

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN ENDOTELYAL
HÜCRELERE FARKLANMASINDA *Ctcf1* GENİNİN ROLÜ**

Gizem Gamze TAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2018-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FARE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN ENDOTELYAL
HÜCRELERE FARKLANMASINDA *Ctcf1* GENİNİN ROLÜ**

Gizem Gamze TAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Güler Leyla SATI

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-1926 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

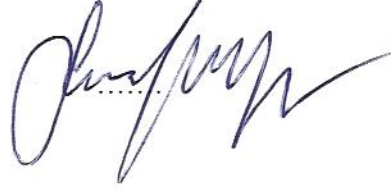
2018-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 29 / 06 / 2018

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Güler Leyla SATI
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Selçuk TUNİK
Dicle Üniversitesi



Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

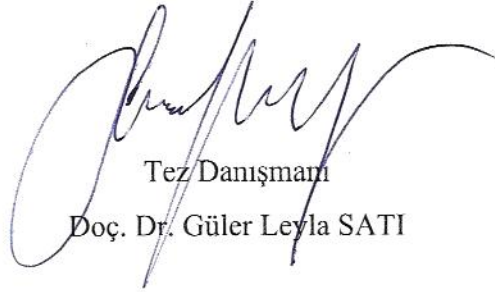
Prof. Dr. Narin DERİN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.



Gizem Gamze TAŞ



Tez Danışmanı

Doç. Dr. Güler Leyla SATI

TEŐEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐmesinde;

Sevgili danışman hocam Doç. Dr. Güler Leyla SATI'ya tezimin gerçekleŐtirilmesi için her konuda göstermiŐ olduğu maddi ve manevi desteği için;

Yüksek lisans eğitim sürecimde, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli Ğretim yeleri baŐta olmak üzere tüm çalışma arkadaŐlarıma,

Çalışma sürecimde bana her konuda yardımcı olan ve yol gösteren Gl Bikem SOYGÜR ve Berna SZEN KAYA'ya,

Her daim güleryüzlü ve yardıma hazır olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalıŐanlarına,

EĞitim hayatım boyunca beni destekleyen, bana inanan ve güvenen, her daim yanımda olan çok kıymetli annem AyŐe TAŞ, babam Mikail TAŞ, kardeŐlerim Batuhan TAŞ ve Beren Ela TAŞ'a ve ailemin diğer tüm fertlerine sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: CTCFL, literatürde BORİS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites), CCCTC-bağlanma faktörü-benzeri protein ya da CTCF-T olarak ifade edilen bir proteindir. *Ctcf*'in aşırı ekspresyonunun embriyogenez sırasında, vasküler bozukluklar, çoklu organ patolojileri ve neonatal ölüm ile bağlantılı olduğu ortaya konulmuştur. Bu noktadan hareketle çalışmamızda, doksisisiklin ile *Ctcf* gen ekspresyonunun indüklendiği fare embriyonik kök hücrelerinde (EKH), *Ctcf*'in aşırı ekspresyonunun *in vitro* endotel yönünde farklanmada etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Yöntem: Çalışmamızda *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan fare EKH'leri kullanıldı. Kültür medyumuna 2 µg/ml doksisisiklin ilavesi ile *Ctcf* gen indüksiyonu gerçekleştirildi. Kültür sonrasında ektopik gen ekspresyonunun sağlanıp sağlanmadığı qRT-PCR ile mRNA, Western Blot ile protein düzeyinde değerlendirildi. Ektopik *Ctcf* ekspresyonunun yapıldığı transgenik deney grubu ile transgen içermeyen ve gen indüksiyonunun yapılmadığı kontrol grupları çalışmaya dahil edildi. Her grup kendi içerisinde endotel yönünde farklılaştırılan ve farklılaştırılmayan şekilde iki gruba ayrıldı. Faz-kontrast mikroskopik değerlendirme ile endotel hücre farklanması gruplar arasında karşılaştırıldı. Flow sitometri yöntemi ile endotel farklanmanın erken dönem belirteçlerinden Flk1 ve VE-kaderin proteinleri analiz edildi. Ayrıca Flk1, VE-kaderin, CD31, CD34, VEGF, Flt1 protein ekspresyonları immünofluoresan boyanma ile değerlendirildi.

Bulgular: Doksisisiklin ile indüklenen grupta *Ctcf* gen ve protein ekspresyonları, kontrol gruplarına kıyasla anlamlı bir şekilde yüksek bulundu. Deney grupları arasında Flk1, VE-kaderin, CD31, CD34, VEGF ve Flt1 proteinlerinin ekspresyon paternleri açısından farklılık izlenmedi. Flow sitometri sonuçlarında, Flk1 ve VE-kaderin proteinleri gruplar arasında benzer ortalama fluoresan yoğunluk değerleri gösterdi.

Sonuç: Bulgularımızda ektopik *Ctcf* ekspresyonunun, *in vitro* endotel farklanmada Flk1 ve VE-kaderin ekspresyonları açısından belirgin bir etkisinin olmadığı gözlemlendi. Farklı belirteçler ve deney modelleri ile konunun olası moleküler mekanizmalarının aydınlatılması gerektiği kanısındayız.

Anahtar Kelimeler: *Ctcf*, vaskülogenez, endotel farklanma, embriyonik kök hücre

ABSTRACT

Objective: CTCFL is a protein called as BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites), CCCTC-binding factor-like protein or CTCF-T in literature. Overexpression of *Ctcf* has been shown to be associated with vascular disorders, multiple organ pathologies and neonatal death during embryogenesis. Thus, in the present work, we aimed to investigate whether or not overexpression of *Ctcf* induced by doxycycline would affect *in vitro* endothelial differentiation in *Ctcf* transgenic mouse embryonic stem cells (ESCs).

Method: *Ctcf* transgenic and non-transgenic mouse embryonic stem cells were used. *Ctcf* gene induction was performed by adding 2 µg/ml doxycycline to the culture media. Ectopic gene expression was confirmed by qRT-PCR at mRNA and by Western Blot method at protein level after culture. The transgenic group with ectopic *Ctcf* gene expression and control groups with no transgene and no gene induction were included in the study. Each group was also divided into two subgroups that cells differentiated into endothelial cells or not. Phase-contrast microscopic evaluation was performed between groups for endothelial cell differentiation. Expression of early markers for endothelial differentiation, Flk1 and VE-cadherin, were analyzed by flow cytometry. Besides, expression of Flk1, VE-cadherin, CD31, CD34, VEGF and Flt1 proteins were assessed by immunofluorescence staining.

Results: The *Ctcf* gene and protein expressions in the doxycycline-induced group were found to be significantly higher than control groups. There were no differences in the expression patterns for Flk1, VE-cadherin, CD31, CD34, VEGF and Flt1 proteins between experimental groups. Flow cytometry results demonstrated that Flk1 and VE-cadherin proteins showed similar mean fluorescence intensity values in each group.

Conclusion: According to our results, ectopic *Ctcf* expression has no obvious effects on *in vitro* endothelial cells differentiation by means of Flk1 and VE-cadherin expressions. However, we believe that elucidation of potential molecular mechanisms of this phenomenon with different markers and experimental models are needed.

Key words: *Ctcf*, vasculogenesis, endothelial differentiation, embryonic stem cell

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLolar DİZİNİ	
SİMGELER ve KISALTMALAR	
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER	13
2.1. Kök Hücre Nedir?	13
2.1.1. Kök Hücre Kaynakları	13
2.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	14
2.3. Farklanma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler	16
2.4. Embriyonik Kök Hücreler	18
2.4.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri	20
2.4.2. Embriyonik Kök Hücrelerin Terapötik Özellikleri	21
2.4.3. Kültür Ortamında Embriyonik Kök Hücrelerin Farklandırılması	21
2.4.4. Embriyonik Kök Hücreler İle İlişkili Sinyal Yolakları	21
2.5. Vaskülogenez	27
2.5.1. Vaskülogenez Sırasındaki Önemli Sinyaller	28
2.6. Endotelial Özelleşme ve Vaskülogenez	31
2.6.1. Mezodermal Prekürsörlerin Endotel Soyuna Yönlendirilmesi	31
2.6.2. Endotelial Soyun Mezodermal Prekürsörlerinde VEGF/KDR Sinyali	32
2.7. Anjiyogenez	32
2.8. CTCFL	33
2.8.1. CTCFL ve Epigenetik Düzenleyici Mekanizmalar	36
2.8.2. CTCFL ve Kanseri İlişkisi	38
2.8.3. CTCFL ve Vasküler Bozukluklar	40

3. GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1. MEF Hücrelerinin Eldesi ve İzolasyonu	43
3.2. MEF Hücrelerinin Pasajlanması	46
3.3. MEF Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması	47
3.4. MEF Hücrelerinin Çözülmesi ve Tekrar Kültüre Edilmesi	48
3.5. Mitomisin C ile MEF Hücrelerinin İnaktivasyonu	49
3.6. Kültür Ortamlarının Kollajen ile Kaplanması	50
3.7. HUVEC Kültürü	50
3.8. Fare Embriyonik Kök Hücre Kültürü	51
3.9. <i>Ctcf</i> Gen Ekspresyonunun İndüksiyonu	51
3.10. qRT-PCR Metodu	52
3.11. RNA İzolasyonu	52
3.12. cDNA Eldesi	54
3.13. qRT-PCR Protokolü	55
3.14. Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi	56
3.15. Western Blot	57
3.15.1. Western Blot Metodu İçin Hücre Lizatı Eldesi	57
3.15.2. Western Blot Protokolü	58
3.16. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin <i>in vitro</i> Endotel Yönünde Farklandırılması	59
3.16.1 %0.1 BSA + 4 mM HCL Karışımının Hazırlanması	61
3.16.2. 0.1 M Sodyum Fosfat Solüsyonunun Hazırlanması	62
3.16.3. Rekombinant bFGF'in Hazırlanışı	62
3.16.4. Rekombinant BMP4'ün Hazırlanışı	62
3.16.5. Rekombinant VEGF165 Solüsyonunun Hazırlanması	63
3.17. Faz-Kontrast Mikroskopik Değerlendirme	63
3.18. İmmünfluoresan Boyama	63
3.19. Flow Sitometri	64

4. BULGULAR	
4.1. <i>Ctcf</i> Transgenine Sahip Embriyonik Kök Hücrelerin Faz-Kontrast Mikroskopik Değerlendirmeleri	68
4.2. Embriyonik Kök Hücrelerde <i>Ctcf</i> Transgeninin Aşırı Ekspresyonu	70
4.2.1. qRT-PCR ile <i>Ctcf</i> Transgeninin Aşırı Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	70
4.2.2. Western Blot ile EKH'lerde CTCFL Proteininin Ekspresyonu	72
4.3. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin <i>in vitro</i> Endotel Yönünde İndüksiyonu	74
4.3.1. Faz-Kontrast Mikroskopik Değerlendirmeler	74
4.3.2. İmmünofluoresan Boyanma Sonuçları	77
4.3.3. Flow Sitometri Değerlendirmeleri	83
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	92
KAYNAKLAR	94
ÖZGEÇMİŞ	120

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	MEF hücre medyumunun içeriği	45
Tablo 3.2.	MEF hücrelerinin dondurma işlemi için kullanılan medyumun içeriği	48
Tablo 3.3.	Fare EKH kültürü sırasında kullanılan medyumun içeriği	51
Tablo 3.4.	cDNA eldesi sırasında kullanılan karışımın içeriği	54
Tablo 3.5.	Ters transkripsiyon reaksiyonuna ait bileşenler	54
Tablo 3.6.	qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan karışımın içeriği	55
Tablo 3.7.	qRT-PCR metodunda kullanılan primerler	56
Tablo 3.8.	%1'lik agaroz jelin hazırlanışı	56
Tablo 3.9.	Endotel yönünde farklıdırma deneylerinde kullanılan kültür medyumunun içeriği	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Bir kök hücre nişine ait temsili görüntü	15
Şekil 2.2.	Kök hücrelerin fonksiyonel potansiyellerinin sistematik gösterimi	18
Şekil 2.3.	EKH'lerin kültür ortamına ekimi	20
Şekil 2.4.	EKH'lerin kültür ortamında farkedilmesinde önemli sinyaller	22
Şekil 2.5.	Kültür ortamında EKH'lerin farkedilmesi	26
Şekil 2.6.	CTCF ve CTCFL genlerinin genomik mimarisinin şematik gösterimi	35
Şekil 2.7.	İnsan CTCF ve CTCFL 11 çinko parmak domeynlerinin karşılaştırılması	36
Şekil 3.1.	Deney grupları	43
Şekil 3.2.	MEF izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kullanılan fare fetuslarının diseksiyonu	46
Şekil 3.3.	Fare EKH'lerin <i>in vitro</i> endotel yönünde farkedilmesinde oluşturulan grupların şeması	60
Şekil 4.1.	Kültürün 1. gününde MEF hücreleri üzerinde kültüre edilen <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan EKH'ler	68
Şekil 4.2.	Kültürün 2. gününde MEF hücreleri üzerinde kültüre edilen <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan EKH'ler	69
Şekil 4.3.	MEF hücrelerinden uzaklaştırılarak kültüre edilen <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan EKH'ler	70
Şekil 4.4.	<i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan EKH'lerde, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı (48 saat) ve yapılmadığı gruplara ait <i>Ctcf</i> ve <i>Gapdh</i> bantları ile $\Delta\Delta Ct$ <i>Ctcf</i> mRNA kat değişim grafiği	71
Şekil 4.5.	Endotel hücre yönünde farkedilme deneyleri boyunca deney gruplarına ait <i>Ctcf</i> ve <i>Gapdh</i> bantları ile $\Delta\Delta Ct$ <i>Ctcf</i> mRNA kat değişim grafiği	72
Şekil 4.6.	<i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı EKH'lerdeki CTCFL protein ekspresyonları	73
Şekil 4.7.	<i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı hücrelere ait faz-kontrast mikroskopik görüntüleri	75
Şekil 4.8.	<i>In vitro</i> kültürdeki EKH'ler ve 5 gün boyunca endotel yönünde farkedilme sonrasında EKH kaynaklı endotel hücre benzeri hücrelere ait faz-kontrast mikroskopik görüntüleri	76
Şekil 4.9.	Uzamış hücre morfolojisine sahip HUVEC görüntüleri	76

Şekil 4.10.	<i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı hücelere ait faz-kontrast mikroskopik görüntüler	77
Şekil 4.11.	HUVEC’lerde Flk1, VE-kaderin, CD31, CD34, VEGF ve Flt1 proteinleri için immünofluoresan boyanma paternleri	78
Şekil 4.12.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünofluoresan mikroskopi ile Flk1 protein ekspresyonu	79
Şekil 4.13.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünofluoresan mikroskopi ile VE-kaderin protein ekspresyonu	79
Şekil 4.14.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünofluoresan mikroskopi ile CD31 protein ekspresyonu	80
Şekil 4.15.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünofluoresan mikroskopi ile CD34 protein ekspresyonu	80
Şekil 4.16.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünofluoresan mikroskopi ile VEGF protein ekspresyonu	81
Şekil 4.17.	<i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı endotel hücrelerindeki Flt1 immünofluoresan mikroskopik görüntüler	81
Şekil 4.18.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında (VE-kaderin, VEGF, Flt1) antikorlarına ait negatif kontrol (anti-rabbit) immünofluoresan mikroskopik görüntüler	82
Şekil 4.19.	Endotel yönünde farklandırılan <i>Ctcf</i> transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında (Flk1, CD31, CD34) antikorlarına ait negatif kontrol (anti-goat) immünofluoresan mikroskopik görüntüler	82
Şekil 4.20.	Flow sitometrik değerlendirmelerde negatif ve pozitif kontrol (HUVEC) örneklerine ait histogramlar	83
Şekil 4.21.	Endotel hücre yönünde farklandırılmayan hücelere ait VE-kaderin MFI grafikleri	84
Şekil 4.22.	Endotel hücre yönünde farklandırılan hücelere ait VE-kaderin MFI grafikleri	84
Şekil 4.23.	Endotel hücre yönünde farklandırılmayan hücelere ait Flk1 MFI grafikleri	85
Şekil 4.24.	Endotel hücre yönünde farklandırılan hücelere ait Flk1 MFI grafikleri	85

SİMGELER ve KISALTMALAR

5 Azad C	: 5 Aza-2'deoksi-sitidin
AVM	: Arteriyovenöz malformasyon
BMP	: Kemik morfogenetik proteini
BSA	: Bovine serum albumin
C	: Karboksi
CCM	: Serebral kavernoza malformasyon
cDNA	: Komplementer Deoksiribo Nükleik Asit
CTCF	: CCCTC bağlanma faktörü
CTCFL	: CCCTC bağlanma faktörü benzeri protein
CO²	: Karbondioksit
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EndH	: Endotelial hücre
EKH	: Embriyonik kök hücre
ER	: Östrojen Reseptörü
FACS	: Floresan yardımcı hücre sıralama
FBS	: Fetal bovine serum
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FGFR	: Fibroblast büyüme faktörünün reseptörü
FITC	: Florescein-5-isoitiocyanate
GDF3	: Büyüme farklılaşma faktörü-3
Gp130	: Glikoprotein 130
HBMSC	: İnsan kemik iliği multipotent kök hücreleri
HCL	: Hidroklorik asit
HUVEC	: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri
HRP	: Horseradish peroksidaz
IGF2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
IHH	: Indian Hedgehog

IHK	: İç hücre kitlesi
İPS	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
JAK	: Janus kinazı
LIF	: Lösemi inhibitör faktör
MAPC	: Multipotent erişkin kök hücreleri
MAPK	: Mitojen aktive protein kinaz
MEF	: Fare embriyonik fibroblast
MIAMI	: Erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenbilir çok soylu (multilineage) hücreler
MKH	: Mezenkimal kök hücreler
MitoC	: Mitomisin C
N	: Amino
NEAA	: Non-esansiyal amino asitler
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIGF	: Plasenta büyüme faktörü
PIK	: Proteaz inhibitör kokteyli
PLCG	: Fosfoinositid fosfolipaz C
PRMT7	: Protein arjinin metiltransferaz 7
rTTA	: Ters tetrasiklin transkripsiyonal aktivatör
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
Stat3	: Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TBS-T	: Tris Tamponlu Salin-Tween 20
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
Tm	: Erime noktası
UV	: Ultraviyole
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VEGFR	: Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü
ZF	: Çinko parmak (Zinc finger)

1. GİRİŞ

CTCFL, Loukinov ve arkadaşları tarafından 2002 yılında tanımlanmış bir proteindir (Loukinov ve ark., 2002). Literatürde BORİS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites), CCCTC-bağlanma faktörü-benzeri protein ya da CTCF-T olarak da ifade edilir. İlginç bir şekilde, CTCFL ekspresyonu, erişkin vücudunda normal koşullar altında “testiste” ve istisnai olarak “malignant hücrelerde” tespit edilmiştir (Klenova ve ark., 2002; Martin-Kleiner, 2012). Bu nedenle, “kansere üreme hücre hattı (germline) ya da bazı kaynaklarda olduğu gibi “kansere-testis antijen ailesinden” biri olarak kabul edilmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda preimplantasyon gelişiminin erken aşamalarında, insan oosit ve 4 hücreli embriyolarında ve embriyonik kök hücrelerde de CTCFL’in eksprese edildiği rapor edilmiştir (Monk ve ark., 2008).

CTCFL’i diğer kanser üreme hücre hattı aile üyelerinden ayıran en önemli nokta ise somatik dokularda yaygın bir şekilde eksprese edilen bir paraloğunun olmasıdır. Üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bu paralog, CTCF proteindir. CTCFL ve CTCF proteinleri, amino (N) ve karboksil (C) uçları dışında, benzer 11 çinko parmak yapısına sahip olmaları nedeniyle aynı DNA bölgelerine bağlanabilmektedir (Klenova ve ark., 2002; Loukinov ve ark., 2002). Literatürde CTCF’in anjiyogenez ve vaskülogenez ile ilişkisinin tanımlandığı çalışmalar mevcuttur (Lu ve Tang, 2012; Tang ve ark., 2011). Dolayısıyla CTCFL’in de, anjiyogenez ve vaskülogenez süreçleri gibi CTCF’in rol oynadığı birçok önemli olayda rol oynayabileceği ileri sürülebilir.

Vaskülogenez, endotel progenitör hücrelerin farklılaşması ve birleşmesi ile meydana gelen kan damarlarının *de novo* oluşum sürecidir (Risau ve ark., 1988). Anjiyogenezle karşılaştırıldığında vaskülogenezi düzenleyen moleküler mekanizmalar hakkında daha az bilgi mevcuttur. Vasküler patolojik mekanizmalarla ilişkili genlerin tam olarak fonksiyonları ve embriyonik gelişim sırasında anjiyogenezi nasıl etkiledikleri günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Vasküler patolojiye bağlı olarak ortaya çıkan birçok hastalığın temelinde genetik bozukluklar bulunabilmektedir. Hatta bunların

bir kısmında klinik bulguların ortaya çıkışında genetik özellikler tek başına etkili olabilmektedir.

Vasküler bozukluklar ve CTCFL ilişkisine dair detaylı bir literatür taraması yapıldığında, 3 temel çalışma göze çarpmaktadır (Sati ve ark., 2015; Schick ve ark., 2011; Schultz ve ark., 2015). Bu çalışmalardan ikisinde CTCFL'in, juvenil anjiyofibroma (Schick ve ark., 2011) ve infantil hemajiyomalar (Schultz ve ark., 2015) olmak üzere iki tane insan benign vasküler malformasyonda ekspre edildiği raporlanmıştır. Bilindiği üzere, anjiyofibromalar birçok küçük ve büyük, sıklıkla dilate olmuş damar kanalının bulunduğu benign bir fibröz doku neoplazmasıdır. Bazı vakalarda *Ctcf* gen duplikasyonu olduğu belirtilmiştir (Scanlan ve ark., 2004). Ayrıca Juvenil anjiyofibromalarda VEGF, İnsülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2), TGF-B ve diğer büyüme faktörlerinin seviyelerinde artış izlenmektedir (Saylam ve ark., 2006). Infantil hemajiyomalar ise özellikle dişilerde görülen vasküler proliferasyonlardır ve CTCFL yine aşırı eksprese olmaktadır (Schultz ve ark., 2015). Grubumuzun yapmış olduğu çalışmada ise, *CTCFL*'in TGF- β yolağını bozarak bu süreçte rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Sati ve ark., 2015).

Ctcf transgenik fare soylarının oluşturulduğu 2015 yılına ait daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda, *Ctcf* geni ile fetal gelişim arasında potansiyel bir ilişki olabileceği ortaya konulmuştur (Sati ve ark., 2015). Bu çalışmada embriyogenez süresince ektopik *Ctcf* gen ekspresyonunun, göz, kas, akciğer, karaciğer, beyin, böbrek gibi birçok organda gelişimsel bozukluk ve vasküler anomalilerle sonuçlandığını rapor ettik (Sati ve ark., 2015). Ektopik *Ctcf* gen ekspresyonunu sağladığımız özel *Ctcf* transgenik fare yavrularının beyin dokularında, belirgin hemoraj ve vasküler anomaliler dikkatimizi çekmiştir. Söz konusu çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, *Ctcf* ekspresyonu ile vaskülogenez arasında bir ilişki olabileceğini işaret etmiştir. Bu noktadan hareketle de mevcut çalışmamızda doksisisiklin ile *Ctcf* gen ekspresyonunun indüklendiği *Ctcf* transgenik fare embriyonik kök hücrelerinde, *Ctcf*'in aşırı ekspresyonunun *in vitro* endotel yönünde farklanmada etkisinin olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir. Dolayısıyla sınırlı ekspresyon tarzı nedeniyle fonksiyonları tam olarak bilinmeyen *Ctcf* geni hakkında yeni bilgilerin sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre Nedir?

Kök hücreler, birçok dokuda bulunan 200'den fazla hücre tipinin öncüsü olarak kabul edilen ilkel hücrelerdir (Murrell ve ark., 2005). Gereksinim durumunda birçok hücreyi oluşturabilecek potansiyele sahip, sonsuz çoğalabilen, farklı dokulara dönüşebilen, kendini yenileyebilen ana hücreler olarak kabul edilirler (Lorzadeh ve Kazemirad, 2018). Hayat boyunca bölünme yeteneklerini korurlar ve köken aldıkları dokuların özelleşmiş hücrelerine farkanabildikleri gibi özel biyolojik sinyallerle fenotipik olarak prekürsöründen farklı özel bir hücreye de farkanabilirler.

Vücudumuzda bulunan kalp, deri, karaciğer, kas hücreleri özelleşmiş hücreler olup, bölündükleri zaman yine aynı doku tipine ait hücreler oluştururlar. Oysa kök hücrelerin bu hücrelerden farkı, belirlenmiş bir fonksiyonlarının bulunmamasıdır. İşte bu nedenden dolayı kök hücreler dış ortamdan aldıkları çeşitli sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Lokal mikroçevredeki sinyaller ve genetik yollar bunu belirleyen en önemli etkenlerdir. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda hasar veya ölüm meydana geldiği zaman, kök hücreler ihtiyaç duyulan hücreye dönüşüm özelliği gösterirler.

2.1.1. Kök Hücre Kaynakları

Esas olarak kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilirler.

a) Embriyonik kök hücreler: Embriyonik gelişim sürecinin erken döneminde blastosistin iç hücre kitlesinden köken alan pluripotent kök hücrelerdir (de Lucas ve ark., 2018; Martin, 2017).

b) Embriyonik olmayan kök hücreler (dokuya özgü kök hücreler, doğum sonrası dönemdeki kök hücreler): Embriyonun iç hücre kitlesi dışındaki kaynaklardan elde edilen kök hücreler, embriyonik olmayan kök hücrelerdir.

❖ Erişkin kök hücreler (somatik kök hücreler)

- Hematopoietik kök hücreler
 - Kemik iliği kaynaklı kök hücreler
 - Periferik kan kaynaklı kök hücreler
- Stromal kök hücreler
 - Mezenkimal kök hücreler (MKH)

- Multipotent erişkin kök hücreleri (MAPC)
 - Erişkin kemik iliği kaynaklı indüklenabilir çok soylu (multilinage) hücreler (MIAMI)
 - İnsan kemik iliği multipotent kök hücreleri (HBMSC)
- Organ özgü kök hücreler
 - ❖ Fetüs kök hücreleri
 - ❖ Kadavradan elde edilen kök hücreleri
 - ❖ Göbek kordonu veya plasental kök hücreleri
 - ❖ Partenot kök hücreleri (partenogenez)
 - ❖ Dedifferansiyasyon ile herhangi bir hücreden kök hücre haline getirilen hücreler (iPS) (Ulloa-Montoya ve ark., 2005).

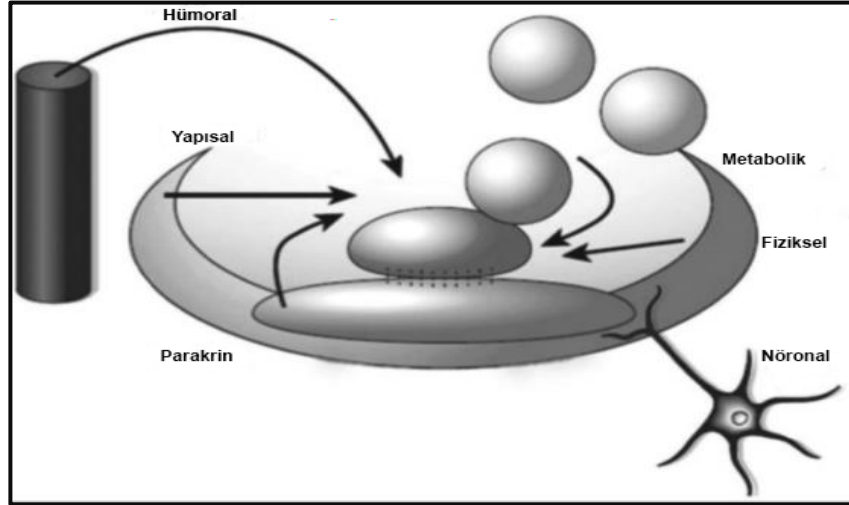
2.2. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreler çok sayıda bölünme geçirerek çoğalabilirler. Kendini yenileme potansiyeli kök hücrelerin en temel özelliklerinden biridir (Grisham ve Coleman, 1996). Bir hücrenin kendini yenilemesi, kök hücre havuzunu yenilemesi anlamına gelir (Dominici ve ark., 2006; Jahagirdar ve Verfaillie, 2005).

Kendini yenileme kavramı, kök hücre ve hücre kültürü literatüründe hücrenin çoğalma sırasıyla ilgili bir kavram olup 'ölümsüz', 'sınırsız', 'sürekli', 'ileri derecede çoğalabilen' gibi farklı terimlerle de anılır. Örneğin; kök hücrelerin birçoğu ölümsüz değil, belli sayıdaki mitoz sonucu yaşlanan ve ölüme giden hücrelerdir (Can, 2013). Yapılan bir çalışmada, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin 40-60 kez bölündükten sonra yaşlandıkları ve diğer kök hücre özelliklerini kayb ettikleri bildirilmiştir (Luna ve ark., 2011). Yani kök hücreler onkojenik bir yaklaşım göstermeksizin bu sayının en az iki katına ulaşabiliyorsa bu hücreler için 'ileri derecede çoğalabilen' terimi kullanılabilir (Chen ve ark., 2009). Buna karşın sadece bazı embriyo kök hücrelerinin ve yetişkin nöral kök hücrelerin bu koşulu sağlayabildiği düşünülürse (Morrison ve ark., 1997), *ex vivo* ortamda kendini yenilemeden sorumlu etkenlerin ve mekanizmaların henüz tam olarak bilinmediği ileri sürülebilir (Can, 2013)

Kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir, özelleşmiş hücelere kaynaklık ederler. Bir kök hücre örneğın, kalp kasında olduğu gibi kanı vücuda pompalamak için komşu hücelerle birlikte çalışmaz, sinir hüceleri gibi doku ve organlara gerekli olan elektrokimyasal sinyalleri iletmez, eritrositlerde olduğu gibi oksijeni dokulara taşıyamaz. Ancak özelleşmemiş kök hüceler, kalp kası hüceleri, sinir hüceleri ya da kan hüceleri gibi özelleşmiş hücelere kaynaklık edebilir ve onlara dönüşebilir (Reya ve ark., 2003).

Kök hüceler, hasara uğramış dokuları tamir edebilme yeteneğine sahiptir. Kök hüceler hasar gören alıcıya nakledildikten sonra konak dokuyu işlevsel olarak yeniden oluşturabilirler. Vücutta uygun niş bölgelerinde bulunarak hasarlanmış dokuya, yakındaki nişten göç ederek ulaşırlar. Kök hücre nişi, kök hücelerin kaderini belirleyen uyarılara sahip olduğu ve bu uyarıları alabildiği *in vivo* mikro ortamdır. Dolayısıyla 'niş' terimi sadece fiziksel bir ortam olarak düşünülmemelidir. Nişi oluşturan bu uyarılar, genleri ve transkripsiyon programlarını aktive eden veya baskılayan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile birlikte çeşitli sinyal moleküllerini içerir (Ferraro ve ark., 2010). Bu etkileşimin doğrudan bir sonucu olarak, kök hücre sayısı kontrol altında tutulur.



Şekil 2.1. Bir kök hücre nişine ait temsili görüntü. Kök hücre nişi; kök hücre kaderini düzenlemek için, hümorale, nöronal, lokal (parakrin), konumsal (fiziksel) ve metabolik işaretlerin birbirleriyle etkileşime girdiği yerdir (Ferraro ve ark., 2010).

Kök hücrelerin devamlılığı ve işlevlerinin önemli modülatörleri olduğu kabul edilen moleküler yollar, her niş için gerekli olmayıp, belirli nişlere göre farklı roller almaktadır. Bu sinyal yolları, Wnt/beta-katenin (Brittan ve Wright, 2002; Reya ve ark., 2003), kemik morfogenetik proteini (BMP) (Chen ve McKearin, 2003; Kulesa ve ark., 2000; Temple, 2001), Notch, Anjiyopietin-1 (Ang-1) ve çeşitli büyüme faktörlerini (fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin büyüme faktörü (IGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü-alfa (TGF-alfa), trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) içermektedir. Bunların arasında, BMP ve Wnt sinyal yolları hem omurgasızlarda hem de memelilerde kök hücrelerin kendini yenilemesi ve soyların belirlenmesini kontrol altına alarak oldukça korunmuş yollar olarak görünmektedir (Ferraro ve ark., 2010).

Kök hücrelerin özel hücrelere farklılaşma kapasitesi, farklı vücut dokularındaki hasarlı hücrelerin yerini alacak şekilde tasarlanmış terapötik uygulamalar için potansiyel olarak değerli olmasını sağlar.

2.3. Farklanma Potansiyellerine Göre Kök Hücreler

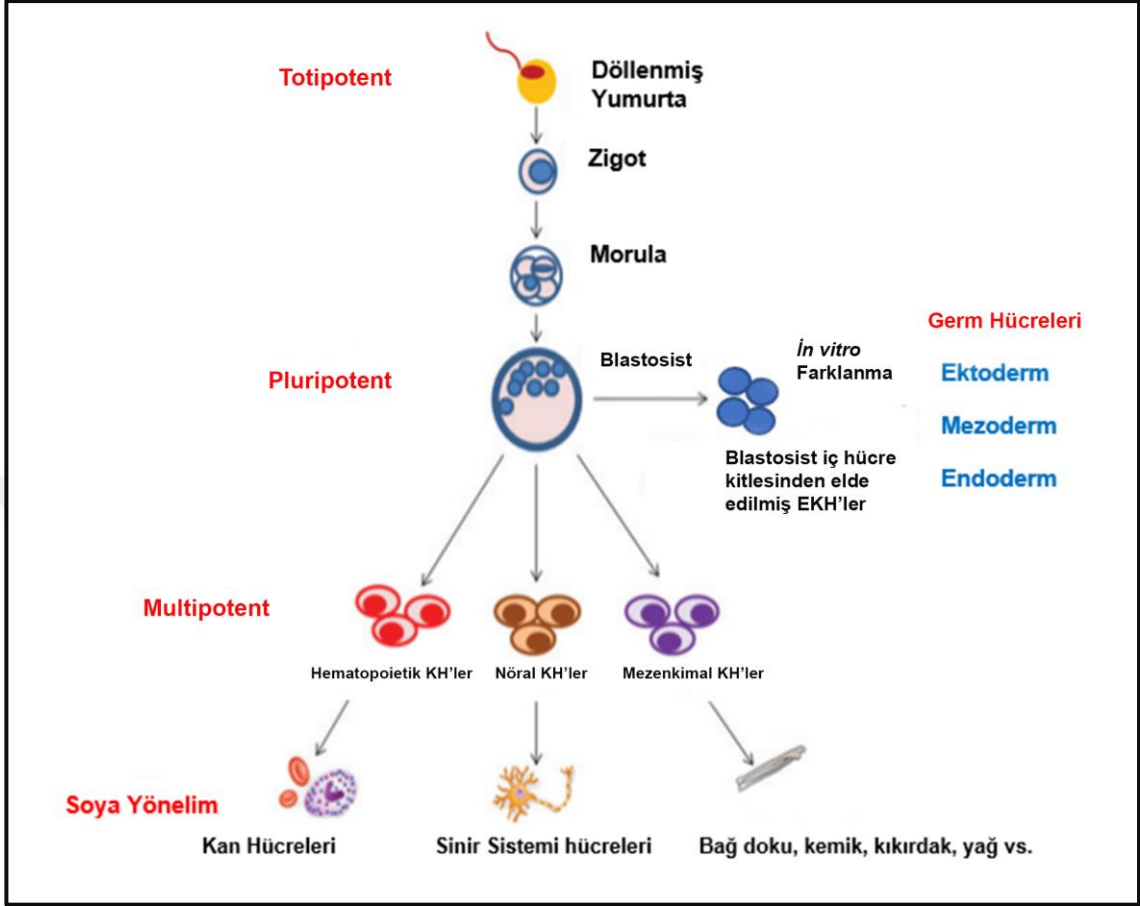
Özel hücre tiplerine farklılaşma ve herhangi bir olgun hücreyi oluşturabilme kabiliyeti kök hücre potansiyelini oluşturur (Hima ve Srilatha, 2011). Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre çeşitli kategorilere ayrılabilirler:

Totipotent Kök Hücreler: Fertilizasyon sonucu zigotun bölünmesi ile ortaya çıkan ilk embriyonal hücreler, esas kök hücrelerdir. Totipotent olarak tanımlanan bu kök hücreler, bir organizmanın büyümesine ve gelişmesine olanak tanıyan hücrelere farklılaşabilir (Singh ve ark., 2016). Dolayısıyla, tam bir bireyi oluşturabilecek kapasiteye ve sınırsız farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Plasenta ve amniyon kesesi gibi ekstraembriyonik dokuları da oluşturabilmektedirler (Hima ve Srilatha, 2011; Jaenisch ve Young, 2008; Krampera ve ark., 2007; Li ve Xie, 2005). Ancak hücrenin totipotent olma özelliği döllenmeden sonraki 5. güne kadar devam eder (Avasthi ve ark., 2008; Kruse ve ark., 2013; Weissman, 2000).

