of Glass 1

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee

HHD: Harmonin homology domain

HUGO: Human Genome Organisation

ICAP1: Integrin sitoplazmik domain-ilişkili protein-1 (Integrin cytoplasmic domain associated protein-1)

IVT: In-vitro Transkripsiyon

KLF4: Kruppel-like faktör 4

KRIT1: K-rev interaction trapped 1

lncRNA: Long non-coding RNA

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MEKK3: Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3

miRNA: mikro RNA

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme (Magnetic resonance imaging)

mRNA: Mesajcı Ribonükleik asit

mRNP: mRNA-protein kompleksi

MS: Multiple skleroz

MST4: Memeli STE20-like protein kinaz 4

MT: RNA 7-methyltransferase

MT: RNA 7-metiltransferaz

NMD: Anlamsız mutasyon-aracılı mRNA bozulması (Nonsense-mediated mRNA decay)

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man

ORA: Overrepresentation enrichment analysis

PC1: Principal component 1

PC2: Principal component 2

PCA: Principle Component Analysis  
PCNA: Proliferating cell nuclear antigen  
PDCD10: Programmed cell death 10  
PIC: Pre-inisiasyon kompleksi (Pre-initiation complex)  
Pol II: Polimeraz II  
Poli-A: Poliadenozin-A  
Pre-mRNA: prekürsör-mRNA  
PTB: Phosphotyrosine-binding domain  
PTC: Prematüre terminasyon kodonu  
RhoA: Rho activated  
RMA: Robust Multi-array Average  
RNA: Ribonükleik Asit  
RNAP II: RNA polimeraz II  
ROCK: Rho kinaz  
siRNA: Small interfering RNA  
SKM: Serebral Kaverno Malformasyon  
snoRNA: Small nucleolar RNA  
snRNA: Small nuclear RNA  
SRC: Stereotaktik Radyocerrahi  
SRSF2: Serin ve arjinince zengin splayzing faktörü 2 (Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2)  
TBP: TATA-bağlayan protein  
TBP: TATA-bağlayan protein (TATA-binding protein)  
TdT: Terminal deoksinükleotidil transferaz  
TF: Transkripsiyon Faktörü  
TFII: Polimeraz II için transkripsiyon faktörü  
TGF- $\beta$ : Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )  
TRES: Transkripsiyon taşıma (Transcription export) kompleks  
TrkA: Tropomyosin receptor kinase A  
UDG: Urasil DNA glikozilaz  
UTP: Üridin trifosfat (Uridine triphosphate)

VEGF:Damar endoteli büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor)

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGFR: Vascular endothelial growth factor receptor

WebGestalt: WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit

$\cap$  : Kesişim kümesi

$\downarrow$  : Anlatımı azalan gen

$\uparrow$  : Anlatımı artan gen



## ÖZET

Eren Gözel, H. (2018). Kavernom Dokusunda Genom Çaplı mRNA Ekspresyon Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : Serebral Kavernöz Malformasyonlar, mRNA, Mikroarray Analizi, Genom çaplı, Parafine gömülü doku.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:55143

Serebral Kavernöz Malformasyonlar, beyin kanamaları, epileptik nöbetler, fokal nörolojik bozukluklar veya baş ağrılarına neden olabilen, yavaş akımlı ve kılcalların böğürtlen benzeri şekil kazandıkları bir damar bozukluğudur. Azalmış apoptozis, sinyal yolakları bozuklukları, kontrol edilemeyen proliferasyon, artmış motilite ve özellikle anjiyogenez gibi birçok hücresel süreçte gen düzeyinde değişimler olmaktadır. Bu patofizyolojik süreçlere neden olan değişimlerin mRNA düzeyinde incelenebilmesi için, altı farklı hastaya ait kavernom dokusu parafin blokları ve dört farklı bireye ait normal beyin dokusu parafin bloklarından mRNA izolasyonu ve tam genom mikroarray analizi yapılmıştır. Deney tasarımı hastaların üç tanesi epilepsi, kalan üç tanesi ise hemoraji ile ilişkili belirtiler göstermektedir. Elde edilen ham veriler biyoinformatik yöntemlerle analiz edilerek önce ekspresyonu anlamlı şekilde değişiklik gösteren ilk 200 gen tespit edildi. Daha sonra anlamlı bulunan genlerin ekspresyon profilleri ve yolak analizleri yapıldı. Sonuçta elde edilen yeni aday genlerin ekspresyon profillerinin yanısıra, kavernom vakalarında damar sızdırmalarına ve hücresel değişimlere neden olabilecek bağlantı ve yapı proteinlerini, hücre bölünmesini kontrol eden proteinleri, epilepsi ile ilgili proteinleri kodladığı ortaya konulmuştur. Bu çalışma ile kavernom patogenezi ile ilgili yeni transkriptom verisi oluşturulmuş ve aday genler literatüre kazandırılmıştır. Bu bilgilerin ışığında gerçekleştirilecek ileri çalışmaların, kavernom dokusundaki hücresel değişimlerin, epileptogenez ve damar bütünlüğünün yitilmesi süreçlerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak, tanı ve tedaviye yönelik yeni yöntemlerin geliştirilmesine katkı sağlayabileceği beklenmektedir.

## ABSTRACT

Eren Gozel, H. (2018). Genome-wide Analysis of mRNA Expression in Cavernous Tissues. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Molecular Medicine. Doktora Tezi. İstanbul.

Key Words: Cerebral Cavernous Malformations, mRNA, Microarray Analysis, Genome-wide, Paraffin embedded tissue.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 55143

Cerebral Cavernous Malformation is a slow-flow mulberry-shaped vascular anomaly that may lead to hemorrhages in brain, epileptic seizures, focal neurologic disorders or headaches. There are gene-level changes in many cellular processes such as decreased apoptosis, signal pathway disorders, uncontrolled proliferation, increased motility and especially angiogenesis. In order to investigate the changes in these pathophysiological processes at the mRNA level, mRNA isolation and whole genome microarray analysis was performed from paraffin blocks of cavernous tissue from six patients and four healthy controls. Three out of six patients were having symptoms that are associated with epilepsy and the remaining three were associated with hemorrhage. Bioinformatics tools, top 200 significantly differential expressed genes were identified from the raw data. Next, expression profile and pathway analysis results were obtained. The resulting candidate genes encode proteins that control cell division, involved in epilepsy, have a function in cell structure and cell junction, which can cause vessel infiltration and cellular alterations in cavernous malformations. In this research, new transcriptome dataset and novel genes that may be associated to cavernous pathogenesis have been introduced into the literature. It is expected that further studies in the light of this information may contribute to the development of new methods for diagnosis and treatment by providing a better understanding of the cellular changes in cavernous tissue, epileptogenesis, and vascular disintegration processes.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bu tezin öncelikli amacı, daha önce literatürde açıklanmamış mRNA – kavernom oluşumu ilişkisini, kavernom dokusunda genom çapında mRNA analizi yaparak ortaya koymaktır.

Sağlıklı beyin dokuları ile kavernom dokularındaki mRNA anlatım profilleri karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ayırt edici, biyopsi için yönlendirici veya alternatif olarak kullanılabilir mRNA biyobelirteçlerinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Anlamli mRNA anlatımları bulunduğu takdirde bunların işlevlerine uygun olarak hastalık patogenezi açıklanması amaçlanmaktadır.

Çalışmanın ikinci amacı ise moleküler çalışmalarda güvenle kullanılabilir taze doku alternatifleri olarak parafin doku bloklarının denenmesidir. Özellikle nöronal hastalıklarla yapılan çalışmalarda en büyük zorluk olan taze doku eldesi, parafine-gömülü dokular kullanılarak aşılmaya çalışılmıştır. Parafine-gömülü doku kullanımı ile; zaman kazanımı, daha kaliteli (çalışma için belirtilen kriterlere tam uyumlu) dokular ile çalışma, patoloji arşivlerinde bekleyen dokuların literatüre kazandırılması, aynı doku ile zaman sınırı olmadan tekrar çalışılabilmesi, hastalığın seyrini ve hastalara post-operatif uygulanan tedavilerin takip edilebilmesinde kolaylık sağlaması gibibirçok avantaj kazandırmaktadır. Parafin dokuların kullanıldığı ve elde edilen ürün verimliliğın yüksek olduğunu gösteren çalışmaların literatürde artması,benzer çalışmaların yapılmasını da teşvik edecektir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kan Damarları

İnsan vücudunda başlıca 5 çeşit kan damarı bulunmaktadır: Arter, arteriyol, kapiller, ven, venül. Arterler kanı organlara taşıırken, venler ise dokulardan gelen kanı kalbe doğru taşımaktadırlar. Büyük, elastik arterler kalpten çıkar ve dallanarak orta büyüklükteki musküler arterleri, onlar da dallanarak boyutça daha küçük olan arteriyolleri oluşturmaktadırlar. Arteriyoller dokuya girerken ‘kapiller’ adı verilen büyüklük olarak daha küçük olan damarlara dallanmaktadırlar. Bu damarların ince duvarları kan ve dokular arasındaki madde değişimine olanak sağlamaktadır.

#### 2.1.1. Kapillerler

5-10 µm çapındaki kapillerler(*capillus*=küçük saç), vücudumuzun en küçük kan damarlarını oluşturmaktadır. Bu damarlar u-şeklinde yapılar oluşturarak arteriol akış ile venöz akış arasında bir bağlantı bölgesi oluşturmaktadırlar.20 milyardan fazla kapiller kısa dallanmalar yaparak hücrelerin arasından geçerek damarları birbirine bağlamaktadır. Bu büyük kapiller ağ sisteminin yüzeyi hücreler ile direkt temas halindedir. Burada kan akışı, metarteriyollerden kapillerler üzerinden postkapillervenüllere doğru gerçekleşmektedir ve bu akışa mikrosirkülasyon denmektedir. Eritrositlerin çapı 8 µm olduğundan kapillerlere giren bu hücreler çoğu zaman lümeninden geçebilmek için kendi üzerlerine katlanmaktadırlar.

Kapillerlerin temel görevi kan ile intersitisyel sıvı arasındaki madde alışverişini gerçekleştirmektir. Neredeyse vücuttaki her hücrenin yakınında bir kapiller bulunmaktadır ve hücre etrafındaki damar sayısı, hücrenin metabolik aktivitesi ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Epitel dokuda, korneada, gözün lensinde ve kıkırdakta ise kapiller bulunmamaktadır.

Kapiller duvarında, tunika mediya ve tunika eksterna tabakaları bulunmamaktadır. Bunun yerine madde alışverişine olanak sağlamak amacıyla, damar sadece tek sıra yassı epitel ve altındaki bazal membrandan oluşmaktadır.

İnsan vücudunda 3 çeşit kapiller bulunmaktadır: Sürekli(continuous) kapiller, fenestralı kapiller ve sinuzoidler.

Vücutta en fazla bulunan kapiller çeşidi ‘sürekli’ olandır. Bu kapiller çeşidinde endotel hücreler birbirine bitişik olarak sıralanarak kapalı bir tüp şeklindeki damarı oluşturmaktadırlar. Sıkı bağlantılar ile endotel hücreler birbirine sıkıca bağlanmıştır ve bu nedenle çoğu zaman ancak su ve çeşitli iyonların geçişi buradan olabilmektedir. Sürekli kapillerlere sıklıkla; merkezi sinir sisteminde, akciğerlerde, deride, kaslarda ve ciltte rastlanılmaktadır.

Fenestralı(fenestr=pencere) kapillerleri oluşturan endotel hücrelerinin plazma membranlarında, çapları 70-100 nm arasında değişen büyüklüklerde küçük porlar bulunmaktadır. Bu porlar daha büyük moleküllerin geçişine olanak sağlamaktadır. Fenestralı kapillerler; böbrekte, ince bağırsağın villuslarında, beyindeki koroid pleksuslarda, gözlerdeki siliyar uzantılarda ve endokrin bezlerde bulunmaktadır.

Sinuzoidler, vücutta en az bulunan bu kapillerler, diğer kapiller çeşitlerine göre daha geniştir ve daha fazla kıvrım içermektedirler. Endotel hücreleri geniş fenestralar içermektedir. Bazal membran ise bazılarında düzensiz olarak bulunmakta veya hiç bulunmamaktadır. Sinuzoidlerin içerdiği geniş boşluklardan proteinler gibi büyük moleküller ve hatta bazı durumlarda kan hücreleri bile geçebilmektedir. Sinuzoidler; kemik iliğinde, karaciğerde, dalakta, ön hipofizde, paratiroid ve adrenal bezlerde bulunmaktadır(Tortora ve Derrickson 2012).

## **2.2. Serebral Kavernozy Malformasyon**

Serebral Kavernozy Malformasyon (SKM), merkezi sinir sisteminde bulunan sürekli kapillerlerde, tekli veya çoklu olarak lümen formasyonlarının oluşması ile karakterize olan bir hastalıktır (OMIM #116860, 603284, 603285). Oluşan bu lümen yapıları nedeniyle damarlarda sızdırma veya kan-beyin bariyeri yapısında bozukluklar görülebilmektedir(Cavalcanti ve ark. 2012).Asemptomatik olabilmekle beraber, bu yapısal bozukluklar;epileptik nöbetler(%40-70),hemorajik felç(%30-40) ve başağrısı(%10-30) gibi ciddi nörolojik semptomlara neden olabilmektedir(Kumar ve ark. 2014).

SKM lezyonları beyin her bölgesinde oluşabilmektedir. Bununla birlikte lezyonların, %76’sı supratentoryal bölgede, %23’ü infratentoryal bölgede ve %1’lik bir orandaki lezyon ise her iki bölgede de görülmektedir(Gross ve ark. 2011). Bir çalışmada, supratentoryal kavernoma sahip bireylerin %53’ünde epileptik nöbetlerin

görüldüğü ve infratentoryal kavernoma sahip bireylerin %64'ünde ise nörolojik bozuklukların olduğu ortaya konmuştur(Moriarity ve ark. 1999).

SKM'nin görülme sıklığı(prevalansı), genel populusyonda %0,1-0,5'dir. Ailesel formda görülen tüm vakaların yaklaşık %50 kadarı Hispanik-Amerikalı nüfusta görülmektedir. Bu oran diğer nüfuslarda %20-40 arasında değişmektedir(Rigamonti ve ark. 1988; Pozzati ve ark. 1996). Yapılan bu çalışmalara istinaden, dünya çapında 18 ile 22 milyon SKM hastası olduğu düşünülmektedir(Lanzino ve Spetzler 2007).

SKM, bebek ve çocuklarda görülebilse de, bir çok hastada semptomların görülmesi çoğunlukla 20 ile 50 yaş aralığında olmaktadır(Robinson ve ark. 1991; Del Curling ve ark. 1991; Zabramski ve ark. 1994). SKM vakalarının %50-80'de hiçbir semptom görülmez iken,bazı vakalarda da semptomlar birden ortaya çıkabilmektedir(Choquet ve ark. 2015; Kim 2016). SKM vakalarının yaklaşık %15-20'si ise başağrısı ile gelen hastaların tedavisi sırasında ortaya çıkmaktadır(Robinson ve ark. 1991; Del Curling ve ark. 1991).

En yaygın görülen semptom epileptik nöbetlerdir ve görülme sıklığı %40'dan %80'lere kadar çıkabilmektedir(Giombini ve Morello 1978; Robinson ve ark. 1991; Del Curling ve ark. 1991; Rigamonti ve ark. 1988; Zabramski ve ark. 1994; Alvarez-Sabin ve ark. 1991). Nöbetlere neden olan temel mekanizma bilinmemekle beraber, hemosiderindeki demir birikimi ile ilişkili olabileceğinden şüphenilmektedir. Demir, iyi bilinen bir epileptogenik ajandır ve hayvan modellerinde epileptik nöbetleri tetiklemek için sıklıkla kullanılmaktadır(Willmore ve ark. 1978; Chusid ve Kopeloff 1962).

Intrakraniyel kanamalar, hem supratentoryal hem de infratentoryal konumlu lezyonlarda görülebilmektedir. Daha önce herhangi bir kanama görülmemiş hastalarda yıllık kanama görülme riski %0,7-1,1 iken, daha önce kafaiçi kanama görülen hastalarda kanama oluşma riski %4,5'e çıkmaktadır(Campbell ve ark. 2010; Robinson ve ark. 1991; Chalouhi ve ark. 2011; Kondziolka ve ark. 1995). Kanama riskinin sıklığı; lezyonların hastada bulunduğu yere, lezyonun boyutuna ve hastanın cinsiyetine göre değişiklik gösterebilmektedir(Mouchtouris ve ark. 2014). Yüzeysel kavernomlardaki kanama riski, daha derinde bulunan kavernomlara göre daha düşüktür. Örneğin,supratentoryal konumlu lezyonlarda kanama riski %0,4 iken, infratentoryal konumlu lezyonlarda kanama riski %3,8'dir(Chalouhi ve ark. 2011; Porter ve ark.

1997). Ayrıca kadın hastalardaki lezyonlar erkek hastalara göre daha ağır bir tablo ile seyretmektedir (Porter ve ark. 1999; Aiba ve ark. 1995).

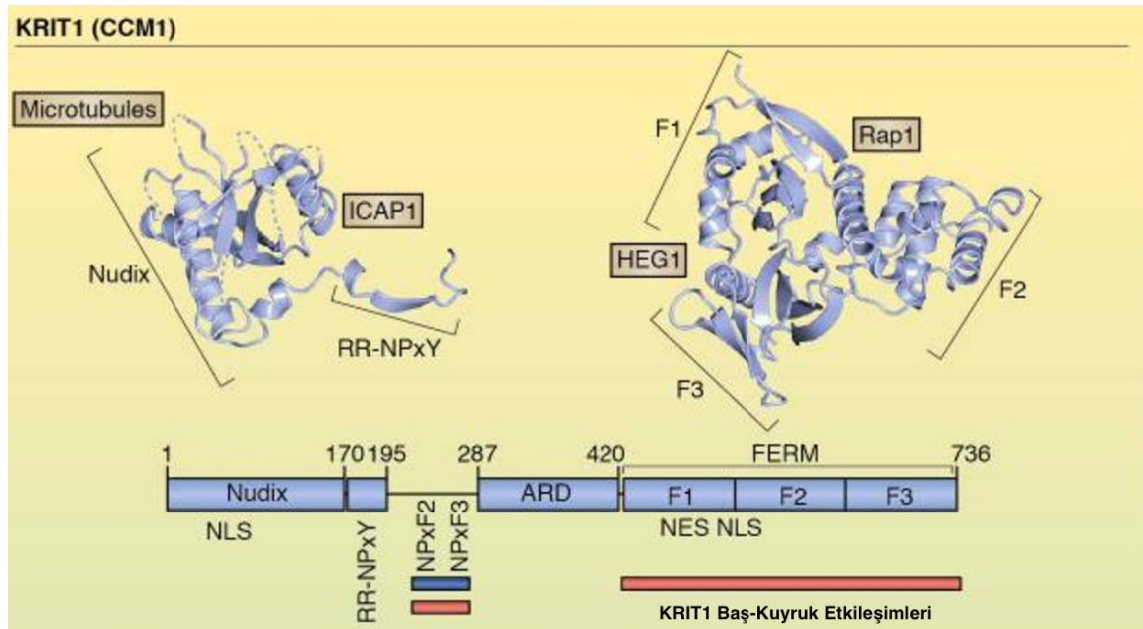
SKM'nin sporadik ve ailesel formları bulunmaktadır. Ailesel formunda ve sporadik formun yaklaşık %50'sinde; *CCM1* (KRIT1), *CCM2* (OSM veya malkavernin) ve *CCM3* (PDCD10) adlı 3 genden en az birinde işlev kaybı mutasyonları görülmektedir (Draheim ve ark. 2014). Ailesel vakalarda, *CCM1*, *CCM2* ve *CCM3* mutasyonlarının görülme sıklığı yaklaşık olarak sırasıyla, %53-65, %15-19 ve %10-22'dir (Spiegler ve ark. 2014; Denier ve ark. 2006; Riant ve ark. 2013) ve otozomal dominant kalıtım göstermektedir. SKM'nin sporadik formunda, hastaların aile geçmişinde SKM vakalarına rastlanılmamaktadır ve MRI bulguları genellikle tek bir lezyonu işaret etmektedir (Labauge ve ark. 1998; Petersen ve ark. 2010). Ailesel formunda ise hastalarda çoklu ve zamanla büyüklüğü artabilen lezyonlara rastlanmaktadır (Rigamonti ve ark. 1988). Ayrıca sporadik formda (%44), SKM ilişkili-venöz anomali gelişiminin, hispanik ailesel formlara (*CCM1*-CHM) (%1,2) nazaran daha yüksek insidansa sahip olduğu bildirilmiştir (Petersen ve ark. 2010). Hispanik ailesel ve sporadik formların genotipik farklılıklarından bir diğeri ise, ailesel *CCM1*-CHM mutasyonlarına sahip bireylerdeki ak madde anomali prevalansının (%15,4), yaş-uyumlu sporadik forma (%2,5) sahip bireylere ve sağlıklı bireylere (%2,1) kıyasla daha yüksek olmasıdır (Golden ve ark. 2015). İki form arasındaki bu farklılıkların nedeni bilinmemekle birlikte, büyük ihtimalle farklı gelişim mekanizmalarına sahip olduklarını düşündürmektedir (Choquet ve ark. 2015).

SKM genlerinin ürünleri olan SKM proteinlerinin, yakın ilişkili olduğu hücre iskeleti ve endotel hücreleri arasındaki hücre bağlantı proteinleri üzerinden anjiyogenezde önemli bir role sahip olduklarını göstermektedir (Yadla ve ark. 2010). Günümüze kadar olan süreçte, *CCM1* gen bölgesinde 100'den fazla, *CCM2*'de 30 ve *CCM3*'de 20 kadar mutasyon tespit edilmiştir (Kumar ve ark. 2014; Draheim ve ark. 2014; Kim 2016). Bu mutasyonların çoğu ya erken kodon sonlanmasına ya da *CCM* gen bölgelerinde büyük delesyonlara neden olmaktadır (Kim 2016). Bu anomaliler ise, damar endotel yapısını bozarak, damarın böğürtlen benzeri şekil almasına ve hücre bağlantı proteinlerinde bozukluklara yol açarak damarın sızıntı yapmasına neden olmaktadır.

## 2.2.1. SKM Proteinleri

### 2.2.1.1. CCM1(KRIT1- Krev interaction trapped 1)

SKM ile ilişkili olduğu bulunan ilk gen bölgesidir(Dubovsky ve ark. 1995). Kromozom 7q11.2-21'de bulunmaktadır(Kleaveland ve ark. 2009; Laberge-le Couteulx ve ark. 1999). KRIT1 proteini, 736 aminoasitten meydana gelmektedir ve CCM proteinleri içerisinde en büyüğüdür. N-terminal Nudix domainini izleyen 3 adet NPxY/F motifi ile Ankirin-tekrar domaini(ARD-Ankyrin repeat domain) ve C-terminal FERM domaini içermektedir(Liu ve ark. 2013; Gingras ve ark. 2013; Li ve ark. 2012)(Şekil 2-1).



Şekil 2-1: CCM1'in yapısı ve domainleri(Draheim ve ark 2014).

Her ne kadar bu proteinin kendisi katalitik bir aktiviteye sahip olmasa da ilişkili olduğu diğer proteinlerin birçok sinyal yolağında görev aldığı düşünülmektedir. KRIT1, erken embriyogenezin başında özellikle büyük damarların endotel hücrelerinde eksprese olmaktadır(Guzeloglu-Kayisli ve ark. 2004). KRIT1 ayrıca endotel hücre sınırlarında ve hücre-hücre bağlantı noktalarında lokalize olmaktadır(Glading ve ark. 2007; Zawistowski ve ark. 2005).

Son yapılan kristallografik analizler, KRIT1 FERM domaini ile Rap1 proteininin bağlandığını göstermektedir (Gingras ve ark. 2013; Li ve ark. 2012). Rap1 proteininin bağlanması ile KRIT1'in mikrotübüllere bağlanmasını (Béraud-Dufour ve

ark. 2007) inhibe ederek KRIT1'in tekrar konumlanmasını ve hücre-hücre stabilizasyonunu sağlamaktadır(Liu ve ark. 2011).

KRIT1 FERM domaini aynı zamanda transmembran proteinlerinden HEG1(heart of glass 1)'e bağlanmaktadır. HEG1 proteini, KRIT1'in hücre bağlantı noktalarındaki lokalizasyonundan sorumludur. Zebra balığında yapılan çalışmalar sonucunda, Rap1 veya HEG1 proteinlerinden herhangi birine bağlanamayan KRIT1 mutantı taşıyan balıklarda kardiyovasküler gelişim defektlerinin oluşabileceğine işaret etmektedir(Liu ve ark. 2011; Gingras ve ark. 2012).

KRIT1 proteinine bağlanan başka bir protein, hücrede  $\beta 1$  integrin aktivasyonunu negatif olarak düzenleyen ICAP1(integrin cytoplasmic domain associated protein-1) supressor proteinidir(Liu ve ark. 2013; Millon-Frémillon ve ark. 2008). İntegrinler; hücrenin, hücre-dışı matrikse bağlanmasında görev almanın yanı sıra hücreden hücreye sinyal iletimi, emriyogenez ve doku tamiri gibi süreçlerde de etkili olan transmembran reseptörlerdir. ICAP1'in ilk üç NPxY/F motif içeren domainine KRIT1 ve  $\beta 1$  integrin peptidleri bağlanabilmektedir. ICAP1'in integrin yerine KRIT1'e bağlanması, hücrede integrin aktivitesinin artmasına sebep olmaktadır(Liu ve ark. 2013). Tam mekanizması bilinmemekle beraber, endotel hücrelerde KRIT1'in ICAP1 proteinini stabilize ettiği düşünülmektedir. KRIT1 mutasyonları, ICAP1 seviyelerini düşürerek yine hücrede  $\beta 1$  integrin aktivasyonuna neden olmaktadır(Faurobert ve ark. 2013). KRIT1-ICAP1 etkileşimini bozacak yönde bir mutasyon, hücrede anormal seviyede bir integrin aktivasyonunu tetikleyerek, normal doku gelişiminin sekteye uğramasına neden olabilmektedir(Baranoski ve ark. 2016).

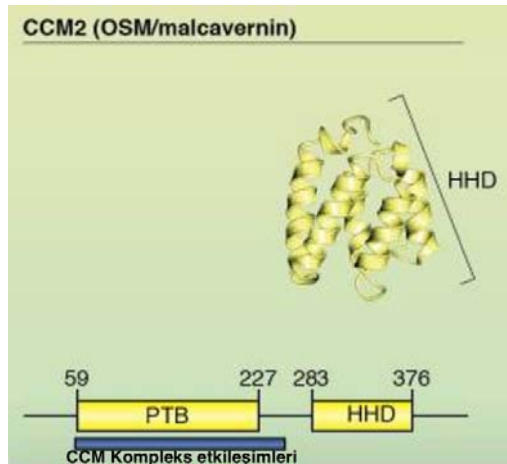
KRIT1 proteininin birçok önemli sinyal yolağı ile etkileşimde olduğu düşünülmektedir. KRIT1 overekspresyonu, hücrede HEY1 ve DLL4 (Notch sinyal yolağı aktivasyonu belirteçleri) artışı; KRIT1'in susturulması ise Notch sinyalizasyon kaybı ile sonuçlanmaktadır(Wüstehube ve ark. 2010). Notch sinyal yolağı, fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K)/AKT aktivasyonu ve ERK1/2 baskılanması ile ilişkilidir. Bunun bir sonucu olarak endotel hücrelerde ve özellikle SKM'de, KRIT1 işlev kaybı mutasyonları, ERK1/2 fosforilasyon artışına neden olabilmektedir (Wüstehube ve ark. 2010). Kusurlu KRIT1 içeren endotel hücrelerinde, Notch sinyalizasyonunda azalma ise düzensiz damar tomurcuklanmasına ve anormal anjiyogeneze sebep olabilmektedir.

KRIT1 aynı zamanda reaktif oksijen türevlerinin yıkımını düzenleyen yollarla ile de etkileşim halindedir. KRIT1'in hücrede azalması superoksit dismutaz-2'nin ekspresyonunu azaltarak reaktif oksijen türevlerinin miktarında artışa, AKT (protein kinaz B) fosforilasyonuna ve FOXO1(AKT –dependent forkhead box protein O1)fosforilasyonuna sebep olabilmektedir(Goitre ve ark. 2010).

KRIT1'in konformasyonel organizasyonunun(açık ve kapalı formları), hücredeki lokalizasyonu ve dolaylı olarak sinyalizasyonda önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin 'açık' konformasyonel formdaki KRIT1, ICAP1 ile bağlanabilmekteyken (Béraud-Dufour ve ark. 2007), 'kapalı' formunda ise mikrotübüllere bağlanabilmektedir (Francalanci ve ark. 2009). Bu bağlanmanın ne kadar özelleşmiş olduğu ve sinyalizasyonundaki önemi tam olarak anlaşılamamıştır.

#### 2.2.1.2. CCM2(MGC4607, Malcavernin)

CCM2, 444 aminoasitde sahip 51kDa ağırlığında bir proteindir. PTB ve Harmonin homology domain(HHD) adlı iki domaini bulunmaktadır. Anlatım paterni KRIT1'e benzeyen ve enzimatik aktivesi bulunmayan bu protein arteriyel endotel hücreler başta olmak üzere birçok dokuda bulunmaktadır (Petit ve ark. 2006; Seker ve ark. 2006). CCM2 proteini, başka birçok proteinin yanı sıra KRIT1 ve PDCD10 proteinlerine bağlanabilmektedir (Hilder ve ark. 2007) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: CCM2'nin yapısı ve domainleri(Draheim ve ark 2014).

CCM2, büyük ihtimalle KRIT1 ile etkileşime girerek nükleusun içi ve dışı arasında mekik dokumaktadır (Zhang ve ark. 2007). Endotelial hücre-hücre bağlantı bölgelerindeki varlığının KRIT1 yokluğu ile kaybedilmesi, CCM2'nin bağlantı bölgelerine yönlendirilmesinde KRIT1'in rolü olduğunu göstermektedir (Stockton ve ark. 2010).

CCM2, sinir hücrelerinde bulunan TrkA (Tropomyosin receptor kinase A) adlı bir reseptör tirozin kinaza bağlanarak, nöroblastoma veya medulloblastomada hücre ölümünü teşvik etmektedir (Harel ve ark. 2009). Hücre ölümünü teşvik etme mekanizması ise tam anlamıyla bilinmemektedir.

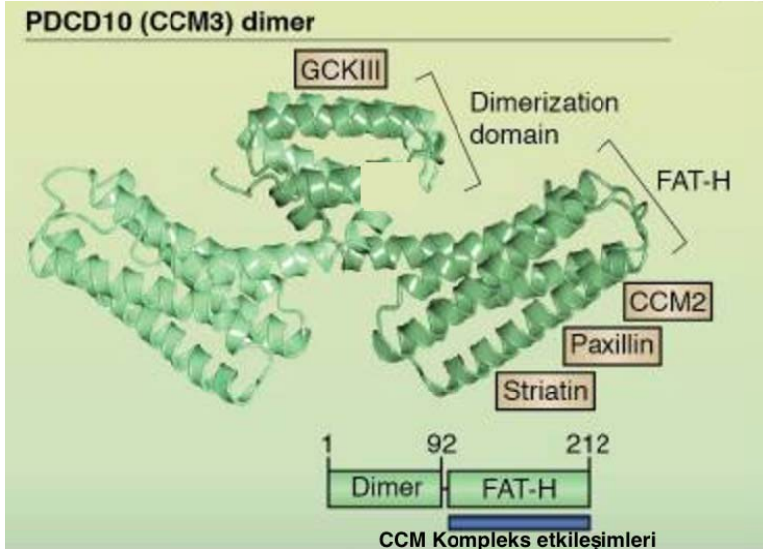
CCM2, aynı zamanda MEKK3 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3) için ozmo-duyarlı skaffold protein olarak da adlandırılmaktadır. Ozmotik şoka bağlı olarak CCM2 membranda tekrar lokalize olarak p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) aktivasyonunu tetiklemektedir (Uhlik ve ark. 2003; Zawistowski ve ark. 2005). Yapılan bir çok benzer çalışma, CCM2'nin MAPK yolaklarında oldukça karmaşık bir işlevi olduğunu işaret etmektedir fakat bu işlevin tam olarak anlaşılabilmesi için daha ileri araştırmalar gerekmektedir.

2012 yılında yapılan bir çalışmada endotel hücrelerde oldukça fazla anlatımı gerçekleşen CCM2-like proteini tanımlanmıştır (Zheng ve ark. 2012). Bu proteinin hastalıklardaki rolü bilinmese de yapılan hayvan çalışmaları bu proteinin CCM2 ile KRIT1'e bağlanma bakımından yarışa girdiğini göstermektedir (Rosen ve ark. 2013; Zheng ve ark. 2012).

### **2.2.1.3. CCM3 (PDCD10)**

Ailesel SKM'ye sahip hastalarda yapılan genetik analizler üçüncü bir CCM lokusunun keşfedilmesine olanak sağlamıştır. CCM3, 3q25.2-27'de lokalize olan 25kDa ağırlığında bir proteindir. PDCD10, N-terminal dimerizasyon domaini (Kean ve ark. 2011; Li ve ark. 2010) ve C-terminal fokal adezyon hedefleyen-homoloji (Focal adhesion targeting-homology - FAT-H) domaini içermektedir (Şekil 2-3).





**Şekil 2-3: CCM3'ün yapısı ve domainleri(Draheim ve ark 2014).**

CCM2(Hilder ve ark. 2007; Voss ve ark. 2007), GCKIII serin/tireonin kinazlar (Fidalgo ve ark. 2010; Xu ve ark. 2013; Zhang ve ark. 2013a), paxillin (Li ve ark. 2011), FAP-1 (PTPN13 olarak da bilinmektedir) (Voss ve ark. 2007), protokadherin- $\gamma$  (Lin ve ark. 2010), VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) (He ve ark. 2010), UNC13D (Zhang ve ark. 2013b) ve striatin (Goudreault ve ark. 2009; Kean ve ark. 2011) gibi birçok proteine bağlanabilmektedir. İşlevi hala bilinmemekle birlikte en dikkat çekici etkileşimlerden birisi heterotrimerik KRIT1–CCM2–PDCD10 kompleksidir (Hilder ve ark. 2007).

Proteomiks çalışmaları, düzgün bir kan damarı filizlenmesi (sprouting) için gerekli olan üçlü protein kompleksinin bileşenlerini ortaya koymuştur. Bu bileşenlerden biri de PDCD10 proteinidir. Bu protein, memeli STE20-like protein kinaz 4(MST4)ile etkileşime girmektedir.PDCD10, over-eksprese olduğunda MST4'ün kinaz aktivitesinde artışa, bu artış ise hücrenin çoğalmasına sebep olmaktadır. PDCD10/MST4 kompleksinin oluşumu ile ERK-MAPK yolağı üzerinden hücre büyümesi düzenlenmektedir.ERK-MAPK yolağı, hücre proliferasyonunu düzenleyen bir yolaktır ve bulgular bu yolağınSKM patogenezi ile ilişkiliolabileceğini işaret etmektedir(Ma ve ark. 2007).

Hücrelerde PDCD10 proteininin anlatımının artması ile hücre göçünün de arttığı tespit edilmiştir(Zhang ve ark. 2013a). Yönlendirilmiş hücre göçünün özellikle yeni damar oluşumunda önemli bir rolü olması bakımından bu mekanizmadaki bir karışıklık vasküler malformasyonlara neden olabilmektedir.

İlginç bir not olarak da, CCM3 genindeki mutasyonlar gerek insanlarda gerekse hayvan modellerinde fenotipik olarak daha ağır bir tabloya neden olmaktadır(Chan ve ark. 2011; Yoruk ve ark. 2012; Song ve ark. 2013).

#### **2.2.1.4. Heterotrimetrik CCM1-CCM2-CCM3 Oluşumu: ‘CCM Kompleksi Sinyal Platformu’**

SKM proteinleri birbirleriyle direkt olarak etkileşim halindedirler ve CCM1-CCM2-CCM3 temelli bir sinyalizasyon platformu oluşturmaktadırlar(Stahl ve ark. 2008; Voss ve ark. 2007).Yapılan çalışmalar, CCM2 ve CCM3 proteinlerinin stabilizasyonu için etkileşime girmelerinin şart olduğunu(Draheim ve ark. 2015) ve yine aynı şekilde CCM1’in stabilizasyonu için de CCM2 proteinine ihtiyaç duyduğunu göstermektedir(Faurobert ve ark. 2013).Bu çalışmalara göre CCM2’nin, CCM kompleksinin oluşumunda merkezi bir görevde olduğunu düşündürmektedir. Sahip olduğu PTB domaini ve PTB’nin korunmuş C-terminali; CCM1’in 2. ve 3. NPxY/F motifleri ile ve CCM3’ün focal adhesion targeting homology(FAT-H) adlı domaini ile etkileşime girmektedir(Li X. ve ark. 2010). Bir fosfoharitalama çalışması, CCM2’de 3’ü PTB domaini üzerinde olmak üzere 14 adet Ser/Thr fosforilasyon bölgesinin olduğunu ve burada gerçekleşen fosforilasyon tepkimeleri ile CCM sinyal kompleksinin oluşumunun etkilenebileceğini ortaya koymuştur(Kim ve ark. 2011). Her ne kadar bu üç CCM proteini bir araya gelerek bir kompleks oluştursa da CCM3’ün fonksiyonunun bir şekilde diğerlerinden farklı olabileceği düşünülmektedir(Kim 2016).

#### **2.2.2. SKM Patogenezinde Rol Alan Mekanizmalar**

2000’li yılların başlarına kadar SKM’ye neden olan veya SKM ilişkili patojenik mekanizmalar bilinmemekteydi(Choquet ve ark. 2015). Günümüzde ise birkaç mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bunlardan ilki Knudsonian ‘two hit’(iki vuruş) hipotezidir. Ailesel formlarda çoklu lezyonlar görülürken, sporadik formlarda tek lezyonun görülmesi araştırmacılara, lezyonlara sebep olan mutasyonların Knudsonian ‘two hit’hipotezine uygun olup olmadığını düşündürmüştür. Bu mekanizmaya göre, SKM formasyonunun oluşması için bir CCM gen bölgesindeki her iki allelin de tamamen

kaybedilmesi(mutasyona uğraması) gerekmektedir. Germline mutasyonu sonucunda allellerden sadece biri kaybedilir(ilk vuruş-first hit), fakat ikinci allelin kaybı için somatik bir mutasyon gerekmektedir. Bu görüşe göre ailesel SKM, otozomal dominant bir kalıtım gösterse de aslında hücrese seviyede resesiftir(Labauge ve ark. 2007; Gault ve ark. 2004; Akers ve ark. 2009). SKM'nin two hit hipotezine uygun olduğunu gösteren birçok çalışma literatürde mevcuttur(Gault ve ark. 2009; Gault ve ark. 2005; Akers ve ark. 2009; Mc Donald ve ark. 2014; Kehrer-Sawatzki ve ark. 2002; Reich ve ark. 2003; Plummer ve ark. 2004; Marini ve ark. 2004).

