

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**SEREBRAL KAVERNOZ MALFORMASYON
OLUŞUMUNDA
PDCD10 GENİNİN ROLÜ**

Gamze TANRIÖVER

Doktora Tezi

Antalya, 2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

SEREBRAL KAVERNOZ MALFORMASYON
OLUŞUMUNDA
PDCD10 GENİNİN ROLÜ

Gamze TANRIÖVER

Doktora Tezi

Tez Danışmanları
Doç. Dr. Necdet DEMİR
Prof. Dr. Murat GÜNEL

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2006.03.0122.008)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurul ve Senato Kararı

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

- 1. Neurosurgery.** 2008 Apr;62(4):930-8; discussion 938. PDCD10, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3, is expressed in the neurovascular unit. **Tanriover G**, Boylan AJ, Diluna ML, Pricola KL, Louvi A, Gunel M. (2009 BAD-NOVARTİS Yayın Teşvik Ödülü)
- 2. Stroke.** 2009 Apr;40(4):1474-81. Apoptotic functions of PDCD10/CCM3, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3. Chen L, **Tanriover G**, Yano H, Friedlander R, Louvi A, Gunel M.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 26/06/2009

Tez Danışmanı : Doç Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Murat GÜNEL
Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Aysel AĞAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Tanju UÇAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/2009 tarih ve ../.. sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Serebral kavernoza malformasyonlar (SKM), merkezi sinir sisteminde görülen normal beyin parankiması olmaksızın endotelyum ile kaplı vasküler kanallardan meydana gelen, vasküler malformasyonlardan biridir. Şimdiye kadar, SKM'larda üç CCM lokusu tanımlanmıştır; bunlar CCM1, CCM2 ve CCM3 olarak adlandırılmıştır. Programlı hücre ölüm geni olarak bilinen PDCD10 genindeki mutasyonlar, otozomal dominant olan serebral kavernoza malformasyon 3 (CCM3)'e sebep olmaktadır. Hastalığın patogeneğinde bu genin fonksiyonu hakkında çok az bilgiye sahip olmamıza rağmen son yıllarda CCM3 olarak bilinen PDCD10'un, MSS'nin vasküler modellenmesinde apoptotik etkiyi arttırdığı hipotezi yaygındır. Bizde, bu hipotezi test etmek amacıyla, CCM3'e has poliklonal antikolar kullanarak insan serebral ve ekstraserebral organlarında CCM3 ekspresyonunu immunohistokimya metodunu kullanarak belirlemeye çalıştık. Ayrıca, CCM3 ekspresyonu immunofloresan metodu kullanılarak farelerde de değerlendirildi. Sonrasında, CCM3 ekspresyonunu mRNA düzeyinde de değerlendirmek için prenatal ve postnatal günlerde fare beyinlerine in situ hibridizasyon metodu uygulandı.

Bu çalışma CCM3 ekspresyonunun sinir sisteminde ve çeşitli ekstraserebral organların arteriyel vasküler endotelyumunda bulunduğunu göstermektedir. Sonuçlar, CCM1 ve CCM2 için daha önce bulunan bulgular ile paralellik göstermekteydi ve buna göre, CCM3/PDCD10 proteini yoğun olarak arteriyel endotelyumda ekspre olurken venöz endotelyumda nadir olarak zayıf bir reaksiyona rastlanmaktaydı. Bulgularımız, PDCD10/CCM3'ün beyin dahil birçok organda nörovasküler ve vasküler yapılarda özellikle arteriyel endotelyumda bulunan bir protein olduğunu göstermektedir.

Fetal döneme ait fare beyinlerinde CCM3 mRNA'sı ventriküler, subventriküler ve ara zonlarda, kortikal plakda ve gelişen septum, striatum, orta beyin, pons, serebellum ve medullada görüldü. Postnatal dönemde ise, CCM3/PDCD10 ekspresyonunu koku soğanı, neokorteks, striatum, septal nukleuslar, hipokampus, dentat gyrus, talamik ve hipotalamik çekirdekler, inferior kollikulus, purkinje hücreleri, granüler hücre tabakası ve serebellumun derin nukleusları ile medullanın birçok nukleusunda gözlemledik.

Genin apoptotik etkisini araştırabilmek amacıyla genin klonlandığı hücre hatlarında TUNEL ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. Sonucu doğrulamak için yapılan DAPI işaretlemesi de hücrelerde apoptoz oranının artmış olduğunu göstermekteydi.

Bulgularımız literatür bilgileriyle değerlendirildiğinde, CCM3'ün apoptozu ve hücre migrasyonunu uyararak, fetal ve postnatal hayat boyunca endotelial hücre davranışlarını yönlendirdiği, CCM1 ve CCM2 ile birlikte öncelikle nörovasküler anjiyogenez olmak üzere ekstraserebral alanlarda vasküler yapı ve fonksiyonların düzenlenmesinde önemli roller oynadığı söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: PDCD10, serebral kavernoza malformasyon, apoptoz, nörovasküler birim.

ABSTRACT

Cerebral cavernous malformation (CCM) is one of the vascular malformations observed in the central nervous system consisting of endothelium-lined vascular channels without intervening normal brain parenchyma. So far, three CCM loci have been mapped as Ccm1, Ccm2, Ccm3 genes in CCM. Mutations in the programmed cell death 10 gene, PDCD10, cause the autosomal-dominant familial cerebral cavernous malformation 3 (CCM3). Little is known about the function of this gene in disease pathogenesis. The recent identification of PDCD10 as the gene mutated in CCM3 led us to hypothesize that CCM3 lesions might be due to derailed apoptosis which is important in CNS vascular remodelling. To test this hypothesis, first, we generated and characterized CCM3-specific polyclonal antibodies and analyzed CCM3 protein expression in human cerebral and solid organ (extra-cerebral) tissues using immunohistochemistry. Moreover, we reported CCM3 expression in mice by using immunofluorescence staining. Afterwards, we analyzed the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of CCM3 in the prenatal and postnatal mouse brain by in situ hybridization.

This study shows the expression of CCM3 in arterial vascular endothelium in various human organs and nervous system. CCM3/PDCD10 protein is strongly expressed in arterial endothelium but not or barely detectable in venous endothelium of extra-cerebral tissues. The expression pattern of CCM3/PDCD10 in multiple organ systems displays similarities to CCM1 and CCM2. As a result of this, PDCD10/CCM3 is highly expressed in the neurovascular unit and in the arterial endothelium of multiple organ systems, including the brain.

In embryonic mouse brain, Ccm3 mRNA was observed in the ventricular, subventricular, intermediate zones, the cortical plate, the developing septum, striatum, midbrain, pons, cerebellum, and medulla. In the postnatal mouse brain, we detected Ccm3/PDCD10 expression in the olfactory bulb, neocortex, striatum, septal nuclei, hippocampus, dentate gyrus, thalamic and hypothalamic nuclei, inferior colliculus, Purkinje, granule cell layers, deep nuclei of the cerebellum, in many cells and nuclei of the medulla.

In order to investigate the apoptotic effects of the gene we used a cloning protocol and also, investigated the expression of CCM3. After cloning of the PDCD10 in cell lines we showed that it increases levels of TUNEL expression and also confirmed by DAPI labelling in the nuclei of the cell lines.

These results demonstrate that Ccm3 plays an active role in neurovascular angiogenesis by inducing endothelial cell migration throughout postnatal life and also induces the apoptotic process. In conclusion, we suggest that CCM lesions may occur as a consequence of aberrant apoptosis, potentially altering the balance between the endothelium and neural cells within the neurovascular unit.

Keywords: PDCD10, cerebral cavernous malformation, CCM, apoptosis, neurovascular unit

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerekleşmesinde;

Sayın Danışman hocam Doç. Dr. Necdet DEMİR ve ikinci danışmanım Prof. Dr. Murat GÜNEL'e tezimin gerçekleşmesi için göstermiş oldukları maddi ve manevi desteklerinden dolayı,

Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi GÜNEL laboratuvarının değerli çalışanlarına, göstermiş oldukları sıcak ilgi ve bilimsel katkılarından dolayı,

LOUVI laboratuvarının Sayın hocası Angeliki LOUVI'ye, birçok moleküler tekniği öğrenmem ve uygulamamdaki yardımlarından dolayı,

Anabilim Dalımız'daki Sayın hocalarıma ve tüm arkadaşlarıma, tezimi Yale Üniversitesinde tamamlamama izin verdikleri ve bu süre içerisinde göstermiş oldukları toleranslarından dolayı,

Sevgili aileme, bana her zaman destek oldukları ve sağladıkları tüm imkânlardan dolayı,

Sevgili eşim İbrahim Kağan TANRIÖVER'e bu zorlu yolda gösterdiği anlayış ve desteğinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gamze Tanrıöver

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii-x
EKLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi-xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv-xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ ve AMAÇ	1-2
GENEL BİLGİLER	3-24
2.1 İnme (Stroke)	3
2.1.1. Kollateral Dolaşım	3
2.1.2. Serebral Kan Akışı	4
2.1.3.1. İskemik İnmeler	4
2.1.3.2. Hemorajik İnmeler	4-5
2.2. Hemorajik Beyin Hastalıkları	5
2.2.1. Primer Hemorajik Beyin Hastalıkları	5
2.2.1.1. İntrakraniyal Anevrizmalar	5-6
2.2.1.2. Polikistik Böbrek Hastalarında Anevrizmalar	6
2.2.1.3. Moyamoya	6
2.2.2. Sekonder Hemorajik Beyin Hastalıkları	6
2.2.2.1. Kalıtsal Serebral Amiloid Anjiyopatiler	6
2.2.2.2. Clotting (pıhtılaşma) Hastalığı	7
2.3. Normal Damar Yapısı	7-8
2.4. Hastalıklara İlişkin Damar Biyolojisi	8
2.5. Vaskülojenenez ve Anjiyogenez	9
2.6. Gelişim Sırasında Merkezi Sinir Sisteminde Vaskularizasyon	10-11
2.7. Vasküler Malformasyonlar	11-12
2.7.1. Arteriovenöz malformasyonlar (AVM)	12
2.7.2. Kapiller Malformasyonlar	13
2.7.3. Kalıtsal Hemorajik Telanjektaziler (HHT)	13
2.7.4. Venöz Malformasyonlar	13
2.7.5. Serebral Kavernoz Malformasyonlar (CCM)	13-14
2.7.5.1. Lezyonların Büyüklüğü ve Lokalizasyonu	15
2.7.5.2. Semptom ve Bulgular	15
2.7.5.3. Epidemiyoloji	15
2.7.5.4. Hastalığın Tedavisi	15

2.7.5.5. Hastalığın Histopatolojisi	15-16
2.7.5.6. Hastalığın Genetiği	16-18
2.7.5.6. Serebral Kavernozy Malformasyonda Genetik Heterojenite	18
2.7.5.7. Hastalığın Moleküler Genetiği	18-19
2.8. Apoptoz	19-21
2.8.1. Apoptotik Sinyalde Regülatör Mekanizmalar	21
2.8.2. Düzensiz Apoptoz Sonucunda Ortaya Çıkan Hastalıklar	22
2.8.2.1. Bcl-2 ailesi	22-23
2.8.2.2. p53	23
2.8.2.3. Sitokrom-c	23-24
2.8.2.4. Kaspazlar	24
2.9. Hipotez	25
GEREÇ ve YÖNTEM	26-51
3.1. Doku Takibi	26
3.2. Antikor Pürifikasyonu	26
3.3. İmmunohistokimya Yöntemi	26-28
3.4. İmmunofloresan Boyama Yöntemi	28
3.5. İmmünyüzdürme (immunofloating) Metodu ile Boyama	28-29
3.6. Hücre Kültürü	30
3.6.1. Tripsinizasyon ve Hücrelerin Sayılıp Uygun Oranda Odacıklı Slaytlara Ekilmesi	30-31
3.7. Hücre Hatlarına İmmunofloresan Boyama Yöntemi	31-32
3.8. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi	32
3.8.1. TRIZOL ile RNA Eldesi	32-33
3.8.2. RNA'dan cDNA Eldesi	33
3.8.2.1. cDNA Reaksiyonu	33
3.8.3. RT-PCR Reaksiyonu	34-35
3.8.3.1. 6X Mavi Örnek Yükleme Tamponunun Hazırlanması	35
3.8.3.2. %1.5'lik Agaroz Solüsyonu	35
3.9. İnsitu Hibridizasyon	35
3.9.1. Transkripsiyon Reaksiyonu için DNA Şablonunun Hazırlanması	35-37
3.9.2. Transkripsiyon Reaksiyonu	37
3.9.3. Transkripsiyon Reaksiyonunun Ardından RNA'nın Çökeltilmesi	37-38
3.9.4. İnsitu Hibridizasyon için Dokunun Hazırlanması	38
3.9.5. Kesitlere İnsitu Hibridizasyon Uygulanması	38-42
3.9.6. Fare Beyninden ISH için Prob Hazırlanması	42-44
3.9.6.1. dh5α E. coli Hücrelerine Transformasyon	44
3.10. Vektör Dizayn Edilmesi	44-45
3.10.1. pcDNA-DEST53 Gateway™ Vektöründen, pEGFP-C3 ve pRFP(C3)-Vektörlerinin İçerisine Ccm3'ün Klonlanması	46
3.11. Transfeksiyon	46-48
3.12. TUNEL Metodu	48-49
3.13. İstatistiksel Analiz	49

3.14. siRNA Tekniği	49
3.14.1. RNA İnterferens (Post-transkripsiyonel Gen Susturma)	49-50
3.15. Western Blot Analizi	50-51
3.16. Elektron Mikroskopik Değerlendirme	51-52
BULGULAR	53-77
4.1. Antikor Özgüllüğünün Test Edilmesi	53
4.2. İmmunohistokimya Bulguları	54-60
4.2.1. İnsan Serebral Dokularında CCM3 (PDCD10)'ün İmmunohistokimyasal Analizi	54-57
4.2.2. İnsan Ekstra-Serebral Dokularında CCM3 (PDCD10)'ün İmmunohistokimyasal Analizi	57-60
4.3. İmmunofloresan İşaretleme	60
4.4. İmmunyüzdürme Metodu ile İşaretleme	61
4.5. Hücre Kültürü ve İmmunofloresan Boyanma	61-63
4.6. RT-PCR Reaksiyonu	63
4.7. İn situ Hibridizasyon	63-68
4.8. Klonlama Bulguları	69-70
4.9. TUNEL Bulguları	70-71
4.10. İstatistiksel Analiz	71-73
4.11. Western Blot Analizi	73-74
4.12. siRNA Tekniği	74-75
4.13. Elektron Mikroskopik Değerlendirme	75-77
TARTIşMA	78-83
SONUÇLAR	84
KAYNAKLAR	85-102
ÖZGEÇMİş	103
EKLER	104

Ek 1. Neurosurgery. 2008 Apr;62(4):930-8; discussion 938. PDCD10, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3, is expressed in the neurovascular unit. **Tanriover G**, Boylan AJ, Diluna ML, Pricola KL, Louvi A, Gunel M. (2009 BAD-NOVARTİS Yayın Teşvik Ödülü)

Ek 2. Stroke. 2009 Apr;40(4):1474-81. Apoptotic functions of PDCD10/CCM3, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3. Chen L, **Tanriover G**, Yano H, Friedlander R, Louvi A, Gunel M.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SVH	: Serebrovasküler hastalıklar
İKH	: İntrakraniyal hemoraji
DSA	: Dijital çıkarma anjiyografi
CT	: Bilgisayarlı tomografi
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
İA	: İntrakraniyal anevrizmalar
SAH	: Subaraknoid hemoraji
ADPKD	: Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı
PKD1	: Polycystin-1
PKD2	: Polycystin-2
KSAA	: Kalıtsal serebral amiloid anjiyopati
MSS	: Merkezi sinir sistemi
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR1	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü-1
VEGFR2	: Vasküler endotelyal büyüme faktör reseptörü-2
Tie	: Ig ve EGF homoloji domeyini içeren tirozin kinaz
Ang-1	: Anjiyopöietin-1
SVM	: Serebral vasküler malformasyonlar
ALK1	: Aktivin A reseptörü
ENG	: Endoglin
AVM	: Arteriovenöz malformasyonlar
HHT	: Kalıtsal hemorajik telanjektaziler
ALK1	: Aktivin reseptör like kinase-1
Acvr11	: Aktivin reseptör like kinase-1
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
Tie2	: Anjiyopöietin-2 reseptörü

SKM	: Serebral kavernoza malformasyonu
CCM1	: Serebral kavernoza malformasyonu geni-1
Krit1	: Krev1/Rap1A Interaction Trapped 1
CCM2	: Serebral kavernoza malformasyonu geni-2
CCM3	: Serebral kavernoza malformasyonu geni-3
PDCD10	: Programlı hücre ölümü geni-10
Y2H	: Yeast 2-hibrit
ICAP1	: İntegrin sitoplazmik domeyin-ilişkili protein
PTB	: Fosfotirozin bağlanma
NPXY	: Asn-Pro-X-Tyr
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz
AIF	: Apoptozu indükleyici faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATP	: Adenozin trifosfat
ICAD	: Kaspazı aktiveleyen deoksiribonüklazın inhibitörü
CAD	: Kaspazı aktiveleyen deoksiribonüklaz
PFA	: Paraformaldehit
PBS	: Fosfat tamponu
DEPC	: Dietil prokarbonat
DAB	: 3,3' Diaminobenzidine
DMEM	: Dulbecco's modified essential medium
FBS	: Fetal bovine serum
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat solüsyonu
DAPI	: 4,6-diamino-2-phenylindole
DTT	: Dithiothreitol
PMSF	: Fenilmetansülfonilflorid
TEMED	: N,N,N',N'-Tetrametiletildiamino
TUNEL	: İn situ terminal deoksiribonükleotid transferaz (dTd) labeling
Tween 20	: Polioksietilen-sorbitanmonolaurat
TdT	: Terminal deoksiribonükleotid transferaz

