



**İN VİTRO ENDOKONDRAL KEMİKLEŞME SÜRECİNDE  
NATRIÜRETİK PEPTİD RESEPTÖR-B (NPR-B) VE  
C-TİPİ NATRIÜRETİK PEPTİD (CNP)  
EKSPRESYON VE FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

**Tülay ALAN**

***Haziran 2008***  
**DENİZLİ**

**İN VİTRO ENDOKONDRAL KEMİKLEŞME SÜRECİNDE  
NATRIÜRETİK PEPTİD RESEPTÖR-B (NPR-B) VE  
C-TİPİ NATRIÜRETİK PEPTİD (CNP)  
EKSPRESYON VE FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Tülay ALAN**

**Danışman: Doç. Dr. A.Çevik TUFAN**

**Haziran, 2008  
DENİZLİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU**

Tülay ALAN tarafından, Doç. Dr. A. Çevik TUFAN yönetiminde hazırlanan "**İn Vitro Endokondral Kemikleşme Sürecinde Natriüretik Peptid Reseptör-B (NPR-B) ve C Tipi Natriüretik Peptid Ekspresyon ve Fonksiyonlarının İncelenmesi**" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Petek KORKUSUZ  
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Recep KUTLUBAY

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Gülçin ABBAN

Jüri Üyesi



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN

Jüri Üyesi (Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.12.2023 tarih ve 05/02-2023 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :  
Öğrenci Adı Soyadı : Tülay Alan

## TEŞEKKÜR

Tezin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında, tezin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini, özverilerini ve bilgilerini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim görevlisi Sayın Doç. Dr. A.Çevik TUFAN'a ve Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr.Recep KUTLUBAY'a teşekkür ederim.

Tezim sırasında bana her türlü yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Gülçin ABBAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ ve Sayın Yrd.Doç.Dr. E.Oğuzhan OĞUZ'a teşekkür ediyorum.

Hayatım boyunca bana destek olan, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

## ÖZET

### İN VİTRO ENDOKONDRAL KEMİKLEŞME SÜRECİNDE NATRIÜRETİK PEPTİD RESEPTÖR-B (NPR-B) VE C-TİPİ NATRIÜRETİK PEPTİD (CNP) EKSPRESYON VE FONKSİYONLARININ İNCELENMESİ

Alan, Tülay

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Danışman: Doç. Dr. A. Çevik TUFAN

Haziran 2008, 48 sayfa

Ekstremitelerimizdeki uzun kemikler endokondral kemikleşme yolu ile oluşurlar. Bu mekanizmada uzun kemikler, gelişimleri sırasında kemik dokuya model oluşturan geçici kıkırdak doku oluşumuna ihtiyaç duyarlar. Dolayısı ile kıkırdak doku gelişimi, vertebralaların embriyonik ekstremitelerde gelişimlerinde önemli bir morfojenetik aşamadır. Genel olarak endokondral kemikleşme mekanizması, ekstremitelerdeki mezenşim orijinli hücrelerin kondrositlere dönüşümlerini, bu kondrositlerin programlanmış ve yapılandırılmış bir sistem ile matürasyonlarını ve takip eden dönemde de bu yapıların yerlerini kemik doku elemanlarına bırakmalarını içerir. Bu sistem son derece koordine ve sıkı embriyonik-genetik kontrol mekanizmaları altında gelişimini tamamlar. Bugüne kadar ortaya konmuş pek çok kontrol mekanizmalarından son dönemde ön plana çıkanlardan birisi de C tipi natriüretik peptit (CNP) ve Natriüretik peptit reseptör-B (NPR-B) yolu ile aktive olan sinyal yoludur. NPR-B proteininin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları akromezomelik displazi tip maroteaux (AMDM; OMIM no. 602875) adı verilen osteokondrodysplaziye yol açar. Ancak AMDM'li hastaların endokondral gelişim süreçlerini yansıtan kemik büyüme plağı histolojilerinin incelenmesi mümkün olmadığından, CNP/NPR-B sinyal yolunun kondrogenez ve kemik gelişimi üzerine olan olası etkileri ve etki mekanizmalarını anlayabilmek için *in vivo* ve *in vitro* model sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu projede, tavuk embriyolarından sağlanan, son farklılaşmaya uğramamış ekstremitelerde tomurcuğu kökenli mezenşimal kök hücreler kullanılarak elde edilen primer hücre kültür

ortamlarında, CNP/NPR-B sinyal yolunun endokondral kemikleşme sürecindeki hücre proliferasyonu, mezenşimal yoğunlaşma, kondrojenik farklılaşma, matürasyon, hipertrofi ve hücre dışı matriks sentezi fazlarındaki olası rolünün moleküler düzeyde incelenmesi amaçlanmıştır. Sonuçlarımız, *in vivo* endokondral kemikleşme sürecinde gözlenen fazların tümünün bu model sistemde *in vitro* olarak taklit edilebildiğini, ve her bir faza spesifik belirleyici özellikte moleküllerin (mezenşimal yoğunlaşma fazına spesifik N-cadherin, kondrojenik farklılaşma fazına spesifik kollajen tip II, ve matürasyon, hipertrofi fazına spesifik kollajen tip X) mRNA düzeyinde ekspresyonlarını göstermiştir. Dolayısı ile çalışmalarımıza zemin hazırlayacak olan *in vitro* bir model sistem kurulmuştur.

Bir sonraki aşamada, önce insan CNP proteininin tavukdaki homoloğu olan CNP-3'ün ve bu sinyal proteininin reseptörü olan NPR-B'nin tavuk ekstremitte gelişimi sürecindeki *in vivo* mRNA ekspresyon profili incelenmiştir. Sonuçlar, gerek CNP-3'ün gerekse NPR-B'nin mRNA düzeyinde incelediğimiz evre 18 ile 35 (Hamburger ve Hamilton'a göre tavuk embriyosu evrelemesi) arasındaki tüm evrelerde eksprese edildiğini göstermiştir. Bu süreç içerisinde her iki molekülün mRNA ekspresyon düzeyleri de ilki evre 23-24'te, ikincisi evre 30-31'de olmak üzere iki yükseliş dönemi göstermiştir. Bu evreler sırası ile *in vivo* pre-kondrojenik mezenşimal yoğunlaşmaya ve kondrojenik matürasyon-hipertrofi'nin tetiklenme dönemlerine karşılık gelmektedir. Aynı inceleme *in vitro* kültür ortamlarında tekrarlandığında her iki molekülün kollajen tip X ile paralel ekspresyon artışı gösterdikleri gösterilmiştir.

Kültür ortamları  $10^{-7}$  M CNP (insan orijinli) ile muamele edildiğinde karşımıza dört önemli sonuç çıkmıştır. Bunlar: 1) Kondrojenik ve glikozaminoglikan sentezi artmıştır, 2) Yoğunlaşma fazının sonunda ekspresyonunda azalma beklenen N-cadherin'in mRNA düzeyi artmıştır ve dolayısı ile mezenşimal yoğunlaşmada artış gözlenmiştir, 3) Kondrojenik matürasyon ve hipertrofi fazında kollajen tip X ekspresyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir, ve 4) Tüm bu artış yönündeki bulgulara rağmen kondrojenik değişimi gösteren kollajen tip II mRNA ekspresyonunda anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgular olası fonksiyon yönünden bakıldığında *in vivo* ekspresyon profillerinde gözlenen pik evreleri ile de uyumludur.

Sonuç olarak çalışmamız, CNP-3/NPR-B sinyal yolunun kondrojenik pozitif yönde tetikleyen bir sinyal yolu olarak fonksiyon gördüğünü, etkisini de özellikle mezenşimal

yoğunlaşmayı, glikozaminoglikan sentezini, ve kondrojenik matürasyon ve hipertrofi fazlarını uyararak gerçekleştirdiğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** CNP, CNP-3, NPR-B, Endokondral kemikleşme, kondrogenez.



**ABSTRACT****ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND FUNCTION OF  
NATRIURETIC PEPTIDE RECEPTOR-B (NPR-B) AND  
C-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE (CNP)  
DURING THE PROCESS OF ENDOCHONDRAL OSSIFICATION**

Alan, Tülay

M.Sc. Thesis in Histology and Embriyology  
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Çevik TUFAN

June 2008, 48 pages

The bones of the limb form through endochondral ossification, a process involving a cartilage intermediate. Thus, chondrogenesis is an important morphogenetic step in the development of vertebrate limb. The overall process consists of a highly coordinated and orchestrated series of events involving the commitment and differentiation of limb mesenchymal cells to chondrocytes, which undergo programmed and structured maturation and subsequent replacement by the bony elements. Embryonic cartilage development has been shown to be under the regulation of a number of factors. Recently, C type natriuretic peptide (CNP) and its receptor natriuretic peptide receptor-B (NPR-B) stimulated signaling pathway has been implicated in the regulation of limb chondrogenesis. A condition known as acromesomelic dysplasia, type Maroteaux (AMDM; OMIM no. 602875) is an autosomal recessive skeletal dysplasia caused by loss-of-function mutations in the *NPR-B* gene. This finding clearly implicates a role for the natriuretic peptide signaling in the regulation of endochondral ossification. However, *in vivo* and *in vitro* model systems are necessary to further investigate the specific mechanism(s) of action of this signaling pathway in endochondral ossification.

The objective of this study was to further dissect out the implication of the CNP-3/NPR-B signaling in the process of chick limb mesenchymal chondrogenesis, and to identify the specific phase(s) of this process that CNP-3/NPR-B signaling is putatively involved in. Thus, the correlation of the expression patterns of CNP-3 and NPR-B with those of known markers of mesenchymal condensation (N-cadherin), chondrogenic differentiation (collagen type II), and maturation and hypertrophy (collagen type X) has been analyzed on the basis of RT-PCR at mRNA level in chick limb mesenchymal micromass cultures. In addition, the chondrogenic response to CNP treatment in these cultures was analyzed on the

basis of alterations at the mRNA level of above-mentioned molecules involved in specific phases of this process.

Results revealed CNP-3 and NPR-B expression in the chick limb bud making stage-specific peak levels first at Hamburger-Hamilton stage 23-24, and second at stage 30-31, corresponding to pre-chondrogenic mesenchymal condensation and initiation of chondrogenic maturation-hypertrophy *in vivo*, respectively. CNP-3 and NPR-B expression *in vitro* increased parallel to collagen type X expression, but not to that of collagen type II. Treatment of cultures with CNP significantly increased N-cadherin, and collagen type X expression, glycosaminoglycan synthesis and chondrogenesis. Collagen type II expression was not significantly affected.

Thus, results implicated CNP-3/NPR-B signaling in pre-chondrogenic mesenchymal condensation, glycosaminoglycan synthesis and late differentiation of chondrocytes in the process of endochondral ossification.

**Key words:** CNP, CNP-3, NPR-B, Endochondral ossification, chondrogenesis.

**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

Özet .....	i
Abstract.....	ii
İçindekiler.....	iii
Şekiller Dizini.....	iv
Tablolar Dizini.....	v
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. İntramembranöz kemik gelişimi.....	1
1.2. Endokondral kemik gelişimi.....	1
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....</b>	<b>2</b>
2.1. Endokondral Kemik Gelişiminin Aşamaları.....	2
2.2. Endokondral Kemik Gelişimini Etkileyen Başlıca Faktörler.....	4
2.3. Model Sistemlerde Endokondral Kemik Gelişimi ve Kondrogeniz Fazlarının	6
Başlıca Belirleyicileri.....	
2.4. Kondrogeniz ve Natriüretik Peptid Sinyal Yolları.....	9
2.5. Genel Olarak Natriüretik Peptidler ve Reseptörleri.....	10
2.5.1. Natriüretik Peptid Ailesi.....	10
2.5.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri.....	13
2.5.3. Natriüretik Peptid Reseptör A .....	16
2.5.4. Natriüretik Peptid Reseptör C ( Natriüretik Peptid Clearance Reseptör )	16
2.5.5. Natriüretik Peptid Reseptör B.....	16
2.6. Hipotez ve Çalışmanın Amacı.....	18
<b>3. MATERYAL YÖNTEM.....</b>	<b>19</b>
3.1. Tavuk Embriyoları.....	19
3.2. Tavuk Embriyosu Ekstremitte Mezenşimal Hücrelerinin Mikro-Kütle Kültürü...	19
3.3. Kondrojenik Değişimin Alcian Mavisi Boyaması ile Analizi.....	21
3.4. Kullanılan Antikorlar.....	22
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama .....	22
3.6. RNA İzolasyonu ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu	23

(RT-PCR ) Analizi.....	
3.7. İstatistiksel Analizler.....	24
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>26</b>
4.1. CNP-3 ve NPR-B'nin tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğunda,in vitro koşullarda zamana bağlı ekspresyon profilleri.....	26
4.2. Mikro-Kütle Kültürlerde Kondrojeniz Sürecinde Meydana Gelen Değişikliklerin Sıra ve Zamanlamalarının Belirlenmesi.....	26
4.3. CNP-3 ve NPR-B'nin Mikro-Kütle Kültürlerde İnvitro Kondrojeniz Sürecindeki Zamana Bağlı Ekspresyon Profillerinin Analizi.....	30
4.4. CNP'nin İnvitro Koşullarda Kondrojeniz ve Kondrojenizin Dönemlerine Spesifik Belirleyici Molekülleri Üzerine Etkilerinin Analizi	30
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>34</b>
<b>6.KAYNAKLAR.....</b>	<b>39</b>
<b>EK.1</b>	<b>46</b>
<b>EK.2</b>	
<b>EK.3</b>	
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>47</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	.....	5
Şekil 2.	İnvitro Kondrojeniz.....	7
Şekil 3.	İnsan CNP Aminoasit Dizisi ile Tavuk CNP-3 Aminoasit Dizisi Benzerliği % 82'dir.....	8
Şekil 4.	Natriüretik Peptidler Birbirleri ile Yapısal Benzerlik Gösteren Ancak Genetik Olarak Farklı Hormonlardır.....	11
Şekil 5.	Natriüretik Peptidlerin Bilinen Üç Farklı Reseptörü Vardır.....	14
Şekil 6.	Natriüretik Peptidlerin Hücre İçi Fizyolojik Etkileri.....	15
Şekil 7.	Mikro-Kütle Hücre Kültürü ve Kondrojeniz.....	20
Şekil 8.	CNP-3 ve NPR-B'nin Tavuk Embriyosu Ekstremitte Tomurcuğunda İn vitro Koşullarda Zamana Bağlı Ekspresyon Profillerinin Analizi.....	27
Şekil 9.	Mikro-Kütle Kültürlerde Kondrojeniz Sürecinde Meydana Gelen Değişikliklerin Sıra ve Zamanlamalarının Belirlenmesi ve CNP-3 ve NPR-B'nin Mikro-Kütle Kültürlerde İn vitro Kondrojeniz Sürecindeki Zamana Bağlı Ekspresyon Profillerinin Analizi.....	29
Şekil 10.	CNP'nin İn vitro Koşullarda Kondrojeniz ve Kollojen TipX Protein Ekspresyonu Üzerine Etkisinin Analizi.....	31
Şekil 11.	CNP'nin İn vitro Koşullarda Kondrojenizin Dönemlerine Spesifik Belirleyici Molekülleri Üzerine Etkilerinin Analizi.....	33

**TABLÖLAR DİZİNİ**

Tablo 1.	Gen Ekspresyonlarının Analizinde Kullanılan RT-PCR Primerleri	25
----------	---	----

## 1.GİRİŞ

Vertebrallılarda iskelet sistemi mezoderm ve krista nöralis hücrelerinden orijin alır (Ahrens vd. 1977,Moore vd. 1993). Primitif kemik yapıların oluşumunda ilk aşama mezenşim hücrelerinin yoğunlaşması ile ortaya çıkan model yapılardır (Moore vd. 1993,Hickok vd. 1998, Hall vd. 2000). Bu aşamadan itibaren kafatası kemiklerinde olduğu gibi bazı kemikler bu mezenşim doku içerisinde intramembranöz yolla, diğerleri ise eksremitelerin uzun kemiklerinde olduğu gibi endokondral yolla gelişimlerini tamamlar. (Moore vd.1993).

### 1.1.İntramembranöz kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yoğunlaşarak membranöz bir tabaka oluşturmuş mezenşim doku hücrelerinden, vaskülarizasyonu takip eden dönemde doğrudan osteoblastik hücre değişimi yolu ile oluşur (Moore vd.1993). Bu doğrudan değişim mekanizması tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte, Kemik Morfogenetik Protein (BMP) grubu faktörlerin bu değişimde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (Gibert 2001). Osteoblastik değişime uğrayan hücreler osteoid doku veya prekemik adı verilen bir matriks salgılayarak, hücreler arası alanı doldururlar. İlerleyen dönemde prekemik dokunun kalsifikasyonu ve osteoblastlardan osteositlerin değişimi, gelişen kemik dokusunun organizasyonunu sağlar. Bu tip kemikleşmeye en güzel örnek yassı kafatası kemiklerinin gelişimleridir.