Pluripotent Kök Hücreler: Totipotent kök hücrelerden gelişen ve embriyonun temel doku katmanlarının (endoderm, mezoderm, ektoderm) öncüsü olan embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücreler olarak isimlendirilir (Sobhani ve ark., 2017; Wakao ve ark., 2011). Embriyonik kök hücrelere kaynaklık ederek blastosistin iç hücre kitlesinden köken alan bu hücreler, gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 270 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptir. Bir pluripotent kök hücre, herhangi bir insan dokusuna farklanma potansiyeline sahip olan; ancak bir organizmanın tam gelişimini destekleyemeyen kök hücredir (Horie ve ark., 2011; Shambloott ve ark., 1998; Wobus ve Boheler, 2005).

Multipotent Kök Hücreler: Belirli bir soy içinde tüm hücre tiplerine farklanma yeteneğine sahip, biraz daha özelleşmiş kök hücrelerdir (Jaenisch ve Young, 2008; Krampera ve ark., 2007; Sobhani ve ark., 2017). Multipotent kök hücrelerin farklanabilme potansiyelleri çok yüksek olup, gastrulasyon boyunca gelişen embriyoda bulunurlar (insanlarda 14-15. gün, farelerde 6.5-7. gün). Bu hücreler belirli germ tabakalarının tüm hücrelerini oluşturabilirler. Bu nedenle farklanma kapasitelerinde hala bir esneklik söz konusudur. Multipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler gibi değildir, çünkü üç germ tabakasının tümünü oluşturabilme yeteneğini kaybetmişlerdir (Biehl ve Russell, 2009a). Multipotent kök hücrelere en iyi örnek kemik iliğinde bulunan hematopoietik kök hücreler olup 1960'lerden beri terapötik amaçla kullanılmaktadır (Good ve ark., 1969). Diğer çalışmalar arasında daha fazla plastisiteye sahip olan plasenta ve göbek kordonu da örnekler içine dahil edilmektedir (Kogler ve ark., 2004).

Unipotent Kök Hücreler: Başka hücrelere farklılanamayan ancak kendini yenileme yeteneğine sahip olan kök hücrelerdir. Bu hücrelerin dokudaki normal hücrelerden farkları kendilerini yenileme yeteneklerinin bulunmasıdır (Blanpain ve ark., 2007; Hima ve Srilatha, 2011).



Şekil 2.2. Kök hücrelerin fonksiyonel potansiyellerinin sistematik gösterimi. Sekiz hücreli evreye kadar embriyoda bulunan hücreler totipotenttir. Uygun maternal destek sağlanırsa, organizmanın tüm hücrelerini ve tamamen yeni bir bireyi oluşturabilme potansiyelindedirler. Pluripotent hücreler blastosistin iç hücre kitlesinde bulunurlar. Embriyonun ömrü boyunca ve dokular farkedikçe pluripotensi durumu azalır. Embriyonik 3 germ tabakasının tümünü temsil eden çoklu hücre tiplerine farkedebilirler. Organizma oluştuktan sonra, embriyonik 3 germ tabakasının farkedilmesine bağlı olarak tüm dokularda bulunan hücreler multipotenttir (Biehl ve Russell, 2009b; Hayes ve ark., 2012).

2.4. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Son 25 yıldır yapılan ilerlemelerin çoğu fare embriyogenezinin gelişimsel çalışmalarına dayanmaktadır. Hücre farkedilmesi ile meydana gelen içi sıvı dolu küre şeklindeki yapı olan blastosist, genellikle "iç hücre kitlesi" (IHK) olarak adlandırılan farkedilmemiş iç hücrelerden ve dış trofoektoderm hücrelerinden oluşmaktadır. IHK hücreleri totipotent değildir ancak embriyonun uygun tüm hücre tiplerine gelişebilme yeteneğine (pluripotensi) sahiptir. Embriyonik kök hücreler, blastosist evresindeki embriyoların iç

hücre kitlesinden elde edilen pluripotent özellikteki kök hücrelerdir (Evans ve Kaufman, 1981; Martin, 1981; Ulrich, 2017). Dolayısıyla, üç embriyonik germ tabakasından herhangi birine (ektoderm, endoderm, mezoderm) farklanma yeteneğine sahiptir.

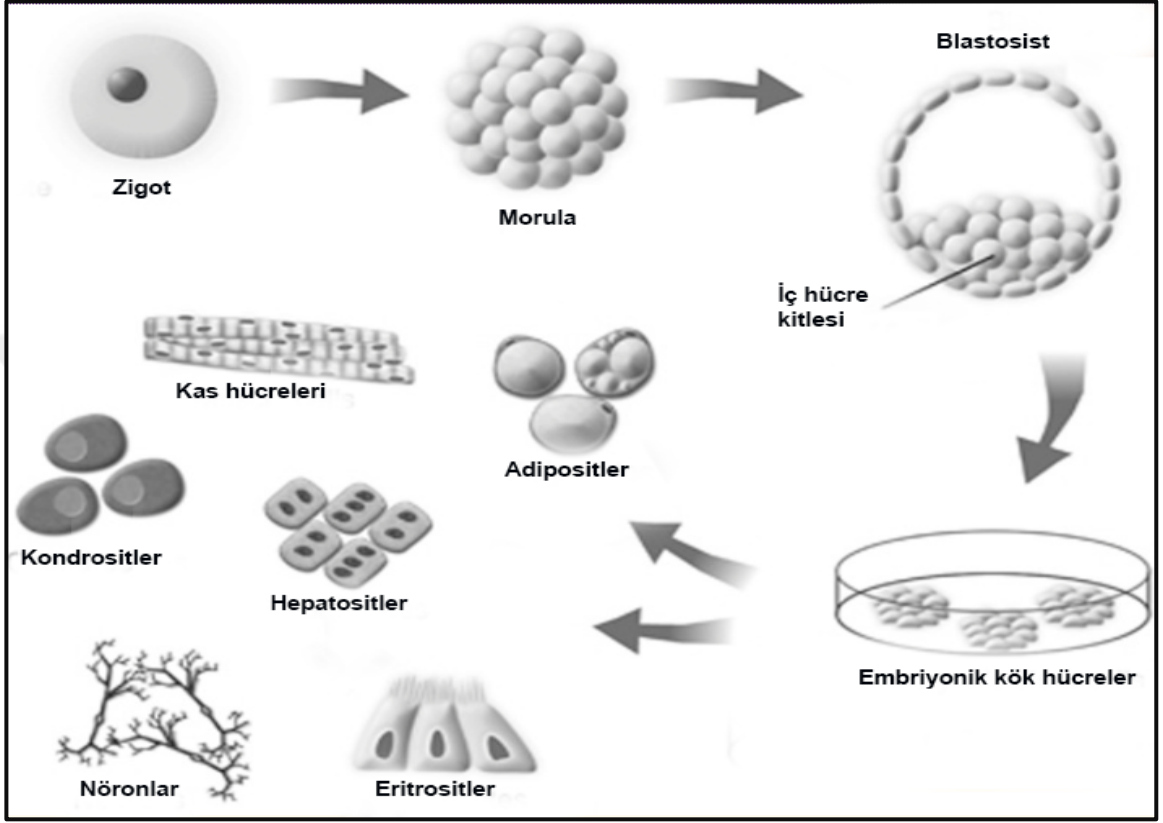
Embriyonik kök hücre araştırmaları 1970'lerin başlarına kadar dayanmaktadır (Stevens, 1967). 1964'de yapılan bir araştırmada, kök hücreler 'teratokarsinoma-teratoma' denilen bir kanser türünün analizi sırasında keşfedilmiştir. Araştırmacılar, teratomdan izole ettikleri hücrelerden tek bir hücrenin farklanmadan kültürde kaldığını saptamıştır. Bu tip hücelere 'embriyonik karsinoma hücreleri' denilmiştir (Evans, 1972; Stevens, 1970).

Klonal olarak izole edilen embriyonik karsinoma hücreleri, farklanma kapasitesini koruyup, üç ana germ tabakasının türevlerine (ektoderm, mezoderm ve endoderm) farklanabilmiştir. Ayrıca embriyonik karsinoma hücreleri, kimerik fareleri üretmek için erken embriyoların iç hücre kitlesine verildiğinde, embriyonik gelişime katılma yeteneği sergiledikleri gözlenmiştir (Mintz ve Illmensee, 1975). Bununla birlikte, embriyonik karsinoma hücreleri kromozomal sapmalar (Papaioannou ve ark., 1975) göstermiş, farklanma yeteneklerini kaybetmiş (Berstine ve ark., 1973) ya da sadece özel koşullar altında farklanabilmiştir (Peckham ve ark., 1989).

Embriyonik kök hücreler, 1981 yılında ilk kez bağımsız iki grup tarafından fare blastosistlerinden elde edilmiştir. Martin Evans ve Matt Kaufman, fare embriyonik fibroblastlarının besleyici katmanını (Evans ve Kaufman, 1981) kullanırken, Gail Martin, embriyonik karsinoma hücre koşullu medyumunu (Martin, 1981) kullanmıştır. *İn vitro* fare EKH'leri, çeşitli somatik hücre tiplerini çoğaltma kapasitesi göstermiş (Doetschman ve ark., 1985; Evans ve Kaufman, 1981; Wobus ve ark., 1984) ve üreme (germ) hattı hücrelerine dönüştüğü bulunmuştur (Geijsen ve ark., 2004; Hubner ve ark., 2003).

İnsan EKH'leri ise 1994 yılında izole edilmiş, 1998'de kültüre edilebilmiştir (Evans ve Kaufman, 1981; Martin, 1981). *İn vitro* ortamda döllenniş embriyolardan insan EKH hatlarının oluşturulması (Thomson ve ark., 1998) ve *in vitro* olarak gelişim potansiyellerinin gösterilmesi (Schuldiner ve ark., 2001; Thomson ve ark., 1998),

rejeneratif tıpta insan EKH'nin gelecekteki uygulamaları ile ilgili yaygın araştırmalara yol açmıştır.



Şekil 2.3. Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamına ekimi (Chagastelles ve Nardi, 2011).

2.4.1. Embriyonik Kök Hücrelerin Karakteristik Özellikleri

Kültür ortamında ölümsüzdürler ve farklanmamış durumda yüzlerce kez pasajlanarak muhafaza edilebilirler. Bu aşamada normal bir kromozom kompozisyonuna sahiptirler. Fare EKH'lerin moleküler karakterizasyonu iyi gelişmiştir. CD9, CD24 ve alkalın fosfataz gibi yüzey belirteçleri ve PI-4, Rex-1, SOX-2, Nanog, LIN28, Thy-1, SSEA-3, SSEA-4.7 gibi pluripotensi ile ilişkili çeşitli genleri ifade ettikleri bilinmektedir (Chagastelles ve Nardi, 2011; Nagano ve ark., 2008). Yüksek düzeyde telomeraz ekspresyonuna sahip olmaları, kültür ortamındaki ölümsüzlüklerinin nedenini açıklamaktadır (Rippon ve Bishop, 2004).

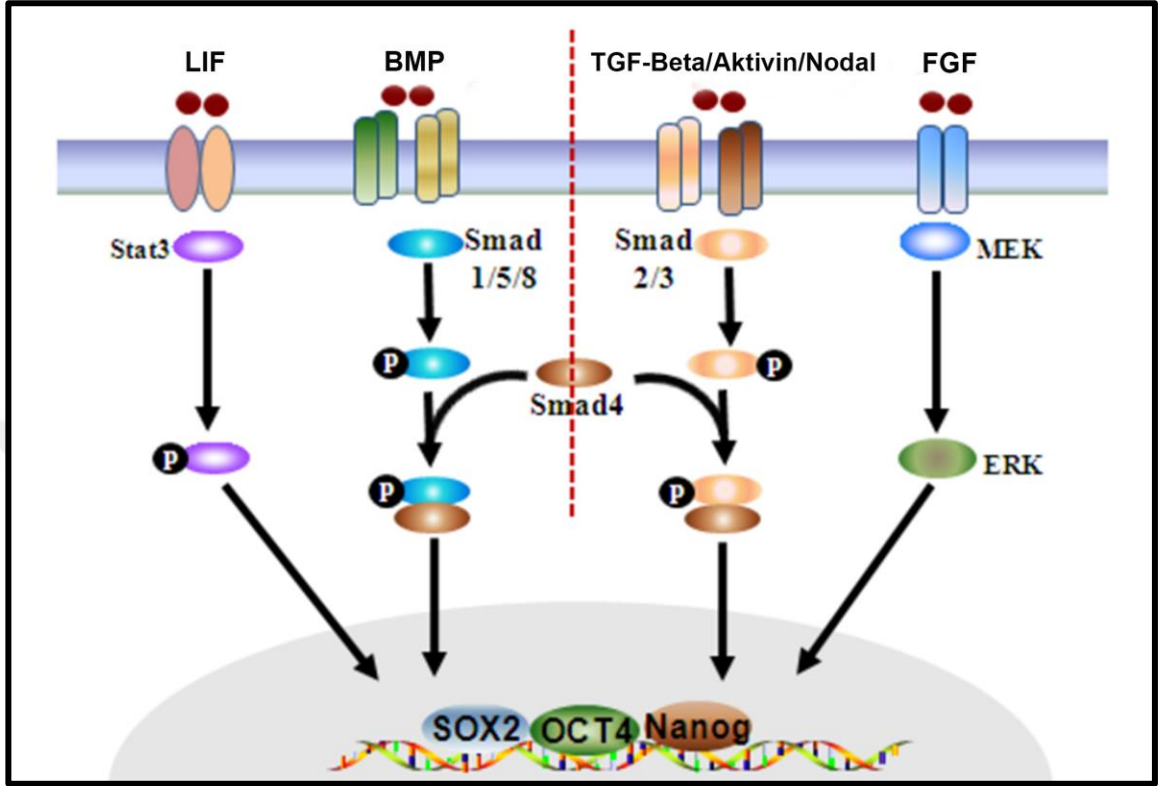
2.4.2. Embriyonik Kök Hücrelerin Terapötik Potansiyelleri

Erişkin kök hücelere kıyasla EKH'lerin başlıca avantajı, yetişkin organizmayı oluşturan tüm hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip oldukları için pluripotens olmaları ve kültürde sınırsız olarak çoğalabilmeleridir. Terapötik amaçlı özel hücrelerin geliştirilmesi için bu potansiyel *in vitro* ortamda çalışılmaktadır. Güvenlik ve etik konulara bağlı olarak, insan EKH'lerin klinikte kullanımı, yetişkin kök hücelere kıyasla çok daha kısıtlıdır. Pluripotensi özelliklerinin bir kanıtı olarak, immün yetmezliği olan farelere enjekte edilen EKH'ler, her üç germ katmanının türevlerini meydana getirmekle birlikte teratom oluşumuna da yol açabilmektedir. Kontamine haldeki farklanmamış hücreler kansere neden olabildiğinden, EKH'lerden elde edilen sadece farklanmış hücreler hastalara uygulanabilir. Buna yönelik yapılan ilk klinik çalışma, 2010 yılının Ekim ayında başlatılmıştır (Lorzadeh ve Kazemirad, 2018). Bu çalışmada insan EKH'lerden oluşturulan oligodendrosit progenitör hücreler kullanılmıştır. Bu hücreler artık EKH olmadığından, bu yöntem "insan EKH tedavisi" olarak isimlendirilememiştir (Lorzadeh ve Kazemirad, 2018).

2.4.3. Kültür Ortamında Embriyonik Kök Hücrelerin Farklandırılması

2.4.4. Embriyonik Kök Hücreler İle İlişkili Sinyal Yolakları

Embriyonik kök hücreler, kültür ortamında pluripotensilerini koruyabilmek için dış (ekstrinsik) büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu dış büyüme faktörleri, EKH'lerin farklanmamış haldeki durumunu devam ettirmek için iç (intrinsik) transkripsiyon faktörleri aracılığıyla farklı sinyal yolakları üzerinden etki eder. Fare EKH'lerinde pluripotensinin desteklenmesinde gerekli olan sinyal yolakları, insan EKH'lerinden farklıdır (Abdelalim, 2013).



Şekil 2.4. Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında farklandırılmasında önemli sinyaller. Embriyonik kök hücre pluripotensisi için çeşitli dış büyüme faktörleri aracılığıyla belirgin sinyal yolları kullanılarak transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu düzenlenir (Abdelalim, 2013).

LIF/JAK/STAT Sinyal Yolağı

Fare EKH'leri başlangıçta fare embriyonik fibroblastlarından (MEF) üretilen besleyici katmanlar üzerinde kültüre edilmiştir. Daha sonra, MEF hücreleri tarafından üretilen ve İnterlökin-6 sitokinlerinin bir üyesi olan lösemi inhibitör faktörü (LIF), fare EKH'lerin farklanmasını inhibe ederek pluripotensiyi korumanın anahtar faktörü olarak kabul edilmiştir (Smith ve ark., 1988). Kültüre eklenen LIF'in bağlanması üzerine, LIF reseptörü, Janus kinazı (JAK) transfosforilasyon yoluyla aktive eden bir heterodimeri oluşturmak için LIF reseptörü ve glikoprotein 130 (gp130)'u ile kompleks oluşturur (Niwa ve ark., 1998). Bu bağlanma JAK / STAT ve MAPK (mitojen aktive protein kinaz) kaskadlarının aktivasyonuna yol açar. Aktive edilmiş JAK, gp130'u fosforile ederek, sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 3 (STAT3)'ü bağlamak için bir kenetlenme bölgesi oluşturur (Ihle ve Kerr, 1995; Stahl ve ark., 1995). STAT3,

gp130'un kenetlenme bölgesine bağlandığında JAK, STAT3'ü fosforile eder. Fosforillenen STAT3, nükleus içine yer değiştirerek (transloke olarak) burada hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için gen yükselticilerine bağlanır (Auernhammer ve Melmed, 2000; Chen ve ark., 2008).

LIF/JAK/STAT3 sinyal yolağı, serum varlığında fare EKH'lerinin pluripotent durumunu korumak için rapor edilmiş olsa da, aktif STAT3'ün bu açıdan işlev mekanizmaları hakkında bilgiler sınırlıdır. İlginç bir şekilde, LIF reseptörü ve gp130 insan EKH'lerinde de eksprese edilir ve insan LIF'i, insan EKH'lerinde STAT3 fosforilasyonunu ve nüklear translokasyonunu indükleyebilir. Ancak, insan LIF'i, insan EKH'lerinin pluripotent halini koruyamamaktadır; bu durum, fare ve insan EKH'lerinin kendi pluripotensilerini yönetmek için farklı sinyal mekanizmaları gerektirdiğinin de bir göstergesidir (Daheron ve ark., 2004).

TGF- β Sinyal Yolağı

TGF- β süper ailesi; TGF- β , aktivin, nodal ve kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) olmak üzere 40'dan fazla üyeden oluşur. TGF- β sinyal yolağının aktivasyonu ligandın reseptörlerine bağlanması ile başlatılır. Sinyal yolağının hücre membranında tip I ve tip II olmak üzere iki adet reseptörü bulunur. TGF- β önce tip II reseptörün membran dışı bölgesine bağlanır, sonra tip I reseptörüne bağlanır. Sinyalizasyon Tip II reseptörünün homodimerine ligandın bağlanması ile başlatılır. Tip II reseptörü transfosforile olduktan sonra tip I reseptörünü aktive eder. Aktiflenmiş tip I reseptörü, sitozolde bulunan SMAD proteinlerini fosforile eder. SMAD2 ve 3, aktivin, nodal ve TGF- β ligandları tarafından özgül olarak aktive edilirken, SMAD1, 5 ve 8, BMP ligandları tarafından aktive edilmektedir (Şekil 2.4) (Itoh ve ten Dijke, 2007; Wrana ve ark., 1992). Bu şekilde fosforile hale gelen SMAD'lar daha sonra SMAD4 ile birleşerek hücre nükleusuna taşınır. Böylece, transkripsiyon faktörleri ve kofaktörler ile bir kompleks oluşturarak hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesine katkıda bulunurlar. TGF- β ile ilgili sinyal yollarının, EKH'lerin pluripotent durumunun ve hücre kaderinin düzenlenmesinde karmaşık roller oynadığı bilinmektedir.

BMP Sinyal Yolağı

Kemik morfogenetik proteini, TGF- β süper ailesinin bir alt grubudur (Sebald ve ark., 2004). BMP ligandları tip II BMP reseptörlerine (BMPRII) bağlandığında BMPRII, tip I BMP reseptörlerini (BMPRI) fosforile eder. Aktive edilen tip I reseptörleri daha sonra BMP'ye duyarlı SMAD1/5/8'i fosforile eder. Fosforillenen SMAD1/5/8, SMAD4 ile bir kompleks oluşturur ve hedef gen ekspresyonunu düzenlemek için nükleusa transloke olur. (Şekil 2.4.). BMP'nin, SMAD1/5'i fosforile ettiği ve nörojenik transkripsiyon faktörlerini antagonize ederek nöronal farklanmayı bloke eden farklanma (Id) genlerinin inhibitörlerini aktive ettiği gösterilmiştir (Ying ve ark., 2003). MEF ve serum yokluğunda, BMP4 proteinleri ile kombinasyon halinde ilave edilen ekzojen LIF, fare süşlarından üretilen fare EKH'lerinin pluripotensisini yeterince devam ettirebilmektedir.

Fare EKH pluripotensisini sürdürebilme rolünün aksine, BMP'nin insan EKH'lerinde trofoblasta farklanmayı teşvik ettiği gösterilmiştir (Xu ve ark., 2002). BMP antagonisti olan Noggin ile BMP sinyalini inhibe etmek, EKH'lerin farklanmamış durumunu devam ettirmektedir (Xu ve ark., 2002; Xu ve ark., 2005).

TGF- β /Aktivin/Nodal Sinyal Yolağı

Her ne kadar MEF besleyici katmanları başlangıçta hem fare hem de insan EKH'lerini kültüre etmek için kullanılmış olsa da, her iki EKH'nin pluripotensi durumunu korumak için MEF'lerden salgılanan sinyal faktörleri temelde farklıdır. İlk çalışmalara ait araştırmalarda, TGF- β ve Nodal genlerinin, farklanmamış insan EKH'lerinde yüksek oranda eksprese edildiği keşfedilmiştir (Sato ve ark., 2003). Daha sonra, TGF- β süper ailesinin bir üyesi olan Aktivin A'nın MEF'ler tarafından salgılandığı ve aktivin A ile zenginleştirilen kültür ortamının, insan EKH'lerini farklanmamış durumda muhafaza etmek için MEF besleyici katmanlarının veya MEF koşullu medyanın yerini alabileceği rapor edilmiştir (Beattie ve ark., 2005).

İnsan EKH pluripotensi özelliğinin korunmasındaki önemli rolünün aksine, TGF- β /Aktivin / Nodal sinyali, fare EKH'lerinin pluripotensisi için gerekli değildir. Bu sinyal yolağının farklanmamış fare EKH'lerinde, SMAD2/3'ün fosforilasyonu ile değerlendirildiğinde aktif olduğu gösterilse de, SB431542 ile SMAD2/3 fosforilasyonunun inhibe edilmesi, fare EKH'nin farklanmamış hali üzerinde hiçbir

etkiye sahip değildir. Ancak, TGF- β /Aktivin/Nodal sinyali, fare EKH proliferasyonunda rol oynayabilir. Başka bir çalışmada ise SMAD7 veya SB431542 tarafından TGF- β /Aktivin/Nodal sinyal yolağının inhibe edilmesi, fare EKH pluripotensisi üzerinde etkili olmadığı fakat proliferasyonlarını önemli ölçüde azalttığını gösterilmiştir (Ogawa ve ark., 2007).

Büyüme ve Farklanma Faktörü 3 (GDF3)

GDF3, fare ve insan EKH'lerinde zıt role sahip olan bir başka TGF- β süper ailesi üyesidir. BMP4'e doğrudan bağlanarak bir BMP antagonisti olarak rol oynayan GDF3, hem fare hem de insan EKH'lerinin pluripotent durumunda özgün olarak eksprese edilir (Levine ve Brivanlou, 2006). GDF3'ün ektopik ekspresyonu, insan EKH'lerinde pluripotensinin korunmasına neden olurken, benzer bir etki de fare EKH'lerinde GDF3 miktarı azaldığında gözlemlenmiştir. LIF yokluğunda bile GDF3 eksik olan fare EKH'lerinin hala pluripotensi belirteçlerini taşıyabildiği rapor edilmiştir (Levine ve Brivanlou, 2006). Bu sonuçlar, fare EKH'nin pluripotensi durumunu destekleyen ancak insan EKH'nin farklanmasına neden olabilecek daha önce tartışılan BMP sinyalleriyle tutarlıdır. Böylelikle GDF3 daha düşük konsantrasyonlarda, fare EKH'de pluripotensiyi artırabilirken, daha yüksek GDF3 seviyeleri BMP sinyalini ortadan kaldırarak insan EKH'nin pluripotensi durumunu olumlu yönde etkileyebilir.

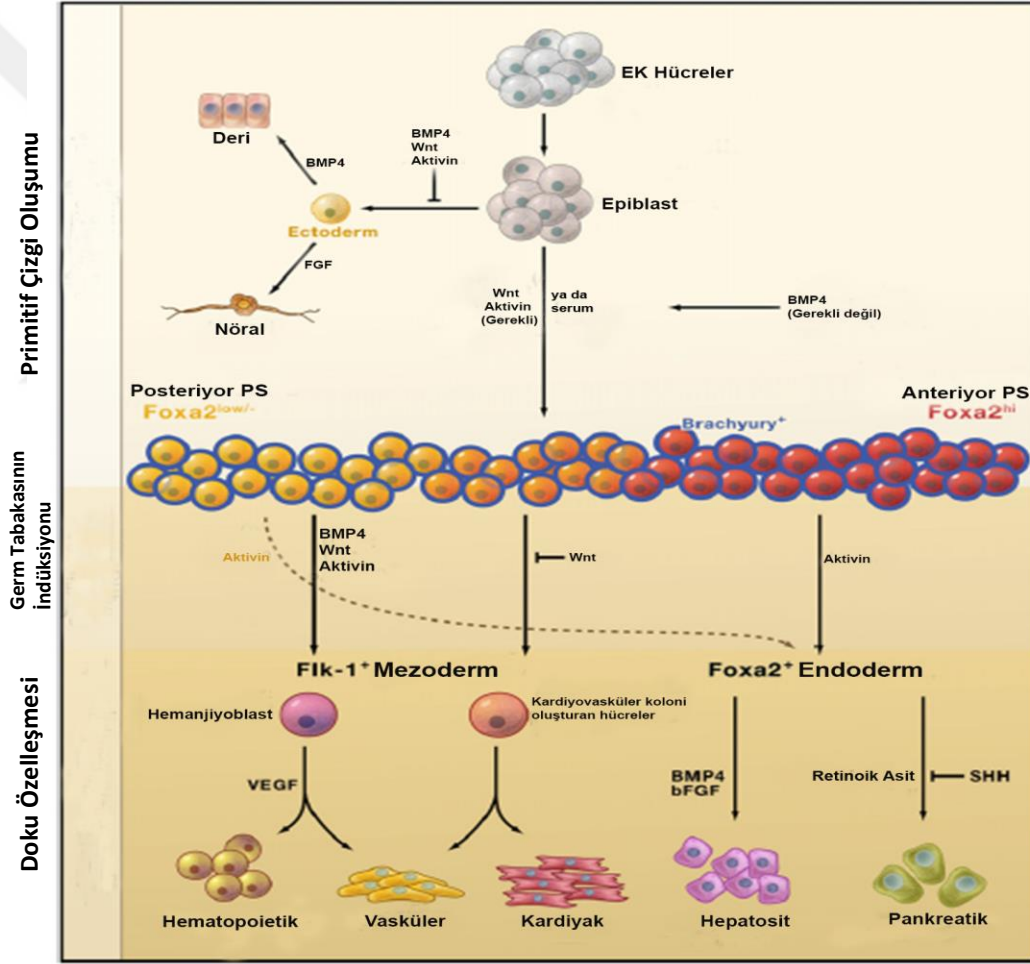
FGF/MEK Sinyal Yolağı

Çalışmalar, aşağı yolak (downstream) sinyal kaskadlarından dört FGF reseptörünün tümü (FGFR1, FGFR3 ve FGFR4) ve birkaç bileşenin (SOS1, PTPN11 ve RAF1) aktivasyonunun, farklanmış insan EKH'leriyle karşılaştırıldığında, farklanmamış insan EKH'lerinde önemli miktarda upregüle olduğunu göstermiştir. Bu sonuçla tutarlı bir şekilde FGF'lerin geri çekilmesi veya bir FGFR inhibitörü olan SU5402 tarafından FGF sinyalinin inhibisyonu, insan EKH farklanmasını hızla indüklemektedir (Dvorak ve ark., 2005; Dvorak ve Hampl, 2005; Kim ve ark., 2005).

FGF sinyalleri, FGF reseptörlerine (FGFR) bağlanarak sinyal oluşumunu sağlar ve çoklu sinyal kaskadlarını etkinleştirir. Bu kaskadlar arasında; Mitojen-Aktive Edilmiş Protein Kinazları (MAPKs), Janus kinazı /sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü

(Jak/Stat), fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve fosfoinositid fosfolipaz C (PLCg) yoluyla yer almaktadır (Kang ve ark., 2005; Li ve ark., 2007).

Fare EKH'lerinde de FGF sinyali üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. FGF/MEK sinyal yolunun bloke edilmesi, fare EKH pluripotensisini arttırdığını düşündürmektedir (Burdon ve ark., 1999; Kunath ve ark., 2007; Stavridis ve ark., 2007). Bu çalışma, serumsuz fare EKH kültür ortamına, FGF/MEK inhibitörleri ve LIF takviye edilerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.5. Kültür ortamında EKH'lerin farklılaşması. Bu model ile primitif çizgi oluşumu, primer germ tabakası indüksiyonu ve farklılaştırılmış fare EKH'lerinden doku özelleşmesi sırasındaki etkili sinyal yollarını gösterilmektedir (Murry ve Keller, 2008).

2.5. Vaskülogenez

Gastrulasyonun hemen ardından dolaşım sisteminin gelişimi, somitlerin oluşumu ile birlikte başlayan bir süreçtir (Goldie ve ark., 2008; Kubis ve Levy, 2003; Patan, 2004; Patel-Hett ve D'Amore, 2011). Gelişimin erken aşamalarında yeni kan damarlarının oluşumu olarak bilinen vaskülogenez, Risau ve arkadaşları tarafından 1988 yılında tanımlanmıştır (Risau ve ark., 1988). Vaskülogenez, endotel progenitör hücrelerin farklılaşması ve birleşmesi ile meydana gelen kan damarlarının *de novo* oluşum sürecidir (Risau ve ark., 1988). Bu süreç ilk olarak memeli embriyolarının embriyonik dönemde vitellus kesesinde, daha sonra embriyo gelişiminde ortaya çıkar. Gastrulasyon sırasında, embriyonik ektodermal (epiblast) hücreler, primitif çizgiye geçiş yaparlar ve burada epitelyal mezodermal geçişe katılırlar. Bu hücreler daha sonra visseral endoderm ile epiblast arasına göç ederek mezoderm veya kesin endodermi oluşturur. Vitellus kesesinde visseral endodermin, memeli embriyosunda üretilecek ilk farklılaşmış hücre tipleri olan primitif endotel ve hematopoietik hücrelerin oluşumunu başlatmak için altta yatan mezoderm oluşumunu hedefleyen sinyaller ürettiği düşünülmektedir. Primitif endotel ve hematopoietik hücreler, daha sonra kapiller ya da vasküler pleksus olarak bilinen primitif bir tüp ağını oluşturmak ve kaynaştıktan sonra kan adacıklarını meydana getirmek üzere birleşir. Bu sürecin devamında, kapiller pleksusun dolaşım ağlarına katılarak olgunlaşması ve yeniden düzenlenmesi gerekir. Ardından kan damarlarının dış duvarını oluşturmak için mural (duvar) hücrelerin takviyesi önemlidir (Patel-Hett ve D'Amore, 2011).

Vaskülogenez konusundaki daha önceki çalışmalar, kan damarı oluşumunun hem intra hem de ekstra embriyonik olarak ortaya çıktığı sonucuna varmıştır. Ekstra embriyonik vitellus kesesi, allantois ve plasentanın da dahil olduğu embriyonik mezoderm, vasküler endotel ve hematopoietik progenitör hücrelerin kaynağı ve vaskülogenezin gerçekleştiği yer olarak tanımlanmıştır (Caprioli ve ark., 2001). Farelerin vitellüs kesesi zarında, prekürsör hücreler E6.5-7. günde kan adacıkları olarak adlandırılan kümelere göç ederek farklılaşırlar. Kan adacıklarında bulunan ve anjiyoplast olarak isimlendirilen, periferik olarak yerleşmiş bir alt grup hücre, E8.5'te endotel hücrelerine farklılaşırken, daha içerde bulunan hücreler kan hücrelerini oluşturacak olan hematopoietik öncüller haline gelir. Hemangioplast terimi, sonuçta hem endotel hem de hematopoietik hücreleri meydana

getiren kan adacıklarının prekürsör hücre grubuna denilmiştir. Endodermin ayrıca anjiyoplast farklanması için kritik olduğu da bilinmektedir.

Anjiyoplastlar, yüksek derecede hareketli hücreler olup ilk önce ekstra embriyonik dokularda ve daha sonra embriyonun içinde endoderm ile yakın temas halinde bulunurlar. Anjiyoplastlar çoğalır, göç eder ve ilkel, tüp benzeri damarları oluşturmak üzere bir araya gelirler (Pardanaud ve Dieterlen-Lievre, 1993).

Damar gelişiminde, anjiyoplastların endotel hücrelerine farklanma işlemi, damar lümenini ve bazal laminayı oluşturdukça gerçekleşir. Vitellus kesesindeki vaskülogenez, ilkel bir vasküler pleksusun oluşumuyla sonuçlanırken, embriyo içerisindeki vaskülogenez, mezenkim ve endokarttaki kapiller oluşuma katkıda bulunur. İki somitli evreye kadar, embriyo halen difüzyon yoluyla oksijen alabildiği halde, intra ve ekstra embriyonik damar düzeni anastomoz halindedir (Risau ve Flamme, 1995). Daha sonrasında pleksus, kalp atışının başlatılmasından hemen önce gelişmekte olan bir kalp tüpüne bağlanır (Dieterlen-Lievre ve ark., 1999; Ribatti ve ark., 2009). Primer vasküler pleksusun kurulmasına ilaveten, vaskülogenez, karaciğer, dalak ve akciğer de dahil olmak üzere birçok organda vaskülarizasyona aracılık eder (Asahara ve ark., 1997; Tongers ve ark., 2010).

2.5.1. Vaskülogenez Sırasındaki Önemli Sinyaller

Anjiyogenezle karşılaştırıldığında vaskülogenezi düzenleyen moleküler sinyaller hakkında daha az bilgi mevcuttur. *In vivo* modellerde yapılan vaskülogenez araştırmaları ile bazı büyüme faktörlerinin bu bağlamda önemli rollere sahip olduğu anlaşılmıştır.

Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF'ler)

Fibroblast büyüme faktörleri erken vasküler gelişimde rol oynamaktadırlar. Memelilerde FGF ailesi, 18 parakrin veya endokrin peptid faktöründen oluşmaktadır (Beenken ve Mohammadi, 2009). Özellikle FGF2'nin, mezodermal indüksiyonu ve mezodermden de anjiyoplastların indüksiyonunu teşvik ettiği bilinmektedir (Cox ve Poole, 2000).

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve VEGF Reseptörleri

Vasküler endotelyal büyüme faktörü sinyalizasyonunun vaskülogenez ve anjiyogenezde önemli rolleri olduğu iyi bilinmektedir. VEGF protein ailesi; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, endokrin bez VEGF (EG-VEGF), VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b ve plasental büyüme faktörü (PlGF) de dahil olmak üzere bir dizi glikoproteinden oluşmaktadır. Bunların başında vasküler geçirgenlik faktörü olarak tanımlanan VEGF-A, üzerinde en fazla çalışılan VEGF aile üyesidir ve hem vaskülogenez hem de anjiyogenezde önemli rol oynamaktadır (Senger ve ark., 1990). VEGF-B'nin kardiyak gelişiminde merkezi bir rol oynadığı gösterilmiştir (Aase ve ark., 2001; Bellomo ve ark., 2000). VEGF-C ve VEGF-D, lenfatik damar gelişimini teşvik etmekle birlikte anjiyogenezde katkıda bulunabilir (Karkkainen ve ark., 2004; Tammela ve Alitalo, 2010; Tammela ve ark., 2005). EG-VEGF, sadece endokrin bezin endotel hücreleri üzerinde etkili olan oldukça özgün bir izoform olarak gözükmektedir. VEGF-A geninin bir varyantı olan VEGF-B'nin anti-anjiyojenik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Bates ve ark., 2002; Woolard ve ark., 2004). Başlangıçta plasentada tanımlanan PlGF, embriyo ve yetişkinlerde düşük seviyelerde görülmektedir ve esasen VEGF-A ile koordinasyon halinde anjiyogenez uyarıcı patolojik koşullarda incelenmiştir (Maglione ve ark., 1991).