GFP : Yeşil floresan proteini
RFP : Kırmızı floresan proteini
BHK : Bebek hamster böbrek hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	<u>Sayfa No</u>
2.1.3.1.1. Kortekste iskemi alanı.	4
2.1.3.2.1. Kortekste hemoraji alanı.	5
2.3.1. Normal arter ve venin histolojik tabakaları	8
2.4.1. Beyinde damar duvarının bozulması.	8
2.5.1. Vaskülojenenez ve anjiyogenez.	9
2.7.5.1. Lezyonun MRI ile farklı kesitlerden görüntüsü.	14
2.7.5.6.1. İntegrin $\beta 1$ ile ICAP1 α arasındaki ilişki.	17
2.7.5.6.2. CCM2'nin, p38 MAPK sinyal yolundaki proteinlerle ilişkisi	18
2.7.5.8.1. PDCD10 geninin haritadaki yerinin şematize olarak gösterilmesi.	19
2.8.1. Nekroz ve apoptozun morfolojik özellikleri.	20
2.8.2.1.1. Canlı hücrelerde apoptotik yolaklar.	23
3.9.1.1. pcDNA-DEST53 plazmidine klonlanan Ccm3 geni.	36
3.9.1.2. Vektör ve genin jeldeki görüntüsü.	36
3.10.1.1. pEGFP-C3 vektörüne Ccm3 klonlanması.	46
3.11.1. Lipofektamin-2000'in canlı hücrelere uygulanışı.	48
4.1.1. CCM3 antikör özgüllüğünün Western blot yöntemiyle gösterilmesi.	52
4.2.1.1. İnsan serebellumunda CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi.	53
4.2.1.2. İnsan beyninin akcevherinde CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi.	54
4.2.1.3. İnsan talamusunda CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi.	55
4.2.1.4. İnsan serebral korteksinde CCM3 immunoreaktivitesi.	55
4.2.2.1. İnsan karaciğer, deri ve böbrek dokusunda CCM3 immunoreaktivitesinin dağılımı.	57
4.2.2.2. İnsan akciğer, dalak ve iskelet kasında CCM3 immunoreaktivitesi.	58
4.3.1. Fare serebellumundan alınan örnekte CCM3 immunoreaktivitesi.	59
4.4.1. P4 ve P7 fare beyinlerinde CCM3 immunoreaktivitesi.	60
4.5.1. Hücre hatlarında CCM3 immunreaksiyonu.	61
4.6.1. Hücre hatlarından elde edilen PCR sonucu.	62

4.7.1. Ccm3 geninin in situ hibridizasyon ile değerlendirilmesi.	64
4.7.2. Ccm3 geninin fare beyin dokusunda bazı alanlarda büyütülerek in situ hibridizasyon metoduyla gösterilmesi.	65
4.7.3. P21 fare beyinlerinden alınan örneklerde seri kesitler üzerinde Ccm1, Ccm2 ve Ccm3 için mRNA düzeylerinin değerlendirilmesi.	66
4.7.4. P14 fare beyinlerinde in situ hibridizasyon ve immunofloresan sonuçlarının kıyaslanması.	67
4.8.1. Klonlama sonrasında hücrelerin durumu	68
4.8.2. Ccm3 geninin RFP vektörüne klonlanması.	69
4.9.1. Ccm3 geninin klonlama sonrasında TUNEL reaksiyonu.	70
4.10.1. HeLa hücrelerine transfeksiyon sonrası apoptotik hücre ölüm oranı.	71
4.10.2. Cos7 hücrelerine transfeksiyon sonrası apoptotik hücre ölüm oranı.	71
4.10.3. Transfeksiyonun başarısının kontrol edilmesi.	72
4.11.1. Transfeksiyon sonrası Western blot analizi.	73
4.12.1. BHK hücrelerinin siRNA oligonükleotidleri yardımıyla Ccm3 geninin susturulması.	74
4.13.1. Normal yapıda beyin damarı elektronmikrografı.	76
4.13.2. CCM oluşumunun elektron mikroskopik görüntüsü.	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.7.1. Vasküler malformasyonların karakteristik özellikleri	12
Tablo 3.11.1. Lipofektamin 2000'in kullanım klavuzundan alınmıştır.	47

GİRİŞ ve AMAÇ

Beyin, istemli hareketlerin denetlenmesi, duyuların birleştirilip yönlendirilmesi, yüksek düzeydeki zihinsel, duyuşal ve motor işlevlerin düzenlenmesi gibi vücudtaki birçok fonksiyonu kontrol eden yapı ve işlev bakımından oldukça kompleks ve özelleşmiş bir sinir sistemi organıdır. Bu kompleks ve özelleşmiş fonksiyonların yerine getirilmesi için beynin düzenli olarak kanlanması ve kan akımının da kontrol altında tutulması gerekmektedir. İnme (strok), travma dışındaki bir nedenle, beyine oksijen ve besin getiren kan damarlarının yırtılması veya kan akımının kısa veya uzun süreli yetmezliğine bağılı olarak ortaya çıkan vasküler bir bozukluk olarak tanımlanabilir. İnme, yaş, cinsiyet, aile öyküsü, etnik köken, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi birçok risk faktörüne ek olarak oldukça kompleks ve patogenezi henüz tam olarak çözülememiş vasküler bir hastalıktır. İnmeye neden olan vasküler hastalıklar;

- arteriovenöz malformasyonlar,
- kapiller malformasyonlar,
- venöz malformasyonlar,
- kalıtsal hemorajik telanjektaziler,
- serebral kavernoş malformasyonlar olarak beş ana sınıfta toplanmaktadır.

Serebral kavernoş malformasyonlar, kavernoş anjiyom, kavernoş malformasyon ya da serebral kavernoma olarak adlandırılmaktadırlar. Serebral kavernoş malformasyon, kapiller damarların normal damar elemanlarını kaybetmesi ve anormal vasküler yapıların oluşmasıyla karakterize vasküler bir hastalıktır. Bu hastalık vasküler malformasyonların %10-15'ini oluşturmaktadır. Hastalığın toplumda görülme sıklığı düşük olmasına rağmen, İspanyol kökenli Amerikalılar gibi bazı özel topluluklarda bulunma oranı daha fazla olduğundan hastalık dikkat çekmiştir. Serebral kavernoş malformasyonlar, otozomal dominant formda kalıtıldığı gibi, sporadik olarak da ortaya çıkmaktadırlar. Bu nedenle yapılan moleküler çalışmalar sonucunda günümüze kadar bu hastalık ile ilgili 3 gen belirlenmiştir. Bunlar; CCM1 lokusu içerisinde yer alan Krit1 (Krev1/Rap1A Interaction Trapped 1) 7q11'de, CCM2 (Malcaavernin) 7p22'de ve CCM3 (PDCD10: Programmed Cell Death 10 gene) 3q'da klonlanmıştır. Literatürde Krit1 ve CCM2 ile ilgili çalışmalar, bu genlerin serebral kavernoş malformasyonda rol aldığını ve birbirleriyle ilişki içerisinde olduklarını göstermektedir. Ancak PDCD10 adı ile anılan Ccm3 geninin serebral kavernoş malformasyona yol açtığı bilinmesine rağmen, gen ve protein düzeyindeki bilgilerin eksikliği nedeniyle hastalığın patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Son yapılan çalışmalarda, Krit1 ve CCM2'nin birbirleriyle ilişkili oldukları aynı yolak üzerinden etki yaptıkları bildirilmektedir. Aynı hastalığa sebep olan üçüncü gen

yani CCM3'ün de bu yolak üzerinde yer alacağı ve diğer iki genin etkisiyle birlikte hastalığa sebep olacağı fikrinden yola çıkarak bu üçüncü geni aydınlatmayı amaçladık. Bu araştırmada, immunohistokimya, immunofloresan, Western blot, RT-PCR, hücre kültürü, siRNA, CCM3 klonlama ve TUNEL gibi moleküler teknikleri kullanarak PDCD10 proteininin hücresel lokalizasyonunun belirlenmesi, vasküler gelişimin ve vasküler bütünlüğün korunmasındaki rolünün aydınlatılması, oluşturulan in vitro sistemler yardımıyla serebral kavernoza malformasyonların oluşumunda görevli hücresel mekanizmaların tanımlanması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Organlarımızın uyum içerisinde ve amaçları doğrultusunda çalışmasını sağlamak, ayrıca çevresel uyaranların algılanarak onlara yanıt oluşturulması ve yaşamın devamlılığı için, sağlıklı bir beyin tartışmasız ilk koşuldur. Beyin yapısında meydana gelecek patolojik değişiklikler, hayatın kaybedilmesinde ya da yaşam kalitesinin bozulmasında önemli bir yer oluşturmaktadır. Vücudun en önemli O₂ tüketim bölgesi olan merkezi sinir sisteminin oksijensiz kalmaya toleransı çok zayıftır (1). Bu nedenle beyini besleyen damarlardaki herhangi bir yetersizlik neticesinde ortaya çıkan klinik tablo serebrovasküler hastalıkların (SVH) oluşumuna sebep olmaktadır. Serebrovasküler hastalıkların ortaya çıkmasında primer neden ise inme (stroke)'dir.

2.1 İnme (Stroke)

İnme beyine oksijen ya da besin getiren kan damarlarının travma dışındaki bir nedenle yırtılması veya o alanda pıhtının oluşması ile karakterize edilen vasküler bir bozukluk olarak tanımlanmaktadır. Kısa ya da uzun süreli olarak oksijensiz kalan beyin bölgesindeki sinir hücreleri, hipoksiye bağlı olarak fonksiyon kaybı gösterirler. Oksijensizliğin şiddetlenerek anoksi düzeyine ulaşmasında ise sinir hücreleri ölümü ve bu hücrelerin yönlendirdikleri fonksiyonların kaybı ortaya çıkar. Bu fonksiyonların hayati önemine bağlı olarak yaşam kalitesinde bozulmalardan başlayarak ölüme varan sonuçlar izlenir (2, 3).

İnme Amerikan Kalp Derneğinin verilerine göre, ABD'de kanser ve kalp hastalığından sonra üçüncü ölüm nedeni olarak bildirilmiştir. ABD'de yılda 60.000'den fazla kişinin inmeden etkilendiği, 20.000'den fazla kişinin ise inme nedeniyle hayatını kaybettiği rapor edilmiştir (4).

Çoğunlukla aniden ortaya çıkan bir felç, duyu kaybı, konuşma güçlüğü, tek veya çift taraflı görme bozukluğu, çift görme, baş dönmesi ve dengesizlik gibi yakınmalarla ortaya çıkan bu hastalık da ilk 6 saat içinde tanı konulması ve tedaviye başlanması hayati bir öneme sahiptir (6). Hipoksiye çok hassas olan beyini kansız bırakmamak için, kontrol edici ve düzenleyici vasküler yapılanmalar gelişmiştir. Bunlar ikiye ayrılır.

- 1- Kollateral Dolaşım,
- 2- Serebral Kan Akışı

2.1.1. Kollateral Dolaşım

Karotis sistemi ile vertebrobasiler sistem beyin tabanında birbirleriyle bağlanarak Willis halkasını yaparlar. Böylece ön ve arka iki sistem birbirine bağlanır. Sistemin birinde bir aksama olursa, ters yönde de olsa arteriyel bir kan akımı sağlanır.

2.1.2. Serebral Kan Akışı

Beynin ihtiyacına göre kanın, belirli bölgelere çok ya da az iletilmesidir.

İnmenin oluşum nedenleri göz önüne alındığında iskemik ve hemorajik olarak iki tipi tanımlanmaktadır.

2.1.3.1. İskemik İnmeler

Serebral tromboz ve serebral embolizis olarak tanımlanan iki farklı oluşum mekanizmasına sahiptir ve bu grupta, ana neden damarın herhangi bir şekilde tıkanması ve devamındaki alanın kanlanamaması durumudur. Serebral tromboz, iskemik inmelerin en yaygın görülen tipini oluşturmaktadır (Şekil 2.1.3.1.1).



Şekil 2.1.3.1.1. Korteksde iskemi alanı. Beyinde iskemi oluşan bölgenin kanlanamaması sonucunda kan akımının olmadığı alanda dokunun nekroza uğraması gösterilmiştir (5).

2.1.3.2. Hemorajik İnmeler

Serebral, subaraknoid ve karışık hemoraji olarak 3 tipte karşılaşılan bu inme tipinin nedeni, damar duvarının yırtılmasıdır (6) (Şekil 2.1.3.2.1). Hemorajik inmelerin sebebi genellikle hipertansiyon, konjenital anevrizma ya da konjenital malformasyonlardır. Hemorajik inmelerin toplumda görülme sıklığı %20 civarındayken trombolik inmeler %50, embolik inmeler de %30 civarında görülmektedirler.



Şekil 2.1.3.2.1. Korteksde hemoraji alanı. Damar duvarının hasarlanması sonucunda ortaya çıkan hemorajinin tablosudur. Sızıntı şeklinde olan kanama beynin o bölgesinde ciddi hasarlar meydana getirebilir (5).

2.2. Hemorajik Beyin Hastalıkları

Hemorajik beyin hastalıkları ya da intrakraniyal hemorajiler (İKH), inmelerin %20'sinin sebebini açıklamaktadır. Bunların yıllık tekrar oranı ise 100.000'de 20 olarak belirlenmiştir (7, 8). Şu ana kadar dijital anjiyografi çıkartma tekniği (DSA: digital subtraction angiography), bilgisayarlı tomografi (CT: computed tomography) ve manyetik rezonans ile görüntüleme (MRI: Magnetic Resonance Imaging) gibi görüntü tekniklerinin gelişmesi ile tedavi seçenekleri; kitle şeklindeki lezyonlar için cerrahi müdahale ile ikincil ve üçüncül önleyici tedbirleri içermektedir. Günümüzde araştırmacılar hemorajik felçlerin 3. faz tedavisinin girişimleri içerisinde, bunlar da moleküler yaklaşımlardır. Modern biyolojik ve genetik keşifler, hemorajik beyin hastalıklarının moleküler ve hüresel dayanaklarının çözülmesini sağlamaktadır.

Hemorajik beyin hastalıkları Primer ve Sekonder hemorajik beyin hastalıkları olmak üzere iki farklı kategoriye ayrılır.

2.2.1. Primer Hemorajik Beyin Hastalıkları

Hemorajiye yatkın olan lezyonlar vasküler ya da parankimal anormalliklerdir.

2.2.1.1. İntrakraniyal Anevrizmalar

İntrakraniyal anevrizmalar (İA), subaraknoid hemorajiye (SAH) sebep olan ikinci yaygın anevrizmalardır. SAH'ler, mortalite oranı %12 olan zayıf prognozlu, nörocerrahi aciliyeti olan hastalıklardır (9, 10).

İA'ların ortaya çıkması da yaklaşık olarak %1-6 oranındadır (11). Çok yaygın olmasına rağmen bu hastalığın patogenezi ve moleküler temeli tamamen anlaşılamamıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, çeşitli çevresel ve hasta spesifik

değişikliklere işaret etmektedir. Bu çalışmalarda, İA'nın çoğunlukla kadınlar arasında yaygın olduğu, hipertansiyon, arteroskleroz, diyabet ve sigara kullananların risk grubunu oluşturduğu belirlenmiştir (12, 13).

2.2.1.2. Polikistik Böbrek Hastalarında Anevrizmalar

Otozomal dominant polikistik böbrek hastalıklarının (ADPKD) %12'den fazlası intrakraniyal anevrizmalara, %5.5'i de SAH'a sahiptir (14). ADPKD'li hastaların %85'i 16p kromozomunda PKD1 (polycystin-1) mutasyonuna sahipken, kalan %15'i de 4q'da PKD2 (polycystin-2) mutasyonuna sahiptir (15-17). Her 2 protein de kan damarlarında görülür ve spesifik olarak endotelial hücreler ve düz kas hücrelerinde yer alırlar. Bu proteinler damar duvarlarının yapısal bütünlüğünde önemli rol oynarlar (18, 19).

2.2.1.3. Moyamoya

Japonca "duman kümesi" anlamına gelen bu kelime, bazal gangliyonlar bölgesinde telanjektatik (kapillerlerin kalıcı olarak genişlemesi) damarlarla ilişkilendirilmiş çocukluk hastalığıdır. Nörolojik eksiklikler ve felç ile kendini gösteren bu hastalıkta MRI bulgularında iskemik lezyonlar izlenir (20). Bu hastalık Japon populasyonunda ailesel fenotiplerde oldukça yaygın görülmektedir (21). 10-14'lü yaşlarda artarken; 40'lı yaşlarda da görülme sıklığı çok düşüktür. Ancak hastalığa sebep olan herhangi bir gen belirlenmemiştir (22).

2.2.2. Sekonder Hemorajik Beyin Hastalıkları

Metabolik sendromlar, koagulasyon faktör eksiklikleri ya da hipertansiyon sebebi ile hemorajinin ortaya çıkmasıdır.

2.2.2.1. Kalıtsal Serebral Amiloid Anjiyopatiler (CAA)

CAA, serebral kan damarları duvarında amiloid depozitlerinin varlığıyla karakterizedir. Amiloid b formundaki proteinin toplanmasıdır. Sıklıkla yaşa bağlı olarak ve çözülemez formda görülür bu nedenle de depolanır. Sporadik vakalarda ise, geniş lobar beyin hemorajileri şeklinde yetişkinlerde görülmektedir. MRI da ise, önce beyin hemorajisi daha sonra beyindeki hemosiderin formlarının boyanmaları ile karakterizedir (23).

CAA'lar ile kalıtsal serebral hemoraji, inmenin moleküler düzeyde ilk kez tanımlanan mendelyan formudur. Bunun iki alt tipi belirlenmiştir. Bu populasyonlarda yapılan çalışmalarda, korteksde ya da onu çevreleyen araknoid de küçük arterler, arteriollerdeki amiloid benzeri depozitler ve skleroz görülmüştür. Bu iki hastalıkta da patolojik damarlar, sıklıkla düzensiz bir dağılım sergilerler ve korteksde toplanırlar (23, 24).

2.2.2.2. Clotting (Pıhtılaşma) Hastalığı

Çeşitli kanama bozukluğu olan kişilerde bu hastalığa rastlanılmıştır. Faktör 5 (parahemofili), 7, 8 (hemofili A) ve 13'ü kodlayan genlerindeki mutasyonlu hastalar, intraserebral hemoraji riskine sahiptirler. Bu faktörlerden biri eksik olduğunda, yaralanmayla ya da kontrol edilemeyen kanamalarla erken dönemde ve çocuklukta ortaya çıkar. İntraventriküler kanamalar, genellikle doğumda ve yenidoğanda meydana gelir. Yaşam boyunca ortaya çıkan minör kanamalar, oldukça kötü seyreden intrakraniyal hemorajiler meydana getirirler.