İkinci bir açıklama haplo-yetersizlik(haploinsufficiency)'dir. Bu durumda ise hasta, *CCM* genlerinin fonksiyonel tek bir kopyasına sahiptir. Diğer kopya bir mutasyon sonucunda inaktive olmuştur. Bu fonksiyonel tek kopya ise proteinin işlevini yerine getirmesi için yeterli olmamaktadır. Örneğin, endotel hücreleri *CCM1*(+/-) ve *CCM2*(+/-) haplo-yetersizlik gösteren farelerde damar geçirgenliğinin arttığı gözlemlenmiştir(Stockton ve ark. 2010).

Başka bir öneri paradominant kalıttır. Bu öneri SKM'nin bazı özelliklerini açıklayabilmektedir.Paradominant kalıtımda, heterozigot bireyler fenotipe yansımayan bir paradominant mutasyona sahiptirler. Bu özellik ise; ancak embriyogenez sırasında somatik bir mutasyon meydana gelirse, heterozigotluğun kaybına ve homozigot bir mutasyonun ortaya çıkmasına neden olarak görünür hale gelecektir(Haasdijsk ve ark. 2012).

SKM patogeneğinde bir diğer önemli mekanizmanın otofaji ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. *CCM1*, *CCM2* ve *CCM3*'ün bozulması ile mTOR-ULK1 yolu üzerinden otofaji supresyonu ve EndMT görülmektedir(Marchi ve ark. 2015). Sadece *CCM1*'in bozulması ile nükleer  $\beta$ -catenin lokalizasyonunda ve WNT sinyalizasyonunda artış meydana gelmektedir(Glading ve ark. 2007; Borikova ve ark. 2010).

Son öneri ise trans-heterozigositedir. Bu mekanizmaya göre SKM yolağındaki farklı genlerdeki mutasyonlar, sinerjistik bir etki oluşturmaktadır ve bu etki ile aynı ailedeki farklı hasta bireyler arasında ortaya çıkan klinik tablodaki farklılıklar açıklanabilmektedir. Örneğin *KRIT1*, *MGC4607* ve *PDCD10* genlerindeki mutasyonlar tek başlarına oluştuklarında klinikte çok az veya hiçbir değişiklik görülmezken, kombine şekilde oluştuklarında yüksek intrakraniyel hemoraj insidansına neden

olmaktadırlar(Gore ve ark. 2008; Revencu ve ark. 2006; Gault ve ark. 2004; Knudson 2001).

Yukarıda bahsedilen mekanizmaların daha ayrıntılı araştırılması gerekliliğinin yanısıra; CCM1, CCM2 ve CCM3'ün sinyal iletimi ve patogenez ile ilişkili yollardaki işlevlerinin de iyi anlaşılması gerekmektedir.

Yapılan çalışmalar, CCM1 ve CCM2 proteinleri arasında güçlü bir etkileşim olduğunu ve bu protein etkileşiminin, hem SKM sinyallerinin düzenlenmesinde (Zawitowski ve ark. 2005; Fisher ve ark. 2015), hem de genel sinyal yollarında rol oynayabileceğini işaret etmektedir(Yoruk ve ark. 2012). CCM3'ün ise daha farklı sinyal yollarında etkili olduğu bilinmektedir(Chan ve ark. 2011; Yoruk ve ark. 2012; Song ve ark. 2013; Zhu ve ark. 2010).

Araştırmalar; KRIT1, CCM2 ve PDCD10 proteinlerinin vasküler yapısal oluşumunda oldukça önemli rolleri olduğunu işaret etmektedir. KRIT1 veya PDCD10 anlatımındaki kayıplar, Delta-Notch sinyalizasyonunda meydana gelen karışıklıklar neticesinde kontrolsüz anjiyogeneze ve PDCD10 proteinlerindeki değişimlerin ise venöz endotel hücre farklılaşmasına yol açmaktadır (Wüstehube ve ark. 2010; You ve ark. 2013; Zheng ve ark. 2010). Bunlara ek olarak, KRIT1 bozuklukları TIAM–PAR3–PKC $\zeta$  polarite kompleksinin bağlantı bölgesindeki yerleşimini etkileyerek, kontrolsüz bir hücre göçü ve bozulmuş vasküler lümen formasyonuna neden olmaktadır (Lampugnani ve ark. 2010).

SKM lezyonlarında sıkça görülen damarların sızdırması hücre-hücre bağlantılarının zayıf veya düzensiz olması ile açıklanmaktadır. KRIT1, hücre bağlantı proteinlerinden VE-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin, AF6 (afadin veya MLLT4 olarak da isimlendirilmektedir) ve p120-catenin ile ilişkilidir (Glading ve ark. 2007). KRIT1 işlev kaybı mutasyonları,  $\beta$ -catenin ve VE-cadherin'in hücre-hücre bağlantılarında anlatımının azalmasına, nükleer  $\beta$ -catenin ve onun transkripsiyonel hedeflerinin ise artmasına neden olmaktadır (Glading ve Ginsberg 2010). Başka bir çalışmada ise Rho aktivasyonu ile CCM proteinlerinin ilişkisi ortaya konmuştur. RhoA ve efektörü Rho kinaz(ROCK)'ın aktivasyonu ile stres fiber formasyonu tetiklenerek sonucunda sıkı bağlantıların stabilitesinde azalmalar, anormal ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmeleri ve endotel geçirgenliğinde artış görülmektedir(Jaffe ve Hall 2005).

CCM1, CCM2 ve CCM3'ün kaybının Rho aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir(Borikova ve ark. 2010).

CCM1 ve CCM2 kayıpları  $\beta 1$  integrin aktivasyonunu arttıran ICAP-1'in destabilizasyonuna neden olmaktadır.  $\beta 1$  integrin aktivasyonu ise RhoA-bağımlı kontraktileteyi(Faubert ve ark. 2013; Whitehead ve ark. 2009) ve endotel hücrelerde p38, Akt ve ERK1/2 aktivasyonunu arttırmaktadır(Zhu ve ark. 2010). Anormal Rho aktivasyonuna sporadik SKM vakalarında da rastlanılmıştır(Stockton ve ark. 2010; McDonald ve ark. 2014).

Yakın zamanlı çalışmalar, CCM1 loss of function farenin endotel hücrelerinde, endotel-mezenkimal dönüşümün(endothelial-mesenchymal transition (EndMT)) varlığını göstermektedir(Maddaluno ve ark. 2013; Cuttano ve ark. 2015). EndMT, kardiyak fibrosis ve kanser progresyonunda görülmektedir. Bu durumun; endotel hücre fenotipini değiştirerek, hücrel bağlantı kayıplarına neden olduğu, hücrenin endotel-spesifik markerlarını kaybederken, mezenkimal spesifik marker ve göç etme özellikleri kazanmasına yol açtığı bilinmektedir. EndMT, endogenöz kemik morfogenetik protein 6(endogenous bone morphogenetic protein 6-BMP6)'nın upregülasyonu ve transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$  - TGF- $\beta$ )'nin aktivasyonu sonucunda ortaya çıkabilmektedir(Kim 2016). CCM1, bir Notch aktivatörüdür ve CCM1, ICAP1 ve CCM3 kayıplarında Notch sinyalizasyonunda downregülasyona yol açarak anjiyogenez arttırdığı bilinmektedir(Wüstehube ve ark. 2010; Brutsch ve ark. 2010; You ve ark. 2013). Bu bulgular ise, CCM1'in overekspresyonunun Notch aktivasyonuna ve VEGF ile uyarılması sonrası anjiyogenez sproutingde azalmaya neden olduğunu düşündürmektedir(Wüstehube ve ark. 2010). CCM1-aracılı Notch inhibisyonu ve Kruppel-like factor 4(KLF4) indüksiyonu, BMP6'nın upregülasyonuna ve EndMT'ye yol açmaktadır(Cuttano ve ark. 2015; Wüstehube ve ark. 2010). Başka bir çalışma ise CCM1 ve CCM3'deki (fakat CCM2 değil) bozuklukların nüklear  $\beta$ -catenin ve VEGF sinyallerinde artışa sebebiyet verdiğini işaret etmektedir(You ve ark. 2013; DiStefano ve ark. 2014).

SKM proteinlerinin VEGF ve Notch sinyal yollarına dahil olması, bu proteinlerin, lezyondaki endotel olmayan hücreler üzerine de parakrin bir etkisi olabileceğini akla getirmektedir. Gerçekten de bir çalışma, CCM3 bozukluğunun VEGF sekresyonunu arttırmak suretiyle endotel hücrelerde Erk1/2 ve AKT'yi aktive ettiğini

(Zhu ve ark. 2010;Zhu ve ark. 2015) ve Glioblastoma(GBM) ksenograft fare modelinde, endotelial CCM3 bozukluğunun GBM hücre proliferasyonunu indükleyerek tümör progresyonunu arttırdığını göstermektedir(Zhu ve ark. 2015). Başka bir çalışmada ise, CCM1 knockdown edilmiş endotel hücrelerinin yanındaki perisit hücrelerindeki Notch sinyalini deregüle ettiği belirtilmiştir(Schulz ve ark. 2015).

Kombinasyonel etkiler ve genetik değiştiriciler, SKM'nin radyolojik ve klinik olarak eksik penetrasyonunu kısmen de olsa açıklayabilmektedir. Azalmış ekspresyon veya proteinlerin bozulan fonksiyonları ile oluşan kombinasyonel etkiler, zebra balığında gösterilmiş(Gore ve ark. 2008) ve buradaki genetik yatkınlığın oksidatif stres ile ilişkili olabileceği önerilmiştir(Choquet ve ark. 2015; Rinaldi ve ark. 2015). SKM patogenezinde oksidant yolağı ilişkisini gosteren başka çalışmalarda ise; CCM1'in, bir antioksidant proteini olan SOD2'nin ekspresyon seviyesini düzenleyebildiği gösterilmiştir (Goitre ve ark. 2010; Rinaldi ve ark. 2015).

CCM genlerinin SKM lezyonları ile ilişkisi birçok çalışma ile açıklanmaya çalışılsa da hem ilişki hem de mekanizma yönünden açıklanması gereken bir çok karanlık nokta varlığını korumaktadır. Örneğin, CCM1 ve CCM2 mutasyonları görülmeyen bir çok ailede CCM3 gen mutasyonunun görülmeye frekansının düşük olması (Bergametti ve ark. 2005; Denier ve ark. 2006; Liquori ve ark. 2006; Liquori ve ark. 2007) ve özellikle ailesel vakaların %5-15'inde her üç gende de bir mutasyonun tespit edilememesi araştırmacıları başka genlerin veya proteinlerin varlığını düşündürmektedir(Riant ve ark. 2013).

Yapılan son araştırmalar, SKM ilişkili yeni genlerin varlığını ve özellikle nörovasküler mikro-çevresindeki değişimlerin lezyon oluşumunda rolü olabileceğini işaret etmektedir (Boulday ve ark. 2011; Dammann ve ark. 2013). Bu lokal değişimlerin mRNA düzeyinde incelenmesi ile hastalığın patogenezi, tanımlanması ve tedavisi ile ilgili literatürde karanlık kalmış kısımlara ışık tutabileceğine inanmaktayız.

### **2.2.3. SKM Teşhis ve Tedavisi**

Çoğu zaman semptom oluşurmeyen SKM'lerin teşhisi oldukça güçtür. Damar bozukluklarının teşhisinde yoğun olarak kullanılan ve özellikle venöz bozuklukları tespit edebilen anjiyografi, SKM teşhisi için yetersiz kalmaktadır. Doğru bir SKM teşhisi için manyetik rezonans görüntülemesi(MRI) uygulanmalıdır(Mouchtouris ve ark. 2014).

Günümüzde SKM için, mevcut 3 tedavi seçeneği bulunmaktadır: Mikrocerrahi ile rezeksiyon, Stereotaktik radyocerrahi ve Konservatif tedavi. Bu yöntemlerin dışında onaylanmış bir tıbbi tedavi bulunmamaktadır.

Mevcut tedavi seçeneklerinden hangisinin hastaya uygulanacağı ise, semptomların görülüp görülmemesi, epilepsinin varlığı, birincil veya tekrarlayan kanamalar, nörolojik bozukluklar gibi bir dizi faktöre bağlıdır. Yine de SKM'nin temel patofizyolojisinin bilinmemesi, özellikle cerrahi olarak erişimin zor olduğu bölgelerde bulunan kavernomlara rezeksiyon uygulanamaması gibi nedenler tedavi sürecini ve yeni tedavi uygulamalarının geliştirilmesini zorlaştırmaktadır.

### **2.2.3.1. Mikrocerrahi ile Rezeksiyon**

SKM'ler, damarlarda büyüme artışının veya gerilemesinin görülebildiği, bazen *de novo* lezyonların da oluşabildiği dinamik yapılı lezyonlardır(Raychaudhuri ve ark. 2005; Clatterbuck ve ark. 2000).

SKM'nin cerrahi olarak alınabilmesi için, hastaların beynindeki birden fazla bölgede kanama oluşması, rezeksiyonun yapılacağı bölgeye cerrahi erişimin kolay olması veya lezyonların nörolojik bozukluklara sebebiyet vermesi gerekmektedir(Steinberg ve ark. 2000).

Ameliyattan 1-2 hafta önce,ödem oluşumunu azaltmak adına hastayasteroid verilmektedir. Rezeksiyonu takiben bölgede; gliozis, kalsifikasyon veya hyalin dejenerasyonu görülebilmektedir(Mouchtouris ve ark. 2014; Wang ve ark. 2003).

Tekrarlayan kanamaları engellemek adına lezyonun tamamının alınması gerekmektedir. Tamamı alınmayan lezyonlara ait cerrahi kalıntılar nedeniyle hastaların %40'ında kanamanın tekrarladığı görülmektedir. Bu nedenle operasyonu takiben 72 saat içerisinde hastaya MRI çekilmesi önerilmektedir. Lezyon kalıntılarının tespiti yapılırsa hastaya mümkün olan en kısa süre içerisinde tekrar cerrahi olarak müdahalede bulunulması gerekmektedir(Cenzato ve ark. 2008).

Semptomlara neden olan lezyonun lokasyonu, beynin önemli fonksiyonlarını getiren bölgelerde(noneloquent area) bulunmuyorsa bu tip SKM'lerin cerrahi olarak alınması önerilmektedir. Böylelikle mevcut epilepsi ve gelecekte meydana gelebilecek kanamaların da tedavisi yapılmış olmaktadır(D'Angelo ve ark. 2006; Bertalanffy ve ark. 2002). Fakat beynin önemli fonksiyonlarını getiren bölgelerde(eloquent area) bulunan

ve az veya herhangi bir semptom göstermeyen lezyonların rezekte edilip edilmeyeceği karar vermek oldukça güç olmaktadır.

Mikrocerrahi ile rezeksiyon, lezyona bağlı nöbetlerin uzun dönemli tedavileri için de bir seçenek sunmaktadır. Supratentoryal lezyonlara bağlı epilepsi geçiren 1226 hasta ile yapılan bir çalışmada, rezeksiyonu takiben bu hastaların %75'inde bir daha nöbet gözlemlenmemiştir. Aynı çalışma, 1,5 cm'den küçük ve tekli lezyonlara sahip hastaların, semptomların başlamasını takiben bir yıl içerisinde ameliyat edildiğinde nöbet kontrol başarısının arttığını göstermiştir(Englot ve ark. 2011). Başka bir çalışmada; epilepsi tedavisi kapsamında 26 hastaya, cerrahi operasyon süresince 1.5 T MRI(iopMRI) ve nöronavigasyonel programlar yardımıyla cerrahi rezeksiyon uygulanmıştır. Uygulama sonucunda(ortalama 47,7 ay boyunca yapılan postoperatif gözleme dayanarak), bu hastaların %80,8'inde tam bir epilepsi tedavisi başarısı elde edilmiştir(Sommer ve ark. 2013). iopMRI kullanımı ile lezyonun tamamının alınması gerçekleştirilmiştir. Bu sayede, özellikle cerrahi rezeksiyon sonucu epilepsi tedavisi mümkün olmayan hastaların (mevcut hastaların %23'ü) tedavisi sağlanmıştır(Englot ve ark. 2011; Kim ve ark. 1997). Bu başarılarla rağmen, operasyon sonucu ortaya çıkabilecek komplikasyonlar dikkate alınarak, epilepsi kontrolünde birincil tedavi seçeneğini antiepileptik ilaçlar oluşturmaktadır.

### **2.2.3.2. Stereotaktik Radyocerrahi**

Mikrocerrahi ile rezeksiyon, kavernom tedavisinde birincil yöntem olsa da, özellikle cerrahi ile erişimi zor bölgelerde oluşabilecek komplikasyon riskinin yüksek olması başka tedavi seçeneklerine ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Cerrahi riskin yüksek olduğu vakalarda stereotaktik radyocerrahi(SRC), lezyonun doğal gelişimini önlemeye yardımcı olabilecek etkili ve güvenli bir yöntemdir(Chalouhi ve ark. 2013).

Literatürde bu yöntemin etkili olduğunu ortaya koyan birçok çalışma mevcuttur. Örneğin bir çalışmada, yüksek riskli SKM hastalarına SRC uygulamasını takiben ilk iki yılda hemoraj riskinin %32,5'ten %10,8'lere düştüğünü ve iki yıldan sonraki periyotta ise bu riskin %1'lere düştüğü gözlemlenmiştir(Lunsford ve ark. 2010). Aynı çalışmada, hastaların %18,4'ünde radyasyonun neden olduğu yan etkilerin görüldüğü belirtilmiştir. Fakat, gelişen teknoloji ile beraber bu oran %8'lere gerilemiştir(Lunsford ve ark. 2010; Chalouhi ve ark. 2013). Bu tedavi seçeneği özellikle erişimi zor SKM vakalarında umut vaatsetse de, uzun dönemde gelişebilecek yan etkiler gözönüne alınmalıdır.



### 2.2.3.3. Konservatif Tedavi

Girişimsel tedavilerin oluşturabileceği potansiyel riskler, SKM tedavileri için farklı tedavi alternatiflerinin geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir. Girişimsel olmayan tedavi seçeneklerinden birisi olan konservatif tedavide, lezyonlara doğrudan müdahale edilmemekte ve lezyon progresyonu doğal sürecine bırakılmaktadır. Konservatif tedavide; lezyon yerine, lezyonların hastada sebep olduğu klinik etkilere müdahale edilmektedir.

Bir çalışmada, 17 refraktör olmayan(Nonrefractory) epilepsi hastası 5 yıl boyunca sadece klinik semptomlarına yönelik tedavi aldıkları ve bunların 12'sinde(%70,6) epileptik nöbetlerin tamamen geçtiği rapor edilmiştir(Fernández ve ark. 2012). Fakat diğer çalışmalar SKM hastalarının uzun dönemde cerrahi rezeksiyon tedavisi gören hastaların konservatif tedavi alanlara göre klinik olarak daha iyi olduklarını iddia etmektedir(Porter ve ark. 1999; Bozinov ve ark. 2010). Garrett ve Spetzler adlı araştırmacılar ise konservatif tedavi gören 14 hastadan; %50'sinde iyileşme görüldüğünü veya hastalığın ilerlemediğini, %29'unda hastalığın kötüleştiğini, %7'sinin öldüğünü ve %14'ünün ise tedaviyi tamamlamadığını ortaya koymuşlardır.

Konservatif tedavi ile ilgili birkaç araştırma literatürde bulunsa da bu çalışmalarda çeşitli limitasyonlar söz konusudur. Bu limitasyonlar ise büyük hasta grupları ile çalışılmaması, deneylerin randomize olmaması gibi nedenlerdir. Bunların yanı sıra cerrahi rezeksiyon tedavisi önerilmeyen hastalar zaten klinik olarak kontrol edilebilir epilepsiye sahip olanlar veya cerrahi opsiyonu reddeden hastalardan oluşmaktadır. Bu nedenle bu tip tedavi yönteminde çalışılan hasta grubu genellikle; ya fazla semptomatik olmayan hastalardan ya da doğal progresyonu normal bir SKM hastasına göre daha hafif olan hastalardan oluşmaktadır. Bu da bu tip araştırmalardaki deneysel sonuçları doğrudan etkilemektedir. Bütün bunlara ek olarak, SKM hastalarının sadece birkaç yıl izlenmesi yeterli olmamaktadır. Çünkü bu tedavi yöntemi, hastalarda herhangi bir olumsuz durum oluştuğunda, erken tedavi için geç kalındığından hastalarda kalıcı nörolojik hasarların oluşması riskini arttırmaktadır.

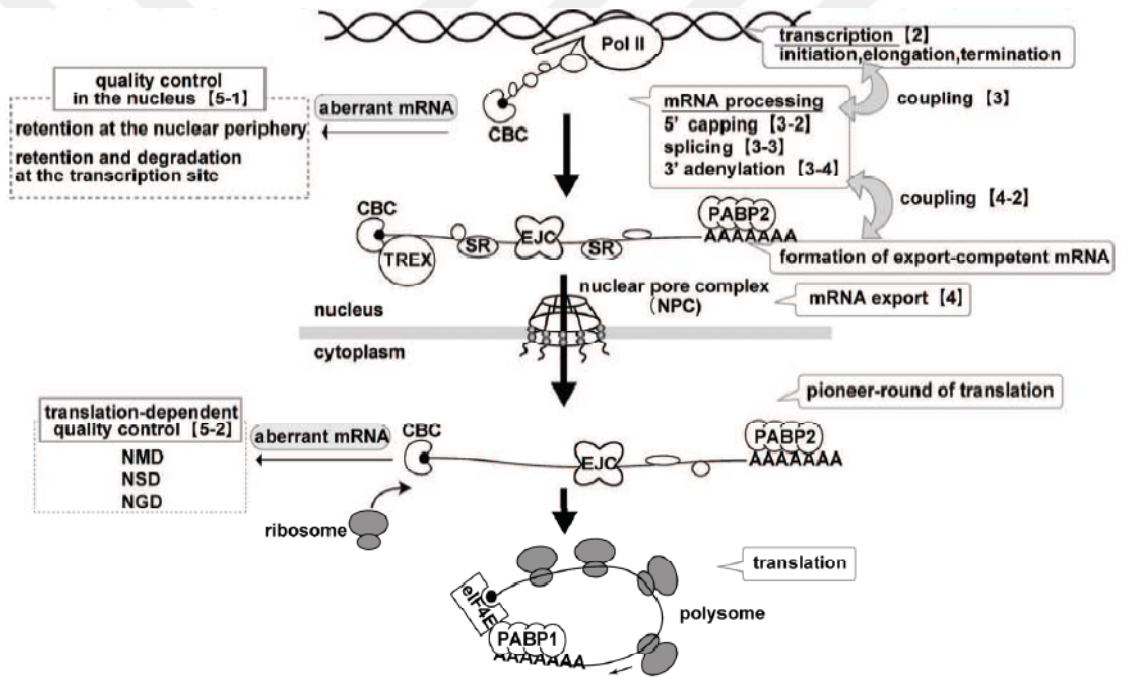
### 2.3. Ribonükleik Asit(RNA)

RNA molekülü, 4 farklı tipteki nükleotid altünitesinin birbiriyle fosfodiester bağları ile bağlanarak oluşturduğu linear bir polimerdir. İki özelliği ile Deoksiribonükleik asitten(DNA) ayrılmaktadır: 1. RNA'daki nükleotidlere

'ribonükleotid' denmektedir ve bunlar adenin, guanin, sitozin ve urasil bazlarından oluşmaktadır. 2. RNA'da riboz şekeri bulunmaktadır. Ayrıca RNA tek zincirlidir ve bu zincir kendi üzerine katlanabilmektedir.

### 2.3.1. mRNA Biyogenez ve Transkripsiyon

Bir hücredeki RNA molekülünün oluşturulması DNA transkripsiyonu ile olmaktadır (Şekil 2-4). Transkripsiyon, çift zincirli DNA molekülünün bir kısmının açılması ile başlamaktadır. Açılan zincirlerden biri RNA molekülünün sentezlenmesi için kalıp görevi görmektedir. Bu kalıba uygun olarak guanine sitozin, DNA'daki timine karşılık adenin, adenine karşılık ise urasil bazları gelmektedir. Kalıba tam karşılık gelen bu bazlar kovalent bağlarla birleşerek RNA zincirini oluşturmaktadırlar.



Şekil 2-4: mRNA'nın yaşam döngüsü(Fujiwara ve ark. 2012)

Transkripsiyon, RNA polimeraz adı verilen enzimler ile gerçekleşmektedir. Bu enzimler, yeni eklenen nükleotidler arasındaki fosfodiester bağları katalizleyerek 5'-3' yönünde RNA zincirinin oluşmasını sağlamaktadırlar. Transkripsiyonun başlaması için primerlere gerek duyulmamaktadır ve sentez için gerekli enerji ribonükleozid trifosfatlardan(ATP, CTP, UTP, GTP) sağlanmaktadır. Sentez tamamlandıktan sonra transkript, şablon olarak kullandığı DNA'dan ayrılmaktadır.

DNA'daki genlerin çoğunluğu proteinlere ait aminoasit sekanslarını içermektedir. Bu genlerden kopyalanan RNA moleküllerine mesajcı RNA(mRNA)

denmektedir. Diğer genlerden üretilen son ürün ise RNA molekülünün kendisidir. Bu moleküllere protein sentezine katılmadıkları için kodlanmayan RNA(noncoding RNA) denmektedir. Bir hücredeki RNA moleküllerinin çoğunluğunu ribosomal RNA molekülü oluşturmaktadır. Tipik bir memeli hücresindeki toplam RNA'nın %3-5'i kadarını mRNA oluşturmaktadır.

### **2.3.1.1. Başlama**

Bir genin doğru bir şekilde transkribe olabilmesi için RNA polimerazın genom üzerinde transkripsiyonun başlama ve bitirme bölgelerini tanıyabilmesi gerekmektedir. Ökaryotlar 3 farklı çeşitte RNA polimeraz içermektedir: RNA polimeraz I, RNA polimeraz II, RNA polimeraz III. Bu üç polimeraz yapısal olarak birbirlerine benzemelerine ve hatta bazı ortak altüniteler içermelerine rağmen farklı kategorilerdeki genleri transkribe etmektedirler. RNA polimeraz I ve III; transfer RNA, ribosomal RNA ve çeşitli küçük RNA'ları kodlayan genleri transkribe etmektedirler. RNA polimeraz II ise protein kodlayan genleri, snoRNA (Small nucleolar RNA) genlerini, miRNA (mikroRNA) genlerini, siRNA (small interfering RNA) genlerini, lncRNA (long non-coding) genlerini ve bazı snRNA (small nuclear RNA) genlerini transkribe etmektedirler.

Ökaryotik hücrelerde DNA nükleozomlar halinde sıkıca paketlenmektedir. Bu nedenle ökaryotlarda transkripsiyonun başlayabilmesi için özel yapılar gelişmiştir. Transkripsiyonun başlaması için öncelikle 'transkripsiyonel aktivatörler' adı verilen proteinlerin DNA üzerindeki enhansır adı verilen özel bölgelere bağlanması ve RNA polimeraz II'yi transkripsiyon başlangıç bölgesine yönlendirmesi gerekmektedir. Sürecin devamında ise 'mediatör' adı verilen bir kompleks protein, aktivatör proteinleri ile transkripsiyon faktörleri arasındaki iletişimin düzgün bir şekilde kurulmasını sağlamaktadır. Son olarak transkripsiyonun başlaması için kromatin-modifiye edici enzimlerin, kromatin yeniden düzenleyici komplekslerin, histon-modifiye edici enzimlerin biraraya gelmesi ve transkripsiyon faktörleri gerekmektedir.

Transkripsiyon faktörleri; TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIFH(polimeraz II ile etkileşimde olanlar)adı verilen bir grup proteinden oluşmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinden TFIID'nin çift zincirli DNA'nın sadece timin ve adenin içeren kısa bir bölgesine bağlanması ile transkripsiyon faktörlerinin DNA üzerindeki toplanması başlamaktadır. Sadece T ve A içermesinden dolayı bu bölgeye 'TATA sekansı' veya

'TATA kutusu' adı verilmektedir. TFIID'nin TATA sekansını tanıyan alt birimine ise TBP(TATA-bağlayan protein-TATA-binding protein) denmektedir. TATA kutusu, transkripsiyonun başlangıç bölgesinin yaklaşık 25 nükleotid gerisinde bulunmaktadır. TFIID'nin TATA kutusuna bağlanması ile DNA'da bir bükülme gerçekleşmektedir. Bunu takiben RNA polimeraz II ile birlikte diğer transkripsiyon faktörleri de bölgeye gelerek burada transkripsiyon başlangıç kompleksini oluşturmaktadırlar.

Promotor üzerinde transkripsiyon başlangıç kompleksinin(pre-inisiasyon kompleksi-PIC) oluşması ile transkripsiyon başlangıç bölgesinde RNA polimeraz II'nin kalıp zincireerişimi sağlanmış olmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinden TFIID'nin mevcut 9 altünitesinden birininDNA helikaz içermesi sebebiyle ATP hidrolize edilerek DNA zincirleri açılmaktadır ve böylece transkripsiyonun başlaması için kalıp zincir açığa çıkmaktadır. Ardından RNA polimeraz II promotor bölgede kısa RNA'lar sentezleyerek konformasyonel değişikliklere uğramaktadır. Polimerazın C-terminal ucuna(kuyruğuna) fosfat gruplarının eklenmesi gibi değişiklikler ile polimeraz promotor bölgede ilerleyerek transkripsiyonun elongasyon aşaması başlatılmaktadır.

### **2.3.1.2. Elongasyon(Uzama)**

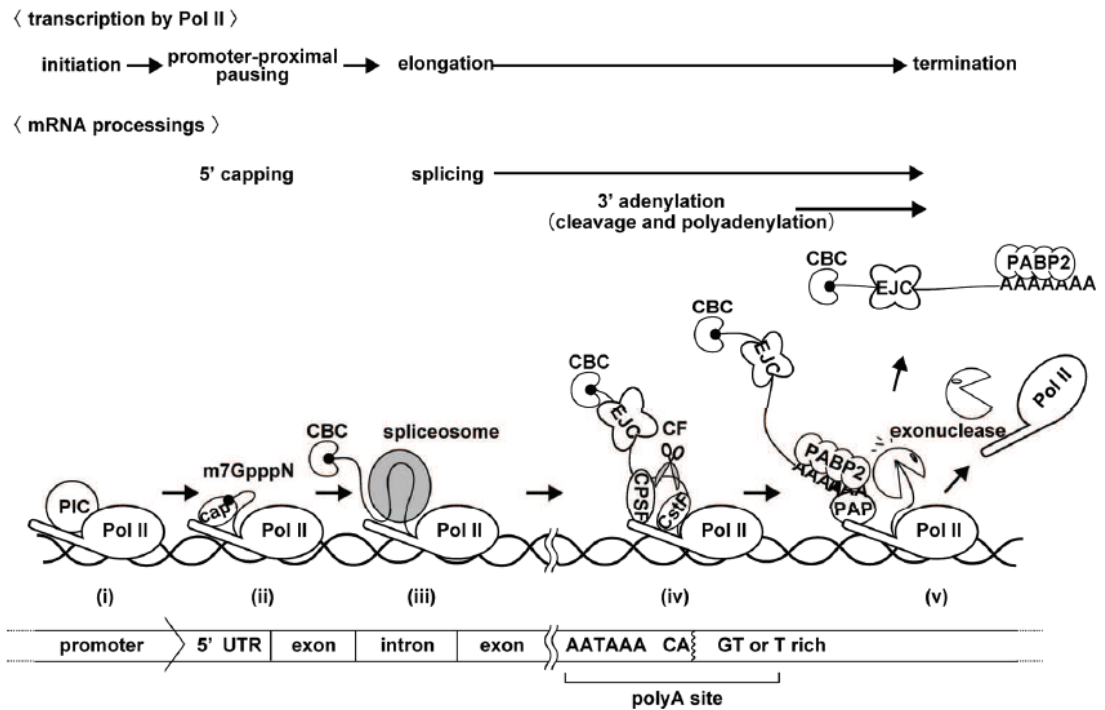
Elongasyon aşamasının başlaması ile beraber transkripsiyon faktörlerinin bir çoğu polimerazdan ayrılarak başka bir transkripsiyonu başlatmak üzere yeni bir polimeraz molekülüne bağlanmaktadır. Bu aşamada RNA polimeraz elongasyon faktörleri ile bağlanmıştır. Elongasyon faktörleri, RNA polimerazın DNA üzerindeki stabilitesinden sorumludur. Bu aşamada, DNA üzerinde ilerleyen polimeraza ATP-bağımlı kromatin yeniden düzenleyici kompleksler ve polimerazın önünde ilerleyerek nükleozomları kısmı olarak açan histon şaperonları eşlik etmektedir. RNA polimeraz ilerledikçe DNA'nın helikal yapısı nedeniyle bir superhelikal gerginliğe yol açmaktadır. Bu gerginlik ise çift zincirli DNA'da ilmikler ve karışıklıklar oluşturmaktadır. Ökaryotlarda superhelikal gerginlik, DNA topoizomerazlar tarafından düzeltilmektedir.

### **2.3.1.3. Terminasyon(Sonlanma)**

Transkripsiyonun sonlanması için, oluşan transkriptin, transkripsiyon bölgesinden ayrılması gerekmektedir. Transkriptin ayrılmasını takiben polimeraz da bölgeden uzaklaşmaktadır. Bu işlemler sonucunda istenilen DNA bölgesi tam anlamıyla transkribe olmuş olsa da transporta hazır matür mRNA'nın oluşması için birkaç işlem daha gerekmektedir. Matürasyon işlemi; prekürsör-mRNA(pre-mRNA)'ya 5' şapka

eklenmesi, splicing ve 3' adenilasyonu ile gerçekleşmektedir ve bu işlemlerin başlaması RNA polimeraz II'nin en büyük alt birimi olan karboksi-terminal domaini(Carboxy-terminal domain-CTD) ile olmaktadır (Şekil 2-5).

CTD, insanda Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser heptapeptidinin 52 kez tekrarlanması ile oluşan korunmuş bir sekanstır. Bu bölgenin fosforile olması ile RNA polimeraz II'nin transkripsiyonel aktivitesi değişmektedir (Buratowski 2009; Egloff ve Murphy 2008; Fuda ve ark. 2009; Koch ve ark. 2008; Kuehner ve ark. 2011).



**Şekil 2-5: mRNA uç-birleştirme mekanizması aşamaları (Fujiwara ve ark. 2012)**

PIC oluşumu sırasında, promotor bölgeye fosforlanmamış CTD'ye sahip Polimeraz II bağlanmaktadır. Devamında mediatör de yine fosforlanmamış polimeraza bağlanmaktadır. PIC içindeki TFIIH, CTD'deki Ser5'i fosforlayarak mediatörün kompleksten ayrılmasına ve sonucunda polimerazın promotor bölgeden ayrılarak transkripsiyonbaşlamasına neden olmaktadır(Max ve ark. 2007).

RNA polimeraz II'nin yaklaşık 25 nükleotidlik RNA oluşturmasını takiben, transkriptin 5' ucu modifiye guanin nükleotidi eklenerek modifiye edilmektedir. Şapka eklenmesi işlemi 2 enzim ile gerçekleşmektedir: HCE(Human Capping Enzyme) ve MT(RNA 7-methyltransferase)(Hirose ve Manley 2000). Bu enzimler direkt olarak fosforile Ser5'e bağlanmaktadır(Fabrega ve ark. 2003).

Ökaryot canlıların protein kodlayan gen sekansları(ekzon), intron adı verilen protein kodlamayan sekanslar ile kesintiye uğramaktadır. Fonksiyonel bir proteinin elde edilebilmesi için bu kodlanmayan bölgelerin ‘uç-birleştirme mekanizması(splayzing)’ adı verilen bir yöntemle şablondan çıkartılması gerekmektedir. Her bir splicing işleminde iki ekzon ucu birbirine yaklaştırılırken aradan bir adet intron çıkartılmaktadır. Splicing işleminin tamamlanmasıyla beraber, ekson-ekson birleşim kompleksi EJC (exon-exon junction complex), ekzon-ekson kavşaklarının yaklaşık 24 nükleotid yukarısında depolanmaktadır (Le Hir ve Andersen 2008; Tange ve ark. 2004). EJC mRNA’nın nükleustan sitoplazmaya taşınmasında önemli bir role sahiptir.

pre-mRNA, 5’ ucu, 3’ ucu gibi splayzing reaksiyonunun gerçekleştiği cis elementlerince zengin bölgeler içermektedir. Bu elementler, büyük bir protein-RNA kompleksi olan splaysozom tarafından tanınmaktadır. Bu kompleks, trans-esterifikasyon reaksiyonları ile ekzonların iki açık ucunun ligasyonunu ve intronun uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Kesin bir uç-birleştirme için splaysozomun cis-elementlerini tanıyabilmesi oldukça önem arz etmektedir. Bu nedenle bu tanınmayı güçlendirmek adına ekzon sekanslarının içinde ‘ekzonik splayzing enhansır(ESE)’ adı verilen sekanslar bulunmaktadır(Chew ve ark. 1999; Wang ve ark. 2005; Wu ve ark. 2005). Serin ve arjinin bakımından zengin bölgeler içeren splayzing faktörleri de, ESE’ye bağlanmayı kolaylaştırmaları bakımından önemli bir role sahip olmaktadırlar(Cartegni ve Krainer 2002; Cramer ve ark. 1999; Liu ve ark. 1998; Sun ve ark. 1993).