### 1.2.Endokondral kemik gelişimi

Bu tip kemik gelişimi, yoğunlaşmış mezenşim hücrelerinin oluşturduğu primitif kemik modellerinin önce kıkırdak dokuya değişimleri, ardından da bu kıkırdak dokunun yerini kemik dokuya bırakması yolu ile oluşur (Moore vd.1993,Hickok vd.1998,Hall vd.2000). Dolayısı ile kondrogenез bu mekanizmanın önemli bir morfojenetik parçasıdır. Geçmiş moleküler ve hücre düzeyindeki çalışmalar, endokondral kemik gelişiminde kondrogenез ve osteogenezin çok erken embriyonik dönemde planlandığını ve bu iki mekanizmanın birbirini takip eden fakat birbirinden bağımsız iki ayrı gelişim mekanizması olduklarını ortaya koymuştur (Hickok vd..1998,Delise vd. 2000). Gerek kondrogenез süresince, gerekse takip eden osteogenezin mekanizmaları esnasında meydana gelebilecek genetik

ve/veya moleküler aksaklıklar ileri dönemde karşımıza birbirlerinden ayırt edilmeleri morfolojik yönden çok zor olan, ortak bir kemik ve/veya ekstremitte defekti fenotipi ile çıkacaklardır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Endokondral Kemik Gelişiminin Aşamaları

Endokondral kemik gelişimi değerlendirildiğinde aşağıda sıralanan aşamalardan geçmektedir. (Şekil-1):

1. Lateral plak mezoderminden orijin alan mezenşim hücrelerinin, primitif ekstremitte tomurcuğu bölgelerine migrasyonları ve mitoz yolu ile proliferasyonları.
2. Prolifere olan bu mezenşim hücrelerinin ekstremitte tomurcuklarının merkez bölgelerinde, hücreler arası teması arttırarak birbirlerine yaklaşmaları ve hücre kümeleri oluşturmak sureti ile yoğunlaşmaları. Yapılan çalışmalar bu aşamada rol oynayan en önemli faktörlerin, hücre bağlantı molekülleri ailesine ait olan N-cadherin ve N-CAM (N-Cell Adhesion Molecule)'in prekondrojenik hücrelerdeki ekspresyonlarında görülen belirgin artış olduğunu ortaya koymuştur (Oberlender vd. 1994, Tavella vd.1994). Bu dönemde ekstra sellüler matriks (ECM) mezenşim hücrelerinin birbirleri ile yakın temaslarına izin veren bir yapıda olup kollajen Tip-I, hiyaluronan, tenaskin, fibronektin gibi faktörlerden zengindir (Hall vd. 1995, Hickok vd. 1998, Hall vd. 20005). Ayrıca, prekondrojenik mezenşimal hücrelerde spesifik olarak eksprese edilen ve bir transkripsiyon faktörü olan scleraxis'in kıkırdağa özel genlerin transkripsiyonlarını tetiklediği gösterilmiştir (Cserjesi 1995). Bu protein kıkırdak doku yerini kemik dokuya bırakıncaya kadar aktif kalır. Yine önemli bir transkripsiyon faktörü olan Sox9 geninin de spesifik olarak prekondrojenik yoğunlaşma bölgelerinde eksprese edildiği ve bir sonraki aşama olan mezenşimal-kondrojenik değişimi tetiklediği bilinmektedir (Wright vd.1995). İnsanlarda Sox9 geninde görülen mutasyonlar "Campomelik Dysplasia" adı verilen ve uzun kemiklerin deformite ve açılanması ile karakterize bir klinik tablonun ortaya çıkmasına yol açmaktadır (Delise vd. 2000).



3. Yoğunlaşmış mezenşim hücrelerinin birbirleri ile olan hücreler arası bağlantıları kaybederek kondrositlere değişimleri. Bu dönemde kondrositlerdeki N-cadherin ve N-CAM ekspresyonlarında belirgin bir azalma gözlenir (Oberlender vd. 1994, Oberlender vd. 1994, Tufan vd. 2001). Ayrıca kondrositlerden kıkırdak dokuya özgü bir ECM depozisyonu başlar. Bu ECM'in en önemli bileşenleri olarak Kollajen Tip-I yerini Kollajen Tip-II, -IX, ve -XI'e bırakırken ilave olarak Gla proteini, kondroitin sülfattan zengin proteoglikanlar, aggregan proteini, ve link (bağlantı) proteini salgılanmaya başlar. (Hickok vd. 1998, Hall vd. 1995, Hall vd. 2000).

4. Kondrositlerin matürasyonları ve hipertrofiye uğramaları. Bu dönemde tipik olarak ECM'deki Kollajen Tip-II, -IX, ve -XI yoğunluklarını Kollajen Tip X'a bırakırlar ve ECM daha fazla fibronektin ve daha az proteaz inhibitörü içerir (Hickok vd. 1998, Hall vd. 1995, Hall vd. 2000). Kondrosit matürasyonu ve hipertrofisi, kıkırdak dokuda uygun kalsifikasyon ve ilerleyen dönemde kemik doku ile yer değişim açısından çok önemlidir. Bu mekanizma embriyonik kemik gelişimi sırasında çalıştığı gibi, postnatal dönemde ekstremite kemiklerinde boyuna uzama ve kişinin postürünün gelişimi boyunca ve kırık kemiklerin iyileşmesi sürecinde de büyük önem taşır. Uzun kemiklerde primer ossifikasyon merkezleri diyafiz denilen bölgelerde yer alırlar (Şekil-1). Bu bölgelerdeki kıkırdak hücreleri hipertrofiye uğrarlarken Kollajen Tip-X bakımından zenginleşen ECM kalsifiye olmaya başlar. Bunu öncelikli olarak diyafizial bölgede vasküler dokunun perikondriumdan kıkırdak dokusuna infiltrasyonu ve osteoprogenitör hücrelerin kıkırdak dokuya taşınması izler. Bu yolla aynı zamanda ileride kemik iliğini oluşturacak hücreler de kıkırdak dokuya taşınmaya başlanır. Eş zamanlı olarak hipertrofiye kondrositlerde planlanmış hücre ölümü (apoptoz) gözlemlenirken, osteoprogenitör hücreler de osteoblastik hücrelere değişim göstermeye başlarlar. Ortaya çıkan apoptotik hücre yapıları kemik matriksinin mineralizasyonunda önemli rol oynarlar. Bu yolla primer ossifikasyon merkezlerinden başlayan kemikleşme uzun kemiklerin her iki ucunda yer alan epifiz bölgelerine doğru ilerleyerek devam eder.

## 2.2 Endokondral Kemik Gelişimini Etkileyen Başlıca Faktörler

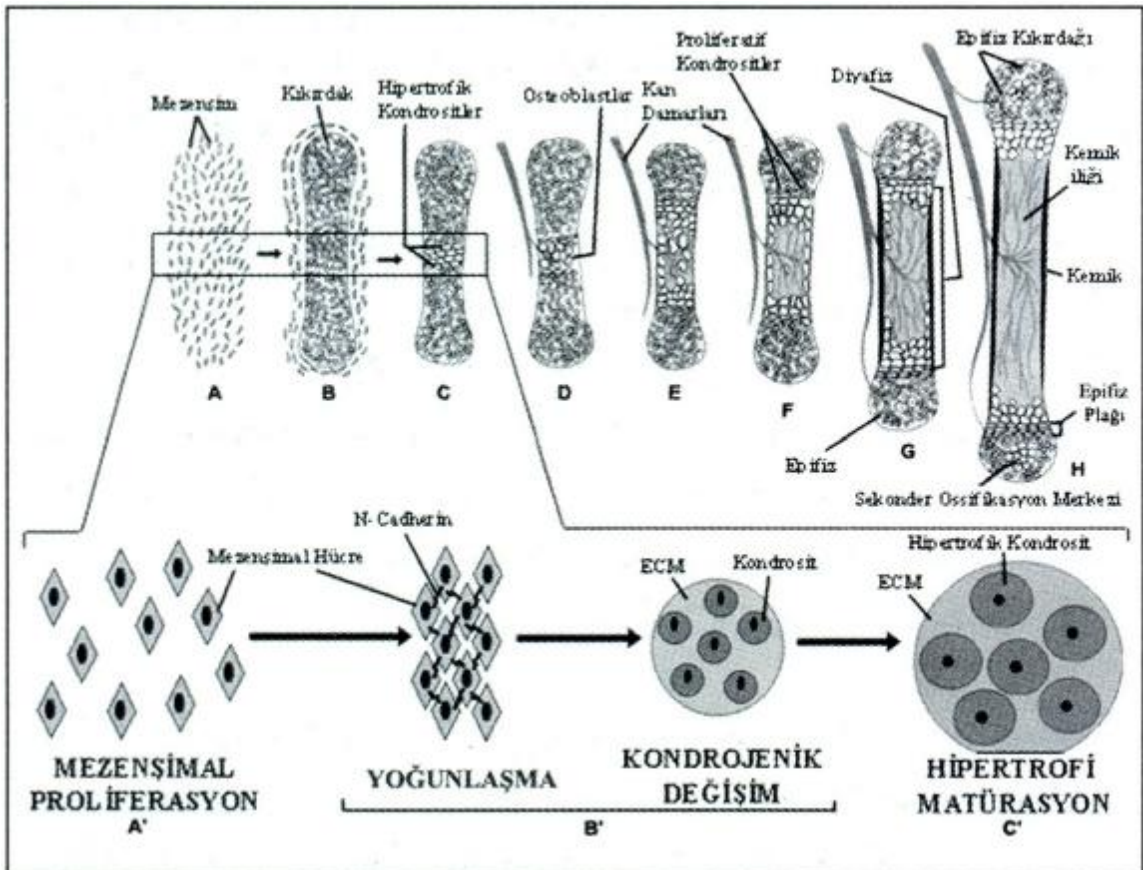
Yukarıda da özetle bahsedildiği gibi, kıkırdak dokuda proliferasyon ve hipertrofi mekanizmaları bir denge içinde çalışmak zorundadır. Bu dengenin sağlanmasında pek çok büyüme faktörü, hormon, sitokin ve hücre sinyal mekanizması rol almaktadır. Bunlar arasında “fibroblast büyüme faktör” (FGF)’ler (Deng vd. 1996, Webster vd. 1996), östrojen, tiroid hormonu ve triiyodotironin (T3) gibi hormonlar (Kaplan vd. 1990, Ballock vd. 1994), “transforming growth faktor- $\beta$ 1” (TGF- $\beta$ 1) (Rosier vd. 1989, O’Keefe vd. 1994), sinyal molekülleri “Indian Hedgehog” (Ihh) (Goodrich vd. 1996) ve “paratiroid hormon-related peptide” (PTHrP) (Iida-Klein vd. 1989, Abou-Samra vd. 1992), anti-apoptotik faktörlerden Bcl-2 (Vaux vd. 1988, Lee vd. 1995), ayrıca “Tumor Necrosis Factor” (TNF) (Wallen-Ohman vd. 1993) ve p53-tümör baskılayıcı genler grubundan p63 (Yang vd. 1999) başlıcalarıdır.

Epifiz plağı bölgesinde (Şekil-1) FGF’lerin etkisi ile kıkırdak hücrelerinin proliferasyonlarında azalma ve değişime uğrayarak matüre ve hipertrofiye olma hızlarında artış görüldüğü tespit edilmiştir (Gilbert 2001). İnsanlarda FGF reseptörlerinde (FGFR) görülen mutasyonların yol açtığı en ciddi klinik tabloyu “dwarfizm ” olguları oluşturur. Örneğin, FGFR3’ün transmembran bölgesine özel olan ve glycin’in arginin’e dönüşümünü sağlayan, 380 numaralı amino asit’te meydana gelen mutasyon “Achondroplasia” olgularının % 95’lik bir çoğunluğuna yol açar (Deng vd. 1996, Webster vd. 1996, Gilbert 2001). Diğer taraftan, FGFR1’de görülen mutasyonların ekstremitelerde defektleri ve kranial sütürlerin erken kapanması (Craniosynostosis) ile karakterize “Pfeiffer” sendromuna yol açtığı gösterilmiştir (Gilbert 2001).

Diğer bir önemli faktör östrojen hormonudur. Başta östrojen olmak üzere seks hormonları da proliferasyon yapan kondrositlerin matüre ve hipertrofiye olmalarını hızlandırır (Kaplan vd. 1990). Yapılan çalışmalar T3 hormonunun da gelişen kemiklerin epifiz plaklarında hipertrofiye kondrositlerin kolumnar organizasyonlarında önemli rol oynadığını göstermiştir (Ballock vd. 1994). Ayrıca, T3 hormon eksikliği görülen hipotiroidizm olgularında, kemiklerin epifiz plağı bölgelerinde mekanik dış etkilere karşı dayanıksızlık

geliştiği gözlemlenmiştir (Loder vd. 1995). Diğer taraftan TGF- $\beta$ 1'in ise kondrosit proliferasyonunu indükleyici olduğu saptanmıştır (Rosier vd. 1989, O'Keefe vd. 1994). Dolayısı ile bu iki faktörün denge içinde çalışan mekanizmalardan biri olduğu olasılığı son dönemde taraftar toplayan bir hipotezdir.

Diğer bir denge mekanizması Ihh ve PTHrP arasındaki negatif geri besleme yolu ile ortaya konmuştur (Vortkamp vd. 1996). Post- mitotik ve pre-hipertrofik kondrositler özel olarak Ihh salgılayan hücrelerdir. Ihh ise proliferatif bölgeden hipertrofik bölgeye geçiş gösteren kondrosit sayısını kontrol eden PTHrP salgılanmasını uyarır. Mekanizma doyuma ulaştığında PTHrP'in Ihh salgılanması üzerindeki inhibe edici negatif geri besleme etkisi, ilave kondrositlerin hipertrofik bölgeye girişlerini ve takip eden apoptozlarını önleyecektir. Diğer sayılan TNF, Bcl-2 ve p63 moleküllerinin de apoptotik yolda önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (Vaux vd. 1988, Yang vd. 1999).



Şekil-1: Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. (A-H) Uzun kemiklerde endokondral kemikleşme. (A'-C') Endokondral kemikleşme sürecinde önemli yeri olan kondrogeniz mekanizmalarının şematik gösterimi.

Özetle, yukarıda bahsi geçen mekanizmalar yolu ile ekstremitelerin kemiklerinde epifiz plağı adı verilen ve proliferen olan kondrositleri, matüre kondrositleri ve hipertrofiye kondrositleri içeren, diyafiz-epifiz birleşim noktalarında uzunlamasına gelişim sağlanır. Perikondrium ossifiye olarak yerini periosta bırakır. Kondrositler diyafize doğru hipertrofiye olarak ilerler ve matriks kalsifikasyonu ve mineralizasyonu, bu hücrelerin yerlerini kemik dokuya bırakmaları ile sonlanır. Epifiz plakları da ossifiye olduklarında kemiklerde boy uzaması durur. Ekstremiten uzun kemiklerinin yanı sıra aksiyal ve pelvik kemikler de endokondral kemikleşme yolu ile gelişen iskelet yapılarıdır.