2.3. Normal Damar Yapısı

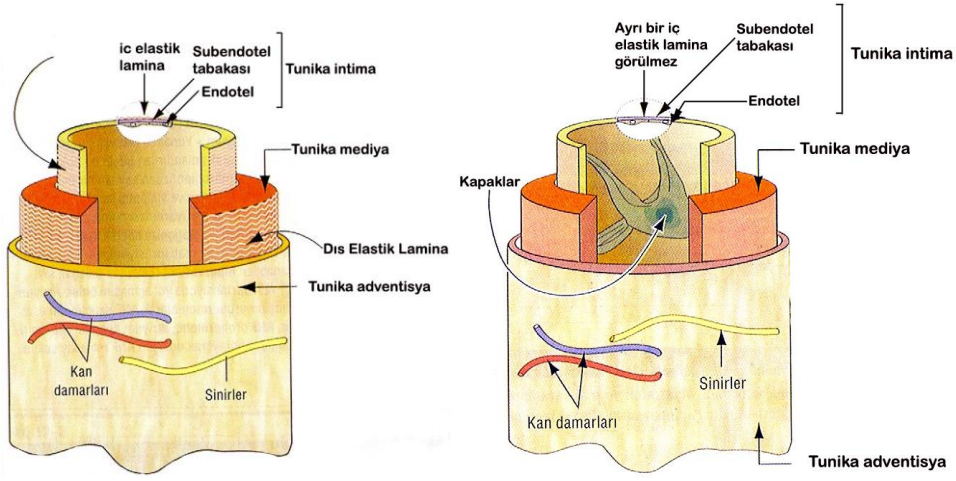
Genel olarak damarlar 3 katmandan oluşmaktadır.

1-Tunika İntima (iç katman); bir endotel örtüsü, gevşek bağ dokusundan oluşan bir ara tabaka (subendotel) ve elastik liflerin dış tabakasından oluşan iç elastik laminadan meydana gelmektedir. Ancak bu iç elastik lamina venlerde görülmez.

2-Tunika Mediya (orta katman); değişik sayıda kollajen lif, hücre dışı ağ ve düzensiz geçitleri olan elastik yapraklarla çevrili düz kas hücrelerinden oluşur. Kollajen lifler, düz kas hücreleri için destekleyici bir ağ oluştururlar ve damar duvarının gerilmesini sınırlarlar. Venlerin kollajen içerikleri arterlerden daha fazladır.

3-Tunika Eksterna (dış katman) veya adventisya, başlıca bağ dokusundan oluşur. Tunika mediyayı adventisyadan ayıran bir dış elastik lamina görülebilir. Büyük damarların adventisyalarda, oksijen ve besleyici maddeleri sağlamak için, tunika mediyanın dış kısmına kadar giren küçük damarlar (vaza vazorum) bulunabilir (Şekil 2.3.1) (25).

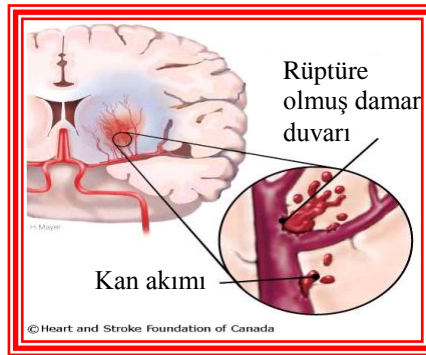
Arter sisteminin son dalları arteriyollerdir. Arteriyoller buldukları bölgelerde, damar büzülmesi (vazokonstriksiyon) ve damar genişlemesi (vazodilatasyon) yoluyla kapiller yataklara kanın farklı oranda dağılmasını düzenlerler. Arteriyoller direnç damarları olarak da kabul edilirler ve sistemik kan basıncının en büyük bileşenini oluştururlar. Arteriyolün dışındaki kısım, arter sisteminin uç dalları olan metarteriyoldür. Bunlarda düz kaslar, genellikle aralıklı, tek sıralı yerleşim gösterirler ve kan akımının önemli bir yerel düzenleyicisini oluştururlar (3). Kapillerler, bazal lamina ile çevrili, yüksek derecede geçirgen, tek sıralı endotel hücrelerinin oluşturduğu oldukça ince tüplerdir. Venöz sistem, kapiller yatağın sonundan, bir postkapiller venül ile başlar ve kan hücrelerinin dokulara diyapedez denilen bir mekanizmayla geçişinde tercih ettikleri yerlerdir. Venler, aynı büyüklükteki arterlerle kıyaslandıklarında, duvarları nispeten incedir. Venlerin yüksek kapasitesi duvarlarının genişleyebilmesine bağlanmaktadır ve bu nedenle, kan içeriği venlerin hacmine göre nispeten fazladır. Lümendeki basıncın biraz artması, içerdiği kan hacminin büyük miktarlarda artışına neden olur. Kanın geri kaçışını önleyen kapakların olması da venlerin tipik bir özelliğidir. İç katmanın lümene doğru yaptığı bir çıkıntı halindeki kapaklar, üzeri endotel hücreleriyle örtülü, elastik ve kollajen liflerle güçlendirilmiş yapılardır (25).



Şekil 2.3.1. Normal arter (sol) ve venin (sağ) histolojik tabakaları (25).

2.4. Hastalıklara İlişkin Damar Biyolojisi

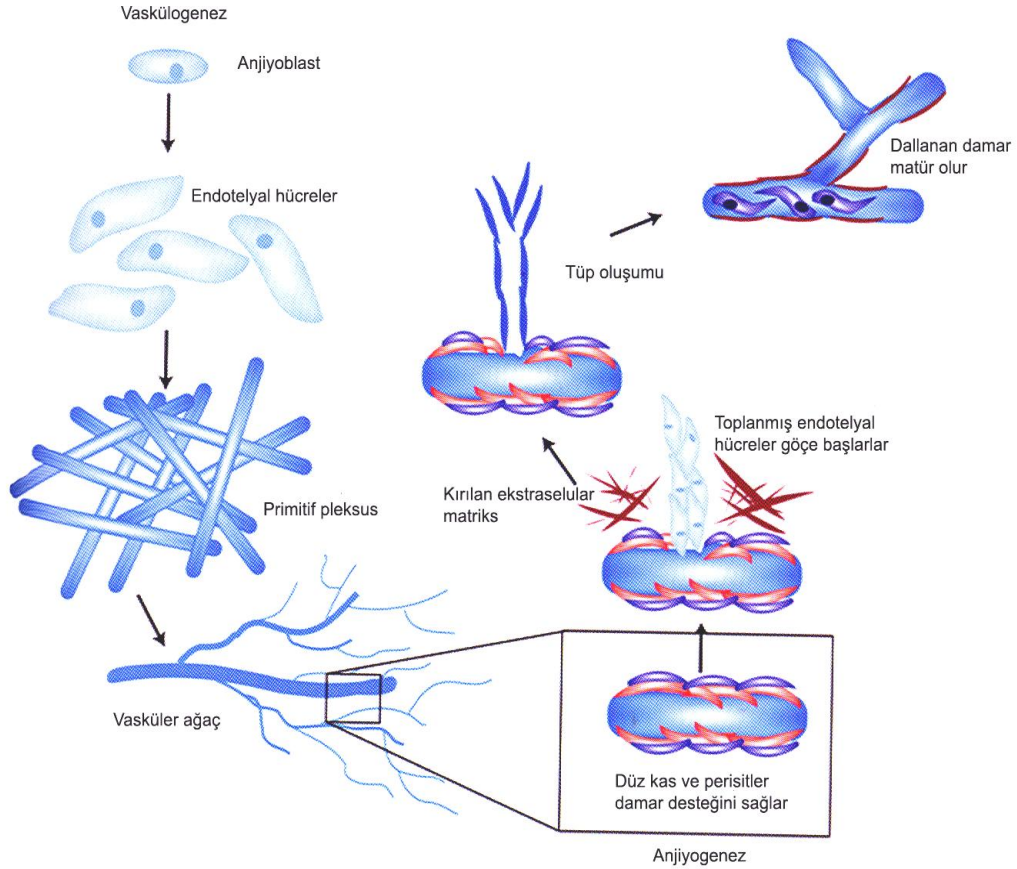
Hemorajik beyin hastalıklarında en önemli sorun, damar biyolojisinde bozulmaların ortaya çıkmasıdır (Şekil 2.3.1). Anjiyogenez ve vaskülogenez sırasında da damar biyolojisinde sorun ortaya çıkabilir. Serebral damarlar, arterler ve venler, anjiyogenez süreci boyunca embriyolojik olarak gelişirler ve nöral tübün çevresinde aortik yaydan filizlenen büyük damarlarla anastomatik bağlantılar yaparlar. Watershed alanlarının (düşük ya da hiç kan akımının olmadığı hasarlı alanlardır) lokalizasyonunun nasıl olduğu, vasküler anomalilerin ve hemorajik felçlerin nasıl meydana geldiğinin anlaşılmasında oldukça önemlidir. Bu nedenle anjiyogenez ve vaskülogenez mekanizmalarının anlaşılması hemorajik beyin hastalıklarının patolojisinin çözülmesine de ışık tutacaktır.



Şekil 2.4.1. Beyinde damar duvarının bozulması. Beyindeki damarlardan herhangi birinde meydana gelebilecek ufak bir sorun o bölgede damardan kan hücrelerinin çıkmasına ya da damarın tıkanmasına sebep olacaktır (26).

2.5. Vaskülojeniz ve Anjiyogeniz

Visseral mezodermden vitellüs kesesinin duvarına göç eden anjiyoblastlar, kan hücreleri ve kan damarlarına farklırlar. Embriyolojik hayatın 3. haftasında anjiyoblastlar mezodermden farklılmaya başlar ve küçük sinsisyal adacıkları oluştururlar (27, 28). Sinsisyal hücrelerin bu küçük kümeleri hücre grupları arasında bağlantı kurarak sinsisyal pleksusu oluşturmak için ince uzantılar verirler. Sinsisyal kitleler arasında interselüler yarıklar görülür (29). Bu yarıklar primitif vasküler lümenleri yapmak üzere kaynaşrlar (vaskülojeniz). Bu yarıkları saran sinsisyal hücreler yeni damarların endotelini oluştururlar. Bu endotel, beyin yüzeyinde bağımsız olarak geliştirmekte olan vasküler alanlara ulaşarak sistemi tamamlar. Anjiyogeniz, endotel proliferasyonu ile var olan bu damar sisteminin dallanmasından ve büyümesinden sorumludur (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.5.1. Vaskülojeniz ve anjiyogeniz (30). Vaskülojeniz ve anjiyogeniz sırasında meydana gelen değişiklikler.

2.6. Gelişim Sırasında Merkezi Sinir Sisteminde Vaskülarizasyon

Gelişen nöroektodermin vaskülarizasyonu diğer organlarıki ile benzerdir. Besin gereksinimi, hipoksi, stimülatör ve inhibitör anjiyogenik faktörler; vaskülarizasyon, anjiyoplast diferansiyasyonu, endotelyal hücre proliferasyonu ve migrasyonunu direk etkilemektedirler. Endodermal organların vaskülarizasyonu, ilk önce vaskülogenezin etkisi altındadır daha sonra ise de novo damar oluşumu bunun yerine geçer ve ardından da dokuda anjiyoplastlar belirir (31). Ancak beyin gibi ekto ve mezodermal organlarda anjiyoplastlar bulunmaz. Bu nedenle, başka alanlarda oluşmuş primitif vasküler yapılarıdaki endotelyal proliferasyonla gerçekleşen anjiyogenez, beyin için vaskülogenezden daha önemlidir (32, 33). MSS'nde anjiyoplastlar siplanoplörük mezodermden, perinöral vasküler pleksusu oluşturmak için kafa içerisine doğru göç ederler (34). Beyin ve spinal kordun vaskülarizasyonu için anjiyogenezin bir basamağı olan kapiller uzama, perinöral vasküler pleksusdan, gelişen nöroektoderm içerisine doğru ilerler (34). Kapiller büyümenin morfolojik modeli, ventriküler kavite içerisine doğru leptomeningeal damarlardan orijinlenen arterlerin radyal göçüyle nöral tüpün her bir parçasında benzer şekilde gerçekleşir (35). Memeli embriyolarında nöral tüp içerisinde kapiller invazyonun ilk işareti hamileliğin 4. haftasında izlenir. İlk vaskülarizasyon beyin sapı ve spinal kordda başlarken, serebellum ve serebral hemisferlere ise 6. haftada ulaşır (35-37).

Beyindeki kan akımı, nöral tüpün çevresindeki pial pleksusdan filizlenen kan damarlarının direk anjiyogeneziyle ortaya çıkar. Bu basamaklar diğer organlarda belirgin bir şekilde farklılık göstermektedir. Yeni gelişmeye başlayan kan damarlarının filizleri nöroepitelyuma penetre olur ve tüm yönlerde dallara ayrılır. Meningeal damarlar, beyin parankimasında striat, kortikal ve medullar olmak üzere 3 yönde ilerlerler. Kortikal damarlar korteksi, medullar damarlar ak maddeyi beslerken; striatal dallar da anteriör perforat substansa doğru girip bazal nukleusları beslerler (29).

Korteks gelişirken sulkus ve gyruslardaki damarlanma modeli oldukça kompleksdir. Bu damarlanma fetüs 3. trimestere ulaştığında sirkülasyon dinamikleri bazal nukleuslardaki kanlanmanın modelini oluşturmuştur. Fetal beyinde, anastomozların lokalizasyonu ve oryantasyonu nedeniyle periventriküler beyaz madde çok büyük bir kanama riski taşır. Term infant beyninde, kortikal “watershed (boşaltma havzası)” bölgeleri yetişkin beynindekilerle benzer özellikler gösterir. Hamileliğin 30. haftasından önce, periventriküler beyaz madde ve germinal matriksdeki damarlar düz kas, kollajen ya da elastin içermez ve doğrudan venler içerisine açılırlar. Bu alanlar akım değişiklikleri için çok duyarlıdır ve bu nedenle doğum sonrası (postpartum) hemorajik risk oldukça fazladır.

Beyin anjiyogenezinin moleküler modülasyonu ise, Fibroblast Growth Factor (FGF) ile başlamıştır ancak, FGF'nin ekspresyonu beyin gelişimi ile yakından ilişkili değildir. Yapılan FGF knock-out fare modelleri çalışmalarında çok büyük vaskülarizasyon anormalitelerine rastlanılmamıştır (33, 35, 38). Aksine, Vasküler

Endothelial Growth Factor (VEGF) ve onun reseptörleri VEGFR1 ve VEGFR2'nin ekspresyon profili, gelişen nöral tüpte ve MSS'nin vaskülarizasyonunda çok daha güçlü bir role sahiptir (39-41). Anjiyopietinler ve bunların reseptörleri olan Tie2/Tek, MSS vaskülarizasyonunda da rol oynarlar. Ang1 eksik fareler ile yapılan çalışmalarda, kranial vaskülarizasyon içinde damar dallanması meydana gelmediği için embriyolar ölmüştür. Ang2 ise, endotel hücrelerde Tie2/Tek'in aktivasyonunu inhibe etmektedir. Bu durum yeni damarların oluşumunu ve dallanmasını indüklemektedir. Ang1 aracılı Tie2/Tek aktivasyonu da yeni oluşmuş damarların maturasyonunu destekler. Ancak, bu güne kadar, hiçbir spesifik çalışmada VEGF ve anjiyopietinlerin gelişen MSS damarlanmasındaki rolü gösterilmemiştir (42).

2.7. Vasküler Malformasyonlar

Vasküler malformasyonlar, anjiyogenik gelişim sürecinde meydana gelen, belirli bir alanda görülen bozukluklardır. Vasküler malformasyonlar, akciğer ve gastrointestinal sistemin organlarında da görülmesine rağmen, sıklıkla beyinde karşımıza çıkmaktadırlar. Vasküler malformasyonlar, tıkanma, kanama ve kalp yetmezliği gibi sorunlara yol açması nedeniyle hayati tehlikesi çok yüksek olan rahatsızlıklardır. Vasküler malformasyonların çoğu sporadik olarak ortaya çıkabildiği gibi, kalıtsal formda olanları da vardır (43).

Serebral vasküler malformasyonlar (SVM), merkezi sinir sisteminde ortaya çıkan, neoplastik olmayan fakat serebral dolaşımı etkileyen vasküler lezyonlar olarak tanımlanabilirler. SVM'ların varlığı ilk olarak yüz yıl önce bildirilmiş (44), ancak hastalığın klinik ve patolojik profili, geçen 10 yıl içerisinde geliştirilen beyin görüntüleme ve histopatolojik yöntemler sayesinde anlaşılmıştır (45).

SVM'lar çoğunlukla, merkezi sinir sistemini tutan tüm vasküler bozuklukları kapsamaktadırlar. SVM'ların büyük bir çoğunluğu embriyonik dönemdeki duraksamaya bağlı olarak ortaya çıktığı için, patolojinin tipine ve oluşum evresine göre farklı tipte histolojik ve klinik bulgularla karşımıza çıkmaktadırlar (46-49). SVM'ların, karakteristik özellikleri, kalıtım modelleri, hastalıklar ile ilişkili genler ve kromozomal lokalizasyonları Tablo 2.7.1'de özetlenmiştir.

Tablo 2.7.1. Vasküler malformasyonların karakteristik özellikleri (43). D: Otozomal dominant, ?: Bilinmiyor, ALK1: Aktivin A reseptörü, ENG: Endoglin

Vasküler Malformasyonlar	Kalıtım Modeli	Gen	Kromozomal Lokalizasyon
AVM	Somatik Mutasyon ?	?	?
Kapiller Malformasyon	OD ?	?	?
HHT HHT1 HHT2	OD OD	ALK1 ENG	9q33-34 12q13
Venöz Malformasyon	OD	Tie2	9p21-22
Serebral Kavernoza Malformasyon CCM1 CCM2 CCM3	OD OD OD	Krit1 Malcavernin PDCD10	7q11.2 7p15-p13 3q25.2-q27

2.7.1. Arteriovenöz Malformasyonlar (AVM)

AVM'ler vasküler malformasyonlar içerisinde en kolay tanı konulabilen ve en sık karşımıza çıkan, aynı zamanda da klinik olarak en riskli grubu oluşturan malformasyonlardır (43, 50). AVM'ler bir ya da daha fazla besleyici arterden gelen kan akımının, kapiller ağ oluşturmada venlere bağlanması ile oluşurlar. Bu bağlanım normal olmadığı için venöz sistemde yüksek kan basıncının oluşmasına neden olur (51). Lezyonlar histopatolojik olarak incelendiğinde, anormal olarak genişlemiş, displastik fakat etrafında normal beyin parenkimi bulduran yapılar olarak görülmektedirler (52, 53). AVM'lerin en önemli patolojik bulgusu displazik arter ve bu artere direk bağlanan intima tabakası incelmış ve arter özelliği kazanmış venöz yapıların bulunmasıdır (54-56). AVM'ler sporadik formda her yaş grubunda görülmekle birlikte sıklıkla 40'lı yaşlarda rastlanılmaktadır. Erkek ve kadınlarda görülme sıklığı hemen hemen aynıdır. Rhoten ve arkadaşları AVM'li hastalarda yapmış oldukları çalışmada, bu hastalarda pre-proendotelin-1 geninin ekspre edilmediğini bildirerek, bu genin hastalıkla ilişkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (57).