VEGF ailesinin üyeleri, VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (insanlardaki KDR ve fare Flk1) ve VEGFR3 (Flt4), tüm tirozin kinaz reseptörleri ve PDGF üyeleri olmak üzere üç ana reseptör ile etkileşime girer. VEGF reseptörleri, VEGF'lerin bağlanması ve hücre içi tirozin kinaz alanlarından sorumlu olan immünoglobülin tekrarlarından oluşan bir hücre dışı alana sahiptir. VEGF-A ve onun reseptörleri olan VEGFR1 ve VEGFR2'in, embriyonik gelişimin başlarında eksprese edildiği bilinmektedir. VEGF-A, ekstra embriyonik endoderm ve mezodermde eksprese edilerek, kan adacıklarında ve E8.5'te intraembriyonik endodermde olduğu gibi bir araya getirilir. VEGFR2 ise kan adacıklarında bulunan endotel ve hematopoietik prekürsör hücrelerin erken dönem belirteçidir (Choi ve ark., 1998; Patan, 2000; Yamaguchi ve ark., 1993).

Genetik çalışmalarla, vaskülogenezdeki VEGF ve VEGF reseptörlerine duyulan gereksinim gösterilmiştir (Shalaby ve ark., 1997). VEGFR2'den yoksun embriyolar,

vaskülogenezin ve hematopoiezin başlatılmaması nedeniyle yaklaşık olarak E9'da ölümler (Ferrara ve ark., 1996; Shalaby ve ark., 1997; Shalaby ve ark., 1995). VEGF'den yoksun olan embriyolar, ciddi vasküler bozukluklar nedeniyle embriyonik letalite göstermektedir. Tek bir VEGF alelinin bile delesyonu, E11'de dorsal aort oluşumundaki ve kan hücrelerinin gelişimindeki kusurlar ile ilgili olarak ortaya çıkan embriyonik letaliteyle sonuçlanmaktadır (Carmeliet ve ark., 1996). VEGFR1'den yoksun embriyoların da embriyonik letalite gösterdikleri ve vasküler defektler sergiledikleri rapor edilmiştir (Fong ve ark., 1995). Bu durumda, kan adacıkları ile ilişkili anjiyoplastlar, kan adacıklarının periferik bölgelerinin yerine merkezi bölgelerine uygun olmayan şekilde lokalize olurlar. Gelişimin başlarında kan damarlarında eksprese edilen ancak daha sonra lenfatik damarlarla sınırlanan VEGFR3'ün eksikliği, kan damarı gelişimini etkilediği fakat en önemli rolünün lenfatik damar gelişimi üzerinde olduğu bilinmektedir. VEGFR3'ten yoksun embriyolarda, vaskülogenez ve anjiyogenezin başlatıldığı, ancak majör kardiyovasküler defektlerden ötürü lenfatik damar oluşumu başlamadan E9.5'te ölüm ile sonuçlanmaktadır. VEGFR3'ün kan damarı oluşumundaki kesin rolü bilinmemektedir (Shalaby ve ark., 1995).

TGF- β ve Reseptörleri

Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), vaskülogenez sırasında işlev gördüğü bilinen bir sitokindir. Endotel hücreleri bir serin treonin kinaz reseptörü olan TGF β RII'yi ve tip I reseptörlerinden Alk1 ve Alk5'i eksprese eder. Alk1 fosforilasyonu SMAD1, SMAD5 ve Smad8'i aktive ederken, Alk5, SMAD2 ve SMAD3'ü aktive eder ve daha sonra SMAD4 ile kompleks oluşturup nükleustaki transkripsiyonu aktive eder (Chen ve ark., 1998; Hoodless ve Wrana, 1998; Rossant ve Howard, 2002).

TGF- β 'nın endotel hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda, TGF- β sinyalizasyonunun karmaşıklığını vurgulayan çelişkili veriler rapor edilmiştir. *In vitro* çalışmalar başlangıçta TGF- β 'nin endotelial proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Baird ve Durkin, 1986; Frater-Schroder ve ark., 1986). Bununla birlikte, diğer çalışmalar, TGF- β 'nin endotel hücreleri üzerinde mitojenik role sahip olduğunu düşündürmüştür (Iruela-Arispe ve Sage, 1993; RayChaudhury ve D'Amore, 1991; Sutton ve ark., 1991). TGF- β aktivitesindeki bu farklılıklar, düşük doz TGF- β 'nin

anjyogenik faktörleri upregüle ettiği fakat yüksek dozlarının endotel hücresi büyümesini inhibe ettiğini göstermiştir (Hofer ve Schweighofer, 2007). TGF- β 'nin hem pro-anjyogenik hem de anti-anjyogenik rollerini gösteren *in vivo* çalışmalarla da çelişkili sonuçlar gözlenmiştir (Li ve ark., 2001; Roberts ve ark., 1986). TGF- β 1'in delesyonunda, mutant embriyoların yarısının vitellüs kesesi vaskülogenezinden ötürü E9.5-E10.5'de letal olduğu, diğer yarısının ise inflamasyona yenik düşmeden birkaç hafta daha hayatta kaldığı saptanmıştır (Dickson ve ark., 1995; Goumans ve Mummery, 2000; Letterio ve ark., 1994). TGF β RII'nin ablasyonu, vitellüs kesesi ve embriyo içindeki bozuk vaskülogenez nedeniyle E10.5'te embriyonik letalite ile sonuçlanmaktadır (Larsson ve ark., 2001; Oshima ve ark., 1996). Alk1 veya Alk5'in delesyonu, embriyolarda vasküler bozukluklara bağlı olarak letaliteye neden olmaktadır (Azuma, 2000).

2.6. Endotelial Özelleşme ve Vaskülogenez

Damar gelişiminde, kan hücreleri gibi endotel hücreleri de ağırlıklı olarak mezodermden gelişmektedir. Aynı zamanda mural hücreler de büyük oranda mezodermden oluşur, ancak nöral krest ve proepikardiyal organ hücreleri de gelişmekte olan damarlarda mural hücrelerine katkıda bulunmaktadır.

2.6.1. Mezodermal Prekürsörlerin Oluşumu ve Endotel Soyuna Yönlendirilmesi

Murin kan damarı oluşumu gastrulasyon sırasında başlar, burada bulunan posterior epiblast hücreleri, vasküler ve kan hücrelerinin farkedildiği mezodermi oluşturmak üzere primitif çizgi boyunca göç ederler. Kan damarı oluşumu için mezoderm özgülleşmesini desteklemek amacıyla çeşitli sinyaller birlikte çalışır. Mezoderm özelleşmesi için gerekli bir sinyal olan çözünebilir faktör BMP4'tür ve gastrulasyon öncesi ekspresyonu primitif çizgiye lokalizedir. BMP4 yokluğunda, mezoderm gelişiminin başarısız olduğu ve böylece mutant embriyoların yumurta hücresi evresinde duraklatıldığı bildirilmiştir (Winnier ve ark., 1995). Mezoderm oluşumu için gerekli olan bir diğer faktör FGF2'dir. FGF reseptör 1'in (FGFR1) nakavt inaktivasyonu, primitif çizgiden geçip mezoderm oluşturmayan epiblast hücrelerinin birikimiyle sonuçlanmış olup böylece, mezoderm oluşumunda FGF sinyalinin önemi daha da vurgulanmıştır. VEGF, farkedilmenin sonraki aşamalarında da kritik rollere sahiptir (Saxton ve Pawson, 1999).

Embriyogenez sırasında, endotelial hücre soyuna multipotent mezodermal hücrelerin yönlendirilmesinin, komşu endodermal hücreler tarafından oluşturulan sinyallerle düzenlendiği düşünülmektedir. Mürin vitellus kesesinde, vasküler indüksiyon için gerekli olan sinyaller visseral endoderm tarafından oluşturulur, ancak bu sinyallerin hiyerarşisi henüz net değildir (Patel-Hett ve D'Amore, 2011).

2.6.2. Endotelial soyun mezodermal prekürsörlerinde VEGF/Flk1(KDR) sinyali

Indian Hedhegog (IHH) ve endoderm kökenli FGF2 arasındaki sinerjik sinyallerin komşu mezodermal hücrelerdeki VEGF reseptörü olan Flk1'in (aynı zamanda Flk1 veya VEGFR2 olarak da bilinir) ekspresyonunu artırdığı bilinmektedir. FGF2 ile muamele edilerek izole edilmiş epiblast hücreleri *in vitro* ortamda endotel hücreleri oluşturabilir (Flamme ve Risau, 1992; Poole ve ark., 2001). Büyük olasılıkla vasküler indüksiyon sırasında FGF2'nin *in vivo* olarak kritik rolü, Flk1'nin upregülasyonudur. Flk1'i ekspres eden mezoderm progenitörleri, VEGF'in biyoaktif seviyelerine karşı hassas olup, vaskülogenez üzerine doz bağımlı bir etki yaparlar (Motoike ve ark., 2000). Flk1'den yoksun embriyolarda vasküler gelişim ve embriyonik letalite gözlemlenmiştir. Bu mutantlarda, endotelial prekürsörler oluşturulur ancak matür endotel hücrelerine farklılaşamazlar; böylece kan adacıklarının gelişimi ve vasküler pleksus oluşumunda aksaklıklar meydana gelmektedir (Shalaby ve ark., 1995). Bu veriler birlikte ele alındığında, VEGF'in matür endotel hücrelerinin farklılaşması ve hayatta kalması için kritik önem taşıdığı görülmektedir.

2.7. Anjiyogenez

Anjiyogenez, önceden var olan mevcut damarların endotel hücrelerinin filizlenmesi yoluyla yeni damarların oluşması ya da 'içine alarak anjiyogenez' (intussusceptive angiogenesis) denilen doku sütunlarının var olan kapiller damarların içine yeni damarlar oluşturmak üzere lümenin içine yerleştirilmesi olarak tanımlanır (Kubis ve Levy, 2003; Varricchi ve ark., 2018).

Anjiyogenez embriyonun E9.5 ile başlar ve embriyonik kan damarlarının çoğunun oluşumuna aracılık eder. Ayrıca beyin ve böbrek de dahil olmak üzere ektoderm ile mezodermden türetilen organların vaskülarizasyonundan da sorumludur. Vasküler filizler, tüp oluşumunda işlev gören endotel hücreleri ile bağlantılı olan ve anjiyojenik

uyarılaraya yanıt veren özel endotel "tip/uç hücreleri" tarafından yönlendirilir (Gerhardt ve ark., 2003). Anjiyogenezin ilerlemesi, bir damarın temel zarının lokal olarak tahrip edilmesi ve kılcal damarlardan perisitlerin ayrışması ile bunu takiben uç hücrelerinin bir anjiyogenik uyarana göçü ile başlatılır. Endotel hücrelerinin çoğalması ve hizalanması ile tüp biçiminde bir lümen oluşumu gözlenir. Perisit veya düz kas hücresi birleşmesi ve bazal membran birikmesi damar stabilizasyonuna aracılık eder (Gerhardt ve ark., 2003).

2.8. CTCFL

CTCFL, Loukinov ve arkadaşları tarafından 2002 yılında tanımlanmış bir proteindir (Loukinov ve ark., 2002). Literatürde BORİS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites), CCCTC-bağlanma faktörü-benzeri protein ya da CTCF-T olarak da adlandırılmaktadır. Aynı isimli gen tarafından kodlanmaktadır.

Yapılan ilk çalışmalarda CTCFL ekspresyonu, erişkin vücudunda normal koşullar altında 'testiste' ayrıca istisnai olarak 'malignant hücrelerde' belirlenebilmiştir (Klenova ve ark., 2001; Loukinov ve ark., 2002). Bu nedenle, "kanser-üreme hücre hattı (germline) ya da bazı kaynaklarda olduğu gibi "kanser-testis antijen ailesinden" biri olarak kabul edilir. (Scanlan ve ark., 2004). Monk ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada (2008) ise preimplantasyon gelişiminin erken aşamalarında, insan oosit ve 4 hücreli embriyolarında ve embriyonik kök hücrelerde eksprese edildiği rapor edilmiştir (Monk ve ark., 2008). Kanser-testis antijenleri, genellikle erkek üreme hattı (germline) ekspresyonu ile sınırlı olup çeşitli kanser türlerinde sıklıkla aktive olabilen immünojenik proteinlerdir (Buoncervello ve ark., 2012; Gjerstorff ve ark., 2015; Hong ve ark., 2005; Simpson ve ark., 2005; Teplyakov ve ark., 2017). Her ne kadar çoğu kanser-testis antijeninin fonksiyonu bilinmese de, bazılarının gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde ve gametogenezin kontrolünde rol oynayabileceği belirtilmektedir (Kalejs ve Erenpreisa, 2005; Old, 2001).

CTCFL'in spermatogenezin erken evrelerinden primer spermatosit ve spermatogonyalarda ekspresyonu tespit edilmiştir. Spermatogenezin sonraki aşamalarından spermatidler ve spermatozoalarda *CTCFL* sessiz hale gelirken, *CTCF* tekrar aktive edilir (Klenova ve ark., 2002; Loukinov ve ark., 2002; Pembrey, 2002). Farelerde yapılan çalışmalarda *Ctcf*'in homozigot delesyonu, erken embriyonik letaliteye

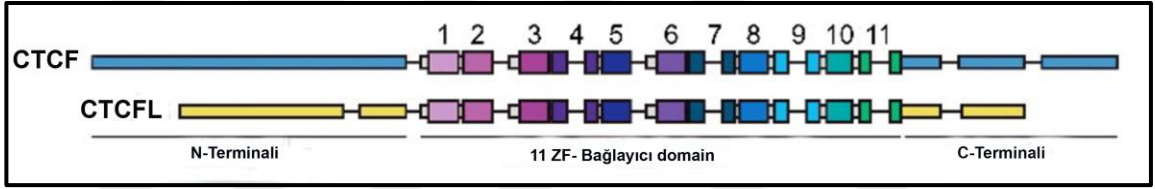
neden olurken, *Ctcf* nakavt farelerde, testis boyutunda küçülme ve gecikmiş gametogenezin dahil olduğu bir dizi spermatogenik defekt ile birlikte subfertilite fenotipi görülmüştür (Sleutels ve ark., 2012; Suzuki ve ark., 2010). Mayozda son derece önemli rol oynadığı bilinen *Gal3stl* (serebrosid sulfotransferaz-CST) transkript düzeylerinin testiste dramatik olarak düştüğü ve spermatogenezde CST'nin transkripsiyonel düzeyde düzenlenmesinde CTCFL'in önemli olduğu gösterilmiştir (Suzuki ve ark., 2010). CTCFL transkriptlerinin düşük ekspresyonu ise; insan beyni, akciğer, böbrek, karaciğer, dalak, mide, kolon, timus ve plasentada belirgin bir şekilde gözlenmiştir (Kholmanskikh ve ark., 2008).

CTCFL'i diğer testis-kanser antijenlerinden farklı kılan nokta ise somatik dokularda übikuitöz olarak eksprese olan bir paraloğunun olmasıdır. Bu paralog " genomun ana işleyicisi" olarak da isimlendirilen ve insan genomunda 14,000 - 25,000 potansiyel bağlanma alanının belirlendiği CTCF proteindir (de Necochea-Campion ve ark., 2011; Phillips ve Corces, 2009). CTCF, çok fonksiyonlu bir DNA bağlayıcı proteindir. CTCF ve CTCFL, tamamen birbirinin aynı merkezi 11-çinko parmak yapısına sahiptir ancak amino (N) ve karboksi (C) uçlarında farklılık göstermektedirler (Şekil 2.6 ve 2.7) (Campbell ve ark., 2010; Loukinov ve ark., 2002). Dolayısıyla her iki proteinin aynı DNA bölgelerine bağlanabileceği fakat amino ve karboksi uçlarındaki farklılıklar nedeniyle farklı ve muhtemelen antagonistik fonksiyonlar gerçekleştirdikleri varsayılmaktadır (Klenova ve ark., 2002; Loukinov ve ark., 2002; Sun ve ark., 2008). CTCF'in aksine, CTCFL metilasyon-bağımsız DNA bağlanma proteini gibi davranır ve gen ekspresyonunu inhibe etmektense aktive eder (Nguyen ve ark., 2008b).

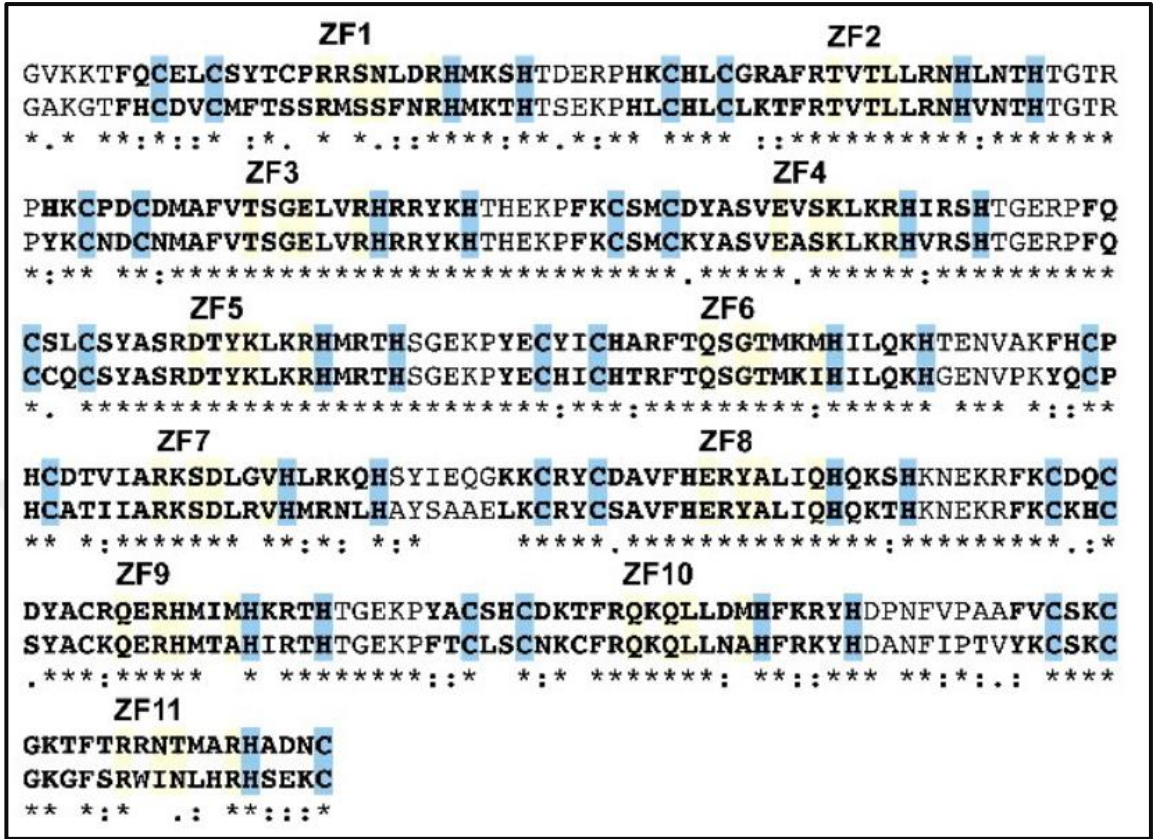
İnsan *CTCFL* DNA'sı 27.931 baz çiftine sahip olup, 11 ekzondan oluşur ve 20q13.31 kromozomunda bulunur. Yapılan çalışmalar sonucunda, insan *CTCFL* geni için 566 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) rapor edilmiştir. İnsan ve diğer omurgalıların *CTCFL* ortologlarında, 11 çinko parmak domeyninin kodlama dizileri arasındaki benzerlik % 80.4 iken, N ve C terminal domeynleri için % 35'in altındadır. *CTCFL* 'in transkripsiyonu promoter A, B ve C olmak üzere üç alternatif promoter tarafından düzenlenir (Renaud ve ark., 2007). 1276 ile 2071 baz çifti aralığında bulunan Promoter A, yüksek transkripsiyonel aktiviteye sahiptir. Promoter B, 996-1106 baz çiftine

sahipken, promoter C ise 622 ile 821 baz çifti aralığında ve başlangıç bölgesinin upstreamında bulunur. Son zamanlarda, çeşitli çinko parmak alanları ile *Ctcf* geninin 23 birleşme (splice) varyantı rapor edilmiştir (Pugacheva ve ark., 2010). *Ctcf* 'in çinko parmak alanlarına örnek olarak, IGF2/H19-ICR bölgesine özgün DNA bağlama bölgelerini içerdiği raporlanmıştır (Kang ve ark., 2007; Pugacheva ve ark., 2010).

İnsan CTCFL proteini 75.7 kilodalton olmakla birlikte 663 amino asitten oluşur. N-terminal ucu 256 amino asit uzunluğundayken, C-terminali ucunda 569-663 arasında amino asit bulunmaktadır. Çinko parmak bölgeleri ise, 23 veya 24 amino asit uzunluğundadır. Fare CTCFL proteini 636 amino asitten oluşmaktadır. Fare CTCFL proteini 73.1 kilodalton olup, bilinen iki fare izoformu rapor edilmiştir.



Şekil 2.6. CTCF ve CTCFL proteinlerinin genomik mimarisinin şematik gösterimleri. C- ve N-terminal ekzonları ince mavi (CTCF) ve sarı (CTCFL) çizgilerle temsil edilmiştir. Korunmuş çinko parmak (ZF) kodlayan ekzonlar, her bir ZF'ye denk gelen ekzonlar ve kodladıkları ZF'ye göre ekzonların sayıları renkli kalın kutular ile belirtilmiştir. ZF'ler 4, 7, 9 ve 11 şeklinde iki ekzon arasında bölünür; bu durumlarda, ZF numarası araya giren intronun üzerine yazılır. ZF bağlayıcılarına karşılık gelen ekzon bölümleri ince gri kutularla gösterilmiştir. İntronlar ise siyah çizgilerle temsil edilmiştir.



Şekil 2.7. İnsan CTCFL (üst sıra) ve CTCF (alt sıra) 11 çinko parmak domeynlerinin karşılaştırılması. Çinko parmak ilişkili diziler mavi renkte vurgulanırken, DNA ilişkili diziler sarı ile gösterilmektedir. Yıldız işaretleri korunmuş aminoasit dizilerini işaret ederken, ‘.’ işareti kuvvetli aminoasit dizilerini (.) ise zayıf olan dizileri işaret etmektedir.

2.8.1. CTCFL ve Epigenetik Düzenleyici Mekanizmalar

Epigenetik kontrol, DNA'daki nükleotid dizilerini değiştirmeyen konformasyonel ancak kalıtılabilir DNA modifikasyonlarını kapsamaktadır (Costa ve ark., 2010). CTCFL promotörünün demetilasyonu, CTCFL'in maksimum aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. CTCFL promotörleri, normal testiste aşırı metile (hipermetile) edilirken, spermde tamamen metillenmemiş halde bulunmaktadır. Bu durumun aksine CTCFL promotörleri normal kan, prostat ve mesane hücrelerinde güçlü bir şekilde metillenmektedir (Hoffmann ve ark., 2006).

CTCFL ile etkileşime giren protein partnerlerinin çoğunun histon metilasyon kompleksleri ile etkileşimde olmasıdır. CTCFL 'in özgül izoformlarını DNA'ya

bağladığı ve sonrasında doğru bir şekilde metiltransferaz komplekslerini genomu çekerek organize ettiği bir senaryo çizmek mümkündür. CTCFL'in (Nguyen ve ark., 2008a) etkileşimde olduğu ortakları ile ilişkilendirilen özgül metiltransferaz kompleksinin, aktif gen transkripsiyonu ile ilişkili H3K4 dimetilasyonlarını katalize ettiği bilinmektedir (Brykczynska ve ark., 2010; Lachner ve ark., 2003). Belirli genomik lokasyonlarda CTCFL'in varlığı genellikle aktif gen ekspresyonuna bağlıdır. Bazı çalışmalar, CTCFL ekspresyonu ile özgül epigenetik değişikliklere bağlantı gösteren H3K4 kromatin metilasyon durumu arasındaki korelasyonu analiz etmiş ve CTCFL ekspresyonunu artıran hücresel koşulların, CTCFL promoter bölgesinde artmış H3K4me2 seviyelerine bağlı olduğunu bulmuştur (Renaud ve ark., 2007; Woloszynska-Read ve ark., 2010). CTCFL ekspresyonunun baskılanması, ters bir etkiye sahiptir. İnsan kolon karsinom hücre hattında CTCFL ekspresyonunun nakavt edilmesi, myc, BRCA1 ve H19'un ekspresyonunun yanı sıra H3K4 metilasyonunun da azalmasına neden olmuştur (Nguyen ve ark., 2008b). Başka bir çalışmada, CTCFL ekspresyonunun baskılanmasının, BAG-1 promoterinde H3K4 metilasyonunu azalttığı ve bu genin ekspresyonunda azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Sun ve ark., 2008).

CTCFL, arjinin metilasyonunu katalize eden bir protein olan protein arjinin metiltransferaz 7 (PRMT7) aktivitesini ve histonların H2A ve H4 rezidülerini uyarmaktadır (Jelinic ve ark., 2006). CTCFL ve PRMT7'nin birlikte ifade edilmesi ICR metilasyonu için çok kritiktir. CTCFL, farklı olarak paternal metillenmiş H19-ICR bölgesine bağlanırken, CTCF metillenmemiş maternal allele bağlanır ve CTCFL'i paternal alele yönlendirir (van de Nobelen ve ark., 2010).

Bu çalışmaların sonuçları CTCFL'in genomda histon metilasyon modifikasyonlarında merkezi bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir (de Necochea-Campion ve ark., 2011).

2.8.2. CTCFL ve Kanser İlişkisi

Kanser hücrelerinde, CTCF ile CTCFL ekspresyonları arasındaki regülasyonun bozularak, bu dengenin kanser gelişimi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (Klenova ve ark., 2002; Robertson, 2005). Bu hipotez, *CTCF* geninin insan kanserlerinin yoğun olarak amplifiye edildiği kromozom 20q13.2 üzerinde lokalizasyon göstermesi ile uyumludur ve bu genin bir onkojen olarak hareket ettiğini de göstermektedir (Klenova ve ark., 2002). CTCFL kanserde tekrar aktive edilen yeni bir onkogen olarak kabul edilmiştir. CTCFL, CTCF aktivitesini inhibe ederek *c-myc* gibi diğer onkogenleri deşifre edebilmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olarak CTCF, *c-myc* onkojen ekspresyonunu baskılamak, bir başka onkogen olan TSP50'nin ekspresyonunu da indüklediği bilinmektedir. Dahası, CTCFL ve CTCF, Rb2 / p130.28 gibi tümör baskılayıcı genleri deregüle edebilir. CTCF tarafından Rb2 / p130, indüklenir ve akciğer kanserinde kromatin modifikasyonlarını düzenler. CTCFL, hTERT transkripsiyonunu aktive ederek kanser hücrelerinde bir apoptoz inhibitörü olarak görev alır. hTERT, telomeraz aktivitesi için gereklidir ve apoptozun endojenöz bir inhibitörüdür. CTCFL, hTERT geninin ilk ekzonuna bağlanır ve CTCF'nin baskıcı etkisine karşı koymak için transkripsiyonuna izin verir. CTCFL'in ekspresyonu azalırken, CTCF ve p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonu artmaktadır (Martin-Kleiner, 2012).

CTCF'in melanoma, meme, nöroblastoma, prostat ve kolon tümör hücre hatlarında ve primer tümörlerde ifade edildiği vurgulanmıştır (Vatolin ve ark., 2005). Bu bulgular farklı gruplarca gösterilen, testiküler (Looijenga ve ark., 2006), ovaryan (Link ve ark., 2013; Woloszynska-Read ve ark., 2007), uterus (Hoivik ve ark., 2014; Risinger ve ark., 2007), meme (D'Arcy ve ark., 2006), kolon (Makovski ve ark., 2012), özefagus (Okabayashi ve ark., 2012), serviks (Velazquez-Hernandez ve ark., 2015), akciğer karsinomalarında (Hong ve ark., 2005; Kang ve ark., 2007) ve epitelyal tümör hücrelerinde (Alberti ve ark., 2015) gözlemlenen CTCFL ekspresyonu ile uyumlu sonuçlar sergilemektedir. Ayrıca servikal kanser kök-hücre benzeri/kanser-başlatıcı hücrelerde (Asano ve ark., 2016) ve embriyonik kanser hücrelerinde (Alberti ve ark., 2014) de varlığı rapor edilmiştir. Dolayısıyla CTCFL, normalde olmaması gerekirken, pek çok kanser hücre hattı ve primer tümörde istisnai olarak eksprese olmaktadır.

Vatolin ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada (2005), indüklenebilir tetrasiklin promoteri kullanılarak hücre kültüründe normal insan dermal fibroblastları ile çalışmalar yapılmıştır. CTCFL'in geçici ekspresyonu çalışılan 25 kanser-testis geninin çoğunda ekspresyon artışına neden olmuştur. Ancak bu çalışmada hücre fenotipin karakterizasyonu ya da geçici olmayan-kararlı *CTCFL* gen ekspresyonu hakkında herhangi bir değerlendirme yapılmamıştır. Literatürde, organizma düzeyinde *in vivo* CTCFL ektopik ekspresyonunun sonuçları üzerine yapılmış sadece grubumuza ait bir çalışma bulunmaktadır (Sati ve ark., 2015).

CTCFL özgül siRNA'ların kullanıldığı bir başka çalışmada, meme kanser hücrelerinde konsantrasyon bağımlı bir şekilde CTCFL ekspresyonunun ve kanser hücrelerinin apoptotik olarak ölümünde bir azalma olduğu ve tümör hücre canlılığının devamlılığı için CTCFL'in rolü olduğu rapor edilmiştir (Dougherty ve ark., 2008). Rapor edilen tümörlü hücre hatlarının% 84'ünde, CTCFL promoterlerinden A ve C'nin ya da B ve C'nin kullanıldığı bilinmektedir. CTCFL'in, *MAGE-A1* ve *NY-ESO-1* gibi oldukça önemli rolleri olan, çok sayıda kanser-testis antijeninin ekspresyonunu ve demetilasyonunu indüklediği ve malignansinin erken dönemlerinde ekspre edildiği gösterilmiştir (D'Arcy ve ark., 2006; Hong ve ark., 2005; Kang ve ark., 2007; Schwarzenbach ve ark., 2014; Vatolin ve ark., 2005). Yapılan bir çalışmada bir hipometilatör olan 5-aza-2'deoksi-sitidin'in (5-azadC), meme, akciğer, mesane, testiküler, prostat, ovaryum ve melanoma kanseri hücre hatlarında CTCFL ekspresyonunu indüklediği rapor edilmiştir. Kanser hücrelerinde 5-azadC tarafından indüklenen CTCFL, çok düşük veya saptanamayan ekspresyonu ile karakterizedir. Ayrıca, 5-azadC ile CTCFL aktivasyonu, akciğer kanserinde bir protoonkogen olan NY-ESO-1'in deregülasyonu ile koreledir. NY-ESO-1, kanserde upregüle olan germ hattına özgü bir genidir (Martin-Kleiner, 2012). Bu nedenle bir kanser- üreme hücre hattı antijeni olan CTCFL, kanser immünoterapi çalışmalarında oldukça önemli bir aday olarak düşünülmektedir (Asano ve ark., 2016; Ghochikyan ve ark., 2007; Joosse ve ark., 2014; Kholmanskikh ve ark., 2008; Loukinov ve ark., 2006; Mkrtychyan ve ark., 2008; Risinger ve ark., 2007). CTCFL'in bir kanser aşısı olarak klinikte kullanımı üzerine, oldukça iyi dergilerde yayınlanmış orijinal çalışmalar mevcuttur (Ghochikyan ve ark., 2007; Loukinov ve ark., 2006; Mkrtychyan ve ark., 2008).

2.8.3 CTCFL ve Vasküler Bozukluklar

Vasküler anomaliler, aslında heterojen bir hastalık grubunu temsil eder. Vasküler tümörler ve vasküler malformasyonlar bu gruba dahil edilmektedir (Blei, 2013). Vasküler malformasyonlar genel olarak, erişkin ve çocuklarda yaklaşık %1-5 oranında görülür (Hochman ve ark., 2011) ve ciddi klinik bulgular ile ortaya çıkar. Bu nedenle günümüzde vasküler malformasyonları anlamak ve tedavi yöntemlerini geliştirebilmek için çok sayıda prospektif randomize klinik deneme yapılmaktadır (Kano ve ark., 2012a; Kano ve ark., 2012c, b; Kano ve ark., 2012d, e; Kano ve ark., 2012f; Laakso ve ark., 2011; Saatci ve ark., 2011). Vasküler patolojilerde rol oynayan patolojik mekanizmalar, ilişkili genlerin tam olarak fonksiyonları, embriyonik gelişim boyunca anjiyogenezi nasıl orkestra ettikleri ve gelişimin postnatal aşamalarında damarları nasıl etkiledikleri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Vasküler bozukluklar ve CTCFL ilişkisine dair detaylı bir literatür taraması yapıldığında, sadece bir çalışmada juvenil anjiyofibroma dokularında CTCFL'in varlığının tanımlandığı, tümör proliferasyonu ve epigenetik disregülasyon ile ilişkilendirildiği tespit edilmiştir (Schick ve ark., 2011). Bilindiği üzere, anjiyofibromalar birçok küçük ve büyük, sıklıkla dilate olmuş damar kanalının bulunduğu benign bir fibröz doku neoplazmasıdır. Bazı Juvenil anjiyofibromalarda *Ctcf* gen duplikasyonu olduğu belirtilmiştir (Scanlan ve ark., 2004). Juvenil anjiyofibromalarda ayrıca VEGF, insülin benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2), TGF- β ve diğer büyüme faktörlerinin seviyelerinde artış izlenmektedir (Saylam ve ark., 2006).

Çocukluk dönemine ait (infantil) hemanjiyomalarda CTCFL ekspresyonunun olduğu rapor edilmiştir (Schultz ve ark., 2015). Juvenil anjiyofibromalarda olduğu gibi, infartil hemanjiyomalarda da IGF2 aşırı ekspre edilmektedir. Hemanjiyomalar, mikroskopik kan damarlarının büyümesi olarak tanımlanan benign vasküler neoplazmalarıdır. Bebeklik döneminde en sık görülen tümör türüdür.

2015 yılında sonuçlarımızı yayınladığımız bir çalışmamızda, embriyogenez süresince ektopik *Ctcf* gen ekspresyonunun, göz, kas, akciğer, karaciğer, beyin, böbrek gibi birçok organda gelişimsel bozukluk ve vasküler anomalilerle sonuçlandığını raporladık (Sati ve ark., 2015). Etkilenen yavruların baş bölgesinde belirgin hemoraj ve vasküler bozukluk fenotipinin önemli bir kısmını oluşturmaktaydı. Bulgularımız, *Ctcf* geninin,

embriyogenez, fetal gelişim anomalileri ve vasküler bozukluklar ile ilişkisini ortaya koyan literatürdeki ilk çalışma olmuştur. Ayrıca bir TÜBİTAK projesi kapsamında laboratuvarlarımızda CTCFL ile insan serebral kavernoza malformasyon (CCM) ve arteriyovenöz malformasyon (AVM) patolojileri arasındaki potansiyel ilişkiyi de araştırmaktayız.