### 2.3 Model Sistemlerde Endokondral Kemik Gelişimi ve Kondrogeniz Fazlarının Başlıca Belirleyicileri

Genel olarak özetlemiş olduğumuz bu endokondral kemikleşme mekanizması, canlı fare, sıçan ve tavuk embriyo sistemlerinde yapılmış pek çok çalışmanın yanı sıra, yine bu embriyolardan uygun gestasyonel dönemlerde diseksiyon ve izolasyon yolu ile elde edilmiş primer ekstremiten mezenşim hücre kültür modellerinde de detaylı olarak moleküler düzeyde incelenmiştir (San Antonio vd.1986, Hall vd. 1995, Hickok vd. 1998, Mello vd.1999, Hall vd. 2000). Bu in vitro model sistemlerin en sık kullanılanlarından birisi de mikro-kütle hücre kültür sistemi (micromass culture system) olarak bilinmekte olup, bu çalışmada da kullanılmış olduğumuz in vitro kondrogeniz hücre kültür modelidir. Bu in vitro çalışmalarda, sıralamış olduğumuz:

- 1- Mezenşimal proliferasyon,
- 2- Mezenşimal yoğunlaşma,
- 3- Kondrojenik değişim,
- 4- Kondrosit matürasyon ve hipertrofisi,
- 5- Programlanmış hücre ölümü (apoptoz), basamaklar zinciri mekanizmalarını

çeşitli moleküler belirleyiciler ile birbirlerinden ayırt etmek ve incelemek mümkündür (Şekil-2). Bu moleküler belirleyiciler kısaca şu şekilde özetlenebilir:

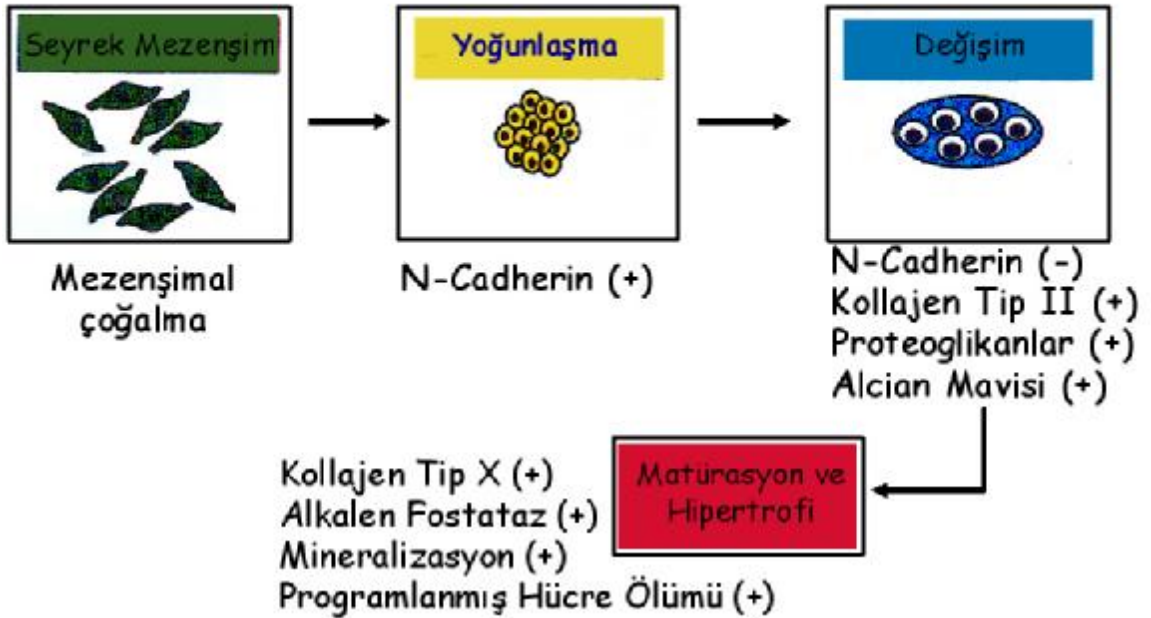
**Peanut Agglutinin (PNA):** Proliferasyon ve yoğunlaşma aşamalarındaki, kondrosite dönüşümleri genetik olarak kesinleşmiş fakat henüz kondrojenik değişime uğramamış mezenşim hücreleri, özel olarak lektin grubu maddelerden olan PNA ile histokimyasal olarak boyanırlar (Hickok vd. 1998, Delise vd. 2000). Kondrositlere değişim geçiren hücreler ise PNA negatiftirler.

**N-cadherin ve N-CAM:** Yoğunlaşma aşamasındaki, kondrosite dönüşümleri genetik olarak kesinleşmiş fakat henüz kondrojenik değişime uğramamış mezenşim hücrelerinde özel olarak N-cadherin ve N-CAM ekspresyonlarında artış gözlenir (Oberlender vd. 1994, Tavella vd. 1994). Takip eden kondrojenik değişim aşamasında ise bu moleküllerin ekspresyonları belirgin olarak azalır (Oberlender vd. 1994, Oberlender vd. 1994, Tufan vd. 2001). Dolayısı ile gerek mRNA düzeyinde, gerekse protein düzeyinde bu moleküllerdeki artışın tesbiti yoğunlaşma fazının diğer fazlardan ayırımına imkan sağlar.

**Kollajen Tip II:** mRNA veya protein düzeyindeki tesbiti prematüre kıkırdak dokusunda kondrojenik değişimin gerçekleşmiş olduğunu gösterir (Tufan vd. 2001). Gerek proliferasyon gerekse yoğunlaşma dönemlerindeki değişim geçirmemiş mezenşim hücreleri ise kollajen tip II negatiftirler.

Şekil-2:

## İN VİTRO KONDROGENEZ (MİKRO-KÜTLE HÜCRE KÜLTÜRÜ VE KONDROGENEZ)



Alcian Mavisi Boyaması: Alcian mavisi boyası özel olarak kondrojenik değişime uğramış hücrelerin ECM içerisine salgılamakta oldukları proteoglikanları mavi renge boyar (Lev vd. 1964). Proliferasyon ve yoğunlaşma fazlarında ise prekondrojenik doku bu boyayı tutmaz.

Kollajen Tip X: Sadece hipertrofiye uğramış olan kondrositler tarafından ECM'e salgılandığı için mRNA veya protein düzeyindeki tesbiti matürasyon ve hipertrofi fazına özeldir (Hickok vd. 1998, Mello vd. 1999, Delise vd. 2000).

Endokondral kemik gelişiminde rol oynayan kontrol mekanizmalarının gerek in vivo gerekse in vitro model sistemler kullanılarak hangi aşamada fonksiyon gösterdiklerinin tesbitinde, yukarıda saydığımız moleküler belirleyicilerdeki kantitatif değişiklikler temel kriterler olarak alınmalıdır.

Bu bilgilerin dışında bu çalışma için tavuk embriyosu mikro-kütle kültür sisteminin model olarak seçilmiş olmasının bazı ek nedenleri de vardır. Bunlar, tavuk embriyosu ekstremitelerindeki anatomik yapılanmanın uzun kemikler bazında insan ile birebir örtüşmesinin yanı sıra, bu sistemin ucuz, embriyo açısından inkübasyon süresi kısa, kolay manipüle edilebilir, kültür ortamlarına geçirilebilir, materyale ulaşımı kolay, kolay

tekrarlanabilir, ve genellikle yüksek teknolojide ekipman gerektirmeyen bir model sistem oluşudur. Tüm bu avantajlarının yanında, bu çalışmada araştırılması planlanmış olan CNP'nin insandaki amino asit dizilimi ile tavukdaki homoloğu olan CNP-3'ün amino asit dizilimleri arasındaki uyum % 82'dir (Şekil-3). Bu da tavuk embriyosunu bu araştırma açısından cazip kılmaktadır.

HumanCNP	102	NKKGISRGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	126
RatCNP	102	NKKGISRGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	126
MouseCNP	102	NKKGISRGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	126
RanaCNP-II	94	NKKGISRGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	118
GallusCNP-3	106	SKKGLSISGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	136
PufferfishCNP-3	134	YKKGITISGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	158
RanaCNP-I	105	NKKGISRGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	129
HumanBNF	104	PKAVQGGSGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	134
GallusBNF	107	PKMMRDSGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	140
XenopusBNF	107	PKMMRDSGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	137
RanaANF	117	RSMRFSISGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	145
HumanANF	116	PKSLFRSSGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	151
PufferfishCNP-4	96	KGGSSISGCFGLKLDRIQSM SGLGC	-----	120

Şekil-3: İnsan CNP amino asit (aa) dizisi ile Tavuk CNP-3 aa dizisi benzerliği %82'dir. (Houweling et al., 2005).

#### 2.4. Kondrojeniz ve Natriüretik Peptit Sinyal Yolları

Yukarıda detaylı olarak oluşum sırası verilen embriyonik kıkırdak gelişimi ve takip eden endokondral kemikleşme basamaklar zinciri, pek çok genetik ve moleküler faktörün kontrolü altındadır. Bunlar arasında growth faktörler grubundan olan TGF- $\beta$  ve FGF grubu proteinler, bu growth faktörlerin etki mekanizmalarında rol alan catenin, small mothers against decapentaplegic (SMAD) ve mitogen activated protein kinase (MAPK) grubu proteinler, Hox, Sox, Engrailed (En) ve "Lef-1" gibi transkripsiyon faktörleri ve Wnt grubu sinyal molekülleri başta gelen kontrol mekanizmalarını oluştururlar. Kıkırdak dokunun ileride kemik dokuya yerini bırakacağı uygun form ve yapısını sağlayan, tüm bu moleküllerin bir uyum içerisinde çalışarak yönlendirdikleri özel hücreler arası ilişkiler, hücre-matriks ilişkileri ve özel gen ekspresyonlarıdır.

Son dönemde tanımlanmış ve endokondral kemik gelişimi sürecinde etkili olduğu düşünülen önemli bir diğer kontrol mekanizması da C tipi natriüretik peptit (CNP) ve reseptörü, natriüretik peptit reseptör-B (NPR-B)'yi kapsamaktadır. Önemli bir cücelik

grubu olan akromezomelik displazi, NPR-B proteininin fonksiyon kaybına yol açan mutasyonları sonucu ortaya çıkar. NPR-B ile ilgili bu bilgi oldukça yeni olup (Bartels vd. 2004), bulunuşu akromezomelik displazi'nin bir alt grubu olan akromezomelik displazi maroteaux tip'li (AMDM, OMIM no. 602875) hastaların kendilerinden ve sağlıklı aile bireylerinden elde edilen DNA örneklerinin bağlantı analizi (linkage analizi) ve bu analiz sonrası elde edilen bilgiler doğrultusunda insan 9. kromozomu üzerindeki ilgili lokus (9p13-q12) bölgesinde yer alan aday genlerin sekanslarının taranması sonucunda elde edilmiştir (Kant vd., 1998, Ianakiev vd., 2000, Bartels vd. 2004).

AMDM (Maroteaux vd. 1971) otozomal çekinik geçiş gösteren bir dwarfizm türü olup, genellikle doğum boy ve ağırlıkları normal sınırlarda olan kişilerin doğumu takip eden 1. yıl sonunda yaşitlarına göre kısa kalma eğilimi gösterdiği ve 2. yıl sonunda ise tipik radyolojik bulguları ile kesin tanı koyulabilecek hale geldiği, uzun kemiklerde ve vertebralarda şekil bozuklukları, özellikle ekstremitelerde orta ve distal uzun ve tubüler kemiklerinde kısalık ve epifiz büyüme plaklarında abnormaliteler ile karakterize bir patolojik durumdur (Kant vd. 1998; Haliloğlu vd. 1999; Ianakiev vd. 2000, Bartels vd. 2004). İlginçtir ki AMDM tanısı konmuş kişilerde bugüne kadar tutulum görülmüş olan tek sistem iskelet sistemidir.

## 2.5. Genel Olarak Natriüretik Peptitler ve Reseptörleri

### 2.5.1. Natriüretik Peptid Ailesi

Natriüretik peptitler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır. Bir kısmı parakrin faktörler olarak da bilinen bu peptitler: kan hacmi, kan basıncı, ventrikül duvar kalınlığı, pulmoner tansiyon, yağ metabolizması, ve uzun kemiklerde büyüme üzerine etkilidirler (Potter vd. 2006).

Bilinen 3 klasik tipi vardır (Şekil-4):

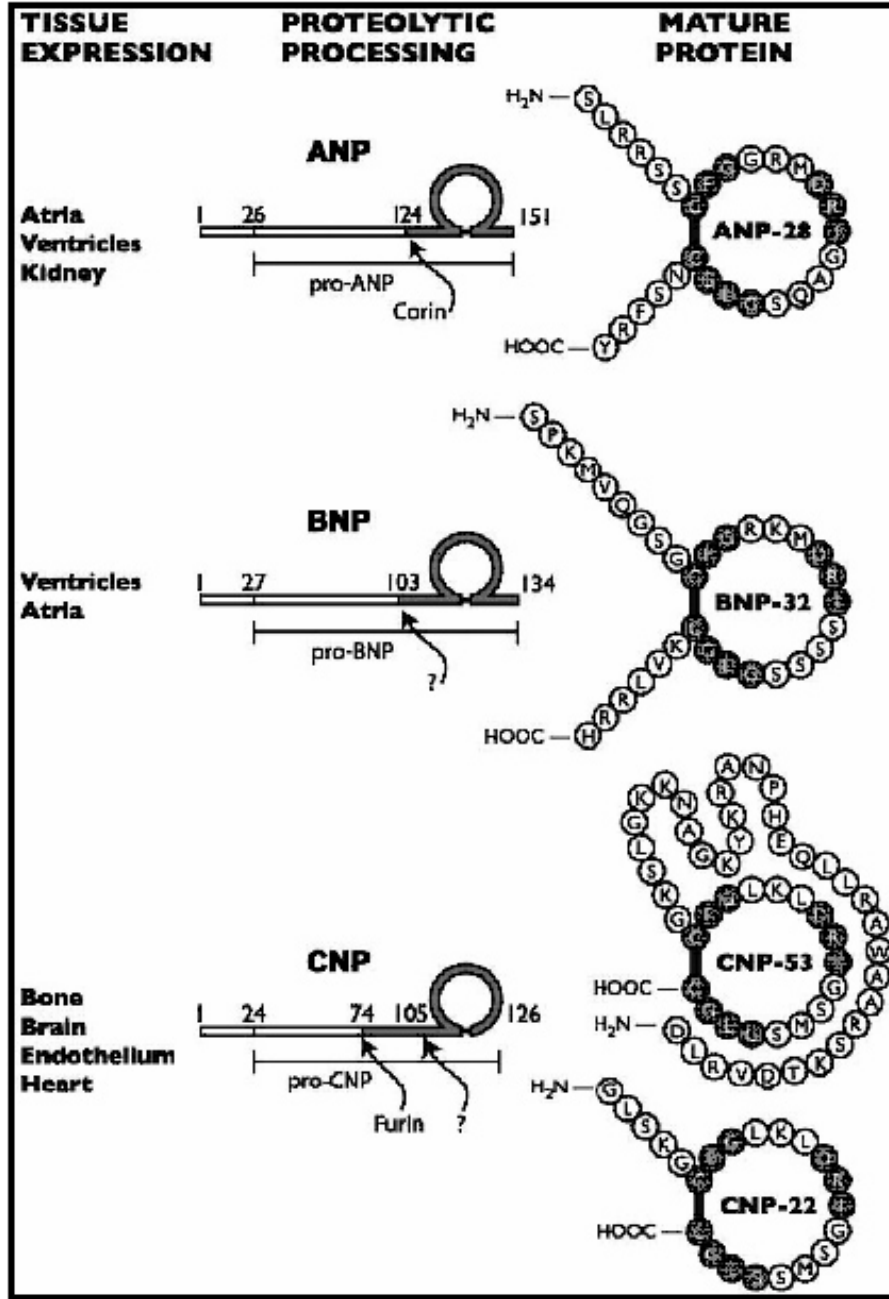
1- Atrial natriüretik peptid (ANP),



2- B-tipi natriüretik peptid (BNP),

3- C-tipi natriüretik peptid (CNP).

Fizyolojik araştırmalar insanda kalp ve böbrek arasındaki bağlantıyı uzun zaman önce ortaya koymuştur. İlk olarak De Bold ve arkadaşları (2005) tarafından sıçanlarda atriumlara intra venöz olarak enjekte edilen bir homojenatin renal sodyum ve su boşaltımını arttırarak, kan basıncını hızla düşürdüğü gösterilmiştir. Bu gelişme sonrasında atrial dokudan, hem natriüretik etkisi hem düz kas gevşetme aktivitesi olan bir peptidler pürifiye edilmiş ve değişik çalışmalarda bu peptid atrial natriüretik faktör, kardionatrin, kardiodilatin, atriopeptin, ve atrial natriüretik peptid (ANP) olarak isimlendirilmiştir (De Bold 2005). Bu son tanımlama bugün en sık kullanılmaktadır. İlerleyen yıllarda natriüretik peptid ailesinin diğer üyeleri olan beyin natriüretik peptid (BNP; B tip natriüretik peptid) ve C tipi natriüretik peptid (CNP) de sırası ile domuz beyin ekstratlarından ve onların gevşetebildiği düz kaslardan pürifiye edilmişlerdir (Olney 2006).



Şekil-4: Natriüretik peptidler birbirleri ile yapısal benzerlik gösteren ancak genetik olarak farklı hormonlardır. Bilinen 3 tipi vardır: 1) Atriyal natriüretik peptid (ANP), 2) B-tipi natriüretik peptid (BNP), 3) C-tipi natriüretik peptid (CNP). (Potter et al., 2006).

Bütün natriüretik peptidler prehormon olarak sentezlenir (Şekil-4). İnsan preproANP'si 151 aminoasit uzunluğundadır. Aminoterminal bölümü ayrılması sonucu oluşan 126

aminoasitli proANP atrial granüllerde depolanan predominant formdur. ANP primer olarak atrial granüllerde depolanır ve eksprese edilir, fakat düşük konsantrasyonda ventrikül ve böbrek gibi dokularda da bulunur. ANP salınımı için birincil uyarıcı intravasküler volüm artması sonucu atrium duvarının gerilmesidir. Sekrete edilen ANP önce koroner sinüse perfüze olur, gerçek endokrin davranışla çeşitli hedef organlara ulaşır. Ayrıca endotelin, angiotensin, arginin-vazopressin, ANP salınımını uyaran faktörlerdir. İnsan ANP geni 1. kromozomun 1p36.2 lokusunda bulunur ve üç exon içerir.

B-tip natriüretik peptid esas olarak domuz beyin ekstratlarından pürifiye edilmiştir. Sonradan insanlarda veya hayvanlarda konjestif kalp yetersizliği veya miyokardial enfarktüs gibi kardiyak stres altında iken çok yüksek konsantrasyonda kalp ventriküllerinde bulunmuştur. BNP bir kardiyak hormondur ve normal yetişkin kalbinde ventriküllerden sekrete edilmektedir (Cameron VA, Ellmers I.J.). BNP 134 aminoasitli peprohormon olarak sentezlenir. Sonra bir parça ayrılır ve 108 aminoasitli prohormon haline gelir. Ardından, bilinmeyen bir proteazla kesilmesi sonucu 76 amino asitlik amino-terminal inaktif fragman ve 32 amino asitlik karboksil-terminal, biyolojik aktif peptid'e ayrılır.