2.7.2. Kapiller Malformasyonlar

Genellikle baş ve boyun bölgesinde gözlenen vasküler bozukluklardır. Lezyonların oluşum nedeni bilinmemekle birlikte, erken embriyonik dönemde derideki kapiller yapıların anormal oluşumundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Kapiller malformasyonda, damar çapı genişlediğinden kan akımı yüksektir ve bu yüzden deri yüzeyi kırmızı-pembe bir görünüm alır. Kapiller malformasyonlar beyinde ise, sıklıkla beyaz maddede ve ponsda kapiller yapılarıdaki genişlemeye bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (4). Sporadik olguların yanında ailesel geçiş gösteren olgular da bulunmaktadır. Ailesel geçişli olan vakalarda, 5q13-22'de lokalize olan genin bu hastalıktan sorumlu olduğu düşünülmektedir (58).

2.7.3. Kalıtsal Hemorajik Telanjektaziler (HHT)

HHT ya da Rendu-Osler-Weber sendromu otozomal dominant bir hastalık olup (59) birçok sistemde hemoraji oluşturan vasküler malformasyonlara sebep olur. Lezyonlar, deride, ağızda ve gastrointestinal sistemde telanjektaziler (kapillerlerin kalıcı olarak genişlemesi durumu) şeklinde ortaya çıkabileceği gibi; beyin, karaciğer ve akciğer gibi organlarda da arteriovenöz şantlar şeklinde de görülebilmektedir (60). HHT hastalarının %7-12'si merkezi sinir sistemi lezyonuna sahip olup, kadınlarda daha sık görüldüğü belirlenmiştir (61-63). Yapılan linkaj çalışmalarında 9q34.1'da lokalize olan HHT1 (64) 12q11-q14'de lokalize olan HHT2; (65) lokuslarının HHT'ye sebep olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, endoglin ve TGF- β 'nin mutasyona uğramasıyla da HHT1 ortaya çıkarken (66), ALK1 (activin reseptör like kinase-1/Acrv11) ve TGF- β 'nin mutasyonunda da HHT2'nin oluşabileceği bildirilmektedir (67). Hem Acrv11 hem de endoglin primer olarak endotel hücreleri tarafından ekspre edilirler ve TGF- β aracılı sinyal yolunda görev alırlar (68).

2.7.4. Venöz malformasyonlar

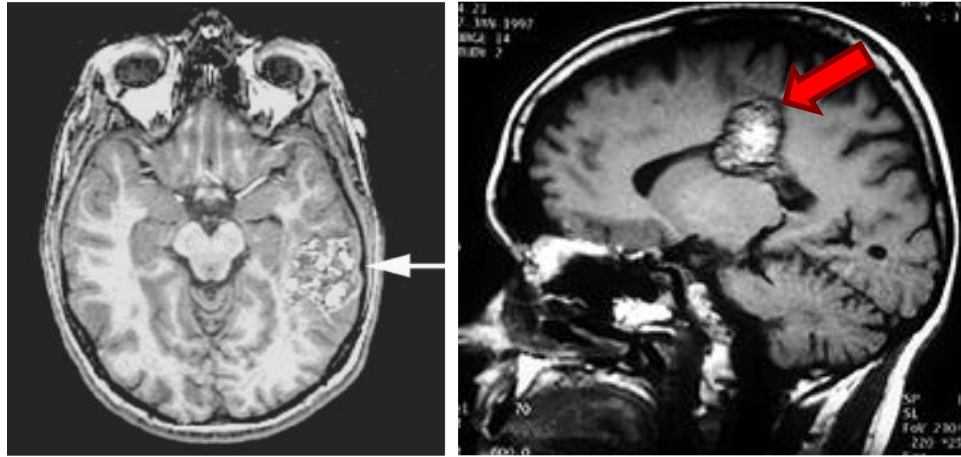
Venöz malformasyonlar, anormal genişlemiş yapıdaki ven drenajlarının oluşturduğu malformasyonlardır (4). Vasküler malformasyonlar içerisinde daha az riske sahip olup, genellikle deride veya intramusküler yapılarda ortaya çıkmaktadırlar. Venöz malformasyonların görülme sıklığı, 1/500-1/10.000 olarak bildirilmiştir. Kalıtsal venöz malformasyonlu ailelerde yapılan çalışmalarda, Tie2 (Anjiyopoetin-2 reseptörü) genindeki mutasyonların hastalığa neden olduğu bildirilmiştir. Tie2, endotelial hücrelerde ekspre edilir ve damar olgunlaşmasında görev alan tirozin kinaz aktivitesine sahip hücre yüzey reseptörüdür. Bu gende meydana gelecek mutasyonlar, reseptörün intraselular kinaz domeyininden kaynaklanır ve proteinin otofosforilasyonunu arttırarak, hücre içerisinde Tie2 aracılı sinyalin daha da güçlenmesine neden olur (69).

2.7.5 Serebral Kavernoza Malformasyonlar (CCM)

Kavernoza anjiyom, kavernoza malformasyon ya da serebral kavernoza olarak adlandırılan CCM'ler, kapiller damarların normal damar elemanlarını kaybetmesi ve

anormal vasküler yapıların oluşmasıyla karakterize vasküler bir hastalıktır. CCM'leri HHT'lerden ayıran en önemli özellik ise kavernomların etrafında normal beyin parankim dokusunun bulunmamasıdır. Kavernleri besleyen herhangi bir ana arter olmadığı için lezyon içinde kan akımı çok düşüktür.

CCM'ler sporadik ve kalıtsal kökenli vasküler lezyonlar olup kan ya da trombus ile dolmuş kaverno çemberler içinde paketlenmiş yapılardan oluşur. Dismorfik bağ doku matriksi (kollajen) tarafından bölümlenmiş endotelial hücreler tek tabaka halinde bir yapı oluştururlar (70, 71). Bu lezyonlar nöral parankimada, düz kas, elastin gibi belirlenebilen matür damar duvarı elementlerini içermezler (70, 71). Dahası, endotelial hücreler arasında açıklıklar bulunur ve normalde kan beyin bariyerini oluşturacak sıkı bağlantılar kaybolmuştur. Beyin parankiması içerisine kırmızı kan hücrelerinin kolaylıkla çıkabilmesine ve bu alanlarda ağır hemosiderin depozitlerine sebep olmaktadır (70, 72). Bu lezyonlar, primer olarak merkezi sinir sisteminde (beyin ve spinal kordda) bulunurken, ancak deri, retina, vertebra ve karaciğerde de örneklerine rastlanmıştır. Bu lezyonların semptomları, ya hemorajiden ya da beyin yapıları yakınındaki kütle etkisinden kaynaklanmaktadır. Sıklıkla hemorajiye neden olan bu lezyonlar, "sızıntılı" olarak tanımlanırlar ve MRI ve patolojilerinde hemosiderinin varlığı ile belirlenirler. Lezyonlar beyin kapillerlerini tuttuğu için standart anjiyografik tekniklerle görüntülenemezler (73-75). Bu nedenle hasta takibinde ve CCM lezyonlarının tanısında en etkin yöntem MRI'dır. Lezyonlar MRI'da " patlamış mısır " benzeri yapılar olarak görülmektedir (76) (Şekil 2.7.5.1).



Şekil 2.7.5.1. Lezyonun MRI ile farklı kesitlerden görüntüsü (76). Her iki görüntüde de patlamış mısır benzeri yapılar dikkati çekmektedir (oklar).

2.7.5.1. Lezyonların Büyüklüğü ve Lokalizasyonu

CCM'de lezyonların büyüklüğü ve lezyonların lokalizasyonu hastalığın kimliğinde oldukça önemlidir. Lezyon büyüklüğü 0.1 cm ile 9 cm arasında değişmektedir (77-79). Sporadik olgularda genellikle tek lezyon gözlenirken, ailesel geçişli olgularda lezyon sayısı artmaktadır (80, 81). Kavernomlar supratentoryal olmak üzere beynin herhangi bir bölgesinde ortaya çıkabilir (82). Pons ve serebellum en yaygın infratentoriyal alanların başında yer alır.

2.7.5.2. Semptom ve Bulgular

Klasik olarak kavernomalar nöbet, fokal nörolojik eksiklik ve kanamaya bağlı semptomlar olmak üzere 3 çeşit klinik semptoma yol açmaktadır. Bunlar içerisinde en sık rastlanan, perilezyonel kan ürünlerinin epileptojenik özelliklerinden dolayı epilepsi nöbetleridir. Semptomatik olan vakaların %35-70'inde epileptik nöbet görülmüştür ve bunların %40'ı ilaca dirençli nöbetlerdir (83).

2.7.5.3. Epidemiyoloji

MRI'nın kullanıma girmesinden sonra yapılan geniş serili retrospektif çalışmalarda, kavernoma insidansı %0.47 ile %0.39 olarak bildirilmiştir (77, 84). Kavernomalar vasküler malformasyonların %8-15'ini oluştururlar (85). Her 2 cinsiyette de eşit olarak görülmektedir (84, 86). Kavernomanın görülme yaşı yenidoğan döneminden 90'lı yaşlara kadar aralıkta olup ortalaması 32-37 arasında değişmektedir (77, 84, 85, 87). Ailevi kavernoza olgularının oranı toplam olguların %10-30'u kadardır ve nöroradyolojideki gelişmelere paralel olarak artış göstermektedir. Pediyatrik vakalar toplam vakaların yaklaşık dörtte biri kadardır (88).

2.7.5.4. Hastalığın Tedavisi

Serebral kavernomalarda hastalık semptomatik olduğu gibi asemptomatik olarak da görülmektedir ve bu nedenle de kesin bir tedavisi yoktur. Semptomatik olgularda ortaya çıkan epileptik nöbetler için anti-epileptik ilaçlar ve hemanjiyomların yarattığı baskıdan dolayı ortaya çıkan baş ağrısı için ağrı kesiciler kullanılmaktadır. Şayet lezyon operasyon için tehlikeli bir yerde değil ise tek tedavi yöntemi, lezyonların cerrahi müdahale ile çıkartılmasıdır (89, 90).

2.7.5.5. Hastalığın Histopatolojisi

CCM'ler makroskobik olarak normal beyin dokusundan kolayca ayırılabilen belirgin bir besleyici arteri olmayan kırmızı-mor renkli böğürtlen benzeri damarsal oluşumlardır. Prospektif geniş otopsi serilerinde ortalama çapları 4.9 mm olarak bulunmuştur (91). Mikroskobik incelemelerde ise, genişlemiş ince duvarlı sinüzoidal görünüm veren kapiller benzeri, yalnızca basit bir endotel içeren, ince ve gevşek bağ dokusundan oluşmuş perivasküler alana sahip lezyonlar olduğu görülmüştür (92). Kavernomaları oluşturan damarların duvarlarında düz kas ve elastik membran

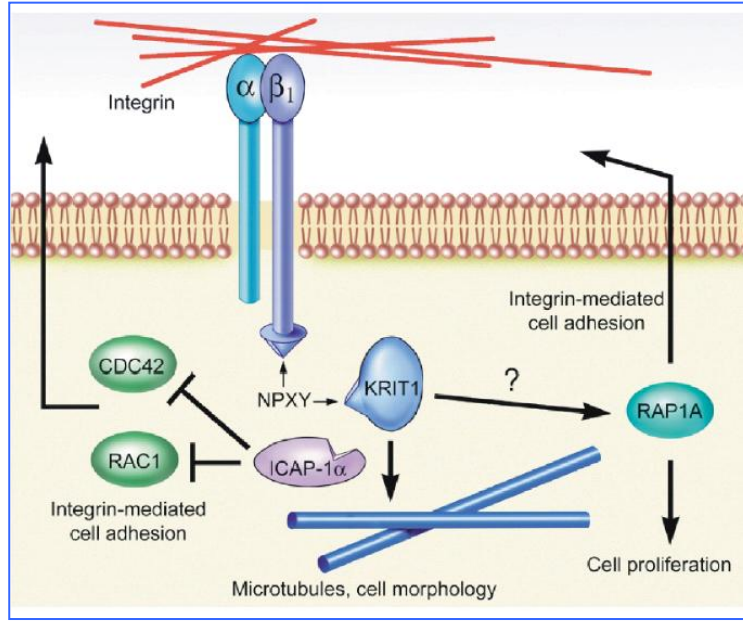
bulunmamaktadır. Kanamaların fazla olması nedeniyle de lezyon içerisinde hemosiderin yüklü makrofajlar ve kalsifikasyon alanları izlenir (93). Ayrıca malformasyon içerisindeki vasküler kanallarda değişen derecelerde tromboza rastlanır. Bu nedenle de kavernomalar içerdikleri kalsifikasyon ve tromboz alanlarına bağlı olarak yumuşak veya sert kıvamlı olurlar (82). Kavernomalar tipik olarak beyin parenkimi içermemekle birlikte, gliosis içeren ve inflamasyona bağlı olarak su içeriği artmış beyin dokusu ile kuşatılmışlardır (82). Lezyonlar elektron mikroskopik düzeyde incelendiklerinde ise endotelial hücreler arasında sıkı bağlantıların olmadığı göze çarpmaktadır. Ayrıca da kan beyin bariyerini oluşturan astrositik uzantıların endotelial hücrelere kadar uzanmadan gliotik sınırdan sonlandıkları görülmüştür (70, 82).

2.7.5.6. Hastalığın Genetiği

CCM, mendelyan geçiş gösteren kalıtsal bir hastalık olarak tanımlandığından, moleküler genetik alanında yapılan çalışmalar sonucunda 3 lokus tanımlanmıştır. Bunlar; CCM1 lokusu içerisinde yer alan Krit1 (Krev1/Rap1A Interaction Trapped I) 7q11'de, CCM2 (Malcavernin) 7p22'de ve CCM3 (PDCD10: Programmed Cell Death I0 gene) 3q'da klonlanmıştır (94, 95). Yapılan bağlantı (linkaj) analizleri sonucunda bu patolojiden CCM1'in en fazla sorumlu olan lokus olduğu ortaya konulmuştur (CCM1 %40, CCM2 %20 ve CCM3 %40) (96). Yakın zamanda yapılan çalışmalarla da CCM1 ve CCM2'nin aynı ekspresyon modeline sahip olduğu ve her 2 molekülünde aynı yolak üzerinden bu vasküler malformasyona neden olduğu gösterilmiştir (97).

Şu ana kadar CCM'le ilgili yapılan çalışmalar CCM1 ve CCM2 ile ilgiliyken, CCM3 yeterince aydınlatılamamıştır. PDCD10 geninde fonksiyon kaybına yol açan mutasyonların serebral kavernoza malformasyona yol açtığı bilinmesine rağmen, protein düzeyindeki bilgilerin eksikliği nedeniyle hastalığın patofizyolojisi hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Yeast 2-hibrit sistemi (Y2H) kullanılarak yapılan çalışmalarda $\beta 1$ integrinin sitoplazmik domeyininin ICAP1 α (integrin cytoplasmic domain-associated protein α) ile ilişkiye girdiği gösterilmiştir (98). ICAP1'in alternatif splicing ile oluşan ICAP1 α ve ICAP1 β olmak üzere 2 izoformu bulunmaktadır. ICAP1 α , 200 aminoasitlik fosfotrozin bağlanma (PTB: phospho tyrosine binding) motifi içeren bir fosfoproteindir. Fosforilasyonu da integrine bağımlı olarak hücre ve ekstraselüler matriks ilişkisine dayanmaktadır. ICAP1 α , $\beta 1$ integrine bağlanma özelliğindedir ICAP1 β ise $\beta 1$ integrin ile ilişkiye girmemektedir. Integrin $\beta 1$ ile ICAP1 α arasındaki bu ilişki de, $\beta 1$ integrinin C-terminalinde yer alan NPXY (Asn-Pro-X-Tyr) motifi sayesinde gerçekleşmektedir (99, 100). Krit1 ise aynı NPXY motifini içermekte, bu yüzden de ICAP1 α , Krit1'e bağlanarak birçok mekanizmanın işleminde rol oynayabilmektedir (Şekil 2.7.5.6.1) (99-102).

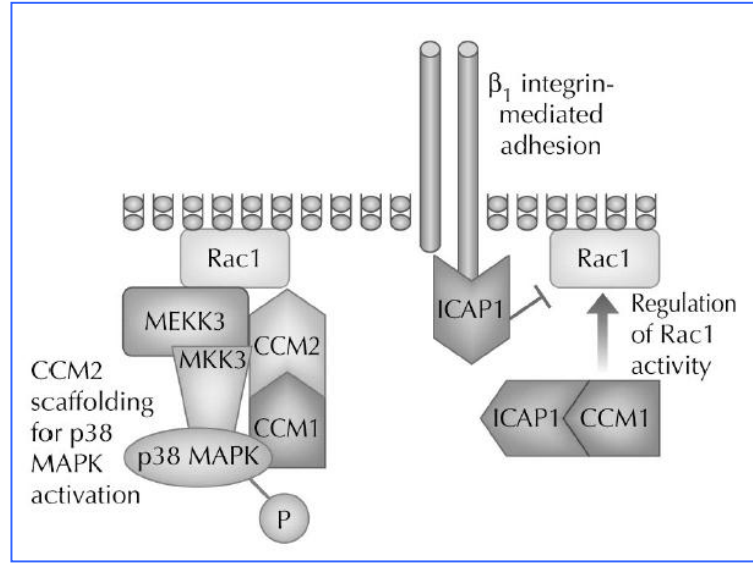


Şekil 2.7.5.6.1 İntegrin β_1 ile ICAP1 α arasındaki ilişki. Krit1de de aynı NPXY motifi olduğundan ICAP1 α 'ya aynı β_1 integrinin bağlanması gibi bağlanabilmektedir (101).