Protein kodlayan mRNA’ların çoğunluğu 3’ adenilasyon işleminden geçmektedir. Bu işlem, transkriptin 3’ ucuna yaklaşık yaklaşık 200-300 nükleotidlik bir poliadenozin kuyruğu(poli-A kuyruğu)eklenmesidir(Danckwardt ve ark. 2008; Proudfoot ve ark. 2002). Fakat poliadenilasyon öncesi, pre-mRNA’nın 3’ ucundaki sekans elementleri tarafından belirlenen CA dinükleotid bölgesinden kesilmektedir. AAUAAA konsensus dizisi ve U/GU-zengin bölge(downstream sequence element veya DSE) içeren bu sekans elementleri sırasıyla kesilecek bölgenin 10-30 nükleotid yukarısında ve 30 nükleotid aşağısında bulunmaktadır. Kesim ve poliadenilasyon spesifite faktörü(CPSF), AAUAAA sekansına bağlanarak Polimeraz II(Pol II)’nin transkribe olmasını duraklatmaktadır (Glover-Cutter ve ark. 2008). Kesim stimülasyon faktörü(CstF) U/GU-zengin bölgeye bağlandıktan sonra ise CPSF de CstF’ye bağlanmaktadır(Kazerouninia ve ark. 2010; Kuehner ve ark. 2011; Nag ve ark. 2007;

Park ve ark. 2004). CPSF'nin CstF'ye bağlanması ile duraklayan Pol II diziden uzaklaşmaktadır. Böylece CPSF-bağımlı kesim gerçekleşmektedir ve sonucunda kesim bölgesinin yukarısı poliadenilasyona maruz kalırken, kesim bölgesinin alt kısmı degrade olmaktadır. CPSF, Pol II üzerinden uzama kompleksiyle ilişkiliyken; CstF, CTD ile etkileşime girmektedir. Transkripsiyonel terminasyon 3' adenilasyon ile gerçekleşmektedir(Logan ve ark. 1987; Whitelaw ve Proudfoot 1986). Bu terminasyonun meydana gelmesi için ise fonksiyonel bir poli-A bölgesine(Zaret ve Sherman 1982) ve kesim faktörünün Pcf11'i içeren önemli altüniteleri gerekmektedir(Birse ve ark. 1998; Gross ve Moore 2001; Minvielle-Sebastia ve ark. 1997).

### 2.3.2. mRNA ve Hastalıklar

mRNA'nın olgunlaşması ve translasyona uğraması bir genin ekspresyonundaki en önemli olaylardır. Uzun yıllar boyunca mRNA, gen bilgisinin pasif bir taşıyıcısı olarak düşünülmüştür. Fakat son yıllarda yapılan çalışmalar mRNA'nın post-transkripsiyonel gen düzenleme mekanizmalarında aktif olarak görev aldığını göstermiştir. Bu mekanizmalar, mRNA'nın yaşam döngüsünün her aşamasını (formasyonunu, modifikasyonunu ve mRNA-protein komplekslerinin(mRNPs) degradesyonunu) etkilemektedir(Mitchell ve Parker 2014). RNA polimeraz II (RNAP II) ile pre-mRNA'nın üretilmesi, ökaryotlarda mRNP üretimini başlatmaktadır ve daha sonra pre-mRNA olgunluğa erişmektedir. Bu evrede kısaca pre-mRNA'nın 5' ucuna başlık eklenmektedir(Shatkin 1976), kodlamayan bölgelerin uzaklaştırılması için splayzing gerçekleştirilmektedir(Berget ve ark. 1977), kesim ve poliadenilasyon ile 3' ucu oluşturulmaktadır(Edmonds ve ark. 1971). Doğru bir olgunlaşma süreci, mRNA'nın sitozole taşınması, uygun lokalizasyonu ve translasyon makinesi ile uygun bir şekilde bağlanabilmesi bakımından yüksek önem taşımaktadır. Bu süreçte, mRNA trans-acting faktörleri kendine çekerek veya uzaklaştırarak mRNP'leri oluşturmaktadır(Linder ve ark. 2015).

mRNA ile proteinlerin bağlanması, RNAP II'nin transkriptin 5' ucunu oluşturmasıyla başlamaktadır. Bu başlangıç aşamasında bir çok faktör mRNA ile ilişkilidir ve sonraki nükleer taşınımı başlatmaktadır(Lee ve Tarn 2013). Bu aşama başlık eklenmesi ve poliadenilasyonu, splaysozomun ve kesim ile poliadenilasyon faktörlerinin mRNA üzerinde birleşmesini içermektedir(Bentley 2014). Nükleer proses

işleminde sadece RNA yapısı değil, aynı zamanda ilgili proteinler de değişikliğe uğramaktadır(Lee ve Tarn 2013). mRNP yeniden-modellenmesi adı verilen bu olay, mRNP'nin nüklear taşınımına izin vermektedir(Rodriguez-Navarro ve Hurt 2011). Bu izin verme işleminin en önemli basamakları EJC'lerin ve metazoan transkripsiyon taşınım(TREX) kompleksi gibi mRNA taşınım faktörlerinin toplanmasıdır(Le Hir ve ark. 2000; Strasser 2002). Yeniden-modelleme, bazı mRNA'ların işlevsellikleri için gerekli olan subselüler lokalizasyonu sağlayan taşınma faktörleri ile ilişkili olduğu sitozolda devam etmektedir(Martin ve Ephrussi 2009). mRNAP'lerin ribozomlar tarafından translasyonu, eIF4E tarafından nüklear başlık bağlanma kompleksinin değiştirilmesi ve EJC'lerin yıkımı gibi çeşitli olaylara neden olarak yeniden-modellemenin devam etmesini sağlamaktadır (Ishigaki ve ark. 2001; Gehring ve ark. 2009).

mRNA'lar tüm yaşam döngüleri boyunca, mRNP'leri oluşturmak üzere *trans-acting* faktörleri(çoğunlukla proteinler olmak üzere, küçük RNA'lar, RNP'ler ve metabolitler) ile etkileşim halindedir. mRNP kodu, mRNA'nın kaderine karar vermesi bakımından olgunlaşmada ve post-transkripsiyonal gen regülasyonunda önemi olan başlıca etkidir(Linder ve ark. 2015). Bu nedenle, RNA-bağlama proteinlerindeki ve bu proteinlerin bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar mRNP kodunda aksaklıklara sebebiyet vererek, okülofaringeal musküler distrofi(Brais ve ark. 1998), hipotrikozis simpleks(Pasternack ve ark. 2013), amyotrofik lateral skleroz(ALS)(Sreedharan ve ark. 2008; Dejesus-Hernandez ve ark. 2011; Renton ve ark. 2011), Frajil X sendromu(Darnell ve ark. 2011) ve spinoserebellar ataksia(Orr ve ark. 1993) gibi bazı nöronal hastalıklara neden olmaktadır.

Anlamsız mutasyon-aracılı mRNA bozulması(NMD), translasyon-bağımlı bir mRNA kontrol mekanizmasıdır ve ökaryotlarda gen ekspresyonunda kalite kontrolünü sağlamaktadır. NMD'nin hücresel olaylar üzerine yaygın olarak kabul edilen iki önemli görevi bulunmaktadır: 1) gen ekspresyonu sırasında meydana gelen rutin hatalar sonucu oluşan anormal transkriptlerin downregüle edilmesi, 2) hücrenin mevcut ihtiyaçlarına cevap olarak mRNA'nın downregüle edilerek uygun seviyelerde tutulması. Günümüzde memelilerde NMD'nin 4 faktörünün (UPF1, UPF2, SMG1 ve SMG6) işlevleri farelerde araştırılmıştır(Li ve ark. 2015; McIlwain ve ark. 2010; Medghalchi ve ark. 2001; Weischenfeldt ve ark. 2008). Bu faktörlerin herhangi birinin eksikliğinde normal



embriyonik gelişimde kusurlar meydana gelmektedir. NMD, prematüre terminasyon kodonu (PTC) içeren anormal mRNA'ların degradasyonunu hızlandırmaktadır (Kurosaki ve Maquat 2016). Bu yolla hastalık oluşturan mRNA'ların 1/3'ü down-regüle olmaktadır (Frischmeyer ve Dietz 1999; Mort ve ark. 2008). İlk defa 1979 yılında Beta-talesemi hastalarında PTC'lerin mRNA'ları azalttığı (Chang ve ark. 1979) ve kısa bir süre sonra da mRNA stabilitesini azalttığı rapor edilmiştir (Maquat ve ark. 1981). PTC'nin NMD'yi tetiklediği trioz fosfat izomeraz yetersizliği (Daar ve Maquat 1988), Marfan sendromu (Caputi ve ark. 2002) gibi başka hastalıklarda da gözlemlenmiştir. Pankreatik adenoskuamöz karsinoma tümörlerinin incelenmesi ile UPF1 geninde somatik mutasyonların olduğu görülmüştür. Bu mutasyonlar tamamen pankreatik adenoskuamöz hastalığına özgü olmakla beraber benzer mutasyonlara normal pankreatik dokularda rastlanmamıştır (Liu ve ark. 2014).

NMD mekanizması, alternatif splayzing bağımlı NMD (AS-NMD) mekanizması ile alternatif splayzinge uğramış transkriptlerin de downregülasyonuna da gerçekleştirmektedir. AS'nin PTC-içeren NMD substratları için ana kaynak olduğu ve biyoinformatik tahminlere dayanarak alternatif splayzinge uğrayan mRNA'ların 1/3'ünün PTC içerdiği düşünülmektedir (Lewis ve ark. 2003). AS-NMD mekanizması onkogen ve tümör supresörlerin regülasyonunda görev almaktadır (Dvinge ve ark. 2016). Sisteince zengin anjiyogenik indüsr 61 (Cysteine-rich angiogenic inducer 61-CYR61) hücredeki seviyeleri AS-NMD ile kontrol edilen bir proanjiyogenik faktördür (Hirschfeld ve ark. 2009). Serin ve arjinince zengin splayzing faktörü 2 (Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2-SRSF2), enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) adlı genin alternatif splayzingine müdahale etmektedir. SRSF2 adlı gende meydana gelen mutasyonlar, EZH2'nin hücredeki seviyelerini etkileyebilmekte ve bu düzensizliklerin de myelodisplastik sendromlar ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Ernst ve ark. 2010; Nikoloski ve ark. 2010). Yakın zamanda, alternatif splayzingi NMD mekanizması ile kontrol edilen ve çeşitli insan tümör hücre hatlarında ekspresyonu görülen bir E-kadherin mRNA varyantı rapor edilmiştir (Matos ve ark. 2017).

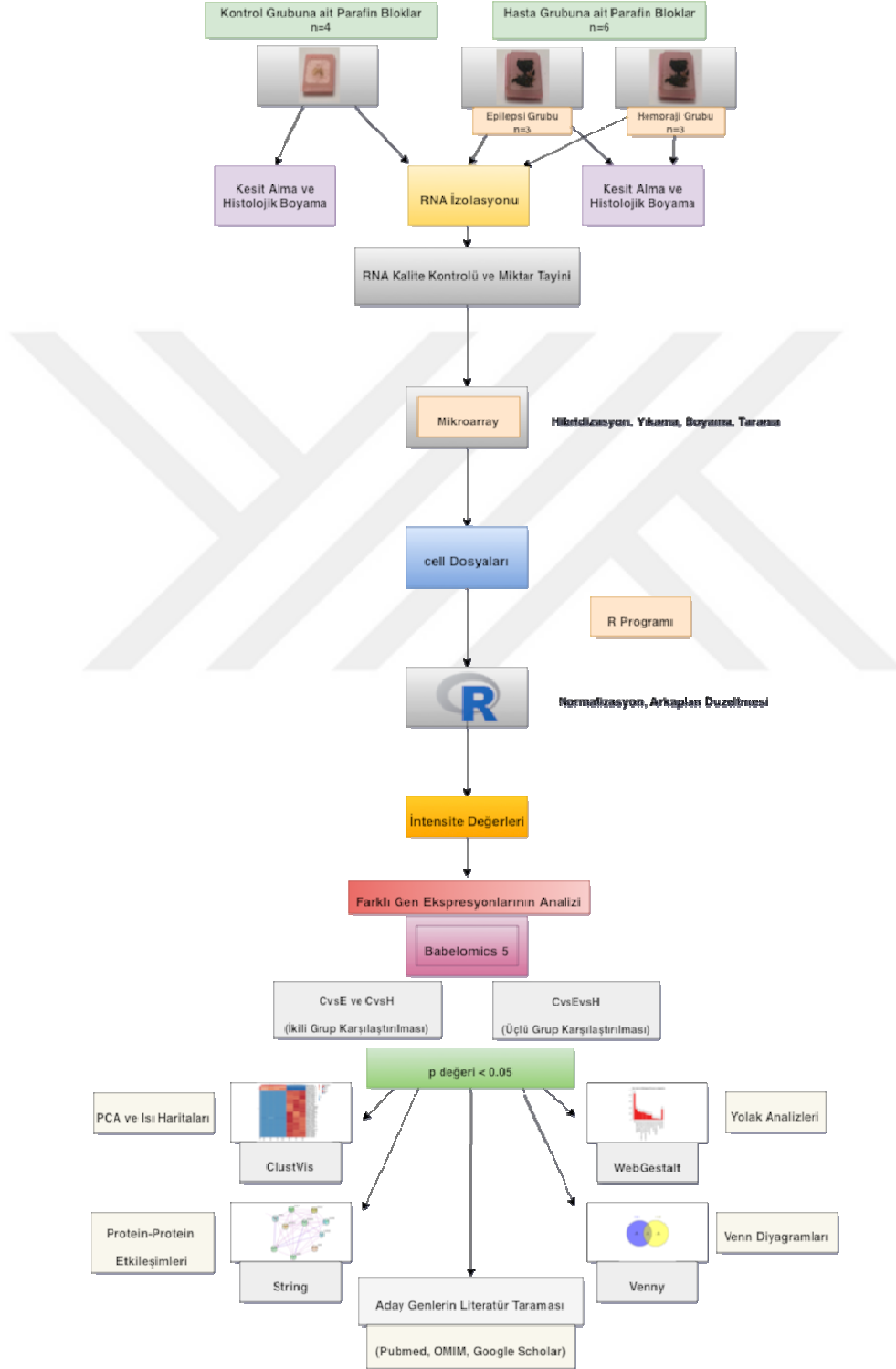
Nöronal transkript seviyelerini posttranskripsiyonel olarak düzenleyen mekanizmalardan biri de AS-NMD'dir (Lykke-Andersen ve Jensen 2015). Bu mekanizmanın bozulması ise nörolojik, nörogelişimsel ve nörodejeneratif hastalıklara

neden olabilmektedir. Örneğin, ATP-Binding Cassette, Sub-Family A, Member 7(ABCA-7) genindeki PTC mutasyonları, orta-yüksek penetrasyonlu risk faktörü içeren geç başlayan Alzheimer hastalığında tanımlanmıştır(De Roeck ve ark. 2017).Bir çok çalışma, AS izoformlarındaki dengesizliklerin multiple skleroz hastalarında, hastalığın etiyojisine katkıda bulunduğunu ifade etmektedir(Da Costa ve ark. 2017; Cardamone ve ark. 2017).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç ve yönteme ait akış şeması Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3-1: Gereç ve yöntem iş akış şeması

### 3.1. Doku Örnekleri

Çalışmada, kavernom teşhisi konmuş 6 hastadan alınan kavernom doku örnekleri ile 4 kontrol grubu beyin doku örnekleri olmak üzere toplamda 10 adet doku kullanılmıştır. Alınan bu dokular temin edildikleri kurumlarda parafin içine gömülmüştür.

#### 3.1.1. Kavernom Doku Örnekleri

İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi anabilim dalı kliniğinde kavernom teşhisi konan ve kavernomunun tedavisi olarak cerrahi rezeksiyonuna karar verilen hastalar ile çalışılmıştır. Bu hastalara ait kavernom dokuları çıkarıldıktan sonra parafin dokulara gömülerek, dokulara Patoloji anabilim dalında serebral kavernom teşhisi konulmuştur. Hastalara ait bilgiler aşağıdaki tabloda mevcuttur (Tablo 3.1).

**Tablo 3-1: Hasta grubuna ait dokuların özellikleri**

KOD	Yaş	Cinsiyet	Semptom	Protokol No	Yıl	Beyindeki Lokasyonu
P1	17	E	Epilepsi	11897	2015	Bilateral (Multiple) Frontal
P2	28	E	Epilepsi	10275	2009	Sol Temporal
P3	43	E	Epilepsi	27651	2012	Sol Temporal
P4	38	K	Hemoraji	11087	2007	Sol Frontal
P5	74	K	Hemoraji	19541	2010	Sağ Temporoinşüler
P6	52	K	Hemoraji	10650	2010	Korpus Kollusum

#### 3.1.2. Kontrol Grubu Örnekleri

Kontrol grubuna ait doku örnekleri, gerekli izinler alındıktan sonra İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından sağlanmıştır. Beyin travması sonucu ölüm ile gelen vakalar ile otopsi sonucunda beyin hasarı(tümör, nekroz, damar hasarları vs.) tespit edilen dokular çalışma dışı bırakılmıştır. Kontrol grubuna ait dokulara ilişkin bilgiler aşağıdaki tabloda mevcuttur (Tablo 3.2).

**Tablo 3-2: Kontrol grubuna ait dokuların özellikleri**

KOD	Yaş	Cinsiyet	Semptom	Yıl	Beyindeki Lokasyonu
C1	74	K	Epilepsi	2017	Sağ Parietal
C2	45	K	Epilepsi	2017	Korpus Kallosum
C3	17	E	Epilepsi	2017	Sağ Frontal
C4	36	E	Hemoraji	2017	Sol Temporal

### 3.2. Kesit Alma

Parafin bloklar halinde gelen doku örnekleri, ışık mikroskobu ile görüntülenmek amacıyla mikrotom cihazı ile 5 mikrometre kalınlığında kesilerek pozitif şarjlı lamlara alınmıştır.

### 3.3. Histolojik Boyama

Boyama öncesi dokulardaki parafini uzaklaştırmak adına kesitler önce 60°C'deki etüvde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra ksilende 20 dakika boyunca bekletilip sırasıyla %100, %96, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek hidrate edilmiştir. Son aşamada örnekler distile su içerisine alınmıştır.

Dokulardaki kan damarlarının varlığını göstermek ve histolojik olarak incelemek adına bağ doku boyamasına özel Masson boyama tekniği uygulanmıştır. Ticari olarak satılan kitin(Bio-optica, İtalya) sağladığı kimyasallardan (Tablo 3.3) yararlanılarak aşağıda belirtilen basamaklara uygun olarak boyama yapılmıştır (Tablo 3.4).

**Tablo 3-3: Masson kitinde kullanılan histolojik boyalar**

Kimyasal içeriği
A: Weigert'in demir hematoksileni – A solüsyonu
B: Weigert'in demir hematoksileni – B solüsyonu
C: Pikrik asit alkolik solüsyonu
D: Mallory'e göre Ponceau asit fuksin
E: Fosfomolibdik asit solüsyonu
F: Masson aniline blue

**Tablo 3-4: Masson kiti işlem basamakları ve süreleri**

İşlem Basamakları	Süre
1 Kesitler distile su aşamasına getirilir.	
2 6'şar damla Reagent A ve Reagent B örneklerin üzerine dökülür	10 dk
3 Yıkamadan, 10'ar damla Reagent C örneklere uygulanır.	4 dk
4 Hızlıca yıkanan örneklere 10'ar damla Reagent D örneklere uygulanır.	4 dk
5 Yıkanan örneklere 10'ar damla Reagent E örneklere uygulanır.	10 dk
6 Yıkamadan, 10'ar damla Reagent F örneklere uygulanır.	5 dk
7 Kesitler distile sudan ve yükselen alkol serilerinden geçirilir, ksilen ile şeffaflaştırılır ve lamel ile kesitlerin üzeri kapatılır.	

Bu kit ile; nükleuslar siyah, sitoplazma ve asidofilik granüller kırmızı, bazofilik granüller mavi ve eritrositler sarı renkte boyanmaktadır.

### 3.4. Görüntüleme

Masson boyama yapılmış kesitler Nikon Eclipse Ni (Nikon, Japonya) ışık mikroskobu ile incelenerek, Nis elements programı ile fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.5. Dokulardan RNA İzolasyonu

Parafine gömülü dokulardan bisturi ile kesilerek ependorf tüp içine konuldu. Üzerine 1 ml ksilen eklenerek 55°C'deki sıcak su banyosunda 5 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler 14800 rpm'de 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atılarak örneklerin üzerine tekrar 1 ml ksilen eklendi, sıcak su banyosunda 5 dakika inkübasyonu takiben santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Üzerine 1 ml etanol eklenerek vortekslendi ve süpernatant tekrar atılarak dokudan parafin mümkün olduğunca uzaklaştırılmaya çalışıldı.

Dokular, RNaz inhibitörü(RNAase ZAP, Sigma) içeren bir solüsyon ile yıkanan seramik havanlara alınarak üzerlerine sıvı azot eklendi ve havaneli ile toz haline gelinceye kadar dövüldü. Daha sonra 1 ml trizol(TriReagent, Sigma) içerisine 50-100 mikrogramlık doku tozu konarak 10 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edildi. Karışım iyice vortekslenerek homojenize edildi ve üzerine -20°C'de soğutulmuş 0,2 ml

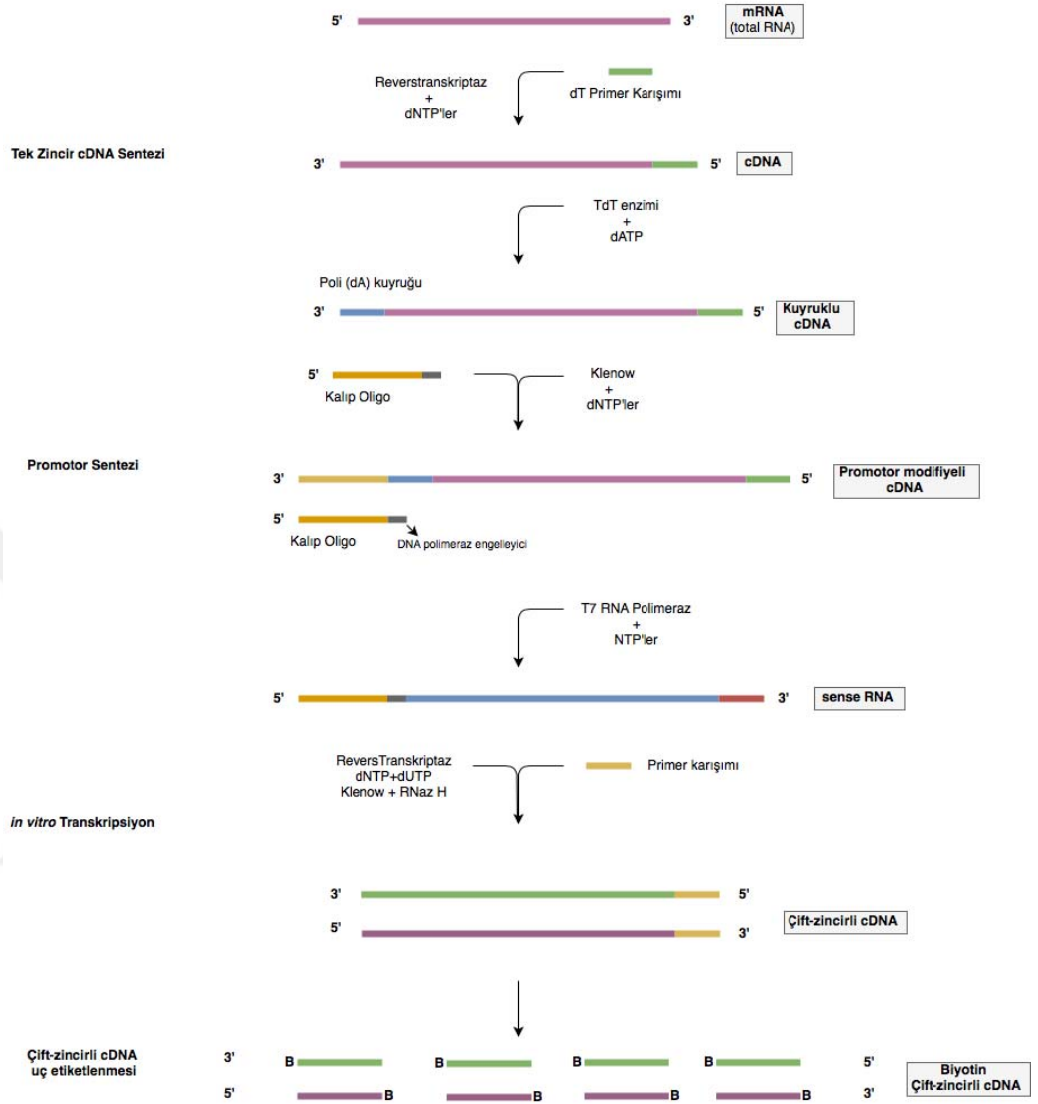
kloroform ilave edildi. Buz üzerinde 5 dakika bekletildi. Daha sonra örnekler 15 dakika boyunca 14000 x g'de santrifüj edildi. RNA içeren üst sıvı fazı dikkatlice alınarak bu miktara eş hacimde isopropanol eklendi ve RNA'nın çökmesi için 30 dakika boyunca -20°C'de bekletildi. İnkübasyonu takiben 14000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek RNA çöktürüldü. Oluşan RNA çözeltisi 0,5 ml %70'lik soğuk etanol ile 10 dakika boyunca +4°C'de bekletilerek 14000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. RNA'nın etanol ile yıkanması işlemi 2 kez tekrarlandı. Santrifüj sonrası oluşan pelletlerden etanol dikkatlice çekilerek oda sıcaklığında 10 dakika kuruması beklendi. Üzerine 20 mikrolitre otoklavda steril edilmiş ve nükleazlardan arındırılmış su konarak 10 dakika bekletildi ve RNA'nın suda çözünmesi sağlandı.

### **3.5.1. Total RNA Miktar Tayini**

İzole edilen total RNA miktarının ve saflığının anlaşılması adına örnekler nanodrop cihazı(P360 Implen nanophotometer, Almanya) ile 260 nm'de ölçüldü. Bunun için öncelikle 2 mikrolitre nükleazlardan arındırılmış su, kör çözelti olarak okutuldu. Daha sonra her bir izolattan 2 mikrolitre alınarak cihazda okutuldu.

### **3.6. Mikroarray Analizi**

Tüm genom transkripsiyon ifade analizi yapmak için SensationPlus™ FFPE Amplification and WT Labeling (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific, Amerika) kiti kullanıldı. Bu kit, ile total RNA'dan revers transkripsiyon yöntemi ile öncelikle cDNA üretilmesi, daha sonra da bu cDNA'nın çoğaltılarak miktarının arttırılmasını sağlandı. Çoğaltılan cDNA'lar kite uygun olarak pürifiye edilip miktar tayinleri yapıldıktan sonra sırasıyla fragmentasyonu, terminal uç etiketlenmesi ve array çipine hibridizasyonları gerçekleştirildi(Şekil 3.2).



**Şekil 3-2: Mikroarray analiz basamakları**

### 3.6.1. RNA'nın ve Poli-A RNA Kontrollerinin Hazırlanması

Poli-A RNA kontrolleri total RNA ile birlikte olup işaretlenmektedir. Kontroller sayesinde GeneChip arraylerin hibridizasyon yoğunlukları denetlenmekte, bu ise başlangıçtaki RNA kalitesinden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Kit içerisinde bulunan Poli-A kontrol stoğu ve Poli-A kontrol dilüsyon bufferı başlangıçta konulan total RNA miktarına göre kitin belirttiği ölçülerde sulandırılmalıdır (Tablo 3.5).



**Tablo 3-5: Poli-A kontrol stok seri sulandırımı**

Başlangıç miktarı	Seri sulandırım				4.Sulandırmadan alınacak miktar
	1.Sulandırım	2.Sulandırım	3.Sulandırım	4.Sulandırım	
20 ng	1:20	1:50	1:50	1:50	2 µl
50 ng	1:20	1:50	1:50	1:20	2 µl
100 ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2 µl
200 ng	1:20	1:50	1:50	1:50	2 µl

Başlangıç materyali olarak belirlenen 200 ng RNA'ya göre olan sulandırmalar tabloya uygun olarak yapıldı.

Birinci sulandırım için 38 mikrolitre Poli-A kontrol dilüsyon bufferı için 2 mikrolitre Poli-A kontrol stoğu eklendi(1:20) ve karışım vorteklenip spin edildi. İçinden 2 mikrolitre alınarak yeni tüpte 98 mikrolitre Poli-A kontrol dilüsyon bufferı ile karıştırıldı(1:50). Vortekslendi ve spin edildi. Üçüncü sulandırmada karışımdan 2 mikrolitre çekildi yeni bir tüpte 98 mikrolitre Poli-A kontrol dilüsyon bufferı ile karıştırıldı(1:50). Vortekslendi ve spin edildi. Dördüncü sulandırmada, üçüncü sulandırmadan alınan 10 mikrolitre yeni tüpte bulunan 40 mikrolitre Poli-A kontrol dilüsyon bufferı üzerine eklendi(1:5). Karışım vortekslendi ve spin edildi. Bu sulandırmadan 2 mikrolitre çekilip 200 ng olan total RNA'ya eklendi. Toplam hacim 7 mikrolitre olacak şekilde üzerine nükleaz içermeyen su konuldu.

### 3.6.2. Tek Zincir cDNA Sentezi

RNA-Primer karışımı hazırlamak için reaksiyon başına 4 µl RT Primer karışımı ile 7 µl total RNA konuldu. Herhangi bir el hatasını önlemek için karışımın %10'u kadar fazla çözelti ise hazırlandı. Buna göre 10 + 1(hata payı) örnek için 11x11 = 121 µl olacak şekilde toplamda 121 µl master karışımbuz üzerinde hazırlandı. Karışım vortekslendi ve spin edildi. SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD), inkübasyon için 10 dakika 80°C'ye, ve 4°C'de 2 dakika olarak ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Ürünler buz üzerine alındı.

Farklı bir tüpte amplifikasyon master karışımı; kitin temin ettiği 4 µl RT buffer karışımı, 2 µl DTT, 1 µl dNTP karışımı, 1 µl RT Enzim karışımı ve 1 µl RNaz inhibitörü ile buz üzerinde karıştırılarak örnek başına 11 µl olacak şekilde hazırlandı.

Daha önceki aşamada hazırlanan 9 µl RNA-Primerkarışımı, burada hazırlanan 11 µl amplifikasyon master karışımı üzerine son hacimde örnek başına 20 µl olacak şekilde eklendi. Son karışım vortekslendi ve spin edildi. SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD), inkübasyon için 1 saat 42°C'ye ve 25°C'de 2 dakika olarak ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı.

### **3.6.3. cDNA Pürifikasyon**

Pürifikasyon bilyelerinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve kullanmadan önce vortekslendi. Nükleaz içermeyen su 65°C'de 10 dakika boyunca ısıtıldı. Daha sonra örneklerin üzerine örnek başına 36 µl olacak şekilde pürifikasyon bilyesi ve 30 µl %100 etanol eklendi. Örnekler 10-20 kez pipetlendi ve 10 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler manyetik standda alındı ve yaklaşık 10 dakika beklendi. Süre sonunda manyetik bilyelere dokunulmadan süpernatant atıldı ve örnek başına 180 µl taze hazırlanmış %70'lik etanol eklendi. 30 saniye inkübe edildi. Manyetik bilyelere dokunulmadan süpernatant atıldı ve bu işlem 2 kez dahatekrarlanarak örnekler toplamda 3 kez yıkandı.Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak tüplerin kapakları açıldı ve 5 dakika boyunca içlerinde hiç sıvı kalmayacak şekilde havada kurumaya bırakıldı. Süre sonunda tüpler manyetik standdan alındı ve üzerlerine 14 µl 65°C'de ısıtılmış nükleaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 2-3 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler 10 kez pipetlendi ve manyetik standda geri kondu. Bu aşamada yaklaşık 3 dakika beklendi ve cDNA içeren süpernatant yeni tüplere aktarıldı. cDNA'lar SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD) ile 80°C'de 10 dakika ve 4°C'de 2 dakika olacak şekilde ısıtıldı ve doğruca buz üzerine alındı.

### **3.6.4. Promotor Sentezi**

Kit tarafından temin edilen kimyasallar ile tailing master karışımı; 6 µl tailing buffer karışımı ile 2 µl tailing enzim karışımları karıştırılarak hazırlandı.

Bir önceki aşamada hazırlanan 12 µl pürifiye edilmiş cDNA ile bu aşamada hazırlanan 8 µl tailing master karışımı üzerine eklenerek vortekslendi ve spin edildi. SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD), inkübasyon için 2 dakika

37°C'ye, sonra 10 dakika 80°C'ye ve 4°C'de 2 dakika olarak ayarlandı ve cihaz çalıştırıldı. Ürünler buz üzerine alındı.

Farklı bir tüpte 4 µl Promoter Sentez Bufferı ile 1 µl Promoter Sentez enzimi karıştırılarak örnek başına 5 µl olacak şekilde promotor sentez master karışımı hazırlandı. Bu karışım bir önceki aşamada hazırlanan 20 µl tailed cDNA ile toplamda 25 µl olacak şekilde birleştirilerek vortekslendi ve spin edildi. Karışım SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD)'nda 30 dakika boyunca 25°C'de inkübe edildi ve ürünler bekletilmeden *in vitro* transkripsiyon aşamasına geçildi.

### 3.6.5. *In vitro* Transkripsiyon

T7 nükleotid karışımı ile T7 buffer karışımının oda sıcaklığına gelmesi beklendi. T7 buffer karışımı vortekslendi ve spin edildi. Oda sıcaklığında toplam hacmi 30 µl olan IVT master karışımı; 16 µl T7 nükleotid karışımı, 5 µl T7 buffer karışımı ve 9 µl T7 enzim karışımı eklenerek hazırlandı. Bir önceki aşamada hazırlanan 25 µl cDNA ile 30 µl IVT master karışımı birleştirilerek toplam hacmi 55 µl olan IVT reaksiyonu Thermal Cycler cihazı ile 37°C'de 16 saat boyunca inkübe edildi. Cihazdan alınan örnekler 5 saniye spin yapıldıktan sonra buz üzerine alındı.

### 3.6.6. senseRNA Pürifikasyonu

Pürifikasyon bilyelerinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve kullanmadan önce vortekslendi. Nükleaz içermeyen su 65°C'de 10 dakika boyunca ısıtıldı. Daha sonra örneklerin üzerine örnek başına 99 µl olacak şekilde pürifikasyon bilyesi eklendi. Örnekler 10-20 kez pipetlendi ve 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler manyetik standda alındı ve yaklaşık 10 dakika beklendi. Süre sonunda manyetik bilyelere dokunulmadan süpernatant atıldı ve örnek başına 180 µl taze hazırlanmış %70'lik etanol eklendi. 30 saniye oda sıcaklığında inkübe edildi. Manyetik bilyelere dokunulmadan süpernatant atıldı ve bu işlem 2 kez daha tekrarlanarak örnekler toplamda 3 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra süpernatant atılarak tüplerin kapakları açıldı ve 5 dakika boyunca içlerinde hiç sıvı kalmayacak şekilde havada kurumaya bırakıldı. Süre sonunda tüpler manyetik standdan alındı ve üzerlerine 23 µl 65°C'de ısıtılmış nükleaz içermeyen su eklendi. Oda sıcaklığında 2-3 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler 10 kez pipetlendi ve manyetik standda geri kondu. Bu aşamada yaklaşık 3 dakika beklendi ve senseRNA içeren süpernatant yeni tüplere aktarıldı.

### 3.6.7. Saflaştırılmış senseRNA Miktar Tayini

senseRNA'lar nanodrop cihazı(P360 Implen nanophotometer, Almanya) ile 260 nm'de ölçüldü. Bunun için öncelikle 2 mikrolitre nükleazlardan arındırılmış su, kör çözelti olarak okutuldu. Daha sonra her bir örnekten 2 mikrolitre alınarak cihazda okutuldu.

### 3.6.8. Çift Zincir cDNA Sentezi

Ölçümü yapılan senseRNA'lar 20 µl hacimde 25 µg olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi. Buz üzerinde 20 µl senseRNA üzerine 3 µl WT etiketleme primer karışımı eklenerek 23 µl hacimli senseRNA-Primer karışımı elde edildi. Bu karışım SimpliAmp Thermal Cycler cihazı(Life Technologies, ABD)'nda 5 dakika boyunca 80°C'de ve 2 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi ve örnekler buz üzerine alındı.

Örnek başına 17 µl Etiketleme RT Master karışımı; 8 µl RT Buffer karışımı, 4 µl DTT, 2 µl Etiketleme dNTP karışımı, 2 µl RT enzim karışımı ve 1 µl RNaz inhibitörü eklenerek hazırlandı.17 µl etiketleme RT master karışımı üzerine 23 µl hacimli senseRNA-Primer karışımı eklendi, vortekslendi ve spin edildi. Toplam hacmi 40 µl olan örnekler, tek zincir sentezi için; SimpliAmp Thermal Cycler cihazında 120 dakika boyunca 42°C'de ve 2 dakika boyunca 25°C'de inkübe edildi ve buz üzerine alındı.

20 µl hacimli ikinci zincir sentezi master karışımı; 13 µl MgCl<sub>2</sub>, 2 µl etiketleme dNTP karışımı, 3 µl Klenow ve 2 µl RNaz H eklenerek hazırlandı. İkinci zincir sentezi master karışımı buz üzerindeki örneklerin üstüne eklendi ve Thermal Cycler cihazında 40 dakika boyunca 37°C'de, 10 dakika boyunca 75°C'de ve 2 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi. İnkübasyon biter bitmez oda sıcaklığında her bir örneğin üzerine 2 µl WT stop solüsyonu eklendi ve hafifçe çalkalandı. Karışım Thermal Cycler cihazında 30 dakika boyunca 65°C'de ve 2 dakika boyunca 25°C'de inkübe edildi. İnkübasyon biter bitmez oda sıcaklığında her bir örneğin üzerine 8 µl WT nötralizasyon karışımı eklendi ve hafifçe çalkalandı.

### 3.6.9. Çift Zincirli cDNA Pürifikasyonu

Nükleaz içermeyen su 65°C'de 10 dakika boyunca ısıtıldı. Pürifikasyon bilyelerinin oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve kullanmadan önce vortekslendi. Daha

sonrason hacmi 70 µl olan çift zincirli cDNA örneklerinin üzerine örnek başına 126 µl olacak şekilde pürifikasyon bilyesi eklendi (toplam hacim 196 µl). Örnekler 10 kez pipetlendi. Örnek başına 65 µl %100'lük etanol eklendi. 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler manyetik standa alındı ve yaklaşık 10 dakika beklendi. Süre sonunda manyetik bilyelere dokunulmadan süpernatant atıldı ve örnekler 170 µl taze hazırlanmış %70'lik etanol eklendi ve 30 saniye boyunca inkübe edildi. Bu yıkama işlemi toplamda 3 kez olacak şekilde tekrarlandı. En son yıkamada kalan etanol tamamen tüplerden alınarak tüplerin kapakları açıldı ve 5 dakika boyunca içlerinde hiç sıvı kalmayacak şekilde havada kurumaya bırakıldı. Süre sonunda tüpler manyetik standdan alındı ve üzerlerine 25 µl 65°C'de ısıtılmış nükleaz içermeyen su eklendi. 2-3 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler 10 kez pipetlendi ve manyetik standa geri kondu. Bu aşamada yaklaşık 3 dakika beklendi ve çift-zincirli cDNA içeren süpernatant yeni tüplere aktarıldı. Pürifiye edilmiş çift-zincirli cDNA'lar buzun üzerine alındı.