BNP, atrial granüllerde ANP ile birlikte depolanır; ama ventriküler granüllerde depolanmaz. BNP yapımı aşırı volüm yüklenmesi sonucu kardiyak duvar gerilmesi ile regüle edilir. Nükleer transkripsiyon faktör, GATA4 bu olgunun düzenlenmesinde dominant rol oynar. Sağlıklı bireylerde plazma konsantrasyonu yaklaşık olarak 3.5 pg/ml veya ANP'nin onda biridir. Buna karşın, konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda plazma BNP konsantrasyonu 200-300 kat yükselir, böylece BNP plazma konsantrasyonu kardiyak stresin ideal indikatörüdür. Birçok çalışma BNP seviyesinin yükselmesi ile kötü prognozunu korele olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak gerek ANP gerekse BNP esas olarak natriüreti ve kan basıncını regüle eden kardiyak hormonlar olarak ayırt edilmişlerdir.

Diğer taraftan sunduğumuz çalışmamızın da önemli bir bölümünü oluşturan CNP pek çok farklı dokuda eksprese edilir. Bunlar arasında başlıcaları kıkırdak, kemik, beyin, endotel, düz kas ve kalp olarak sıralanabilir (Potter vd. 2006). Tipik olarak granüllerde depolanmaz. Endotel hücre kültürlerinde sekresyonu TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 ve stres tarafından uyarılır, insülin tarafından da suprese edilir.

İnsan proCNP'si 103 aminoasit içerir ve intracellüler endoproteaz furin'le in vitro işleme tabi tutularak olgun 53 aminoasitli peptide dönüştüğü gösterilmiştir. Bazı dokularda CNP-53 bugün için bilinmeyen bir enzim tarafından bölünerek aktif peptid olan CNP-22'ye dönüştürülür. CNP-53 beyin, endotel hücresi ve kalpte majör form iken; CNP-22 insan plazması ve cerebral-spinal sıvıda predominanttır.

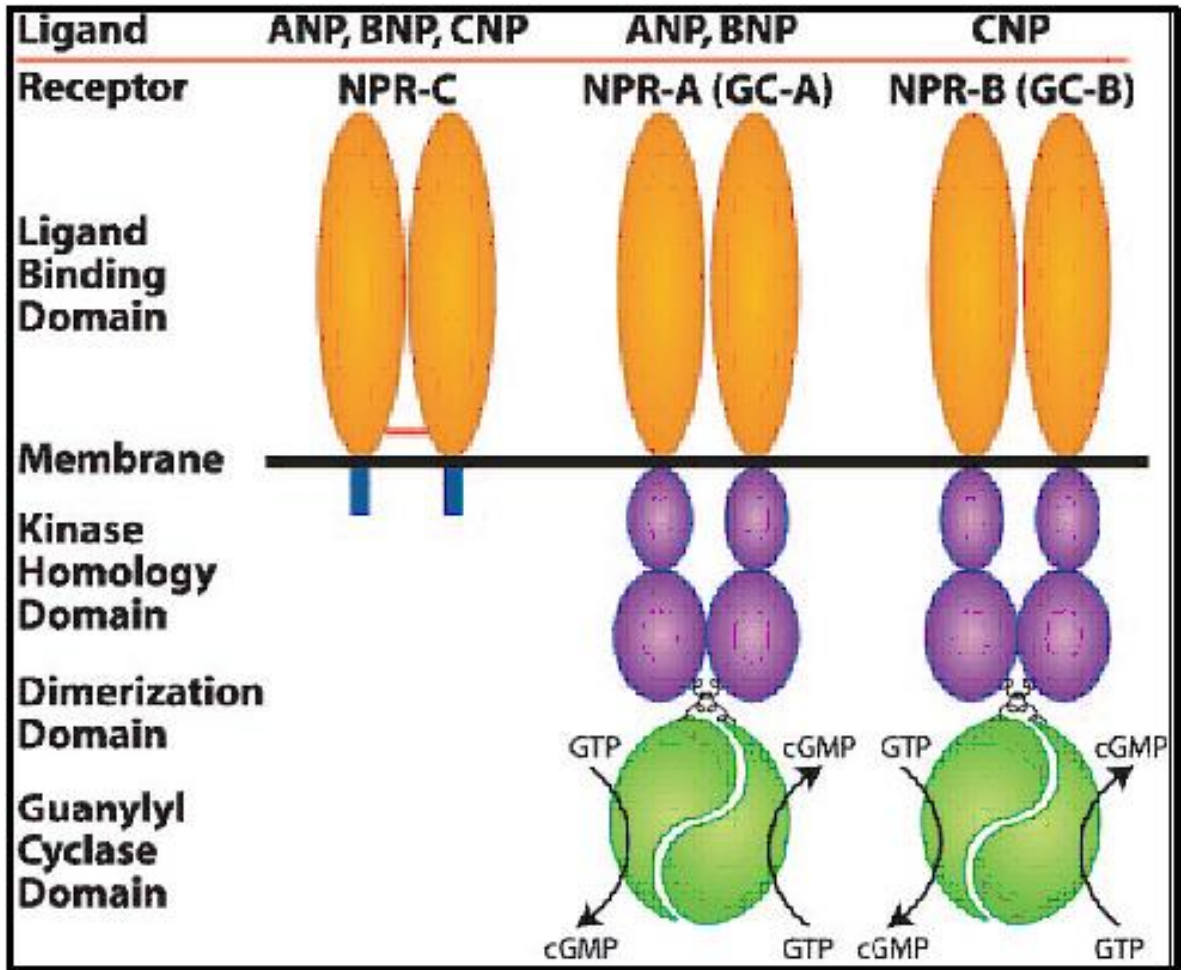
Fare ve insanda natriüretik peptid genlerinin mutasyonlar ile inaktivasyonu sonucu görülen başlıca fenotipler şunlardır (Olney vd. 2006 ):

- 1- ANP mutasyonlarında hipertansiyon ve kardiyak hipertrofi,
- 2- BNP mutasyonlarında ventriküler fibrozis,
- 3- CNP mutasyonlarında ise dwarfizm görülmektedir.

Son dönemde natriüretik peptidlere benzerliği ile dikkat çeken iki farklı sinyal peptidi daha tanımlanmıştır. Bunlardan ilki ilk olarak kemikte bulunmuş ve osteocrin olarak adlandırılmıştır (Olney vd. 2006 ). Diğer peptid ise ilk olarak kas dokusunda bulunmuş ve musclin olarak adlandırılmıştır (Olney vd. 2006). Ancak bu iki peptid ile ilgili çalışmalar oldukça yenidir.

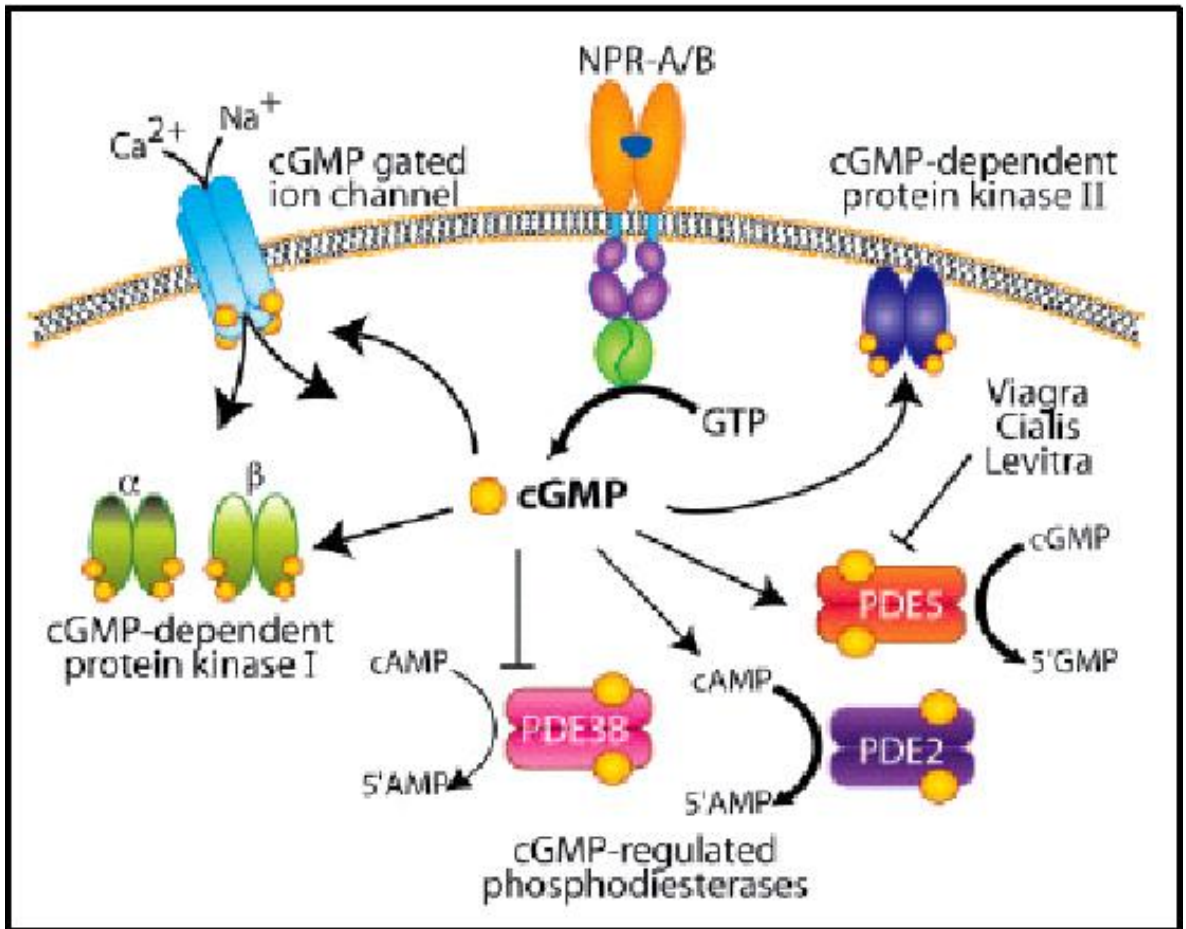
### 2.5.2. Natriüretik Peptid Reseptörleri

Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır (Şekil-5). İlk ikisi [Natriüretik Peptid Reseptör-A (NPR-A, GC-A, NPR1) ve NPR-B (GC-B, NPR2)] transmembran guanil siklazlar olarak işlev görür ve uyarıldıklarında cGMP sentezini katalizlerler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç NP'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir.



Şekil-5: Natriüretik peptidlerin bilinen üç farklı reseptörü vardır: İlk ikisi [Natriüretik Peptid Reseptör-A (NPR-A, GC-A, NPR1) ve NPR-B (GC-B, NPR2)] transmembran guanyl siklazlar olarak işlev görür ve uyarıldıklarında cGMP sentezini katalizlerler. Üçüncü reseptör (NPR-C, NPR3) ise hücre içi enzimatik aktiviteden yoksun olup, her üç NP'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir. (Potter vd. 2006).

Natriüretik Peptidlerin bu reseptörlere bağlanmaları ile hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP bağlayan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP-bağımlı protein kinazlar, cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar, ve cGMP bağımlı iyon kanallardır (Şekil-6).



Şekil-6: Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri. Natriüretik Peptidlerin hücre içi fizyolojik etkileri üç farklı cGMP bağlayan protein grubu tarafından yönlendirilir. Bunlar: cGMP-bağımlı protein kinazlar, cGMP ile yönlendirilen fosfodiesterazlar, ve cGMP bağımlı iyon kanallarıdır. (Potter vd. 2006).

### 2.5.3. Natriüretik peptid reseptör A

İnsan ve sıçanlarda, NPR-A mRNA'sı en fazla böbrek, adrenal bez, terminal ileum, yağ doku, aort ve akciğerde eksprese edilir. NPR-A'nın natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile: ANP $\geq$ BNP>CNP şeklindedir.

### 2.5.4. Natriüretik peptid reseptör C (Natriüretik peptid clearance reseptör)

NPR-C mRNA'sı başlıca atrium, mezenter, placenta, akciğer, böbrek, venöz doku, aort düz kası, aortik endotelial hücrelerde ve kıkırdak ve kemikte bulunur. Hücre içi guanil siklaz enzimatik aktivitesinden yoksun olup, her üç natriüretik peptid'in lokal konsantrasyonunu ayarlayan bir rol üstlenir. NPR-C'nin natriüretik peptidlere afinitesi, insan ve sıçanlarda sırası ile: ANP $\geq$ CNP>BNP şeklindedir.

### 2.5.5. Natriüretik peptid reseptör B

NPR-B'nin beyin, adrenal gland, uterus gibi birbirinden farklı pek çok dokuda varlığı gösterilmiştir (Tamura ve Garbers, 2003). Ancak mevcut literatür bilgileri bu proteinin ana görevinin iskelet sistemi gelişimi ile ilgili olduğunu düşündürmektedir (Bartels vd. 2004). AMDM'li hastalarda da iskelet sistemi bulgularına eşlik eden nörolojik defektler ve

bozukluklar veya anormal kan basıncı düzeyleri gibi problemlerin görülmemiş olması bu düşünceyi desteklemektedir.

NPR-B'nin natriüretik peptidlere afinitesi sırası ile:  $CNP \gg ANP \geq BNP$  şeklindedir. Daha önce de belirtildiği gibi NPR-B'nin iskelet sistemi gelişimi üzerine olan etkileri ve bu etkilerin mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, bu reseptörün ana ligandı olan C tipi natriüretik peptid'i (CNP) veya bu reseptörün ikincil habercilerinden birisi olarak görev gördüğü düşünülen cGMP-bağımlı protein kinaz II (cGKII) sinyal yolunu hedef alan geçmiş çalışmalar bize bu konuda ışık tutmaktadır.

Fare modelinde yapılmış çalışmalar CNP'den yoksun farelerde dwarfizm (Chusho vd. 2001), genomlarına CNP transferi yapılmış ve bu proteini normalden daha fazla üreten farelerde ise uzun kemiklerde boy uzaması gerçekleştiğini (Chusho vd. 2001, Yasoda vd. 2004) göstermiştir. Fare ve sıçan tibiaları kullanılarak yapılmış organ kültürlerinde ise CNP'nin kondrosit proliferasyonunu ve hipertrofisini arttırdığı gösterilmiştir (Yasoda vd. 1998; Mericq vd. 2000). Yine son dönemde yayınlanan bir çalışmada CNP'nin matris sentezini artırarak FGFR-3 mutasyonlu akondroplazik farelerde dwarfizmi engellediği gösterilmiştir (Yasoda vd. 2004). CNP, NPR familyasından NPR-B'nin yanı sıra NPR-A ve/veya NPR-C'ye de bağlanabilmekte ve bu reseptörlerden özellikle NPR-C'de epifiz büyüme plağında eksprese edilmektedir (Bartels vd. 2004).

Diğer taraftan Linkoln ve Cornwell (1993) NPR-B'nin CNP ile aktivasyonu sonrası cGMP ile etkileştiğini ve cGMP bağımlı protein kinazları aktive ettiğini göstermişlerdir. Bu bağlamda farklı amaçla hazırlanmış bir cGKII (insanlarda PRKG2 genine karşılık gelmektedir) defektli fare modelinde dwarfizm gözlenmiş olması da anlamlı bir bilgidir (Pfeifer vd. 1996). cGKII knock-out farelerde epifiz plağı terminal hipertrofi bölgesinde henüz değişimlerini tamamlayamamış kondrositlerin bir yığılım oluşturdıkları gösterilmiştir (Pfeifer vd. 1996). Ancak CNP knock-out farelerde aynı bulgunun bulunmayışı ise NPR-B'nin endokondral büyüme hem cGKII bağımlı hem de cGKII bağımsız sinyal yollarının tümünü kullanarak regüle ettiğini düşündürmektedir (Miyazawa vd. 2002).



Son olarak, NPR-B proteini fonksiyonel haployetersizliği (haploinsufficiency), ki bu durum AMDM gözlenen hastaların taşıyıcı anne ya da babalarında görölmektedir, normale göre dwarfizm düzeyinde olmayan boy kısalığı ile karakterizedir (Bartels vd. 2004).

Tüm bu bilgiler ışığında NPR-B'nin endokondral büyüme üzerine olan etkilerinin ve hücre dışı sinyallerin bu büyümenin hangi evresinde ve hangi mekanizmalar ile hücre içine taşınarak ne gibi değişikliklere yol açtığının belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu araştırmadan elde edilecek yeni bilgiler oldukça kompleks bir regölasyonu olan endokondral büyüme biyolojisinde yeni yaklaşımların yapılabilmesini sağlayacak niteliktedir.