Krit1 proteinine karşı kullanılan antitadiler ise endotelyal hücrelerin sitoplazmasında beta-tubulin ile kolokalizasyon olurlar (76). Krit1 ile ilgili knock-out model çalışmaları, embriyogenezin erken dönemlerinde görülmeye başladığını ve vasküler gelişimde de etkin bir molekül olduğunu göstermiştir. Krit1 hem nöronlar ve astrositlerde hemde endotelyal hücrelerde ekspres edilmiştir (103).

Diğer bir gen de Malcavernin, ya da CCM2 dir (104). Bu gen, Krit1'in bağlanma partneri olan ICAP1 α 'da bulunan fosfotirozin bağlanma domeni (PTB) kodlamaktadır. Bu gen hakkında da çok fazla bilgiye sahip değiliz. Ancak CCM2'nin analizi sonucunda, histopatolojisinin Krit1 ile benzer bir paterne sahip olduğu gösterilmiştir. Arteriyal endotelde bulunmakta ama düz kas ve venöz dolaşımında yer almamaktadır (105). CCM2, p38 MAPK sinyal yolundaki proteince yapıtaş proteinine gibi bağlanır. CCM1, ICAP1'e bağlandıktan sonra CCM2 de CCM1'e tutunarak bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks p38 MAPK sinyalini regüle eder. P38 MAPK sinyalinin fosforile olması da beraberinde çalışacak birçok mekanizmayı aktive edecektir (106, 107). Böylece yapılan moleküler çalışmalarda CCM1 ve CCM2'nin birbirlerine bağlı çalışmaları belirlenmiştir (Şekil 2.7.5.6.2) (106, 107). Serebral kaverno malformasyonuna sebep olan 3. genin, yani CCM3'ün de diğer 2 gene bağlı olarak çalıştığını tahmin etmekteyiz. CCM3 ile ilgili olarak bilinen tek kanıt ise apoptoz sırasında bu genin upregüle olduğudur (107). p38 MAPK'ın fosforilasyonu sonucunda oluşan apoptozun, CCM3 tarafından tetiklendiği düşünülmektedir. Bu şekilde CCM2 ile ilişkisi açıklanabilir. Ancak apoptoza giderken CCM3'ün hangi yolları kullandığı bilinmemektedir.

CCM3’de meydana gelen mutasyonlarda PDCD10 geni ile ilişkilendirilmiştir (95, 108, 109). Bu genin henüz sekans analizleri yapılmamış ve konu henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. Ancak çalışmalar CCM hastalığında rol alan bu 3 genin patolojik olarak farklı olmasına rağmen hepsinin ortak bir yol kullandığını göstermektedir. Özellikle de MSS’nde vasküler gelişimde birlikte rol oynayabilecekleri dikkat çekicidir.



Şekil 2.7.5.6.2. CCM2’nin, p38 MAPK sinyal yolundaki proteinlerle ilişkisi. CCM2, p38 MAPK sinyal yolundaki proteinlere yapıtaşı proteini gibi bağlanır. P38 MAPK sinyalinin fosforile olması da beraberinde çalışacak birçok mekanizmayı aktive edecektir (107).

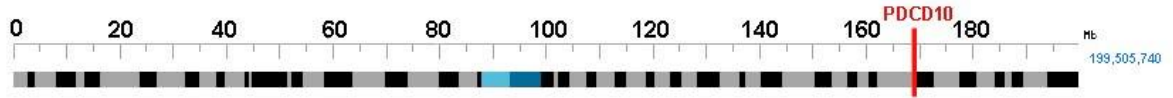
2.7.5.7. Serebral Kavernoza Malformasyonda Genetik Heterojenite

Bu hastalıkta ilk tanımlanan Ccm1 lokusunun ardından mutasyonel çalışmalar devam etmiş ve hastalığın oluşumundan sorumlu Ccm2 ve Ccm3 genlerinin varlığı tespit edilmiştir. Serebral kavernomaların %40’ının Ccm1, %20’sinin Ccm2 ve %40’ının da Ccm3 lokusu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (96). Bu nedenle CCM’li hastalarda bu 3 lokusun varlığının da taranması gerekmektedir.

2.7.5.8. Hastalığın Moleküler Genetiği

Kavernomalar sporadik olarak ortaya çıkabildiği gibi kalıtsal olarak da görülmektedirler (110, 111). Hispanik ailelerde yapılan moleküler çalışmalar ile, CCM’lerin otozomal dominant formda kalıtılan vasküler bir bozukluk olduğu ilk olarak 3 farklı grup tarafından segregasyon analizi, linkaj ve pozisyonel klonlama gibi farklı teknikler kullanılarak gösterilmiştir (112-114).

Hastalıkla ilişkili genin *D3S1763* ve *D3S1262* arasında 22-cM'lik bir aralıkta yer aldığı belirlenmiştir (115). Yapılan çalışmalarda, CCM'den sorumlu olan 3. gen olarak bildirilen PDCD10'un 3q25.2-27 (Ccm3; OMIM 603285) de lokalize olduğu tanımlanmış ve bu bölge Ccm3 olarak adlandırılmıştır. Böylelikle kavernomalı ailelerde yapılan linkaj çalışmaları sonucunda hastalıkla ilişkili olan 3. genin 3. kromozomda yer aldığı gösterilmiştir (94, 95). Ayrıca Bergametti ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, PDCD10'un omurgalı ve omurgasızlarda, damar gelişimi ve maturasyonunda rol alan yeni bir molekül olduğunu göstermişlerdir (116). CCM2 lokusunda gösterildiği gibi CCM3 lokusunda da genomik delesyonların görülebileceği hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu nedenle 20 aileyi yüksek-yoğunluklu mikrosatellit genotipleme ile incelediklerinde; 1 ailede eksik alellerin 4-Mb içerisinde *D3S3668* ve *D3S1614* arasındaki delesyondan ileri geldiğini görmüşlerdir. Bu, de novo delesyon, CCM3 genini tanımlayan 970-kb'lik bölge *D3S1763*'ü kuşatmaktadır (Şekil 2.7.5.8.1)(116).



Şekil 2.7.5.8.1. PDCD10 geninin haritadaki yerinin şematize olarak gösterilmesi (117).

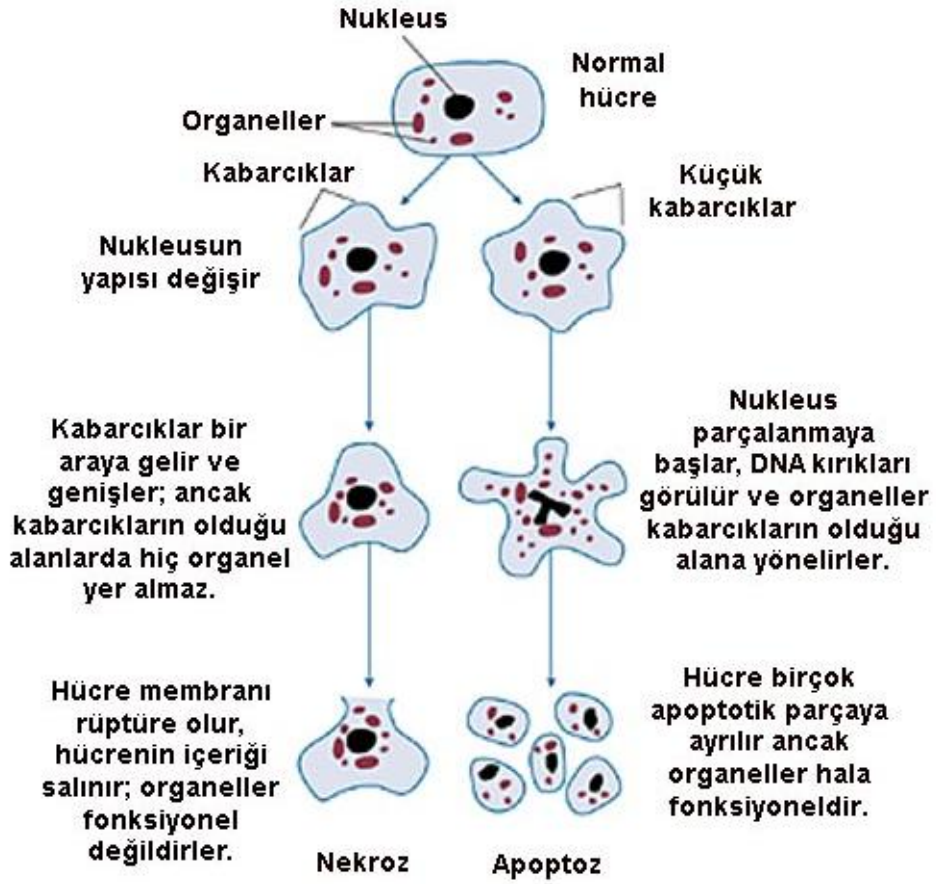
Programlı hücre ölüm geni olarak belirlenen PDCD10; 50kb'den daha uzundur ve 7 kodlama ekzonu ve 5-primer non-kodlama ekzonu içermektedir. ATG başlangıç kodunu da 4. ekzonda bulunmaktadır. Genin fonksiyonu değerlendirildiğinde, serebral kaverno malformasyona sebep olmasına ilaveten, vasküler morfogenez ve yenilenme için güçlü bir aday gen olduğu da belirlenmiştir (116). Apoptotik karakteri de göz önüne alındığında birçok mekanizmayı nasıl başlattığı da merak konusu olmuştur.

2.8. Apoptoz

Hücre ölümü 2 mekanizmayla gerçekleşmektedir, apoptoz ve nekroz.

Apoptoz (“normal ya da programlı” hücre ölümü); gelişim sırasında ya da diğer normal biyolojik şartlarda istenmeyen ya da kullanışsız, elverişsiz hücrelerin elemine edilmesiyle ortaya çıkan fizyolojik bir durumdur (Şekil 2.8.1).

Nekroz (“kazara” hücre ölümü); ciddi şekilde fiziksel olarak ya da kimyasal bazı maddelere maruz kalınması sonucunda ortaya çıkan patolojik bir durumdur (Şekil 2.8.1).



Şekil 2.8.1. Nekroz ve apoptozun morfolojik özellikleri (118).

Apoptoz, ilk kez 1842 yılında Vogt tarafından hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Biyolojik bilimler literatüründe apoptoz terimi, ilk kez İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (119). Kanserden nörodejenerasyona kadar birçok hastalığın patolojik paradigmalarının çözülebilmesinde apoptozun etkileri değerlendirilmektedir. Bu nedenle, apoptozun moleküler mekanizmalarının anlaşılabilmesi sadece teorik olarak önemli olmakla kalmayıp, özel terapötik değerler de içermektedir (120).

Apoptoz hücre ölümünün aktif formudur ve bunun için enerji ve protein sentezi gerekmektedir (121). Apoptotik hücrelerde, farklı hücre içi ve hücre dışı sinyaller ile hücre ölümü tetiklenir ve bu durumda 2 faz incelenmektedir.

- Başlangıç (Initial commitment)
- Yok etme fazı (122).

Bu fazlar sırasında plazma membranı şişer, sitoplazma büzülür, endoplazmik retikulum dilate olur, apoptotik cisimcikler içinde nuklear kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu görülür. Bu apoptotik cisimcikler de komşu hücreler tarafından hızla fagosite edilerek ortadan kaldırılır (119). Apoptoz sırasında hücre hacmini azaltır, iyonlarını dışarı pompalar ve sitoiskeleti kontraksiyon yapmaya başlar, nukleus çevresinde de kafes benzeri yapılar oluşur. Bu esnada ölen hücre kendi proteolitik enzimlerini aktive eder (123).

Apoptoz ve nekroz birçok özelliği açısından oldukça farklı ölüm mekanizmalarını içermektedirler. Nekroz, fizyolojik bir ölüm şekli olmasına rağmen apoptoz, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Apoptoz morfolojik olarak özgündür. Nekroz da hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin paterni nukleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa, apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepcikler oluşur (124). Nekrotik hücre sonra lizise uğrar, apoptotik hücre ise küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler değişen miktarlarda hücre içi yapılar içeren membranla kaplı fragmanlardır. Nekrozda plazma membranı bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucunda inflamasyon uyarımı yapılır. Apoptozda ise apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz.

Apoptozun en özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır (125). Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfotidil serinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma sayesinde apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır (126).

2.8.1. Apoptotik Sinyalde Regülatör Mekanizmalar

Canlı hücrelerde apoptotik sinyal yolu inaktifken, ölüm uyarımı gelince, hemen bu uyarıma karşı bir yanıt oluşturulur. Apoptotik sinyal ağının komponentleri genetik olarak kodlanmıştır ve çoğu hücre tipinde aktivasyon için hazır durumdadır. Bu nedenle, olası tablo şu şekilde gerçekleşmektedir; çok hücreli hayvanların tüm hücreleri aslen programlı bir şekilde kendi kendini yıkmaya girişimindedir ve hücre ölümü, yaşamsal olan bazı sinyallerin baskılanmasıyla ansızın gerçekleşebilir. Bu yaşamsal sinyaller anti-apoptotik moleküllerin ekspresyonu ve aktivitesiyle artabilir. Bu nedenle de pro-apoptotik faktörlerin aktivasyonunun kontrol altında olması gerekmektedir (127, 128).

2.8.2. Düzensiz Apoptoz Sonucunda Ortaya Çıkan Hastalıklar

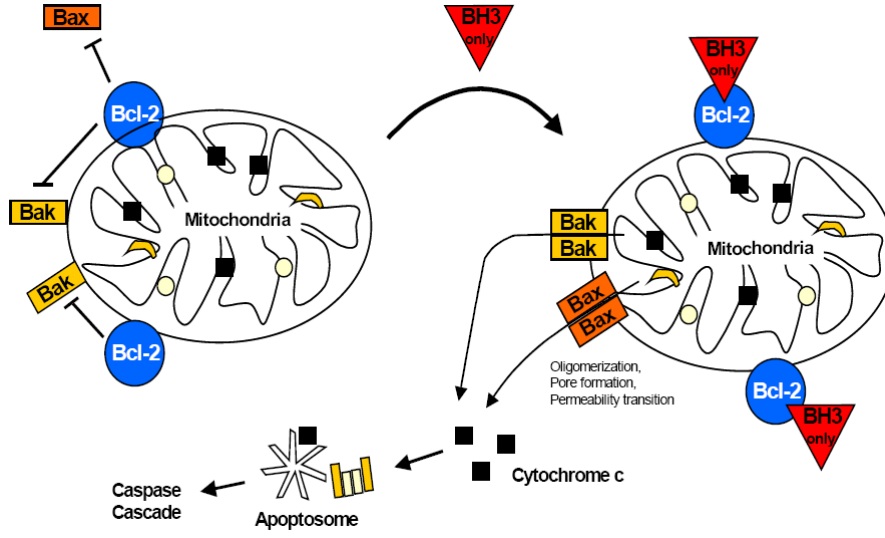
Yetişkin insan vücudunda mitozla saniyede yüzbinlerce hücre üretilmektedir ve aynı şekilde benzer sayıda hücre de immun hücrelerin seçimi ve aktivitesinin düzenlenmesi gibi birçok spesifik olay ve homeostaz sırasında da apoptozla ölmektedir (129). Apoptotik sinyallerin bozulması, kanser, otoimmünite, geçmeyen infeksiyonlara sebep olan çeşitli hastalıkların primer ya da sekonder etkilerinde kendini gösterebilir. Bununla birlikte aşırı apoptoz ise, nörodejenerasyon (Alzheimer, Parkinson, Huntington, amyotrofik lateral skleroz hastalıkları), otoimmünite (organlarda kontrol edilemeyen apoptoz), AIDS (T lenfositlerinin azalması) ve iskemi (inme, miyokardial infarktüs) gibi hastalıklara sebep olabilmektedir (130). Apoptozun başlaması yada yürütülmesine direkt ya da indirekt faktörler için kod olan genlerin mutasyonu sonucunda ölüm makinesinde bozukluklar meydana gelmektedir. Bu şekilde apoptotik genlerdeki birçok mutasyon belirlenmiştir ve insanlardaki hastalıkların sebebi ya da yardımcı faktörler açığa çıkarılmıştır (131).

Apoptozun kontrol noktaları oldukça önemlidir, örneğin tümör baskılayıcı p53 kanser ile ilişkili olan apoptotik faktörlerden biri olarak belirlenmiştir. İnsan kanserlerinin %50'sinden fazlasında bu faktörün inaktive olduğu bilinmektedir (132). Tümör baskılayıcı protein olan p53, onkogen aktivasyonu, hipoksi ve özellikle de DNA hasarlarında önemli bir transkripsiyon faktörü olarak aktive olmaktadır. Bcl-2, Bcl-XL ya da Survivin (133, 134) gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak ya da p21, Bax, Puma, Noxa, Apaf-1, Fas ve DR5 gibi çeşitli p53 hedef genlerinin ekspresyonunun stimüle edilmesiyle apoptozun meydana gelebileceği bildirilmiştir (135).

Apoptotik komponentler ile ilgili mekanizmalar ve değişikliklerin anlaşılması, patojenik basamaklarla ilişkilidir. Bu basamaklar, pro-apoptotik tümör baskılayıcıların hedeflenmiş aktivasyonuna ya da anti-apoptotik onkogenlerin bloklanmasına karışabilmektedir. Nörodejenerasyon sırasında hücre ölümünün tedavisi için kaspazlar gibi pro-apoptotik anahtar komponentlerin inhibe olması gerekmektedir (130).

2.8.2.1. Bcl-2 Ailesi

Bu ailenin üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bak, Bcl-Xs) bilinirken bir kısmının da aksine inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) belirlenmiştir (Şekil 2.8.2.1.1). Bir hücrenin yaşayabilmesi bu ailenin pro- ve anti-apoptotik üyelerinin oranına bağlıdır. Anti-apoptotik Bcl-2 proteini, özellikle mitokondrinin dış membranında yer almakta ve iyon transportunu düzenlemektedir (136). Bax, sitosolde yer almaktadır ve herhangi bir apoptotik uyarım geldiğinde mitokondri membranına bağlanarak, porların oluşumunu indüklemektedir. Bu durumla birlikte selektif iyon permeabilitesi ortadan kalkar, sonuçta da sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör-1'in (AIF; apoptosis inducing factor-1) mitokondriden sitosole geçmesini sağlar (137).