#### **3.6.10. Saflaştırılmış Çift Zincirli cDNA Miktar Tayini**

cDNA örnekleri nanodrop cihazı(P360 Implen nanophotometer, Almanya) ile 260 nm'de ölçüldü. Bunun için öncelikle 2 mikrolitre nükleazlardan arındırılmış su, kör çözelti olarak okutuldu. Daha sonra her bir örnekten 2 mikrolitre alınarak cihazda okutuldu. Okunan değerlere uygun olarak örnekler 22,5 µl hacimde 6 µg olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile seyreltildi.

#### **3.6.11. Çift Zincirli cDNA'nın Terminal Etiketlenmesi**

7,5 µl hacimli terminal etiketleme reaksiyon master karışımı; 6 µl fragment ve label buffer karışımı ve 1,5 µl fragment ve label enzim karışımı eklenerek hazırlandı. Bu karışım, 22,5 µl hacimli saflaştırılmış çift-zincirli cDNA ile karıştırıldı(son hacim 30 µl). Karışım Thermal Cycler cihazında 60 dakika boyunca 37°C'de, 2 dakika boyunca 93°C'de ve 2 dakika boyunca 4°C'de inkübe edildi.

#### **3.6.12. Array Hibridizasyonu**

Hibridizasyon fırını, GeneChip® Hybridization Oven 645(Thermo Fisher Scientific, Amerika) 47°C ve 60 rpm'e ayarlandı. Fırın açılarak istenilen sıcaklığa gelmesi sağlandı. Hibridizasyon, yıkama ve boyama kiti olarak GeneChip™ Hybridization, Wash and Stain(Thermo Fisher Scientific, Amerika) kiti kullanıldı.

Array'ler ve kitte bulunan kimyasallar oda sıcaklığına alındı. Array'lerin üzeri numune isimleri yazılarak etiketlendi.

Kitin temin ettiği 20 X Hibridizasyon kontrolleri Thermal Cycler cihazı ile 65°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Her bir numune için; 3,3 µl Kontrol Oligo B2, 10 µl 20 X Hibridizasyon kontrolleri, 100 µl 2X Hybridizasyon karışımı, 20 µl DMSO ve 36,7 µl nükleaz içermeyen su eklenerek toplam hacmi 170 µl olan hibridizasyon master karışımı hazırlandı. Karışım vortekslendi ve üzerine 30 µl biyotin ile işaretlenmiş çift-zincirli cDNA eklenerek 200 µl hacimli hibridizasyon kokteyli hazırlandı. Thermal Cycler cihazı ile 99°C'de 5 dakika ve sonra 47°C'de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Her bir array çipine 200 µl hibridizasyon kokteyli enjekte edildi. Arrayler hibridizasyon fırınına yerleştirildi ve 60 rpm,47°C'de 16 saat boyunca hibridize edildi.

### **3.6.13. Yıkama, Boyama, Tarama**

Arrayler hibridizasyon fırınından çıkarıldı ve hibridizasyon kokteyli çipten yeni tüplere alındı. Her bir array Yıkama buffer A ile dolduruldu ve arraylerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Bu arada array özellikleri yıkama ve tarama işlemlerini yapacak bilgisayara yüklendi. Kit içindeki Stain Coctail-1, Stain Coctail-2 ve Array Holding Buffer sırasıyla 600µL-600µL-800µL miktarlarında ışık görmeyecek şekilde ependorflara alındı ve GeneChip® Yıkama istasyonu 450(Thermo Fisher Scientific, Amerika)adlı makinedeki uygun yerlere yerleştirildi. Arrayler yıkama protokolünü uygun olarak yıkandı. Array, sistem bilgisayarı ile kontrol edilen GeneChip® 3000 Scanner 7G(Thermo Fisher Scientific, Amerika) adlı tarayıcıya yerleştirildi ve intensite verileri elde edildi.

## **3.7. Veri Analizi**

### **3.7.1. Verilerin Programa Yüklenmesi, Normalizasyonu ve Gen Listelerinin Belirlenmesi**

Affimetrix cihazında gerçekleşen Mikroarray (mikrodizin)analizi sonucu ham veriler (raw data), Affimetrix GeneChip platformuna özgü "cel" dosya formatında elde edildi. Mikroarray analizi iş akışında ilk aşama olan ham veri analizi (raw data analysis), özetleme (summarizasyon) ve normalizasyon işlemlerinden oluşmaktadır. Ön işleminden geçirme (pre-processing) aşaması (Smyth 2005) R programı (versiyon 3.4.1) ve Bioconductor yazılım kaynağı (Gentleman ve ark. 2004) kullanılarak gerçekleştirildi.

Bu aşamada ham intensite değerlerinin okunması, ham veri analizi ve özetlenmesi işlemleri Affymetrix platformuyla uyumlu *affy* (Gautier ve ark. 2004) ve *limma* (Smyth ve Speed 2003) R paketlerinden yararlanıldı. Summarizasyon işlemi sonucu probe seviyesindeki değerler probeset değerlerine çevrildi. Probeset seviyesindeki veriler Robust Multi-array Average(RMA) (Irizarry ve ark. 2003) metodu ile normalize edilerek işlendi (processed) ve ekspresyon verilerine dönüştürüldü. Ön işlem den geçirme (pre-processing) aşaması R konsolunda R kodları girilerek gerçekleştirildi. Bu aşama ile ilgili R komutları Tablo 3.6’da verilmiştir.

**Tablo 3-6: R konsolunda yapılan işlemler ve uygulanan R komutları**

İşlem	Komut
R konsolunda, bilgisayar üzerindeki girdi verisinin (CEL formatındaki dosyaların) bulunduğu klasörün, çalışma lokasyonu olarak ayarlanması	> setwd("/Users/heren/Desktop/Thesis_RawData/")
Affymetrix’e uyumlu cell dosyalarının program tarafından okunabilmesi için çeşitli paketlerin yüklenmesi	> library(limma) > library(affy) > biocLite("hugene20sttranscriptcluster.db") > biocLite("oligo") > biocLite("pd.hugene.2.0.st")
CEL formatındaki dosyaların R programına girdi olarak okutulması	> targets <- readTargets("mydata.txt",sep="") > library("oligo") > library("pd.hugene.2.0.st") > targets
RMA kullanılarak verilerin arka plan düzeltilmesi, normalizasyonu ve ekspresyonlarının özetlenmesi	> abatch <- read.celfiles(filenamees=targets\$filename) > eset <- rma(abatch)
Veri analizi sonucu elde edilen işlenmiş gen ekspresiyonunun “txt” dosya formatında kaydedilmesi	> write.exprs(eset,file="allmicroarray_norm_exprdata.txt")

### 3.7.2. Ayırt Edici Gen Ekspresyonu Analizi

Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>, versiyon 5) programına, Differential Expression: Class comparison opsiyon bölümünde, hastalığın iki farklı morfolojik özelliğine göre (kanamalı ve epileptik) ve kontrol gruplandırılmış gen listesi ve ilgili anlatım değerleri input (girdi) olarak yüklendi. p değerini hesaplamak için limma (Smyth ve Speed 2003) testi uygulandı. Belirlenen kritere ( $p < 0,05$ ) uygun olan gen listeleri oluşturuldu.

### 3.7.3. Venn Diyagramının Oluşturulması

$p < 0,05$  değeri için oluşturulan gen listelerindeki kontrol, kanamalı ve epilepsi gruplarında anlatımı gerçekleştiren ortak genlerin varlığının ortaya konulabilmesi için venn diyagramları oluşturuldu. Bunun için Venny programı versiyon 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) programı kullanıldı. Bu şekilde her üç durum için de ortak olan ve olmayan genler tespit edildi.

### 3.7.4. Yolak Analizleri

Üç farklı grupta “pathway” ve “geneontology” seçenekleri farklı olarak seçilerek overrepresentation zenginleştirme analizi (overrepresentation enrichment analysis-ORA), WebGestalt (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) programı (<http://www.webgestalt.org/> - versiyon/update2013) kullanılarak yapıldı (Zhang ve ark. 2005). Bu analiz; her bir grup için ayrı ayrı uygulanarak KEGG, Reactome, Panther ve Wikipathway veri tabanları baz alındı. Üç farklı gruba ait gen listelerinin “Biyolojik süreçler” “Moleküler Fonksiyon” ve “Hücrenel komponent” gibi özellikler bakımından fonksiyonel anlamlandırılması (functional interpretation) gerçekleştirildi.

### 3.7.5. Verilerin Kümelenmesi (Clustering) ve Görselleştirilmesi

Üç farklı gruba ait gen ekspresyonlarına temel bileşen analizi (Principal Component Analysis-PCA) (Jolliffe 2002) ve hiyerarşik kümelenme (Hierarchical Clustering) yapıldı. Bunun için ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) programı (versiyon/update 2018) kullanıldı. Bunun sonucunda ısı haritaları ve PCA plotlar oluşturuldu.

### 3.7.6. Protein-Protein Etkileşim Ağı Analizi

Farklı hasta gruplarındaki proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinin anlaşılması ve etkileşim ağlarının oluşturulması için protein-protein etkileşim ağı analizi yapıldı.



Bunun içinString (<https://string-db.org/>) programı (versiyon 10.5) kullanıldı. Program ara yüzünde; Multiple proteins → Organisms (Homo sapiens) → Settings → Experiments → 1st shell no more than 50 interactions seçenekleri uygulandı. Bu seçimler sonucunda CvsE, CvsH ve CvsEvsH grupları için protein-protein etkileşimlerini gösteren bağlantı haritaları oluşturuldu.

### **3.7.7. Ayırt Edici Genlere Odaklı Veritabanı ve Literatür Taraması**

Babelomics sonucu her üç grupta  $p < 0,05$  değeri için anlamlı bulunan genler;pubmed, NCBI ve google scholar gibi çeşitli veritabanlarında literatür taraması yapılarak bu genlerin işlevleri, anlatımının görüldüğü dokular ve ilişkili oldukları hastalıklara ait bilgiler ortaya konulmaya çalışıldı.

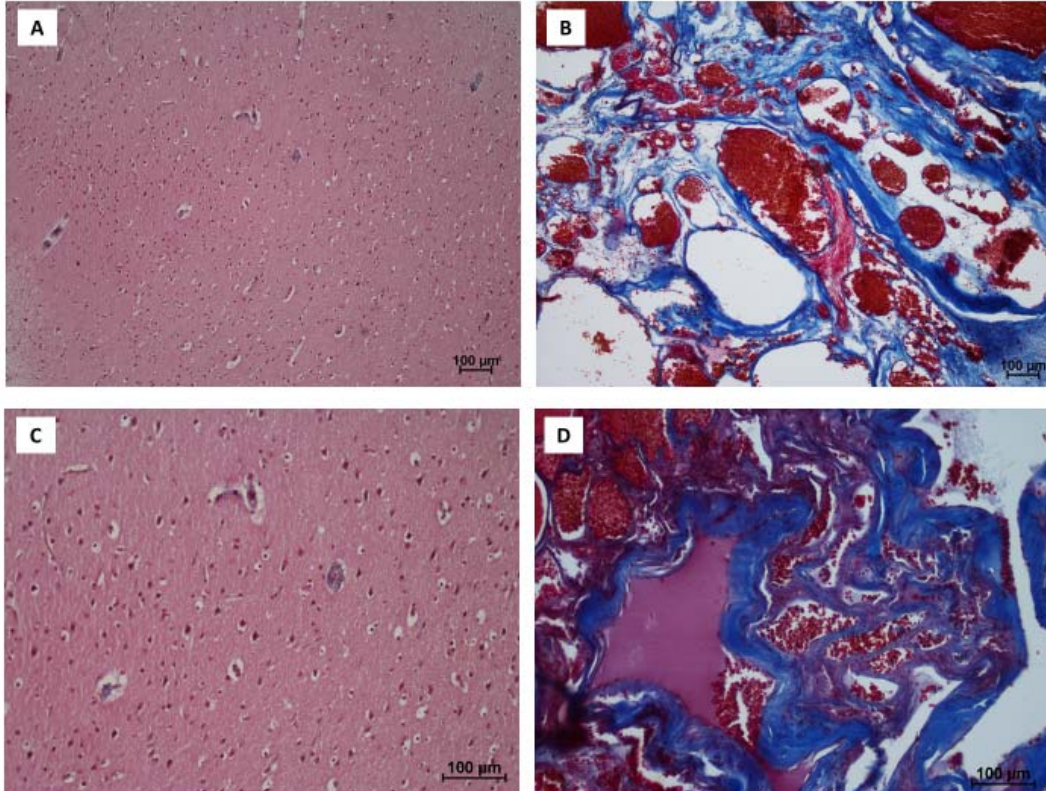
## 4. BULGULAR

### 4.1. Histolojik Boyama

Normal serebral kan damarlarının lümenleri, birbirine sıkı bağlantılar ile bağlı tek katlı yassı endotel hücreleri ile döşenmiştir (Şekil 4.1 A ve C). Endotel hücre katmanının altında bazal lamina bulunmaktadır. Kapillerler sadece endotel tabakası içerirken, diğer tüm damarlar endotel tabakasına ek olarak bir veya bir kaç katlı düz kas hücre tabakası ile çevrilidirler. Endotel hücreleri, bunların arasındaki sıkı bağlantılar ve bu yapıları çevreleyen astrositler ile beraber beyin-kan bariyerini oluşturmaktadırlar.

Tıpkı kapillerler gibi, SKM damarları da düz kas katmanı içermemektedir. Bu damarlar, parankimin içine girmiş, birbirine yakın duran geniş lümenli bir patoloji sergilemektedirler. Damarların sınırları belirgin, aralarında nöral doku bulunmayan, besleyici arter ve boşaltıcı venlerden yoksun benign vasküler hemartomlardır. Tek tabaka endotelin etrafında kalın, mavi renk ile boyanan bir kollajen tabakası teşekkül etmektedir. Şekil 4.1B ve D'de görülen büyük sinüzoidal damarsal boşlukların birleşmesiyle böğürtlen benzeri bir yapı oluşmaktadır.

**Şekil 4-1: Kavernom dokularının Masson boya ile boyanması**



#### 4.2. Total RNA'nın Nanodrop ile ölçülmesi

Parafin içine gömülü dokulardan RNA izolasyonu sonrası izole edilen RNA'nın miktarının tayin edilebilmesi için nanodrop ile ölçüm yapıldı (Tablo 4.1).

**Tablo 4-1: Nanodrop ile tayin edilen total RNA miktarları**

Örnekler	A260 nm	A260/A280	A260/230
	159 ng/μl	1,4	0,2
	141 ng/μl	1,4	0,2
	188 ng/μl	1,5	0,2
	218 ng/μl	1,5	0,2
	77 ng/μl	1,4	0,1
P2	82 ng/μl	1,5	0,2
	179 ng/μl	1,5	0,2
	154 ng/μl	1,4	0,2
	129 ng/μl	1,5	0,2
	128 ng/μl	1,4	0,1

#### 4.3. Saflaştırılmış senseRNA Miktar Tayini

İn vitro transkripsiyon sonrası pürifiye edilen senseRNA miktarları nanodrop ile ölçüldü (Tablo 4.2).

**Tablo 4-2: Nanodrop ile tayin edilen total senseRNA miktarları**

Örnekler	A260 nm	A260/A280	A260/230
	1193 ng/μl	2,2	2,3
	1204 ng/μl	2,2	2,3
	1511 ng/μl	2,2	2,5
	1339 ng/μl	2,2	2,2
	1293 ng/μl	2,2	2,4
	1463 ng/μl	2,2	2,8
	1376 ng/μl	2,2	2,6
	1503 ng/μl	2,2	2,5
	1180 ng/μl	2,2	2,4
	1224 ng/μl	2,2	2,3

#### 4.4. Saflaştırılmış Çift Zincirli cDNA Miktar Tayini

Çift-zincirli cDNA sentezi sonrası pürifiye cDNA miktarları nanodrop ile ölçüldü (Tablo 4.3).

**Tablo 4-3: Nanodrop ile tayin edilen total cDNA miktarları**

Örnekler	A260 nm	A260/A280	A260/230
	514 ng/μl	2,0	1,8
	550 ng/μl	1,8	1,8
	568 ng/μl	2,1	2,4
	544 ng/μl	1,8	2,1
	548 ng/μl	1,8	2,1
P2	505 ng/μl	2,0	2,1
	503 ng/μl	1,9	2,3
	476 ng/μl	2,0	2,5
	592 ng/μl	1,9	2,3
	429 ng/μl	1,9	2,3

#### 4.5. Data Eldesi ve Sonuçların İşlenmesi

Mikroarray işlemi sonrası alınan cel dosyaları, Bioconductor (Gentleman ve ark. 2004) programı R ara yüzü (Smyth 2005) kullanılarak ham intensite veri dosyalarına çevrildi. Bu işlem sonrası her bir örnek başına 53617 probesete ait veri elde edildi.

Bioconductor programından elde edilen veriler, Babelomics 5 (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es>) programına, hastalığın iki farklı morfolojik özelliğine göre (kontrol grubu ile hemorajik (kanamalı) grubun karşılaştırılması-CvsH ve kontrol grubu ile epileptik grubun karşılaştırılması-CvsE) ve tüm grupların birbirleri ile karşılaştırılmaları (CvsEvsH) olacak şekilde sınıflandırılarak yüklendi. Her üç grup için en düşük p değerine sahip ilk 200 probesete ait listeler oluşturuldu. İleri analizler öncesi bu listelerdeki probesetler, gen nomenklatur komitesinin (HGNC:HUGO Gene Nomenclature Committee) belirlediği gen sembollerine çevrildi ve anlamsız bulunan probesetler (pozitif veya negatif kontrol olarak bulunan probesetler) çıkarıldı. Böylece  $p < 0,05$  değeri için; CvsE grubu için 56 gen, CvsH grubu için 64 gen ve CvsEvsH grubu

için 41 gen ile ileri analizlere devam edildi. Mevcut genlerin anlatımına bakıldığında bu 3 gruptaki bütün genlerin anlatımında azalma olduğu görülmüştür (Tablo 4.4).

**Tablo 4-4:  $p < 0,05$  değeri için CvsH, CvsE ve CvsEvsH gruplarında anlamlılık gösteren genler**

	<b>CvsE (Gen ID-Probeset No)</b>	<b>CvsH (Gen ID-Probeset No)</b>	<b>CvsEvsH (Gen ID-Probeset No)</b>
1	ACP6 (16692341)	RBM44 (16892956)	GOLGA8A (17121284)
2	ZNF860 (16938620)	KRT12 (16844487)	AARD (17072052)
3	KCNK18 (16709709)	PIGT (16914240)	TAS2R39 (17052744)
4	NF1P2 (16805915)	TSEN34 (16865244)	DIAPH3-AS1 (16775156)
5	TSGA10IP (16727184)	YBX2 (16840611)	VPS9D1 (16829350)
6	CA4 (16836655)	TSPAN6 (17112607)	ADGRA1-AS1 (16719794)
7	C11orf95 (16739784)	SLC39A3 (16866985)	KSR1 (16832350)
8	OSBPL2 (16915635)	TRBV7-1 (17052607)	CEACAM19 (16863011)
9	POU5F1B (17072664)	KDM4D (16730296)	NSF (16835087)
10	KIR2DS2 (16876286)	TCTA (16940693)	LINC00965 (17074342)
11	UCP3 (16741989)	CDKN2B-AS1 (17126214)	SLC39A3 (16866985)
12	SCPEP1 (16836333)	IER5 (16674618)	NF2 (16928824)
13	EIF4A1 (17120718)	SHISAL1 (16935905)	MIR2909 (17119080)
14	MIP (17120810)	ZNF860 (16938620)	KIAA1210 (17113549)
15	IFFO2 (16682487)	NAIP (16996956)	RPL36 (16857353)
16	TRIM24 (17052115)	MIR212 (16839552)	RBM44 (16892956)
17	EGLN1 (16700489)	MIR520A (16865036)	FGD6 (16768675)
18	TRAM1L1 (16979213)	PDGFD (16743816)	KCNK18 (16709709)
19	FAM114A1 (16966047)	EYA1 (17078134)	CCDC62 (16758442)
20	RIT2 (16854819)	MASP1 (16962536)	NF1P2 (16805915)
21	TAS2R42 (16761533)	DNAJC11 (16681225)	QSOX1 (16674521)
22	GRPEL1 (16974096)	RAET1E (17024669)	ZNF253 (16860097)
23	CRISP2 (17019864)	RBM38 (16915173)	CLYBL (16776100)
24	MAD1L1 (17123106)	TMEM75 (17081067)	OR52E4 (16721313)
25	TCEAL1 (17105757)	UCP3 (16741989)	MYBPHL (16690553)
26	HYLS1 (16733157)	IGHA1 (16797607)	ZNF860 (16938620)
27	IFI44 (16666509)	OAS3 (16757347)	PGF (16794846)
28	SCARNA11 (16731691)	RAB2A (17069250)	KRT12 (16844487)
29	KRT12 (16844487)	ESPNP (16682278)	ELL3 (16808345)
30	PGM1 (16665566)	FAM110D (16661058)	PRDM13 (17011191)
31	CHADL (16935380)	TRAV20 (16781912)	ZBTB37 (16674008)
32	GTF3C6 (17011683)	MRGPRF (16741334)	MIR520A (16865036)
33	ELAVL4 (16664533)	P2RY8 (17108740)	KDM4D (16730296)
34	REC8 (16782710)	SRMS (16921280)	CALML6 (16657926)
35	BTBD6 (16789624)	EID1 (16800871)	MIP (17120810)

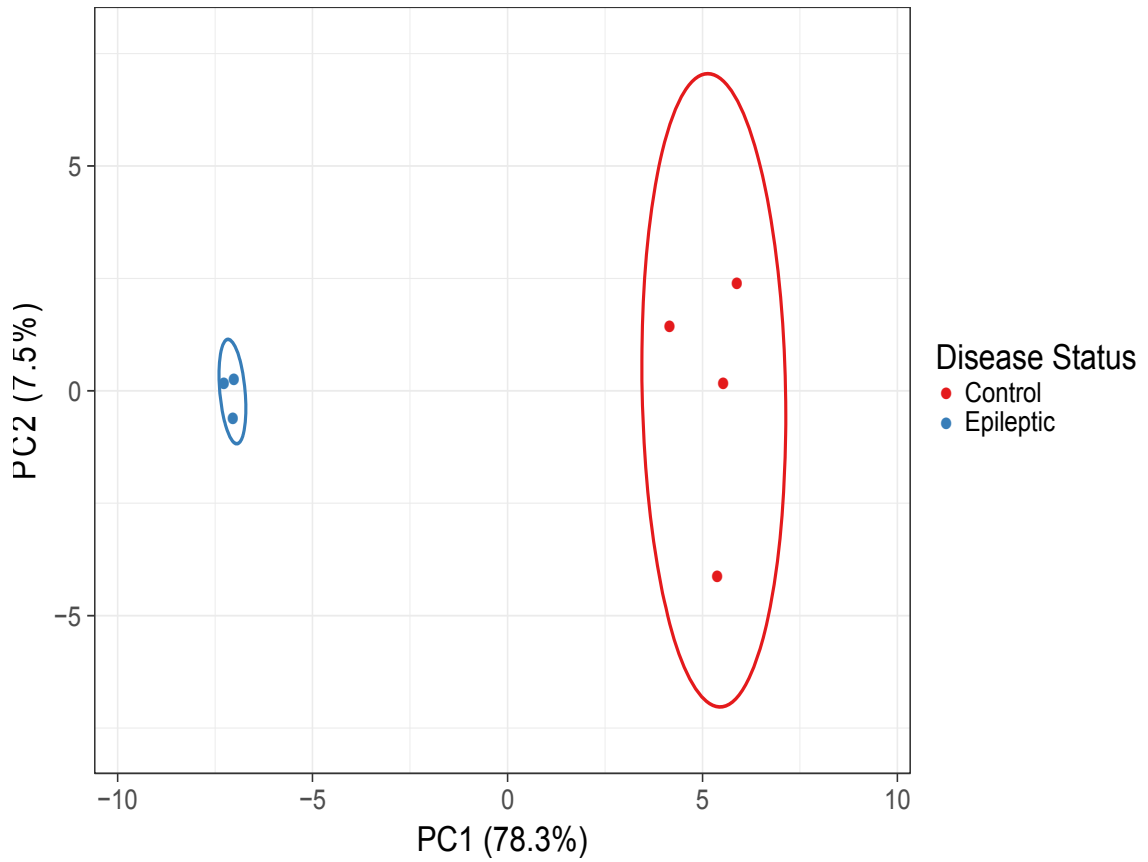
---

36	SLC43A3 (16738479)	UBR1 (16807996)	IRX5 (16819039)
37	TRAV20 (16781912)	HIST1H4D (17016383)	LINCMD1 (17020007)
38	UQCR11 (16866718)	MKL2 (16815985)	EHD3 (16878731)
39	FAM26E (17011949)	HIST3H2BB (16678496)	YBX2 (16840611)
40	SLC52A1 (16840210)	COPB1 (16736014)	ALDH3B1 (16727976)
41	C17orf75 (16843221)	PPP1R14D (16807511)	ORMDL3 (16844239)
42	KIAA0586 (16784710)	PACSIN3 (16737925)	
43	IGHA1 (16797607)	CCR1 (16952874)	
44	SRGAP2B (17125876)	ZCCHC14 (16829037)	
45	MIR519D (16865062)	IGF2-AS (16720842)	
46	CHAF1B (16922577)	MSTO1 (16671791)	
47	SEC14L2 (16928938)	TMEM177 (16885028)	
48	FPGS (17089460)	SIX1 (16793613)	
49	MIR4506 (16796202)	TMEM134 (16741023)	
50	IL11 (16875754)	ACKR2 (16939739)	
51	ARHGEF37 (16990966)	USP22 (16842452)	
52	TUBA1B (16764285)	ING2 (16972764)	
53	DSEL (16855781)	SOWAHC (16884200)	
54	NFE2L2 (16905498)	THAP7 (16932690)	
55	HIST2H2AC (16670401)	CAPN2 (16677863)	
56	PF4 (16976815)	MIR873 (17093076)	
57		MIR4725 (16833024)	
58		ADAM2 (17076538)	
59		TBK1 (16753498)	
60		VPS9D1 (16829350)	
61		TMEM8A (16822438)	
62		SNORA14A (17047459)	
63		MIR3529 (16813024)	
64		SYN3 (16934274)	

---

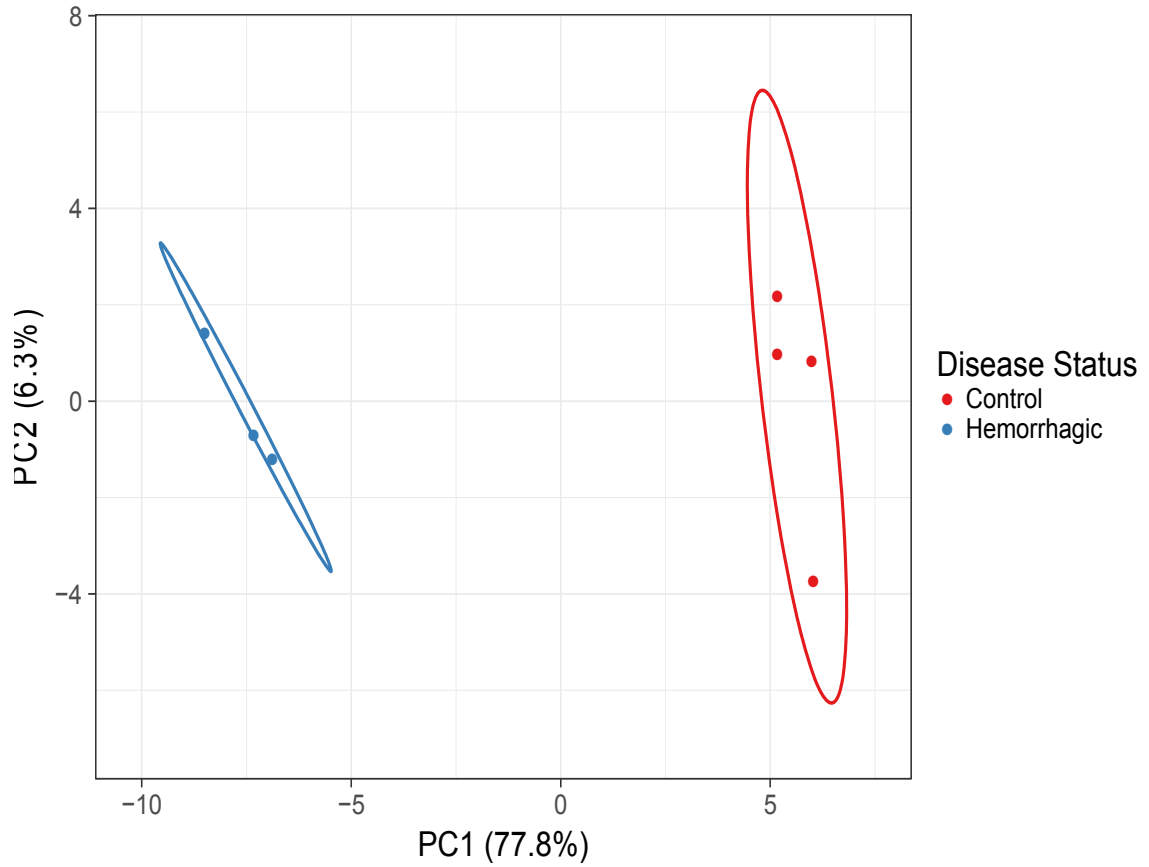
ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) programında üç farklı grubun (CvsE, CvsH ve CvsEvsH)  $p < 0,05$  değeri için temel bileşen analizi (Principal Component Analysis-PCA) (Jolliffe 2002) yapıldı.

CvsE grubuna ait X ve Y eksenleri temel bileşen 1 (principal component 1: PC1) ve temel bileşen 2'ye ait toplam varyansın sırasıyla %78,3 ve %7,5 olduğunu göstermiştir. Aynı gruplarla yapılacak yeni gözlemler 0,95 olasılıkla yine benzer bölgelere denk gelecektir(Şekil 4.2).



**Şekil 4-2: CvsE grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu**

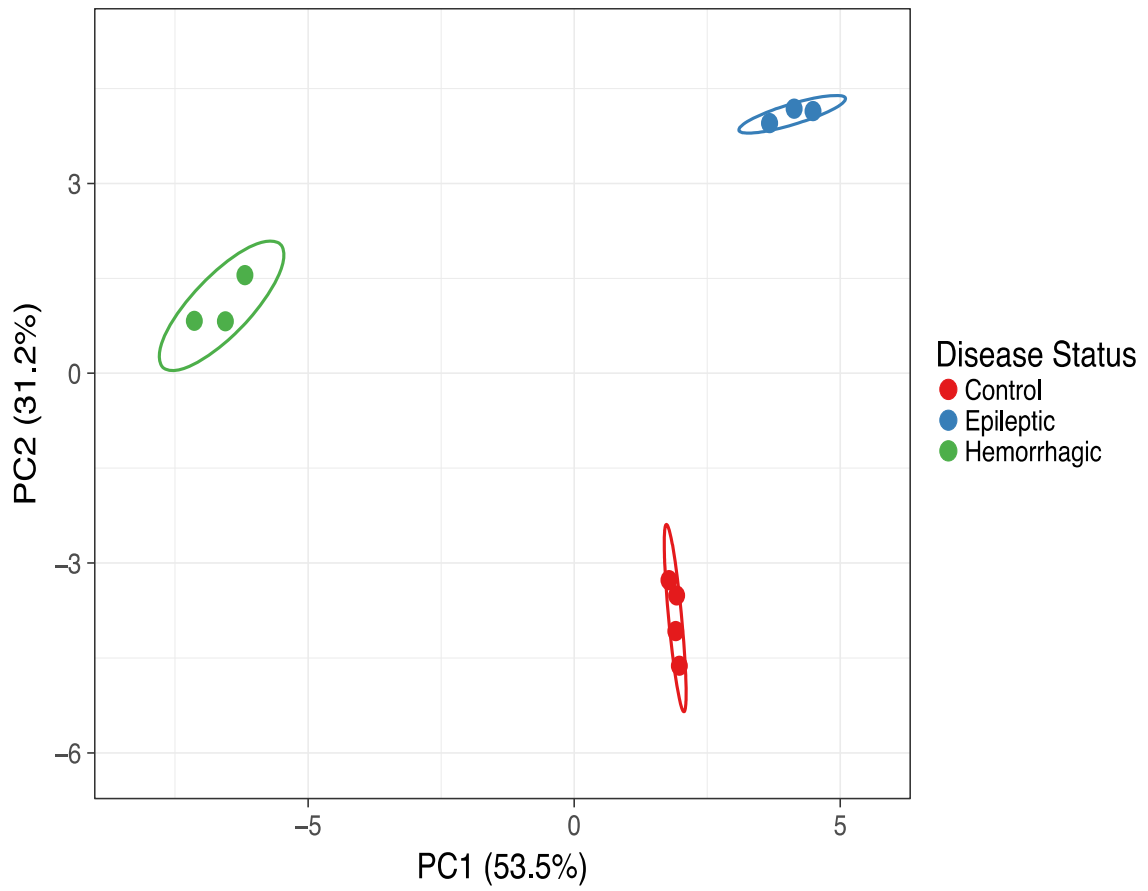
CvsH grubuna ait X ve Y eksenleri temel bileşen 1 (principal component 1: PC1) ve temel bileşen 2'ye ait toplam varyansın sırasıyla %77,8 ve %6,3 olduğunu göstermektedir. Aynı gruplarla yapılacak yeni gözlemler 0,95 olasılıkla yine benzer bölgelere denk gelecektir (Şekil 4.3).



Şekil 4-3: CvsH grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu

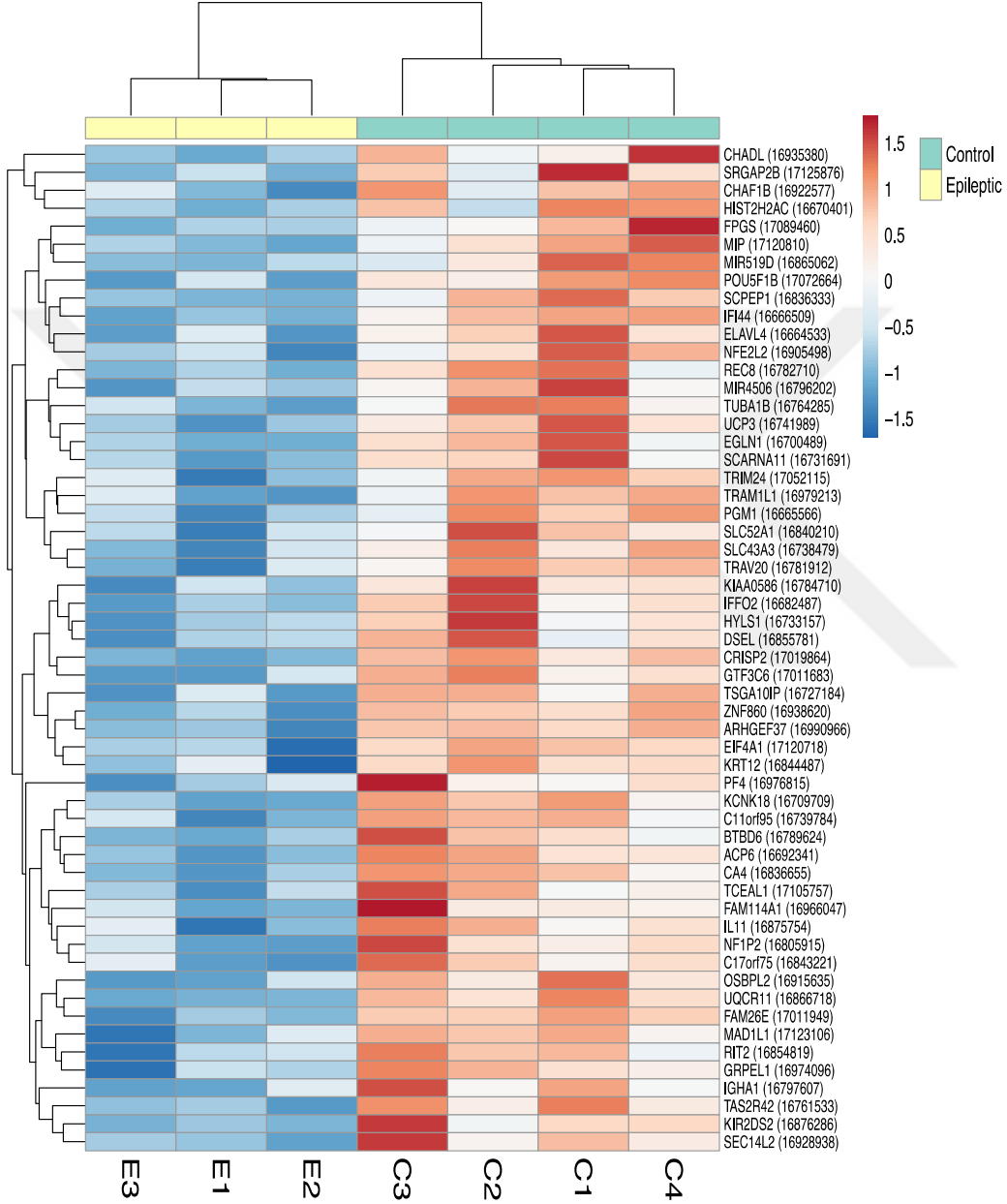


CvsEvsH grubuna ait X ve Y eksenleri temel bileşen 1 (principal component 1: PC1) ve temel bileşen 2'ye ait toplam varyansın sırasıyla %53,5 ve %31,2 olduğunu göstermektedir. Aynı gruplarla yapılacak yeni gözlemler 0,95 olasılıkla yine benzer bölgelere denk gelecektir(Şekil 4.4).