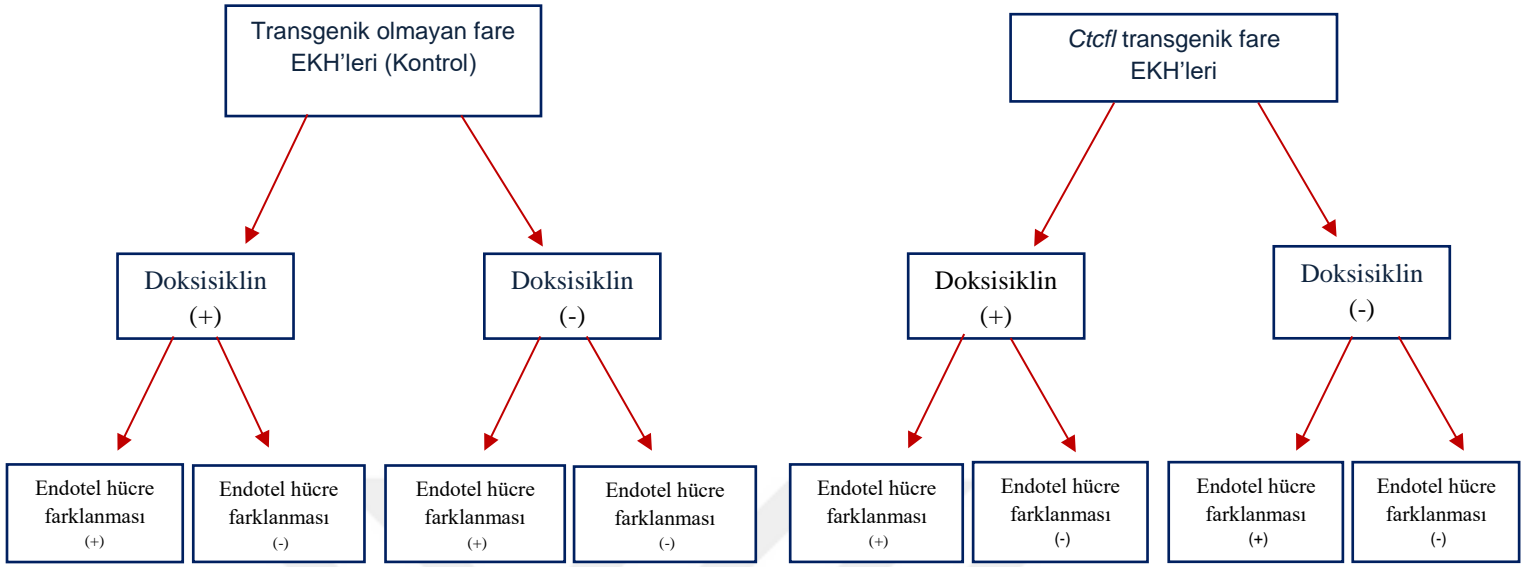
3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Yale Üniversitesi ile ortaklaşa gerçekleştirdiğimiz daha önceki projemizde oluşturmuş olduğumuz *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan fare EKH kullanıldı. Bu kök hücre hatları, genotipik olarak *Ctcf Cre rtTA* transgenik erkek farelerin, C57B/6J dişiler ile çiftleştirilmesi sonucu elde edilen blastosistlerden elde edildi. Embriyonik 0.5 günde vajinal plak kontrolü yapıldıktan sonra blastosistler E3.5 günde toplanmıştır.

Blastosistler, Yale Üniversitesi'nde 37 °C'de %5 O², %5 CO² ve %90 N² içeren bir inkübatörde KSOMAA medyumunda kültüre edildi (Biggers ve ark., 2000). Oluşturulan EKH'leri, EKH medyumunda inaktive edilmiş fare embriyonik fibroblast hücreleri (MEF) ile birlikte kültüre edildi. Kùltürler, EKH morfolojisinin belirlenebilmesi için gözlenerek, kök hücreler belirlendiği zaman, hücreler tripsinize edilerek yeniden pasajlandı.

Hipotezimiz doğrultusunda oluşturduğumuz deney grupları aşağıda belirtilmiştir (Şekil 3.1). Ektopik *Ctcf* ekspresyonunun yapılacağı transgenik deney grubu ile transgen içermeyen ve gen indüksiyonunun yapılmadığı kontrol grupları çalışmaya dahil edildi. Her grup kendi içerisinde endotel yönünde farklılandırılan ve farklılandırılmayan şekilde iki gruba ayrıldı.

Transgenik olmayan, normal embriyonik kök hücrelere da doksisisiklin verilerek, transgen olmadan doksisisiklinin olası etkileri de gözlemlendi.



Şekil 3.1. Deney grupları özetlenmiştir.

Ctcf transgenik ve transgenik olmayan fare EKH'leri, mitotik olarak inaktive edilmiş MEF hücreleri ile kültüre edildi.

3.1. MEF Hücrelerinin Eldesi ve İzolasyonu

MEF izolasyonu için çiftleşmeden sonra E14.5 günde olan C57BL6 türü gebe dişi fareler kullanıldı. Vajinal tıkacın gözlemlendiği ilk gün E0.5 olarak kabul edildi.

1. İzolasyon işlemine başlamadan işlem sırasında kullanılan aletler (makas, pens, bistüri), cam şişe, petri ve steril 1x PBS (phosphate buffer saline) (Thermo katalog no: 14200-075) otoklavlanıp steril hale getirildi.

Steril 1x PBS (phosphate buffered saline) Solüsyonunun Hazırlanışı

- Stok 10x PBS solüsyonundan 50 ml alınarak 450 ml steril distile su içinde dilüe edildi.
 - Elde edilen 1x PBS solüsyonu, otoklavlandıktan sonra kullanıldı.
 - Oda ısısında muhafaza edildi.
2. E14.5 günde olan gebe dişi fare, etere konulduktan sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çıkarılan uterus boynuzları, içinde 10 ml otoklavlanmış PBS bulunan cam petriye alındı.

3. İçinde embriyoların bulunduğu petriler, laminar flow altında izolasyon işlemine tabii tutuldu.
4. 2 pens yardımıyla her embriyonun plasenta ve çevresindeki fetal membranlardan ayrılması sağlandı (Şekil 3.2).
5. Beyin ve kırmızı renkli organlar kesilerek bir kenara ayrıldı, steril 1x PBS ile yıkanarak fazla kanın uzaklaştırılması gerçekleştirildi.
6. Geriye kalan beyaz kısımlar, bir bistüri yardımıyla steril 1x PBS içerisinde iyice parçalanarak 'pipetlenebilir' duruma getirildi.
7. Parçalanmış hücreler, 5 ml %0.25 (1x) Trypsin-EDTA (her embriyo için 1-2 ml olacak şekilde) (GIBCO, katalog no: 25200) bulunan falkon tüplere (BD katalog no: 352096, 15 mm) konularak iyice karışması sağlandı ve 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
8. 30 dakikanın sonunda hücre süspansiyonunun üzerine, 5 ml MEF medyumunu ilave edildi.
9. 5 dakika, 1000 rpm, 25 °C'de gerçekleştirilen santrifüj işleminden sonra, süpernatant kısmı aspire edilerek uzaklaştırıldı.
10. Santrifüj işlemi sırasında, daha önceden %0.1 jelatinle (Sigma, katalog no: G1890-100G) kaplanılan 100 mm'lik petrilere 10 ml MEF medyumunu ilave edildi.

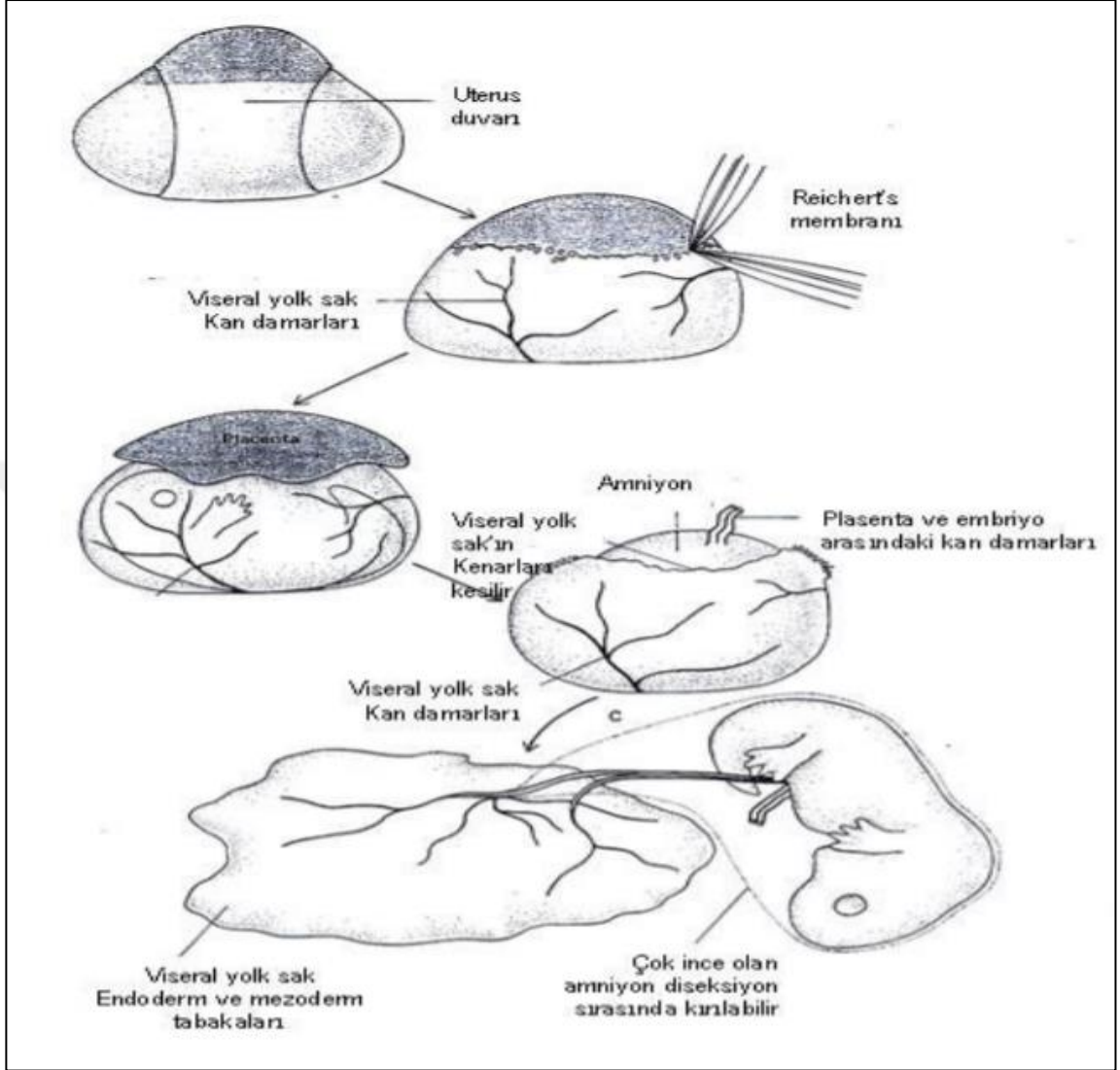
%0.1'lik Jelatin Solüsyonu Hazırlanışı

- 0.5 gr jelatin (Sigma, katalog no: G1890-100G) tartılarak 500 ml steril distile suda dilüe edildi ve otoklavlandı
- Kültür petrilerinin (Falcon, katalog no: 351029, 100 mm x 15 mm) jelatinle kaplanması işlemi laminar flow içinde yapıldı.
- Petri kaplarının içine uygun miktarda jelatin solüsyonu eklenerek oda ısısında 40-45 dakika inkübe edildi.
- Bu sürenin sonunda fazla jelatin solüsyonu petri kaplarından aspire edilerek, petriler 10-15 dakika oda ısısında kurumaya bırakıldı.
- Fazla %0.1'lik jelatin solüsyonu oda ısısında saklandı.

11. Hücre peletinin üzerine 5 ml MEF medyumunu ilave edilip resüspense edildi. Bu hücre süspansiyonundan, içinde MEF medyumunu bulunan petrilere, her embriyo bir petriye eşdeğer olacak şekilde paylaştırıldı. Bu petrilere pasajın 1. günü olarak kabul edildi. Ertesi gün hücreler mikroskop altında kontrol edilip medyumları değiştirildi.

Tablo 3.1. Fare Embriyonik Fibroblast (MEF) medyumunun içeriği.

MEF Medyumunun İçeriği (550 ml)	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles medium) (GIBCO, katalog no: 11965-092)	500 ml
FBS (Fetal Bovine Serum) (GIBCO, katalog no: 26140-079)	50 ml
Pen/Strep/Glutamin (GIBCO, katalog no: 10378-016, 100X)	5.5 ml



Şekil 3.2. MEF izolasyonunu gerçekleştirmek amacıyla kullanılan fare fetuslarının diseksiyonu gösterilmiştir (İstanbul Memorial Hastanesi, 2015).

3.2. MEF Hücrelerinin Pasajlanması

1. Kültür işlemine başlamadan 20 dakika önce MEF medyum ve % 0.25 (1x) tripsin-EDTA 37 °C'lik su banyosuna konularak ısılarının 37 °C'ye gelmesi sağlandı.
2. Laminar flow içinde öncelikle, 100 mm'lik 0.1% jelatin ile kaplı yeni petrilerin üzerine hücre grubunun ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı ve içine 10 ml MEF medyum eklendi.
3. Hücreler CO² inkübatöründen alınarak, mikroskop altında incelendi. Petrideki medyum aspire edildi.

4. Hücre tabakasına dokunulmadan petrinin köşesinden 10 ml steril 1x PBS eklenip, yüzey yıkandı ve PBS dikkatlice aspire edildi.
5. Steril 1x PBS solüsyonu aspire edilip, yeni bir pipet kullanılarak her petri için 2-3 ml olacak şekilde tripsin-EDTA ilave edildi ve 37 °C, %5'lik CO² inkübatöründe 2-3 dakika bekletildi.
6. Mikroskopta hücrelerin petri tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edildi.
7. Bu arada 15 ml'lik falkon tüpüne 5 ml MEF medyumu eklendi.
8. Hücrelerin tümünün petri tabanından kalktığından emin olunduktan sonra tripsin-EDTA'lı hücre süspansiyonu, içinde 5 ml MEF medyumu bulunan falkon tüpe eklendi.
9. 25 °C, 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
10. Süpernatant kısımları aspire edilip, hücre pelletinin üzerine 3 ml MEF medyumu eklendi (1:3 oranında).
11. Hücrelere zarar vermeyecek şekilde hücre süspansiyonu birkaç kez pipetlendi. Bu işlem yapılmadığı takdirde hücreler kültür işleminden sonra küme halinde kalabilir.
12. 10 ml MEF medyumu bulunan 0.1% jelatin ile kaplı petrilere her birine 1ml bu hücre süspansiyonundan ilave edildi.
13. Hücrelerin homojen dağılımı mikroskop altında kontrol edildikten hemen sonra petrilere 37 °C, %5'lik CO² inkübatörüne kaldırıldı.

3.3. MEF Hücrelerinin Dondurulması ve Saklanması

Hücrelerin dondurulması, hücreler yeniden çözüldüğünde canlılıklarının korunması açısından çok dikkat edilmesi gereken bir işlemdir.

1. Konfluent haldeki hücreler inkübatörden alınarak içerdikleri medyumlar aspire edildi ve steril 1x PBS ile yıkandı. Her 100 mm'lik petriye 2-3 ml olacak şekilde % 0.25 (1x) Tripsin-EDTA eklendi.
2. 37 °C'de %5 CO² içeren inkübatörde hücrelerin tümü petri tabanından kalkıncaya kadar yaklaşık 2-3 dakika bekledi (hücreler mikroskop altında kontrol edildi).

3. Aynı zamanda 15 ml'lik falkon tüplere 5 ml MEF medyumunu ilave edildi.
4. Hücrelerin tamamının petri tabanından kalktığından emin olunduktan sonra, tripsinize edilmiş hücre süspansiyonu pipet yardımıyla içinde MEF bulunan falkon tüplere konuldu. MEF medyumunu ile karıştırılarak tripsinin inaktive hale gelmesi sağlandı.
5. 25 °C, 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
6. Süpernatant aspire edildikten sonra hücre peletine yaklaşık 2 ml dondurma medyumunu eklendi (1:2 oranı).

Tablo 3.2. MEF hücrelerinin dondurma işlemi için kullanılan medyumun içeriği.

MEF Dondurma Medyumunu (100 ml)	
MEF Medyumunu	85 ml
FBS (%5)	5 ml
DMSO (%10)	10 ml

7. Hücre süspansiyonu 'kriyovial' adı verilen tüplere 1ml olacak şekilde bölündü. Hücrelerin bulunduğu tüpler dondurma kabına (Mr. Frosty Freezing Container) konuldu ve -80 °C'de bir gece bekletildi. Bu işlem hücrelerin aşamalı bir şekilde dondurulabilmesi için bu şekilde uygulanmıştır.
8. Ertesi gün hücreler -196 °C'deki sıvı azot tankına transfer edildi. Kriyotüpün konulduğu yerleşim kaydedildi.

3.4. MEF Hücrelerinin Çözülmesi ve Tekrar Kültüre Edilmesi

1. Hücreler sıvı azot tankından çıkarılır çıkarılmaz 37 °C'lik su banyosunda hızla çözüldü. Sonrasında kriyotüpün etrafı %70'lik alkolle iyice temizlendi.
2. Aynı zamanda laminar flow içinde, 15 ml'lik falkon tüplerine oda sıcaklığına getirilmiş 5 ml MEF medyum eklendi. Hücreler çözüldükten sonra MEF medyumunu bulunan falkon tüplere eklendi.
3. 25 °C, 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Böylece dondurma medyumunun içeriğinde bulunan ve toksik etkiye sahip olan DMSO'nun (Sigma, katalog no: D2650) uzaklaştırılması sağlandı.

4. Süpernatant aspire edilip hücre peletine MEF medyum eklendi ve resüspense edildi.
5. Nazikçe pipetlenen hücre süspansiyonu içinde 10 ml MEF medyum bulunan jelatin kaplı 100 mm'lik petrilere 1ml olacak şekilde ilave edildi. Petrinin üzerine ilgili pasaj numarası yazıldı.
6. Hücreler mikroskop altında kontrol edildi ve 37 °C'de %5'lik CO² içeren inkübatöre kaldırıldı.
7. Ertesi gün mikroskop altında hücre canlılığı incelendi ve medyumları değiştirildi.

3.5. Mitomisin C (MitoC) ile MEF Hücrelerinin İnaktivasyonu

1. En az %80-100 konfluent olan MEF hücre petripleri, laminar flow içine alınarak medyumları aspire edildi.
2. Her petriye 10 ml MitoC eklenip, 37 °C, %5 CO² içeren inkübatöre konuldu ve 3 saat inkübe edildi.

Mitomisin C Stok Solüsyonunun Hazırlanışı

- 2 mg MitoC (Sigma, katalog no: M0503-2MG) içeren stok şişenin içerisine 1ml steril 1x PBS eklenerek hazırlandı.
 - Hafifçe sallanarak homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra kullanıldı (5 µL/1mL) Stok MitoC, +4 °C'de muhafaza edildi.
3. 3 saatin sonunda inaktivasyon medyumunu aspire edilip, petripler 10 ml steril 1x PBS ile yıkandı.
 4. Steril 1x PBS ortamdan uzaklaştırılıp, her petri için, hücre yüzeylerini kapatacak şekilde 100 mm petri kabı için, 2-3 ml %0.25 (1x) Tripsin-EDTA eklendi.
 5. 37 °C'de %5 CO² içeren inkübatörde hücreler petri tabanından kalkıncaya kadar yaklaşık 3-5 dakika bekletildi. Mikroskop altında hücreler kontrol edildi.
 6. Aynı zamanda 15 ml'lik falkon tüplere 5 ml MEF medyum eklendi. Tripsinize edilmiş hücre süspansiyonu pipet yardımıyla içinde MEF bulunan falkon tüplere ilave edildi (1:3 oranında).
 7. 25 °C, 5 dakika, 1000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi.

8. Süpernatant uzaklaştırılıp, peletin üzerine MEF medyum eklendi ve pipetleme işlemi nazikçe yapıldı. Bu işlem kültürün devamında hücre kümelenmesinin olmaması için dikkatlice yapılmalıdır.
9. 100 mm'lik jelatin kaplı petrilere 10 ml MEF eklendi ve üzerine her bir petri için 1 ml hücre solüsyonu ilave edildi.
10. Hücre petrileri kültürün devamı için 37 °C'de %5 CO² içeren inkübatöre kaldırıldı.

3.6. Kültür Ortamlarının Kollajen İle Kaplanması

1. İnsan plasental tip IV kollajen (Sigma, katalog no:C-7521), 2 mg/ml'lik bir konsantrasyonda % 0.2 asetik asit içinde dilüe edildi. Bu işlem yaklaşık 1 saat sürdü.
2. Hazırlanan kollajen solüsyonu daha sonra 5 µm'lik filtreden geçirildi.
3. Yukarı kısımda kalan filtrat, 0.45 µm'lik selüloz asetat filtre aparatı ile tekrar süzüldü ve bu kısım ihtiyaç duyulana kadar +4°C'de saklandı.
4. Kullanılmak üzere kollajen solüsyonu 1:5 oranında steril su ile seyreltildi.
5. Her petri için farklı miktarda belirtilen kollajen solüsyonu (35 mm'lik petri: 2 ml, 60 mm'lik petri: 3 ml, 100 mm'lik petri: 5 ml) kültür ortamlarına eklendi ve UV altında 12-18 saat aralığında kurumaya bırakıldı.
6. Ertesi gün kollajen solüsyonu aspire edildi ve kurumaya bırakıldı.
7. Kültür ortamlarının kuruma işlemi tamamlandıktan sonra steril 1x PBS solüsyonu ile 2 kez yıkama işlemi yapıldı (35 mm'lik petri: 1 ml, 60 mm'lik petri: 1.5 ml, 100 mm'lik petri: 2.5 ml)
8. Tekrar kurumaya bırakıldı ve sonrasında parafinle kaplanıp ihtiyaç duyulana kadar +4°C'de muhafaza edildi.

3.7. İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücre (HUVEC) kültürü

HUVEC hücreleri, endotel indüksiyonu deneyleri için pozitif kontrol olarak olarak kullanıldı. Hücreler %0.1 jelatinle kaplanılan 100 mm'lik petrilere ekildi. EGMTM-2 (Lonza, katalog no: CC4176) kullanılarak hücrelerin büyümeleri sağlandı. HUVEC dondurulması için %10 DMSO ve %90 FBS karışımı kullanıldı.

3.8. Fare Embriyonik Kök Hücre Kültürü

Fare EKH'lerin pluripotensi özelliğinin korunması, farklanmanın engellenmesi için kültür medyumuna LIF ilave edildi. Fare EKH kültürü için kullanılan medyumun içeriği **Tablo 3.3.**'de sunulmuştur.

Tablo 3.3. Fare EKH kültürü sırasında kullanılan medyumun içeriği.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagles medium) (GIBCO, katalog no: 11965-092)	480 ml
Fetal bovin serum (FBS) (GIBCO, katalog no: 26140-079)	90 ml
Pen/Strep/glutamin (GIBCO, katalog no: 10378-016, 100X)	6 ml
Non-esansiyal amino asitler (NEAA) (100X) (Thermo, katalog no:11140-050)	6 ml
β -mercaptoethanol (14.3M) (American Bio. katalog no: AB01340-00030)	6 μ L
LIF (ESGRO, 10^7 U/ml) (Millipore, katalog no: ESG1107)	60 μ L

3.9. *Ctcf* Gen Ekspresyonunun İndüksiyonu

Ctcf transgenik kök hücrelerde yer alan tet promoteri, ters (reverse) Tetrasiklin transkripsiyonal aktivatör (*rtTA*) transjeni ile kombine olmadığı sürece inaktiftir. Bu nedenle, *Ctcf* transgenleri, transgenik hücrelerde sessiz olarak bulunmaktadır. Deneylerimizde kullandığımız *Ctcf* transgenik fare EKH'leri, yapısında *rtTA* transgenleri de içermektedir. Bu şekilde, gerek *Ctcf* gerekse *rtTA* transgenleri, kültür ortamında doksisisiklin (Sigma, katalog no: D9891-1G) bulunduğu zaman, *Ctcf* genini eksprese edebilir. Kültür medyumuna 2 μ g/ml doksisisiklin ilavesi ile *Ctcf* gen indüksiyonu yapıldı. Kontrol ve *Ctcf* *rtTA* transgenik fare EKH'lerinin her ikisine de doksisisiklinin eklendiği gruplar oluşturularak ve karşılaştırmalar yapıldı.

3.10. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) metodu

Doksisiklin ile ektopik gen ekspresyonunun sağlanıp sağlanmadığını kontrol etmek için, *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan fare EKH hücrelerinde kantitatif gerçek zamanlı PCR metodu uygulandı. Bu amaçla *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan fare EKH hücreleri, tripsinize edildi. *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan fare EKH'lerinden RNA izolasyonu gerçekleştirildi. *Ctcf1* gen indüksiyonunun sağlandığı hücrelerde analizlere devam edildi.

Hücrelerden total RNA izolasyonu RNeasy Kiti (Qiagen, katalog no:74104) kullanılarak üretici firmanın tavsiyeleri doğrultusunda yapıldı. Total RNA, RNaz içermeyen DNaz (Qiagen, RNase-Free DNase Set, katalog no: 79254) ile muamele edilerek DNA kontaminasyonu engellenmiştir.

3.11. RNA izolasyonu

1. *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan EKH'lerin bulunduğu petripler inkübatörden alınarak medyumları aspire edildi ve oda ısısındaki steril 1xPBS ile yıkandı.
2. Petrilere 2-3 ml %0.25 (1x) Tripsin-EDTA eklenerek inkübatörde 3-5 dakika bekletildi. Böylece hücrelerin petri tabanından kalkması sağlandı. Her 2 gruba ait tripsinize hücre süspansiyonları, 15 ml'lik falkon tüplere alınarak üzerine soğuk steril 1xPBS den 10 ml eklendi.
3. Oda ısısında, 5 dakika, 1000 g'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi ve süpernatant kısımları uzaklaştırıldı.
4. Peletlerin zerine 600 μ L RLT tamponu eklendi. Karışım pipet ile QIAshredder (Qiagen, katalog no:74104) evirme kolonuna aktarıldı. 2 dakika en yüksek devirde (14,600 rpm) santrifüj yapıldı. Pipet yardımıyla süpernatant alındı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. İlerleyen aşamalarda sadece bu süpernatant kullanıldı. Kullanılmadan nce RLT tamponuna beta-merkaptetanol eklendiğinden emin olundu.
5. Lizat aynı şekilde 3 dakika boyunca en yüksek devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant dikkatlice pipet yardımıyla alındı ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

6. Lizattan 350 µL alınarak üzerine 350 µL %70'lik etanol ilave edildi. Pipetlenerek hızlı bir şekilde karıştırıldı. QIAshredder homojenizasyonundan artan örnek, -80°C'ye kaldırıldı.
7. 700 µL örnek, çökmeler ile birlikte 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy çevirme kolonuna transfer edildi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama kabı tekrar kullanıldı.
8. Kolon membranını yıkamak için, kolonun ortasına 350 µL RW1 tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü ve toplama kabı tekrar kullanıldı.
9. DNase muamelesi: 10 uL DNase I stok çözeltisi 70 µL RDD tamponuna eklendi. Tüp yavaşça ters çevirerek karıştırıldı. Tüpün kenarlarında kalmaması için santrifüj edildi.
10. Hazırlanan DNase I enzim karışımından, 80 µL RNeasy çevirme kolonunun ortasından eklendi ve 15 dakika boyunca oda ısısında (20-30 °C) bekletildi.
11. RNeasy çevirme kolonlarına 350 µL RW1 tamponu eklendi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü.
12. Yeni toplama tüpleri kullanıldı. 500 µL RPE tamponu RNeasy çevirme kolonuna transfer edildi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı kısım döküldü.
13. RNeasy çevirme kolonuna aynı şekilde tekrar 500 µL RPE tamponu ilave edildi. Kapağı kapatılıp 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
14. RPE tamponunu ortamdaki uzaklaştırmak için, RNeasy çevirme kolonu yeni toplama tüplerine yerleştirilerek örnekler en yüksek devirde (14,600 rpm) 1 dakika santrifüj edildi.
15. RNeasy çevirme kolonu, 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne yerleştirildi. Membranın tam ortasına 40 µL RNaz içermeyen su eklenerek 1 dakika oda ısısında beklendi. RNA'nın elüsyonu için 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. RNA örnekleri kısa sürede çalışılacaksa -20 °C'de, uzun vadede çalışılacaksa -80 °C'de saklandı.

Elde edilen RNA örnekleri EpochTM Multi-Volume spektrofotometre (BioTek) sistemi ile ölçüldü ve yaklaşık 600 ng RNA cDNA'ya dönüştürüldü.

3.12. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

Reaksiyonun hazırlanacağı yüzey DNAoff (Takara, Clontech, katalog no:TAK9036) ile temizlendi. QuantiTect Reverse transkripsiyon kiti (Qiagen, katalog no: 205311) kullanıldı. Her bir reaksiyon 3 defa tekrarlandı.

1. cDNA temizleme tamponu (gDNA wipeout tamponu), ters (Reverse) transkriptaz enzimi, RT tamponu, RT primer karışımı ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında (15–25 ° C) çözülürken, RNA'ların buz üzerinde çözülmesi sağlandı.
2. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu Tablo 3.4'e göre buz üzerinde hazırlandı ve santrifüj edilip buz üzerinde muhafaza edildi.

Tablo 3.4. cDNA eldesi sırasında kullanılan karışımın içeriği

İçerik	Miktar
cDNA temizleme tamponu, 7x	2 µL
RNA (1:10 oranında dilüe)	Değişken (600ng)
RNaz içermeyen su	Değişken
Toplam miktar	14 µL

3. 2 dakika 42 °C'de inkübe edildi ve sonrasında hemen buz üzerine konuldu.
4. Buz üzerinde ters transkripsiyon ana karışımı hazırlandı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Ters transkripsiyon reaksiyonuna ait bileşenler.

İçerik	Miktar
Ters transkripsiyon ana karışımı	
Ters transkriptaz	1 µL
RT Tamponu	4 µL
RT Primer karışımı	1 µL
Şablon (template) RNA ve tüm genomik DNA eliminasyon reaksiyonu (önceki basamaktan)	14 µL
Toplam miktar	20 µL

5. Ters transkripsiyon ana karışımını içeren her tüpe şablon RNA eklendi.
6. 42 °C'de 15 dakika inkübe edildi.
7. Ters transkriptazı inaktive etmek için 95 °C'de 3 dakika inkübe edildi.
8. Elde edilen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.13. qRT-PCR protokolü

SsoFast™ EvaGreen® Supermiksi (BioRad, katalog no: 172-5201) kullanıldı (Tablo 3.6). *Ctcf1* ve *Gapdh* gen ekspresyonları için uygun primerler dizayn edildi (Tablo 3.7). qRT-PCR, LightCycler 1.5 Instrument (Roche) real-time PCR cihazı kullanılarak ölçümler yapıldı. Her bir gen için hazırlanmış olan tüpler qRT-PCR cihazında okutularak software programı yardımıyla Ct (siklus eşik değerleri) değerleri belirlendi. Her bir reaksiyon üç defa tekrarlanarak, karşılaştırmalı $\Delta\Delta C_T$ metodu kullanılarak, *Gapdh* gen ekspresyonu ile normalize edildi. Amplifikasyon, 40 siklusta gerçekleştirildi. Ayrıca, erime eğrisi (melting curve) analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen T_m (erime noktası) değerleri karşılaştırılıp, PCR ürünlerinin özgüllüğü değerlendirildi.

Ctcf1 qRT-PCR Reaksiyon Kurulumu

Tablo 3.6. qRT-PCR reaksiyonunda kullanılan karışımın içeriği.

Bileşen	Reaksiyon başına hacim
SsoFast™ EvaGreen® Supermiksi	10 µL
10 µM İleri primer	1 µL
10 µM Geri primer	1 µL
cDNA (1:10 dilue edilmiş)	8 µL
Toplam hacim	20 µL

1. basamak 98 °C2 dakika
2. basamak 98 °C5 saniye
3. basamak 61 °C10 saniye
4. basamak 72 °C15 saniye

okuma

5. basamak 2. basamağa 40 kez tekrar
6. basamak 95 °C10 saniye
7. basamak 65 °C – 95 °C 'ye erime eğrisi, 0.5 °C artış 10 saniye

okuma

Tablo 3.7. qRT-PCR metodunda kullanılan primerler.

qRT-PCR Primerleri	
<i>Ctcf1</i> transgeni (~163 bp)	F 5'- ACC AGT GTT CCA GGG GCA AA -3' R 5'- GAC ACA GAT GTG GCC GTT CG -3'
<i>Gapdh</i> (~150 bp)	F-‘5-CAA TGC ATC CTG CAC CAC CAA CT-3’ R-‘5-TCA CGC CAC AGC TTT CCA GAG-3’

3.14. Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi

3.14.1. %1’lik Agaroz Jelin Hazırlanması

1. 50x Tris-Asetat-EDTA (TAE) tamponundan (Fisher, katalog no: BP1332-1) 10 ml alınarak üzerine 490 ml distile su eklenip dilüe hale getirildi.
2. Kullanılcan yürütme tankına uygun gerekli miktarda agaroz (Sigma, katalog no: A9539) tartılıp bir erlene konuldu. Üzerine 1x TAE tamponundan eklendi (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. %1’lik agaroz jelin hazırlanışı.

Malzemeler	%1’lik Jel için
Agaroz	1.2 gr
TAE 1x	120 ml
Etidyum bromid (EtBr)	5 µL

3. Hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırında kaynatıldı.
4. EtBr eklendikten sonra çalkalayarak tüm çözeltiye homojen bir şekilde dağılması sağlandı.
5. Solüsyon tanka yavaşça döküldü ve donması için en az 25 dakika beklendi.

3.14.2. Örneklerin Agaroz Jelde Yürütülmesi

1. Jel tanka dikkatlice yerleştirildi.
2. Tank jelin üstünü kapatacak kadar 1x TAE ile dolduruldu.
3. 15 µL örnek yükleme solüsyonu (Invitrogen, katalog no: 10816-015) ile karıştırılıp jele yüklendi.
4. İlk kuyucuğa da belirteç (Fermentas, katalog no: SM0333) konuldu.
5. 90 V da -'den + yönüne doğru yürütüldü.

3.15. Western Blot Metodu

Deney gruplarına ait lizat örneklerinde CTCFL (Abcam, katalog no: ab126778) ve β -aktin (Abcam, katalog no: ab6276) protein düzeyinde ekspresyon seviyelerinin semikantitatif olarak değerlendirilmesi için Western Blot analizi yapıldı.

3.15.1. Western Blot Metodu İçin Hücre Lizatı Eldesi

1. İnkübatörden çıkartılan konfluent haldeki transgenik ve transgenik olmayan gruplara ait hücre, mikroskop altında kontrol edildikten sonra buz üzerine alındı. İşlemler laminar flow içinde gerçekleştirildi.
2. Medyumlar uzaklaştırıldıktan sonra petrilere 10 ml buz soğukluğunda steril 1x PBS eklendi ve yıkama işleminin ardından PBS aspire edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlandı.
3. Buz üzerinde bulunan petrilere (her 100 mm'lik petri için 500 µL RIPA+10 µL proteaz inhibitör kokteyli (PIK) olacak şekilde) RIPA+PIK karışımından eklendi ve 30 dakika beklendi.
4. Petrinin her köşesi hücre kazıyıcı (cell scraper) ile iyice kazınarak tüm hücrelerin solüsyon içinde toplanması sağlandı.
5. Hücre lizatları toplanarak 1.5 ml'lik ependorflara konuldu ve muhafaza edilmek üzere -20 °C'e kaldırıldı.