Şekil 2.8.2.1.1. Canlı hücrelerde apoptotik yollar. Canlı hücrelerde pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri Bax, Bak ve BH3 proteinleri, Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyeler tarafından antagonize edilirler. Apoptotik stimulusa yanıtta, BH3 üyeleri transkripsiyonel upregülasyon (Bax, Noxa, Puma), subselular relokalizasyon (Bim, Bmf), defosforilasyon (Bad) ya da proteolizis (Bid) tarafından aktive edilirler. Aktive olmuş BH3 proteinleri, anti-apoptotik Bcl-2 üyelerinin hareketini engeller. Ayrıca, bunlar Bax ve Bak'ın konformasyonel değişimini doğrudan indükleyebilirler. Sonuç olarak pro-apoptotik faktörler, mitokondriyal membran içerisinde sitosole salınırlar (138).

2.8.2.2. p53

Hücrede DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek durumdaysa p53 proteini, hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar kötüyse, p53 apoptozu indükler. Bu indüklemenin sonucunda da, Bax ekspresyonu artar ve Bcl-2/Bax oranı değişir.

2.8.2.3. Sitokrom-c

Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması, apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönülemez bir döneme girildiğini işaret etmektedir. Sitokrom-c'nin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır ancak apoptoz indükleyici faktör (AIF; apoptosis inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Burada sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanır ve onu aktive eder. Bu işlemin ardında da ATP'nin etkisiyle apoptozom oluşumu gözlenir. Bu kompleks, inaktif prokaspaz-9'u aktif hale geçirir; bu aktiflenme durumu da prokaspaz-3'ü aktive eder. Kaspaz-3'ün aktifleşmesi de ICAD'ı (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktif hale getirir. ICAD'ın bağlandığı CAD (caspase-activated deoxyribonuclease) serbest hale gelir. Bu durum apoptozun karakteristik bulgularından

biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur.

2.8.2.4. Kaspazlar

Kaspazların apoptozla olan ilişkisi ilk kez *Caenorhabditis Elegans* adında bir nematodun genetik analizi sonucunda ortaya çıkmıştır (139). Ced-3, Ced-4 ve Ced-9 genlerinin *C. Elegans*da apoptozu düzenlediği belirlenmiştir. Daha sonra bu genlerin memelilerdeki homoloğu kaspazlar, Apaf-1 ve Bcl-2 belirlenmiştir (140, 141).

Kaspazlar, inaktif prekürsör olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak da adlandırılan bir grup enzimdir. Kaspazlar birbirlerini aktiveştirerek proteolitik bir yol ortaya çıkartırlar. Bazıları başlatıcı (Kaspaz 2,8,9,10), bazıları da yürütücü (Kaspaz 3,6,7) olarak görev yaparlar (139). Başlatıcı olarak görev yapanlar, apoptotik uyarım sonucunda başlayan ölüm sinyallerini yürütücü kaspazlara iletmekte görevlidirler. Yürütücü kaspazlar ise, ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin ortaya çıkmasına neden olurlar.

Hipotez

CCM'e sebep olduğu bilinen Ccm1, Ccm2 ve Ccm3 adlı bu 3 genin birbirleriyle ilişkili olabileceği; hatta bu hastalığı ortaya çıkarırken bu genlerin hepsinin de aynı yolağı kullanabileceği kanaatindeyiz. Bu fikirden yola çıkararak daha önce literatürde aydınlatılan Ccm1 ve Ccm2'ye ilaveten Ccm3'ün de bu yolağın içerisinde yer aldığını gösteren delillere ulaşmaya çalışacağız.

Ccm3, damar duvarının yapısında yer alan, buradaki endotel hücrelerinin, yönelişlerini düzenlemede ve çevreyle ilişkilerinde önemli role sahip bir moleküldür. Ccm3'ün anjiyogenez ve vaskülogenez mekanizmalarının işleyişinde de önemli bir görev aldığı kanaatindeyiz. Ccm3 mekanizmasının zlebilmesi; Ccm1 ve Ccm2 gibi merkezi sinir sistemi kavernozy malformasyonlarının patogeneziyle ilişkili diğer genlerle de bağlantılı olabileceği düşüncesindeyiz. Bu nedenle de vasküler deformasyonların oluşumunda önemli role sahip olan bu gen ailesinden biri olan Ccm3' araştırmayı hedefledik.

GEREÇ ve YÖNTEM

İmmunohistokimya için kullanılan insana ait parafin dokular Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Bölümü'nden sağlanmıştır. Fare örneklerine ait beyin dokuları ise, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesinden temin edilen C57 tipi normal farelerdir.

3.1. Doku Takibi

Deney hayvanları ünitesinden temin edilen hayvanlar ketamin anestezisi altında uyutulduktan sonra öncelikle heparinli izotonik ardından da %4 paraformaldehit (PFA) ile perfüze edildi. Perfüzyon sonrası beyin dokusuna hasar verilmeden dikkatlice çıkartıldı. Doku immunohistokimya ve in situ hibridizasyon yöntemi için %30 Sukroz-PFA içeren solüsyonda +4°C'de yaklaşık 1 gün süreyle bekletildi. Dokunun osmotik basıncının uygun hale geldiğinin anlaşılması beyinin dibe çökmesi ile belirlendi. Doku frozen kesit için hazırlanıp kesit alındı. Kesitler in situ hibridizasyon ve immunyüzdürme metodu için PBS içeren 12 kuyucuklu kaplara seri bir şekilde alındı. Normal immunohistokimya ve immunofloresan için de lamlara yapıştırıldı.

3.2. Antikor Pürifikasyonu

CCM3/PDCD10, (CCM3)-spesifik tavşan poliklonal antikor, KIPDEINDRVRFLQTIKD (Open Biosystems, Huntsville, AL) peptid dizisinden dizayn edildi ve firmaya gönderildi. Firma tarafından saflaştırılan anti-peptid antikor laboratuvarımıza gönderildi. Antikor özgünlüğü, CCM3-GFP füzyon proteinini kodlayan ekspresyon vektörüyle Cos7 hücre hatlarına transfekte edilerek test edildi. Full-length CCM3 cDNA'sı pcDNA-DEST53 içerisine klonlandı ve Cos7 hücrelerine lipofectAMINE yardımıyla transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında uygun zamanda protein elde edilerek Western blot analizine tabi tutuldu. Bu, sadece Cos7 hücreleri ile sınırlı kalmayıp N2A ve BAEC hücrelerinde de değerlendirildi.

3.3. İmmunohistokimya Yöntemi

Dokularda CCM3 proteininin varlığını göstermek amacıyla kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar

1X PBS (Phosphate buffer saline) Tamponu:

7.2 gr. Na₂HP0₄.12H₂0 (Merck)

0.8 gr. KH₂P0₄ (Merck)

16 gr. NaCl (Merck)

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=7.4 olacak şekilde ayarlandı.

Sitrik Asit Tamponu:

2.1 gr. sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Merck) 900 ml. bidistile su içerisinde çözüldü ve pH'sı 2N NaOH ile pH=6.0 olacak şekilde ayarlandı.

%3'lük H_2O_2 Solüsyonu:

92 ml. Metanol (CH_3OH) (Merck) ve 8 ml. %30 H_2O_2 (Merck) ilave edilerek şale içerisinde hazırlandı.

Bloklama Solusyonu: Ultra V Block (TA-1250UB; LabVision)

Sekonder Antikor: Biotinli anti-tavşan (keçi de üretilmiş) BA-1000 Vector lab.

Negatif Tavşan IgG Solüsyonu: 1 ml. bloklama solusyonu içerisine primer antikor ile aynı konsantrasyonda tavşan IgG'leri (Vector) eklenerek hazırlandı. I-1000 Vector Lab.

Streptaavidin Peroksidaz Kompleksi: (ABC, Vector lab. PK-6100)

Kromojen: 3-3'- diaminobenzidin (DAB, Sigma-FAST D4293)

İmmunohistokimya boyaması için kesitler 5µm kalınlığında superfrost-manyetik olarak statik olan lamlar üzerine alındı. Bu kesitler 37°C'lik etüvde gece boyu bekletildikten sonra ertesi gün 60°C'lik etüvde çalışmaya başlamadan önce 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kesitlerin 2 defa 20 dk. ksilol ve 5 dk. azalan alkol serilerinde (%100, %90, %80, %70) bekletilmesiyle deparafinize olması sağlandı. Alkol serilerinden sonra kesitler 5 dk. distile su içerisinde dehidrate edildikten sonra 1X PBS ile 2 defa yıkandı ve taze hazırlanan sitrik asit (pH: 6.0) tamponunda 2 defa 5 dk. mikrodalga ışınımına maruz bırakıldı. Kesitler mikrodalga uygulaması sonrasında oda ısısında 20 dk. soğutulduktan sonra, PBS ile 5 dk. oda ısısında yıkandı. Daha sonra, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile oda ısısında 20 dk. bekletilerek yok edildi. Kesitler 3 defa PBS ile yıkandıktan sonra, özgül olmayan bağlanımları bloke etmek için bloklama solüsyonu ile oda ısısında 7 dk. bekletildi. Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, örnekler üzerine primer antikorlar eklendi ve oda ısısında 2 saat nemli ortamda inkübe edildi. Primer antikorlardan CCM2 ve CCM3 1/250 dilüsyon oranında hazırlandı. Negatif kontrol olarak da, primer antikorlar ile aynı konsantrasyonda olan normal tavşan IgG'i kullanıldı. Kesitler 3 defa 5'er dk.'lık yıkama işlemlerini takiben, biotin ile işaretlenmiş anti-tavşan IgG'leri ile 30 dk. oda ısısında inkübe edildi. Sekonder antikorların dilüsyon oranı da 1/400 olarak belirlendi.

Sekonder antikor aşamasından sonra, kesitler üzerine 30 dk. önceden hazırlanan ve oda ısısında bekletilen streptaavidin-peroksidaz kompleksi (Vector lab. ABC kit) eklendi ve 30 dk. oda ısısında bekletildi. PBS ile yıkama aşamalarını takiben, kesitler

üzerine DAB solüsyonu damlatılarak ortaya çıkan kromojenik reaksiyon ışık mikroskobu altında takip edilerek boyanma şiddeti belirlendi. 3 dk'lık inkübasyon süresi sonunda kromojenik reaksiyon PBS içerisine alınarak durduruldu ve örnekler Mayer hematoksilen ile boyandıktan sonra immunohistokimya için uygun olan kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Ardından da ışık mikroskobu altında boyanmalar değerlendirildi.

3.4. İmmunofloresan Boyama Yöntemi

CCM3 ekspresyonunun bulunduğu yerleri floresan boyama ile doğrulamak sonuçları in situ ve immünyüzdürme ile kıyaslamak için kullanıldı.

Kullanılan Malzemeler

Bloklama Solusyonu: Ultra V Block (TA-1250UB; LabVision)

Sekonder Antikor: At-anti tavşan Aleksa 488 sekonder antikor (İnvitrogen)

Slayt Kapatma Solüsyonu: DAPI'li kapatma solusyonu (Vector Lab. H-1200)

Normal immunohistokimya yapılır gibi 5µm kalınlığında kesitler alındı, deparafinize edildi. Sitrik asit kullanılarak fiksatifin oluşturduğu sıkı aldehit bağları kopartıldı. UV blok kullanılarak, non-spesifik reaksiyonlar baskımlandı. Anti-CCM3 antikorunu, (1/250) dilüsyon oranında kullanılarak gece boyu +4°C'de inkübe edildi. Ertesi gün PBS ile yıkamaların ardından floresan işaretli sekonder antikor (At-anti tavşan Aleksa 488 sekonder antikor (İnvitrogen) ile muamele edilen kesitler 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Yine takip eden PBS yıkamalarından sonra kesitlerin üzerine DAPI'li kapatma solusyonu damlatılarak kapatıldı ve floresan mikroskobunda boyanmalar değerlendirildi.

3.5. İmmünyüzdürme (immunofloating) Metodu ile Boyama

Normal immunohistokimyadan biraz daha farklı bir methodur ve çok daha kalın (35µm) kesitler üzerinde ekspresyonları değerlendirmek için tercih edildi.

Kullanılan Solüsyonlar

DEPC-PBS (Dietil prokarbonat): 1litre PBS içerisine 1 ml. DEPC eklenir ve iyice çalkalanır. Köpük benzeri yapılar kaybolunca şişenin ağzı tam sıkıştırmadan oda ısısında gece boyu bekletilir. Ertesi sabah otoklavlanır, soğuduktan sonra kullanıma hazırdır.

%1 H₂O₂ Solüsyonu : 5 ml. DEPC-PBS + 167 µl. H₂O₂

Bloklama Solusyonu: % 5 Normal at serumu
% 1 Sığır serum albumini

% 0.1 Glisin
% 0.1 Lizin
% 0.3 Triton X-100

Antikor Dilüe Edici Solüsyon: 10 ml Bloklama solüsyonu + 30 µl Triton X-100

Sekonder Antikor: Biotin-SP-Conjugated affinity pure donkey anti-rabbit IgG (Jackson Immunoresearch) Triton X-100 içermeyen bloklama solüsyonu içerisinde 1:250 dilüsyonda hazırlandı.

Streptaavidin: ABC karışımı (Vector lab) damlatmadan 30 dk. önce hazırlanıp +4°C'de inkübe edildi.

DAB (% 0.05; pH: 7.4):

Renk Reaksiyonu: Her ml. DAB için;

4 µl. NH₄Cl
1 µl. Glukoz-oksidad
10 µl. Nikel amonyum sülfat
20 µl. Glukoz

Kesitler içerisinde DEPC-PBS olan küçük penisilin şişelerine alındı ve 25 dk. boyunca sık sık PBS'i değiştirilerek kesitlerin yıkanması sağlandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra %1 H₂O₂ solüsyonunda 10 dk. oda ısısında bekletildi. Bunun ardından H₂O₂'i uzaklaştırabilmek için DEPC-PBS içerisinde kesitler 1 saat boyunca en az 4 kez değiştirilerek yıkandı. Yıkama sonrasında bloklama solüsyonu içerisinde oda ısısında 1 saat boyunca bloklandı. Bloklama solüsyonunun ardından primer antikor içerisinde 2 gece +4°C'de bekletildi. İnkübasyon sonrasında kesitler 40 dk. boyunca DEPC-PBS içerisinde yıkandı. Stereptaavidin için ABC kompleksi hazırlandı ve 2 saat oda ısısında kesitler bu karışım içerisinde inkübe edildi. 1 saat boyunca DEPC-PBS içerisinde yıkandı ve DAB ile 20 dk boyunca inkübe edildi. Sonrasında DAB hiç geri çekilmeden renk reaksiyonu için substrat hazırlandı ve ışık mikroskobu altında kesitler kontrol edilerek doğru inkübasyon süresi tayin edildi. Reaksiyon geliştikten sonra DEPC-PBS içerisinde gece boyu yıkandı ve ertesi gün slaytlara yapıştırıldı. Gece boyu kuruması için beklendikten sonra ertesi gün dehidratasyon yapıldı. Bunun için;

5 dk. % 50 etanol
5 dk. % 70 etanol
5 dk. % 90 etanol
5 dk. % 100 etanol
1 saat ksilen-1
Gece boyu ksilen-2, ardından Histomount ile kapatma yapıldı.

3.6. Hücre Kültürü

CCM3 ekspresyonunu in vitro ortamda gözleyebilmek ve klonlama yapabilmek için tercih edildi.

Kullanılan Solüsyonlar

Hücreler için uygun olan mediumlar;

N2A (nöroblastoma hücre hattı) İçin Besi Ortamı:

- %50 yüksek glukozlu DMEM (low-glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA),
- %50 OPTI-MEM,
- %5 ısı ile inaktive olan FBS (heat-inactivated fetal bovine serum),
- %1 penisilin/streptomisin,
- %1 L-Glutamin

BAEC (sığır aortik endotelyal hücre hattı) İçin Besi Ortamı:

- Yüksek glukozlu DMEM,
- %10 FBS,
- %1 L-Glutamin

Cos7 (Maymun böbrek hücrelerinden elde edilen hücre hattı) İçin Besi Ortamı:

- Düşük glukozlu DMEM,
- %10 FBS,
- %1 penisilin/streptomisin

Tüm besiyeri ortamları steril koşullar altında hazırlanıp, filtre edildikten sonra +4°C'de saklandı.

Dondurulmuş olarak gelen hücreler 37°C'lik su banyosu içerisinde çözüldükten sonra, hemen T-75'lik kültür kaplarına alınarak üzerlerine 10 ml. besi ortamı eklendi ve 37°C'de %5'lik CO₂'li etüvde üremeye bırakıldı. 24 saatin sonunda kültür kabına yapışmayan ölü hücreler besi ortamı ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Her 48 saatte bir besi ortamı değiştirildi ve kabın tabanının %70'ini hücreler kaplayana kadar üretildi.

3.6.1. Tripsinizasyon ve Hücrelerin Sayılıp Uygun Oranda Odacıklı Slaytlara Ekilmesi

Hücreler kültür kaplarını yeterince kaplayacak hale geldiklerinde (%70) tripsinizasyon işlemi yapıldı. Öncelikle medyum tamamen uzaklaştırılıp steril PBS tamponu ile hücreler 2 defa yıkandı. Bu şekilde canlı olmayan ve kültür kabına tutunmamış hücreler ortamdan uzaklaştırılıp sadece canlı hücrelerin kalması sağlandı. Daha sonra kültür tabağının içine tripsin eklenip 5 dk. 37°C'lik CO₂'li inkübatör içerisinde hücrelerin kalkması için bekletildi. Sonrasında kültür kabının içerisinde kalkan tüm hücreler bir falkon tüpünde toplandı ve üzerine hücrelere has medyumdan

bir miktar daha eklendikten sonra 20.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi. Tüpün dibinde pellet oluşuktan sonra üstteki süpernatant mediyaya döküldü. Pelletin üzerine yeni taze mediyadan 3 ml. eklendikten sonra pipetle hücrelerin homojenize olması sağlandı. Daha sonra bu karışımdan 10 µl. alınarak hemasitometrede hücreler sayıldı. Hücreler farklı konsantrasyonlarda 6 kuyucuklu kaplar içerisine ekilerek yeniden 37⁰C'lik CO₂'li inkübatör içerisine konuldu. Hücreler bu slaytlara tutunması için 1 gece inkübe edildi. Hücreler için uygun sayı 0.3x10⁶ olarak belirlendi ve hücrelerin 1.2x10⁶ olması için beklenildi.