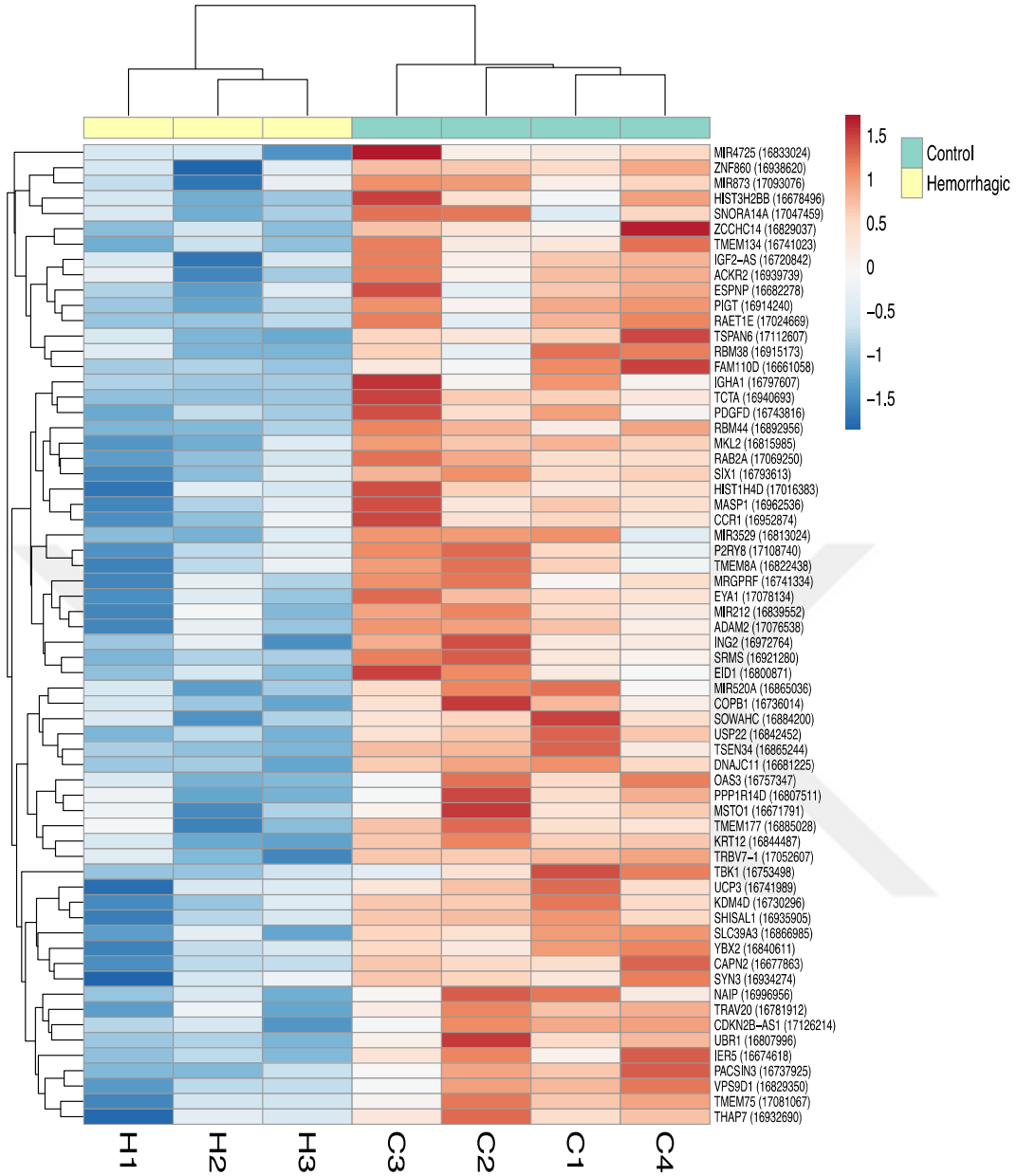


Şekil 4-4: CvsEvsH grubuna ait temel bileşen analizi (PCA) sonucu

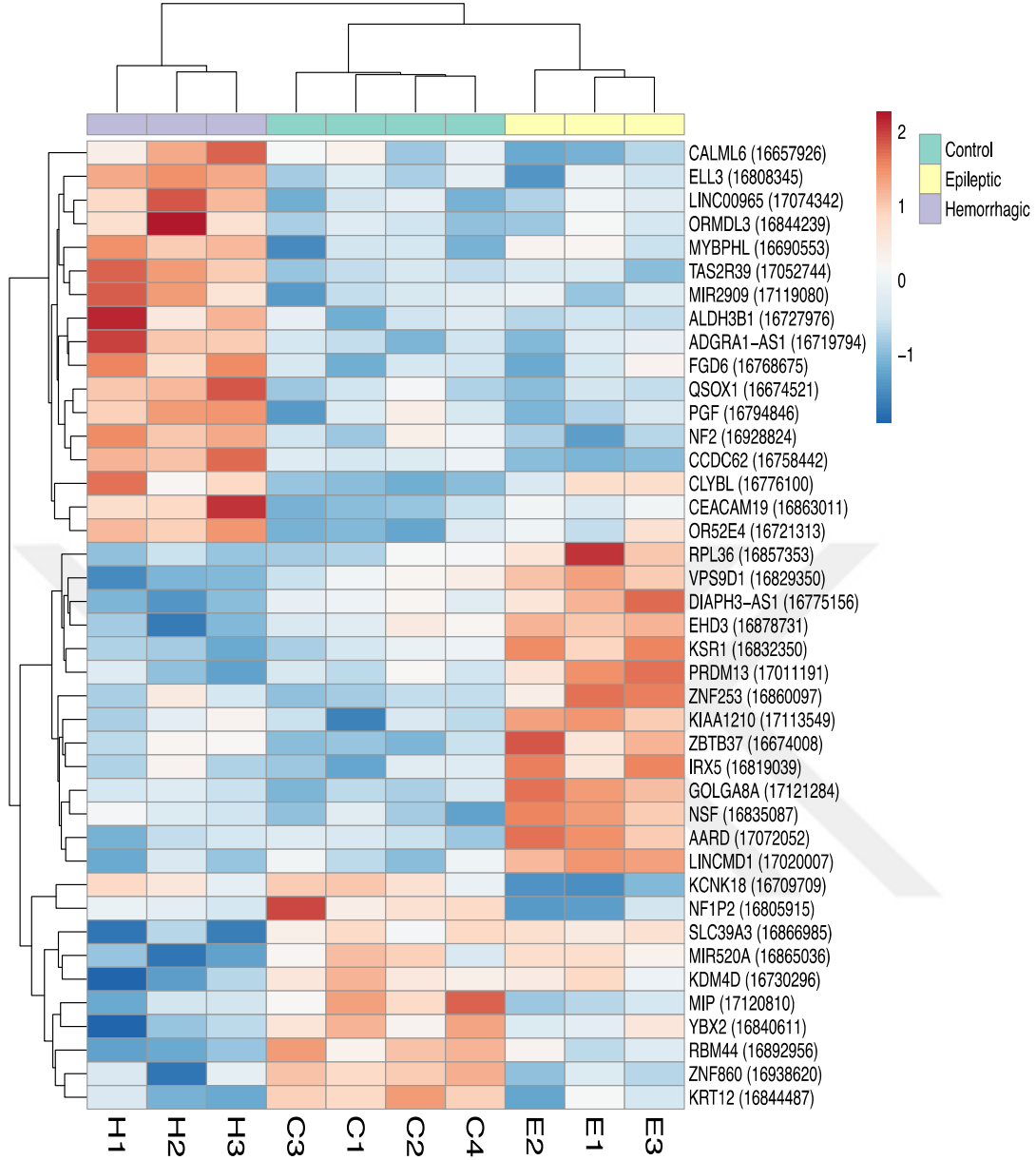
ClustVis programında üç farklı grubu ait (CvsE (Şekil 4.5), CvsH (Şekil 4.6) ve CvsEvsH (Şekil 4.7))  $p < 0,05$  değerlerine göre oluşturulan listelerdeki genlerle ısı haritaları oluşturuldu).



Şekil 4-5: CvsE grubuna ait ısı haritası



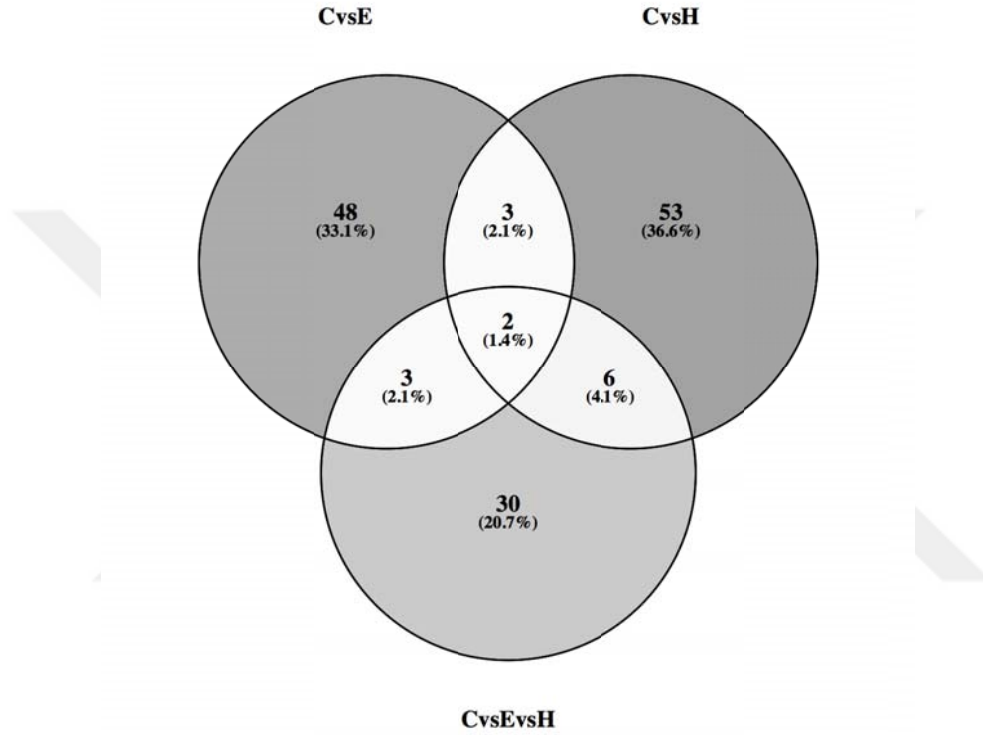
Şekil 4-6: CvsH grubuna ait ısı haritası



Şekil 4-7: CvsEvsH grubuna ait ısı haritası

$p < 0,05$  değeri için oluşturulan gen listelerindeki CvsH, CvsH ve CvsEvsH gruplarındaki ortak genlerin varlığının ortaya konulabilmesi için Venny 2.1 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) programı yardımıyla venn diyagramları oluşturuldu (Şekil 4.8). Bu analiz sonucunda her 3 grupta mevcut olan iki gen tanımlandı (ZNF860 ve KRT12). CvsE ve CvsH grupları için ortak olan beş gen tanımlandı (UCP3, TRAV20, IGHA1, ZNF860 ve KRT12). CvsE ve CvsEvsH grupları

için ortak olan beş gen tanımlandı (KCNK18, NF1P2, MIP, ZNF860 ve KRT12). CvsH ve CvsEvsH grupları için ortak olan sekiz gen tanımlandı (RBM44, YBX2, SLC39A3, KDM4D, MIR520A, VPS9D1, ZNF860 ve KRT12)(Tablo 4.5).



**Şekil 4-8: CvsE, CvsH ve CvsEvsH gruplarındaki genlere ait Venn diyagramı**

**Tablo 4-5: Farklı gruplara ait ortak genlerin listesi**

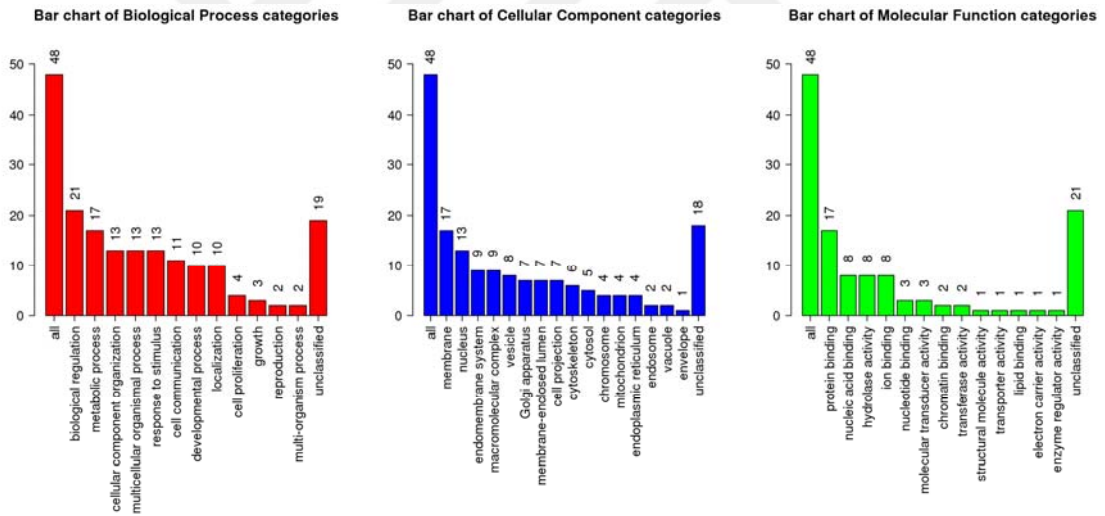
<b>CvsE∩CvsH ortak genler</b>	<b>CvsE∩CvsEvsH ortak genler</b>	<b>CvsH∩CvsEvsH ortak genler</b>	<b>CvsE∩CvsH∩CvsEvsH ortak genler</b>
UCP3 (16741989) (↓)	KCNK18 (16709709) (↓)	RBM44 (16892956) (↓)	ZNF860 (16938620) (↑)
TRAV20 (16781912) (↓)	NF1P2 (16805915) (↓)	YBX2 (16840611) (↓)	KRT12 (16844487) (↑)
IGHA1 (16797607) (↓)	MIP (17120810) (↓)	SLC39A3 (16866985) (↓)	
ZNF860 (16938620) (↓)	ZNF860 (16938620) (↓)	KDM4D (16730296) (↓)	
KRT12 (16844487) (↓)	KRT12 (16844487) (↓)	MIR520A (16865036) (↓)	
		VPS9D1 (16829350) (↓)	
		ZNF860 (16938620) (↓)	
		KRT12 (16844487) (↓)	

WebGestalt programı (<http://www.webgestalt.org/>) ile üç farklı grupta “pathway (yolak)” ve “geneontology (gen ontolojisi)” seçenekleri seçilerek ORA analizi yapıldı. Bu analiz; KEGG, Reactome, Panther ve Wikipathway veri tabanları için ayrı ayrı tekrarlandı.

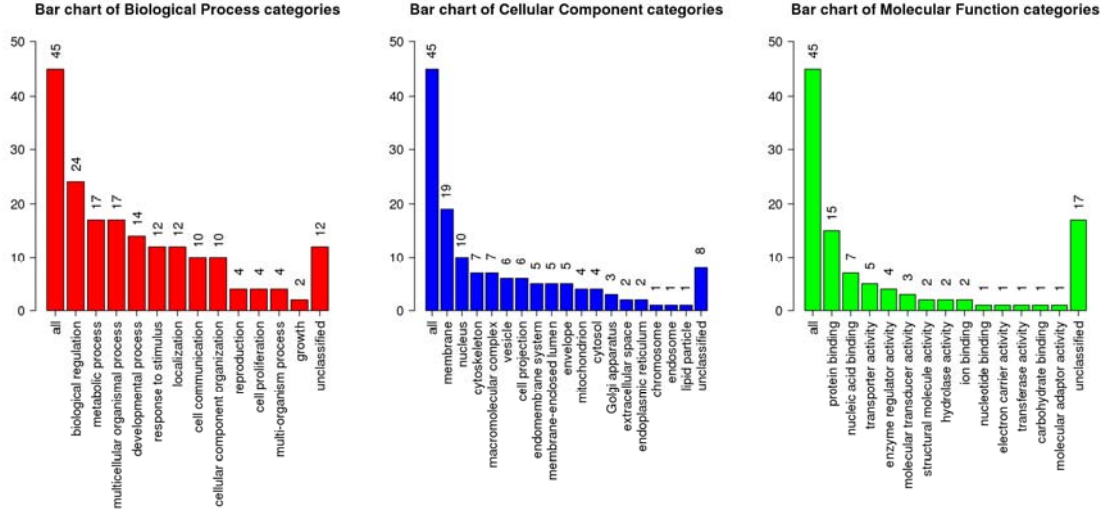
Yolak seçeneği seçilerek yapılan analizler incelendiğinde, CvsE grubunda eksprese olan genlerin, biyolojik regülasyon, metabolik süreçler ve lokalizasyon (Şekil 4.9); CvsH grubunda eksprese olan genlerin, biyolojik regülasyon, metabolik süreçler ve uyarana tepki verme (Şekil 4.10); CvsEvsH grubunda eksprese olan genlerin, biyolojik regülasyon, metabolik süreçler ve uyarana tepki verme gibi süreçlerde rol oynadıkları görülmüştür (Şekil 4.11).

Kodlanan proteinlerin hücre içi yerleşimlerine bakıldığında ise her üç grupta da ilk sırayı membran, ikinci sırayı nükleus almaktadır. Üçüncü sıraya bakıldığında ise CvsE grubundaki proteinler sitozolde (Şekil 4.8), CvsH grubundakiler veziküllerde (Şekil 4.10) ve CvsEvsH grubundakilerin ise endomembran sistemde yer aldığı görülmektedir (Şekil 4.11).

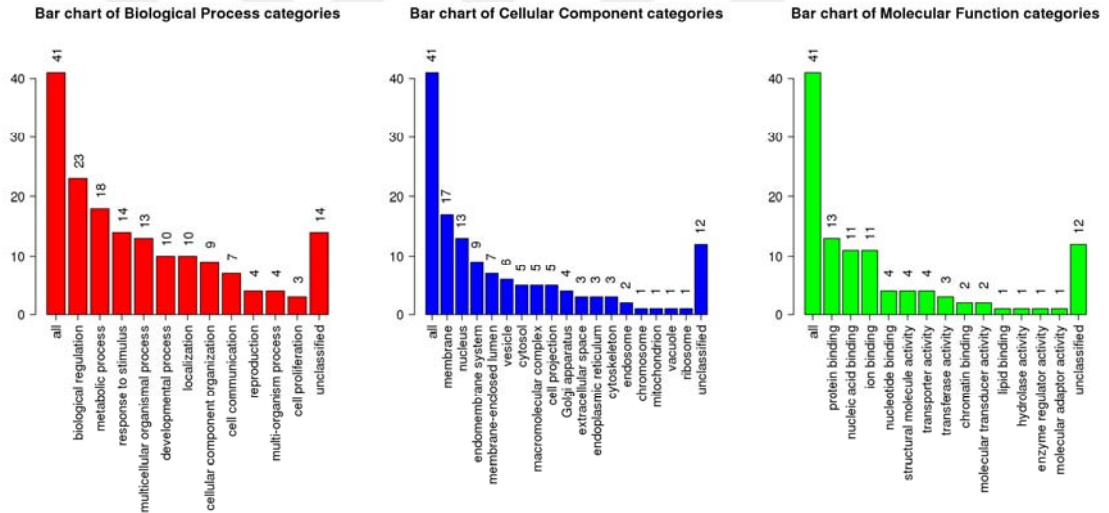
Bu gruplara ait genlerin moleküler işlevleri incelendiğinde ise ilk iki sıra yine ortak olarak proteine bağlanma ve nükleik aside bağlanma yer almaktadır. Diğer proteinler incelendiğinde ise gruplar arasında birtakım farklılıklar ortaya çıkmaktadır. CvsE grubundaki proteinlerin daha çok transporter aktivitesi, nükleotid bağlanma ve hidrolaz aktivitesi (Şekil 4.9); CvsH grubundaki proteinlerin iyon bağlanma, hidrolaz aktivitesi ve nükleotid bağlanma (Şekil 4.10) ve CvsEvsH grubundaki proteinlerin iyon bağlanma, nükleotid bağlanma, yapıya katılma gibi işlevleri olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4-9: CvsE grubu yolak analizi



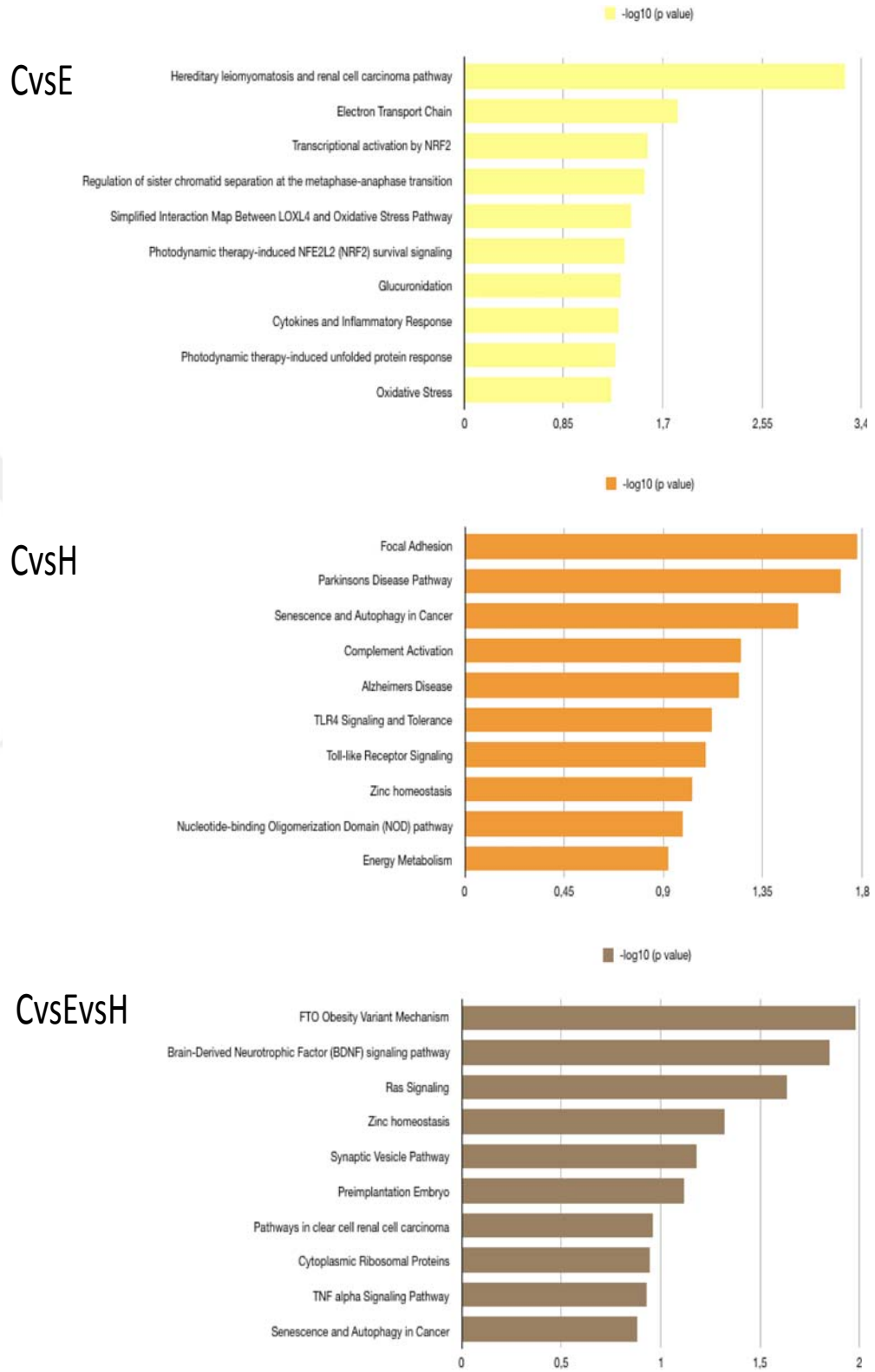
Şekil 4-10: CvsH grubu yolak analizi



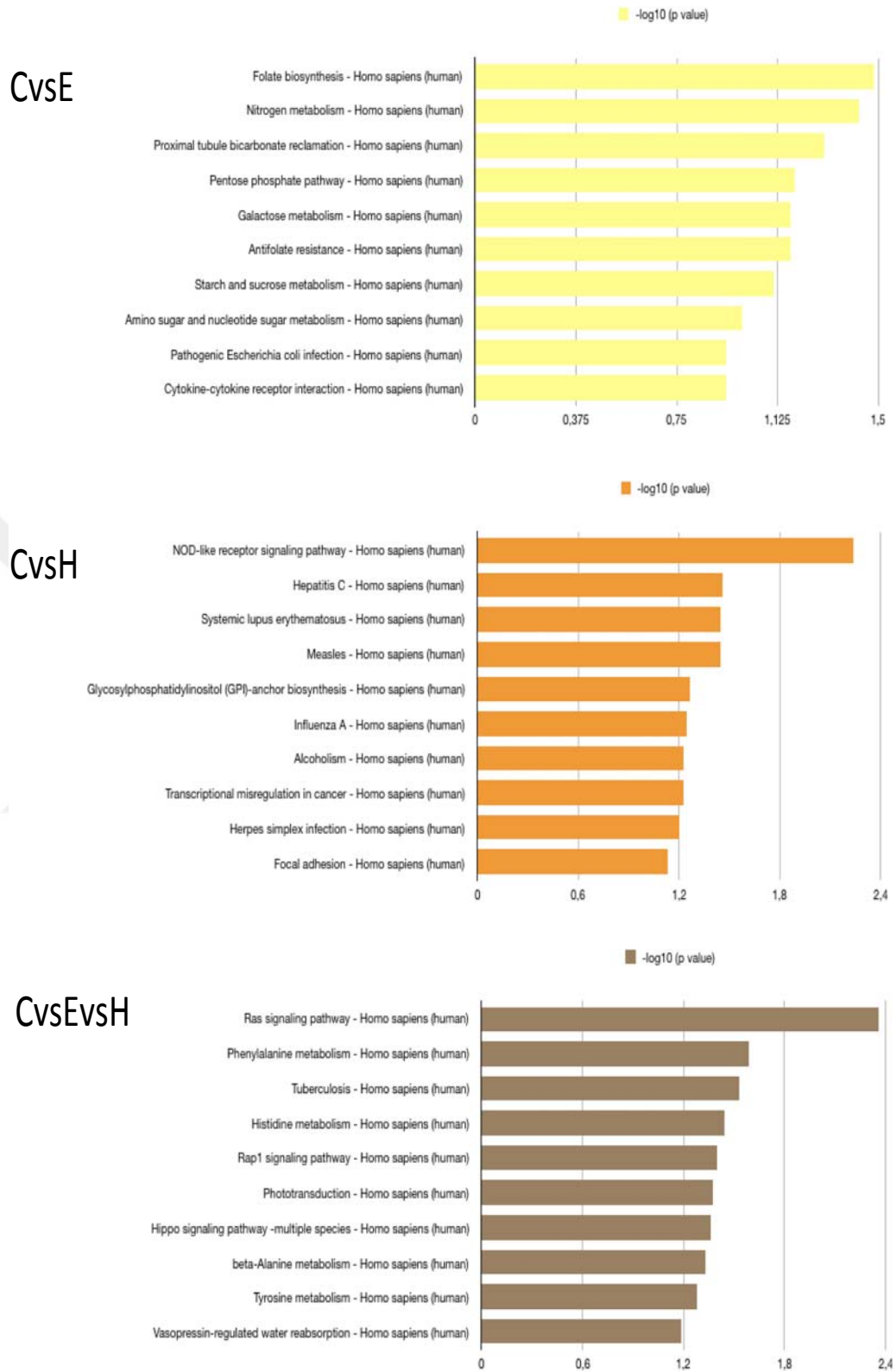
Şekil 4-11: CvsEvsH grubu yolak analizi

Yolak seçeneği seçilerek yapılan zenginleştirme analizlerine ait sonuçlar üç farklı grup için dört farklı veritabanından (Wikipathway, KEGG, Reactome, Panther) yararlanılarak grafik haline getirilmiştir. Wikipathway veritabanına ait sonuçlar şekil 4.12’de gösterilmiştir. KEGG veritabanına ait sonuçlar şekil 4.13’de gösterilmiştir. Reactome veritabanına ait sonuçlar şekil 4.14’de gösterilmiştir. Panther veritabanına ait sonuçlar şekil 4.15’de gösterilmiştir.



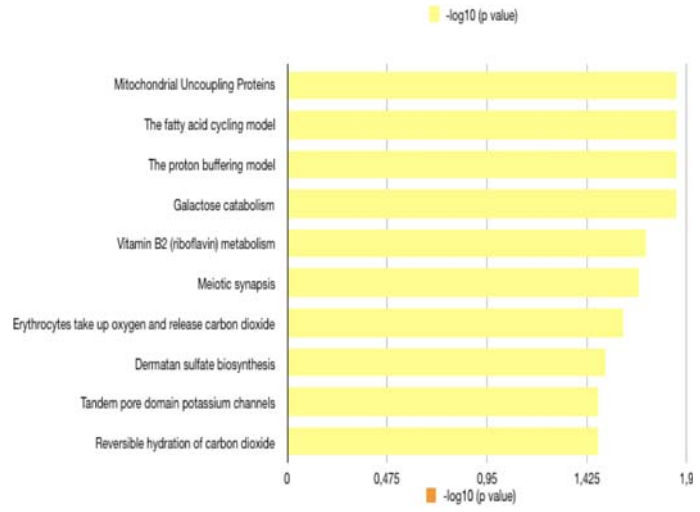


**Şekil 4-12: Wikipathway veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları**

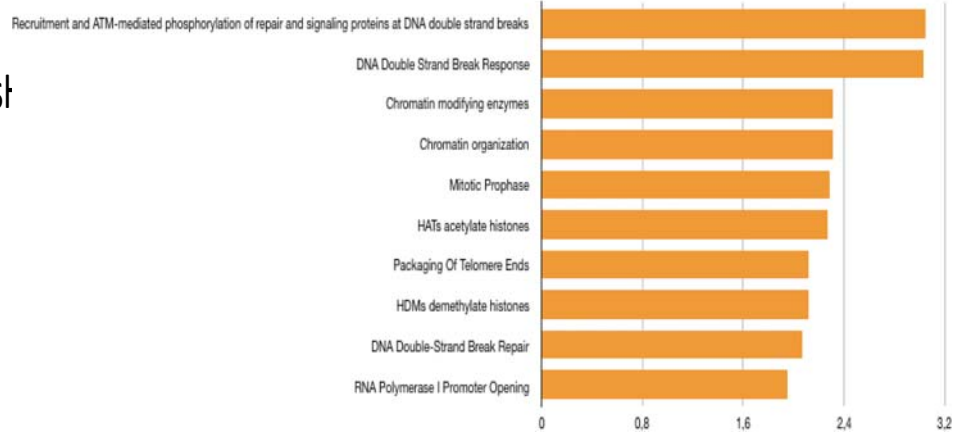


**Şekil 4-13: KEGG veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları**

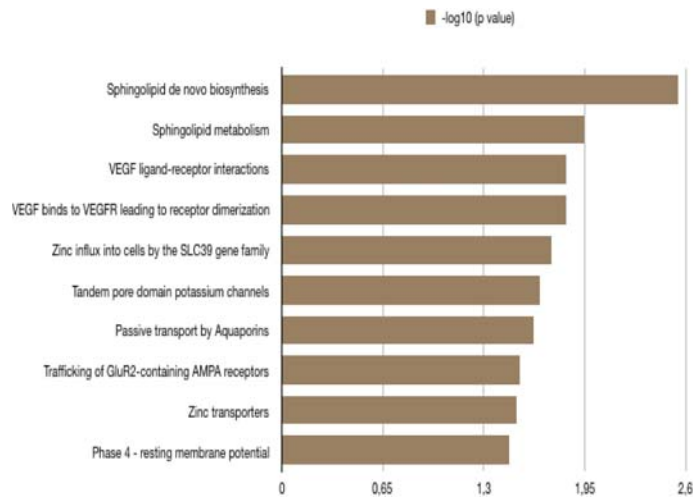
CvSE



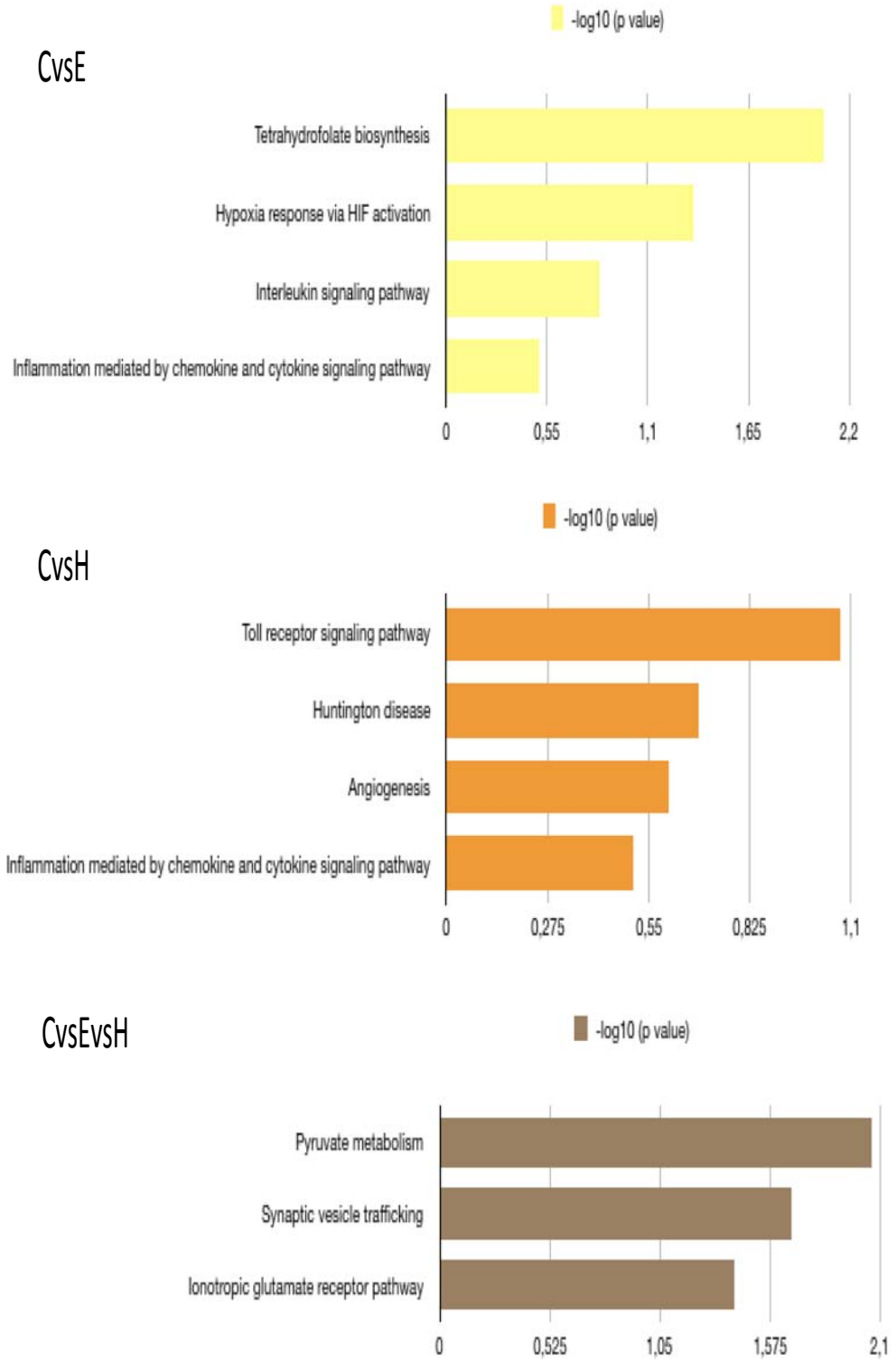
Cvst



CvSEvSH

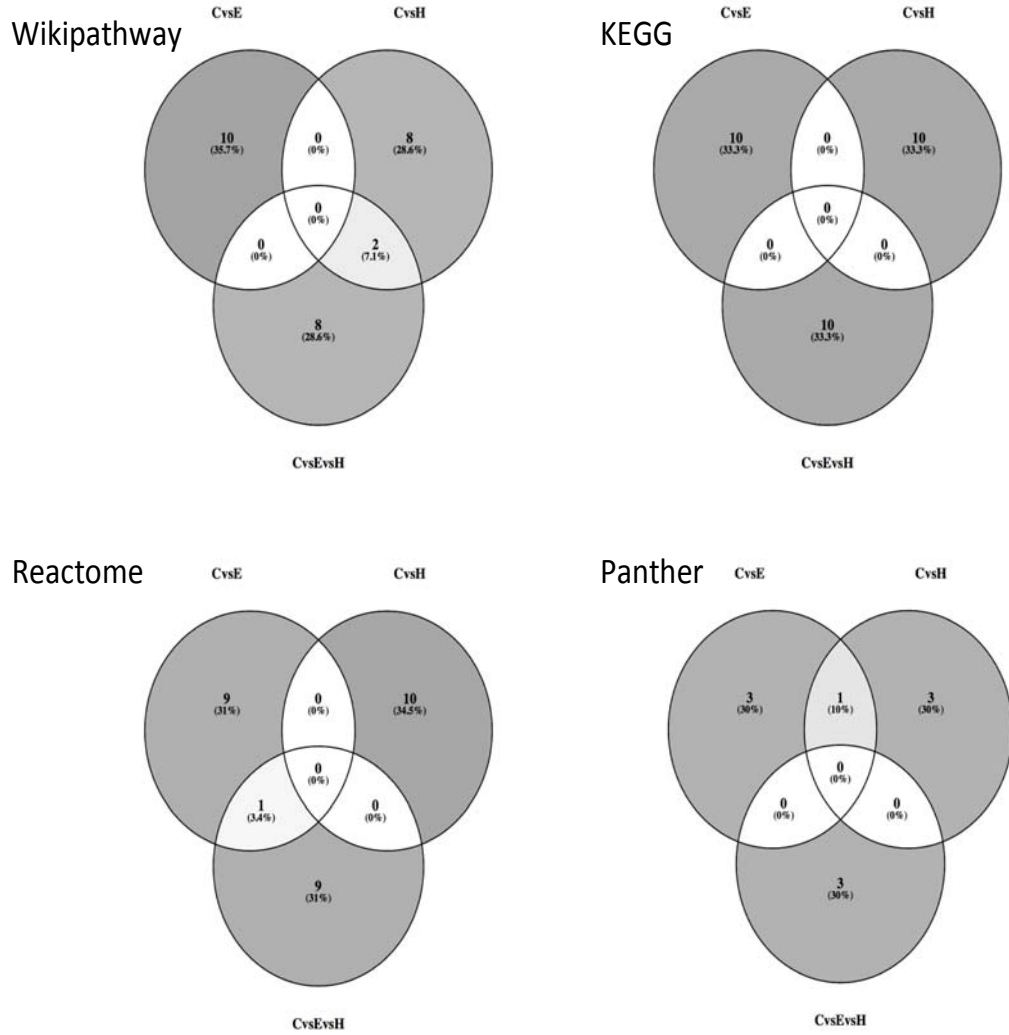


Şekil 4-14: Reactome veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları



**Şekil 4-15: Panther veritabanına göre üç farklı gruba ait analiz sonuçları**

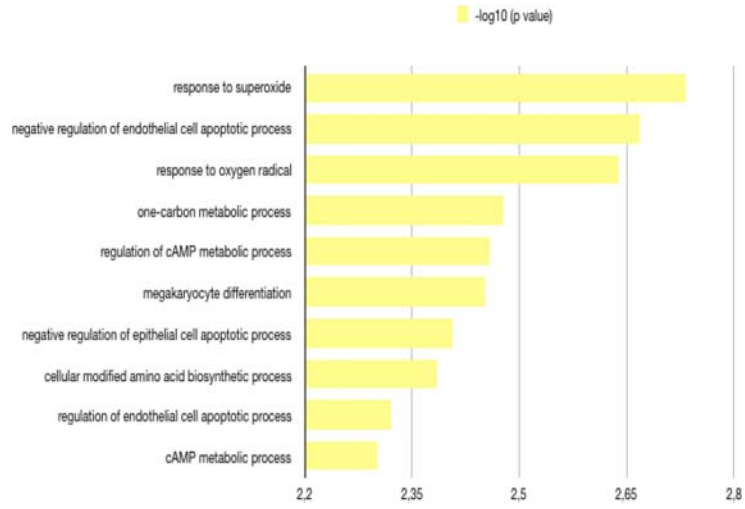
“Pathway” seçeneğine göre yapılan zenginleştirme analizi sonuçlarının gruplar arasında bir benzerliğe sahip olup olmadığı görmek adına 4 farklı veritabanına ait sonuçlara venn şeması ile gösterilmiştir (Şekil 4.16).