3.15.2. Western Blot Protokolü

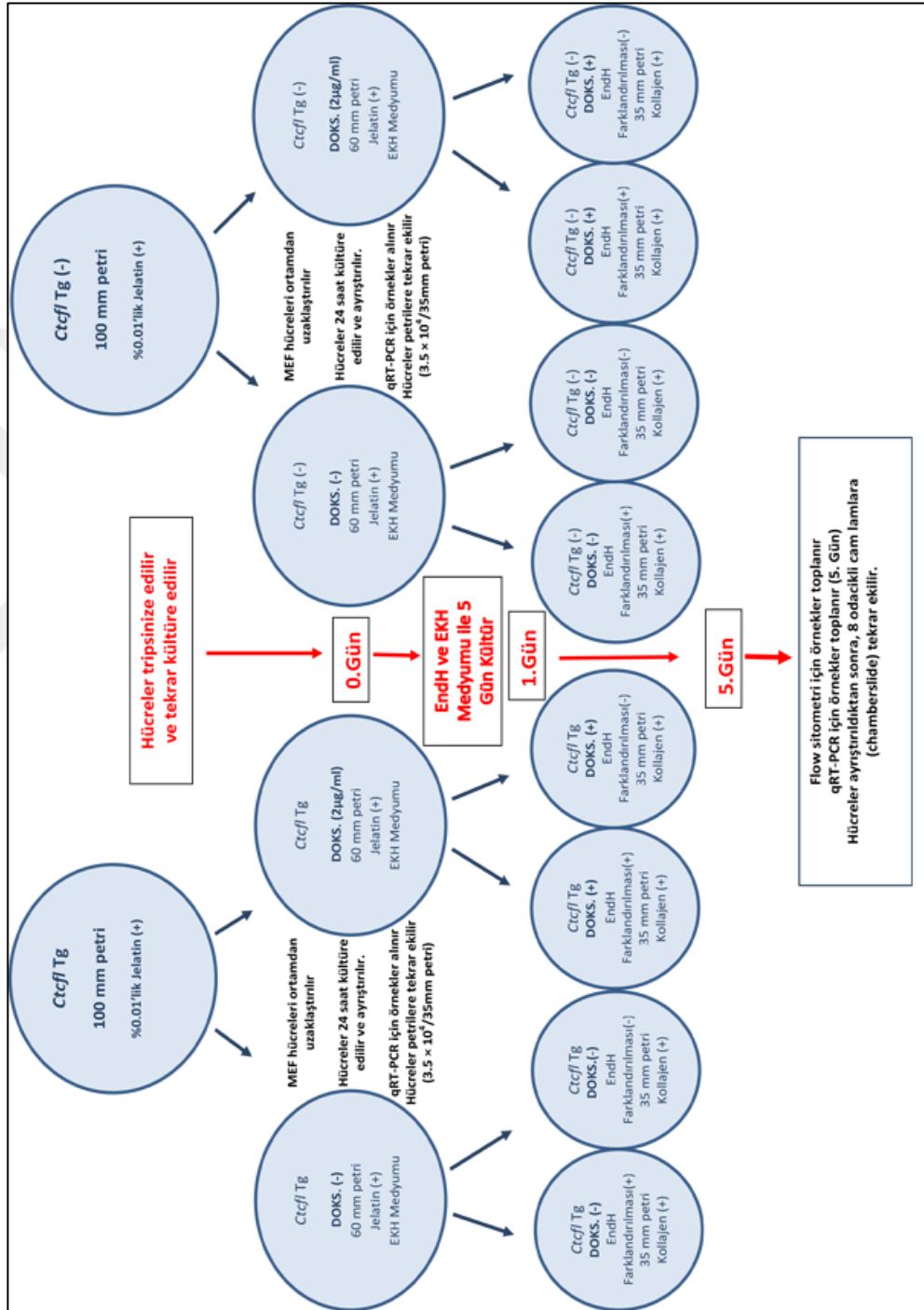
1. Hücrelerin içerdiği protein miktarları BCA protein assay kiti (Vector Lab, katalog no: PK-6100) kullanılarak tespit edildi; elektroforezden önce, 100 °C'deki suda örnekler 5 dakika kaynatılıp, jel elektroforezi için uygun yüzdelerde poliakrilamid jel hazırlandı.
2. Her kuyucuğa 20 µL örnek, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenerek, Mini Protean Sistem III tankının içine yerleştirildi. Mini Protean Sistem III tankına elektroforez solüsyonu eklenerek, tank güç kaynağına bağlandı. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 100 Volt, 50 miliamperde 80-100 dakika elektroforez edildi.
3. Elektroforez sonrasında proteinler Mini protean III sistemi kullanılarak PVDF membrana transfer edilerek, Tris tamponlu tuz solüsyonu + % 0.1 Tween-20 (Merck, katalog no: 8221840500) (TBS-T) ile hazırlanan % 5'lik yağsız kuru süt tozu (BioRad, katalog no: 170-6404) ile oda ısısında 1 saat çalkalayıcı üzerinde bloklama işlemi gerçekleştirildi.
4. Membran, üreticinin tavsiyesine göre hazırlanmış ve bloklama solüsyonu içinde sulandırılmış olan primer antikor (CTCF, 1:3000 ve β-aktin, 1:2000) kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı.
6. Membran, primer antikor için uygun olan ve bloklama solüsyonu ile sulandırılmış uygun horseradish peroksidaz (HRP) konjuge sekonder antikorla (Vectorlab, katalog no: PI-1000, 1:2000) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 10 dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapıldı.
7. Membran Super Signal Chemiluminisans (CL)-HRP (Thermo, katalog no: 170-6404) substrat sistemi ile 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında karanlık oda içerisinde membranlardaki sinyaller hiperfilme aktarıldı.
8. Film, geliştirici ve tespit solüsyonundan geçirildikten sonra distile su ile yıkayıp kurutuldu. Böylece, transgenik ve transgenik olmayan örneklerde CTCFL protein

ekspresyon seviyesi belirlenmiş olup, β -aktin ile normalize edilerek semikantitatif olarak protein seviyeleri karşılaştırıldı.

3.16. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin *In Vitro* Endotel Yönünde Farklandırılması

Deney protokolü Şekil 3.3'te sunulmuştur:

1. Fare EKH'lerin *in vitro* olarak endotel yönünde farklandırılması için, EKH'ler fare MEF hücrelerini içermeyen kültür ortamında ve EKH medyumunu kullanılarak bir gün boyunca kültüre edildi.
2. Ertesi gün doksisisiklin ile gen indüksiyonu deneylerine geçildi. Doksisisiklin verilen gün, 0. deney günü olarak kaydedildi. EKH medyumunu varlığında hücreler bir gün daha bu şekilde kültüre edildi. Bu aşamada 4 temel deney grupları oluşturuldu. Aynı gün HUVEC ile de kültür sürecine başlandı.
3. Daha sonra hücreler kollajen IV ile kaplanmış kültür kaplarında (Sigma, katalog no: C7521-5MG) 35,000/35 mm yoğunlukta olacak şekilde ekildi. Endotelial farklanma için hücreler farklandırma medyumunda 2 μ g/ml Doksisisiklin varlığında/yokluğunda 5 gün boyunca kültüre edilerek günlük olarak indüksiyon medyumunu değiştirildi.
4. Endotelial hücre farklanması boyunca kullanılacak olan medyumun içeriği Tablo 3.9'da özetlenmiştir (Kohler ve ark., 2013).



Şekil 3.3. Fare EKH'lerin *in vitro* endotel yönünde indüksiyonunda oluşturulan gruplar şematize edilmiştir. (Tg: transjenik, tg (-): transjenik olmayan, DOKS.(2µg/ml): 2µg/ml doksisisiklin verilerek gen indüksiyonu yapılan, DOKS. (-): doksisisiklin verilmeyen, EndH: endotelial hücre yönünde farklılandırılan hücreler).

Tablo 3.9. Endotel yönünde farklandırma deneylerinde kullanılan kültür medyumunun içeriği.

Endotele farklandırma medyumu		
	Stok	100 ml'e
%75 IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (GIBCO, 1x, katalog no:31980030)		75 ml
25% Ham's F12 medium, (GIBCO, 1x, katalog no:31765-035)		25 ml
Vitamin A içermeyen N-2 ve B-27 ilavesi, (GIBCO, katalog no:12587001)	50X	2 ml
% 0.05 Bovin serum albümin (BSA), (GIBCO, katalog no:15260037)	100X	1 ml
4.5×10^{-4} M 1-thiogliserol (MTG) (Sigma, katalog no:M6145-25ML)		3.91 μ L
0.5 mM askorbik asit, (Sigma, katalog no: A4403)	10 mg/ml	880.6 μ L
2 ng/ml BMP-4, (R&D Systems, katalog no:314-BP-050CF)	50 μ g/ml	4 μ L
50 ng/ml VEGF ¹⁶⁵ , (R&D Systems, Minneapolis, katalog no:293-VE-050)	100 μ g/ml	50 μ L
10 ng/ml FGF (Millipore, katalog no: GF003)	100 μ g/ml	10 μ L

3.16.1. %0.1 BSA + 4 mM HCL Karışımının Hazırlanması

1. 0.1 gr toz haldeki BSA tartılarak, 100 ml 4Mm'lık HCL içerisine eklendi ve solüsyon filtrelendi.
2. Solüsyon taze hazırlanarak kullanıldı.

3.16.2. 0.1 M Sodyum Fosfat Solüsyonunun Hazırlanması (pH:6 ile 7.2 aralığında olmalıdır)

1. İstediğimiz pH değeri arasında bulunan 1 M NaH_2PO_4 (monobazik) ve 1 M Na_2HPO_4 (dibazik) stok çözeltilerinin karıştırılması ile elde edildi.
2. Stok çözeltiyi hazırlamak için,
13.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (monobazik; mw = 138) tartılarak 100 ml distile suda çözüldü.
14.2 g Na_2HPO_4 (dibazik; mw = 142) tartılarak 100 ml distile su içinde çözüldü.
3. pH 6.8 için 1M'lık Na_2HPO_4 'den 4.63 ml+1M'lık $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 'den 5.37 ml alınarak üzerine 90 ml distile su eklendi.

3.16.3. Rekombinant bFGF'in (Millipore, katalog no: GF003) Hazırlanışı

1. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyona sahip liyofilize haldeki stok şişenin içerisine, 0.1 M'lık sodyum fosfat tamponundan (pH 6.8) 0.5 ml eklenerek protein rekonstitüe edildi.
2. Homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra kullanılacak miktar medyum içerisine ilave edildi.
3. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

3.16.4. Rekombinant BMP4'ün (R&D, katalog no: 314-BP-050/CF) Hazırlanışı

1. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyona sahip liyofilize haldeki stok şişenin içerisine, % 0.1 BSA+4 mM HCL karışım solüsyonundan 1 ml eklenerek protein rekonstitüe edildi.
2. Homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra kullanılacak miktar medyum içerisine ilave edildi.
3. $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

3.16.5. Rekombinant VEGF165'ün (R&D, katalog no: 293-VE-050) Hazırlanışı

1. 100 µg/ml konsantrasyona sahip liyofilize haldeki stok şişenin içerisine, % 0.1 BSA+4 mM HCL karışım solüsyonundan 0.5 ml eklenerek protein rekonstitüe edildi.
2. Homojen hale gelmesi sağlandıktan sonra kullanılacak miktar medyum içerisine ilave edildi.
3. -20 °C'de muhafaza edildi.

3.17. Faz-kontrast mikroskopik değerlendirme:

Ctcf1 transgenik ve transgenik olmayan fare EKH hücreleri, endotel yönünde farklandırma deneyleri sonrasında morfolojik açıdan değerlendirildi ve gruplar karşılaştırıldı.

3.18. İmmünfluoresan Boyama

1. Hücrelerin fiksasyon işlemi için, hücreler odacıklı slaytlara (chamber slide) (BD Falcon, katalog no: 354114) ekilip yüzeyini örtecek miktarda %4 paraformaldehit (Electron Microscopy Sciences, methanolsüz, katalog no: 15710) solüsyonu eklendi ve 10 dakika beklendi.
2. 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı.
3. Permeabilizasyon işlemi için, hücrelerin üzerine %0.1 Triton X-100/PBS (Acros, katalog no: 42235-5000) karışımı eklendi ve hücrelerin permeabilizasyonunu sağlamak için 10 dakika oda sıcaklığında beklendi.

Permeabilizasyon solüsyonunun hazırlanışı:

10 ml PBS üzerine 10 µL triton X-100 eklendi.

4. 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı.
5. %0.1'lik bloklama solüsyonu (Labvision) eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika beklendi. Bloklama solüsyonunun hazırlanışı: 0.1 gr BSA alınarak 10 ml PBS içinde çözüldü.

6. Primer antikorlar Flk1 (R&D, katalog no:AF644, 1:50), VEGF (Santa Cruz, katalog no:sc152, 1:50), VE-kaderin (Abcam, katalog no:ab33168, 1:100), CD31 (R&D, katalog no:AF3628, 1:100), CD34 (Santa Cruz, katalog no:sc7045, 1:50) belirtilen dilüsyon oranında PBS solüsyonu ile dilüe edildi ve hücrelerle gece boyu +4 °C’da inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyon sonrası primer antikör solüsyonu aspire edildi ve hücreler 3 defa, her defasında 5 dakika olmak üzere, 1x PBS ile yıkandı.
8. 1:200 oranında PBS solüsyonu ile dilüe edilmiş olan sekonder antikörlerle (Thermo Fisher Scientific, Alexa Fluor 488 Donkey anti-goat, katalog no: A1105- Dylight 488 anti-rabbit, katalog no: DI-1488) hücreler oda sıcaklığında 1 saat boyunca inkübe edildi.
9. Süre sonunda sekonder antikör aspire edildi ve hücreler 3 defa, her defasında 5 dakika olmak üzere, 1x PBS ile yıkandı.
10. DAPI solüsyonu (Sigma, katalog no:10236276001) eklenip 20 dakika karanlık ortamda bekletildi.
11. 3 kez 5 dakika boyunca PBS ile yıkandı.
12. Slaytların odacık oluşturan üst kısımları ayrılarak kaldırıldı.
13. Slaytların üzerine antifade (Vector, katalog no: H1000) damlatılıp lamel ile kapatıldı.
14. Karanlıkta 1-2 saat bırakılmış hücreler floresan mikroskop (Olympus, IX71) kullanılarak incelendi.

3.19. Flow sitometri

Ctcf transgenik ve transgenik olmayan fare EKH hücrelerinde oluşturulan deney grupları, 1 mM’lık EDTA PBS solüsyonu ile petrilere toplandı. Hücre süspansiyonları Flk1 ve VE-kaderin primer antikörleri ve sonrasında uygun sekonder antikörlerle işaretlenerek hazırlandı. Özgül işaretleyiciler taşıyan immünfluoresan işaretli hücre popülasyonları, Flow sitometri cihazı (BD Biosciences, LSR II flow sitometri cihazı) üzerinde analiz edildi. Ortalama floresan yoğunluk kullanılarak gruplar karşılaştırıldı. Protokol aşağıda sunulmuştur:

- 1- 35mm'lik petri kaplarının içine 1.5 ml hücre ayırma (ayırıştırma) çözeltisi (1 mM EDTA, pH 7.4) eklenerek 37 °C'lik CO₂ inkübatöründe 10-15 dakika inkübe edildi.
- 2- EDTA'nın ya da hücre ayırıştırma enziminin etkisini durdurmak için serum içermeyen medyum (ilişkili farklandırma medyum; EKH grupları için EKH medyum, EndH grupları için EndH medyum) eklendi ve daha sonra santrifüjde 400 x g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 3- Santrifüjden sonra, 1 ml soğuk steril 1x PBS tamponu eklenerek hücreler tekrar yıkandı. Bu amaçla her tüpe soğuk PBS tamponundan 5 ml ilave edildi. Bu adım medyumı yıkayıp uzaklaştırmak için kullanıldı. Yüksek kaliteye sahip EndH'lerini izole etmek için, ayrılmış/bağımsız halde bulunan hücreler burada açıklandığı gibi tek hücre süspansiyonu haline getirildi.
- 4- Hücreler 1 ml soğuk 1x PBS tamponunda resüspanse edildi.
- 5- Hücre sayımı yapıp hücre süspansiyonları 2 x 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ayarlandı. Tüpler deneyler için uygun şekilde alikuotlandı ve etiketlendi. 8 adet deney grubuna ek olarak pozitif ve negatif kontrol grupları da değerlendirildi.

Pozitif ve negatif kontrol grupları:

- Boyanmamış hücreler (Gerek *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan hücrelerden EKH ve gerekse EndH hücreye farklandırılan hücrelerden kullanıldı)
 - Tekli boyanmış pozitif kontrol- HUVEC-Flk1 (PE)
 - Tekli boyanmış pozitif kontrol- HUVEC-VE-kaderin (Alexa Fluor 488)
 - Her iki antikor için izotip kontrolleri
 - Normal rabbit serum
 - Normal goat serum
 - Sadece sekonder antikorun uygulandığı kontrol grupları (sadece PE ve sadece Alexa 488)
- 6- Süpernatantlar aspire edilip, peletlere 1 ml soğuk %2'lik paraformaldehit ilave edildi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Tek hücre süspansiyonunu korumak için aralıklı olarak vorteklendi.
- Fiksasyon, ekzotermik bir işlem olduğu için genellikle soğuk bir solüsyon kullanılarak yapılmalıdır.

Fiksatifin iyi penetrasyonunu sağlamak ve hücre kümelenmesini azaltmak için fiksatif ilave ederken hücreler hafifçe vortekslenmelidir. Bir hücre peletine en azından 1 ml fiksatif solüsyonu eklenmelidir.

- 7- Hücreler 5 ml soğuk FACS tamponu içinde yıkandı ve bir kez santrifüj edilerek fiksatif döküldü.
- 8- FACS tamponu: % 0.1 sodyum azid ve % 0.5 BSA ile PBS karışımı. Hücreler 1 ml permeabilizasyon tamponu ile tekrar süspanse edilip oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

Permeabilizasyon tamponu: 1x PBS solüsyonunun içine 0.1 % Triton X-100 ilave edilerek hazırlandı.

(25 ml 1x PBS+ 25 µL Triton X-100)

- 9- Her tüpe 5 ml soğuk FACS tamponu eklendi ve 400 × g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip supernatant atıldı.
- 10- Her tüpe içinde % 1 BSA (Sigma, katalog no: A1470-25G) bulunan PBS solüsyonundan 1 ml (bloklama tamponu) eklendi, kısa bir süre vortekslendi ve buz üzerinde (ya da 4 °C'de) 10 dakika boyunca inkübe edildi.
- 11- 400 × g'de 5 dakika boyunca santrifüj edilip süpernatant atıldı.
- 12- Primer antikorların uygun konsantrasyonları (örnek başına 100 µL) kullanıldı ve 1 saat boyunca 4 °C'de (karanlıkta) inkübe edildi.

VE-kaderin (Abcam, katalog no: ab33168) : FACS tamponunda 100 µl hücre içinde 1.5 ul

Flk1 (R&D, katalog no: AF644) : FACS tamponunda 2 µg / 10⁶ hücre

- 13- 5 ml soğuk FACS tamponu eklendikten sonra örnekler 400 x g'de, 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Hücre peletleri sekonder antikorlar ile tekrar süspanسیون haline getirildi ve 4 °C'de 30 dakika inkübe edildi (karanlıkta).

VE-kaderin için: Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, Katalog no: A1105) (4 µg/ml)

Flk1 için: Goat IgG PE-konjuge antikor (6 µL/10⁶ cells)

14- 5 ml soğuk FACS tamponu eklenip örnekler santrifüjlendi (400 x g, 5 dakika) ve hücreler 500 µL FACS Tamponu içerisinde tekrar süspanse edildi. Cihazı çalıştırmadan önce örneklerin filtrelendiğinden (80 µm Nylon 6/6 Screening Mesh, SEFAR NITEX®) emin olundu. En iyi sonuç 200 µL pipetle alınırken, 1000 µL'lik bir pipet de kullanabilir fakat bunun sonucunda daha büyük hacim kaybına neden olmaktadır. Hızlıca pipetleme yapıldı ve cihazda okuma gerçekleştirildi.

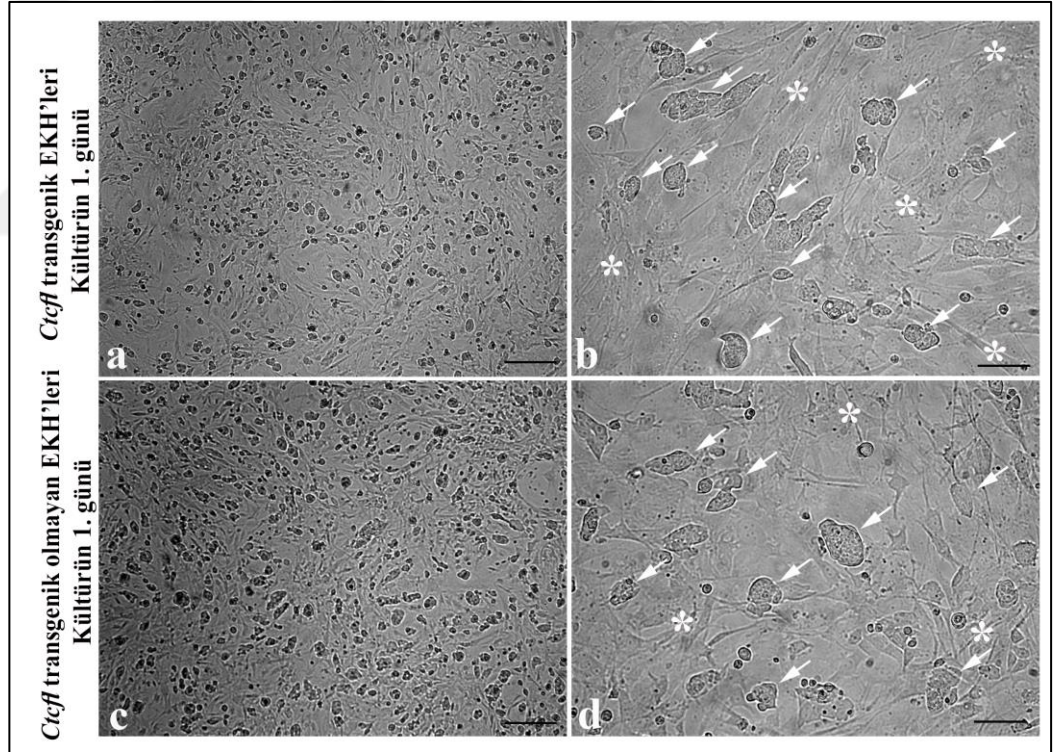
İstatistiksel analizler

Çalışma sonucunda elde edilen tüm veriler tek yönlü varyans analizi ve onu takiben Tukey Post Hoc Testi ile analiz edildi. Bulgular ortalama \pm standart hata olarak sunuldu. İstatistiksel olarak anlamlılık değeri $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

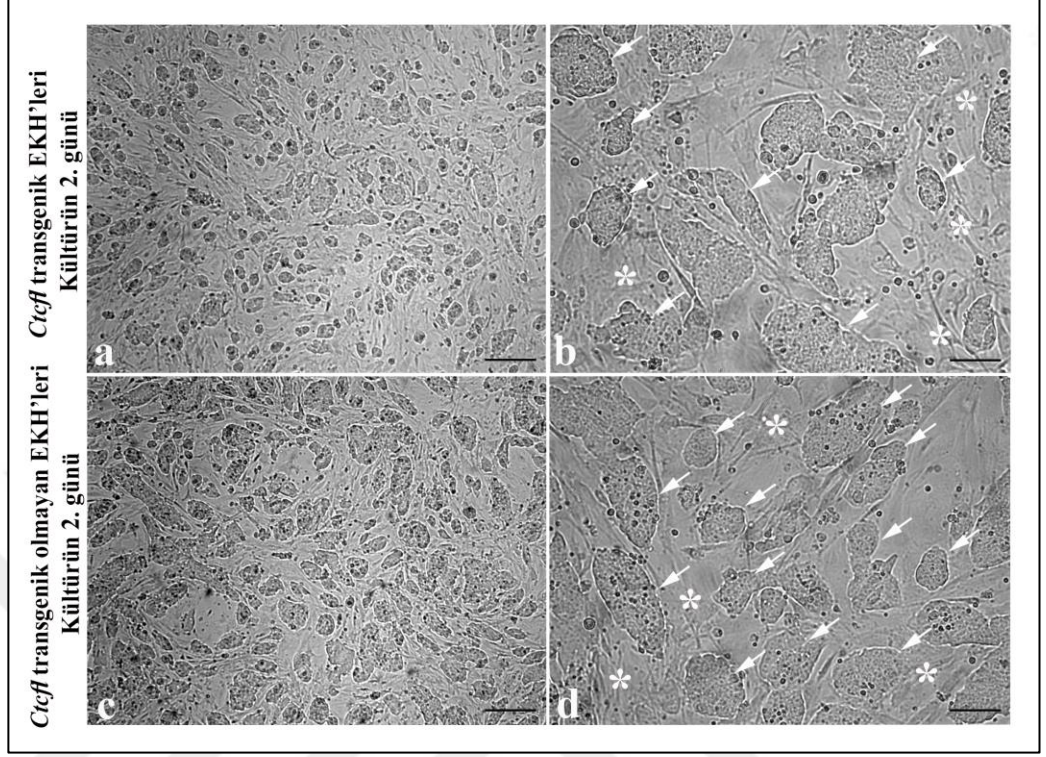
4. BULGULAR

4.1. *Ctcf* Transgenine Sahip EKH'lerin Faz-Kontrast Mikroskopik Değerlendirmeleri

Fare *Ctcf* transgenik EKH'leri, mitotik olarak inaktive edilmiş MEF hücreleri ile birlikte kültüre edildi. MEF hücreleri, E14.5 günlük C57BL/6 fare soyundan elde edildi. Bu hücreler kültür ortamında besleyici (feeder) hücreler olarak kullanıldı. *Ctcf* transgenini içeren ve içermeyen her iki gruba ait kök hücre kolonileri net bir şekilde takip edildi. Hücre kolonileri arasında morfolojik açıdan herhangi bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.1 ve 4.2).

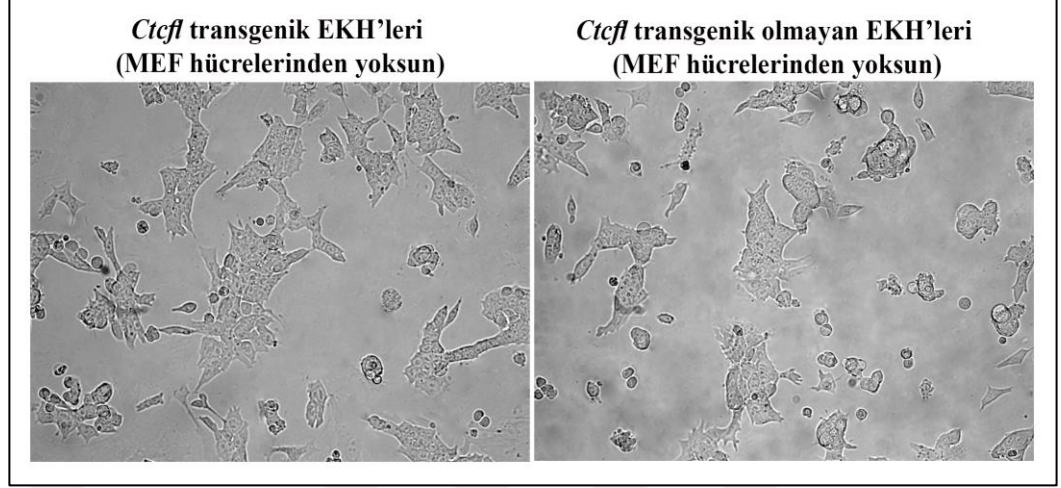


Şekil 4.1. Kültürün 1. gününde MEF hücreleri üzerinde kültüre edilen *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan EKH'leri gösterilmektedir. Oklar, EKH kolonilerini; (*) besleyici MEF hücrelerini işaret etmektedir. Skala bar 200 µm'yi göstermektedir.



Şekil 4.2. Kültürün 2. gününde MEF hücreleri üzerinde kültüre edilen *Ctefl* transgenik ve transgenik olmayan EKH'leri gösterilmektedir. Her iki grupta da kök hücre kolonilerinin sayıca ve hacimce arttığı dikkat çekmiştir. Birinci günde olduğu gibi hücre morfolojisi açısından iki grupta da herhangi bir farklılık gözlenmedi. Oklar, EKH kolonilerini; (*) besleyici MEF hücrelerini işaret etmektedir. Skala bar 200 μm 'yi göstermektedir.

Kültür koşulları kontrol edildikten sonra doksisisiklin ile gen indüksiyonu aşamaları gerçekleştirildi. Bu amaçla MEF hücreleri uzaklaştırılarak sadece EKH'lerini içeren kültür şartları sağlandı (Şekil 4.3). Gen indüksiyonu, kültür medyumuna 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doksisisiklin ilavesi ile gerçekleştirildi.



Şekil 4.3. MEF hücrelerinden uzaklaştırılarak kültüre edilen *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan EKH'ler gösterilmektedir. Skala bar 200µm'yi göstermektedir.

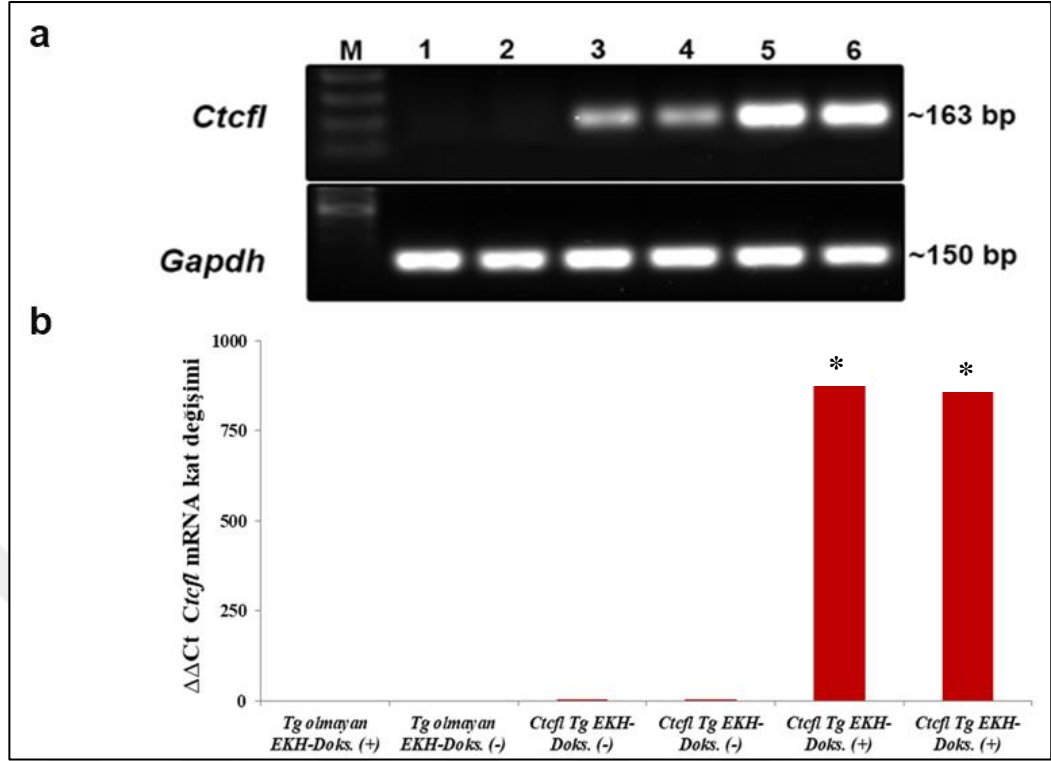
4.2. Embriyonik Kök Hücrelerde *Ctcf* Transgeninin Aşırı Ekspresyonu

Ctcf transgeninin doksisisiklin muamelesi ile ektopik gen indüksiyonunun gerçekleştirilebildiğini ortaya koyabilmek için, doksisisiklin ile muamele edilmiş *Ctcf* transjeni içeren ve içermeyen hücre örnekleri ile qRT-PCR ve Western Blot deneyleri yapıldı.

qRT-PCR deneyleri için hücrelerden RNA örnekleri izole edildi. Sonrasında ters transkribe edilerek, *Ctcf* transjeni için dizayn edilmiş primerler kullanılarak, amplifiye edilen cDNA'lar kantitatif olarak değerlendirildi. Bu deneyler gerçekleştirilirken, *Ctcf* transjeni içeren ve içermeyen; doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı farklı gruplar incelendi.

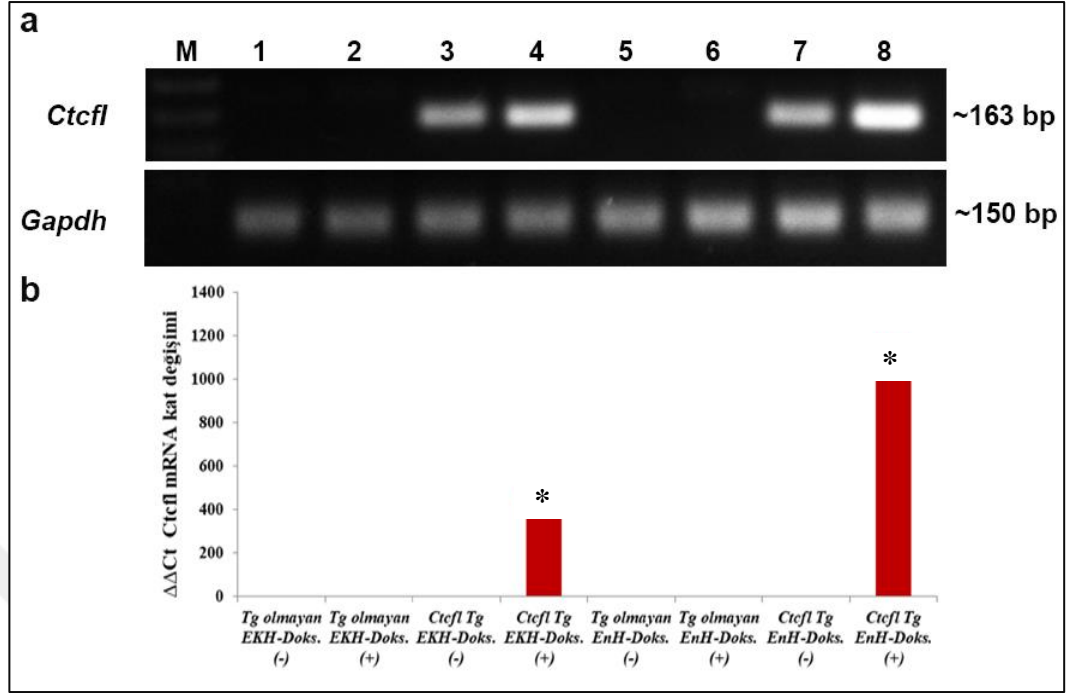
4.2.1. qRT-PCR ile *Ctcf* Transgeninin Aşırı Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Bulgularımız, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı *Ctcf* transgenik EKH'lerinde, diğer karşılaştırılan transgen içermeyen ve gen indüksiyonunun yapılmadığı kontrol gruplarına göre gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğunu ortaya koydu ($p < 0.001$) (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Böylelikle EKH'lerin, endotelial hücre yönünde farklılaştırma deneylerine başlamadan önce mRNA düzeyinde *Ctcf* aşırı ekspresyonun gerçekleştirilebildiği doğrulandı.



şekil 4.4. a) *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan EKH'lerde, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı (48 saat) ve yapılmadığı gruplara ait *Ctcf1* ve *Gapdh* bantları gösterilmektedir. Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: *Ctcf1* Transgenik olmayan/Doksisisiklin(-) EKH, 2: *Ctcf1* Transgenik olmayan/Doksisisiklin(+) EKH, 3: *Ctcf1* Transgenik/Doksisisiklin(-) EKH, 4: *Ctcf1* Transgenik/Doksisisiklin(-) EKH, 5: *Ctcf1* Transgenik/Doksisisiklin(+) EKH, 6: *Ctcf1* Transgenik/Doksisisiklin(+) EKH'leri. b) *Ctcf1* transgenik (Tg) ve transgenik olmayan EKH'lere ait $\Delta\Delta Ct$ *Ctcf1* mRNA kat değişim grafiği. *Ctcf1* transgenik olup da doksisisiklin (Doks.) ile gen indüksiyonunun yapıldığı grupta istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($P < 0.001$).

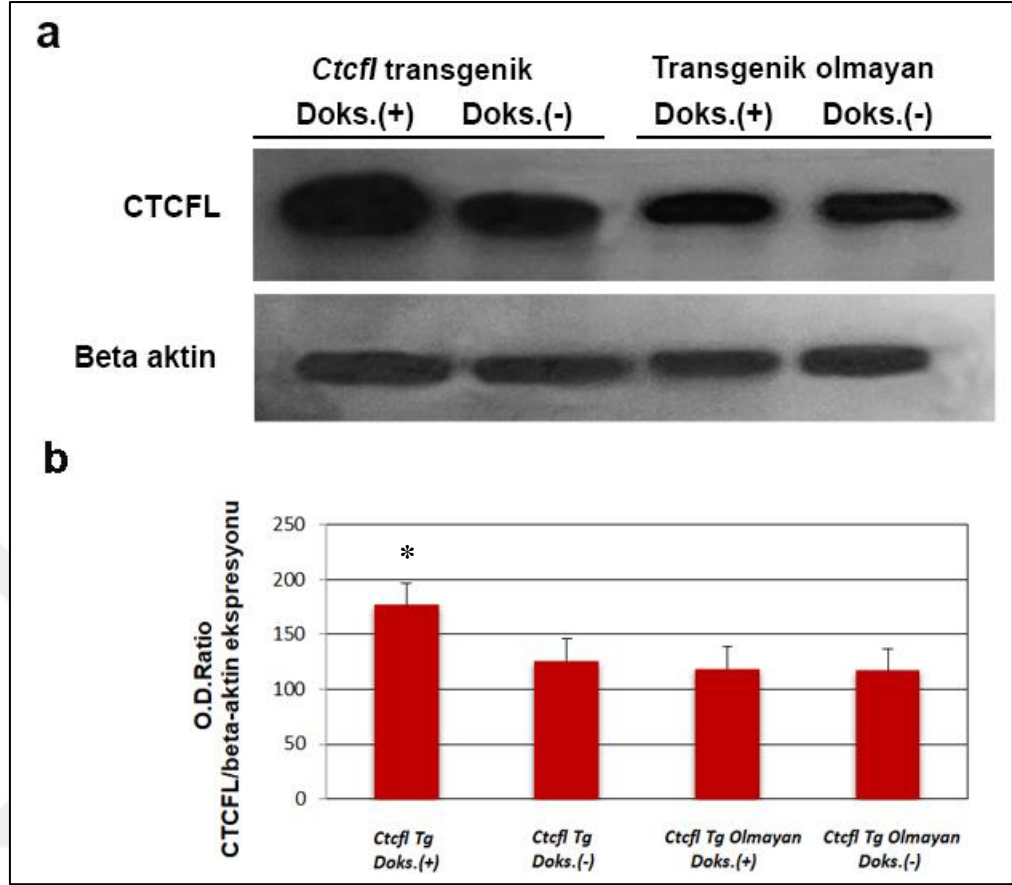
Ctcf1 transgenik ve transgenik olmayan EKH'lerinde *Ctcf1* gen ekspresyonu, aynı deney setinde endotelial hücre yönünde farklılaştırma deneylerinin başlangıcında (24 saat) ve sonrasında (5 gün) da değerlendirildi. Total RNA izolasyonları, cDNA eldesi ve sonrasında yapılan qRT-PCR deneylerinde ilgili gruplarda gen indüksiyonunun devam ettirildiği ortaya konuldu (şekil 4.5).