3.7. Hücre Hatlarına İmmunofloresan Boyama Yöntemi

Hücre hatlarında normal olarak CCM3 ekspresyonunun varlığı ve lokalizasyonunu incelemek için kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar

1X PBS Tamponu:

3.1'de anlatıldığı gibi hazırlandı ancak ortam steril olmak zorunda olduğundan otoklava konulup sterilizasyonu gerçekleştirildi.

Permeabilizasyon Solüsyonu:

%0.2 triton X-100 içeren PBS solüsyonu

Bloklama Solüsyonu:

%3 BSA (bovine serum albumine), 50mM NH₄Cl, 10mM Glisin, PBS içerisinde hazırlandı.

Antikor Dilüsyon Solüsyonu:

%1 Normal keçi serumu ya da %3 BSA ve %0.2 Tween-20 içeren PBS solüsyonu.

Yıkama Solüsyonu:

%0.2 Tween-20 içeren PBS tamponu.

Sekonder Antikor:

Alexa-fluor 555 konjuge sekonder antibadi

DAPI içeren kapatma solüsyonu:

Vektor Lab. H-1200

Hücreler yeterli düzeyde petrinin dibini kapladıktan sonra mediyaya uzaklaştırıldı. Soğuk PBS ile 2 defa kültür tabağı yıkandıktan sonra %4 PFA (paraformaldehit) ile oda ısısında 5-10 dk. fikse edildi. PFA uzaklaştırıldı ve yine 2 defa PBS ile yıkandı. Üzerine permeabilizasyon solüsyonundan eklendi ve oda ısısında 5 dk. inkübe edildi. Ardından bloklama solüsyonu ile 15 dk. oda ısısında bloklandıktan sonra, antibadi dilüsyon tamponunda hazırlanan 1/250 dilüsyon oranındaki CCM3 antikorunu gece boyu +4⁰C'de

inkübe edildi. Ertesi gün 3 defa %0.2 Tween-20 içeren PBS'li yıkama solüsyonunda yıkama işleminin ardından, sekonder antibadi ile muamele edildi. 1/400 oranında dilüe edilerek hazırlanan Aleksa-flour 555 at anti-tavşan sekonder antikoru ile 1 saat oda ısısında bekletildikten sonra yıkama solüsyonu ile 3 defa daha yıkandı. Üzerine DAPI içeren kapatıcı damlatıldıktan sonra floresan mikroskobunda incelendi.

3.8 Total RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi

Kullanılan Malzemeler

TRIZol (İnvitrogen)

Kloroform (Baker)

%100 İzopropanol Alkol (Baker)

%70'lik Alkol (steril)

DEPC-H₂O: 1 litre bidistile su içerisine 1 ml. DEPC eklendi ve iyice çalkalandı. Köpük benzeri yapılar kaybolunca şişenin ağzını tam sıkıştırmadan oda ısısında gece boyu bekletildi. Ertesi sabah otoklavlandı, soğutulduktan sonra da kullanıma hazır hale geldi.

RNaz inhibitörü Roche-03335399001(2000 unit)

Oligo (dT)_{12-18mer} primer (Invitrogen-18418-012)

RNaz içermeyen H₂O

Reverz Transkriptaz (Omniscript)- Qiagen 205111

dNTP karışımı (10mM, Roche)

dNTP karışımı (5mM, Roche)

Taq polimeraz enzimi (Roche)

Agaroz (Amerikan Bioanalitik)

Etidyum bromid (BioRad)

50X TAE (Tris Asetik asit EDTA) solüsyonu:

242 gr. Tris-Base

57.1 ml. Asetik Asit

100 ml. 0.5M EDTA (pH: 8.0)

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

3.8.1. TRIZol ile RNA Eldesi

Hücreler tripsinizasyon sonrasında 6 kuyucuk içeren kaplara hemasitometrede sayılarak uygun konsantrasyonlarda ekildi. Yeterli sayıda hücre kabın dibini kapladıktan sonra TRIZol ile RNA elde etme aşamalarına geçildi. Hücreler 2 defa soğuk PBS tamponuyla yıkandı, tampon vakum yardımıyla iyice çekildikten sonra 6 kuyucuklu kaplar buz üzerine alındı. Bundan sonraki tüm aşamalar RNA'nın degrades olmasını engellemek amacıyla buz üzerinde yada soğuk ortamda gerçekleştirildi. Her kuyucuğa 1 ml. TRIZol eklendi ve buz üzerinde özel hücre kazıyıcısı (cell scaper) yardımıyla hücrelerin kabın dibinden kalkması sağlandı. Her kuyucuktan hücreler pipetle alınarak

mikrotüplere konuldu. Mikrotüp içerisinde 10 dk. oda ısısında bekletildi. Bunun üzerine 200 µl. Kloroform eklendi. Elimizle tüpü hızlıca karıştırdıktan sonra 1 dk. oda ısısında inkübe edildi. Ardından +3⁰C’de 25 dk. 14.000 rpm’de santrifüj edildi. Yaklaşık 200 µl. civarında olan süpernatant alındı ve pellet uzaklaştırıldı. Temiz mikrotüpe alınan süpernatantın üzerine 700 µl. %100 izopropanol eklendi. Hızla elimizle karıştırdıktan sonra 1 dk. oda ısısında bekletildi. Ardından yeniden +3⁰C’de 20 dk. 14.000 rpm’de santrifüj edildi. Bu kez süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet saklandı. Pelletin üzerine 500 µl. %70’lik etanol eklendi ve yavaş hareketlerle sadece tüpün altüst yapılmasıyla alkolün pellet ile teması sağlandı. Ardından, +4⁰C’de 14.000 rpm’de 6 dk. santrifüj edildi. Pipetle alkol dikkatlice uzaklaştırıldı ve 5-10 dk. pelletin kuruması, alkolün uzaklaşması için beklenildi. Daha sonra üzerine 20 µl. DEPC-H₂O eklendi ve pelletin homojenize olması için el yardımıyla karışımı sağlandı. Nanodrop yardımıyla içerisinde ne kadar ng/µl konsantrasyonda örnek olduğu ölçüldükten sonra -20⁰C’de tüm RNA’lar kullanılacağı zamana kadar saklandı.

3.8.2. RNA’dan cDNA Eldesi

Elimizdeki hücre hatlarına ait RNA’nın 1µg. olacak şekilde hesaplanması gerekmektedir. Buna göre kaç µl RNA konulacağı hesaplandı.

3.8.2.1. cDNA reaksiyonu

RNA	1µg
Oligo (dT) _{12-18mer} primer	0.5µg/µl
RNaz içermeyen H ₂ O	- µl
<hr/>	
Toplam	15µl

Bu reaksiyonu kurarken önce RNaz içermeyen H₂O, RNA ve en son Oligo (dT) mikrotüpe eklendi. Vortekslendi ve kısa süreli bir santrifüj işlemi ile tüm sıvının PCR tüplerinin dibine inmesi sağlandıktan sonra 65⁰C’de 5 dk. inkübe edildi. Bu inkübasyonun hemen ardından tüpler buz üzerine alındı ve 2 dk. da buzda inkübe edildi. İnkübasyon sırasında “mastermix” denilen bir karışım hazırlandı.

MM

2 µl. RT tamponu	
2 µl. dNTP (5mM)	
1 µl. H ₂ O	
0.25 µl. RNaz inhibitörü (1.0 u/µl.)	
<hr/>	
5.25 µl. karışım	

Bu karışım inkübasyonu tamamlanan her bir PCR tüpüne 5.25 µl. olacak şekilde eklendi. Sonrasında da 37⁰C’de 1 saat inkübe edildi. Bu şekilde hücre hatlarına ait RNA’lar cDNA’ya çevrildi.

3.8.3. RT-PCR reaksiyonu

Hücre hatlarında mRNA düzeyinde Ccm3 ekspresyonunun varlığını değerlendirmek için kullanıldı.

Hücre hatlarından alınan örnekler için;

10X Tampon	2.5 µl.
10mM dNTP karışımı	0.5 µl.
MgCl ₂	0.75 µl.
F’ primer	0.5 µl.
R’ primer	0.5 µl.
cDNA	1 µl.
Enzim (Taq polimeraz)	0.25 µl.
H ₂ O	-

Toplam 25 µl.

Negatif kontrol için, cDNA yerine 1 µl. H₂O konuldu. Aynı reaksiyon PCR reaksiyonunun doğruluğunu kontrol etmek için β-actin için de kuruldu.

95⁰C’de 5 dk. }
94⁰C’de 30 sn. } 30 siklus
58⁰C’de 30 sn. }
72⁰C’de 2 dk. }

95⁰C’de 30 sn. }
56.7⁰C’de 30 sn. } 5 siklus
72⁰C’de 2 dk. }
72⁰C’de 10 dk. }
+4⁰C’de ∞ }

72⁰C’de 10 dk. olacak şekilde termal cyclers ayarlandı.

CCM3 için Kullanılan Primerler:

Cos7 ve BAEC için: F’: 5’-CCCAGATGAGATCAATGACAGA-3’
R’: 5’-ATGAATTAGTCGGTTGGCACTT-3’

N2A için: F’: 5’-TGGTTTCTATGCCTCTCTATGC-3’
R’: 5’-GCCGCTCAATCATGTACTCTT-3’

β -actin için kullanılan primer: F': 5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3'
R': 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGAT-3'

3.8.3.1. 6X Mavi Örnek Yükleme Tamponunun Hazırlanması

60 mM Tris-HCl (pH 7.5), 60 mM EDTA, 60% (w/v) Gliserol, bromfenol mavisi.

3.8.3.2. %1.5'lik Agaroz Solüsyonu

1.5 gr. Agaroz 100 ml. 1X TAE içerisinde çözüldükten sonra, mikrodalga fırında kaynatıldı. Jel oda ısısında biraz soğutulduktan sonra içerisine 5 μ l. etidyum bromür ilave edildi ve kasete dökülerek donması için beklendi.

Hazırlanan PCR karışımından 3-4 μ l., örnek tamponundan da 2 μ l. alınıp karıştırıldıktan sonra %1.5'luk agaroz jelin kuyucuklarına yüklendi. Kuyucukların başına da 1 Kb. DNA Ladder yüklendi.

Elektroforetik yürütme işleminin ardından jel ultraviyole ışınım altında görüntülenip, bantlar fotoğraflandı.

3.9. İnsitu Hibridizasyon

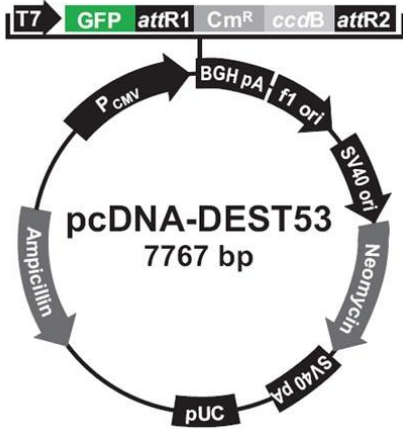
Dokuda CCM3 ekspresyonunu mRNA düzeyinde gösterebilmek için kullanıldı.

3.9.1. Transkripsiyon Reaksiyonu İçin DNA Şablonunun Hazırlanması

100 μ l. reaksiyon hazırlamak için 20 μ g. plazmid DNA'sının kullanılması gerekmektedir. Bu reaksiyon da 2 saat 37⁰C'de gerçekleşir. İçerisine 1-2 ünite restriksiyon enzimi / μ g. DNA konulur ancak enzim miktarı toplam hacmin %10'undan fazla olmamalıdır. Buna göre aşağıdaki reaksiyon kuruldu.

DNA (pcDNA-DEST53-hCcm3)	20 μ g.
10X Enzim tamponu (her enzim için spesifiktir; NEB#2)	10 μ l.
DEPC-içermeyen-H ₂ O	-
Enzim (Xho1)	20-40 ünite
<hr/>	
Toplam	100 μ l.

Plazmid olarak pcDNA-DEST53 kullanıldı.



```

905                                     1621
MET ... .. Lys
|                                     |
861 ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGA CACC ATG [REDACTED] AAA
    TAATTATGCT GAGTGATATC CCTCTGGGTT CGACCGATCT GTGG TAC [REDACTED] TTT
                                     GFP 'cycle 3 mutant'

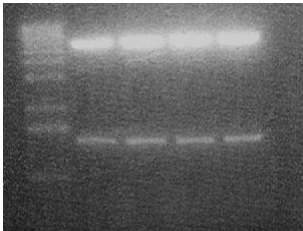
                                     1650
Ser Gly Ser Gly Pro Asp Gln Thr Ser Leu Tyr Lys Lys Ser Gly ... .. ***
1622 AGC GGT TCC GGA CCG GAT CAA ACA AGT TIG TAC AAA AAA GCA GGC TN- --- GENE ---
    TCG CCA AGG CCT GGC CTA GTT TGT TCA AAC ATG TTT TTT CGT CCG AN- ---

                                     attB1
3312
3301 NACCCAGCTT TCTTGTACAA AGTGGTGATA ATTAATTAAG ATAAACCCGC TGATCAGCCT CGACTGTGCC
    NIGGGTCGAA AGAACATGTT TCACCACTAT TAATTAATTC TATTTGGGCG ACTAGTCGGA GCTGACACGG
                                     attB2

```

Şekil 3.9.1.1. pcDNA-DEST53 plazmidine klonlanan Ccm3 geni.(www.invitrogen.com).

İnkübasyon sonrasında, reaksiyonu kontrol etmek için 5 µl. tüpten alınıp %1.2'lik agaroz jelde yürütüldü. Bu aşama, enzimin parçalama işlemini yerine getirip getirmediğini anlamak için gerçekleştirildi. Şayet, parçalama reaksiyonu tam olarak gerçekleşmezse enzimden normal miktarın yarısı kadar daha eklenip 1 saat daha inkübasyona tabi tutulmalıdır. Bu işlemin sonunda 2 bant elde edildi, 7.3 kb (Şekil 3.9.2) vektör, 1.5 kb'de Ccm3 ürünüydü.



Şekil 3.9.1.2: Vektör ve genin kesildikten sonra jeldeki ağırlıkları.

Bu basamağı takiben reaksiyona 5 µl. %10 SDS ve 5 µl. Proteinaz K eklendi. 37⁰C'de 15 dk. daha inkübe edildi. Sonrasında, fenol/kloroform ekstraksiyonu için 110 µl. fenol/kloroform/isoamil (25:24:1) eklendi ve vortekslendi. 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra, üstte kalan sıvı faz yeni bir ependorfa transfer edildi. Bu reaksiyonu tekrar etmek amacıyla 110 µl. kloroform/isoamil (24:1)'den eklendi yeniden vortekslenip, 5 dk. santrifüj edildikten sonra yine üstte kalan sıvı faz başka bir ependorfa alındı. Çökelmeyi gerçekleştirmek için, 230 µl. %100 Alkol ve 11 µl. 3M Na-Asetat (RNaz içermeyen) eklendi. Bu aşamada fazla eklenen tuz transkripsiyon reaksiyonunu inhibe edebilmektedir. Bu aşamanın ardından, buz üzerinde 15 dk. inkübe edildi ve süpernatant pellete zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırıldı. Pelletin üzerine 200 µl. %70'lik alkol (RNaz içermeyen) eklenerek pelletin yıkanması sağlandı. 14.000 rpm'de oda ısısında 5 dk. santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve pellet oda ısısında kurumaya bırakıldı. Daha sonra üzerine 20 µl. DEPC-H₂O eklenerek pelletin çözünmesi sağlandı. İçerisinden 1 µl.'si kullanılarak %1.2'lik jelde yürütüldü ve yeniden kontrol edildi.

3.9.2. Transkripsiyon Reaksiyonu

Ependorf tüpü içerisinde aşağıdaki karışım hazırlandı.

1 µg. şablon DNA
? µl. DEPC-H₂O
2 µl. 10X transkripsiyon tamponu
2 µl. 10X Nükleotid karışımı (DIG-mix.)
1 µl. RNaz inhibitörü
1 µl. 100 mM. DTT (Dithiothreitol)
2 µl. RNA polimeraz

Toplam 20 µl.

Bu reaksiyon karıştırıldıktan sonra 37⁰C'de 2 saat inkübe edildi. İçerisine 2 µl. DNaz (RNaz içermeyen) eklendikten sonra yine 37⁰C'de 15 dk. inkübe edildi.

3.9.3. Transkripsiyon Reaksiyonunun Ardından RNA'nın Çökeltilmesi (Presipitasyonu)

Öncelikle aşağıdaki reaksiyon kuruldu ve karışımın içerisine eklendi.

100 µl. DEPC-H₂O
10 µl. 4M LiCl
300 µl. %100 Alkol

Ortaya çıkan karışım 15 dk. buzda inkübe edildi. Ardından 14.000 rpm'de +4⁰C'de 15 dk. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellete 200 µl. %70

Alkol (RNaz içermeyen) eklenerek pellet yıkandı. Tekrar 14.000 rpm'de bu defa oda ısısında 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılıp pelletin oda ısısında kuruması sağlandı. Pelletin üzerine 100 µl. DEPC-H₂O eklenip karıştırıldıktan sonra, içinden 5-10 µl. alınarak jelde yürütüldü ve tekrar kontrol edildi. Tüpte kalan karışım artık bizim riboprobumuz olduğundan -20°C'de saklandı. Kullanmadan önce, 70 µl. riboprob 14 ml. pre-hibridizasyon solusyonu içerisine konuldu ve bu karışım slayt kaplarına alınarak -20°C'de saklandı.

3.9.4. İnsitu Hibridizasyon için Dokunun Hazırlanması

Kullanılacak C57 farelerin beyinleri %4 PFA perfüzyonu yapıldıktan sonra, zarar görmeyecek şekilde çıkartıldı. Ardından %4 PFA içerisinde 30 dk. +4°C'de fiksasyonu sağlandı ve total beyin %30 sükröz içeren PFA solüsyonuna alındı; tamamen dibe batana kadar sallayıcı cihazın üzerinde +4°C'de gece boyu bekletildi. Sonrasında %30 sükröz solüsyonuna gömülerek kriyotomda 36 µm.'lik seri kesitler, içinde DEPC-PBS bulunan 12 kuyucuklu kaplara alındı. Dokunun tamamı bu kaplara alındıktan sonra seri halde elektrostatik lamlara diseksiyon mikroskopu altında yapıştırıldı. Gece boyu kuruması için beklendikten sonra ertesi gün slaytları boyamak için in situ protokolüne başlandı.