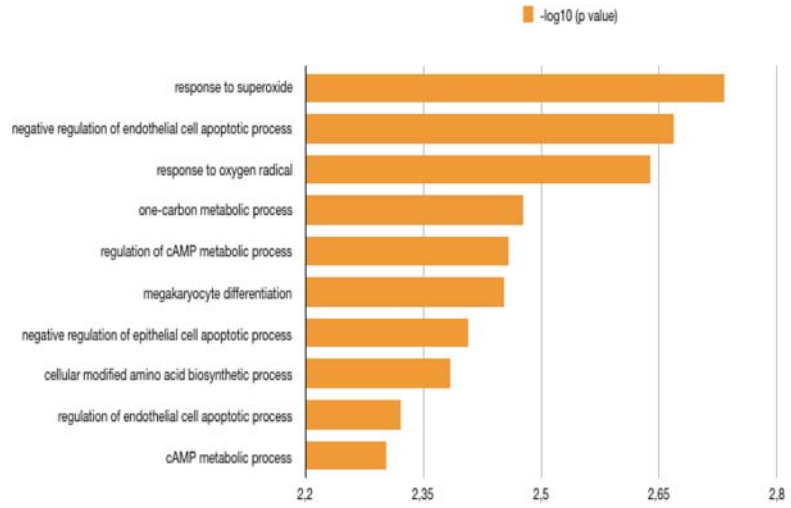
**Şekil 4-16: Pathway seçeneğine göre yapılan ORA analizinin farklı veritabanlarına göre gruplararası karşılaştırılması**

“Geneontology” seçeneği seçilerek yapılan zenginleştirme analizlerine ait sonuçlar üç farklı grup için üç farklı duruma “Biological Process (Biyolojik süreç), Cellular component (Hücresel bileşen), Molecular function (Moleküler işlev)” uygun olarak grafik haline getirilmiştir. Biyolojik süreç durumuna ait olan sonuçlar şekil 4.17’de gösterilmiştir. Hücresel bileşen durumuna ait olan sonuçlar şekil 4.18’de gösterilmiştir. Moleküler işlev durumuna ait olan sonuçlar şekil 4.19’da gösterilmiştir.

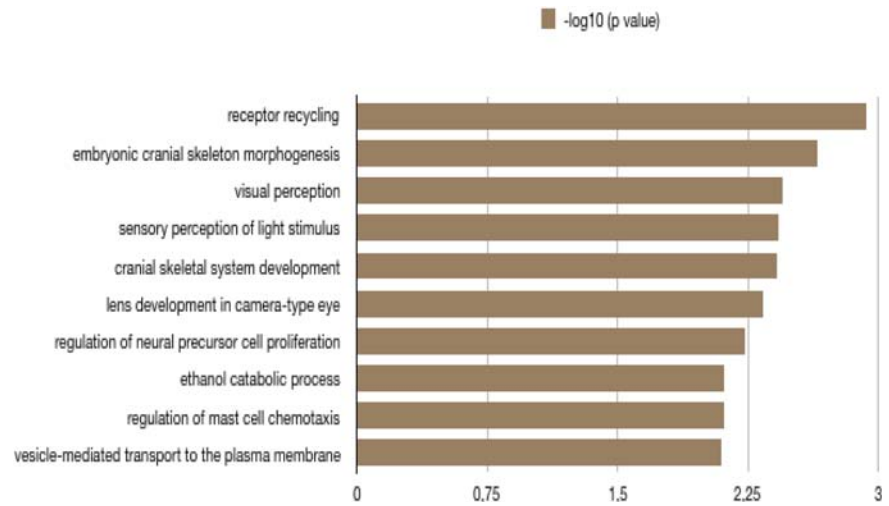
CvsE



CvsH

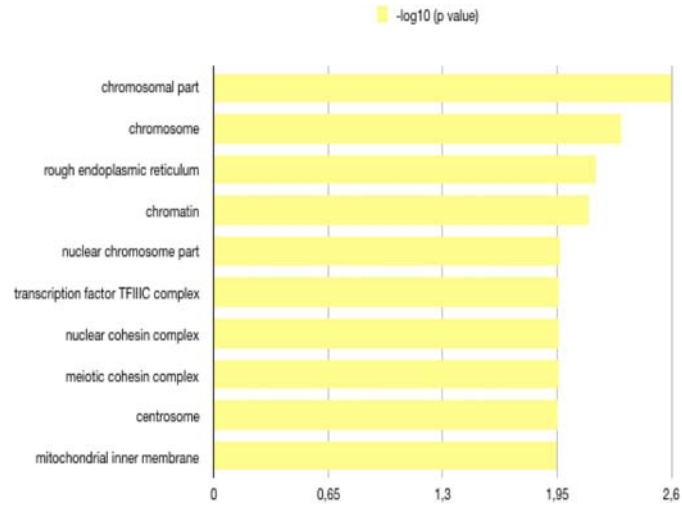


CvsEvSH

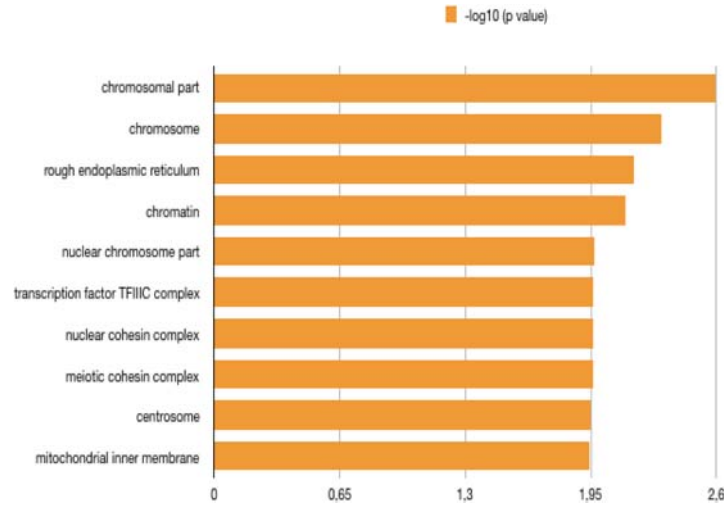


**Şekil 4-17: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin görev aldıkları biyolojik süreçler**

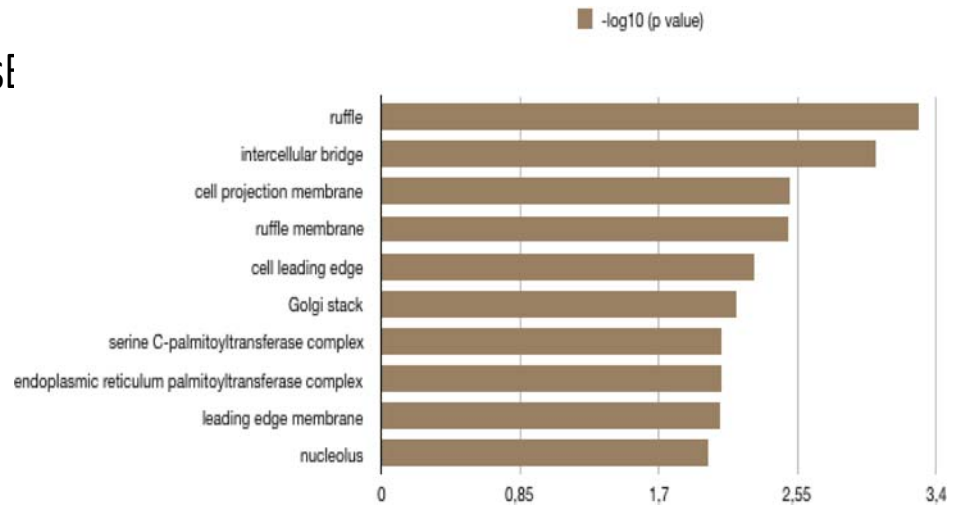
CvsE



CvsH

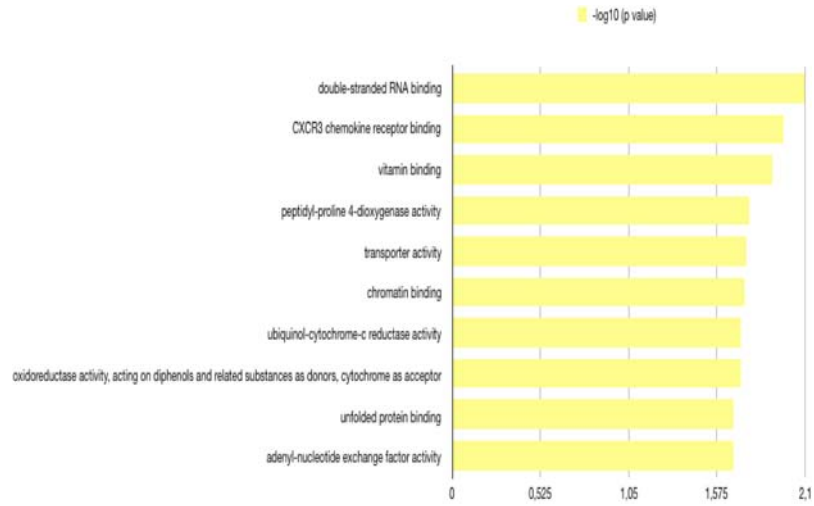


CvsI

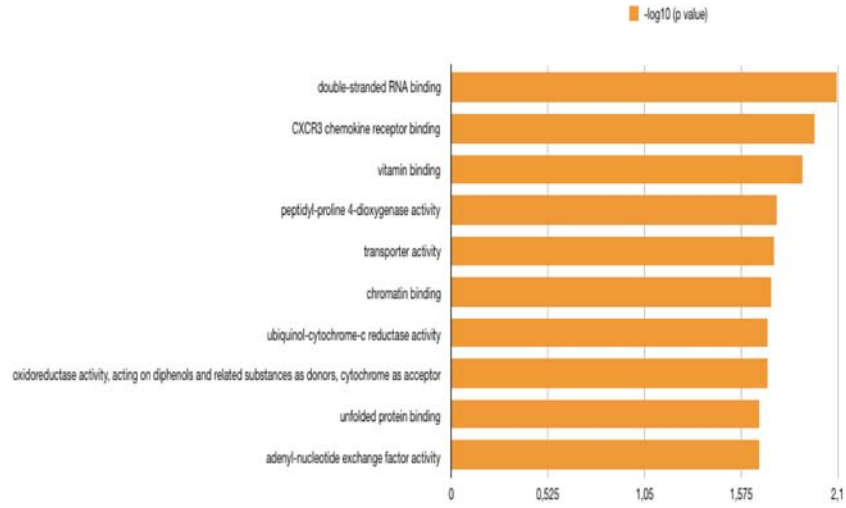


Şekil 4-18: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin hücredeki yerleri

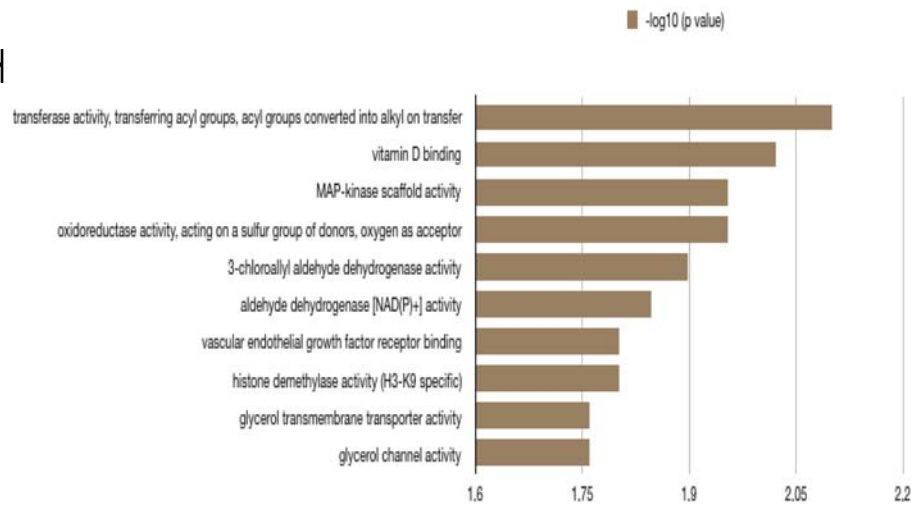
CvSE



CvSH



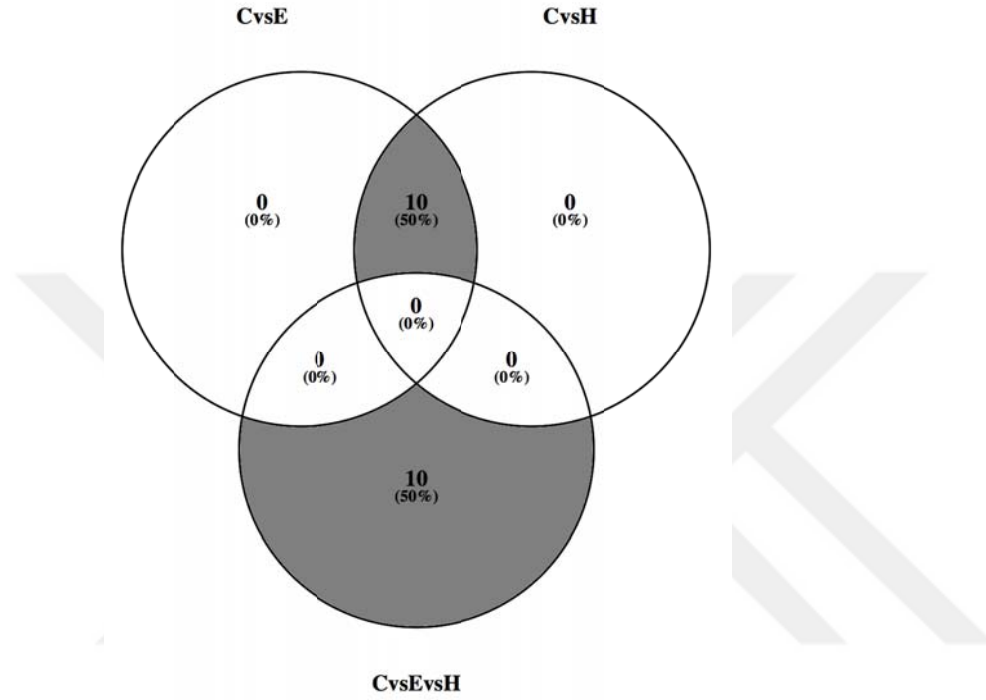
CvSEvSH



**Şekil 4-19: Zenginleştirme analizine göre farklı gruplara ait genlerin moleküler işlevleri**

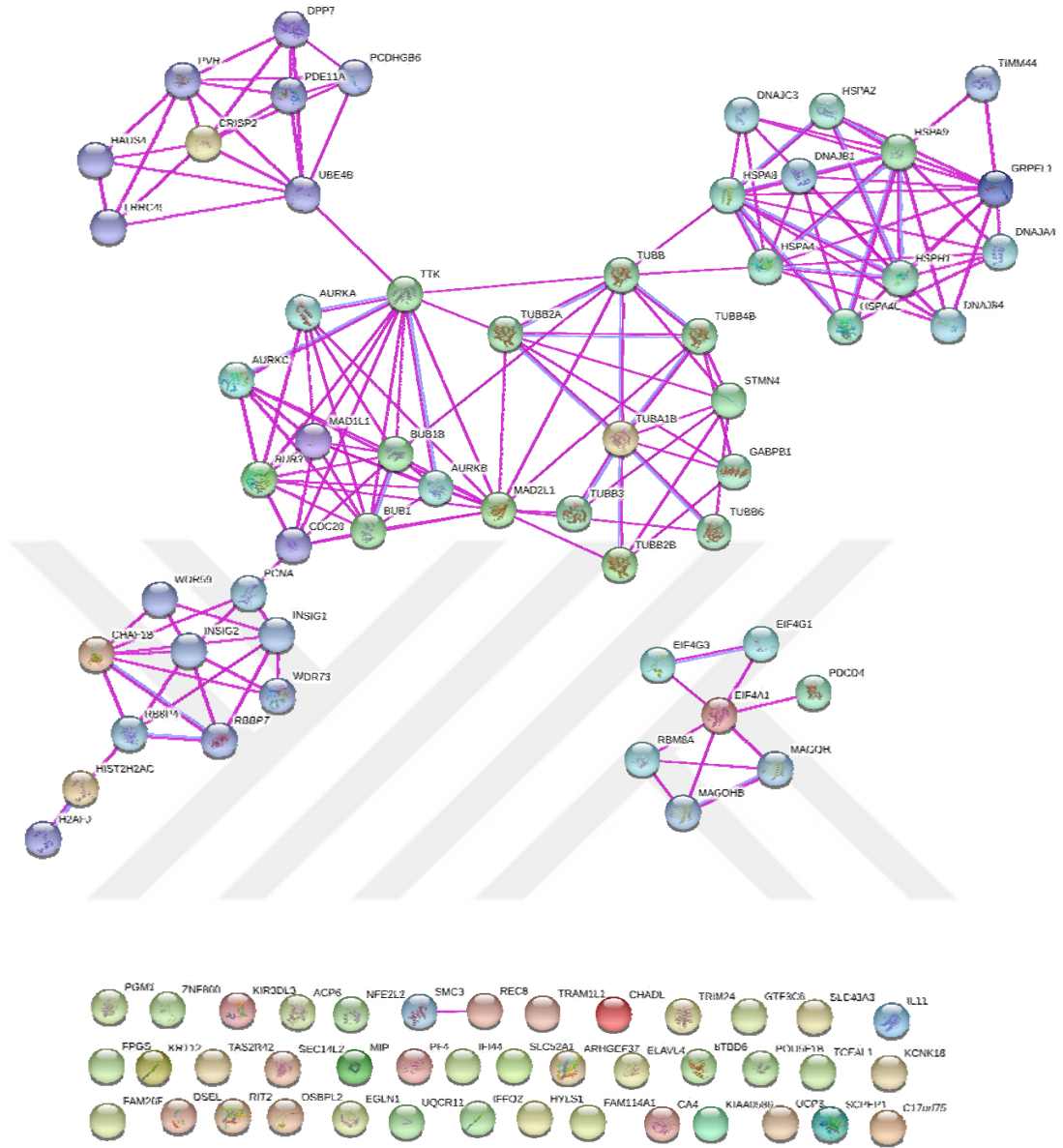


“Geneontology” seçeneğine göre yapılan zenginleştirme analizi sonuçlarının gruplar arasında bir benzerliğe sahip olup olmadığı görmek adına 3 farklı duruma (Biyolojik süreç, Hücresel bileşen, Moleküler işlev) ait sonuçlar venn şeması ile karşılaştırılmıştır. Her üç farklı durum için de tamamen aynı venn şeması elde edildiği için sadece tek bir venn şeması ile sonuçlar gösterilmiştir(Şekil 4.20).

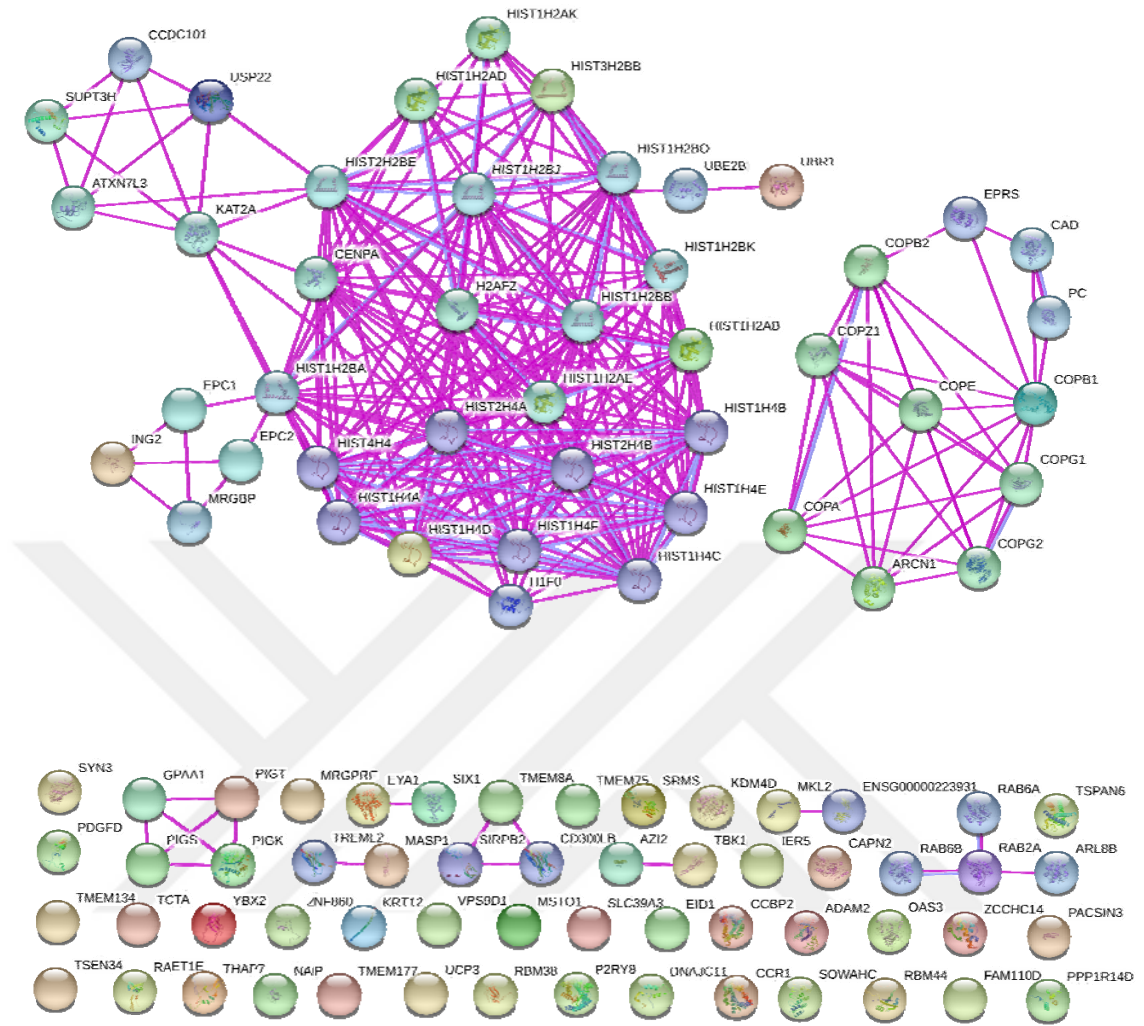


**Şekil 4-20: Gruplararası Geneontology sonuçlarının benzerliklerinin karşılaştırılması**

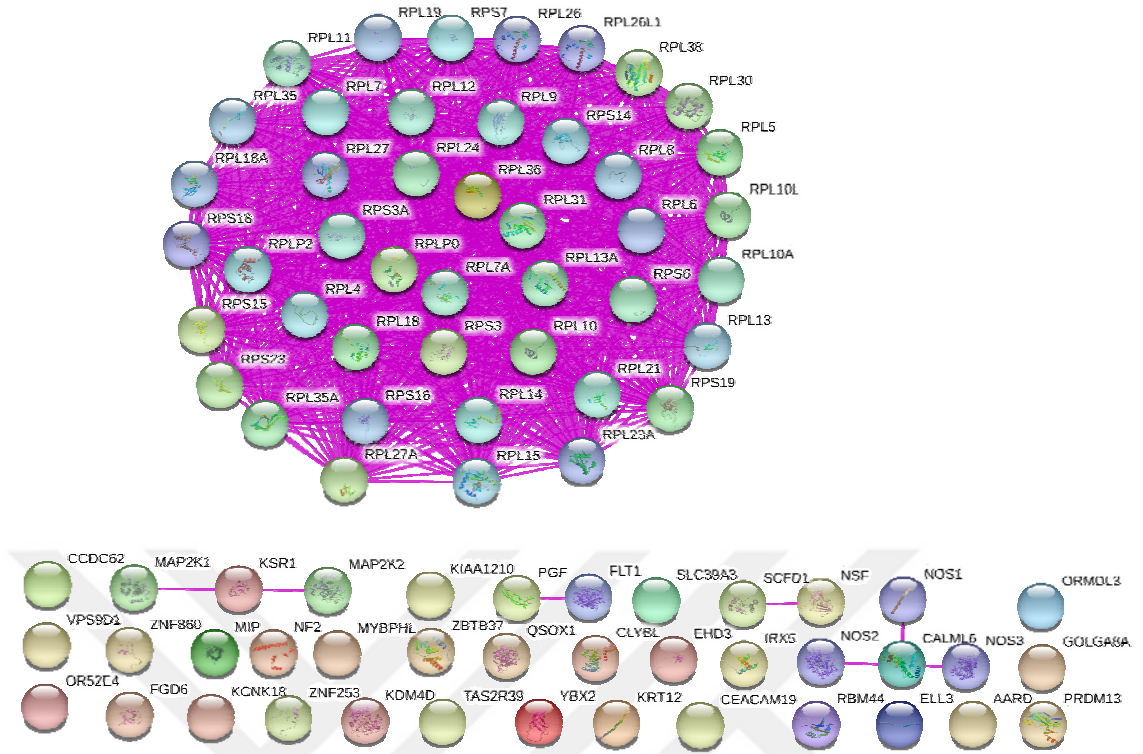
Farklı hasta gruplarındaki proteinlerin birbirleri ile etkileşimlerinin anlaşılması ve etkileşim ağaçlarının oluşturulması için String (versiyon 10.5) (<https://string-db.org/>) programı kullanıldı. Program ara yüzünde; Multiple proteins → Organisms (Homo sapiens) → Settings → Experiments → 1st shell no more than 50 interactions seçenekleri seçildi. Bu seçimler sonucunda CvsE (şekil 4.21), CvsH (şekil 4.22) ve CvsEvsH (şekil 4.23) grupları için bağlantı haritaları oluşturuldu.



Şekil 4-21: CvsE bağlantı analizi



Şekil 4-22: CvsH bağlantı analizi



Şekil 4-23: CvsEvsH bağlantı analizi

## 5. TARTIŞMA

SKM ile ilişkili olduğu bilinen proteinler, özellikle vasküler yapının oluşumuna müdahale etmekte ve bu yapının normal gelişim sürecini yeniden düzenlemektedirler. Örneğin, KRIT1 anlatımının azalması ile kontrolsüz anjiyogenez ve PDCD10 proteinlerindeki değişimlerle ise endotel hücre farklılaşması görülmektedir (Wüstehube ve ark. 2010; You ve ark. 2013; Zheng ve ark. 2010). KRIT1 bozuklukları, kontrolsüz bir hücre göçü ve bozulmuş vasküler lümen formasyonuna neden olmaktadır (Lampugnani ve ark. 2010).

SKM lezyonlarında sıkça görülen damarların sızdırması hücre-hücre bağlantılarının zayıf veya düzensiz olması ile açıklanmaktadır. KRIT1, hücre bağlantı proteinlerinden VE-cadherin,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin, AF6 ve p120-catenin ile ilişkilidir (Glading ve ark. 2007). KRIT1 işlev kaybı mutasyonları,  $\beta$ -catenin ve VE-cadherin'in hücre-hücre bağlantılarında anlatımının azalmasına, nükleer  $\beta$ -catenin ve onun transkripsiyonel hedeflerinin ise artmasına neden olmaktadır (Glading ve Ginsberg 2010). Başka bir çalışma ise, RhoA ve efektörü Rho kinaz(ROCK)'ın aktivasyonu ile stres fiber formasyonu tetiklenerek sonucunda sıkı bağlantıların kararlılığında azalmalar, anormal ekstraselüler matriks yeniden düzenlenmeleri ve endotel geçirgenliğinde artış görüldüğünü ortaya koymaktadır (Jaffe ve Hall 2005). CCM1, CCM2 ve CCM3'ün kaybının Rho aktivasyonunu arttırdığı bilinmektedir (Borikova ve ark. 2010). Fakat sporadik kavernom olgularının çok az bir kısmında bu genlerde mutasyon görülmektedir.

Literatürdeki birçok çalışma, SKM ile ilişkisi olduğu bilinen genlerin damar bozukluğuna neden olabileceğini gösterse de yapılan son araştırmalar SKM ile ilişkili farklı genlerin de olabileceğini öngörmektedir. Özellikle bu araştırmalarda, nörovasküler mikro-çevredeki değişimlerin SKM lezyon oluşumunda rolü olabileceğini işaret etmektedir (Boulday ve ark. 2011; Dammann ve ark. 2013). SKM patogenezinin gerçek nedenlerinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi için, çalışmalar CCM1, CCM2 ve CCM3 gen bölgeleri dışında lezyon ve lezyon mikro-çevresini içeren dokularda yapılacak tüm-genom analizleri büyük önem taşımaktadır. Bu görüşten yola çıkılarak, Adli Tıp Enstitüsünden sağlanan kontrol grubu parafin blok dokuları ile epilepsi görülen veya sadece kanama görülen SKM hastalarına ait parafin blok dokularında mRNA

mikroarray analizi yapılmıştır.  $p < 0,05$  değeri için CvsE, CvsH ve CvsEvsH gruplarında en düşük p değerine sahip ilk 200 probset incelenmiştir. İleri analizler öncesi bu listedeki probsetler, gen nomenklatür komitesinin (HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee) belirlediği gen sembollerine çevrilmiş ve anlamsız bulunan probsetler (pozitif veya negatif kontrol olarak bulunan intronik bölgeler) çıkarılmıştır. Buna göre CvsE grubunda 56 gen, CvsH grubunda 64 gen, CvsEvsH grubunda 41 gen anlamlı bulunmuştur ve bu genler ile ileri analizlere devam edilmiştir.

CvsE, CvsH ve CvsEvsH grupları Venny programı ile gruplandırıldığında her üç grupta da anlatımında farklılık görülen 2 gen bulunmaktadır: KRT12 ve ZNF860.

*KRT12* (Keratin 12) geni, korneal epitelyumda eksprese olan tip1 ara filament zincir keratin 12'yi kodlamaktadır. Bu gendeki mutasyonların Meesmann korneal distrofiye yol açtığı bilinmektedir. *KRT12*'nin beyinde anlatımının olduğunu gösteren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut literatürde *KRT12* anlatımı ile beyinde meydana gelen bir hastalık arasında birebir korelasyon olduğunu gösteren iki hayvan çalışması bulunmaktadır (Alvarado ve ark. 2013; Maphis ve ark. 2017). Bu çalışmalardan ilkinde; periferik sinir yaralanmalarının, beyin yapısında (özellikle prefrontal kortekste) çeşitli moleküler değişimlere sebep olabileceği iddia edilmektedir. Periferik sinir hasarı verilen farelerde hasarı takiben 6 ay süre hayvanlar izlenerek sonucunda prefrontal korteksleri çıkartılmış ve transkriptomik analizler gerçekleştirilmiş. Sonucunda ise *KRT12*'nin sinir hasarı verilen grupta en fazla anlatımı gerçekleşen 10 genden birisi olduğu rapor edilmiştir (Alvarado ve ark. 2013). Diğer çalışmada ise, Alzheimer modeli çalışmak için tau protein üretimi indüklenmiş fareler ile wild-type farelerin hipokampus bölgeleri çıkartılarak bu dokularda tam genom analizi yapılmış ve sonucunda kontrol grubuna göre tau indüklenmiş farelerde *KRT12* anlatımının azaldığı gösterilmiştir (Maphis ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir. *KRT12*'nin beyindeki fonksiyonu tam bilinmemekle beraber bu çalışmalar, bu genin nöronal bir işlevi olabileceğini öngörmektedir. Ayrıca bu tez çalışması *KRT12*'nin insan dokularında meydana gelen bir hastalıkta ve kavernom olgularında anlamlı şekilde eksprese olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

*ZNF860* (zinc finger protein 860), işlevi bilinmemekle birlikte yakın zamanda yapılan bazı çalışmalar bu genin diyabet (Yamada ve ark. 2018) ve agresif prostat tümörleri

(Voizianov ve ark. 2016; Dmitriev ve ark. 2015) gibi farklı hastalıklardaki biyobelirteç olabilme potansiyeli üzerinde durmaktadır.

CvsE ve CvsH grupları için anlatımında değişiklik görülen ortak olan beş gen tanımlandı (*UCP3*, *IGHA1*, *TRAV20*, *ZNF860* ve *KRT12*).

UCP3 (uncoupling protein 3), gibi mitokondriyel ayrılma proteinlerinin (Mitochondrial uncoupling proteins-UCPs) temel işlevi, anyonların iç mitokondriyel membrandan dış mitokondriyal membrana transferi ile protonların dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana dönüş transferini kolaylaştırmaktır. UCP'lerin hücre metabolizmayı düzenleme ve sinyalizasyon gibi çeşitli süreçlerde rol aldıkları bilinmektedir. Örneğin UCP2, UCP4 ve UCP5'in, nöronları oksidatif stresin etkilerine karşı koruyarak nöronal kayıpları önlediklerine dair çalışmalar bulunmaktadır (Geisler ve ark. 2017). UCP2 anlatımı indüklenmiş fare korikal nöron hücre kültürlerinin, oksijen ve glikoz azalmasına bağlı nöron ölümlerine daha dirençli hale geldiği ve UCP2 anlatımı indüklenmiş transgenik farelerde ise iskemik ve travmatik hasarın daha az oluştuğunu ve hasar sonrası beyin fonksiyon kazanımının daha hızlı gerçekleştiği rapor edilmiştir (Mattiasson ve ark. 2003; Madeiro da Costa ve ark. 2010). Bir başka çalışmada ise, hipergliseminin periferik duyu nöronlarında UCP3 anlatımını azalttığı ve UCP3 veya UCP1 anlatımlarının artmasının, hiperglisemiye bağlı nöron hasarlarına karşı koruyucu etkiye sebep olduğu ortaya konmuştur (Vincent ve ark. 2004).

Alzheimer hasta dokuları ile yapılan bir ayırt edici ekspresyon çalışmasında, IGHAI (immunoglobulin heavy constant alpha 1), anlatımının hipokampusta dokularında, kontrol grubu dokularına göre arttığı tespit edilmiştir (Zahid ve ark. 2014). Başka bir çalışmada ise epitelyum-kökenli kanser hücrelerinde IGHAI anlatımının arttığı ortaya konmaktadır (Zheng ve ark. 2007). Fakat literatürde beyin dokularında IGHAI anlatımının azalması ile ilgili bir makaleye rastlanmamıştır.

T hücre reseptörleri, majör doku uygunluk kompleksine bağlanmış antijenleri tanıma özelliğine sahiptir. Literatürde TRAV20 (T cell receptor alpha variable 20)'ye özgü bir çalışma yer almamaktadır. Bu nedenle bu çalışma kavnom olgularında TRAV20 anlatımının azaldığını gösteren ilk çalışmadır.

CvsE ve CvsEvsH grupları için anlatımında değişiklik görülen ortak olan beş gen tanımlandı (*KCNK18*, *MIP*, *NF1P2*, *ZNF860* ve *KRT12*).

Potasyum kanalları; aksiyon potansiyeli, kas kasılması, hormon salgılanması, ozmotik regülasyon ve iyon akışı gibi birçok hücrenel süreçte rol oynamaktadır ve bu kanallardaki işlev bozuklukları migren, depresyon ve epilepsi gibi çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir (Lafrenière ve ark. 2010). İyon kanallarının ifade seviyelerindeki ve/veya biyofiziksel özelliklerindeki değişimler aksiyon potansiyel eşiğini düşürerek nosireseptörlerde ektoptik değişimlere neden olmaktadır (Abdulla ve Smith 2001a; Abdulla ve Smith 2001b). KCNK18 (potassium two pore domain channel subfamily K member 18), hücrede elektriksel eksitabiliteden sorumlu bir potasyum kanal proteindir. Bir ağrı modeli çalışmasında, KCNK18 (TRESK)'in anlatımının azalması sinir hasarı ile indüklenen nöronal hipereksitabiliteye sebep olabileceği iddia edilmektedir (Tulleuda ve ark. 2011). Başka bir çalışmada ise TRESK'in depresyon, ağrı ve epilepsi tedavileri için hedef molekül olabileceğini önermektedir (Kang ve ark. 2008). Bu bilgilerden yola çıkarak KCNK18'in anlatımının azalmasının epilepsi ile karakterize bir tabloya neden olabileceği ve kavernom vakalarındaki epilepsinin varlığının KCNK18 işlev kaybına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Aquaporinler biyolojik membranlardan suyun (bazı durumlarda da gliserol gibi küçük çözünen maddelerin) geçişini sağlayan membran proteinleridir. Memelilerde en az 12 farklı (AQP0 - AQP11) aquaporin çeşidi bulunmaktadır. MIP (major intrinsic protein of lens fiber-AQP0), göz lensinin fiberlerin için karakteristik bir aquaporindir ve diğer aquaporinlere nazaran membran geçirgenliği oldukça düşüktür (Mulders ve ark. 1995). Esas işlevi birbirine komşu olarak bulunan lens fiber hücreleri arasında hücre-hücre bağlantılarını oluşturmaktır (Fotiadis ve ark. 2000). Aquaporin ailesinin bir başka bilinen görevi ise iyon kanal aktivitesine sahip olmalarıdır. İyon kanalları ile fizyolojik benzerlikleri bilinmese de AQP0'ın iyon iletim özelliğinin olduğu bilinmektedir (Yool 2007). Belki de bu özelliği ile nöronlarda KCNK18 benzeri bir görev yerine getirmekte ve epilepsi ile sonuçlanan bir dizi olaya eşlik etmektedir.