## 2.6. Hipotez ve Çalışmanın Amacı

Literatürdeki CNP and NPR-B knock-out fare çalışmaları sonucu görölen dwarf fenotip (Olney 2006), CNP transgenik farelerde görölen aşırı büyüme ve trabeküler kemik kalınlaşması (Olney 2006) ve natriüretik peptid sinyal yollarındaki ligant-reseptör affiniteleri ve eşleşmeleri göz önüne alındığında (Olney 2006; Potter vd. 2006), CNP/NPR-B sinyal yolunun endokondral kemik gelişimi sürecinde kondrogenezde önemli rolü olduğu düşünölmektedir.

Bu hipotez doğrultusunda sunulan çalışmanın amacı; mutasyonları ve/veya yoklukları, uzun kemiklerde boy kısalığı ve buna bağlı dwarfizm ile sonuçlanan CNP/NPR-B sinyal yolunun endokondral kemikleşme sürecinde kondrogenez üzerine olan etkilerini ve etki mekanizmalarını belirlemektir. Yukarıda açıklanmış olan kriterler doğrultusunda bu sinyal yolunun kondrogenezin hangi aşama ve/veya aşamalarında rol oynadığının araştırılması

hedeflenmiştir. Bu amaçla, CNP-3 ve NPR-B'nin ekspresyon profilleri ile kondrojenizde fazlara spesifik ekspresyon gösteren N-cadherin (mezenşimal yoğunlaşma), kollajen tip II (kondrojenik değişim), ve kollajen tip X (hipertrofi ve matürasyon) ekspresyonları arasındaki olası korelasyonların, tavuk mikro-kütle kültür ortamlarında, mRNA düzeyinde RT-PCR yöntemi ile analizi hedeflenmiştir. Ayrıca, fonksiyonel analizler açısından ilgili mikro-kütle kültürlerinin CNP ile muamelesinin bahsi geçen belirleyici nitelikteki bu molekülleri ekspresyon düzeylerindeki yol açacağı olası değişikliklerin de yine mRNA düzeyinde RT-PCR yöntemi ile analizi planlanmıştır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

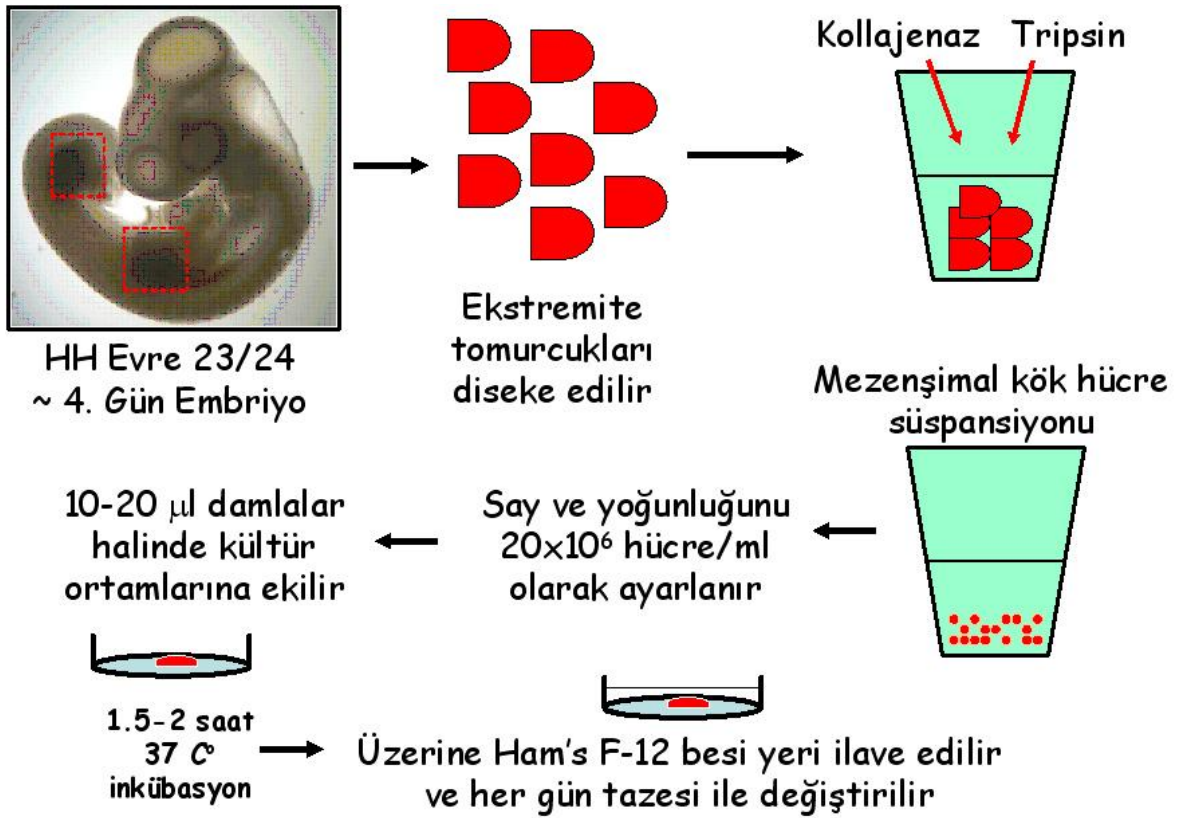
#### 3.1. Tavuk Embrioları

Fertilize (damızlık) "Denizli Horozu" cinsi tavuk yumurtaları Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Denizli İl Müdürlüğü, Denizli Horozu Yetiştirme Ünitesin'den alınmıştır. Yumurtalar 37.5 C° de ve nemli ortamını koruyan yumurta inkübatöründe istenilen süre kadar bekletildi. Bu çalışmada uygulanan tüm deneyler Pamukkale Üniversitesi, Tıbbi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

#### 3.2. Tavuk Embriosu Ekstremitte Mezenşimal Hücrelerinin Mikro-kütle Kültürü

Tavuk embriyosu Hamburger ve Hamilton (HH) evrelemesine göre evre 23/24 düzeyine ulaşan embriyoların (Hamburger and Hamilton, 1992) ekstremite tomurcukları stereo mikroskop altında diseksiyon ile toplandıktan sonra, ilk olarak Ahrens ve arkadaşları (1977) tarafından tarif edilip, ardından San Antonio ve Tuan (1986) tarafından modifiye edilen protokole göre enzimatik yıkıma tabi tutulmuştur. Kısaca özetlemek gerekir ise:

- 1- HH evre 23/24 embriyoların ekstremite tomurcukları  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  dan arındırılmış şekerli salin solüsyonu (CMFSG) içerisinde toplanmıştır.
- 2- Ardından, aynı solüsyon içerisinde, % 0.1'lik tripsin (Type II-S, Sigma, St. Louis, MO, A.B.D.), % 0.1 kollagenaz (Worthington, Lakewood, NJ, A.B.D.), ve % 10 tavuk serumu (Sigma) ile 1 saat  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de enzimatik yıkıma tabi tutulmuştur.
- 3- Enzimatik yıkım, reaksiyona CMFSG içerisinde hazırlanmış % 10'luk keçi serumu ilavesi ile durdurulmuştur.
- 4- Elde edilen hücre süspansiyonu, kalmış olabilecek hücre kümelenmelerini de ortadan kaldırmak için 70 mikronluk hücre filitrelerinden (Falcon, Franklin Lakes, NJ, A.B.D.) geçirilmiştir.
- 5- Santrifüj ile çöktürülen hücreler 1 ml CMFSG solüsyonu içerisinde tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.



Şekil-7: Mikro-kütle hücre kültürü ve kondrojeniz. Deneylerde kullanılan prosedür kısaca özetlenmiş ve önemli noktaları gösterilmiştir.

- 6- Tripan mavisi boyaması sonrası hemositometre üzerinde, mikroskop altında sayılan hücrelerin konsantrasyonları gerekli olan kadar CMFSG ilave edilerek her deneyde gerekli görülen yoğunluğa ayarlanmıştır ( $10-30 \times 10^6$  hücre/ml; Şekil-9'daki çalışma için  $30 \times 10^6$  hücre/ml, Şekil-10 'deki çalışma için  $10 \times 10^6$  hücre/ml).
- 7- Yoğunluğu ayarlanan hücre süspansiyonu zaman zaman yoğunluğun homojenitesini kaybetmemesi için karıştırılarak, 12 kuyulu hücre kültürü plakalarına (Corning

Glassworks, Corning, NY, A.B.D.), her kuyunun ortasına 15 µl olacak şekilde ekilmiştir.

- 8- Bu aşamada hücreler 37 C°'de % 5'lik CO<sub>2</sub> içeren steril hücre kültürü inkübatörlerinde 1.5-2 saat bekletilerek hücrelerin plastiğe yapışması sağlanmıştır.
- 9- Bu sürenin sonunda her kuyucuğa 1 ml önceden hazırlanmış besi yeri ilave edilerek istenen süre kadar aynı ortamda inkübasyonu sağlanmıştır.

Bu deneylerde % 10 FBS (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA, A.B.D.), 50 U/ml penisilin, ve 50 µg/ml streptomisin ilave edilmiş Ham's F-12 besi yeri (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, A.B.D. kullanılmıştır. Aynı besi yeri sonuçları Şekil-7de gösterilen deneylerde 10<sup>-7</sup> M CNP (32-53; Human, Porcine, AnaSpec, Inc., San Jose, CA, A.B.D.) ilave edilerek kullanılmıştır. Kuyulardaki besi yeri her 24 saatte bir tazesi ile değiştirilmiştir.

### 3.3. Kondrojenik değişimin Alcian mavisi boyaması ile analizi

Mikro-külte kültürlerin idamesi sürecinde, her 24 saatte bir seçilen kültürler besi yerinden arındırılıp, PBS ile yıkanmıştır. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında % 4'lük paraformaldehid ile fikse edilen kültürler son olarak tekrar PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyonları tamamlanan kültürler bir gece boyunca, oda sıcaklığında, pH'I 1.0 olan (Lev and Spicer, 1964) Alcian mavisi (Sigma) boyası ile boyanmış, mikroskop altında gözlenmiş ve fotoğraflanmıştır. Kültür ortamlarında gerçekleşen kondrojenin sayısal ve istatistiksel olarak karşılaştırılabilmesi için bir gece boyunca oda sıcaklığında 6 M guanidine-HCl (1 ml/mikro-külte kültür) ile kültürlerin tuttuğu boya ekstrakte edilmiş ve yoğunluğu A<sub>650</sub> dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüştür (San Antonio vd. 1986). Her deneyde grup başına 8 mikro-külte kültürü kullanılmış ve deneyler 3 kere tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar tüm bu deneylerin ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir.

### 3.4. Kullanılan antikorlar

Deneylerde kullanılan antikorlar sırası ile aşağıdaki gibidir:

- 1- 6B3, tavuk N-cadherin monoklonal antikor (George-Weinstein vd. 1997),
- 2- II-II6B3, tavuk kollajen tip II monoklonal antikor (Linsenmayer and Hendrix, 1980),

- 3- X-AC9, tavuk kollajen tip X monoklonal antikoru (Schmid and Linsenmayer, 1985).

Tüm antikorlar Developmental Studies Hybridoma Bank (University of Iowa, Iowa City, IA, A.B.D.)'den satın alınmıştır.

### 3.5. İmmunohistokimyasal boyama

% 4'lük paraformaldehid ile fiksasyonu tamamlanan kültürler PBS ile yıkama sonrası rutin histolojik takip, parafine gömme ve bloklama işlemlerine tabi tutulmuşlardır. İmmunohistokimyasal boyama için 10 µm'lik kesitler alınmıştır. Ardından uygulanan protokol sırası ile aşağıdaki gibidir:

- 1- Kesit dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi hazırlanan % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulama ile ortadan kaldırılmıştır.
- 2- PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir (Zymed, San Francisco, CA, A.B.D.).
- 3- Tekrar PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek oda sıcaklığında 1 saat bekletilmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildedir: 6B3 PBS ile 1:125 dilüe edilmiştir; II-II6B3 PBS ile 1:250 dilüe edilmiştir; X-AC9 PBS ile 1:250 dilüe edilmiştir.
- 4- İlgili doku tarafından tutulan bu primer antikorların immünohistokimyasal analizi biotin ile konjuge geniş spektrumlu sekonder antikor ve streptavidin konjuge horseradish peroxidase (HRP) içeren Zymed Histostain-Plus kit ve aminoethyl carbazole (AEC) kromojen substrat karışımı ile gerçekleştirilmiştir.

### 3.6. RNA izolasyonu ve Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) analizi

Deneylerde kullanılan total RNA HH evre 18 ila 35 arası embriyoların diseksiyon ile toplanan ekstremite tomurcuklarından veya belirlenen günlerdeki mikro-kütle kültürlerden Tri-Reagent (Sigma) kullanılarak (embriyoların evrelerine göre 1ml/4-20 ekstremite

tomurcuğu veya 1 ml/8 mikro-kütle kültürü) izole edilmiştir. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmış olup sunulan veriler bu 3 deneyin ortalaması  $\pm$  standart hata şeklindedir. İzolasyonu takiben elde edilen total RNA konsantrasyonu  $A_{260}$  dalga boyunda spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Diğer taraftan elde edilen RNA'nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile test edilmiştir. Her bir reverse transkripsiyon reaksiyonu için 1 mikrogram RNA örneği kullanılmış ve Qiagen OneStep RT-PCR with Q-solution kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bu kit ile kullanılan protokol kısaca şu şekilde özetlenebilir:

a) Sırası ile:

- 1- 10  $\mu$ l 5x Qiagen OneStep RT-PCR tampon çözeltisi (12.5 mM  $MgCl_2$  içerir),
- 2- Her dNTP'den 10mM içeren 2  $\mu$ l dNTP karışımı,
- 3- 10  $\mu$ l 5x Q-solüsyonu,
- 4- Her bir analiz edilen gen için spesifik olarak tasarlanmış, forward ve revers primerlerin her birisinden 10  $\mu$ M konsantrasyonda içeren primer karışımından toplam 3  $\mu$ l (Bu çalışmada kullanılan primerler için Tablo-1'e bakınız. Primerlerin sentezi Metabion International AG, Martinsried, Almanya'da gerçekleştirilmiştir),
- 5- 2  $\mu$ l of Qiagen OneStep RT-PCR enzim karışımı,
- 6- 22  $\mu$ l RNase-free distile  $H_2O$ , toplam 50  $\mu$ l volüm içerisinde, buz üzerinde örnek RNA ile karıştırılmıştır.

b) Elde edilen karışım ile aşağıda basamakları sıralanan RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1- 50 C°, 30 dakika, 1 döngü (reverse transkripsiyon),
- 2- 95 C°, 15 dakika, 1 döngü (PCR aktivasyon basamağı),
- 3- 94 C°, 1 dakika (denatürasyon); 55-58 C°, 1 dakika (primerlerin örnek cDNA'ya tutulumu); 72 C°, 1 dakika (sentez ve uzama); bu üç basamak sırası ile 25-30 döngü tekrarlanmıştır.
- 4- 72 C°, 10 dakika, 1 döngü (son sentez ve uzama),
- 5- Reaksiyonlar 4 C°'de sonlandırılmışlardır ve -20 C°'de saklanmışlardır.

Deneylemiz öncesinde gerçekleştirdiğimiz PCR optimizasyon çalışmasında 25 döngü ile elde edilen sonuçların PCR ampifikasyonunun doğrusal artış evresine denk geldiği ve gruplar arası kıyaslamalar açısından uygun olduğu bulunmuştur.

- c) PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ve etidyum bromür boyaması ile gözlemlenmiştir.
- d) Elde edilen gen spesifik bantlar GelQuant Ver.2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) bilgisayar programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edilmiştir.

### 3.7. İstatistiksel analizler

Kondrojenin ölçülmesi ve RT-PCR sonuçlarının dansitometrik analizlerinin karşılaştırılması için non-parametrik Mann Whitney's U-testi kullanılmış olup, tüm bu istatistiksel karşılaştırmalarda  $P < 0.05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tablo-1: Gen ekspresyonlarının analizinde kullanılan RT-PCR Primerleri.

---



Gen	Primer dizisi (5'dan 3' a doğru)	Ürün (bç)	Genbank kayıt numarası (İlgili Referans)
N-Cadherin	F: AGATTCTGGAAATCCACATGC R: CTCCTTCATAGTCAAAGACT	540	NC006089.2 (Zhang et al., 2003)
Collagen type II	F: CATCAAACCTCTGCCATCCCG R: TGAAGTGGAAACCGCCGTTG	224	M17866 (Young et al., 1984)
Collagen type X	F: ATTGCCAGGGATGAAGGGACATAG R: AGGTATTCCTGAAGGTCCTCTTGG	439	M13496 (Ninomiya et al., 1986)
CNP-3	F: AAGAGAGGGATCGTGAGCAA R: TCCTGGACAGACCCTTTTTG	201	XM417643 (Houweling et al., 2005)
NPR-B	F: GCCTGCTCCGAGTACGTG R: GTGCAGGTGGGAGACGAA	252	XM427055 (This study)
GAPDH	F: AGTCATCCCTGAGCTGAATG R: AGGATCAAGTCCACAACACG	330	J00849 (Dugaiczky et al., 1983)

F = forward primer; R = reverse primer; bç = baz çifti.