Şekil 4.5. a) Endotel hücre yönünde farklandırma deneyleri boyunca deney gruplarına ait *Ctcfl* ve *Gapdh* bantları gösterilmektedir. Bantlar sırasıyla: M: Marker, 1: *Ctcfl* transgenik olmayan/Doksisisiklin (-) EKH, 2: *Ctcfl* transgenik olmayan/Doksisisiklin (+) EKH, 3: *Ctcfl* transgenik/Doksisisiklin (-) EKH, 4: *Ctcfl* transgenik/Doksisisiklin (+) EKH, 5: *Ctcfl* transgenik olmayan/Doksisisiklin (-) EndH (Endotelyal hücre yönünde farklandırılan), 6: *Ctcfl* transgenik olmayan/Doksisisiklin (+) EndH, 7: *Ctcfl* transgenik/Doksisisiklin (-) EndH, 8: *Ctcfl* transgenik/Doksisisiklin (+) EndH. b) Deney gruplarına ait $\Delta\Delta Ct$ *Ctcfl* mRNA kat değişimi grafiği. Sadece *Ctcfl* transgenik (Tg) olup da doksisisiklin (Doks.) ile gen induksiyonunun yapıldığı gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($P < 0.001$).

4.2.2. Western Blot ile EKH'lerde CTCFL Proteininin Ekspresyonu

Kök hücrelerin endotel hücrelerine farklandırma aşamalarına geçmeden önce, deneysel dizayn açısından doksisisiklin ile *Ctcfl* transgeninin ektopik aşırı ekspresyonunun protein düzeyine yansıyor yansımadığı Western Blot metodu ile değerlendirildi. *Ctcfl* transgeninin bulunduğu ve doksisisiklin ile gen induksiyonunun yapıldığı grupta CTCFL protein düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu doğrulandı ($P = < 0,001$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan, doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı EKH'lerdeki CTCFL protein ekspresyonları gösterilmektedir. a) *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan EKH'lerinin, CTCFL protein ekspresyonlarına ait Western Blot bantları. b) Beta aktin ile normalize edilerek grafik haline getirilmiştir. *Ctcf1* transgeninin bulunduğu ve doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı grupta CTCFL'in protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği gözlemlendi ($P = <0,001$). Tg:transgenik; Doks.:doksisisiklin.

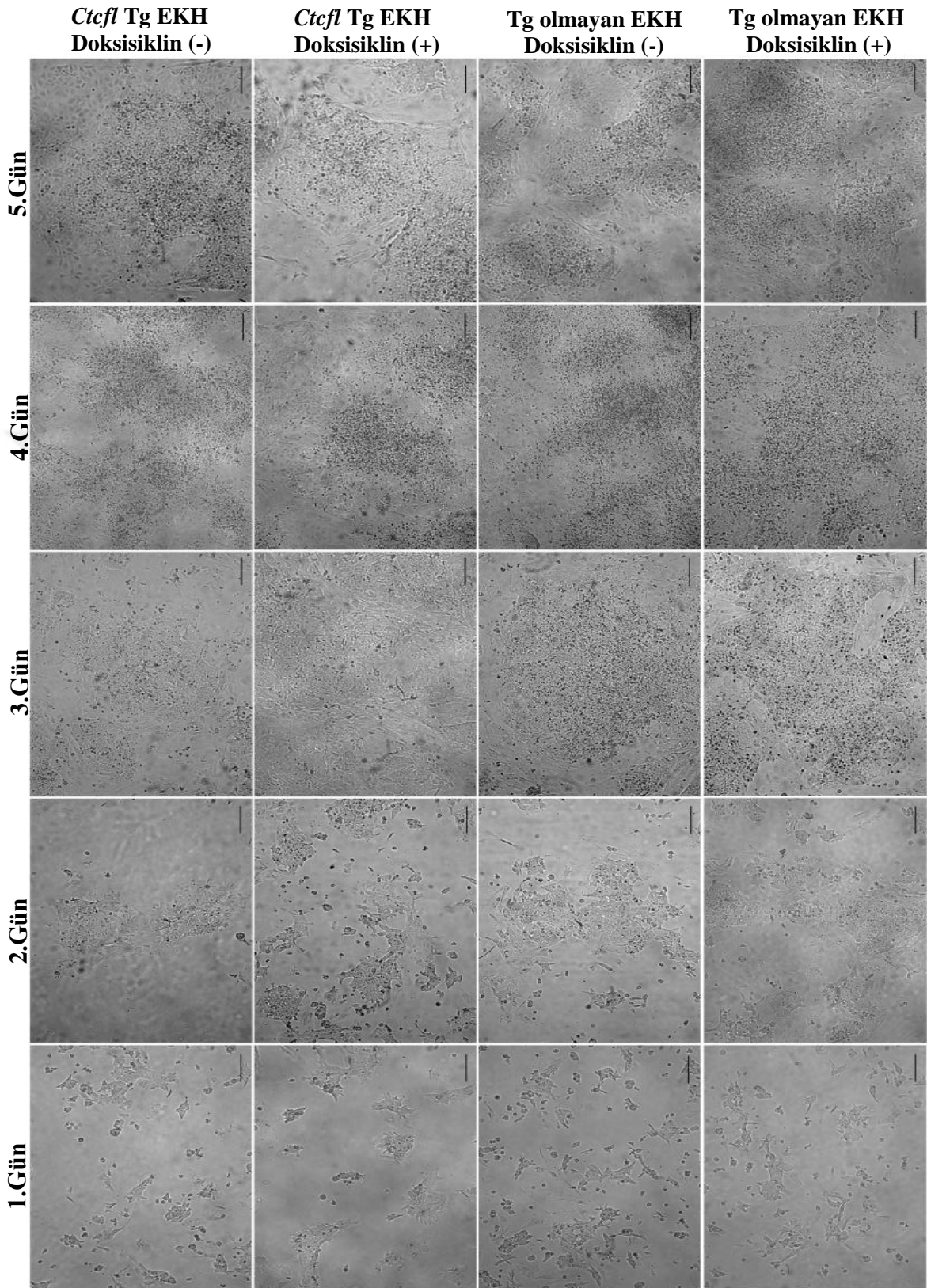
4.3. Fare Embriyonik Kök Hücrelerin *in vitro* Endotel Yönünde İndüksiyonu

Fare embriyonik kök hücrelerin *in vitro* olarak endotel yönünde farklandırılması için öncelikle MEF hücrelerinin aşamalı bir şekilde kültür ortamından uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Bu işlemde bir gün sonra *Ctcf1* transgeni içeren ve içermeyen EKH hücrelerinin ilgili gruplarına 2 µg/ml doksisisiklin muamelesi yapıldı. Hücre sayımlarını takiben, doksisisiklin muamelesinin ikinci gününden itibaren endotel yönünden farklandırma deneylerine başlandı.

Ctcf1 transgeni içeren ve içermeyen fare EKH hücreleri kollajen IV ile kaplı özel farklandırma kültür ortamında 5 gün boyunca kültüre edildi. Endotelyal indüksiyon için hücreler indüksiyon medyumunda 2µg/ml doksisisiklin varlığında/yokluğunda 5 gün boyunca kültüre edildi. Günlük olarak indüksiyon medyumunu değiştirildi. Günlük olarak faz-kontrast mikroskop ile hücre morfolojisinin takibi yapıldı. Farklandırma sürecinin sonunda hücreler endotel hücreleri için önemli belirteçler açısından immünfluoresan işaretleme ile boyandı ve flow sitometri ile değerlendirildi.

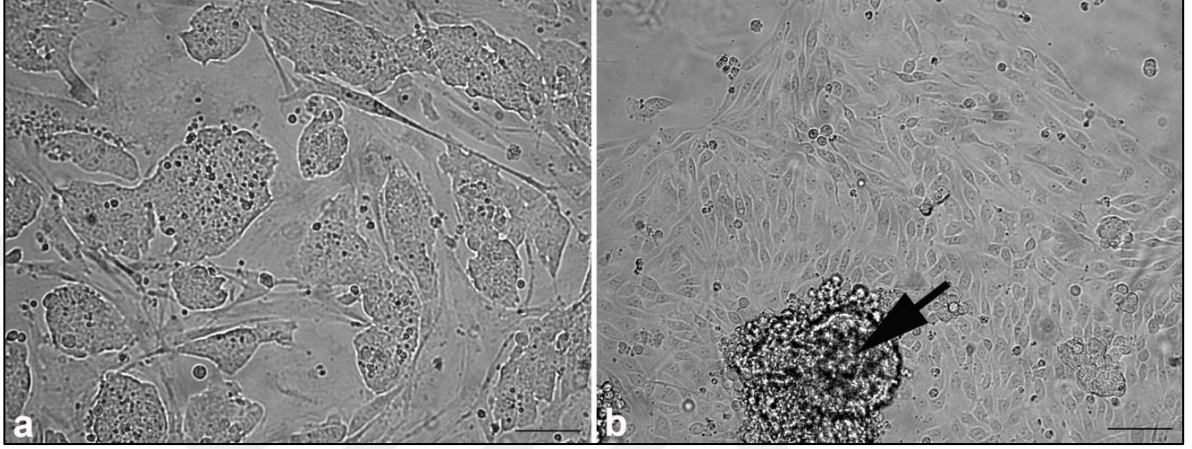
4.3.1. Faz-kontrast Mikroskopik Değerlendirmeler

Kültür süreçleri boyunca EKH medyumunda MEF hücreleri olmaksızın kültüre edilen EKH'lerinin tipik koloni morfolojisini devam ettirdiği dikkat çekti (Şekil 4.7). Bununla birlikte bu hücre grubunda da özellikle kolonilerinin dışında yer alan hücrelerde, farklanmanın kısmen başladığı gözlemlendi. Hücresel görünüm açısından EKH deney grupları arasında herhangi bir belirgin farklılık gözlenmedi.



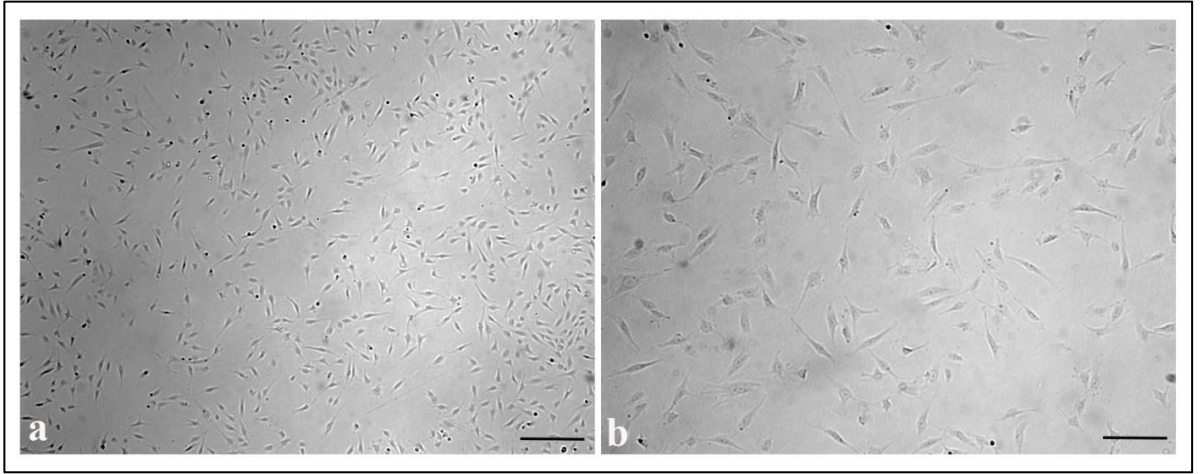
Şekil 4.7. *Ctcf1* transjenik ve transjenik olmayan, doksisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı EKH'lerine ait faz-kontrast mikroskopik görüntüleri. Skala bar 200 µm'yi göstermektedir.

Benzer şekilde endotel yönünde farklıdırılan ve doksisisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı deney grupları morfolojik açıdan değerlendirildi. Hücrelerin tipik EKH hücre morfolojisinden uzaklaşarak endotel hücrelere benzediği faz-kontrast mikroskopi ile gözlemlendi (Şekil 4.8).



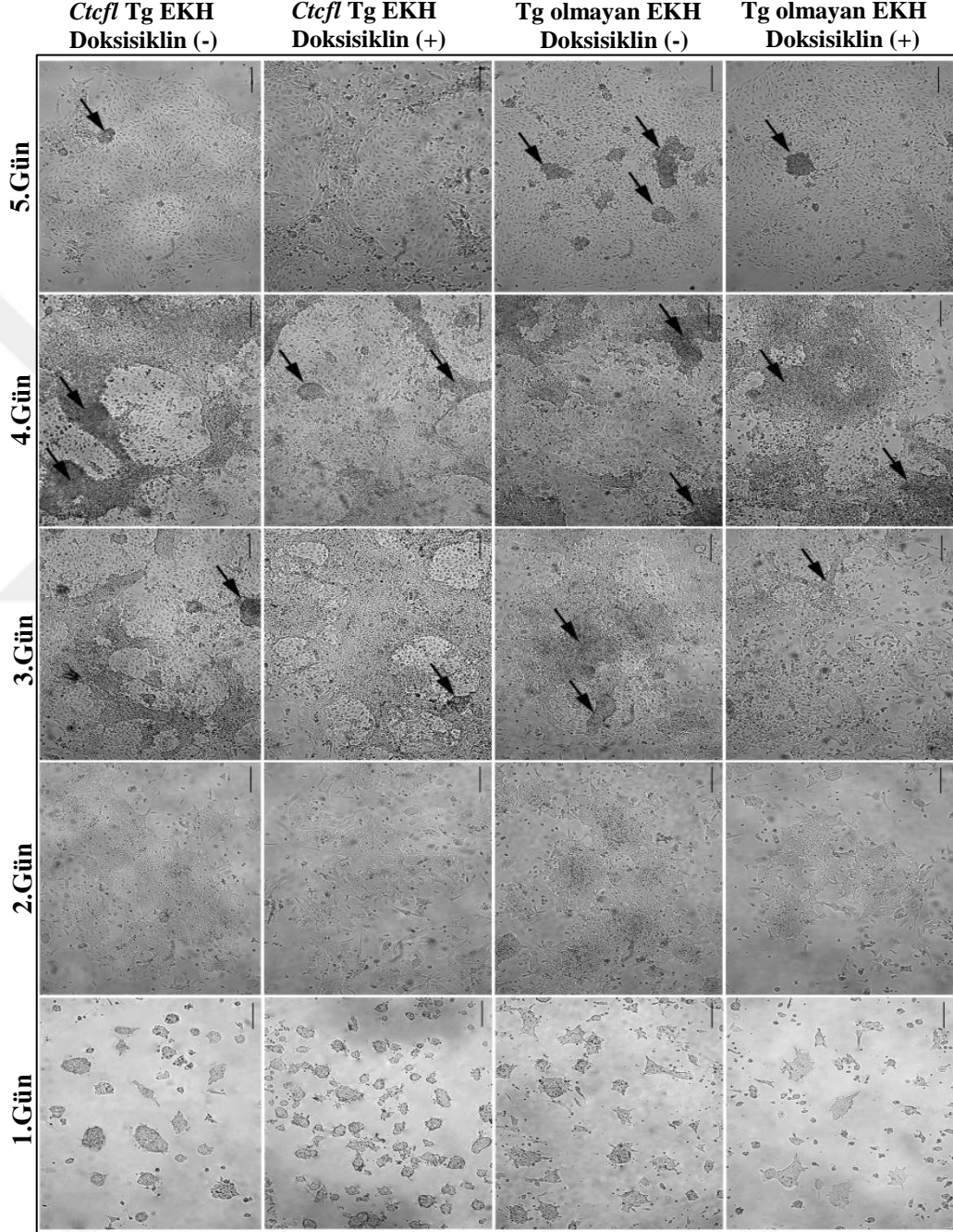
Şekil 4.8. a) *In vitro* kültürdeki EKH hücreleri ve b) 5 gün boyunca endotel yönünde farklıdırma sonrasında EKH kaynaklı endotel hücre benzeri hücrelere ait faz kontrast mikroskopik görüntüleri. Oklar farklıdırma süreci boyunca gözlenen hücre birikimlerini (agregat) işaret etmektedir. Skala bar 200µm'yi göstermektedir.

Endotel hücrelerine örnek olarak HUVEC hücre kültürü de gerçekleştirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Uzamış hücre morfolojisine sahip HUVEC görüntüleri. Faz-kontrast mikroskopik olarak hücreler çok yoğun olduğunda kaldırım taşı görüntüsü elde edilmektedir. Skala bar 200 µm'yi göstermektedir.

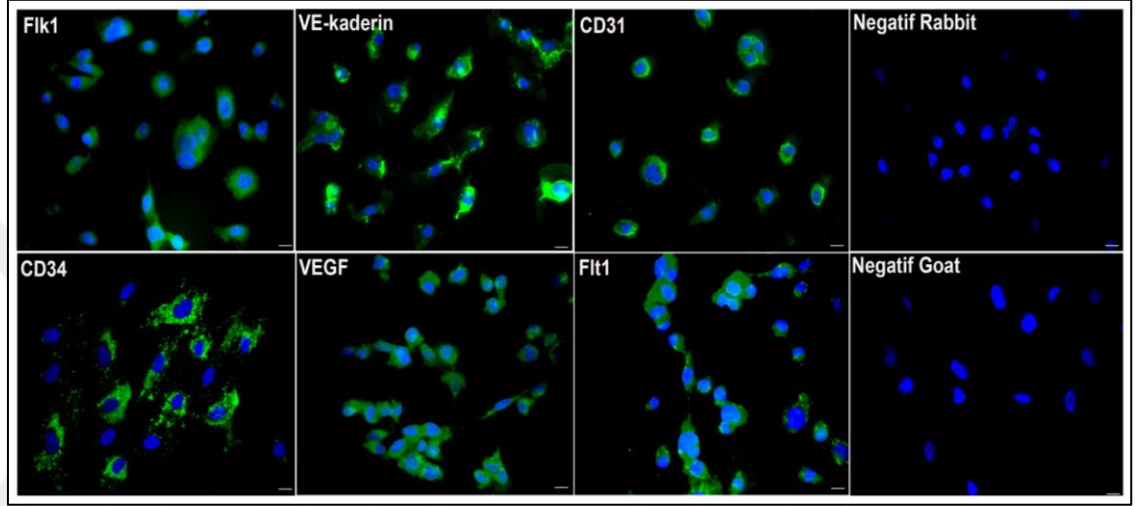
EKH deney gruplarında olduğu gibi endotelial yönde farklılaşmanın gerçekleştirildiği deney gruplarında da morfolojik açıdan herhangi bir farklılık izlenmedi (Şekil 4.10)



Şekil 4.10. *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan, doksisiklin ile gen indüksiyonunun yapıldığı ve yapılmadığı hücelere ait faz-kontrast mikroskopik görüntüleri. Oklar farklılaşma süreci boyunca gözlenen hücre birikimlerini (agregat) işaret etmektedir. Skala bar 200 µm'yi göstermektedir.

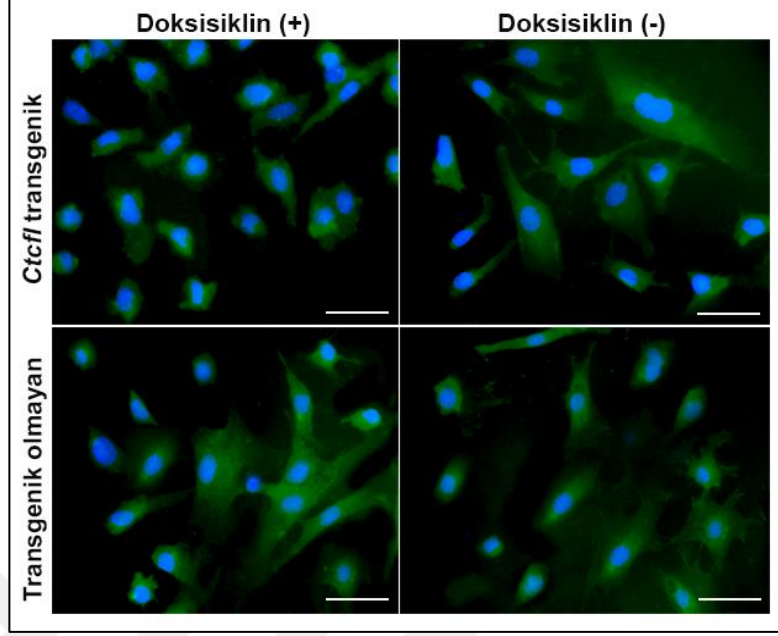
İmmünfluoresan Boyanma Sonuçları

Endotel yönünde farklılandırılan deney gruplarına ait hücrelerde Flk1, VE- kaderin, CD31, CD34, VEGF, Flt1 primer antikoları ve sonrasında uygun sekonder antikolar ile işaretlenerek immünfluoresan boyanmalar yapıldı. Pozitif kontrol olarak HUVEC kullanıldı (Şekil 4.11).

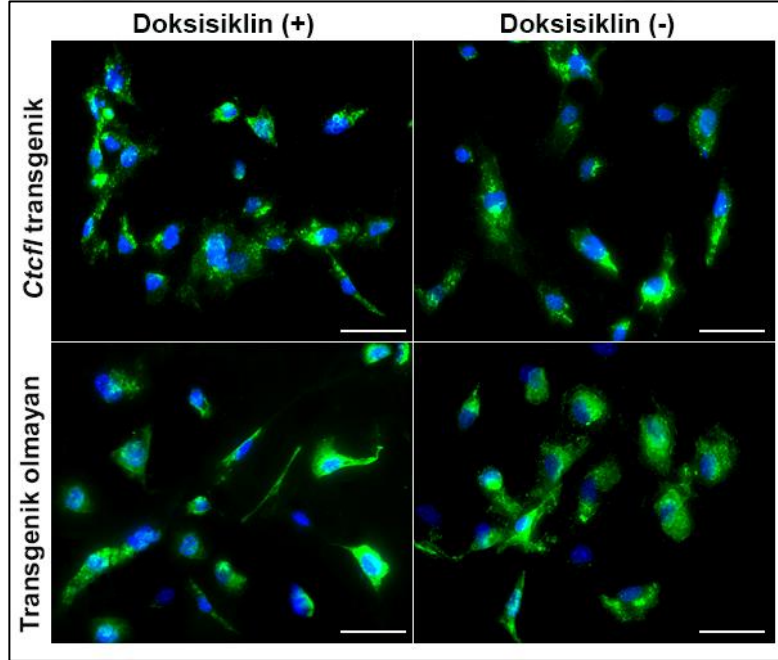


Şekil 4.11. HUVEC’lerde Flk1, VE-kaderin, CD31, CD34, VEGF ve Flt1 proteinleri için immünofluoresan boyanma paternleri. Skala bar 20.0 μm ’yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: ilgili protein ekspresyonu)

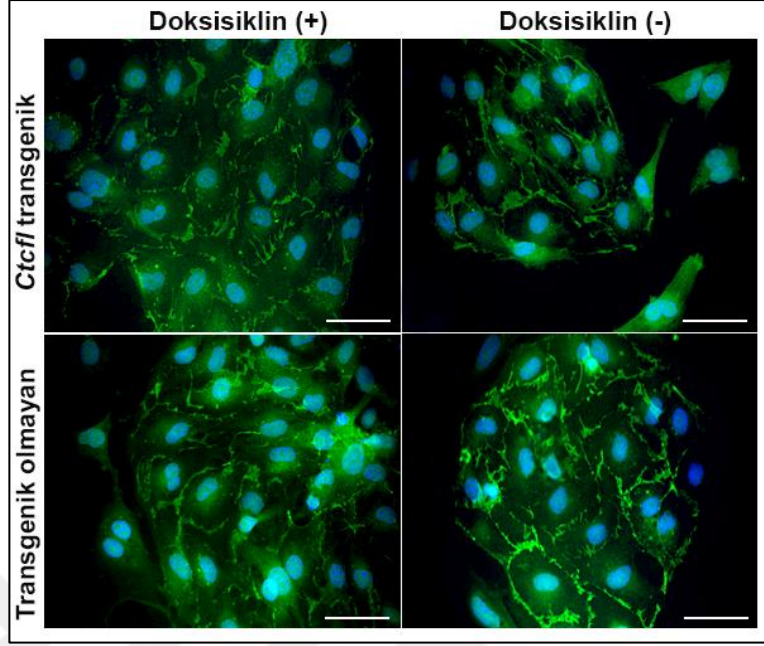
İmmünfluoresan boyanma sonuçlarında, HUVEC’ler tarafından eksprese olan proteinlerin (Flk1, VE-kaderin, CD31, CD34, VEGF ve Flt1), endotel yönünde farklılandırılan hücre gruplarında da benzer boyanma paternleri gösterdiği izlendi (Şekil 4.12-4.17). Deney grupları arasında herhangi bir belirgin farklılık gözlenmedi. Negatif kontrol gruplarında herhangi bir reaksiyon görülmemiştir (Şekil 4.18-4.19).



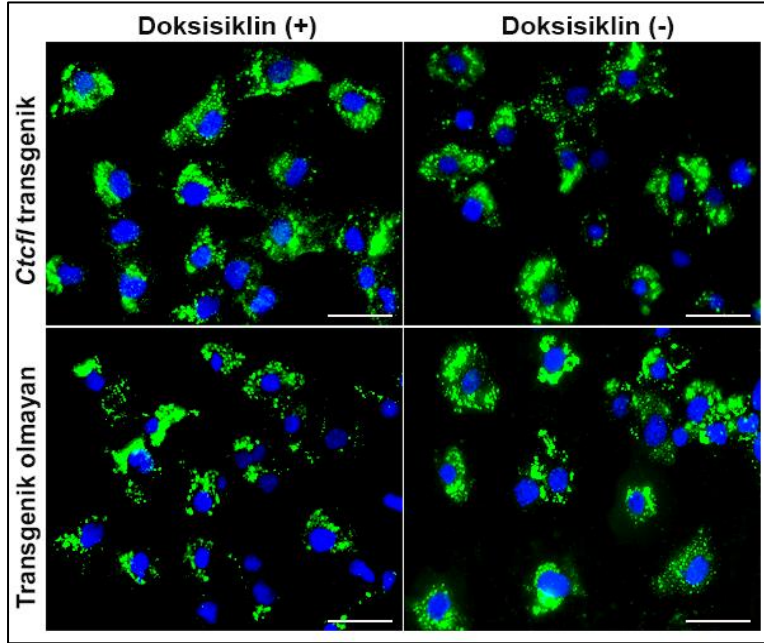
Şekil 4.12. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile Flk1 protein ekspresyonu. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: Flk1).



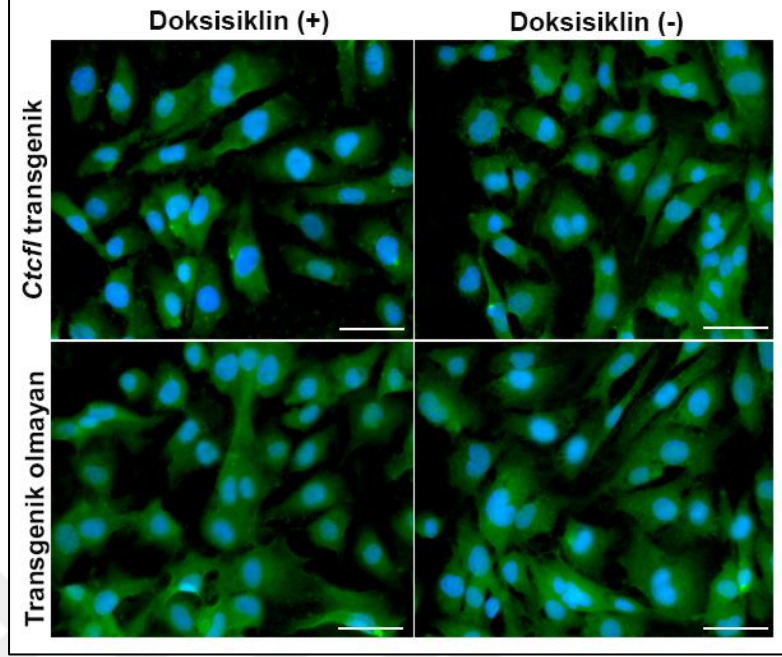
Şekil 4.13. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile VE-kaderin protein ekspresyonu. VE-kaderin, sitoplazmik boyanma paterni sergilemektedir. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: VE-kaderin).



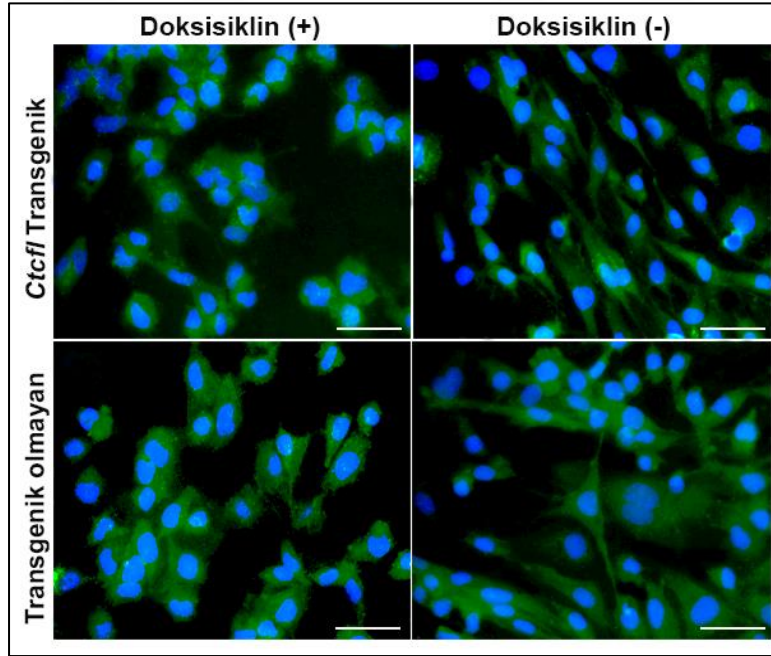
Şekil 4.14. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transjenik ve transjenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile CD31 protein ekspresyonu. CD31, hücre membranına lokalize bir boyanma paterni sergilemektedir. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: CD31).



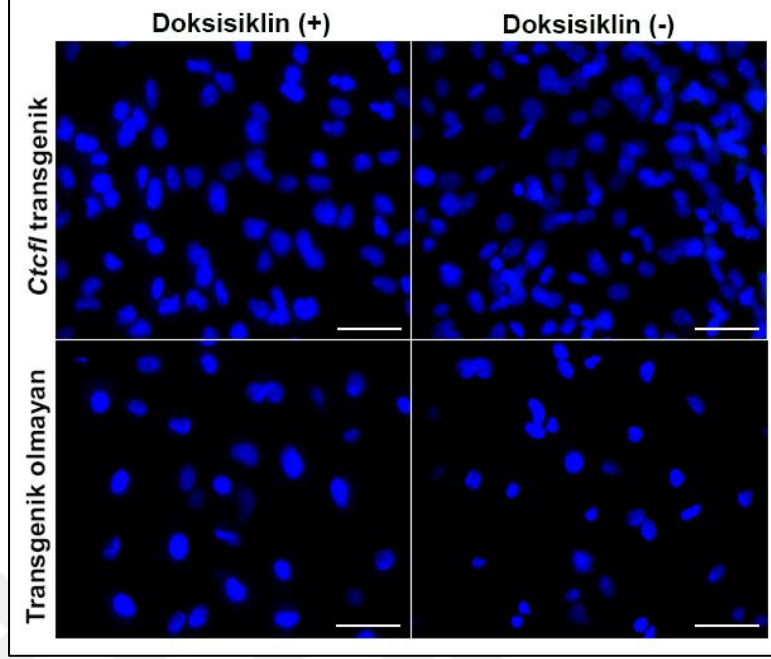
Şekil 4.15. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transjenik ve transjenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile CD34 protein ekspresyonu. CD34, hücre yüzeyi ve sitoplazmada boyanma paterni sergilemektedir. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: CD34).



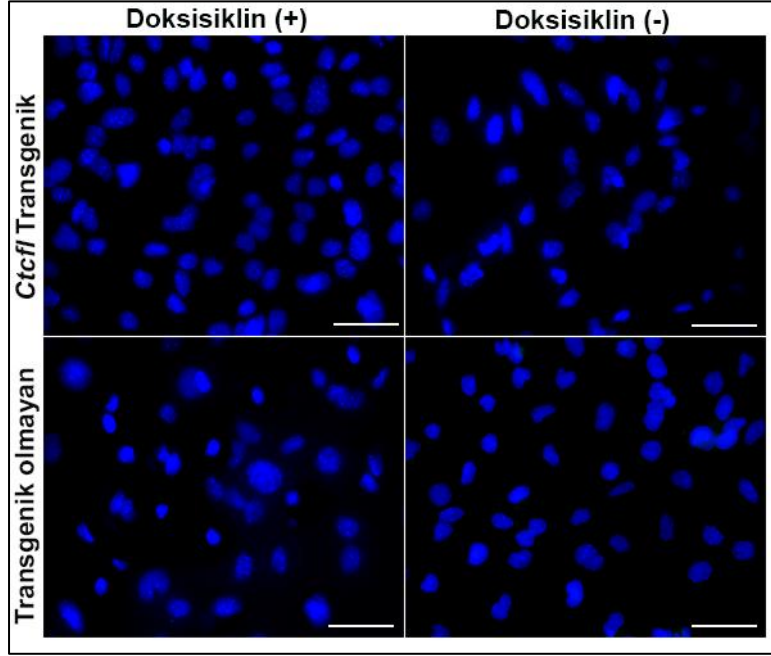
Şekil 4.16. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile VEGF protein ekspresyonu. VEGF, sitoplazmik bir boyanma paterni sergilemektedir. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: VEGF).



Şekil 4.17. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında immünfluoresan mikroskopi ile Flt1 protein ekspresyonu. Flt1, sitoplazmik boyanma paterni sergilemektedir. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI, yeşil: Flt1)



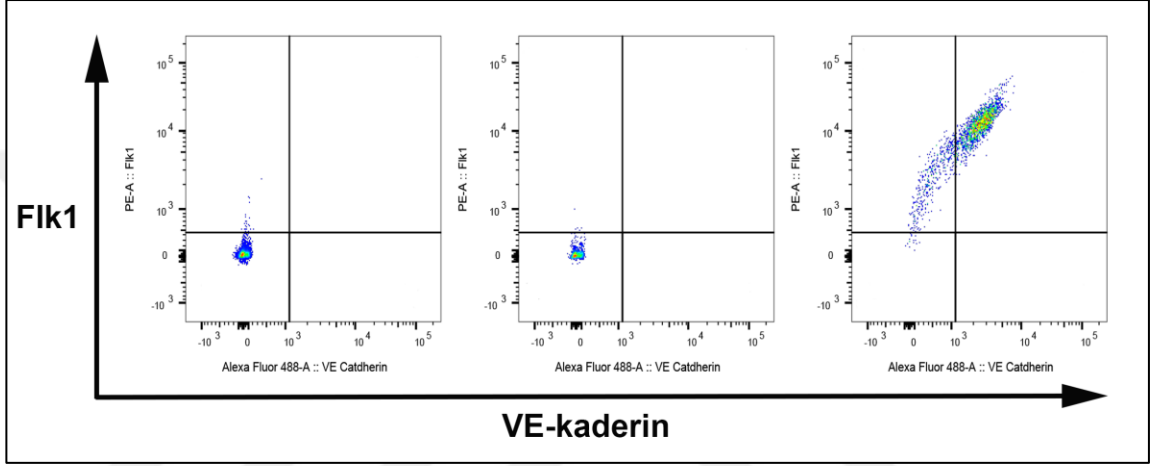
Şekil 4.18. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında (VE-kaderin, VEGF, Flt1) antikorlarına ait negatif kontrol (anti-rabbit) görüntüleri. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI).



Şekil 4.19. Endotel yönünde farklılandırılan *Ctcfl* transgenik ve transgenik olmayan hücre gruplarında (Flk1, CD31, CD34) antikorlarına ait negatif kontrol (anti-goat) görüntüleri. Skala bar 20.0 μm 'yi göstermektedir. (Mavi: DAPI).