*NFIP2* (neurofibromin 1 pseudogene 2), geni hakkında bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. İşlevi bilinmeyen bu genin anlatımı, epileptik bulgular gösteren kavernom vakalarında azalmaktadır.

CvsH ve CvsEvsH grupları için anlatımında değişiklik görülen ortak sekiz gen tanımlandı (YBX2, RBM44, SLC39A3, KDM4D, MIR520A, VPS9D1, ZNF860 ve KRT12).



*YBX2* (Y-box binding protein 2) geni, testis dokusuna spesifik, nükleik asitlere bağlanma özelliği olan bir protein kodlamaktadır. Çalışmalar bu genin, erkek infertilitesi (Hammoud ve ark. 2009) ve testis kanserler ile ilişkili olduğunu işaret etmektedir (Yoshida ve ark. 2006; Kohno ve ark. 2006). Literatürde sadece tek bir çalışmada bu genin etkinliği germ hücreleri dışındaki hücrelerde (yağ) gösterilmiştir (Xu ve ark. 2017). Bu çalışmada *YBX2*'nin mRNA üzerine etki ederek hücrede translasyon sürecine karışabileceği ve mRNA seviyelerini değiştirebileceği iddia edilmektedir. Bu tez çalışması, *YBX2*'nin beyinde ve kavernom dokularında anlatımının olduğunu gösteren ilk çalışmadır.

Çinko, tüm canlı organizmalar için gerekli olan önemli bir eser elementtir. Bu element, proteinleri yapısal olarak stabilize etmesinin yanı sıra enzimatik katalizi kolaylaştırmak için de bir kofaktör olarak kritik rol oynamaktadır. Hücre içi miktarının azalması ise; bağışıklık cevap kayıplarına, doku rejenerasyonunda ve travma sonrası doku iyileşmesinde azalmaya ve çeşitli nörolojik bozuklukların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. *SLC39A3* (solute carrier family 39 member 3), çinkoyu hücre içine transfer ederek hücrede çinko metabolizmasında görev almaktadır. Bu gendeki anlatımın azalması, hücre içi çinko seviyesinde bir düşüşe neden olabilecektir. Literatürdeki birkaç çalışma, periferel kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerin düşük seviyedeki çinkoya karşı duyarlı olduğunu ve endotel hücrelerin bütünlüğünü kaybedebildiklerini işaret etmektedir (Hennig ve ark. 1992; Meerarani ve ark. 2000). Endotel hücrelerinin bütünlüğünü yitirmesi ise kavernom olgularının kardinal belirtilerinden olan damar sızdırmasına neden olabilmektedir.

*KDM4D* (lysine demethylase 4D)geni, histonlardan metil gruplarını çıkaran histon demetilaz enzimini kodlamaktadır. *KDM4D*, DNA'daki çift zincir kırıklarını onararak genom bütünlüğünün korunmasına katkı sağlamaktadır (Khoury-Haddad ve ark. 2014). Bu genin anlatımının fazla olması hücre çoğalmasını ve hücrenin hayatta kalmasını sağlarken, eksikliğinde hücrede apoptoz tetiklenmektedir (Kim ve ark. 2012). Kolon kanser hücrelerinde *KDM4D* artışı ile hücrelerin proliferasyonunun arttığı gözlemlenmiştir (Berry ve Janknecht 2013). *KDM4D* aynı zamanda DNA replikasyonu ile ilişkilidir. Anlatımının azalması, *Cdc45*, *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen), ve polimeraz  $\delta$ 'nın biraraya gelmesinde bozukluklara sebep olarak DNA replikasyonun başlamasını sekteye uğratmaktadır (Wu ve ark. 2016). İlginç olarak, *KDM4D* aktivitesi

sadece kanser hücrelerinde değil, aynı zamanda TNF- $\alpha$  gibi sitokinlerinyol açtığı enflamasyonsonucunda datümör oluşumunu etkilemektedir (Berry ve Janknecht 2013).

Farelerde yapılan bir çalışmada, MIR520A(microRNA 520a)'nın, EGFR (epidermal growth factor receptor) üzerine olası bir etki göstererek; hücre göçünü baskılayabildiği, apoptosisi indüklediği, kolorektal kanser hücrelerinde G0 / G1 fazında bölünmeyi durdurabildiği, tümör oluşumunu yavaşlattığıortaya konulmuştur (Zhang ve ark. 2017). Yapılan başka bir çalışma, miRNA 520a'nın anlatımının artmasının hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve G0 / G1 fazında hücre bölünmesinin durmasını indüklediği, bu mikro RNA'nın anlatımının ise hepatoselüler karsinomda, normal karaciğer hücrelerine oranla azaldığını göstermektedir. Sadece karaciğer kanserinde değil, küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde de miRNA 520a'nın ekspresyonu azalmaktadır (Liu ve ark. 2016). Yapılan benzer çalışmalar, miRNA 520a'nın hücrede tümör supressör benzeri bir işlev gördüğü ve kanser gibi patolojik olgularda anlatımının azaldığını işaret etmektedir. Kavernom vakalarında miRNA 520a'nın anlatımının azalması literatür bilgileri ile korelasyon göstermektedir ve bu olgularda bağ doku artışının nedeni ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

VPS9D1(VPS9 domain containing 1)'nin tam işlevi bilinmemekle birlikte, çeşitli hastalıklarda anlatım düzeylerinin değiştiği gözlenmektedir. Örneğin bu gen, kolorektal kanserlerde yüksek seviyede eksprese olmakta ve bu artış kötü diyagnoz belirteci olarak görülmektedir (Yang ve ark. 2016). Yine sepsis vakalarında da genin anlatımı artmaktadır (Tsalik ve ark. 2014). Gastrik kanser hücrelerinde ise normal hücrelere oranla anlatım seviyesinin düştüğü, anlatım azlığının tümör büyüklüğü ile ters orantıya sahip olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark. 2017). Kavernom olgularında daha önce bu genin varlığına dair bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde ilk defa bu çalışma ile kavernom dokularında VPS9D1 anlatımının düştüğü gösterilmiştir.

RBM44 (RNA binding motif protein 44), spermatogonia farklılaşmasında rol oynayan hücrelerarası sitoplazmik köprü proteini olarak tanımlanmıştır (Iwamori ve ark. 2011). Sağlıklı bireyler ile hipertrofik yara izi bulunan hastalardan alınan dokuların karşılaştırıldığı bir çalışmada, yara izi bulunan dokularda RBM44 geninin anlatımının düştüğü bildirilmiştir (Cho ve ark. 2013). Hipertrofik yara izi, yara iyileşmesi sırasında kollajen biyosentezi ile matriks yıkımı arasındaki dengesizlik sonucu oluşmaktadır.

Kavernomda endotel hücreleri, kalın bir kollajen yığını içerisinde gömülü halde bulunmaktadır. Ekstraselüler matriks, vasküler duvar içerisindeki endotel hücrelerin zararlı bir uyarıyı nasıl algıladığının kritik bir düzenleyicisidir (Davis 2010; Davis ve ark. 2000) ve bu uyarana uygun olarak; vasküler geçirgenlik, enflamasyon, anjiyogenez ve tromboz gibi süreçleri etkileyerek akut yanıt oluşturmaktadır (Arroyo ve Iruela-Arispe, 2010; Davis ve Senger, 2005; Senger ve Davis, 2011). Hücre içinde RBM44 gibi çeşitli moleküllerin anlatımındaki değişiklikler, ekstraselüler matriksin yeniden düzenlenmesine neden olabilmektedir. Bu değişimin ise, kavernom vakalarında karakteristik bir tablo olan lümen formasyonu ve damar geçirgenliğinin artması gibi çeşitli sonuçlara yol açabileceğini düşünmek oldukça mantıklıdır.

Bu ortak genlerin dışında bazı genler işlevleri bakımından dikkat çekmektedir. Örneğin, CvsH grubunda anlatımı düşen *MASPI* (mannan binding lectin serine peptidase 1) geni, endotel hücrelerinde koagülasyon faktörlerini aktive ederek pıhtı oluşumunu başlatmaktadır (Jenny ve ark. 2018). Aynı zamanda *MASPI* geninin insan umbilikal veni endotel hücrelerini etkileyerek, sitokin ve adezyon moleküllerinin anlatım seviyelerini değiştirdiği gösterilmiştir (Schwaner ve ark. 2017). Hepatit C virüsü ile enfekte edilen dokularda geliştirilen hepatoselüler karsinom hücrelerinde, kontrol grubuna kıyasla *MASPI* geninin anlatımında oldukça çarpıcı bir azalma gözlemlenmiştir (Das ve ark. 2013). Pulmoner emboli hastalarında yapılan başka bir çalışmada, yine bu hastalardaki *MASPI* anlatımının kontrol grubuna göre düştüğü rapor edilmiştir (Lv ve ark. 2013).

Zenginleştirme analiz sonuçları incelendiğinde CvsE grubu için özellikle wikipathway veritabanından elde edilen “NRF2’nin transkripsiyonel aktivasyonu” ve Panther veritabanından elde edilen “HIF (Hypoxia-Inducible Factor) üzerinden hipoksia cevabı” sonuçları dikkat çekicidir. CvsE grubunda bu özellikler ile ilgili 2 gen (*NFE2L2* ve *EGLN1*) bulunmaktadır ve literatürde bu genlerin epilepsi ile ilişkili olduklarına dair çalışmalar bulunmaktadır. *NFE2L2* geninin kodladığı NRF2 proteini; sinyal proteinleri, detoksifikasyon, anti-oksidan, anti-inflamatuar ve kalsiyum homeostazı ile ilgili çok sayıda genin ifadesini koordine etmektedir. Bu genin artan ekspresyonunun nöron hücrelerinde antioksidan özelliği artırarak hücreleri epilepsiye karşı koruduğu gözlemlenmiştir (Mazduferi ve ark. 2013; Liu ve ark. 2015; Porokhovnik ve Pisarev 2017). Bu çalışmada olduğu gibi bu genin anlatımının azalması belki de epilepsiye yol açan bir

dizi olaya ön ayak olmaktadır. HIF1a, hipoksiya karşı hücrel adaptasyonu sağlayan temel transkripsiyon faktörüdür (Ding ve ark. 2010). HIF1a anlatımının temporal lob epilepsisi hastalarında arttığı rapor edilmiştir (Li ve ark. 2016). Hücrede EGLN1, HIF'in represörü olarak işlev görmektedir ve EGLN1'in anlatımı düştüğünde ise kontrolsüz kalan HIF1'in anlatımı artacaktır. İlk 200 listesine girmediği için HIF1 (probeset no: 16700489) anlatımı bu çalışmadaki tablolarda yer almasa da, bu genin epilepsi grubundaki ekspresyonu incelendiğinde anlatımı, kontrol ve hemoraji grubuna göre arttığı görülmüştür. Literatüre uygun bir sonuç gösteren bu iki genin epilepsi için aday gen olma ihtimali üzerinde durulmalı ve farklı analizler yapılarak validasyonu sağlanmalıdır.

CvsH grubu için zenginleştirme analizi sonuçlarına bakıldığında üç sonuç üzerinde durulması gerekmektedir: Fokal adezyonlar, Anjiogenez ve çift-zincir DNA kırıkları. Calpain gen ailesi ait proteazlar (CAPN2), integrin-aracılı adezyon komplekslerini regüle etmektedir (Bhatt ve ark. 2002; Dourdin ve ark. 2001; Franco ve ark. 2004). Bu gen ailesine ait genlerin ürettikleri proteinlerdeki azalma, adezyon moleküllerini etkileyerek hücreler arası bağlantıların zayıflamasına neden olabilecektir (Dourdin ve ark. 2001). Özellikle endotel hücrelerini birbirine bağlayan moleküllerde meydana gelebilecek bu türde zayıflıkların ise damar sızdırmalarına neden olabileceği ihtimalini düşündürmektedir. Gastrik kanser hücrelerinde anlatımı azaltılan PDGF-D geninin  $\beta$ -catenin ve VEGF aktivitesi ile anjiyogenez öncül moleküllerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (Zhao ve ark. 2010). Mevcut literatür bilgisinden yola çıkılarak, bu genin anlatımının kavernom olgularında azalması, tıpkı CAPN2 geni gibi hücre bağlantılarının zayıflamasına ve anjiyogenezde bozukluklar ile sonlanacak bir senaryoya neden olabileceğini işaret etmektedir. İntraserebral kanamalarda hemoglobinin yıkılıp içeriğindeki demirin ortaya çıkması, kanamanın olduğu bölgedeki hücrelerde demire bağlı bir oksidatif stres yaratmaktadır. Bu oksidatif stres ise kalıcı DNA hasarlarına sebebiyet verebilmektedir (Nakamura ve ark. 2005; Nakamura ve ark. 2006; Wu ve ark. 2002). Çift-zincir DNA kırıkları ise hücredeki birçok farklı süreçte bozukluklara neden olabilmektedir.

Zenginleştirme analizi sonrası anlatımı gerçekleştiren genlerin gruplar arası benzer işlevleri olup olmadığının ortaya konulabilmesi amacıyla venn şemaları oluşturulmuştur. Bu şemalar incelendiğinde, genlerin fonksiyonlarının, hem aynı

hastalığın farklı semptomlar gösteren gruplarında (CvsE ve CvsH), hem de bu grupların CvsEvsH grubu ile karşılaştırıldığında büyük oranda farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu durum, iki farklı olasılığı ortaya koymaktadır: İlki farklı moleküler mekanizmaların aynı hastalığa sebebiyet verebileceğini düşündürmektedir. İkincisi ise, belki de bu durum, değişikliğe uğrayan moleküler mekanizmaya uygun olarak, aynı hastalıkta farklı bulgular ile seyreden bir klinik tablonun ortaya çıkabilmesini mümkün kılmaktadır.

Protein-protein etkileşimlerine bakıldığında, CvsE grubunda farklı anlatım gösteren genlerin; hücre-içi sinyal iletimi, iyon kanalı aktivitesi, bağlantı proteinleri, ısı-ışık proteinleri ve hücre bölünmesindeki kinetokor-mikrotübül bağlantılarından sorumlu proteinler ile; CvsH grubundaki proteinlerin transkripsiyonu düzenleyen proteinler, hücre içi vezikül trafiği, ve histonlarla ilgili proteinler ile etkileşimde oldukları görülmektedir.

SKM; kan-beyin bariyeri ve hücre bağlantı bileşenlerinin bozularak kanama, baş ağrısı ve epilepsilere sebebiyet veren, yavaş kan akımı ile karakterize bir damar bozukluğudur. Familial veya herediter tipinde CCM1, CCM2 ve CCM3 genlerinde mutasyonlar veya işlev kaybı görülürken, sporadik SKM vakalarında, CCM mutasyonlarına çok az rastlanmaktadır (D'Angelo ve ark. 2013). Bu durum, sporadik SKM'ye neden olabilecek başka gen ve ilişkili proteinlerin varlığını işaret etmektedir. Benzer öngörüye sahip araştırmalar sporadik SKM patogenezinin; aktin dinamikleri, sitokin transdüksiyonu, damar geçirgenliğinin artması, hücre bağlantıları ve inflamasyonlar ile ilişkili olabileceğini ortaya koymaktadır (D'Angelo ve ark. 2013; Yadla ve ark. 2010; Shi ve ark. 2007; Whitehead ve ark. 2009).

Toplumda görülme sıklığının az olması, çalışılacak doku azlığı, hastalığın nedeninin iyi bilinmemesi sebebiyle hayvan modellerinin azlığı bu hastalık üzerinde çalışma yapmayı zorlaştırmaktadır. Bu tez çalışmasında taze dokular yerine hastane arşivlerindeki kavernom parafin blokları ile çalışılmıştır. RNA gibi oldukça hassas bir molekül ile çalışılmış olursa da oldukça yüksek verimde RNA izolasyonu yapılmış ve başarılı bir şekilde mikroarray sonuçları elde edilmiştir. Parafin bloklar ile çalışmanın 2 avantajı bulunmaktadır: Öncelikle, özellikle nadir hastalıklar ile çalışan araştırmacıların taze doku gelmesini beklemesi gibi oldukça zaman alan bir süreci ortadan kaldırmaktadır. İkincisi ise, çalışma sonundaki bulguları o hastanın belki de 10 yıllık

süre sonundaki durumu ile karşılaştırabilme olanağı sunmasıdır. Bu ikinci madde özellikle operasyon sonrası hasta durumunu ilgilendiren ve hastalığın tekrar etme durumu olan çalışmalar için avantaj sağlamaktadır.

Tekrarlı kanamalar, düşük kan akımı, bağlantı proteinlerindeki yapısal hasarlar gibi moleküler, genetik, fizyolojik ve henüz bilinmeyen birçok etken birleşerek bu kompleks hastalığa sebep olabilmektedir. Gelişen teknoloji, birçok yeni kimyasalın üretilmesi ve bunlara erişimin kolaylığı bu hastalığı anlamak üzerine geliştirilen yöntemlerde de yenilikler sunmaktadır. Ticari olarak satılan geniş kapsamlı mikroarraylar, çok az miktardaki nükleik asitler ile hızlı bir şekilde çalışmayı mümkün kılmakta ve böylece yeni genlerin keşfine olanak sağlamaktadır. Bu genlerin keşfi; hastalığın patogenezi anlamak, teşhis ve tedavi için gerekli yeni yöntemlerin ve ilaçların geliştirilmesine katkı sağlayacak, hastalığın seyri için klinisyenler ve araştırmacılara öngörü kazandıracaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdulla, F. A., Smith, P. A. (2001a). Axotomy-and autotomy-induced changes in Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channel currents of rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of neurophysiology*. **85(2)**, 644-658.
- Abdulla, F. A., Smith, P. A. (2001b). Axotomy-and autotomy-induced changes in the excitability of rat dorsal root ganglion neurons. *Journal of neurophysiology*. **85(2)**, 630-643.
- Aiba T., Tanaka R., Koike T., Kameyama S., Takeda N., Komata T. (1995). Natural history of intracranial cavernous malformations. *Journal of Neurosurgery*. **83(1)**, 56–59.
- Akers, AL., Johnson, E., Steinberg, GK., Zabramski, JM., Marchuk, DA. (2009). Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCM): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. *Human Molecular Genetics*. **18**, 919–930.
- Alvarado, S., Tajerian, M., Millecamps, M., Suderman, M., Stone, L. S., Szyf, M. (2013). Peripheral nerve injury is accompanied by chronic transcriptome-wide changes in the mouse prefrontal cortex. *Molecular pain*. **9(1)**, 21.
- Alvarez-Sabin, J., Montalban, J., Tintore, M., Codina, A. (1991). Pure sensory stroke due to midbrain haemorrhage. [letter; comment] *The Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. **54(9)**, 843.
- Arroyo, A. G., Iruela-Arispe, M. L. (2010). Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovascular research*. **86(2)**, 226-235.
- Baranoski, J. F., Kalani, M. Y. S., Przybylowski, C. J., Zabramski, J. M. (2016). Cerebral Cavernous Malformations: Review of the Genetic and Protein–Protein Interactions Resulting in Disease Pathogenesis. *Frontiers in Surgery*. **3(60)**, 1-6. doi: 10.3389/fsurg.2016.00060
- Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. **57**, 289-300.
- Bentley, DL. (2014). Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Review Genetics*. **15**, 163–175.

- Béraud-Dufour, S., Gautier, R., Albiges-Rizo, C., Chardin, P., Faurobert, E. (2007). Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *Federation of European Biochemical Societies Journal*. **274**, 5518-5532.
- Bergametti F., Denier C., Labauge P., Arnoult M., Boetto S., Clanet M., ve ark. (2005). Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *The American Journal of Human Genetics*. **76**, 42–51.
- Berget, S. M., Moore, C. and Sharp, P. A. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **74**, 3171– 3175.
- Berry, W. L., Janknecht, R. (2013). KDM4/JMJD2 histone demethylases: epigenetic regulators in cancer cells. *Cancer research*. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4300
- Bertalanffy H., Benes L., Miyazawa T., Alberti O., Siegel AM., Sure U. (2002). Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. *Neurosurgical Review*. **25(1-2)**, 1–53.
- Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., Huttenlocher, A. (2002). Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain. *Journal of cell science*. **115(17)**, 3415-3425.
- Birse, C. E., Minvielle-Sebastia, L., Lee, B. A., Keller, W., and Proudfoot, N. J. (1998). Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science*. **280**, 298-301.
- Borikova AL., Dibble CF., Sciaky N. ve ark. (2010). Rho kinase inhibition rescues the endothelial cell cerebral cavernous malformation phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**, 11760-11764.
- Boulday, G., Rudini, N., Maddaluno, L., Blé'con, A., Arnould, M., Gaudric, A., Chapon, F., Adams, RH., Dejana, E., Tournier-Lasserre, E. (2011). Developmental timing of CCM2 loss influences cerebral cavernous malformations in mice. *The Journal of Experimental Medicine*. **208**, 1835-1847.
- Bozinov, O., Hatano, T., Sarnthein, J., ve ark. (2010). Current clinical management of brainstem cavernomas. *Swiss Medical Weekly*. **140**, w13120.
- Brais, B. ve ark. (1998). Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nature Genetics*. **18**, 164–167.



- Brusch R., Liebler SS., Wustehube J., ve ark. (2010). Integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 attenuates sprouting angiogenesis. *Circulation Research*.**107**, 592-601.
- Buratowski, S. (2009). Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular Cell*.**36**, 541-546.
- Campbell P. G., Jabbour P., Yadla S., Awad IA. (2010). Emerging clinical imaging techniques for cerebral cavernous malformations: a systematic review. *Neurosurgical Focus*. **29(3)**, 1–8.
- Caputi, M., Kendzior, RJ. ve Beemon, KL. (2002). A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes Development*. **16**, 1754-1759.
- Cardamone, G., Paraboschi, E.M., Rimoldi, V., Duga, S., Solda, G., Asselta, R. (2017). The characterization of GSDMB splicing and backsplicing profiles identifies novel isoforms and a circular RNA that are dysregulated in Multiple Sclerosis. *International journal of molecular sciences*.**18(3)**, 1-15.
- Cartegni, L., and Krainer, A. R. (2002). Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nature Genetics*. **30**, 377-384.
- Cavalcanti, D. D., Kalani, M. Y., Martirosyan, N. L., Eales, J., Spetzler, R. F., Preul, M. C. (2012). Cerebral cavernous malformations: from genes to proteins to disease. *Journal of Neurosurgery*.**116**, 122-132.
- Cenzato M., Stefini R., Ambrosi C., Giovanelli M. (2008). Post-operative remnants of brainstem cavernomas: incidence, risk factors and management. *Acta Neurochirurgica*. **150(9)**, 879–886.
- Chalouhi N., Dumont A. S., Randazzo C. ve ark. (2011). Management of incidentally discovered intracranial vascular abnormalities. *Neurosurgical Focus*. **31(6)**, E1.
- Chalouhi N., Jabbour P., and Andrews DW. (2013). “Stereotactic radiosurgery for cavernous malformations: is it effective?” *World Neurosurgery*. **80(6)**, e185–e186.
- Chan AC., Drakos, SG., Ruiz, OE., ve ark. (2011). Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. **121**, 1871-1881.
- Chang, J., Temple, G., Trecartin, R., Kan, Y. (1979). Suppression of the nonsense mutation in homozygous  $\beta^0$  thalassaemia. *Nature*.**281**, 602-603.

- Chen, M., Wu, X., Ma, W., Zhou, Q., Wang, X., Zhang, R., Yang, X. (2017). Decreased expression of lncRNA VPS9D1-AS1 in gastric cancer and its clinical significance. *Cancer Biomarkers*, (Preprint), 1-6.
- Chew S. L., Liu H. X., Mayeda A., Krainer A. R. (1999). Evidence for the function of an exonic splicing enhancer after the first catalytic step of pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**, 10655-10660.
- Cho, S. B., Kim, J. S., Zheng, Z., Choi, M. J., Choi, I. G., Oh, H. S., Ahn, K. J. (2013). Decreased tissue and serum expression of galectin-7 in patients with hypertrophic scars. *Acta dermato-venereologica*. **93(6)**, 669-673.
- Choquet H., Pawlikowska, L., Lawton, M. T., Kim, H. (2015). Genetics of Cerebral Cavemous Malformations: Current Status and Future Prospects. *Journal of neurosurgical sciences*. **59(3)**, 211–220.
- Chusid J. G., Kopeloff L. M. (1962). Epileptogenic effects of pure metals implanted in motor cortex of monkeys. *The Journal of Applied Physiology*. **17**, 697–700.
- Clatterbuck R. E., Moriarity J. L., Elmaci I., Lee R. R., Breiter S. N., Rigamonti D. (2000). Dynamic nature of cavernous malformations: a prospective magnetic resonance imaging study with volumetric analysis. *Journal of Neurosurgery*. **93(6)**, 981–986.
- Cramer, P., Caceres, J. F., Cazalla, D., Kadener, S., Muro, A. F., Baralle, F. E., and Kornblihtt, A. R. (1999). Coupling of transcription with alternative splicing: RNA pol II promoters modulate SF2/ASF and 9G8 effects on an exonic splicing enhancer. *Molecular Cell*. **4**, 251-258.
- Cuttano R., Rudini N., Bravi L. ve ark. (2015). KLF4 is a key determinant in the development and progression of cerebral cavernous malformations. *EMBO Molecular Medicine*. **8**, 6-24.
- D'Angelo V. A., De Bonis C., Amoroso R. ve ark. (2006). Supratentorial cerebral cavernous malformations: clinical, surgical, and genetic involvement. *Neurosurgical Focus*. **21(1)**, 1-7.
- D'Angelo, R., Alafaci, C., Scimone, C., Ruggeri, A., Salpietro, F. M., Bramanti, P., Sidoti, A. ve ark. (2013). Sporadic cerebral cavernous malformations: report of further mutations of CCM genes in 40 Italian patients. *BioMed research international*, 2013.

- Da Costa, P.J., Menezes, J., Romao, L. (2017). The role of alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay in human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **91**, 168-175.
- Daar, IO. ve Maquat, LE. (1988). Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Molecular Cellular Biology*.**8**, 802-813.
- Dammann, P., Hehr, U., Weidensee, S., Zhu, Y., Gerlach, R., Sure, U. (2013). Two-hit mechanism in cerebral cavernous malformation? A case of monozygotic twins with a CCM1/KRIT1 germline mutation. *Neurosurgical Review*.**36**, 483-486.
- Danckwardt, MR., Hentze, MW., Kulozik, AE. (2008). 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *EMBO journal*.**27**, 482-498.
- Darnell, Jennifer C. ve ark. (2011). FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell*.**146**, 247–261.
- Das, T., Diamond, D. L., Yeh, M., Hassan, S., Bryan, J. T., Reyes, J. D., Perkins, J. D. (2013). Molecular signatures of recurrent hepatocellular carcinoma secondary to hepatitis C virus following liver transplantation. *Journal of transplantation*, 2013.
- Davis, G. E. (2010). Matricryptic sites control tissue injury responses in the cardiovascular system: relationships to pattern recognition receptor regulated events. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 48(3), 454-460.
- Davis, G. E., Bayless, K. J., Davis, M. J., Meininger, G. A. (2000). Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *The American journal of pathology*, 156(5), 1489-1498.
- Davis, G. E., Senger, D. R. (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circulation research*, 97(11), 1093-1107.
- De Roeck, A., Van den Bossche, T., van der Zee, J., Verheijen, J., De Coster, W., Van Dongen, J., Dillen, L., Baradaran-Heravi, Y., Heeman, B., Sanchez-Valle, R., Llado, A., Nacmias, B., Sorbi, S., Gelpi, E., Grau-Rivera, O., Gomez-Tortosa, E., Pastor, P., Ortega-Cubero, S., Pastor, M.A., Graff, C., Thonberg, H., Benussi, L., Ghidoni, R., Binetti, G., de Mendonca, A., Martins, M., Borroni, B., Padovani, A., Almeida, M.R., Santana, I., Diehl-Schmid, J., Alexopoulos, P., Clarimon, J., Lleo, A., Fortea, J., Tsolaki, M., Koutroumani, M., Matej, R., Rohan, Z., De Deyn, P., Engelborghs,

- S., Cras, P., Van Broeckhoven, C., Sleegers, K. (2017). Deleterious ABCA7 mutations and transcript rescue mechanisms in early onset Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica. European Early-Onset Dementia consortium*. **134(3)**, 475-487.
- DeJesus-Hernandez, M. ve ark. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*. **72**, 245–256.
- Del Curling, O Jr., Kelly, D. L. Jr., Elster A. D., Craven, T. E. (1991). An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *Journal of Neurosurgery*. **75(5)**, 702–708.
- Denier C., Labauge P., Bergametti F., Marchelli F., Riant F., Arnoult M., ve ark. (2006). Genotype-phenotype correlations in cerebral cavernous malformations patients. *Annals of Neurology*. **60**, 550–556.
- Ding, Z., Yang, L., Xie, X., Xie, F., Pan, F., Li, J., Liang, H., ve ark. (2010). Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. **136(11)**, 1697-1707.
- DiStefano P. V., Kuebel J. M., Sarelius I. H., Glading A. J. (2014). KRIT1 protein depletion modifies endothelial cell behavior via increased vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**, 33054-33065.
- Dmitriev, A. A., Rosenberg, E. E., Krasnov, G. S., Gerashchenko, G. V., Gordiyuk, V. V., Pavlova, T. V., Danilets, R. O. (2015). Identification of novel epigenetic markers of prostate cancer by NotI-microarray analysis. *Disease markers*, 2015.
- Dourdin, N., Bhatt, A. K., Dutt, P., Greer, P. A., Arthur, J. S. C., Elce, J. S., Huttenlocher, A. (2001). Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. **276(51)**, 48382-48388.
- Draheim K. M., Li X., Zhang R. ve ark. (2015). CCM2-CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation. *The Journal of Cell Biology*. **208**, 987-1001.
- Draheim, K. M., Fisher, O. S., Boggon, T. J., Calderwood D. A. (2014). Cerebral cavernous malformation proteins at a glance. *Journal of Cell Science*. **127**, 701–707.

- Dubovsky J. Zabramski J. M., Kurth J., ve ark. (1995). A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Human Molecular Genetics*. **4(3)**, 453-458.
- Dvinge, H., Kim, E., Abdel-Wahab, O., Bradley, R.K. (2016). RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nature reviews. Cancer*. **16(7)**, 413-430.
- Edmonds, M., Vaughan, M.H. and Nakazato, H. (1971) Polyadenylic acid sequences in the heterogeneous nuclear RNA and rapidly-labeled polyribosomal RNA of HeLa cells: possible evidence for a precursor relationship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **68**, 1336–1340.
- Egloff, S. ve Murphy, S. (2008). Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes. *Biochemical Society Transactions*. **36**, 537-539.
- Englot D. J., Han S. J., Lawton M. T., Chang E. F. (2011). Predictors of seizure freedom in the surgical treatment of supratentorial cavernous malformations. *Journal of Neurosurgery*. **115(6)**, 1169–1174.
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boulwood, J., Grand, FH., Cross, N. C. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature genetics*. **42(8)**, 722-726.
- Fabrega, C., Shen, V., Shuman, S. ve Lima, C. D. (2003). Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular Cell*. **11**, 1549-1561.
- Faurobert, E., Rome, C., Lisowska, J., Manet-Dupe', S., Boulday, G., Malbouyres, M., Balland, M., Bouin, AP., Ke'ramidas, M., Bouvard, D. ve ark. (2013). CCM1-ICAP-1 complex controls beta1 integrin-dependent endothelial contractility and fibronectin remodeling. *The Journal of Cell Biology*. **202**, 545-561.
- Fernández, S., Miró J., Falip, M. (2012). Surgical versus conservative treatment in patients with cerebral cavernomas and nonrefractory epilepsy. *Seizure*. **21(10)**, 785-788.
- Fidalgo, M., Fraile, M., Pires, A., Force, T., Pombo, C. and Zalvide, J. (2010). CCM3/PDCD10 stabilizes GCKIII proteins to promote Golgi assembly and cell orientation. *Journal of Cell Science*. **123**, 1274-1284.

- Fisher OS., Liu W., Zhang R. ve ark. (2015). Structural basis for the disruption of the cerebral cavernous malformations 2 (CCM2) interaction with Krev interaction trapped 1 (KRIT1) by disease-associated mutations. *The Journal of Biological Chemistry*. **290**, 2842-2853.
- Fotiadis, D., Hasler, L., MuÈller, D. J., Stahlberg, H., Kistler, J., Engel, A. (2000). Surface tongue-and-groove contours on lens MIP facilitate cell-to-cell adherence. *Journal of molecular biology*. **300(4)**, 779-789.
- Francalanci, F., Avolio, M., De Luca, E., Longo, D., Menchise, V., Guazzi, P., Sgro`, F., Marino, M., Goitre, L., Balzac, F. ve ark. (2009). Structural and functional differences between KRIT1A and KRIT1B isoforms: a framework for understanding CCM pathogenesis. *Experimental Cell Research*. **315**, 285-303.
- Franco, S. J., Rodgers, M. A., Perrin, B. J., Han, J., Bennin, D. A., Critchley, D. R., Huttenlocher, A. (2004). Calpain-mediated proteolysis of talin regulates adhesion dynamics. *Nature cell biology*. **6(10)**, 977.
- Frischmeyer, P. A. ve Dietz, H. C. (1999). Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics*. **8**, 1893-1900.
- Fuda, N. J., Ardehali, M. B., and Lis, J.T. (2009). Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature*. **461**, 186-192.
- Fujiwara N., Shiki T. ve Masuda S. (2012). mRNA Biogenesis in the Nucleus and Its Export to the Cytoplasm, Current Frontiers and Perspectives in Cell Biology, Prof. Stevo Najman (Ed.), ISBN: 978-953-51-0544-2, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/current-frontiers-and-perspectives-in-cellbiology/mrna-biogenesis-in-the-nucleus-and-its-export-to-the-cytoplasm>. En son erişim tarihi: 06.12.17
- Gault, J., Awad, I. A., Recksiek, P., Shenkar, R., Breeze, R., Handler, M., ve ark. (2009). Cerebral cavernous malformations: somatic mutations in vascular endothelial cells. *Neurosurgery*. **65**, 138–144.
- Gault, J., Sarin, H., Awadallah, N. A., ve ark. (2004). Pathobiology of human cerebrovascular malformations: basic mechanisms and clinical relevance. *Neurosurgery*. **55**, 1–16; discussion 16–17.
- Gault, J., Shenkar, R., Recksiek, P., Awad, I. A. (2005). Biallelic somatic and germ line CCM1 truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. *Stroke*. **36**, 872–874.

- Gautier L., Cope L., Bolstad B. M., Irizarry R. A. (2004). Affy – analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics*. **20(3)**, 307–315.
- Gehring, N. H., Lamprinaki, S., Kulozik, A. E. and Hentze, M. W. (2009). Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell*. **137**, 536–548.
- Geisler, J. G., Marosi, K., Halpern, J., Mattson, M. P. (2017). DNP, mitochondrial uncoupling, and neuroprotection: A little dab'll do ya. *Alzheimer's & Dementia*. **13(5)**, 582-591.
- Gentleman, R.C., Carey, V.J., Bates, D.M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J. (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*. **5**, R80.
- Gingras, A. R., Liu, J. J., Ginsberg, M. H. (2012). Structural basis of the junctional anchorage of the cerebral cavernous malformations complex. *The Journal of Cell Biology*. **199**, 39-48.
- Gingras, A. R., Puzon-McLaughlin, W., Ginsberg, M. H. (2013). The structure of the ternary complex of Krev Interaction Trapped 1 (KRIT1) bound to both the Rap1 GTPase and the heart of Glass (HEG1) cytoplasmic tail. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**, 23639-23649.
- Giombini, S., Morello, G. (1978). Cavernous angiomas of the brain. Account of fourteen personal cases and review of the literature. *Acta Neurochirurgica(Wien)*. **140(1-2)**, 61–82.
- Glading, A., Han, J., Stockton, R. A., Ginsberg, M. H. (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *The Journal of Cell Biology*. **179**, 247-254.
- Glading, A. J. ve Ginsberg, M. H. (2010). Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling. *Disease Model & Mechanism*. **3**, 73-83.
- Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J., and Bentley, DL. (2008). RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nature Structural & Molecular Biology*. **15**, 71-78.
- Goitre L., Balzac F., Degani S. ve ark. (2010). KRIT1 regulates the homeostasis of intracellular reactive oxygen species. *PLoS One*. **5**, e11786.
- Golden, MJ., Morrison, LA., Kim, H., Hart, BL. (2015). Increased number of white matter lesions in patients with familial cerebral cavernous malformations. *American Journal of Neuroradiology*. **36(5)**, 899–903.

- Gore, AV., Lampugnani, MG., Dye, L., ve ark. (2008). Combinatorial interaction between CCM pathway genes precipitates hemorrhagic stroke. *Disease Models & Mechanisms*.**1**, 275–281.
- Goudreault, M., D'Ambrosio, LM., Kean, MJ., Mullin, MJ., Larsen, BG., Sanchez, A., Chaudhry, S., Chen, GI., Sicheri, F., Nesvizhskii, AI., ve ark. (2009). A PP2A phosphatase high density interaction network identifies a novel striatin-interacting phosphatase and kinase complex linked to the cerebral cavernous malformation 3 (CCM3) protein. *Molecular & Cellular Proteomics*.**8**, 157-171.
- Gross BA., Lin N., Du R., Day AL. (2011). The natural history of intracranial cavernous malformations. *Neurosurgical Focus*.**30(6)**, E24.
- Gross, S., ve Moore, C. (2001). Five subunits are required for reconstitution of the cleavage and polyadenylation activities of *Saccharomyces cerevisiae* cleavage factor I. *Proceedings of the National Academy of Science USA*.**98**, 6080-6085.
- Guzeloglu-Kayisli, O., Amankulor, NM., Voorhees, J., Luleci, G., Lifton, RP., Gunel, M. (2004). KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery*.**54**, 943-949.
- Haasdijk, RA., Cheng, C., Maat-Kievit AJ., Duckers, HJ. (2012). Cerebral cavernous malformations: from molecular pathogenesis to genetic counselling and clinical management. *European Journal of Human Genetics*.**20**, 134-140.
- Hammoud, S., Emery, B. R., Dunn, D., Weiss, R. B., & Carrell, D. T. (2009). Sequence alterations in the YBX2 gene are associated with male factor infertility. *Fertility and sterility*, *91*(4), 1090-1095.
- Harel, L., Costa, B., Tcherpakov, M., Zapatka, M., Oberthuer, A., Hansford, LM., Vojvodic, M., Levy, Z., Chen, ZY., Lee, FS. ve ark. (2009). CCM2 mediates death signaling by the TrkA receptor tyrosine kinase. *Neuron*.**63**, 585-591.
- He, Y., Zhang, H., Yu, L., Gunel, M., Boggon, T. J., Chen, H., Min, W. (2010). Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. *Science Signaling*.**3**, ra26, 1-14.
- Hennig, B., Wang, Y., Ramasamy, S., & McClain, C. J. (1992). Zinc deficiency alters barrier function of cultured porcine endothelial cells. *The Journal of nutrition*, *122*(6), 1242-1247.