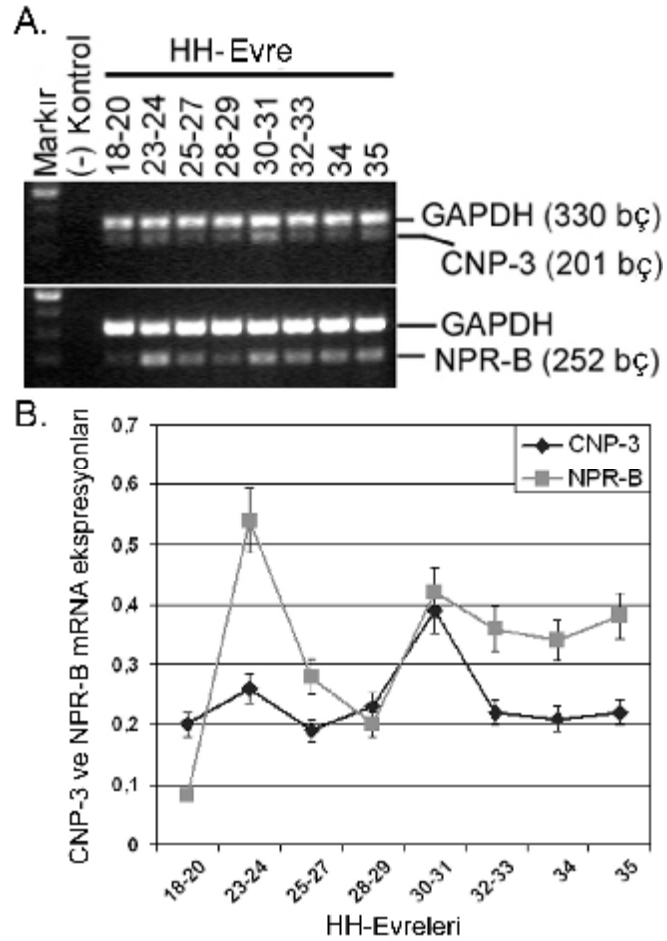
#### 4. BULGULAR

4.1. CNP-3 ve NPR-B'nin tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğunda, in vivo koşullarda zamana bağlı ekspresyon profilleri

CNP-3 ve NPR-B mRNA'larının tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğunda zamana bağlı ekspresyon profili RT-PCR ile incelenmiştir. Sonuçlar gerek ligand olan CNP-3'ün, gerekse bu ligandın reseptörü olan NPR-B'nin, bu çalışmada incelenmiş olan HH evre 18 ile 35 arasında devamlı bir ekspresyon gösterdiğini ortaya koymuştur (Şekil-8A). Ancak evrelere spesifik olarak elde edilen CNP-3 ve NPR-B mRNA ekspresyonları, aynı evrelerde elde edilen ve bu çalışmada kontrol olarak kullanılan GAPDH (Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz) ekspresyonları ile normalize edilerek dansitometrik ölçüm grafikleri haline getirildiğinde; CNP-3 mRNA seviyesinin HH evre 23-24'de bir pik yaptığını, ardından azaldığını ve HH evre 30-31'de bazal seviyesinin yaklaşık 2 katına çıkarak ikinci bir pik oluşturduğunu göstermiştir (Şekil-8B). Aynı işlemler NPR-B için de uygulanmış ve NPR-B mRNA seviyesinin de HH evre 23-24'de bazal seviyenin yaklaşık 6.5 katı kadar arttığı, ardından HH evre 28-29'a kadar geçen sürede bu seviyeden yaklaşık 2.7 kat kadar azaldığı ve son olarak da HH evre 30-31'e uyan dönemde yaklaşık 2.1 kat kadar artarak ikinci bir pik oluşturduğu ve ardından gösterdiği hafif azalma ile bir plato seviyesine ulaştığı gösterilmiştir (Şekil-8B).

#### 4.2. Mikro-kütle kültürlerde kondrogenез sürecinde meydana gelen değişikliklerin sıra ve zamanlamalarının belirlenmesi

Bu amaçla iki farklı deney serisi düzenlenmiştir. Bunlardan birincisinde mikro-kütle kültürler geçirdikleri kondrogenез sürecinde farklı zaman noktalarında toplanmış ve total RNA izolasyonu gerçekleştirilerek bu zaman noktalarına spesifik N-cadherin, kollajen tip II ve kollajen tip X mRNA ekspresyonları daha önce Tablo-1'de verilen genlere spesifik

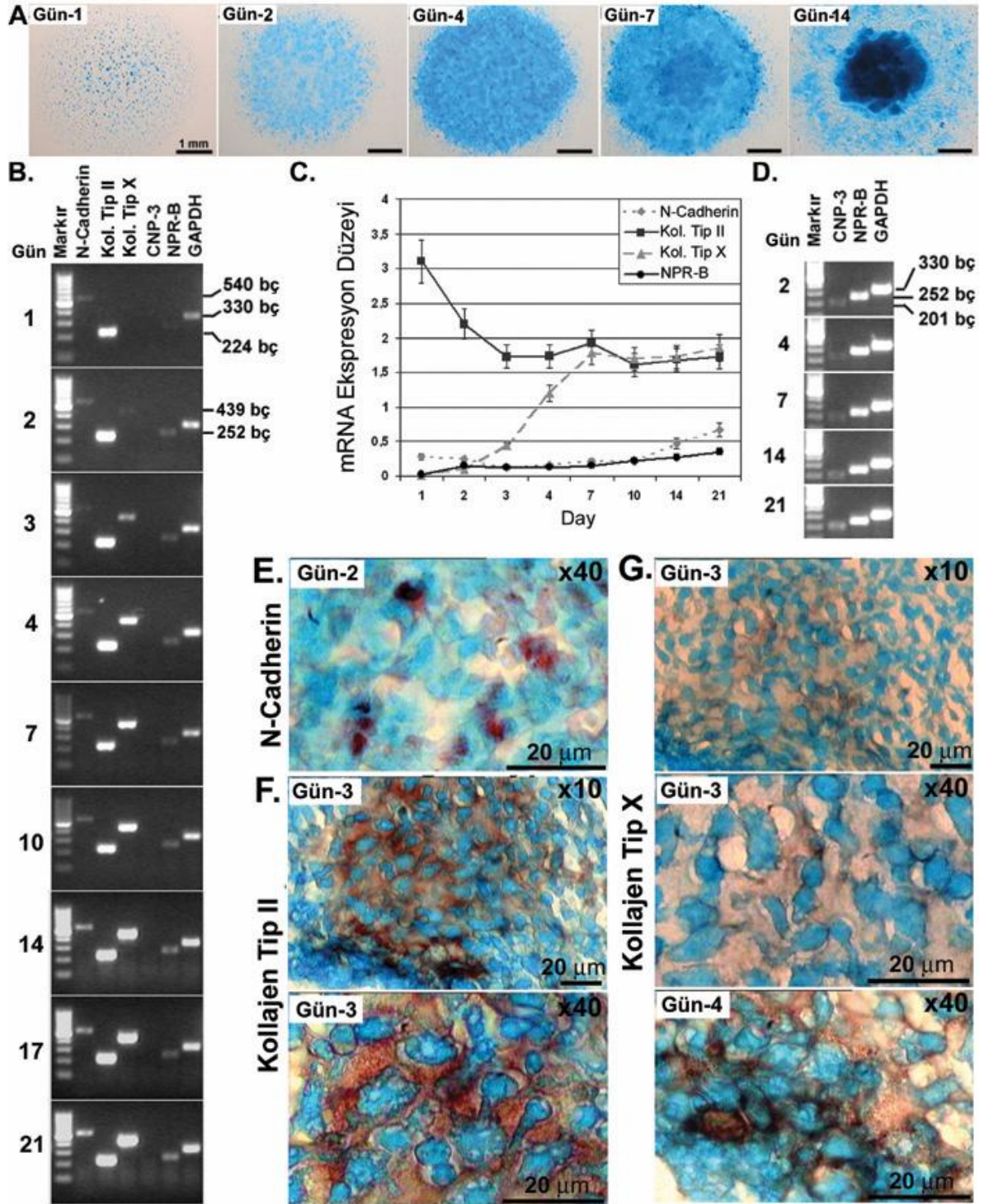


Şekil-8: CNP-3 ve NPR-B'nin tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğunda, in vivo koşullarda zamana bağlı ekspresyon profillerinin analizi

primer çiftleri kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. İkinci olarak ise yine aynı zaman noktalarına uyan günlerde fikse edilen ve histolojik rutin takip sonrası kesitleri alınan benzer mikro-kütle kültürlerde aynı moleküllerin protein düzeyinde varlıklarını ve

lokalisasyonlarını gösterebilmek için immünohistokimyasal analiz gerçekleştirilmiştir. Her iki deney serisinden elde edilen sonuçlar birbirleri ile oldukça paralel olup, şu sonuçları göstermişlerdir:

- 1- Birinci gün kültürlerde mezenşimal hücre yoğunlaşmaları görülmüştür (Şekil-9A, Gün-1) ve bu yoğunlaşma bölgelerinde görülen N-cadherin ekspresyonu ikinci günde giderek azalmış, sadece birkaç hücrede pozitif boyanma görülebilmıştır (Şekil-9B, C ve E).
- 2- Kültürlerin tuttuğu Alcian mavisi boya yoğunluğu, kültürlerde görülen kondrojenik değişime ve sülfatlı proteoglikanlardan zengin ekstrasellüler matriks (ECM) sentezine paralel bir şekilde artmıştır (Şekil-9A, Gün-2 ila Gün-14).
- 3- Bu süreç içerisinde ECM içerisindeki kollajen tip II ekspresyonu en üst seviyesini 1. günde göstermiş, ardından kademeli bir azalma profili çizmiştir (Şekil-9B, C ve F).
- 4- Diğer taraftan, ECM içerisindeki kollajen tip X düzeyi ilk olarak 2. günde mRNA düzeyinde RT-PCR ile (Şekil-9B ve C), 3. günde ise immünohistokimyasal olarak protein düzeyinde (Şekil-9G) gözlemlenmiştir. Bunu takip eden dönemde kollajen tip X seviyesi kondrositlerde görülen matürasyon ve hipertrofiye paralel bir şekilde kademeli olarak artmıştır (Şekil-9B, C ve G).
- 5- Gerek kollajen tip II, gerekse kollajen tip X bu kültürlerde 7. güne ulaşıldığında plato seviyelerine ulaşmışlardır (Şekil-9B ve C).



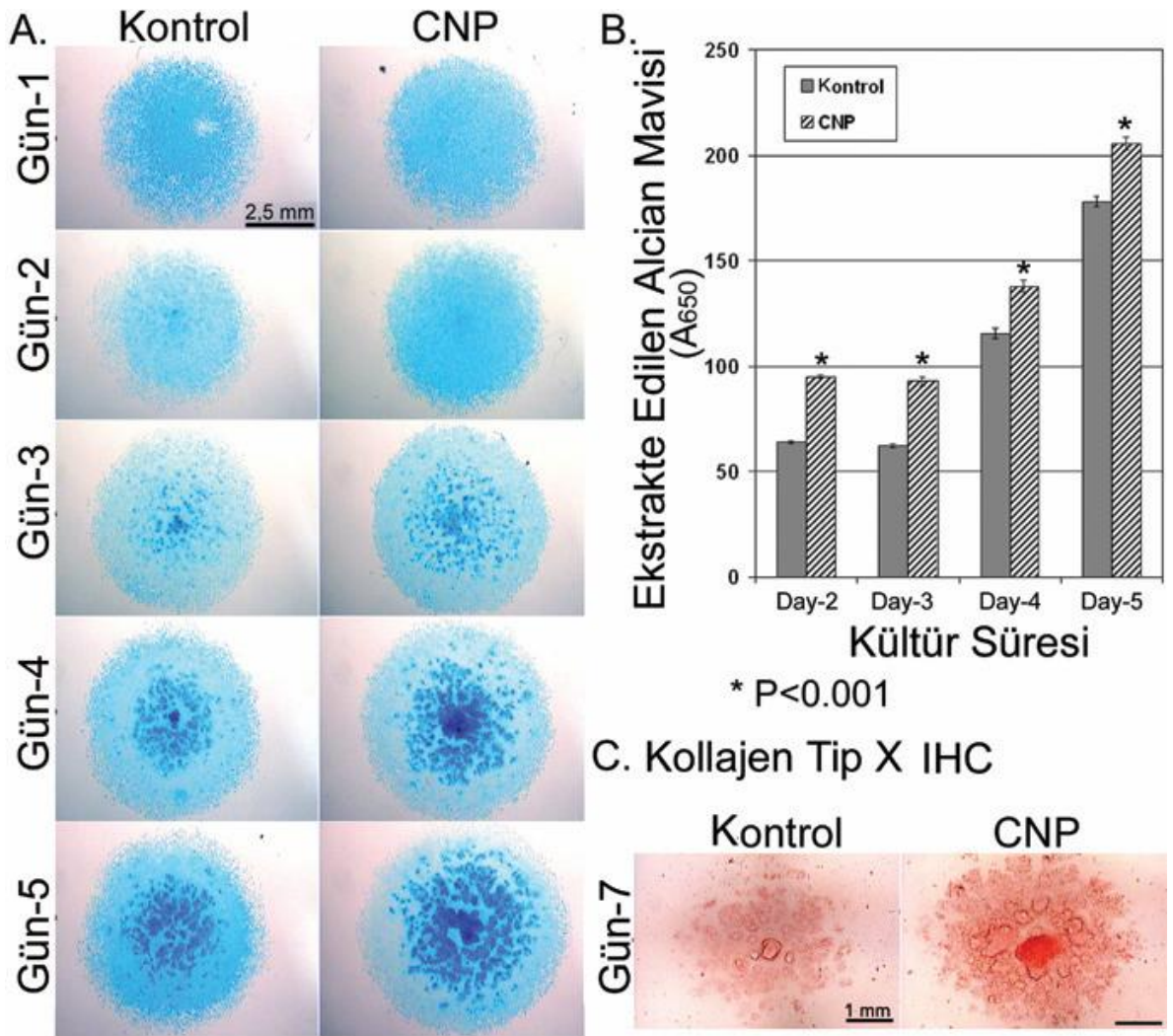
Şekil-9: Mikro-kütle kültürlerde kondrojeniz sürecinde meydana gelen değişikliklerin sıra ve zamanlamalarının belirlenmesi ve CNP-3 ve NPR-B'nin mikro-kütle kültürlerde in vitro kondrojeniz sürecindeki zamana bağlı ekspresyon profillerinin analizi.

4.3. CNP-3 ve NPR-B'nin mikro-kütle kültürlerde in vitro kondrogeniz sürecindeki zamana bağlı ekspresyon profillerinin analizi.

Bu model sistem içerisinde, Tablo-1'de verilen gen spesifik primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen CNP-3 ve NPR-B mRNA'larının tesbitine yönelik RT-PCR sonuçları bu deneylerde kullanılan koşullarda kollajen tip II'nin en üst seviyede tesbit edilebildiği kondrojenik değişim döneminde ne CNP-3'ün ne de NPR-B'nin ekspresyonlarının görülemediğini ortaya koymuştur (Şekil-9B, Gün-1). RT-PCR koşulları değiştirilmeksizin, devam eden süreç analiz edildiğinde NPR-B mRNA ekspresyonunun 2. günde, kollajen tip X ekspresyonuna paralel olarak görülebildiği ve kondrositlerin matürasyon ve hipertrofileri sürecinde kademeli olarak arttığı gösterilmiştir (Şekil-9B ve C). Bu süreçte belirlenebilen NPR-B ekspresyon yoğunluğu gerek kollajen tip II'ninkinden, gerekse de kollajen tip X'unkinden oldukça düşük seviyededir (Şekil-9B ve C). Bu deney serisinde CNP-3 mRNA'sının NPR-B'ninkine paralel olan ekspresyonunun RT-PCR ile analizi ancak daha yüksek döngü sayılarına çıkıldığında mümkün olmuştur (Şekil-9B'de gösterilen 25 döngülü RT-PCR sonuçları ile Şekil-9D'de gösterilen 30 döngülü RT-PCR sonuçlarını karşılaştırmız).

4.4. CNP'nin in vitro koşullarda kondrogeniz ve kondrogenizin dönemlerine spesifik belirleyici molekülleri üzerine etkilerinin analizi

Mikro-kütle kültürlerinin 1. ve 7. kültür günleri arasında besi yerine  $10^{-7}$  M insan CNP proteini ilavesi ile elde edilen deney grubu bu ilavenin gerçekleştirilmediği kontrol kültürlerle Alcian mavisi boyaması yapılarak karşılaştırıldığında CNP'nin gerek glikozaminoglikan sentezini, gerekse de kondrogenizi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır (Şekil-10A ve B;  $P < 0.001$ ). Kültürlerin 7. gününde yapılan immünohistokimyasal analizde CNP ilave edilen grupta kontrol grubuna oranla kollajen tip X protein ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Şekil-10C).