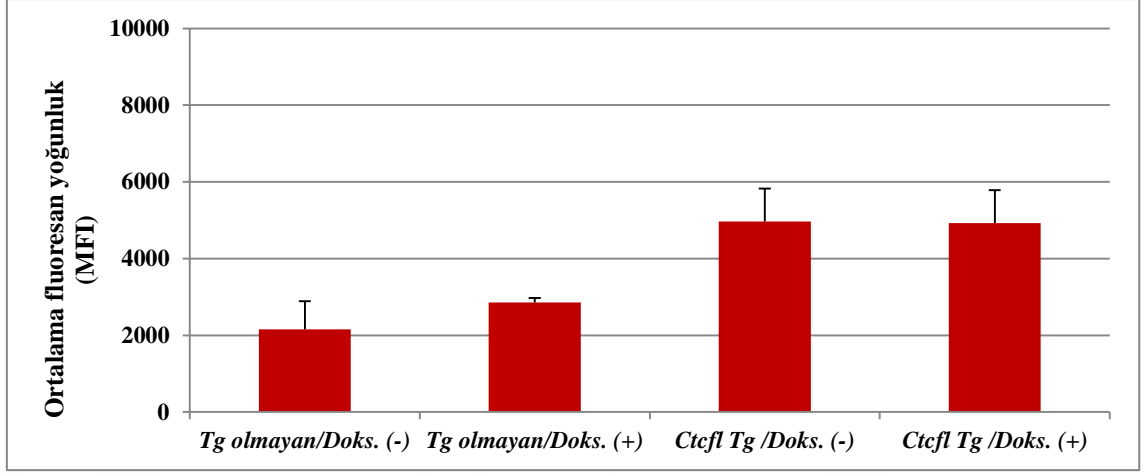
4.3.2. Flow Sitometri Değerlendirmeleri

Deney gruplarına ait hücre süspansiyonları Flk1 ve VE-kaderin primer antikorları ve sonrasında uygun sekonder antikorlar ile işaretlenerek flow sitometri yöntemi ile değerlendirildi. Pozitif ve negatif uygun kontrol grupları ile antikor özgünlüğü doğrulandı (Şekil 4.20).

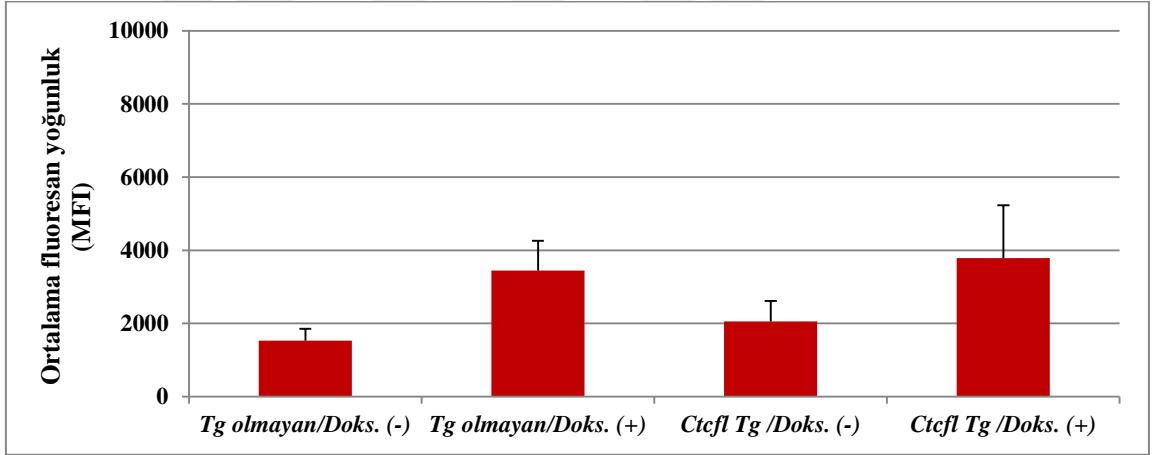


Şekil 4.20. Flow sitometrik değerlendirmelerde negatif ve pozitif kontrol (HUVEC) örneklerine ait histogramlar. Kullanılan antikorların özgünlüğü doğrulandı.

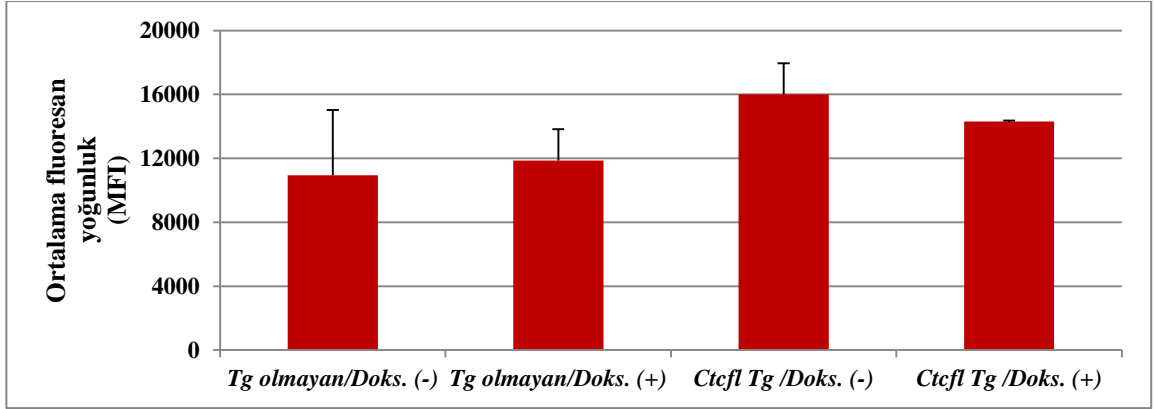
Hücelere ait ortalama fluoresan yoğunluk (mean fluorescein intensity: MFI) kullanılarak değerler grafik haline getirildi. Gerek EKH'nin gerekse endotel yönünde farklılandırılan hücre popülasyonlarının kendi grupları arasında yapılan karşılaştırmalarında VE-kaderin (sırasıyla $P = 0.200$ ve $P = 0.267$) (Şekil 4.21 ve Şekil 4.22) ve Flk1 MFI değerleri (sırasıyla $P = 0.476$ ve $P = 0.114$) (Şekil 4.23 ve Şekil 4.24) açısından herhangi bir fark bulunmadı.



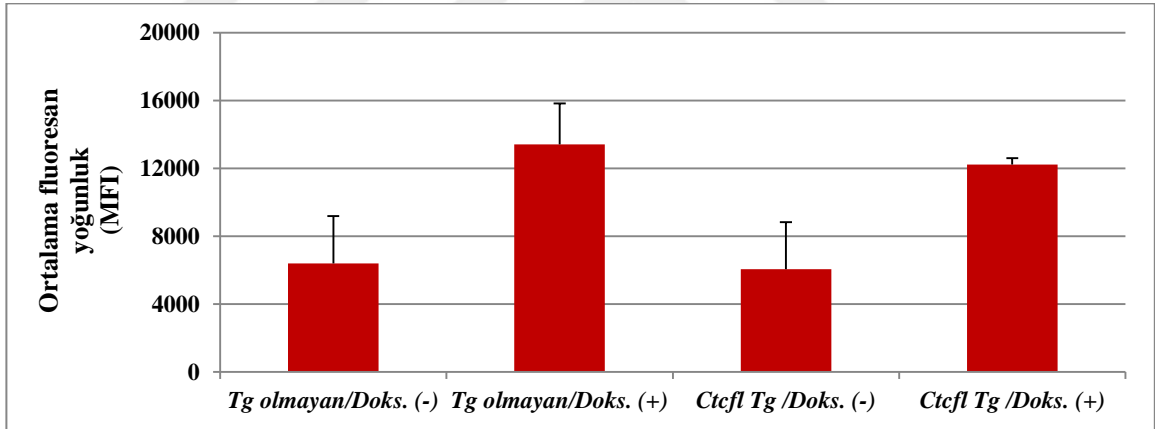
Şekil 4.21. Endotel hücre yönünde farklandırılmayan hücelere ait VE-kaderin MFI grafikleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (P = 0.200). Tg: transgenik; Doks.:Doksisiklin.



Şekil 4.22. Endotel hücre yönünde farklandırılan hücelere ait VE- kaderin MFI grafikleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (P = 0.267). Tg: transgenik; Doks.:Doksisiklin.



Şekil 4.23. Endotel hücre yönünde farklandırılmayan hücelere ait Flk1 MFI grafikleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (P = 0.476). Tg: transgenik; Doks.:Doksisiklin.



Şekil 4.24. Endotel hücre yönünde farklandırılan hücelere ait Flk1 MFI grafikleri. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (P = 0.114). Tg: transgenik; Doks.:Doksisiklin.

5. TARTIŞMA

Ctcf transgenik fare soylarının oluşturulduğu 2015 yılına ait daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda, *Ctcf* geni ile fetal gelişim arasında potansiyel bir ilişki olduğunu ortaya koyduk (Sati ve ark., 2015). Bu çalışmada gebelik süresince devam ettirilen doksisisiklin muamelesi ile *Ctcf*'in normalde olmaması gerekirken ektopik olarak gerçekleştirilen ekspresyonunun yavru nesillerde farklı patolojilere yol açtığı gözlemlendi. Ektopik *Ctcf* gen ekspresyonunu sağladığımız özel *Ctcf* transgenik fare yavrularının beyin dokularında yapmış olduğumuz araştırmalarda, ciddi vasküler anomaliler görüldü. Kan damarı dilatasyonları ile göze çarpan bir şekilde, beyinlerinde lokalize hemoraji belirlendi. Söz konusu çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular, *Ctcf* ekspresyonu ile vaskülogenez arasında bir ilişki olabileceğini işaret etmiştir. Bu noktadan hareketle de mevcut çalışmamızda doksisisiklin ile *Ctcf* gen ekspresyonunun indüklendiği *Ctcf* transgenik fare embriyonik kök hücrelerinde, *Ctcf*'in aşırı ekspresyonunun *in vitro* endotel yönünde farklanmada etkisi olup olmadığının araştırılması hedeflendi. Dolayısıyla sınırlı ekspresyon tarzı nedeniyle fonksiyonları tam olarak bilinmeyen *Ctcf* geni hakkında yeni bilgilerin sağlanması amaçlanmıştır.

Literatürde, *in vivo* organizma düzeyinde CTCFL ekspresyonunun çalışıldığı sadece 3 çalışma bulunmaktadır (Kosaka-Suzuki ve ark., 2011; Sati ve ark., 2015; Schultz ve ark., 2015; Suzuki ve ark., 2010). Dolayısıyla bu genin fonksiyonları hakkında yeterli ve detaylı bilgi mevcut değildir. Bu çalışmaların iki tanesi CTCFL'in nakavt edilmesi ile oluşturulmuştur (Kosaka-Suzuki ve ark., 2011; Sati ve ark., 2015; Schultz ve ark., 2015; Suzuki ve ark., 2010). CTCFL'in nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre artmış hücre ölümü ile daha küçük testis yapısına sahip fareler gözlenmiştir (Suzuki ve ark., 2010). *In vivo* CTCFL ektopik ekspresyonunun etkileri konusunda yapılmış sadece grubumuza ait bir çalışma bulunmaktadır (Sati ve ark., 2015). Bu çalışmamızda, fare *Ctcf* geni, GFP (yeşil fluoresan protein) ve tetrasiklin (Tet) duyarlı element içeren iki yönlü Tet plazmidine (pTRE-Tight-BI-AcGFP1) klonlanmıştır. Bu sistemin en önemli özelliği, *Ctcf* transgen ekspresyonunun sadece testiste ve tetrasiklin analogu olan doksisisiklin varlığında görülebilmesine imkan sağlamış olmasıdır. Embriyogenez sürecinde *Ctcf* ekspresyonunda görülen anormal ekspresyonun, global anlamda tüm yavru vücudunu

etkilediği çok net bir şekilde ortaya konulmuştur. Zira *Ctcf* transgenik fare yavrularının fenotipi taşıyan bireylerinin, çoklu organ patolojileri ile postnatal hayatın ilk gününde ölmesi dikkat çekici olmuştur. Dolayısıyla *Ctcf* ile doğum defektleri ve konjenital malformasyonlar arasında bir ilişki söz konusudur ve *Ctcf* geni embriyogenez sürecinde kritik rol oynamaktadır (Sati ve ark., 2015). Özellikle indüklenebilir bir transgenik hayvan modelinde *in vivo* olarak *Ctcf*'in etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamız literatürde ilk olma özelliği taşımış ve oluşturduğumuz deney modeli, *Ctcf*'in olası *in vivo* etkilerini ortaya koyabilmemizi mümkün kılmış orijinal bir model olmuştur. Bu transgenik hayvanlara ait, doksisisiklin ile *Ctcf* geninin indüklenebildiği embriyonik kök hücreler oluşturulmuş ve mevcut tez çalışmasında kullanılmıştır.

Teknik olarak çalışmamızda kullanıldığımız tetrasiklin ile indüklenebilir sistem ve vektörü (Tet-On sistemi), zaman-bağımlı bir tarzda pek çok biyolojik sorunun cevaplanabilmesi avantajını sağlayabilen, teknik olarak oldukça yüksek potansiyelli bir sistemdir. Bu sistemde doksisisiklin ile indüksiyon sonrasında, hedef genin transkripsiyonu ve sonrasında da translasyonu gerçekleşir (Gossen ve ark., 1995). Bu anlamda çalışmalarımızın başlangıcında qRT-PCR yapmak için *Ctcf* transgenik EKH'lerden RNA izolasyonu yapılmıştır. Doksisisiklin verilen ve transgene sahip EKH'lerde gen indüksiyonunun gerçekleştirilebildiği mRNA düzeyinde doğrulanmıştır. Ayrıca hücrelerden protein lizatları da elde edilmiştir. Sonrasında yapılan Western Blot analizlerinde, gen indüksiyonunun protein düzeyine de yansıdığı ortaya konulmuştur.

Bir tetrasiklin analogu olan doksisisiklinin, sitotoksik düzeyin altında rtTA'i etkili bir şekilde aktive ettiği ve herhangi bir patolojiye neden olmadığı bilinmektedir (Baron ve Bujard, 2000; Gossen ve ark., 1995). Gerçekten de çalışmamızda doksisisiklin verilen, ancak transgen içermeyen kontrol grubu hücrelerde morfolojik olarak herhangi bir patolojik görünüm izlenmemiştir. Faz-kontrast mikroskopik değerlendirme ile endotel yönünde farklandırma sonrasında da morfolojik açıdan farklılık görülmemiştir.

Projemizin deneysel dizaynının temelini oluşturan Tet sistemi, Cre, FRT ve ER (östrojen reseptör) gibi diğer koşullu gen ekspresyon sistemlerine göre daha avantajlı bir sistemdir. Ayrıca daha hızlı cevap sağladığı için tercih edilmiştir. Dolayısıyla

çalışmamız teknik dizayn ve kurulum bakımından, *in vitro* bir sistemde *Ctcf* ve endotelial farklanma arasındaki olası ilişkiyi araştıran önemli bir çalışmadır.

Vasküler anomaliler, vaskülogenez ve anjiyogenez sırasında vasküler gelişimdeki kusurlara bağlı olarak meydana gelen heterojen bir hastalık grubunu temsil eder (Picard ve Galvao, 2017). Vasküler patolojik mekanizmalarla ilişkili genlerin tam olarak fonksiyonları ve embriyonik gelişim sırasında anjiyogenezini nasıl etkiledikleri günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Vasküler patolojiye bağlı olarak ortaya çıkan birçok hastalığın temelinde genetik bozukluklar bulunabilmektedir. Hatta bunların bir kısmında klinik bulguların ortaya çıkışında genetik özellikler tek başına etkili olabilmektedir.

Yapmış olduğumuz literatür çalışmaları doğrultusunda, vasküler bozukluklar ve CTCFL ilişkisine ait toplam üç temel çalışmanın bulunduğu dikkatimizi çekmiştir (Sati ve ark., 2015; Schick ve ark., 2011; Schultz ve ark., 2015). Bu çalışmalardan ikisinde CTCFL'in, juvenil anjiyofibroma (Schick ve ark., 2011) ve infantil hemajiyomalar (Schultz ve ark., 2015) olmak üzere iki tane insan benign vasküler malformasyonda eksprese edildiği raporlanmıştır. Juvenil anjiyofibromalar, gençlik dönemindeki erkeklerde nazal kavitede gelişen fibrovasküler tümörlerdir. Bazı vakalarda *CTCFL* gen dublikasyonu da mevcuttur (Scanlan ve ark., 2004). Juvenil anjiyofibromalar, artmış VEGF, insulin-benzeri büyüme faktörü 2 (IGF2), TGF- β ve diğer büyüme faktörleri ekspresyonu göstermektedir (Saylam ve ark., 2006). Infantil hemajiyomalar ise özellikle dişilerde görülen vasküler proliferasyonlardır ve *CTCFL* yine aşırı eksprese olmaktadır (Schultz ve ark., 2015). Grubumuzun yapmış olduğu çalışmada ise, *CTCFL*'in TGF- β yolağını bozarak bu süreçte rol oynayabileceği ifade edilmiştir (Sati ve ark., 2015).

CTCFL'i diğer testis-kanser antijenlerinden ayıran en önemli nokta ise, somatik dokularda eksprese olan bir paraloğunun olmasıdır. Bu paralog CTCF proteinidir (Loukinov ve ark., 2002). CTCFL ve CTCF proteinleri, tamamen birbirinin aynı merkezi 11-çinko parmak yapısına sahiptir ancak amino (N) ve karboksi (C) uçları açısından farklılık gösterir (Campbell ve ark., 2010; Loukinov ve ark., 2002). Dolayısıyla her iki proteinin aynı DNA bölgelerine bağlanabileceği fakat amino ve karboksi uçlarındaki

farklılıklar nedeniyle farklı ve muhtemelen antagonistik fonksiyonlar gerçekleştirdikleri varsayılmaktadır (Klenova ve ark., 2002; Loukinov ve ark., 2002; Sun ve ark., 2008). CTCF aracılı kromatin izolasyonunun, anjiyogenezin hiperaktivasyonuna karşı çok önemli bir koruma görevi gördüğü bilinmektedir (Tang ve ark., 2011). CTCF bir kromatin izolatörü olarak, vaskülarizasyon için çok önemli olan VEGF'in ve anjiyogenezin transkripsiyon induksiyonunu engelleyerek bu süreçlerde görev almaktadır (Lu ve Tang, 2012). Benzer DNA bölgelerine bağlanabilme noktasından hareket edilecek olursa, CTCFL'in bu süreçlere ait potansiyel rolü araştırılmaya değerdir. Bununla birlikte bizim deney modelimizde VEGF immünfluoresan ekspresyonu açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

Ektopik CTCFL ekspresyonunun fare damarlanması üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, daha önce yapmış olduğumuz çalışmamızda *Ctcf* transgenik hayvanların beyinlerine ait meninkslerde vasküler gelişimin zayıf olduğu gözlemlendi (Sati ve ark., 2015). Entorhinal korteksteki CD34 boyanması, transgenik hayvanlarda belirgin bir şekilde azalmıştı. Ayrıca transgenik hayvana ait dermis bölgesinde kontrol grubuna kıyasla artmış CD31 boyanması dikkatimizi çekmiştir (Sati ve ark., 2015). Bununla birlikte mevcut çalışmamızda, endotel induksiyon sonrasında *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan farklılaştırılmış hücrelerde immünohistokimyasal olarak, Flk1, VE-kaderin (Kohler ve ark., 2013), CD34 (Kwon ve ark., 2014), CD31 (Tsuneki ve Madri, 2014), VEGF (Sriram ve ark., 2015), ve Flt1 boyanmaları açısından gruplar arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. CD31, endotel hücre adezyon molekülü;, CD34, hematopoietik ve endotel kök hücre belirteci;, VEGF, proanjiyogenik faktör ve Flt1 olarak bilinen VEGF reseptörü de immünofluoresan değerlendirmelere dahil edilmiştir.

Çalışmamızda *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan embriyonik kök hücrelerde *in vitro* endotelial farklılaşma gerçekleştirildikten sonra, bu hücrelerde endotelial farklılaşmanın erken dönem belirteçleri olan Flk1 ve VE-kaderin proteinleri flow sitometri yöntemi ile analiz edilmiştir. Gerek flow sitometri ve gerekse immünofluoresan değerlendirmelerimizde, *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan embriyonik kök hücrelerden endotel yönünde farklılaştırılan gruplarda, Flk1 ve VE-

kaderin ekspresyonları tespit edilmiştir. HUVEC kullanılarak pozitif kontrol olarak gerek boyanma paternleri gerekse teknik uygulamanın özgüllüğü doğrulanmıştır.

Flk1, anjiyoblastların ve mezodermal kök hücrelerin erken dönem belirteci olmak ile birlikte Flk1 pozitif mezodermal hücrelerin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda endotel hücrelerini meydana getirebildiği bilinmektedir (Choi ve ark., 1998; Huber ve ark., 2004; Park ve ark., 2013). Flk1, endotel hücrelerin gelişimi, hayatta kalması, farklılaşması, göçü ve lümen oluşumu gibi neovaskülarizasyonun birçok yönünü düzenlemektedir (Sawano ve ark., 2001; Shalaby ve ark., 1995; Yamashita ve ark., 2000). Çünkü Flk1 pozitif hücreler embriyonik gelişim sırasında ve kültür ortamında fonksiyonel bir damar yapısının oluşumu ve endotel hücre kimliğinin belirlenmesi için de gereklidir (Carmeliet ve ark., 1996; Park ve ark., 2013; Shalaby ve ark., 1995). Bununla birlikte, oluşturduğumuz deney modelinde flow sitometrik analizlerde, *in vitro* endotel hücre farklılaşma sonrasında *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan gen indüksiyonunun yapıldığı hücreler arasında Flk1 ortalama floresan yoğunluk değerleri açısından herhangi bir farklılık bulunmamıştır. Flk1 immünfluoresan boyanma paterni açısından da gruplar arasında bir farklılık izlenmemiştir.

VE-kaderin ise hem matür hem de immatür endotel hücrelerde ifade edilen bir transmembran proteindir; adherens bağlantılarının oluşumuna katkıda bulunur ve hücre-hücre adezyonuna aracılık eder (Choi ve ark., 1998; Huber ve ark., 2004; Maltsev ve ark., 1993). Ayrıca, endotel hücrelerde özgül olarak eksprese edildiğinden ve endotel bariyer fonksiyonunun sürdürülmesi için gerekli olduğundan çalışmamıza dahil edilmiştir (Breier ve ark., 1996; Vittet ve ark., 1997). Çalışmamızda flow sitometrik analizlerde ortalama floresan yoğunluk açısından VE-kaderin ekspresyonu, genel olarak Flk1'e göre daha düşük olarak izlenmiştir. Bununla birlikte *in vitro* endotel hücre farklılaşma deneylerinde, *Ctcf1* transgenik ve transgenik olmayan gen indüksiyonunun yapıldığı hücreler arasında ortalama floresan yoğunluk açısından bir fark gözlenmemiştir. VE-kaderin immünfluoresan boyanma paterni açısından da farklılık görülmemiştir.

Çalışmamızda flow sitometrik analizlerimizde, ilginç bir şekilde EKH medyumunu ile kültüre edilen hücrelerde de Flk1 ve VE-kaderin ekspresyonu gözlenmiştir. Literatürde, fare EKH farklanmasının, retinoik asit (Wobus ve ark., 1997), büyüme faktörleri, stromal hücre katmanları ile hücre-hücre teması veya hücre dışı matrisler ile temas gibi ekzojen faktörlerden kaynaklanabildiği bilinmektedir (Kennedy ve Keller, 2003; Kitajima ve ark., 2003; Nishikawa ve ark., 1998; Wobus ve ark., 1997). Beş gün boyunca süren endotel yönünde farklandırma deneylerinde, destekleyici MEF hücrelerinin uzaklaştırılmış olması farklanma sinyallerini artırmış olabilir.

Özet olarak, literatürde CTCFL ve vasküler gelişim arasındaki neden-sonuç ilişkisi halen aydınlatılmış değildir. Mevcut çalışmamızda; *in vitro* kültür yapılarak, endotel yönüne farklandırılan *Ctcf* transgenik fare EKH'lerinde, vaskülogenezin erken dönem belirteçleri olan Flk1 ve VE-kaderin proteinlerini değerlendirdik. Oluşturduğumuz modele göre, Flk1 ve VE-kaderin ekspresyonu açısından, *Ctcf* geninin ektopik ekspresyonunun, endotel farklanmasında belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte moleküler mekanizmalarının anlaşılması açısından, farklı belirteçler ve deney modelleri kullanılarak araştırılmanın detaylandırılmasının gerektiği kanısındayız. Zira bir kanser-testis antijeni olan CTCFL'in vasküler gelişim, anjiyogenez ve vaskülogenez mekanizmaları üzerindeki etkisinin tümörögenез açısından da önemli olduğu tartışılmaz bir gerçektir. CTCFL ile anjiyogenez ve vaskülogenez süreçleri arasındaki moleküler mekanizmalarının anlaşılmasının, vasküler patolojilerde terapötik yaklaşımların tasarımı ve geliştirilmesi açısından önemli olduğu ve bu tür damarlanma hastalıklarına sahip birçok hasta için, ileride, insan sağlığına yönelik klinik araştırmalara öncü olabileceği düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Tez çalışmamızda, transgenik EKH modelinde ektopik *Ctcf* ekspresyonu gerçekleştirilerek, genin aşırı ekspresyonunun *in vitro* endotel farklanmada etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Çalışmamızda Tet/ON sistemi kullanılarak indüklenebilir tarzda oluşturulmuş *Ctcf* transgenik farelerden elde edilen embriyonik kök hücreler kullanılmıştır. Doksisisiklinin, sitotoksik düzeyin altında rtTA'yi aktive ettiği ve herhangi bir patolojiye neden olmadığı bilinmektedir. Çalışmamızda doksisisiklin verilen, fakat transgen içermeyen kontrol grubu hücrelerde morfolojik olarak herhangi bir patolojik görünüm izlenmemiştir. Faz-kontrast mikroskopik değerlendirme ile endotel yönünde farklanma sonrasında grupların benzer olduğu izlenmiştir.
2. Çalışmamızda, projemizin temelini oluşturan ve benzeri birçok sisteme göre daha avantajlı olan Tet sistemi kullanılmıştır. Dolayısıyla çalışmamız teknik dizayn ve kurulum bakımından, *in vitro* bir sistemde *Ctcf* ve endotelyal farklanma arasındaki olası ilişkiyi araştıran önemli bir çalışmadır.
3. Çalışmamızda, endotel yönünde indüksiyon sonrasında *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan farklandırılmış hücrelerde immünohistokimyasal olarak, Flk1, VE-kaderin, CD34, CD31, VEGF, ve Flt1 boyanmaları açısından gruplar arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir.
4. Flow sitometri ve immünofluoresan değerlendirmelerimizde, *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan embriyonik kök hücrelerden endotel yönünde farklandırılan gruplarda, Flk1 ve VE-kaderin ekspresyonları tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak HUVEC kullanılarak hem boyanma paternleri hem de teknik uygulamanın özgünlüğü doğrulanmıştır.
5. Flow sitometrik analizlerde ortalama fluoresan yoğunluk açısından VE-kaderin ekspresyonu, genel olarak Flk1'e göre daha düşük olarak izlenmiştir. Bununla birlikte *in vitro* endotelyal farklandırma deneylerinde, *Ctcf* transgenik ve transgenik olmayan gen indüksiyonunun yapıldığı hücreler arasında ortalama fluoresan yoğunluk açısından bir fark gözlenmemiştir.

6. Oluşturduğumuz modele göre, Flk1 ve VE-kaderin ekspresyonu açısından, *Ctcf* geninin ektopik ekspresyonunun, EKH'lerin endotelyal hücre yönünde farklanmada belirgin bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir.



KAYNAKLAR

Aase, K, von Euler, G, Li, X, Ponten, A, Thoren, P, Cao, R, Cao, Y, Olofsson, B, Gebre-Medhin, S, Pekny, M, Alitalo, K, Betsholtz, C, Eriksson, U. Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 2001. 104:358-364.

Abdelalim, E M. Molecular mechanisms controlling the cell cycle in embryonic stem cells. *Stem Cell Rev* 2013. 9:764-773.

Alberti, L, Losi, L, Leyvraz, S, Benhattar, J. Different Effects of BORIS/CTCF on Stemness Gene Expression, Sphere Formation and Cell Survival in Epithelial Cancer Stem Cells. *PLoS One* 2015. 10:e0132977.

Alberti, L, Renaud, S, Losi, L, Leyvraz, S, Benhattar, J. High expression of hTERT and stemness genes in BORIS/CTCF positive cells isolated from embryonic cancer cells. *PLoS One* 2014. 9:e109921.

Asahara, T, Murohara, T, Sullivan, A, Silver, M, van der Zee, R, Li, T, Witzenbichler, B, Schatteman, G, Isner, J M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997. 275:964-967.

Asano, T, Hirohashi, Y, Torigoe, T, Mariya, T, Horibe, R, Kuroda, T, Tabuchi, Y, Saijo, H, Yasuda, K, Mizuuchi, M, Takahashi, A, Asanuma, H, Hasegawa, T, Saito, T, Sato, N. Brother of the regulator of the imprinted site (BORIS) variant subfamily 6 is involved in cervical cancer stemness and can be a target of immunotherapy. *Oncotarget* 2016. 7:11223-11237.

Auernhammer, C J, Melmed, S. Leukemia-inhibitory factor-neuroimmune modulator of endocrine function. *Endocr Rev* 2000. 21:313-345.

Avasthi, S, Srivastava, N, R., Singh, A, Srivastava, M. STEM CELL: PAST, PRESENT AND FUTURE- A REVIEW ARTICLE. 2008.

Azuma, H. Genetic and molecular pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Med Invest* 2000. 47:81-90.

Baird, A, Durkin, T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type beta-transforming growth factor: interactions with acidic and basic fibroblast growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1986. 138:476-482.

Baron, U, Bujard, H. Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances. *Methods Enzymol* 2000. 327:401-421.

Bates, D O, Cui, T G, Doughty, J M, Winkler, M, Sugiono, M, Shields, J D, Peat, D, Gillatt, D, Harper, S J. VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002. 62:4123-4131.

Beattie, G M, Lopez, A D, Bucay, N, Hinton, A, Firpo, M T, King, C C, Hayek, A. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 2005. 23:489-495.

Beenken, A, Mohammadi, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009. 8:235-253.

Bellomo, D, Headrick, J P, Silins, G U, Paterson, C A, Thomas, P S, Gartside, M, Mould, A, Cahill, M M, Tonks, I D, Grimmond, S M, Townson, S, Wells, C, Little, M, Cummings, M C, Hayward, N K, Kay, G F. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res* 2000. 86:E29-35.

Berstine, E G, Hooper, M L, Grandchamp, S, Ephrussi, B. Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973. 70:3899-3903.

Biehl, J K, Russell, B. Introduction to Stem Cell Therapy. *Journal of Cardiovascular Nursing* 2009a. 24:98-103.

Biehl, J K, Russell, B. Introduction to stem cell therapy. *J Cardiovasc Nurs* 2009b. 24:98-103; quiz 104-105.

Biggers, J D, McGinnis, L K, Raffin, M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biology of reproduction* 2000. 63:281-293.

Blanpain, C, Horsley, V, Fuchs, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* 2007. 128:445-458.

Blei, F, 2013. Peripheral vascular anomalies, malformations, and vascular tumors., in: M. A. Creager, J. A. Beckman, Loscalzo. J (Eds.), *Vascular Medicine: A Companion to Braunwald's Heart Disease*. Elsevier: Philadelphia, pp. 790–809.

Breier, G, Breviario, F, Caveda, L, Berthier, R, Schnurch, H, Gotsch, U, Vestweber, D, Risau, W, Dejana, E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 1996. 87:630-641.

Brittan, M, Wright, N A. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002. 197:492-509.

Brykczynska, U, Hisano, M, Erkek, S, Ramos, L, Oakeley, E J, Roloff, T C, Beisel, C, Schubeler, D, Stadler, M B, Peters, A H. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat Struct Mol Biol* 2010. 17:679-687.

Buoncervello, M, Borghi, P, Romagnoli, G, Spadaro, F, Belardelli, F, Toschi, E, Gabriele, L. Apicidin and docetaxel combination treatment drives CTCFL expression and HMGB1 release acting as potential antitumor immune response inducers in metastatic breast cancer cells. *Neoplasia* 2012. 14:855-867.

Burdon, T, Stracey, C, Chambers, I, Nichols, J, Smith, A. Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 1999. 210:30-43.

Campbell, A E, Martinez, S R, Miranda, J J. Molecular architecture of CTCFL. *Biochem Biophys Res Commun* 2010. 396:648-650.

Can, A, 2013. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları.

Caprioli, A, Minko, K, Drevon, C, Eichmann, A, Dieterlen-Lievre, F, Jaffredo, T. Hemangioblast commitment in the avian allantois: cellular and molecular aspects. *Dev Biol* 2001. 238:64-78.

Carmeliet, P, Ferreira, V, Breier, G, Pollefeyt, S, Kieckens, L, Gertsenstein, M, Fahrig, M, Vandenhoeck, A, Harpal, K, Eberhardt, C, Declercq, C, Pawling, J, Moons, L, Collen, D, Risau, W, Nagy, A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996. 380:435-439.

Chagastelles, P C, Nardi, N B. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl* (2011) 2011. 1:63-67.

Chen, A E, Egli, D, Niakan, K, Deng, J, Akutsu, H, Yamaki, M, Cowan, C, Fitz-Gerald, C, Zhang, K, Melton, D A, Eggan, K. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell* 2009. 4:103-106.

Chen, D, McKearin, D. Dpp signaling silences bam transcription directly to establish asymmetric divisions of germline stem cells. *Curr Biol* 2003. 13:1786-1791.

Chen, X, Xu, H, Yuan, P, Fang, F, Huss, M, Vega, V B, Wong, E, Orlov, Y L, Zhang, W, Jiang, J, Loh, Y H, Yeo, H C, Yeo, Z X, Narang, V, Govindarajan, K R, Leong, B, Shahab, A, Ruan, Y, Bourque, G, Sung, W K, Clarke, N D, Wei, C L, Ng, H H. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 2008. 133:1106-1117.

Chen, Y G, Hata, A, Lo, R S, Wotton, D, Shi, Y, Pavletich, N, Massague, J. Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 1998. 12:2144-2152.

Choi, K, Kennedy, M, Kazarov, A, Papadimitriou, J C, Keller, G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998. 125:725-732.

Costa, V L, Henrique, R, Ribeiro, F R, Carvalho, J R, Oliveira, J, Lobo, F, Teixeira, M R, Jeronimo, C. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer. *Epigenetics* 2010. 5:343-351.

Cox, C M, Poole, T J. Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. *Dev Dyn* 2000. 218:371-382.

D'Arcy, V, Abdullaev, Z K, Pore, N, Docquier, F, Torrano, V, Chernukhin, I, Smart, M, Farrar, D, Metodiev, M, Fernandez, N, Richard, C, Delgado, M D, Lobanenkova, V, Klenova, E. The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 2006. 12:5978-5986.

Daheron, L, Opitz, S L, Zaehres, H, Lensch, M W, Andrews, P W, Itskovitz-Eldor, J, Daley, G Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004. 22:770-778.

de Lucas, B, Perez, L M, Galvez, B G. Importance and regulation of adult stem cell migration. *J Cell Mol Med* 2018. 22:746-754.

de Necochea-Campion, R, Ghochikyan, A, Josephs, S F, Zacharias, S, Woods, E, Karimi-Busheri, F, Alexandrescu, D T, Chen, C S, Agadjanyan, M G, Carrier, E. Expression of the epigenetic factor BORIS (CTCF) in the human genome. *J Transl Med* 2011. 9:213.

Dickson, M C, Martin, J S, Cousins, F M, Kulkarni, A B, Karlsson, S, Akhurst, R J. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 1995. 121:1845-1854.

Dieterlen-Lievre, F, Jaffredo, T, Pardanaud, L. [Emergence of the endothelial network during embryonic development]. *Pathol Biol (Paris)* 1999. 47:301-306.

Doetschman, T C, Eistetter, H, Katz, M, Schmidt, W, Kemler, R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985. 87:27-45.

Dominici, M, Le Blanc, K, Mueller, I, Slaper-Cortenbach, I, Marini, F, Krause, D, Deans, R, Keating, A, Prockop, D, Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006. 8:315-317.

Dougherty, C J, Ichim, T E, Liu, L, Reznik, G, Min, W P, Ghochikyan, A, Agadjanyan, M G, Reznik, B N. Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochem Biophys Res Commun* 2008. 370:109-112.

Dvorak, P, Dvorakova, D, Koskova, S, Vodinska, M, Najvirtova, M, Krekac, D, Hampl, A. Expression and potential role of fibroblast growth factor 2 and its receptors in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005. 23:1200-1211.

Dvorak, P, Hampl, A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol* 2005. 43:203-208.

Evans, M J. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol* 1972. 28:163-176.

Evans, M J, Kaufman, M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981. 292:154-156.

Ferrara, N, Carver-Moore, K, Chen, H, Dowd, M, Lu, L, O'Shea, K S, Powell-Braxton, L, Hillan, K J, Moore, M W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996. 380:439-442.

Ferraro, F, Celso, C L, Scadden, D. Adult stem cells and their niches. *Adv Exp Med Biol* 2010. 695:155-168.

Flamme, I, Risau, W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development* 1992. 116:435-439.

Fong, G H, Rossant, J, Gertsenstein, M, Breitman, M L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995. 376:66-70.