- Hilder, TL., Malone, MH., Bencharit, S., Colicelli, J., Haystead, TA., Johnson, GL., Wu, CC. (2007). Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *Journal of Proteome Research*. **6**, 4343-4355.
- Hirose, Y. ve Manley, JL. (2000). RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & Development*. **14**,1415-1429.
- Hirschfeld, M., zur Hausen, A., Bettendorf, H., Jäger, M., Stickeler, E. (2009). Alternative splicing of Cyr61 is regulated by hypoxia and significantly changed in breast cancer. *Cancer research*. **69(5)**, 2082-2090.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., Speed, T. P. (2003). Exploration, Normalization, and Summaries of High Density Oligonucleotide Array Probe Level Data. *Biostatistics*.**4(2)**, 249-264.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, LE. (2001). Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*. **106**, 607–617.
- Iwamori, T., Lin, Y. N., Ma, L., Iwamori, N., Matzuk, M. M. (2011). Identification and characterization of RBM44 as a novel intercellular bridge protein. *PLoS One*, **6(2)**, e17066.
- Jaffe AB and Hall A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *The Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **21**, 247-269.
- Jenny, L., Dobó, J., Gál, P., Pál, G., Lam, W. A., Schroeder, V. (2018). MASP-1 of the complement system enhances clot formation in a microvascular whole blood flow model. *PloS one*, **13(1)**, e0191292.
- Jolliffe, I.T. (2002). Principal Component Analysis, second edition, New York: Springer-Verlag New York, Inc.
- Kang, D., Kim, G. T., Kim, E. J., La, J. H., Lee, J. S., Lee, E. S., ... Han, J. (2008). Lamotrigine inhibits TRESK regulated by G-protein coupled receptor agonists. *Biochemical and biophysical research communications*. **367(3)**, 609-615.
- Kazerouninia, A., Ngo, B., and Martinson, H. G. (2010). Poly(A) signal-dependent degradation of unprocessed nascent transcripts accompanies poly(A) signal-dependent transcriptional pausing in vitro. *Rna*.**16**, 197-210.
- Kean, MJ., Ceccarelli, DF., Goudreault, M., Sanches, M., Tate, S., Larsen, B., Gibson, LC., Derry, WB., Scott, IC., Pelletier, L. ve ark. (2011). Structure- function analysis

- of core STRIPAK proteins: a signaling complex implicated in Golgi polarization. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**, 25065-25075.
- Kehrer-Sawatzki, H., Wilda, M., Braun, VM., Richter, HP., Hameister, (2002). H. Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1). *Acta Neuropathologica (Berlin)*. **104**, 231–40.
- Khoury-Haddad, H., Guttmann-Raviv, N., Ipenberg, I., Huggins, D., Jeyasekharan, A. D., Ayoub, N. (2014). PARP1-dependent recruitment of KDM4D histone demethylase to DNA damage sites promotes double-strand break repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(7), E728-E737.
- Kim DS., Park YG., Choi JU., Chung SS., Lee KC. (1997). An analysis of the natural history of cavernous malformations. *Surgical Neurology*. **48**(1), 9–18.
- Kim, J. (2016). Introduction to cerebral cavernous malformation: a brief review. *BMB Reports*. **49**(5), 255-262.
- Kim, J., Sherman, NE., Fox, JW., Ginsberg, MH. (2011). Phosphorylation sites in the cerebral cavernous malformations complex. *Journal of Cell Science*. **124**, 3929-3932.
- Kim, T. D., Oh, S., Shin, S., Janknecht, R. (2012). Regulation of tumor suppressor p53 and HCT116 cell physiology by histone demethylase JMJD2D/KDM4D. *PLoS one*, *7*(4), e34618.
- Kleaveland, B., Zheng, X., Liu, JJ., et al. (2009). Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. *Nature Medicine*. **15**, 169–176.
- Knudson, AG. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews Cancer*. **1**, 157–162.
- Koch, F., Jourquin, F., Ferrier, P., and Andrau, JC. (2008). Genome-wide RNA polymerase II: not genes only! *Trends in Biochemical Sciences*. **33**, 265-273.
- Kohno, Y., Matsuki, Y., Tanimoto, A., Izumi, H., Uchiumi, T., Kohno, K., ... & Sasaguri, Y. (2006). Expression of Y-box-binding protein dbpC/contrin, a potentially new cancer/testis antigen. *British journal of cancer*, *94*(5), 710.
- Kondziolka D., Lunsford LD., Kestle JRW. (1995). The natural history of cerebral cavernous malformations. *Journal of Neurosurgery*. **83**(5), 820–824.
- Kuehner, JN., Pearson, EL. et Moore, C. (2011). Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **12**, 283-294.

- Kumar A., Bhandari A., Goswami C. (2014). Surveying genetic variants and molecular phylogeny of cerebral cavernous malformation gene, CCM3/PDCD10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **455**, 98-106.
- Kurosaki T. ve Maquat, LE. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *Journal of Cell Science*. **0**, 1-7. doi:10.1242/jcs.181008
- Labauge, P., Denier, C., Bergametti, F., ve ark., (2007). Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurology*. **6**, 237–244.
- Labauge, P., Laberge, S., Brunereau, L., Levy, C., Tournier-Lasserre, E. (1998). Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. *Societe Francaise de Neurochirurgie. Lancet*. **352**, 1892–1897.
- Laberge-le Couteulx, S., Jung, HH., Labauge P., ve ark. (1999). Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nature Genetics*. **23**, 189–193.
- Lafrenière, R. G., Cader, M. Z., Poulin, J. F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., ... & Marcinkiewicz, M. M. (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nature medicine*, *16*(10), 1157.
- Lampugnani, MG., Orsenigo, F., Rudini, N., Maddaluno, L., Boulday, G., Chapon, F., Dejana, E. (2010). CCM1 regulates vascular-lumen organization by inducing endothelial polarity. *Journal of Cell Science*. **123**, 1073-1080.
- Lanzino, G., Spetzler, R.F. (2007). Cavernous malformations of the brain and spinal cord. İçinde I. Feiz-Erfan, J.M. Zabramski, L.J. Kim, J.D. Kolpfenstein. (Ed.), *Natural History of Cavernous Malformations of the Central Nervous System*. New York, ABD: Thieme Medical Publishers, Inc; 3-10.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, LE. and Moore, MJ. (2000). The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO Journal*. **19**, 6860–6869.
- Le Hir, H., ve Andersen, GR. (2008). Structural insights into the exon junction complex. *Molecular and Cellular Biology*. **18**, 112-119.
- Lee, K.M. and Tarn, W.Y. (2013) Coupling pre-mRNA processing to transcription on the RNA factory assembly line. *RNA Biology*. **10**, 380–390.

- Lewis, BP., Green, RE., Brenner, SE. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100(1)**, 189-192.
- Li X., Zhang R., Zhang H. ve ark. (2010). Crystal structure of CCM3, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. *The Journal of Biological Chemistry*.**285**, 24099-24107.
- Li, T., Shi, Y., Wang, P., Guachalla, LM., Sun, B., Joerss, T., Chen, YS., Groth, M., Krueger, A., Platzner, M., Yang, YG., Rudolph, KL., Wang, ZQ. (2015). Smg6/Est1 licenses embryonic stem cell differentiation via nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Journal*. **34**, 1630-1647.
- Li, X., Ji, W., Zhang, R., Folta-Stogniew, E., Min, W., Boggon, TJ. (2011). Molecular recognition of leucine-aspartate repeat (LD) motifs by the focal adhesion targeting homology domain of cerebral cavernous malformation 3 (CCM3). *The Journal of Biological Chemistry*. **286**, 26138-26147.
- Li, X., Zhang, R., Draheim, K. M., Liu, W., Calderwood, DA., Boggon, TJ. (2012). Structural basis for small G protein effector interaction of Ras-related protein 1 (Rap1) and adaptor protein Krev interaction trapped 1 (KRIT1). *The Journal of Biological Chemistry*.**287**, 22317-22327.
- Li, Y., Huang, C., Feng, P., Jiang, Y., Wang, W., Zhou, D., Chen, L. (2016). Aberrant expression of miR-153 is associated with overexpression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in refractory epilepsy. *Scientific reports*, **6**, 32091.
- Lin, C., Meng, S., Zhu, T. and Wang, X. (2010). PDCD10/CCM3 acts downstream of gamma-protocadherins to regulate neuronal survival. *The Journal of Biological Chemistry*.**285**, 41675-41685.
- Linder, B., Fischer, U., Gehring, NH. (2015). mRNA metabolism and neuronal disease. *FEBS Letter*.**589**, 1598–1606.
- Liquori CL., Berg MJ., Squitieri F., Leedom TP., Ptacek L., Johnson EW., ve ark. (2007). Deletions in CCM2 are a common cause of cerebral cavernous malformations. *The American Journal of Human Genetics*.**80**, 69– 75.
- Liquori CL., Berg MJ., Squitieri F., Ottenbacher M., Sorlie M., Leedom TP., ve ark. (2006). Low frequency of PDCD10 mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Human Mutation*.**27**, 118.

- Liu, C., Karam, R., Zhou, Y., Su, F., Ji, Y., Li, G., Xu, G., Lu, L., Wang, C., Song, M., Zhu, J., Wang, Y., Zhao, Y., Foo, WC., Zuo, M., Valasek, MA., Javle, M., Wilkinson, MF., Lu, Y. (2014). The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenosquamous carcinoma. *National Medicine*. **20**, 596–598.
- Liu, HX., Zhang, M., and Krainer, AR. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Development*. **12**, 1998-2012.
- Liu, JJ., Stockton, RA., Gingras, AR., Ablooglu, AJ., Han, J., Bobkov, AA., Ginsberg, MH. (2011). A mechanism of Rap1-induced stabilization of endothelial cell – cell junctions. *Molecular Biology of the Cell*. **22**, 2509-2519.
- Liu, W., Draheim, KM., Zhang, R., Calderwood, DA. and Boggon, TJ. (2013). Mechanism for KRIT1 release of ICAP1-mediated suppression of integrin activation. *Molecular Cell*. **49**, 719-729.
- Liu, Y., Miao, L., Ni, R., Zhang, H., Li, L., Wang, X., Wang, J. (2016). microRNA-520a-3p inhibits proliferation and cancer stem cell phenotype by targeting HOXD8 in non-small cell lung cancer. *Oncology reports*, **36**(6), 3529-3535.
- Liu, Z., Yin, X., Liu, L., Tao, H., Zhou, H., Ma, G., ... Cai, Z. (2015). Association of KEAP1 and NFE2L2 polymorphisms with temporal lobe epilepsy and drug resistant epilepsy. *Gene*, **571**(2), 231-236.
- Logan, J., Falck-Pedersen, E., Darnell, JE., Jr., and Shenk, T. (1987). A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta maj-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **84**, 8306-8310.
- Lunsford LD., Khan AA., Niranjana A., Kano H., Flickinger JC., Kondziolka D. (2010). Stereotactic radiosurgery for symptomatic solitary cerebral cavernous malformations considered high risk for resection. *Journal of Neurosurgery*. **113**(1), 23–29.
- Lv, W., Wang, L., Duan, Q., Gong, Z., Yang, F., Song, H., Song, Y. (2013). Characteristics of the complement system gene expression deficiency in patients with symptomatic pulmonary embolism. *Thrombosis research*, **132**(1), e54-e57.
- Lykke-Andersen, S., Jensen, TH. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **16**(11), 665-677.

- Ma X., Zhao H., Shan J., Long F., Chen Y. ve ark. (2007). PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Molecular Biology of the Cell*. **18**, 1965-1978.
- Maddaluno L., Rudini N., Cuttano R. ve ark. (2013). EndMT contributes to the onset and progression of cerebral cavernous malformations. *Nature*. **498**, 492-496
- Madeiro da Costa, R. F., Blanco Martinez, A. M., & Ferreira, S. T. (2010). 2, 4-Dinitrophenol blocks neurodegeneration and preserves sciatic nerve function after trauma. *Journal of neurotrauma*, *27*(5), 829-841.
- Maphis, N. M., Jiang, S., Binder, J., Wright, C., Gopalan, B., Lamb, B. T., & Bhaskar, K. (2017). Whole Genome Expression Analysis in a Mouse Model of Tauopathy Identifies MECP2 as a Possible Regulator of Tau Pathology. *Frontiers in molecular neuroscience*, *10*, 69.
- Maquat, L.E., Kinniburgh, A.J. and Ross, J. (1981). Unstable  $\beta$ -globin mRNA in mRNA-deficient  $\beta$ 0-thalassemia. *Cell*. **27**, 543-553.
- Marchi S., Corricelli M., Trapani E. ve ark. (2015). Defective autophagy is a key feature of cerebral cavernous malformations. *EMBO Molecular Medicine*. **7**, 1403-1417.
- Marini, V., Ferrera, L., Pigatto, F., Origone, P., Garre, C., Dorcaratto, A., ve ark. (2004). Search for loss of heterozygosity and mutation analysis of KRIT1 gene in CCM patients. *American Journal of Medical Genetics Part A*. **130A**, 98–101.
- Martin, K.C. and Ephrussi, A. (2009). mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*. **136**, 719–730.
- Matos, M.L., Lapyckyj, L., Rosso, M., Besso, M.J., Mencucci, M.V., Briggiler, C.I., Giustina, S., Furlong, L.I., Vazquez-Levin, M.H. (2017). Identification of a novel human E-cadherin splice variant and assessment of its effects upon EMT-related events. *Journal of cellular physiology*. **232**(6), 1368-1386.
- Mattiasson, G., Shamloo, M., Gido, G., Mathi, K., Tomasevic, G., Yi, S., ... & Nikolich, K. (2003). Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nature medicine*, *9*(8), 1062.
- Max, T., Sogaard, M., and Svejstrup, J. Q. (2007). Hyperphosphorylation of the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II facilitates dissociation of its complex with mediator. *Journal of Biological Chemistry*. **282**, 14113-14120.

- Mazduferi, M., Kumar, G., van Eyll, J., Danis, B., Foerch, P., Kaminski, R. M. (2013). Nrf2 defense pathway: Experimental evidence for its protective role in epilepsy. *Annals of neurology*, 74(4), 560-568.
- McDonald, DA., Shi, C., Shenkar, R., Gallione, CJ., Akers, AL., Li, S., ve ark. (2014). Lesions from patients with sporadic cerebral cavernous malformations harbor somatic mutations in the CCM genes: evidence for a common biochemical pathway for CCM pathogenesis. *Human Molecular Genetics*. 23, 4357–4370.
- McIlwain, DR., Pan, Q., Reilly, PT., Elia, AJ., McCracken, S., Wakeham, AC., Itie-Youten, A., Blencowe, BJ., Mak, TW. (2010) Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 107, 12186–12191.
- Medghalchi, SM., Frischmeyer, PA., Mendell, JT., Kelly, AG., Lawler, AM., Dietz, HC. (2001). Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Human Molecular Genetics*. 10, 99–105.
- Meerarani, P., Ramadass, P., Toborek, M., Bauer, H. C., Bauer, H., Hennig, B. (2000). Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor  $\alpha$ -. *The American journal of clinical nutrition*, 71(1), 81-87.
- Millon-Frémillon, A., Bouvard, D., Grichine, A., Manet-Dupé, S., Block, MR., Albiges-Rizo, C. (2008). Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity. *The Journal of Cell Biology*. 180, 427-441.
- Minvielle-Sebastia, L., Preker, PJ., Wiederkehr, T., Strahm, Y., VE Keller, W. (1997). The major yeast poly(A)-binding protein is associated with cleavage factor IA and functions in premessenger RNA 3'-end formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 94, 7897-7902.
- Mitchell, SF. and Parker, R. (2014) Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular Cell*. 54, 547–558.
- Moriarity JL., Wetzel M., Clatterbuck RE. ve ark. (1999). The natural history of cavernous malformations. A prospective study of 68 patients. *Neurosurgery*. 44(6), 1166-1171.
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, DN. ve Chuzhanova, NA. (2008). A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Human Mutation*. 29, 1037-1047.

- Mouchtouris N., Chalouhi N., Chitale A., ve ark. (2014). Management of Cerebral Cavernous Malformations: From Diagnosis to Treatment. *The Scientific World Journal*.**2015**, 1-8.
- Mulders, S. M., Preston, G. M., Deen, P. M., Guggino, W. B., van Os, C. H., Agre, P. (1995). Water channel properties of major intrinsic protein of lens. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(15), 9010-9016.
- Nag, A., Narsinh, K., and Martinson, HG. (2007). The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nature Structural & Molecular Biology*.**14**, 662-669.
- Nakamura, T., Keep, R. F., Hua, Y., Hoff, J. T., Xi, G. (2005). Oxidative DNA injury after experimental intracerebral hemorrhage. *Brain research*, *1039*(1-2), 30-36.
- Nakamura, T., Keep, R. F., Hua, Y., Nagao, S., Hoff, J. T., Xi, G. (2006). Iron-induced oxidative brain injury after experimental intracerebral hemorrhage. In *Brain Edema XIII* (pp. 194-198). Springer, Vienna.
- Nikoloski, G., Langemeijer, S.M., Kuiper, R.P., Knops, R., Massop, M., Tonnissen, E.R., van der Heijden, A., Scheele, T.N., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B.A., Jansen, J.H. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature genetics*. **42**(8), 665-667.
- Orr, H.T. ve ark. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature Genetics*.**4**, 221–226.
- Park, NJ., Tsao, DC., and Martinson, HG. (2004). The two steps of poly(A)-dependent termination, pausing and release, can be uncoupled by truncation of the RNA polymerase II carboxyl-terminal repeat domain. *Molecular and Cellular Biology*.**24**, 4092-4103.
- Pasternack, Sandra M. ve ark. (2013). Mutations in SNRPE, which encodes a core protein of the spliceosome, cause autosomal-dominant hypotrichosis simplex. *The American Journal of Human Genetics*.**92**, 81–87.
- Petersen, TA., Morrison, LA., Schrader, RM., Hart, BL. (2010). Familial versus sporadic cavernous malformations: differences in developmental venous anomaly association and lesion phenotype. *American Journal of Neuroradiology*.**31**, 377–82.



- Petit, N., Blécon, A., Denier, C., Tournier-Lasserre, E. (2006). Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expression Patterns*. **6**, 495-503.
- Plummer, NW., Gallione, CJ., Srinivasan, S., Zawistowski, JS., Louis, DN., Marchuk, DA. Loss of p53 sensitizes mice with a mutation in Ccm1 (KRIT1) to development of cerebral vascular malformations. (2004). *The American Journal of Pathology*. **165**, 1509–18.
- Porokhovnik, L. N., Pisarev, V. M. (2017). Association of polymorphisms in NFE2L2 gene encoding transcription factor Nrf2 with multifactorial diseases. *Russian Journal of Genetics*, **53**(8), 851-864.
- Porter, PJ., Willinsky RA., Harper W., Wallace MC. (1997). Cerebral cavernous malformations: natural history and prognosis after clinical deterioration with or without hemorrhage. *Journal of Neurosurgery*. **87**(2), 190–197.
- Porter, RW., Detwiler PW., Spetzler RF., ve ark. (1999). Cavernous malformations of the brainstem: experience with 100 patients. *Journal of Neurosurgery*. **90**(1), 50–58.
- Pozzati, E., Acciarri, N., Tognetti, F., Marliani, F., Giangaspero, F. (1996). Growth, subsequent bleeding, and de novo appearance of cerebral cavernous angiomas. *Neurosurgery*. **38**, 662-670.
- Proudfoot, NJ., Furger A., Dye MJ. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell*. **108**, 501-512.
- Raychaudhuri R., Batjer HH., and Awad IA. (2005). Intracranial cavernous angioma: a practical review of clinical and biological aspects. *Surgical Neurology*. **63**(4), 319–328.
- Reich, P., Winkler, J., Straube, A., Steiger, HJ., Peraud, A. (2003). Molecular genetic investigations in the CCM1 gene in sporadic cerebral cavernomas. *Neurology*. **60**, 1135–8.
- Renton, AE. ve ark. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*. **72**, 257–268.
- Revencu, N., Vikkula, M. (2006). Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *Journal of Medical Genetics*. **43**, 716–721.
- Riant, F., Cecillon, M., Saugier-veber, P., Tournier-Lasserre, E. (2013). CCM molecular screening in a diagnosis context: novel unclassified variants leading to abnormal splicing and importance of large deletions. *Neurogenetics*. **14**, 133-141.

- Rigamonti, D., Hadley, MN., Drayer, BP., ve ark. (1988). Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *The New England Journal of Medicine*. **319**, 343-347.
- Rinaldi, C., Bramanti, P., Fama, A. ve ark. (2015). Glyoxalase I A111e, Paraoxonase 1 Q192r and L55m Polymorphisms in Italian Patients with Sporadic Cerebral Cavernous Malformations: A Pilot Study. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. **29**, 493-500.
- Robinson, JR., Awad, IA., Little JR. (1991). Natural history of the cavernous angioma. *Journal of Neurosurgery*. **75(5)**, 709–714
- Rodriguez-Navarro, S. and Hurt, E. (2011). Linking gene regulation to mRNA production and export. *Current Opinion in Cell Biology*. **23**, 302–309.
- Rosen, JN., Sogah, VM., Ye, LY., Mably, JD. (2013). ccm2-like is required for cardiovascular development as a novel component of the Heg-CCM pathway. *Developmental Biology*. **376**, 74-85.
- Schulz, GB., Wieland, E., Wustehube-Lausch, J. ve ark. (2015). Cerebral Cavernous Malformation-1 Protein Controls DLL4-Notch3 Signaling Between the Endothelium and Pericytes. *Stroke*. **46**, 1337-1343.
- Schwaner, E., Németh, Z., Jani, P. K., Kajdácsi, E., Debreczeni, M. L., Doleschall, Z., Hegedűs, T. (2017). Transcriptome analysis of inflammation-related gene expression in endothelial cells activated by complement MASP-1. *Scientific Reports*, **7(1)**, 10462.
- Seker, A., Pricola, KL., Guclu, B., Ozturk, AK., Louvi, A., Gunel, M. (2006). CCM2 expression parallels that of CCM1. *Stroke*. **37**, 518-523.
- Senger, D. R., Davis, G. E. (2011). Angiogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3(8)**, a005090.
- Shatkin, AJ. (1976) Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell*. **9**, 645–653.
- Shi, C., Shenkar, R., Batjer, H. H., Check, I. J., & Awad, I. A. (2007). Oligoclonal immune response in cerebral cavernous malformations.
- Smyth G. K., Speed T. P. (2003). Normalization of cDNA microarray data. *Methods*. **31**, 265–273.
- Smyth, G. (2005) Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R. and Huber, W. (eds). *Bioinformatics and*

- Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. *Springer, New York.* 397–420.
- Sommer, B., Kasper, BS., Coras, R. ve ark. (2013). Surgical management of epilepsy due to cerebral cavernomas using neuronavigation and intraoperative MR imaging. *Neurological Research.* **35(10)**, 1076–1083.
- Song, Y., Eng, M., Ghabrial, AS. (2013). Focal defects in single-celled tubes mutant for Cerebral cavernous malformation 3, GCKIII, or NSF2. *Developmental Cell.***25**, 507-519.
- Spiegler, S., Najm, J., Liu, J. ve ark. (2014). High mutation detection rates in cerebral cavernous malformation upon stringent inclusion criteria: one-third of probands are minors. *Molecular Genetics and Genomic Medicine.* **2**, 176-185.
- Sreedharan, J. ve ark. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science.***319**, 1668–1672.
- Stahl S., Gaetzner S., Voss K. ve ark. (2008). Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Human Mutation.***29**, 709-717.
- Steinberg GK., Chang SD., Gewirtz RJ., Lopez JR. (2000). Microsurgical resection of brainstem, thalamic, and basal ganglia angiographically occult vascular malformations. *Neurosurgery.* **46(2)**, 260–271.
- Stockton, RA., Shenkar, R., Awad, IA., Ginsberg, MH. (2010). Cerebral cavernous malformations proteins inhibit Rho kinase to stabilize vascular integrity. *The Journal of Experimental Medicine.***207**, 881-896.
- Strasser, K. et al. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature.* **417**, 304–308.
- Sun, Q., Mayeda, A., Hampson, RK., Krainer, AR., and Rottman, FM. (1993). General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer. *Genes & Development.***7**, 2598-2608.
- Tange, TO., Nott, A., and Moore, MJ. (2004). The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Current Opinion in Cell Biology.***16**, 279-284.
- Tortora, GJ. ve Derrickson, B. (2012). *Principles of Anatomy and Physiology.* (13<sup>th</sup> ed.). New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.

- Tsalik, E. L., Langley, R. J., Dinwiddie, D. L., Miller, N. A., Yoo, B., van Velkinburgh, J. C., Henao, R. (2014). An integrated transcriptome and expressed variant analysis of sepsis survival and death. *Genome medicine*, 6(11), 111.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., & Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Molecular pain*, 7(1), 30.
- Uhlik, MT., Abell, AN., Johnson, NL., Sun, W., Cuevas, BD., Lobel-Rice, KE., Horne, EA., Dell'Acqua, ML. Johnson, GL. (2003). Rac-MEKK3- MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nature Cell Biology*.5, 1104-1110.
- Vincent, A. M., Olzmann, J. A., Brownlee, M., Sivitz, W. I., & Russell, J. W. (2004). Uncoupling proteins prevent glucose-induced neuronal oxidative stress and programmed cell death. *Diabetes*, 53(3), 726-734.
- Voss, K., Stahl, S., Schleider, E., Ullrich, S., Nickel, J., Mueller, TD., Felbor, U. (2007). CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics*.8, 249-256.
- Vozianov, S. O., Kashuba, V. I., Grygorenko, V. M., Gordiyuk, V. V., Danylets, R. O., Bondarenko, Y. M., & Vikarchuk, M. V. (2016). Identification of a new diagnostic markers of prostatic cancer, using noti-microchips. *Klinichna khirurgiia*, (4), 54-57.
- Wang, CC., Liu A., Zhang JT., Sun B., Zhao YL. (2003). Surgical management of brain-stem cavernous malformations: report of 137 cases. *Surgical Neurology*. 59(6), 444– 454.
- Wang, J., Smith PJ., Krainer AR., ve Zhang MQ. (2005). Distribution of SR protein exonic splicing enhancer motifs in human protein-coding genes. *Nucleic Acids Research*. 33, 5053-5062.
- Weischenfeldt, J., Damgaard, I., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Thoren, LA., Nielsen, FC., Jacobsen, SE., Nerlov, C., Porse, BT. (2008). NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes Development*. 22, 1381–1396.
- Whitehead KJ., Chan AC., Navankasattusas S. ve ark. (2009). The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. *Nature Medicine*.15, 177-184.

- Whitelaw, E., and Proudfoot, N. (1986). Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. *Embo Journal*. **5**, 2915-2922.
- Willmore, L.J., Sybert, G.W., Munson, J.B. (1978). Recurrent seizures induced by cortical iron injection: a model of posttraumatic epilepsy. *Annals of Neurology*. **4(4)**, 329-336.
- Wu, J., Hua, Y., Keep, R. F., Schallert, T., Hoff, J. T., Xi, G. (2002). Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. *Brain research*, *953(1-2)*, 45-52.
- Wu, R., Wang, Z., Zhang, H., Gan, H., Zhang, Z. (2016). H3K9me3 demethylase Kdm4d facilitates the formation of pre-initiative complex and regulates DNA replication. *Nucleic acids research*, *45(1)*, 169-180.
- Wu, Y., Zhang, Y., and Zhang, J. (2005). Distribution of exonic splicing enhancer elements in human genes. *Genomics*. **86**, 329-336.
- Wüstehube, J., Bartol, A., Liebler, S.S., Brütsch, R., Zhu, Y., Felbor, U., Sure, U., Augustin, H.G., Fischer, A. (2010). Cerebral cavernous malformation protein CCM1 inhibits sprouting angiogenesis by activating DELTA-NOTCH signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **107**, 12640-12645.
- Xu, D., Xu, S., Kyaw, A. M. M., Lim, Y. C., Chia, S. Y., Siang, D. T. C., ... Sun, L. (2017). RNA Binding Protein, Ybx2, Regulates RNA Stability During Cold-Induced Brown Fat Activation. *Diabetes*, db170655.
- Xu, X., Wang, X., Zhang, Y., Wang, D. C. and Ding, J. (2013). Structural basis for the unique heterodimeric assembly between cerebral cavernous malformation 3 and germinal center kinase III. *Structure*. **21**, 1059-1066.
- Yadla S., Jabbour P.M., Shenkar R., Shi C., Campbell P.G., Awad I.A. (2010). Cerebral cavernous malformations as a disease of vascular permeability: from bench to bedside with caution. *Neurosurgical focus*. **29(3)**, E4.
- Yamada, Y., Kato, K., Oguri, M., Horibe, H., Fujimaki, T., Yasukochi, Y., ... & Sakuma, J. (2018). Identification of four genes as novel susceptibility loci for early-onset type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, or hyperuricemia. *Biomedical reports*, *9(1)*, 21-36.

- Yang, L., Xu, L., Wang, Q., Wang, M., An, G. (2016). Dysregulation of long non-coding RNA profiles in human colorectal cancer and its association with overall survival. *Oncology letters*, 12(5), 4068-4074.
- Yool, A. J. (2007). Aquaporins: multiple roles in the central nervous system. *The Neuroscientist*, 13(5), 470-485.
- Yoruk, B., Gillers, BS., Chi, NC., Scott, IC. (2012). Ccm3 functions in a manner distinct from Ccm1 and Ccm2 in a zebrafish model of CCM vascular disease. *Developmental Biology*.362, 121-131.
- Yoshida, T., Izumi, H., Uchiumi, T., Sasaguri, Y., Tanimoto, A., Matsumoto, T., ... & Kohno, K. (2006). Expression and cellular localization of dbpC/Contrin in germ cell tumor cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1759(1-2), 80-88.
- You, C., Sandalcioglu, IE., Dammann, P., Felbor, U., Sure, U., Zhu, Y. (2013). Loss of CCM3 impairs DLL4-Notch signalling: implication in endothelial angiogenesis and in inherited cerebral cavernous malformations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17, 407-418.
- Zabramski, JM., Wascher, TM., Spetzler, RF, ve ark. (1994). The natural history of familial cavernous malformations: results of an ongoing study. *Journal of Neurosurgery*. 80(3), 422-432.
- Zahid, S., Oellerich, M., Asif, A. R., & Ahmed, N. (2014). Differential expression of proteins in brain regions of Alzheimer's disease patients. *Neurochemical research*, 39(1), 208-215.
- Zaret, KS., ve Sherman, F. (1982). DNA sequence required for efficient transcription termination in yeast. *Cell*.28, 563-573.
- Zawistowski, JS., Stalheim, L., Uhlik, MT., Abell, AN., Ancrile, BB., Johnson, GL., Marchuk, DA. (2005). CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Human Molecular Genetics*.14, 2521-2531.
- Zhang, B., Kirov, S.A., Snoddy, J.R. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*, 33(Web Server issue), W741-748.

- Zhang, J., Rigamonti, D., Dietz, H. C. and Clatterbuck, R. E. (2007). Interaction between krit1 and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery*.**60**, 353-359.
- Zhang, M., Dong, L., Shi, Z., Jiao, S., Zhang, Z., Zhang, W., Liu, G., Chen, C., Feng, M., Hao, Q. ve ark. (2013a). Structural mechanism of CCM3 heterodimerization with GCKIII kinases. *Structure*.**21**, 680-688.
- Zhang, R., Liu, R., Liu, C., Niu, Y., Zhang, J., Guo, B., Chen, X. (2017). A novel role for MiR-520a-3p in regulating EGFR expression in colorectal cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, **42**(4), 1559-1574.
- Zhang, Y., Tang, W., Zhang, H., Niu, X., Xu, Y., Zhang, J., Gao, K., Pan, W., Boggon, T.J., Toomre, D. ve ark. (2013b). A Network of Interactions Enables CCM3 and STK24 to Coordinate UNC13D-Driven Vesicle Exocytosis in Neutrophils. *Developmental Cell*.**27**, 215-226.
- Zhao, L., Zhang, C., Liao, G., Long, J. (2010). RNAi-mediated inhibition of PDGF-D leads to decreased cell growth, invasion and angiogenesis in the SGC-7901 gastric cancer xenograft model. *Cancer biology & therapy*. **9**(1), 42-48.
- Zheng X., Xu C., Di Lorenzo A., Kleaveland B., Zou Z., Seiler C., Chen M., Cheng L., Xiao J., He J., ve ark. (2010). CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. *The Journal of Clinical Investigation*.**120**, 2795-2804.
- Zheng X., Xu, C., Smith, AO., Stratman, AN., Zou, Z., Kleaveland, B., Yuan, L., Didiku, C., Sen, A., Liu, X. ve ark. (2012). Dynamic regulation of the cerebral cavernous malformation pathway controls vascular stability and growth. *Developmental Cell*.**23**, 342-355.
- Zheng, H., Li, M., Ren, W., Zeng, L., Liu, H. D., Hu, D., ... & Cao, Y. (2007). Expression and secretion of immunoglobulin alpha heavy chain with diverse VDJ recombinations by human epithelial cancer cells. *Molecular immunology*, **44**(9), 2221-2227.
- Zhu Y, Zhao K, Prinz A. ve ark. (2015). Loss of endothelial programmed cell death 10 activates glioblastoma cells and promotes tumor growth. *Journal of Neuro-Oncology*.**18**, 538-548.
- Zhu Y., Wu Q., Xu JF. ve ark. (2010). Differential angiogenesis function of CCM2 and CCM3 in cerebral cavernous malformations. *Neurosurgical Focus*.**29**, E1.

**HAM VERİLER**



**FORMLAR**



**ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 940

Tarih : 07.05.2015

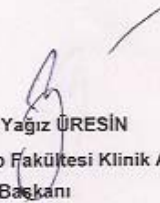
Konu : Prof.Dr.Sadrettin PENÇE

Sayın Prof.Dr.Sadrettin PENÇE  
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü

İlgi :Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünün 11/08/2014 gün ve 320 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Hilal EREN'in yürüteceği 2014/1262 dosya numaralı "Kavernom Dokusunda Genom Çaplı Mrna Ekspresyon Analizi" başlıklı çalışma kurulumuzun 24/04/2015 tarih ve 08 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞKANIN AÇIK ADI		"Kavernom Dokusunda Genom Çaplı Mrna Ekspresyon Analizi"	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	15/08/2014	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU	<input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ	<input type="checkbox"/>	
	Belge Adı	<input type="checkbox"/>	Açıklama
	TÜRKÇE ETİKET ÖRNEĞİ	<input type="checkbox"/>	
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
	HASTA KARTI GÜNÜLÜKLERİ	<input type="checkbox"/>	
	ILAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Anabilim Dalı Başkanlığından Üst Yazı ve Akademik Kurul Kararı, Literatür Kaynağı, Sorumluluk Paylaşım Belgesi, Olgular Raporu Formu, İlgili Elemanların Bilgilendirildiğine Dair Belge, CV, CD
KARAR BELGELERİ	Karar No:08	Tarih: 24/04/2015	
	İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalında görevli Prof.Dr.Sadrettin PENÇE'nin sorumluluğunda ve Hilal EREN'in yürüteceği yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan Etik Kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.		

## İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

ÇALIŞMA ESASI		19.08.2011 tarihli, 28030 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkındaki Yönetmelik							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi *	Katılım **		İmza	
Prof. Dr. A. Yağız ÜRESİN	Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkanı)	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Berrin UMMAN	Kardiyoloji	İstanbul Tıp Fakültesi (Etik Kurul Başkan Yardımcısı)	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ahmet GÜL	Romatoloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Oğuzhan ÇOBAN	Nöroloji	İstanbul Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Sevda ÖZEL YILDIZ	Biyostatistik	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

- \* -Araştırma ile ilişkisi  
 \*\* -Toplantıya Bulunma

İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Klinik araştırmalar Etik kurulu 13.04.2013 tarih, 28617 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik çerçevesinde kurulmuş ve T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu tarafından onaylanmıştır. İlgili yönetmelik kapsamında kalan araştırmalar Sağlık Bakanlığından izin almak zorundadır. Yönetmelik kapsamı dışında kalan araştırmalar ise Etik Kurul bünyesinde oluşturulmuş 5 kişilik alt komisyon tarafından değerlendirilmekte olup Sağlık Bakanlığı iznine tabi değildir.

T. C.  
ADALET BAKANLIğI  
Adli Tıp Kurumu Başkanlığı

Sayı : 21589509/397  
Konu: Bilimsel Çalışma

15/12/2015

Sayın, Yük. Mol. Biyolog Hilal EREN

"Kavernom Dokusunda Genom Çaplı mRNA Ekspresyon Analizi" isimli çalışma öneriniz 15/12/2015 tarihli Eğitim ve Bilimsel Araştırma Komisyonu toplantısında görüşülmüş ve kabul edilmiştir.

Bilginize rica ederim.

  
Doç. Dr. Yalđın BÜYÜK  
Başkan

**PATENT HAKKI İZİNİ**



**TELİF HAKKI İZİNİ**



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hilal	<b>Soyadı</b>	Eren Gözel
<b>Doğ.Yeri</b>	Beykoz	<b>Doğ.Tar.</b>	03.04.1985
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	50491183102
<b>Email</b>	hilaleren2@gmail.com	<b>Tel</b>	0530 310 18 22

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İstanbul Üniversitesi	
<b>Yük.Lis.</b>	İstanbul Teknik Üniversitesi	2010
<b>Lisans</b>	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2008
<b>Lise</b>	Kadıköy Anadolu Lisesi	2004

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Öğretim Görevlisi	İ. Medipol Üniversitesi	2015-
2.	Öğretim Görevlisi	İ. Gelişim Üniversitesi	2012-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	94	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office	Çok iyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

### Özel İlgi Alanları (Hobileri):

## Kavernom Dokusunda Genom çaplı mRNA Ekspresyon Analizi

### ORJİNALLIK RAPORU

<b>%2</b>	<b>%2</b>	<b>%1</b>	<b>%0</b>
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

### BİRİNCİL KAYNAKLAR

<b>1</b>	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
<b>2</b>	deneyseltip.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
<b>3</b>	Submitted to Dokuz Eylul Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
<b>4</b>	cdn.intechopen.com İnternet Kaynağı	<%1
<b>5</b>	Submitted to Anadolu University Öğrenci Ödevi	<%1
<b>6</b>	www.slideserve.com İnternet Kaynağı	<%1
<b>7</b>	Paulo J. da Costa, Juliane Menezes, Luísa Romão. "The role of alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay in human disease", The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2017 Yayın	<%1