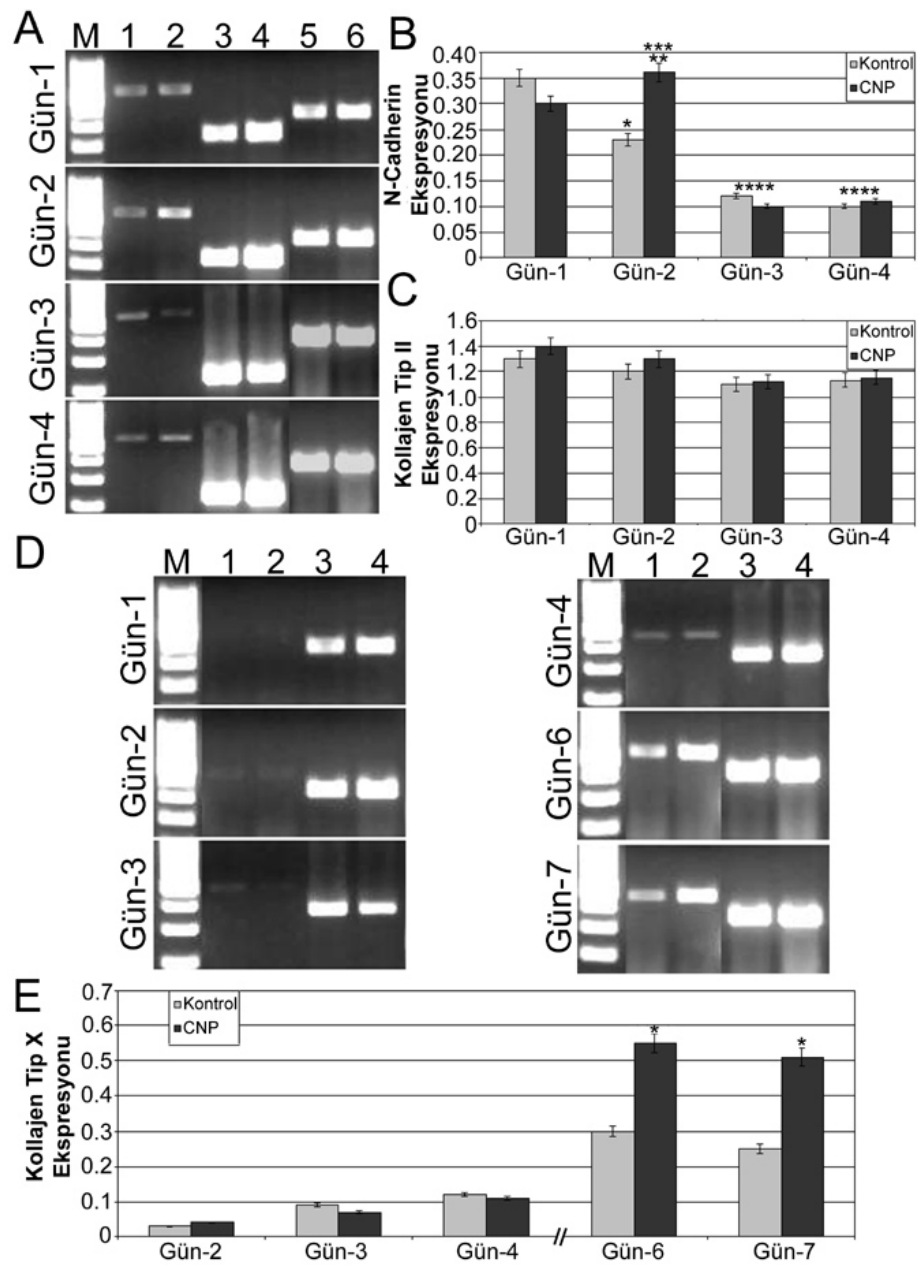


Şekil-10: CNP'nin in vitro koşullarda kondrogenез ve kollajen tip X protein ekspresyonu üzerine etkisinin analizi.

Bu aşamadan sonra CNP'nin kondrojenезi arttırıcı yöndeki etkisinin mekanizmasını açıklayabilmek için kondrojenез evrelerinin belirleyicileri olan moleküllerin CNP ile muamele edilmiş olan kültürlerdeki zamana bağlı mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar sırası ile aşağıdaki gibi bulunmuştur:

- 1- Kültürün 1. günü ile 2. günü arasında kontrol grubunda N-cadherin ekspresyonu % 34'lük bir azalma gösterirken ( $P<0.001$ ), aynı süreçte CNP uygulanan grupta N-cadherin ekspresyonu % 17'lik bir artış göstermiştir ( $P<0.03$ ; Şekil-11A ve B). Her iki grup arasında 2. gündeki N-cadherin ekspresyonu karşılaştırıldığında CNP uygulanan gruptaki seviyenin kontrol grubundakine göre anlamlı olarak yüksek olduğu görülmüştür ( $P<0.001$ ).
- 2- Takip eden günlerde aynı karşılaştırmalar ve analizler tekrarlandığında CNP uygulanan grupta görülen N-cadherin artışının geçici bir süre devam ettiği ve kültürlerin 3. ve 4. günlerinde bu seviyenin kontrol grubu seviyesine düştüğü görülmüştür (Şekil-11A ve B).
- 3- Ayrıca her iki grupta görülen 3. ve 4. günlerdeki N-cadherin seviyesi azalması 2. gün seviyeleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ( $P<0.001$ ). Bu düşüş mezenşimal hücrelerin kondrojenik değişimleri için de gereklidir.
- 4- Diğer taraftan, CNP uygulanan ve kontrol grubu kültürlerdeki kollajen tip X mRNA'sının ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında kültürün 4/5. gününe kadar önemli bir fark gözlenmemiştir (Şekil-11D ve E). Ancak 6. günden itibaren CNP uygulanan gruptaki kollajen tip X ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış göstermiştir (Şekil-11D ve E;  $P<0.001$ ).
- 5- Son olarak, her iki grup arasındaki kollajen tip II mRNA'sının ekspresyonları karşılaştırıldığında kültürün ilk 4 günlük sürecinde her iki grubun birbirine paralel kademeli olarak azalan kollajen tip II ekspresyonları gösterdiği görülmüştür (Şekil-11A ve C). Her iki grup arasında bu süreçte kollajen tip II ekspresyonu açısından istatistiksel bir fark gösterilememiştir.





Şekil-11: CNP'nin in vitro koşullarda kondrogenezin dönemlerine spesifik belirleyici molekülleri üzerine etkilerinin analizi. A) N-cadherin (sütun 1, 2), kollajen tip II (sütun 3, 4), GAPDH (sütun 5, 6), Kontrol grubu (sütun 1, 3, 5), CNP grubu (sütun 2, 4, 6). D) Kollajen tip X (sütun 1, 2), GAPDH (sütun 3, 4), Kontrol grubu (sütun 1, 3), CNP grubu (sütun 2, 4).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın amacı CNP-3/NPR-B sinyal yolunun tavuk embriyosu model sistemi kullanılarak ekstremite gelişimi sürecinde mezenşimal kondrogenez ve endokondral kemik gelişimi olgularındaki olası rolünü ve bu olguların hangi fazlarına yönelik işlevleri olduğunu analiz etmek olarak belirlenmiştir.

Kondrogenezde rol alan düzenleyici moleküllerin ve sinyal yollarının belirlenmesinde bugüne kadar sıklıkla ve başarı ile kullanılmış in vitro modellerin arasında tavuk embriyosu ekstremite tomurcuğundan elde edilen primer mezenşimal hücrelerin mikrokütle kondrojenik hücre kültürleri sayılabilir (Tufan vd. 2001). Geçmişte yayınlanmış pekçok makalede (DeLise vd. 2000, Daumer vd. 2004) ve bu sunulan çalışmada, bu kültür ortamlarında in vivo kondrojenik fazların tümünün taklit edilebildiği başarı ile gösterilmiştir. Bu kültür sisteminin sağladığı avantajlardan en önemlisi kondrogenezin evrelerinin, bu evrelere spesifik moleküller temel alınarak ayrı ayrı, ancak bir sıra dahilinde birbirleri ile olan ilişkileri de gözönüne alınarak analiz edilebilmeleridir. Bu bağlamda en sıklıkla kullanılan başlıca belirleyici moleküller ve spesifik oldukları kondrogenez evreleri şu şekilde sıralanabilir:

- 1- N-cadherin: Hücre zarlarında eksprese edilen bu hücre adezyon molekülü mezenşimal hücrelerin yoğunlaşması evresine spesifiktir,
- 2- Kollajen tip II: ESM komponenti olan bu molekül ekstremite mezenşimal hücrelerinin kondrojenik değişimi evresine spesifiktir,
- 3- Alcian mavisi boyaması: ESM içerisine sentezlenen glikozaminoglikanları tutan bir boyadır.

4- Kollajen tip X: ESM komponenti olan bu molekül kondrositlerin matürasyon ve hipertrofi evresine spesifiktir.

Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada mezenşimal mikro-kütle kültürlerinde CNP-3 ve NPR-B'nin mRNA ekspresyon profilleri ile yukarıda sıralanan moleküllerin mRNA ekspresyon profilleri arasındaki olası korelasyon RT-PCR yöntemi temel alınarak incelenmiştir. Bunun yanı sıra, benzer kültürlerin besi yerinde çözünür CNP sinyal peptidi ile uyarılmaları sonrası yine bahsi geçen belirleyici moleküllerdeki olası mRNA ve protein ekspresyon değişiklikleri de araştırılmıştır.

Literatürden edinilen bilgiler ışığında CNP-3/NPR-B sinyal yolunun uyarılması hücre içerisinde şu olası değişikliklere yol açar (Olney 2006; Potter vd. 2006):

- 1- Bu sinyal yolunun ikincil habercisi olarak çalışan cGMP'nin hücre içi sentezi artar.
- 2- cGMP hücre içerisinde cGMP bağımlı protein kinaz I ve II'yi (cGK-I ve cGK-II), cGMP bağımlı iyon kanallarını ve cGMP bağımlı fosfodiesterazları aktive eder.

Bu sinyal yolunun herhangi bir aşamada kesintiye uğramasını sonuçları deneysel ve klinik pek çok çalışmada gösterilmiş olduğu üzere dwarfizm ve osteokondrodisplazilerdir (Olney 2006; Potter vd. 2006). NPR-B mutasyonlarının ortaya çıkarttığı osteokondrodisplazi AMDM adı ile bilinir. Tüm bu gelişmelere rağmen literatürde bu sinyal yolunun bahsi geçen etkilerinin mekanizmasının belirlenmesine yönelik çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Literatürde natriüretik peptid ailesi üyelerinin kondrogenез üzerine olan olası etkilerinin incelenmesinde en sık kullanılmış olan model sistem, insülin ile uyarıldığında in vitro şartlarda kondrositlere değişim gösterebilen ATDC5 adı ile bilinen, klonlanmış fare embriyonik hücre dizinidir (Fujishige vd. 1999; Suda vd. 2002). Bu bağlamda ATDC5 hücreleri ile gerçekleştirilmiş olan ve CNP/NPR-B sinyal yolunun kondrogenезdeki etkilerini incelemiş sınırlı sayıda araştırmanın sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

- 1- İnsülin uyarısı ATDC5 hücrelerinin kondrojenik değişimlerini tetiklemektedir ve bu değişime uğrayan hücrelerdeki kollajen tip II ekspresyonu ile gösterilmiştir (Fujishige vd. 1999),

- 2- Bu hücrelerdeki değişime paralel görülen kollajen tip II ekspresyonu 20 günde gösterilmiş olup, aynı gündeki kültürlerin CNP ve NPR-B mRNA'larını da eksprese ettiği gösterilmiştir (Fujishige vd. 1999),
- 3- Farklı bir çalışmada aynı kültür sisteminin kullanımı ile CNP uyarısına cevap olarak bu kültürlerde proliferasyon indeksinde ve kondrojenik matürasyon ve hipertrofinin belirleyicisi olan kollajen tip X ekspresyonunda artış saptanmıştır (Suda vd. 2002).
- 4- Mevcut çalışmamızın yayına hazırlandığı dönemde basılmış olan fare embriyonik hücrelerinin kullanıldığı çok yeni bir diğer makalede ise CNP uyarısının kondrojenik yoğunlaşma üzerine pozitif etki gösterdiği, N-cadherin ekspresyonunu etkilediği, glikozaminoglikan sentezini arttırdığı, ancak kondrojenik transkripsiyon faktörleri olan Sox9, -5, ve -6 veya ESM komponentleri olan kollajen tip II ve aggrecan üzerine herhangi bir etki göstermediği bildirilmiştir (Woods vd. 2007).

Bu çıkarımlardan Fujishige ve ark. (1999)'a ait olan ikincisi, sadece aynı esnada kültürlerde ekspresyonları beraber gözlenebiliyor diye CNP/NPR-B sinyal yolunun kollajen tip II ekspresyonu ve kondrojenik değişim fazı üzerine etkileri olduğu yönünde değerlendirilmiştir. Oysa ki gerek devam eden dönemdeki çalışmalar (Suda vd. 2002, Woods vd. 2007) gerekse bizim sunduğumuz bu çalışma bu sonucu desteklememektedir.

Bizim çalışmamızın sonuçları CNP-3 ve NPR-B'nin in vivo prekondrojenik yoğunlaşma (HH evre 23-24) ve daha geç dönemde kondrositlerin matürasyon ve hipertrofi döneminde (HH evre 30-31 ve sonrasında) artan ekspresyon profillerini göstermiştir. Diğer taraftan in vitro kültür sonuçları, bu moleküllerin kollajen tip X paralel artan ekspresyon profillerini ortaya koymuştur. Ancak belirtmek gerekir ki, in vitro koşullarda mezenşimal prekondrojenik yoğunlaşma döneminde N-cadherin ekspresyonunun yüksek, kollajen tip II ekspresyonunun düşük olduğu dönemi gözlemleyemediğimizden dolayı (bu aynı zamanda inkübatörden evre 23-24 döneminde aldığımız ve diseke ederek ekstremite hücrelerini süspansiyon haline getirdiğimiz dönemde bu hücrelerin bahsi geçen evreyi geçirmiş olmasından da kaynaklanmış olabilir) CNP-3 ve NPR-B'nin bu döneme ait in vitro ekspresyon analizi de gerçekleştirilememiştir. Buna rağmen, aynı kültürlerin CNP uyarımı sonucunda hem kondrogenezde hem de bir önceki deneyde hakkında yorum yapamadığımız

dönemin belirleyicisi olan N-cadherin'in mRNA düzeyinde 1-2 günler arası geçici de olsa anlamlı bir artış saptanmıştır. Buna ilave olarak, CNP uyarısı kondrojenik mikro-kütle kültürlerinde 4-5. günden sonraki dönemde kollajen tip X ekspresyonunu arttırmıştır. Unutulmamalıdır ki, kontrol grubu kültürlerde de 6-7. günlere uyan dönemde kollajen tip X ekspresyonu plato düzeyine ulaşmaktadır (Şekil-9C). Bu sonuçlar doğrultusunda, çalışmamız CNP/NPR-B sinyal yolunun kondrojenizdeki rolüne ilişkin birbiri ile çelişen literatür verilerine (Fujishige vd. 1999, Suda vd. 2002; Woods vd. 2007) açıklık kazandırmıştır. Sonuçlarımız CNP'nin kondrojeniz sürecinde hem prekondrojenik yoğunlaşma hem de geç değişim dönemi olan kondrojenik matürasyon ve hipertrofide etkili uyarıcı bir sinyal molekülü olduğunu ortaya koymuştur. CNP uyarısı glikozaminoglikan sentezini de arttırmaktadır. Komatsu ve arkadaşlarının (2002) CNP knockout farelerde uzun kemiklerin epifiz plaklarında kondrositlerin geç değişimlerinin hızında yavaşlama ve hipertrofik zona geçemeyerek birikimlerini göstermiş olmaları, bizim in vitro sonuçlarımızı destekler in vivo deneysel çalışmalardır.

Kondrojenizi arttıran CNP uyarısının mekanizması incelendiğinde, bu etkide erken kondrojenik değişimi etkileyen kollajen tip II ekspresyonu üzerinden bir etki söz konusu olması mümkün gözükmemektedir. Bizim çalışmamızda da CNP uyarısına alınan cevapta kollajen tip II ekspresyon profilinde kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Ayrıca yine CNP uyarısına maruz kalan grupta kontrol grubunda görülen kollajen tip II'nin azalma eğilimi profilinde bir değişiklik olmamıştır.