Frater-Schroder, M, Muller, G, Birchmeier, W, Bohlen, P. Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1986. 137:295-302.

Geijsen, N, Horoschak, M, Kim, K, Gribnau, J, Eggen, K, Daley, G Q. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004. 427:148-154.

Gerhardt, H, Golding, M, Fruttiger, M, Ruhrberg, C, Lundkvist, A, Abramsson, A, Jeltsch, M, Mitchell, C, Alitalo, K, Shima, D, Betsholtz, C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* 2003. 161:1163-1177.

Ghochikyan, A, Mkrtichyan, M, Loukinov, D, Mamikonyan, G, Pack, S D, Movsesyan, N, Ichim, T E, Cribbs, D H, Lobanenkov, V V, Agadjanyan, M G. Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J Immunol* 2007. 178:566-573.

Gjerstorff, M F, Andersen, M H, Ditzel, H J. Oncogenic cancer/testis antigens: prime candidates for immunotherapy. *Oncotarget* 2015. 6:15772-15787.

Goldie, L C, Nix, M K, Hirschi, K K. Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* 2008. 4:257-263.

Good, R A, Meuwissen, H J, Hong, R, Gatti, R A. Bone marrow transplantation: correction of immune deficit in lymphopenic immunologic deficiency and correction of an immunologically induced pancytopenia. *Trans Assoc Am Physicians* 1969. 82:278-285.

Gossen, M, Freundlieb, S, Bender, G, Muller, G, Hillen, W, Bujard, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 1995. 268:1766-1769.

Goumans, M J, Mummery, C. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 2000. 44:253-265.

Grisham, J W, Coleman, W B. Neof ormation of liver epithelial cells: progenitor cells, stem cells, and phenotypic transitions. *Gastroenterology* 1996. 110:1311-1313.

Hayes, M, Curley, G, Ansari, B, Laffey, J G. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care* 2012. 16:205.

Hima, B, A. , Srilatha, B. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 2011.

Hochman, M, Adams, D M, Reeves, T D. Current knowledge and management of vascular anomalies, II: malformations. *Arch Facial Plast Surg* 2011. 13:425-433.

Hofer, E, Schweighofer, B. Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost* 2007. 97:355-363.

Hoffmann, M J, Muller, M, Engers, R, Schulz, W A. Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem Pharmacol* 2006. 72:1577-1588.

Hoivik, E A, Kusonmano, K, Halle, M K, Berg, A, Wik, E, Werner, H M, Petersen, K, Oyan, A M, Kalland, K H, Krakstad, C, Trovik, J, Widschwendter, M, Salvesen, H B. Hypomethylation of the CTCFL/BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene. *Oncotarget* 2014. 5:1052-1061.

Hong, J A, Kang, Y, Abdullaev, Z, Flanagan, P T, Pack, S D, Fischette, M R, Adnani, M T, Loukinov, D I, Vatolin, S, Risinger, J I, Custer, M, Chen, G A, Zhao, M, Nguyen, D M, Barrett, J C, Lobanekov, V V, Schrupp, D S. Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* 2005. 65:7763-7774.

Hoodless, P A, Wrana, J L. Mechanism and function of signaling by the TGF beta superfamily. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998. 228:235-272.

Horie, M, Ito, A, Kawabe, Y, Kamihira, M. A Genetically Engineered STO Feeder System Expressing E-Cadherin and Leukemia Inhibitory Factor for Mouse Pluripotent Stem Cell Culture. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques* 2011.

Huber, T L, Kouskoff, V, Fehling, H J, Palis, J, Keller, G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature* 2004. 432:625-630.

Hubner, K, Fuhrmann, G, Christenson, L K, Kehler, J, Reinbold, R, De La Fuente, R, Wood, J, Strauss, J F, 3rd, Boiani, M, Scholer, H R. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003. 300:1251-1256.

Ihle, J N, Kerr, I M. Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 1995. 11:69-74.

Iruela-Arispe, M L, Sage, E H. Endothelial cells exhibiting angiogenesis in vitro proliferate in response to TGF-beta 1. *J Cell Biochem* 1993. 52:414-430.

İstanbul Memorial Hastanesi Reprodüktif Endokrinoloji ve Genetik Merkezi Araştırma ve Geliştirme Laboratuvarı, Embriyonik Kök Hücre Kültür ve İzolasyon Protokolü, 2015.

Itoh, S, ten Dijke, P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 2007. 19:176-184.

Jaenisch, R, Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008. 132:567-582.

Jahagirdar, B N, Verfaillie, C M. Multipotent adult progenitor cell and stem cell plasticity. *Stem Cell Rev* 2005. 1:53-59.

Jelnic, P, Stehle, J C, Shaw, P. The testis-specific factor CTCFL cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* 2006. 4:e355.

Joosse, S A, Muller, V, Steinbach, B, Pantel, K, Schwarzenbach, H. Circulating cell-free cancer-testis MAGE-A RNA, BORIS RNA, let-7b and miR-202 in the blood of patients with breast cancer and benign breast diseases. *British journal of cancer* 2014. 111:909-917.

Kalejs, M, Erenpreisa, J. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brainstorming" session. *Cancer Cell Int* 2005. 5:4.

Kang, H B, Kim, J S, Kwon, H J, Nam, K H, Youn, H S, Sok, D E, Lee, Y. Basic fibroblast growth factor activates ERK and induces c-fos in human embryonic stem cell line MizhES1. *Stem Cells Dev* 2005. 14:395-401.

Kang, Y, Hong, J A, Chen, G A, Nguyen, D M, Schrump, D S. Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* 2007. 26:4394-4403.

Kano, H, Kondziolka, D, Flickinger, J C, Park, K J, Parry, P V, Yang, H C, Sirin, S, Niranjana, A, Novotny, J, Jr., Lunsford, L D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations, Part 6: multistaged volumetric management of large arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 2012a. 116:54-65.

Kano, H, Kondziolka, D, Flickinger, J C, Yang, H C, Flannery, T J, Awan, N R, Niranjana, A, Novotny, J, Jr., Lunsford, L D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations, Part 3: outcome predictors and risks after repeat radiosurgery. *J Neurosurg* 2012b. 116:21-32.

Kano, H, Kondziolka, D, Flickinger, J C, Yang, H C, Flannery, T J, Awan, N R, Niranjana, A, Novotny, J, Lunsford, L D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations, part 2: management of pediatric patients. *J Neurosurg Pediatr* 2012c. 9:1-10.

Kano, H, Kondziolka, D, Flickinger, J C, Yang, H C, Flannery, T J, Niranjana, A, Novotny, J, Jr., Lunsford, L D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous

malformations, Part 4: management of basal ganglia and thalamus arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 2012d. 116:33-43.

Kano, H, Kondziolka, D, Flickinger, J C, Yang, H C, Flannery, T J, Niranjana, A, Novotny, J, Jr., Lunsford, L D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations, Part 5: management of brainstem arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 2012e. 116:44-53.

Kano, H, Lunsford, L D, Flickinger, J C, Yang, H C, Flannery, T J, Awan, N R, Niranjana, A, Novotny, J, Jr., Kondziolka, D. Stereotactic radiosurgery for arteriovenous malformations, Part 1: management of Spetzler-Martin Grade I and II arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 2012f. 116:11-20.

Karkkainen, M J, Haiko, P, Sainio, K, Partanen, J, Taipale, J, Petrova, T V, Jeltsch, M, Jackson, D G, Talikka, M, Rauvala, H, Betsholtz, C, Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 2004. 5:74-80.

Kennedy, M, Keller, G M. Hematopoietic commitment of ES cells in culture. *Methods Enzymol* 2003. 365:39-59.

Kholmanskikh, O, Lorient, A, Brasseur, F, De Plaen, E, De Smet, C. Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer* 2008. 122:777-784.

Kim, S J, Cheon, S H, Yoo, S J, Kwon, J, Park, J H, Kim, C G, Rhee, K, You, S, Lee, J Y, Roh, S I, Yoon, H S. Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2005. 579:534-540.

Kitajima, K, Tanaka, M, Zheng, J, Sakai-Ogawa, E, Nakano, T. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells to hematopoietic cells on an OP9 stromal cell monolayer. *Methods Enzymol* 2003. 365:72-83.

Klenova, E M, Chernukhin, I V, El-Kady, A, Lee, R E, Pugacheva, E M, Loukinov, D I, Goodwin, G H, Delgado, D, Filippova, G N, Leon, J, Morse, H C, 3rd, Neiman, P E, Lobanekov, V V. Functional phosphorylation sites in the C-terminal region of the multivalent multifunctional transcriptional factor CTCF. *Mol Cell Biol* 2001. 21:2221-2234.

Klenova, E M, Morse, H C, 3rd, Ohlsson, R, Lobanekov, V V. The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 2002. 12:399-414.

Kogler, G, Sensken, S, Airey, J A, Trapp, T, Muschen, M, Feldhahn, N, Liedtke, S, Sorg, R V, Fischer, J, Rosenbaum, C, Greschat, S, Knipper, A, Bender, J, Degistirici, O, Gao, J, Caplan, A I, Colletti, E J, Almeida-Porada, G, Muller, H W, Zanjani, E, Wernet, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004. 200:123-135.

Kohler, E E, Wary, K K, Li, F, Chatterjee, I, Urao, N, Toth, P T, Ushio-Fukai, M, Rehman, J, Park, C, Malik, A B. Flk1+ and VE-cadherin+ endothelial cells derived from iPSCs recapitulates vascular development during differentiation and display similar angiogenic potential as ESC-derived cells. *PLoS One* 2013. 8:e85549.

Kosaka-Suzuki, N, Suzuki, T, Pugacheva, E M, Vostrov, A A, Morse, H C, 3rd, Loukinov, D, Lobanekov, V. Transcription factor BORIS (Brother of the Regulator of Imprinted Sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J Biol Chem* 2011. 286:27378-27388.

Krampera, M, Franchini, M, Pizzolo, G, Aprili, G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transfus* 2007. 5:120-129.

Kruse, D, Wise, J, Poe, B, Young, A, Kelly., 2013. *Anatomy and Physiology, Anatomy and Physiology*.

Kubis, N, Levy, B I. Vasculogenesis and Angiogenesis: Molecular and Cellular Controls. Part 2: Interactions between Cell and Extracellular Environment. *Interv Neuroradiol* 2003. 9:239-248.

Kulesa, H, Turk, G, Hogan, B L. Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle. *EMBO J* 2000. 19:6664-6674.

Kunath, T, Saba-El-Leil, M K, Almousaillekh, M, Wray, J, Meloche, S, Smith, A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 2007. 134:2895-2902.

Kwon, S M, Lee, J H, Lee, S H, Jung, S Y, Kim, D Y, Kang, S H, Yoo, S Y, Hong, J K, Park, J H, Kim, J H, Kim, S W, Kim, Y J, Lee, S J, Kim, H G, Asahara, T. Cross talk with hematopoietic cells regulates the endothelial progenitor cell differentiation of CD34 positive cells. *PLoS One* 2014. 9:e106310.

Laakso, A, Dashti, R, Juvela, S, Isarakul, P, Niemela, M, Hernesniemi, J. Risk of hemorrhage in patients with untreated Spetzler-Martin grade IV and V arteriovenous malformations: a long-term follow-up study in 63 patients. *Neurosurgery* 2011. 68:372-377; discussion 378.

Lachner, M, O'Sullivan, R J, Jenuwein, T. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J Cell Sci* 2003. 116:2117-2124.

Larsson, J, Goumans, M J, Sjostrand, L J, van Rooijen, M A, Ward, D, Leveen, P, Xu, X, ten Dijke, P, Mummery, C L, Karlsson, S. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 2001. 20:1663-1673.

Letterio, J J, Geiser, A G, Kulkarni, A B, Roche, N S, Sporn, M B, Roberts, A B. Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science* 1994. 264:1936-1938.

Levine, A J, Brivanlou, A H. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 2006. 133:209-216.

Li, C, Guo, B, Bernabeu, C, Kumar, S. Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and CD105. *Microsc Res Tech* 2001. 52:437-449.

Li, J, Wang, G, Wang, C, Zhao, Y, Zhang, H, Tan, Z, Song, Z, Ding, M, Deng, H. MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 2007. 75:299-307.

Li, L, Xie, T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005. 21:605-631.

Link, P A, Zhang, W, Odunsi, K, Karpf, A R. BORIS/CTCF mRNA isoform expression and epigenetic regulation in epithelial ovarian cancer. *Cancer Immun* 2013. 13:6.

Looijenga, L H, Hersmus, R, Gillis, A J, Pfundt, R, Stoop, H J, van Gurp, R J, Veltman, J, Beverloo, H B, van Drunen, E, van Kessel, A G, Pera, R R, Schneider, D T, Summersgill, B, Shipley, J, McIntyre, A, van der Spek, P, Schoenmakers, E, Oosterhuis, J W. Genomic and expression profiling of human spermatocytic seminomas: primary spermatocyte as tumorigenic precursor and DMRT1 as candidate chromosome 9 gene. *Cancer Res* 2006. 66:290-302.

Lorzadeh, N, Kazemirad, N. Embryonic Stem Cells and Infertility. *American journal of perinatology* 2018.

Loukinov, D, Ghochikyan, A, Mkrtichyan, M, Ichim, T E, Lobanenkov, V V, Cribbs, D H, Agadjanyan, M G. Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem* 2006. 98:1037-1043.

Loukinov, D I, Pugacheva, E, Vatolin, S, Pack, S D, Moon, H, Chernukhin, I, Mannan, P, Larsson, E, Kanduri, C, Vostrov, A A, Cui, H, Niemitz, E L, Rasko, J E, Docquier, F M, Kistler, M, Breen, J J, Zhuang, Z, Quitschke, W W, Renkawitz, R, Klenova, E M,

Feinberg, A P, Ohlsson, R, Morse, H C, 3rd, Lobanenkov, V V. BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. 99:6806-6811.

Lu, J, Tang, M. CTCF-dependent chromatin insulator as a built-in attenuator of angiogenesis. *Transcription* 2012. 3:73-77.

Luna, J I, Ciriza, J, Garcia-Ojeda, M E, Kong, M, Herren, A, Lieu, D K, Li, R A, Fowlkes, C C, Khine, M, McCloskey, K E. Multiscale biomimetic topography for the alignment of neonatal and embryonic stem cell-derived heart cells. *Tissue Eng Part C Methods* 2011. 17:579-588.

Maglione, D, Guerriero, V, Viglietto, G, Delli-Bovi, P, Persico, M G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. 88:9267-9271.

Makovski, A, Yaffe, E, Shpungin, S, Nir, U. Intronic promoter drives the BORIS-regulated expression of FerT in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2012. 287:6100-6112.

Maltsev, V A, Rohwedel, J, Hescheler, J, Wobus, A M. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 1993. 44:41-50.

Martin-Kleiner, I. BORIS in human cancers -- a review. *Eur J Cancer* 2012. 48:929-935.

Martin, G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981. 78:7634-7638.

Martin, U. Therapeutic Application of Pluripotent Stem Cells: Challenges and Risks. *Front Med (Lausanne)* 2017. 4:229.

Mintz, B, Illmensee, K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975. 72:3585-3589.

Mkrtichyan, M, Ghochikyan, A, Loukinov, D, Davtyan, H, Ichim, T E, Cribbs, D H, Lobanenkov, V V, Agadjanyan, M G. DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice. *Gene Ther* 2008. 15:61-64.

Monk, M, Hitchins, M, Hawes, S. Differential expression of the embryo/cancer gene ECSA(DPPA2), the cancer/testis gene BORIS and the pluripotency structural gene OCT4, in human preimplantation development. *Mol Hum Reprod* 2008. 14:347-355.

Morrison, S J, Shah, N M, Anderson, D J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997. 88:287-298.

Motoike, T, Loughna, S, Perens, E, Roman, B L, Liao, W, Chau, T C, Richardson, C D, Kawate, T, Kuno, J, Weinstein, B M, Stainier, D Y, Sato, T N. Universal GFP reporter for the study of vascular development. *Genesis* 2000. 28:75-81.

Murrell, W, Feron, F, Wetzig, A, Cameron, N, Splatt, K, Bellette, B, Bianco, J, Perry, C, Lee, G, Mackay-Sim, A. Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa. *Dev Dyn* 2005. 233:496-515.

Murry, C E, Keller, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008. 132:661-680.

Nagano, K, Yoshida, Y, Isobe, T. Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. *Proteomics* 2008. 8:4025-4035.

Nguyen, P, Bar-Sela, G, Sun, L, Bisht, K S, Cui, H, Kohn, E, Feinberg, A P, Gius, D. BAT3 and SET1A form a complex with CTCFL/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol Cell Biol* 2008a. 28:6720-6729.

Nguyen, P, Cui, H, Bisht, K S, Sun, L, Patel, K, Lee, R S, Kugoh, H, Oshimura, M, Feinberg, A P, Gius, D. CTCFL/BORIS is a methylation-independent DNA-binding

protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res* 2008b. 68:5546-5551.

Nishikawa, S I, Nishikawa, S, Hirashima, M, Matsuyoshi, N, Kodama, H. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 1998. 125:1747-1757.

Niwa, H, Burdon, T, Chambers, I, Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev* 1998. 12:2048-2060.

Ogawa, K, Saito, A, Matsui, H, Suzuki, H, Ohtsuka, S, Shimosato, D, Morishita, Y, Watabe, T, Niwa, H, Miyazono, K. Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2007. 120:55-65.

Okabayashi, K, Fujita, T, Miyazaki, J, Okada, T, Iwata, T, Hirao, N, Noji, S, Tsukamoto, N, Goshima, N, Hasegawa, H, Takeuchi, H, Ueda, M, Kitagawa, Y, Kawakami, Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci* 2012. 103:1617-1624.

Old, L J. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun* 2001. 1:1.

Oshima, M, Oshima, H, Taketo, M M. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 1996. 179:297-302.

Papayioannou, V E, McBurney, M W, Gardner, R L, Evans, M J. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature* 1975. 258:70-73.

Pardanaud, L, Dieterlen-Lievre, F. Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Anat Embryol (Berl)* 1993. 187:107-114.

Park, C, Kim, T M, Malik, A B. Transcriptional regulation of endothelial cell and vascular development. *Circ Res* 2013. 112:1380-1400.

Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000. 50:1-15.

Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004. 117:3-32.

Patel-Hett, S, D'Amore, P A. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 2011. 55:353-363.

Peckham, I, Sobel, S, Comer, J, Jaenisch, R, Barklis, E. Retrovirus activation in embryonal carcinoma cells by cellular promoters. *Genes Dev* 1989. 3:2062-2071.

Pembrey, M E. Time to take epigenetic inheritance seriously. *Eur J Hum Genet* 2002. 10:669-671.

Phillips, J E, Corces, V G. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 2009. 137:1194-1211.

Picard, M, Galvao, V R. Current Knowledge and Management of Hypersensitivity Reactions to Monoclonal Antibodies. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2017. 5:600-609.

Poole, T J, Finkelstein, E B, Cox, C M. The role of FGF and VEGF in angioblast induction and migration during vascular development. *Dev Dyn* 2001. 220:1-17.

Pugacheva, E M, Suzuki, T, Pack, S D, Kosaka-Suzuki, N, Yoon, J, Vostrov, A A, Barsov, E, Strunnikov, A V, Morse, H C, 3rd, Loukinov, D, Lobanekov, V. The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. *PLoS One* 2010. 5:e13872.

RayChaudhury, A, D'Amore, P A. Endothelial cell regulation by transforming growth factor-beta. *J Cell Biochem* 1991. 47:224-229.

Renaud, S, Pugacheva, E M, Delgado, M D, Braunschweig, R, Abdullaev, Z, Loukinov, D, Benhattar, J, Lobanekov, V. Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative

promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res* 2007. 35:7372-7388.

Reya, T, Duncan, A W, Ailles, L, Domen, J, Scherer, D C, Willert, K, Hintz, L, Nusse, R, Weissman, I L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2003. 423:409-414.

Ribatti, D, Nico, B, Crivellato, E. Morphological and molecular aspects of physiological vascular morphogenesis. *Angiogenesis* 2009. 12:101-111.

Rippon, H J, Bishop, A E. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 2004. 37:23-34.

Risau, W, Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995. 11:73-91.

Risau, W, Sariola, H, Zerwes, H G, Sasse, J, Eklom, P, Kemler, R, Doetschman, T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988. 102:471-478.

Risinger, J I, Chandramouli, G V, Maxwell, G L, Custer, M, Pack, S, Loukinov, D, Aprelikova, O, Litzi, T, Schrupp, D S, Murphy, S K, Berchuck, A, Lobanekov, V, Barrett, J C. Global expression analysis of cancer/testis genes in uterine cancers reveals a high incidence of BORIS expression. *Clin Cancer Res* 2007. 13:1713-1719.

Roberts, A B, Sporn, M B, Assoian, R K, Smith, J M, Roche, N S, Wakefield, L M, Heine, U I, Liotta, L A, Falanga, V, Kehrl, J H, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986. 83:4167-4171.

Robertson, K D. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005. 6:597-610.

Rossant, J, Howard, L. Signaling pathways in vascular development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002. 18:541-573.

Saatci, I, Geyik, S, Yavuz, K, Cekirge, H S. Endovascular treatment of brain arteriovenous malformations with prolonged intranidal Onyx injection technique: long-

term results in 350 consecutive patients with completed endovascular treatment course. *J Neurosurg* 2011. 115:78-88.

Sati, L, Zeiss, C, Yekkala, K, Demir, R, McGrath, J. Expression of the CTCFL Gene during Mouse Embryogenesis Causes Growth Retardation, Postnatal Lethality, and Dysregulation of the Transforming Growth Factor beta Pathway. *Mol Cell Biol* 2015. 35:3436-3445.

Sato, N, Sanjuan, I M, Heke, M, Uchida, M, Naef, F, Brivanlou, A H. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. *Dev Biol* 2003. 260:404-413.

Sawano, A, Iwai, S, Sakurai, Y, Ito, M, Shitara, K, Nakahata, T, Shibuya, M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* 2001. 97:785-791.

Saxton, T M, Pawson, T. Morphogenetic movements at gastrulation require the SH2 tyrosine phosphatase Shp2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96:3790-3795.

Saylam, G, Yucel, O T, Sungur, A, Onerci, M. Proliferation, angiogenesis and hormonal markers in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 2006. 70:227-234.

Scanlan, M J, Simpson, A J, Old, L J. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun* 2004. 4:1.

Schick, B, Wemmert, S, Willnecker, V, Dlugaiczyk, J, Nicolai, P, Siwiec, H, Thiel, C T, Rauch, A, Wendler, O. Genome-wide copy number profiling using a 100K SNP array reveals novel disease-related genes BORIS and TSHZ1 in juvenile angiofibroma. *Int J Oncol* 2011. 39:1143-1151.

Schuldiner, M, Eiges, R, Eden, A, Yanuka, O, Itskovitz-Eldor, J, Goldstein, R S, Benvenisty, N. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001. 913:201-205.

Schultz, B, Yao, X, Deng, Y, Waner, M, Spock, C, Tom, L, Persing, J, Narayan, D. A Common Polymorphism within the IGF2 Imprinting Control Region Is Associated with Parent of Origin Specific Effects in Infantile Hemangiomas. *PLoS One* 2015. 10:e0113168.

Schwarzenbach, H, Eichelser, C, Steinbach, B, Tadewaldt, J, Pantel, K, Lobanenkov, V, Loukinov, D. Differential regulation of MAGE-A1 promoter activity by BORIS and Sp1, both interacting with the TATA binding protein. *BMC cancer* 2014. 14:796.

Sebald, W, Nickel, J, Zhang, J L, Mueller, T D. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem* 2004. 385:697-710.

Senger, D R, Connolly, D T, Van de Water, L, Feder, J, Dvorak, H F. Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res* 1990. 50:1774-1778.

Shalaby, F, Ho, J, Stanford, W L, Fischer, K D, Schuh, A C, Schwartz, L, Bernstein, A, Rossant, J. A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 1997. 89:981-990.

Shalaby, F, Rossant, J, Yamaguchi, T P, Gertsenstein, M, Wu, X F, Breitman, M L, Schuh, A C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 1995. 376:62-66.

Shamblott, M J, Axelman, J, Wang, S, Bugg, E M, Littlefield, J W, Donovan, P J, Blumenthal, P D, Huggins, G R, Gearhart, J D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95:13726-13731.

Simpson, A J, Caballero, O L, Jungbluth, A, Chen, Y T, Old, L J. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 2005. 5:615-625.

Singh, V K, Saini, A, Kalsan, M, Kumar, N, Chandra, R. Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Front Cell Dev Biol* 2016. 4:134.

Sleutels, F, Soochit, W, Bartkuhn, M, Heath, H, Dienstbach, S, Bergmaier, P, Franke, V, Rosa-Garrido, M, van de Nobelen, S, Caesar, L, van der Reijden, M, Bryne, J C, van Ijcken, W, Grootegoed, J A, Delgado, M D, Lenhard, B, Renkawitz, R, Grosveld, F, Galjart, N. The male germ cell gene regulator CTCFL is functionally different from CTCF and binds CTCF-like consensus sites in a nucleosome composition-dependent manner. *Epigenetics & chromatin* 2012. 5:8.

Smith, A G, Heath, J K, Donaldson, D D, Wong, G G, Moreau, J, Stahl, M, Rogers, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988. 336:688-690.

Sobhani, A, Khanlarkhani, N, Baazm, M, Mohammadzadeh, F, Najafi, A, Mehdinejadani, S, Sargolzaei Aval, F. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran* 2017. 55:6-23.

Sriram, G, Tan, J Y, Islam, I, Rufaihah, A J, Cao, T. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to arterial and venous endothelial cells under feeder- and serum-free conditions. *Stem Cell Res Ther* 2015. 6:261.

Stahl, N, Farruggella, T J, Boulton, T G, Zhong, Z, Darnell, J E, Jr., Yancopoulos, G D. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 1995. 267:1349-1353.

Stavridis, M P, Lunn, J S, Collins, B J, Storey, K G. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. *Development* 2007. 134:2889-2894.

Stevens, L C. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* 1967. 38:549-552.

Stevens, L C. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970. 21:364-382.

Sun, L, Huang, L, Nguyen, P, Bisht, K S, Bar-Sela, G, Ho, A S, Bradbury, C M, Yu, W, Cui, H, Lee, S, Trepel, J B, Feinberg, A P, Gius, D. DNA methyltransferase 1 and 3B

activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res* 2008. 68:2726-2735.

Sutton, A B, Canfield, A E, Schor, S L, Grant, M E, Schor, A M. The response of endothelial cells to TGF beta-1 is dependent upon cell shape, proliferative state and the nature of the substratum. *J Cell Sci* 1991. 99 (Pt 4):777-787.

Suzuki, T, Kosaka-Suzuki, N, Pack, S, Shin, D M, Yoon, J, Abdullaev, Z, Pugacheva, E, Morse, H C, 3rd, Loukinov, D, Lobanenkoy, V. Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Molecular and cellular biology* 2010. 30:2473-2484.

Tammela, T, Alitalo, K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell* 2010. 140:460-476.

Tammela, T, Enholm, B, Alitalo, K, Paavonen, K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005. 65:550-563.

Tang, M, Chen, B, Lin, T, Li, Z, Pardo, C, Pampo, C, Chen, J, Lien, C L, Wu, L, Ai, L, Wang, H, Yao, K, Oh, S P, Seto, E, Smith, L E, Siemann, D W, Kladdde, M P, Cepko, C L, Lu, J. Restraint of angiogenesis by zinc finger transcription factor CTCF-dependent chromatin insulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108:15231-15236.

Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001. 414:112-117.

Teplyakov, E, Wu, Q, Liu, J, Pugacheva, E M, Loukinov, D, Boukaba, A, Lobanenkoy, V, Strunnikov, A. The downregulation of putative anticancer target BORIS/CTCFL in an addicted myeloid cancer cell line modulates the expression of multiple protein coding and ncRNA genes. *Oncotarget* 2017. 8:73448-73468.

Thomson, J A, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, S S, Waknitz, M A, Swiergiel, J J, Marshall, V S, Jones, J M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998. 282:1145-1147.

Tongers, J, Roncalli, J G, Losordo, D W. Role of endothelial progenitor cells during ischemia-induced vasculogenesis and collateral formation. *Microvasc Res* 2010. 79:200-206.

Tsuneki, M, Madri, J A. CD44 regulation of endothelial cell proliferation and apoptosis via modulation of CD31 and VE-cadherin expression. *J Biol Chem* 2014. 289:5357-5370.

Ulloa-Montoya, F, Verfaillie, C M, Hu, W S. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005. 100:12-27.

Ulrich, H. Stem Cell Reviews and Reports: Induced Pluripotent Stem Cells, Embryonic Stem Cells and Development Section. *Stem cell reviews* 2017. 13:3.

van de Nobelen, S, Rosa-Garrido, M, Leers, J, Heath, H, Soochit, W, Joosen, L, Jonkers, I, Demmers, J, van der Reijden, M, Torrano, V, Grosveld, F, Delgado, M D, Renkawitz, R, Galjart, N, Sleutels, F. CTCF regulates the local epigenetic state of ribosomal DNA repeats. *Epigenetics Chromatin* 2010. 3:19.

Varricchi, G, Loffredo, S, Galdiero, M R, Marone, G, Cristinziano, L, Granata, F. Innate effector cells in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Curr Opin Immunol* 2018. 53:152-160.

Vatolin, S, Abdullaev, Z, Pack, S D, Flanagan, P T, Custer, M, Loukinov, D I, Pugacheva, E, Hong, J A, Morse, H, 3rd, Schrupp, D S, Risinger, J I, Barrett, J C, Lobanenkov, V V. Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res* 2005. 65:7751-7762.

Velazquez-Hernandez, N, Reyes-Romero, M A, Barragan-Hernandez, M, Guerrero-Romero, F, Rodriguez-Moran, M, Aguilar-Duran, M, Lazalde Medina, B. BORIS and CTCF are overexpressed in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Genetics and molecular research : GMR* 2015. 14:6094-6100.

Vittet, D, Buchou, T, Schweitzer, A, Dejana, E, Huber, P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94:6273-6278.

Wakao, S, Kitada, M, Kuroda, Y, Shigemoto, T, Matsuse, D, Akashi, H, Tanimura, Y, Tsuchiyama, K, Kikuchi, T, Goda, M, Nakahata, T, Fujiyoshi, Y, Dezawa, M. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011. 108:9875-9880.

Weissman, I L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000. 100:157-168.

Winnier, G, Blessing, M, Labosky, P A, Hogan, B L. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* 1995. 9:2105-2116.

Wobus, A M, Boheler, K R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 2005. 85:635-678.

Wobus, A M, Holzhausen, H, Jakel, P, Schoneich, J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984. 152:212-219.

Wobus, A M, Kaomei, G, Shan, J, Wellner, M C, Rohwedel, J, Ji, G, Fleischmann, B, Katus, H A, Hescheler, J, Franz, W M. Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997. 29:1525-1539.

Woloszynska-Read, A, James, S R, Link, P A, Yu, J, Odunsi, K, Karpf, A R. DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer. *Cancer Immun* 2007. 7:21.

Woloszynska-Read, A, James, S R, Song, C, Jin, B, Odunsi, K, Karpf, A R. BORIS/CTCF expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines. *Cancer Immun* 2010. 10:6.

Woolard, J, Wang, W Y, Bevan, H S, Qiu, Y, Morbidelli, L, Pritchard-Jones, R O, Cui, T G, Sugiono, M, Waine, E, Perrin, R, Foster, R, Digby-Bell, J, Shields, J D, Whittles, C E, Mushens, R E, Gillatt, D A, Ziche, M, Harper, S J, Bates, D O. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res* 2004. 64:7822-7835.

Wrana, J L, Attisano, L, Carcamo, J, Zentella, A, Doody, J, Laiho, M, Wang, X F, Massague, J. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992. 71:1003-1014.

Xu, R H, Chen, X, Li, D S, Li, R, Addicks, G C, Glennon, C, Zwaka, T P, Thomson, J A. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002. 20:1261-1264.

Xu, R H, Peck, R M, Li, D S, Feng, X, Ludwig, T, Thomson, J A. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nat Methods* 2005. 2:185-190.

Yamaguchi, T P, Dumont, D J, Conlon, R A, Breitman, M L, Rossant, J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 1993. 118:489-498.

Yamashita, J, Itoh, H, Hirashima, M, Ogawa, M, Nishikawa, S, Yurugi, T, Naito, M, Nakao, K. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 2000. 408:92-96.

Ying, Q L, Nichols, J, Chambers, I, Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 2003. 115:281-292.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem Gamze	Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti
Soyadı	TAŞ	Tel no	0536 324 01 78
Doğum tarihi	01.01.1994	e-posta	gizemgamzetas@gmail.com ggt_93@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Akdeniz Lisesi	2011
Lisans	Antalya Akdeniz Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Antalya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2018
Doktora	-	

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yökdil	68,75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Akut ve Kronik Dönem Elektromanyetik Radyasyon Uygulamasının Rat Testisinde Apoptoz ve JNK/p38 MAPK Sinyal Yolağı İlişkisinin Araştırılması	BAP - 3739	18 Ay 2018 - Devam
2209- Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destekleme Programı (Akdeniz Üniversitesi Avifaunası'nın Belirlenmesi)	TÜBİTAK-2209	2013 - 2014

Burslar-Ödüller:

- 1- Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Fakülte İkindiliği Ve Bölüm Birinciliği Yüksek Onur Ödülleri - 2015
- 2- Türk Eğitim Vakfı (TEV) Yükseköğrenim Başarı Ödülü – 2015
- 3- Türk Eğitim Vakfı (TEV) Yükseköğrenim Üstün Başarı Bursu – 2014 / 2015

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası kongre bildirileri:

- 1- Gizem Gamze Tas, Kubra Aksu, Nuray Acar Aydemir, Leyla Sati. The expression and localization of KIF17 in mouse uteri and implantation sites during peri-implantation period. 26. International Symposium on Morphological Sciences. July 5-7, Prague, Czech Republic.
- 2- Gizem Gamze Tas, Guven Akcay, Betul Danisman, Narin Derin, Leyla Sati, Alper Tunga Derin. Effect Of L-Carnitine Supplementation On Apoptosis In The Cochlea Of Aged Rats. 26. International Symposium on Morphological Sciences. July 5-7, Prague, Czech Republic.
- 3- Leyla Sati, Gizem Gamze Tas, Kubra Aksu, Nuray Acar Aydemir. CTCFL expression in mouse uteri and implantation sites during the peri-implantation period. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 26-28 Nisan 2018, Sofia (Bulgaria).
- 4- Leyla Sati, Gizem Gamze Tas, Bikem Soygur. Endogenous retroviral protein syncytin 2 receptor, MFSD2, is present in human sperm. European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). 26-28 Nisan 2018, Sofia (Bulgaria).
- 5- Leyla Sati, Gizem Gamze Tas, Bikem Soygur, Ozlem Babacan. Expression of endogenous retroviral protein Syncytin 2 in spermatozoa from normozoospermic and oligozoospermic men. II. International Expermed Congress, Expert Meeting on Personalized Reproductive Medicine. 27-30 April 2017, Kyrenia, Cyprus.
- 6- Leyla Sati, Nilay Kuscu, Gizem Gamze Tas, Bikem Soygur, Ciler Celik-Ozenci. Comparison of the expression and localization of FoxO3 in normal term and gestational diabetic placentas. 13th Multinational Congress on Microscopy, 24-29 September 2017, Rovinj, Croatia.

Ulusal kongre bildirileri:

- 1- Güven Akçay, Betül Danışman, Gizem Gamze Taş, Leyla Satı, Narin Derin, Alper Tunga Derin. Uzun Dönem L-Karnitin Tedavisinin Presbiakuzi Üzerinde Koruyucu Etkilerinin Araştırılması. 16. Ulusal Sinirbilim Kongresi. 20-23 Mayıs 2018, İstanbul.
- 2- Leyla Satı, Bikem Soygür, Gizem Gamze Taş, Hakan Er, Piraye Yargıçoğlu. Akut ve kronik dönem 900 MHz elektromanyetik radyasyon uygulamasının rat testisi üzerindeki etkisi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
- 3- Gizem Gamze Taş, Leyla Satı, Özlem Babacan, Eren Öğüt, Rahime Şekerci, Fatoş Belgin Yıldırım. Kronik Deltametrin uygulaması sonrasında karaciğerde Sirinjik asitin koruyucu etkisinin araştırılması. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 10-13 Mayıs 2018, Antalya.
- 4- Esmâ Konuk, Gizem Gamze Taş, Aslı Özmen, Emin Türkay Korgun, Necdet Demir. Maternal diyabeti olan fetal testislerde Rapamisin uygulamasının Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.
- 5- Gizem Gamze Taş, Esmâ Konuk, Aslı Özmen, Emin Türkay Korgun, Necdet Demir. Maternal Diyabeti Olan Fetal Ovaryumlarda Rapamisin Uygulamasının Endoplazmik Retikulum (ER) Stresi Üzerindeki Etkisinin Değerlendirilmesi. 13. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (THED). 30 Nisan-3 Mayıs 2016, Çeşme, İzmir.