Bu çalışmada altı çizilmesi gereken önemli bir bulgu da ekstremiteilerin kondrojenik mezenşimlerinde NPR-B mRNA ekspresyonu ile kıyaslandığında, CNP-3 mRNA ekspresyonunun oldukça düşük seviyelerde bulunmuş olması ve ancak yüksek PCR döngü sayıları ile analiz edilebilmesidir. İncelenen sinyal yolunun kondrojenik yoğunlaşma, matürasyon ve hipertrofide öne sürülen uyarıcı etkilerini gerçekleştirebilmesi için, bu yolda reseptör olarak görev alan NPR-B molekülünün kondrojenik mezenşimal hücrelerde ve daha sonra da değişime uğrayan kondrositlerde eksprese edilmeleri gerekli olup, beklenen bir bulgudur. Ancak, çalışmamızdaki CNP-3'e ait bulgular bu reseptörün ligandı olan CNP-3'ün periferik kanda dolaşan seviyesinin çok düşük olması nedeniyle bu faktörün otokrin ve/veya parakrin bir faktör olarak işlev gördüğünü öne süren çalışmalara da (Olney vd. 2006) kanıt oluşturacak niteliktedir. Houweling ve arkadaşlarının (2005) HH

evre 36 tavuk embriyosu ekstremite kesitleri üzerinde gerçekleştirdikleri ve CNP-3'ün mRNA düzeyinde ekspresyonunu kondrojenik mezenşimin dışında kalan, dermisin altındaki sınırlı bir bölgede gösteren sonuçları da bizim sonuçlarımız ve CNP-3'ün daha çok parakrin bir faktör olduğu hipotezi ile uyumludur.

Sonuç olarak, bu çalışma gelecekte gerçekleştirilebilecek olan, CNP-3/NPR-B sinyal yolunun endokondral kemik gelişimi ve özellikle mezenşimal kondrogenez ve ilgili mekanizmalar üzerindeki etkileri konulu pek çok yeni çalışmaya temel oluşturacağı bir gerçektir. Sonuçlarımız CNP-3'ün kondrojenik mezenşimde eksprese edilen NPR-B reseptörü üzerinden etki eden bir parakrin faktör olarak erken prekondrojenik mezenşimal yoğunlaşmayı, takip eden dönemde glikozaminoglikan sentezini ve son olarak da geç dönem değişim mekanizmalarından kondrojenik matürasyon ve hipertrofiyi tetiklediğini düşündürmektedir.

## 6.KAYNAKLAR

- Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF (1992) Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 89:2732-6.
- Ahrens PB, Solursh M, Reiter RS.(1977) Stage-related capacity for limb chondrogenesis in cell culture. *Dev Biol.*, 60:69-82.
- Amling M, Neff L, Tanaka S, Inoue D, Kuida K.(1997) Bcl-2 lies downstream of parathyroid hormone-related peptide in a signaling pathway that regulates chondrocyte maturation during skeletal development. *J Cell Biol.*, 136:205-13.
- Ballock RT, Reddi AH.(1994) Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columnar cartilage from isolated chondrocytes in chemically defined medium. *J Cell Biol.*, 126:1311-8.
- Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P, Rhee DK, van Ravenswaaij-Arts C, Pauli RM, Mundlos S, Chitayat D, Shih LY, Al-Gazali LI, Kant S, Cole T, Morton J, Cormier-Daire V, Faivre L, Lees M, Kirk J, Mortier GR, Leroy J, Zabel B, Kim CA, Crow Y, Braverman NE, van den Akker F, Warman ML. (2004) Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet.*, 75(1):27-34.

- Cameron, Gren, GB., White, CN., Laterza, OF., Clarke, W., Kim, H., Sokoll, LJ. (2006) Assessment of BNP and NT-proBNP in emergency department patients presenting with suspected acute coronary syndromes. *Clin Biochem.*, 39:11-8.
- Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, Nakamura K, Nakao K, Kurihara T, Komatsu Y, Itoh H, Tanaka K, Saito Y, Katsuki M, Nakao K. (2001) Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(7):4016-21.
- Cserjesi P.(1995) A basic helix-loop- helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development.*, 121: 1099-110.
- Daumer KM, Tufan AC, Tuan RS. (2004) Long-term In Vitro Analysis of Limb Cartilage Development: Involvement of Wnt Signaling. *J Cell Biochem.*, Baskida
- De Bold. AJ., De Bold, ML. (2005) Determinants of natriuretic peptide production by the heart: basic and clinical implications. *J. Investig Med.*, 53:371-7.
- DeLise AM, Fischer L, Tuan RS.(2000) Cellular interactions and signaling in cartilage development. *J Osteoarthritis Cartilage*, 8:309-34
- Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P.(1996) Fibroblast growth factor receptor-3 is a negative regulator of bone growth. *Cell*, 84: 911-21.
- Denker AE, Haas AR, Nicoll SB, Tuan RS.(1999) Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation*, 64:67-76.
- Edwall-Arvidsson C, Wroblewski J.(1996) Characterization of chondrogenesis in cells isolated from limb buds in mouse. *Anat Embryol.*, 193:453-61.
- Ellmers, LJ., Scott, NJ., Piuholaj, Maeda, N., Simithies, O., Frampton, CM., Richards, AM., Cameron, VA. (2007) Npr1-regulated gene pathways contributing to cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Mol Endocrinol.*, 38: 245-57.
- Fujishige, K., Kotera, J., Yanaka, N., Akatsuka, H., Omori, K. (1999) Alteration of cGMP metabolism during chondrogenic differentiation of chondroprogenitor-like EC cells, ATDC5. *Biochim Biophys Acta.*, 1452:219-27.
- George-Weinstein, M. (1997) N-cadherin promotes the commitment and differentiation of skeletal muscle precursor cells. *Dev. Biol.*, 185:14-24.



- Gilbert SF, Sunderland, MA, Sinauer. (2001) *Developmental Biology*, 6th ed.
- Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP.(1996) Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev.*, 10:301-12..
- Haas AR, Tuan RS.(1999) Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: II. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 requires modulation of Ncadherin expression and function. *Differentiation*, 64:77-89.
- Haliloglu M, Ozen H, Kocak N, Unsal M. (1999) Acromesomelic dysplasia associated with mild lumbar spine stenosis. *Eur Radiol.*, 1999;9(1):103-4.
- Hall BK, Miyake T.(2000) All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*, 22:138-47.
- Hall BK, Miyake T.(1995) Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol.*, 39:881-93..
- Hickok NJ, Haas AR, Tuan RS.(1998) Regulation of chondrocyte differentiation and maturation. *Microsc Res Tech.*, 43:174-90.
- Houweling, AC., Sami, S., Massink, MP., Groenen, MA., Moorman, AF., Christoffels, VM. (2005) Comparative analysis of the natriuretic peptide precursor gene cluster in vertebrates reveals loss of ANF and retention of CNP-3 in chicken. *Dev Dyn.*, 233:1076-82.
- Ianakiev P, Kilpatrick MW, Daly MJ, Zolindaki A, Bagley D, Beighton G, Beighton P, Tsipouras P. (2000) Localization of an acromesomelic dysplasia on chromosome 9 by homozygosity mapping. *Clin Genet.*, 57(4):278-83.
- Iida-Klein A, Varlotta V, Hahn TJ.(1989) Protein kinase C activity in UMR-106-01 cells: effects of parathyroid hormone and insulin. *J Bone Miner Res.*, 4:767-74.
- Kant SG, Polinkovsky A, Mundlos S, Zabel B, Thomeer RT, Zonderland HM, Shih L, van Haeringen A, Warman ML. (1998) Acromesomelic dysplasia Maroteaux type maps to human chromosome 9. *Am J Hum Genet.*, 63(1):155-62.
- Kaplan SL, Grunbach MM.(1990) Pathophysiology and treatment of sexual precocity. *J Clin Endocrinol Metab.*, 71: 785-9.

- Komatsu, Y., Chusko, H., Tamura, N., Yasoda, A., Miyazawa, T., Suda, M., Miura, M., Ogawa, Y., Nakao, K. (2002) Significance of C-type natriuretic peptide (CNP) in endochondral ossification: analysis of CNP knockout mice. *J Bone Miner Metab.*, 20:331-6
- Lee K, Deeds JD, Segre GV.(1995) Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology*, 136:453-63.
- Lev R, Spicer S.(1964) Specific staining of sulfated groups with Alcian blue at low pH. *J Histochem. Cytochem.*, 12: 309.
- Lincoln TM, Cornwell TL. (1993) Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.*, 7(2):328-38.
- Linsenmayer, TF., Hendrix, MJ. (1980) Monoclonal antibodies to connective tissue macromolecules:type II collagen. *Biochem Biophys Res Commun.*, 92:440-6
- Loder RT, Wittenberg B, Silva G.(1995) Slipped capital femoral epiphysis associated with endocrine disorders. *J Pediatr Orthop.*, 15:349-56.
- Maroteaux P, Martinelli B, Campailla E. (1971) [Acromesomelic dwarfism] *Presse Med.*, 79(42):1839-42.
- Mello MA, Tuan RS.(1999) High density Micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: An in vitro model of endochondral skeletal development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 35:262-9.
- Mericq V, Uyeda JA, Barnes KM, De Luca F, Baron J.( 2000) Regulation of fetal rat bone growth by C-type natriuretic peptide and cGMP. *Pediatr Res.*, 47(2):189-93.
- Miyazawa T, Ogawa Y, Chusho H, Yasoda A, Tamura N, Komatsu Y, Pfeifer A, Hofmann F, Nakao K. (2002) Cyclic GMP-dependent protein kinase II plays a critical role in C-type natriuretic peptide-mediated endochondral ossification. *Endocrinology*, 143(9):3604-10.
- Moore KL, Persaud TVN: *The Developing Human*.(1993) Clinically Oriented Embryology., 5th ed. Philadelphia, PA, W.B. Saunders Company

- Nakayama K, Negishi I, Kuida K, Sawa H, Loh DY.(1994) Targeted disruption of Bcl-2 alpha beta in mice: occurrence of gray hair, polycystic kidney disease, and lymphocytopenia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 91:3700-4.
- Oberlender SA, Tuan RS.(1994) Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development*, 120:177-87.
- Oberlender SA, Tuan RS.(1994) Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell Adhes Commun.*, 2:521-37.
- O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Rosier RN.(1994) Effects of transforming growth factor-beta 1 and fibroblast growth factor on DNA synthesis in growth plate chondrocytes are enhanced by insulinlike growth factor-I. *J Orthop Res.*, 12:299-310.
- Olney RC.(2006). C-type natriuretik peptide in growth : a new paradigm.*Growth Horm. IGF Res.*, 22:6-14.
- Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. (1996) Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. *Science*, 274(5295):2082-6.
- Potter, LR., Abbey-Hosch, S., Dickey, DM. (2006) Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Reviews*, 27:47-72.
- Rosier RN, O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE. (1989) Transforming growth factor beta: an autocrine regulator of chondrocytes. *Connect Tissue Res.*, 20:295-301.
- San Antonio JD, Tuan RS.(1986) Chondrogenesis of limb bud mesenchyme in vitro: stimulation by cations. *Dev Biol.*, 115:313-24.
- Schmid, TM., Linsenmayer, TF. (1985) Developmental acquisition of type X collagen in embryonic chick tibiatarus. *Dev Biol.*, 107: 373-81.
- Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH.(1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92:7834-8.
- Suda, M., Tanaka, K., Yasoda, A., Komatsu, Y., Chusho, H., Miura, M., Tamura, N., Ogama, Y., Nakao, K.(2002) C type natriuretic peptide/ guanylate cyclase B system in ATDC5 cells, a chondrogenic cell line. *J Bone Miner Metab.*, 20: 136-41.
- Tamura N, Garbers DL. (2003) Regulation of the guanylyl cyclase-B receptor by alternative splicing. *J Biol Chem.*, 2003 Dec 5;278(49):48880-9.

- Tavella S, Raffo P, Tacchetti C, Cancedda R, Castagnola P.(1994) N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res.*, 215:354-62.
- Tuan RS. (2003) Cellular signaling in developmental chondrogenesis: N-cadherin, Wnts, and BMP-2. *J Bone Joint Surg Am.*, 85-A Suppl 2:137-41.
- Tufan AC, Tuan RS. (2001) Wnt regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin-related functions. *FASEB J.*, 15(8):1436-8.
- Tufan AC, Daumer KM, DeLise AM, Tuan RS.(2002) AP-1 transcription factor complex is a target of signals from both Wnt-7a and N-cadherin-dependent cell-cell adhesion complex during the regulation of limb mesenchymal chondrogenesis. *Exp Cell Res.*, 273(2):197-203.
- Tufan AC, Daumer KM, Tuan RS. (2002). Frizzled-7 and limb mesenchymal chondrogenesis: effect of misexpression and involvement of N-cadherin. *Dev Dyn.*, 223(2):241-53.
- Van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. 2003. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev.*, 24(6):782-801.
- Vaux DL, Cory S, Adams JM.(1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335:440-2.
- Vortkamp A, Lee K, Lanske K, Segre G, Kronenberg HM.(1996) Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273:613-22.
- Wallen-Ohman M, Lonnbro P, Schon A, Borrebaeck CA.(1993) Antibody-induced apoptosis in a human leukemia cell line is energy dependent: thermochemical analysis of cellular metabolism. *Cancer Lett.*, 75:103-9.
- Webster MK, Donoghue DJ.(1996) Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor-3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.*, 15:520-7.
- Woods, A., Khan, S., Beier, F. (2007) C-type natriuretic peptide regulates cellular condensation and glycosaminoglycan synthesis during chondrogenesis. *Endocrinology*, 148: 30-41.

- Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, Cooper L, Kun J.(1995) The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet*, 9:15-20.
- Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N.(1999) p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398:714-8.
- Yasoda A, Ogawa Y, Suda M, Tamura N, Mori K, Sakuma Y, Chusho H, Shiota K, Tanaka K, Nakao K. 1998. Natriuretic peptide regulation of endochondral ossification. Evidence for possible roles of the C-type natriuretic peptide/guanylyl cyclase-B pathway. *J Biol Chem*, 273(19):11695-700.
- Yasoda A, Komatsu Y, Chusho H, Miyazawa T, Ozasa A, Miura M, Kurihara T, Rogi T, Tanaka S, Suda M, Tamura N, Ogawa Y, Nakao K. (2004). Overexpression of CNP in chondrocytes rescues achondroplasia through a MAPK-dependent pathway. *Nat Med*, 10(1):80-6.
- Zelzer E, Olsen BR. (2003) The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, 423(6937):343-8.

## EKLER

### EK.1. Yayınlanmış olan makale hakkında bilgi

Bu tez içerisinde yer alan araştırma ve sonuçları 06.05.2008 tarihinde Journal of Cellular Biochemistry dergisi tarafından 10.1002/jcb.21815 DOI numarası ile, on-line olarak yayınlanmış olup, aynı zamanda aynı dergi tarafından basılı kopya olarak da yayınlanmak üzere kabul edilmiştir. Bu yayına ilişkin Pubmed tarafından verilen 27.06.2008 tarihli künye bilgileri aşağıdaki gibidir:

Alan T, Tufan AC. C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. J Cell Biochem. 2008 May 6. DOI: 10.1002/jcb.21815.

### EK.2. Yayınlanmış olan bildiri hakkında bilgi

Bu tez içerisinde yer alan araştırma ve sonuçları 20-23 Mayıs 2008 tarihleri arasında, Çukurova Üniversitesi tarafından Adana'da düzenlenmiş olan "IX. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresinde" sözlü bildiri olarak sunulmuş olup, özeti Cell and

Tissue Biology Research dergisi tarafından “Vol 1, 2008 Supplement” sayısında basılmıştır. Bu bildiriye ait künye bilgileri aşağıdaki gibidir:

Alan T, Tufan AC. C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. Cell and Tissue Biology Research, Vol. 1, 2008 Supp.: p. 22, Abstract # O-11.

EK.3. Etik kurul onayı.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı: Tülay Alan  
Doğum Yeri ve Tarihi: Denizli, 21 Temmuz 1968

### Eğitim

1983-1986	Denizli Lisesi
1986-1992	İstanbul Üniversitesi /Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
1998-2001	Sitoloji Eğitimi Denizli Devlet Hastanesi Patoloji Lab.
2006	Sitoloji ve Kolposkopi Kursu Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı
2005-2008	Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisansı Pamukkale Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji

## Anabilim Dalı

## Mesleki Deneyim

1993-1994	Güneyyurt Sağlık Ocağı, Karaman
1994-1996	Honaz Sağlık Merkezi, Denizli
1998-2003	Denizli Sağlık Müdürlüğü Pap Smear Tarama Merkezi
2003-2008	Denizli Devlet Hastanesi, Kanser Tarama ve Eğitim Merkezi Sorumlu Hekimliği

## Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Alan T, Tufan AC (2008). C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. J Cell Biochem. May 6. DOI: 10.1002/jcb.21815.

## Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

Alan T, Tufan AC (2008). C-type natriuretic peptide regulation of limb mesenchymal chondrogenesis is accompanied by altered N-cadherin and collagen type X-related functions. Cell and Tissue Biology Research, Vol. 1, Supp.: p. 22, Abstract # O-11.

Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul onayı



T.C. Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'nın 27.4.2005 tarih, 2005/045 sayılı karar yazısı ile bildirildiği üzere, çalışmamızın yapılmasında tıbbi etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.