3.9.5. Kesitlere İnsitu Hibridizasyon Uygulanması

Kullanılan Solüsyonlar

Deterjan Karışımı:

	<u>1 litre için</u>	<u>Son konsantrasyonu</u>
IGEPAL CA-360	10 ml.	% 1.0 IGEPAL CA-360
% 10 SDS	100 ml.	% 1.0 SDS
% 5 Deoxycholate	100 ml.	% 5 Deoxycholate
1M Tris-HCl (pH:8.0)	50 ml.	50 mM 1M Tris-HCl (pH:8.0)
0.5M EDTA (pH:8.0)	2 ml.	1 mM EDTA (pH:8.0)
2M NaCl	75 ml.	150 mM NaCl

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 1 litreye tamamlanır.

0.5M EDTA (pH:8.0):

400 ml. DEPC-H₂O içerisinde 94 gr. EDTA (disodium salt) çözüldü, yaklaşık 10 gr. NaOH pelleti ile pH:8.0'a ayarlandı. Son hacmin yaklaşık 500 ml. olması sağlandı ve sonrasında solüsyon otoklavlandı.

%10 Formalin (1 litre):

100 ml. formaldehit solüsyonu (%37 w/w) 900 ml DEPC-PBS içerisinde karıştırıldı ve +4°C'de saklandı.

2M NaCl (500 ml. için):

400 ml. DEPC-H₂O içerisinde 58.5 gr. NaCl çözüldü ve sonrasında otoklavlandı.

3M NaOAc pH: 5.2 (50 ml.):

20.4 gr. Sodyum asetat.3H₂O bir miktar DEPC-H₂O içerisinde çözüldükten sonra glacial asetik asit ile pH: 5.2'ye ayarlandı, sonunda toplam hacim DEPC-H₂O ile 50 ml.'ye tamamlandı.

NTMT:

	<u>250 ml. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
2M NaCl	12.5 ml.	100 mM NaCl
1M Tris-HCl (pH 9.5)	25 ml.	100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
1M MgCl ₂	12.5 ml.	50 mM MgCl ₂
Tween 20	2.5 ml.	% 1 Tween 20
Levamisol	132 mg.	2 mM Levamisol

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 250 ml.'ye tamamlandı.

2X Fosfat Tamponu:

Na₂HPO₄ (dibasic anhydrous) 22.66 gr.

NaH₂PO₄ (monobasic anhydrous) 5.04 gr.

500 ml. DEPC-H₂O içerisinde karıştırılır ve sonrasında hacim 1 litreye tamamlanır ve otoklavlanır.

%4 Paraformaldehit (PFA):

500 ml. bidistile H₂O 70-80°C'ye kadar ısıtıldı ve bunun içine 40 gr. paraformaldehit (Sigma P6148) çok dikkatlice eklendi. Daha sonra içerisinde 10N NaOH'dan 1-2 damla solüsyonun rengi berrak olana kadar damlatıldı. İçerisine 500 ml. 2X fosfat tamponundan eklendi ve pH kontrol edildi (pH: 7.4-7.6 arasında olmalıdır). Solüsyon Whatman kağıdı ile süzülükten sonra 50 ml'lik falkon tüplerine alındı ve -20°C'de saklandı. Tüm bu işlemler biyolojik kabin içerisinde yapıldı.

Hibridizasyon Solüsyonu:

	<u>500 ml. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Formamid	250 ml.	%50 Formamid
20X SSC (pH:4.5)	125 ml.	5X SSC
%10 SDS	50 ml.	%1 SDS
tRNA (125 mg/ml)	2 ml.	500 µg/ml. tRNA
aBSA (25 mg/ml)	4 ml.	200µg/ml acetylated BSA
Heparin Stok (10 mg/ml)	2.5 ml.	50 µg/ml heparin

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 500 ml.'ye tamamlandı ve 25 ml. falkon tüplerine bölünüp, -20°C'de saklandı.

Keçi Serumu:

-20°C'den alınan keçi serumu gece boyu +4°C'de bekletilerek yavaş yavaş çözülmesi sağlandı. Ardından ertesi gün 56°C'lik su banyosunda 30-60 dk. bekletilerek ısı ile inaktive olması sağlandı ve 14 ml.'lik falkon tüplerine konularak -20°C'de saklandı.

4M LiCl (50 ml.):

8.48 gr. LiCl 40 ml. DEPC-H₂O içerisinde çözüldü ve son hacim 50 ml.'ye tamamlandı ardından solüsyon otoklavlandı.

1M MgCl (200 ml.):

40.6 gr. MgCl₂.6H₂O 150 ml. DEPC-H₂O içerisinde çözüldü. Sonrasında toplam hacim 50 ml.'ye tamamlandı ve solüsyon otoklavlandı.

Proteinaz K Tamponu:

	<u>1 L. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
1M Tris-HCl pH: 8.0	100 ml.	100 mM Tris-HCl pH: 8.0
0.5M EDTA pH: 8.0	100 ml.	50 mM EDTA pH: 8.0

Solüsyon DEPC-H₂O ile 1litreye tamamlandı.

Tween 20 Tamponu:

DEPC-PBS içerisinde %1 Tween-20 hazırlandı.

%10 SDS Tamponu:

100 gr. SDS 900 ml. DEPC-H₂O içerisinde çözüldü. 68°C'ye kadar ısıtıldı ve toplam hacim DEPC-H₂O ile 1 litreye tamamlandı.

Solüsyon X:

	<u>500 ml. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
20X SSC (pH: 4.5)	50 ml.	2X SSC (pH: 4.5)
Formamid	250 ml.	%50 Formamid
%10 SDS	50 ml.	%1 SDS

Solüsyon DEPC-H₂O ile 500 ml.'ye tamamlandı.

20X SSC pH: 4.5 (1L.):

175.3 gr. NaCl ve 88.2 gr. Sodyum sitrat, 800 ml. DEPC-H₂O içerisinde çözüldü. Yaklaşık 10 gr. sitrik asit ile pH 4.5'a ayarlandı ve toplam hacim DEPC-H₂O ile 1 litreye tamamlandı ve solüsyon otoklavlandı.

%30 Sükroz-PFA (50 ml.):

15 gr. sükroz bir şişeye konuldu ve PFA ile toplam hacim 50 ml.'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

10X TBST:

	<u>1 L. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
1M Tris-HCl (pH: 7.5)	250 ml.	250 Mm Tris-HCl (pH: 7.5)
NaCl	80 gr.	1.36 M NaCl
KCl	2 gr.	26.8 mM KCl
Tween-20	100 ml.	%10 Tween 20

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 1 litreye tamamlandı ve solüsyon otoklavlandı. pH: 7.0 civarında olmalıdır.

TE Stop Tamponu:

	<u>250 ml. için</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
1M Tris-HCl (pH: 7.5)	2.5 ml.	10 mM Tris-HCl (pH: 7.5)
0.5 M EDTA (pH:8.0)	5 ml.	10 mM EDTA (pH:8.0)

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 250 ml.'ye tamamlandı ve solüsyon otoklavlandı.

1M Tris-HCl (1L):

121.1 gr. Tris-base 800 ml. DEPC-H₂O içinde çözüldü. pH'yı ayarlamak için konsantre HCl'den aşağıdaki miktarlarda eklendi.

pH: 7.5	75 ml.
pH: 8.0	42 ml.
pH 9.5	10 ml.

Toplam hacim DEPC-H₂O ile 1 litreye tamamlandı ve solüsyon otoklavlandı.

LB (Luria-Bertani) Agar Besiyeri Ortamı:

15 gr. Bacto-Agar, 1 litre d H₂O içerisinde çözüldü. Bu karışım otoklavlandı ve 50⁰C'ye kadar soğuması için beklendikten sonra içerisine kullanılacak olan antibiyotik (ampisilin/ kanamisin) eklendi. 90 mm. çaplı kültür kaplarına dökülerek oda ısısında donması için beklendi. Sonra da +4⁰C'de saklandı.

Kesitlere in situ hibridizasyon uygulanırken 3 günlük bir protokol takip edildi. Bu protokole 1. gün, kesinlikle RNaz içermeyen koşullarda tamamlandı, 2. ve 3. gün için ise bu şart değildi. Bu protokole göre;

1. gün:

- Slaytlar RNaz içermeyen slayt kaplarına konuldu ve %4 PFA içerisinde 15 dk. oda ısısında fikse edildi.
- Oda ısısında 3X5 dk. DEPC-PBS ile yıkandı.
- Oda ısısında Deterjan solusyonunda 2X15 dk. tutuldu.
- Oda ısısında 10 dk. DEPC-PBS ile yıkandı.

- 37⁰C’de 30 dk. Proteinaz K (1µg/ml) solüsyonunda inkübe edildi. (17mg/ml Proteinaz K tamponunun içine 3 µl Proteinaz K eklenir.)
- %4 PFA içerisinde 15 dk. daha oda ısısında fikse edildi.
- Oda ısısında 3X5 dk. DEPC-PBS ile yıkandı.
- Hibridizasyon basamağı: 70 ml prob 14 ml. hibridizasyon solüsyonunun içine konuldu ve slayt kabına boşaltıldı. Slaytlar bu RNaz içermeyen kabın içerisine konuldu ve 70⁰C’de gece boyu inkübe edildi.

2. gün:

- Slaytlar Solüsyon X içerisine alındı ve hibridizasyon solüsyonu dökülmeden - 20⁰C’de muhafaza edildi.
- Slaytlar 70⁰C’de 3X45 dk. Solüsyon X ile yıkandı.
- Oda ısısında 3X15 dk. TBST ile yıkandı.
- 1 saat oda ısısında TBST içinde hazırlanan %10 keçi serumuyla bloklandı.
- Bloklamının ardından anti-Digoxigenin-AP (Roche # 11 093 274 910) antibadisiyle 2 saat oda ısısında inkübe edilir. (TBST içerisinde %1’lik keçi serumuyla 1/5000 dilüsyon oranında hazırlanır).
- Oda ısısında 3X15 dk. TBST ile yıkandı.
- Oda ısısında 10 dk. taze hazırlanan NTMT ile inkübe edildi.
- Renk reaksiyonu için: her 10 ml NTMT için 35 µl. NBT (Nitro blue tetrazolium chloride) ve 35 µl. BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate, toluidine salt) [Roche, 11 681 451 001] eklendi. Oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi.

3. gün:

- Renk reaksiyonu tamamlanınca, TE-Stop Tamponu ile 2 defa yıkandı ve birkaç saat bu tampon içerisinde bekletildi.
- Ortaya çıkan zemin boyanmasını ortadan kaldırmak için TBST ile yıkandı.
- PBS ile çalkalandıktan sonra 5’er dk. yükselen alkol serilerinden geçirildi (%70, %80, %90, %100). Ardından Histoclear I ve Histoclear II’den geçirilip, Aquamont ile kapatıldı ve gece boyu kuruması için oda ısısında bekletildi. Slaytlar ertesi gün +4⁰C’de saklandı.

3.9.6. Fare Beyninden ISH için Prob Hazırlanması

Ticari olarak alınmış fare beyninden elde edilmiş mRNA ekstraktlarını kullanarak prob elde edildi. Bunun için öncelikle elimizdeki mRNA ekstraktı cDNA’ya reverz transkriptaz enzimi yardımıyla çevrildi. Ancak sadece PDCD10 genine ait ürün elde etmek için bu gene spesifik primerler dizayn edildi. Primerler ve cDNA’yı kullanarak PCR reaksiyonu kuruldu ve elimizdeki cDNA örneği çoğaltıldı. 50 µl.’lik ürünün 35 µl.’si jelde yürütülüp ürünün saflığı değerlendirildi. Saf olarak elde ettiğimiz ürünü “gel extraction kiti” yardımıyla jelden kesip çıkartarak DNA saf olarak elde edildi. Elimizdeki cDNA’yı klonlamak için TOPO TA[®] klonlama kitini kullanarak cDNA bunun içerisine yerleştirildi. Sonrasında E. coli’ye transformasyon yapıldı.

Ortaya çıkan ürün ampisilin içeren besiyeri ortamlarına ekildi. Kolonilerin çoğalması için beklendikten sonra mini prep. ile DNA elde edildi. Vektörle birlikte genimizin olduğu alandan uygun enzimlerle genimiz kesildi. Bu aşamadan sonra prob sentezi için transkripsiyon reaksiyonuna geçildi.

Ticari olarak satın alınan fare beyin mRNA ekstraktları reverz transkriptaz reaksiyonu (Omniscript kit # 205110, QIAGEN) ile cDNA'ya çevrildi. Bu reaksiyon için;

10X RT Tamponu	2 µl.
RNaz içermeyen dH ₂ O	10 µl.
dNTP (5mM)	2 µl.
10 mM Oligo DT	2 µl.
RNaz1(10u/µl)	1 µl.
OmniRT	1 µl.
RNA	2 µl.
<hr/>	
Toplam	20 µl.

Bu reaksiyon 37⁰C'de 1 saat inkübe edildi bu inkübasyon sonrasında mRNA'lar cDNA'ya çevrilmiş oldu. Bu reaksiyonun ardından PDCD10 geni için sentezlenen primerlerde kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. Bu şekilde elimizdeki cDNA'nın çoğaltılması sağlandı. PCR reaksiyonu için;

10X pfu Tamponu	5 µl.
10 mM dNTP	1.25 µl
10 mM F' primer	2 µl.
10 mM R' primer	2 µl.
cDNA (PDCD10)	2 µl.
pfu	0.75 µl.
dH ₂ O	37 µl.
<hr/>	
Toplam	50 µl.

Oluşturulan bu reaksiyonun 35 µl.'si %1.5'luk agaroz jelde yürütüldü ve bant verip vermeyeceği kontrol edildi. Doğru yerde görülen bant sonucunda UV altında bu bantın olduğu bölge jelden dikkatli bir biçimde jilet yardımıyla kesilerek çıkartıldı. Bu içerisinde DNA'mızın olduğu jel parçası için "jel ayrıştırma kiti" (QIAGEN) yardımıyla saflaştırma işlemi yapıldı. Bu işlem için öncelikle steril bir mikrotüp içine jel parçamız konuldu ve hassas terazi ile tartıldıktan sonra hacminin 3 katı kadar QG tamponundan eklendi. Bu jel parçası tampon içerisinde 50⁰C'de 10 dk. inkübe edildi. Bu inkübasyon

sırasında rengin sarıya dönüşmesi beklendi. Sonrasında başlangıçtaki jelin hacmi kadar isopropanol eklendi ve karıştırıldı. +4⁰C’de 13.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra kitin toplayıcı tüplerine örnekler aktarıldı. QIA quick spin kolonların içerisine alındıktan sonra da 13.000 rpm’de +4⁰C’de 1 dk. daha santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı ve 0.75 ml. PE tamponundan üzerine eklendi. Yine alta inen sıvı uzaklaştırıldı. 13.000 rpm’de 1 dk. daha santrifüj edildikten sonra kolonun içinde kalan DNA’mızı elde etmek için EB tamponundan 30 µl. eklendi ve tekrar santrifüj edildi. Bu işlemlerin sonunda saf olarak DNA’mızı elde etmiş olduk.

Sonraki aşama bu DNA’nın bir vektör içerisine yerleştirilmesiydi. Bunun için TOPO TA[®] (# K4500-01, Invitrogen) vektörü kullanıldı. Bunun için;

PCR ürünü	0.5-4 µl.
Tuz solüsyonu	1 µl.
TOPO [®] vektörü	1 µl.
Steril su	toplam hacim 6 µl.’ye tamamlandı.
<hr/>	
Toplam	6 µl.

3.9.6.1 dH5α E. coli Hücrelerine Transformasyon

Vektöre DNA’mız girdikten sonra bu vektör E. coli içerisine transforme edildi. Transformasyon için dH5α E. coli hücreleri kullanıldı. Transformasyon için;

Her E. coli transformasyonu için 1 mikrotüp bulunmaktadır. Her bir mikrotüp içerisine 2 µl. TOPO TA klonlama reaksiyonundan eklendi. Nazikçe karıştırıldı ve buz üzerinde 5-30 dk. inkübe edildi. Bundan sonra ısı şoku için hücreler 42⁰C’de 30 sn. hiç karıştırmadan bekletildi. Bunun üzerine 250 µl. oda ısısında bekletilmiş SOC medyumundan 250 µl. eklendi. 37⁰C’de 1 saat karışımın gerçekleşmesi sağlandıktan sonra 10-50 µl. LB ampisilin dirençlilik geni içeren besiyeri ortamlarına ekildi. Bu ortamlar gece boyu 37⁰C’de bekletildikten sonra, ertesi gün beyaz ve sağlıklı görünen tüm koloniler toplandı. Bu koloniler kullanılarak (ortalama 15-20 tane) firmanın önerdiği protokol doğrultusunda (QIAGEN) mini prep. yapıldı. Bunun sonucunda elde edilen saf DNA’da sorun olmasını engellemek için vektördeki uygun primerler yardımıyla sekansa gönderildi. Sekans sonucuna göre en iyi koloni hangisi ise o mikrotüp -80⁰C’de saklandı. Sekans sonuçları herşeyi doğrulayınca in situ hibridizasyon için gerekli olan transkripsiyon reaksiyonu tıpkı daha önce vektörden kesip çıkarttığımız DNA’da olduğu gibi gerçekleştirildi ve sonuçta prob elde edildi.

3.10. Vektör Dizayn Edilmesi

Ccm3 genini vektör içerisine klonlayarak in vitro ortamda genin etkisinin değerlendirilebilmesi için kullanıldı.

Kullanılan Malzemeler

pcDNA-DEST37 GatewayTM Vector
pcDNA-DEST53 GatewayTM Vector (#12288-015, Invitrogen)
pEGFP-N2 #: U57608 (Clontech)

Daha önce pcDNA-DEST37-hCcm3 vektöründen Ccm3 kısmı kesilip yeni vektörümüz pcDNA-DEST53 GatewayTM Vector içerisine yerleştirildi. Bunu yapmak için sırasıyla LR reaksiyonu denilen şu basamaklar takip edildi (Invitrogenin katoloğunda önerildiği gibi).

- pcDNA-DEST37-hCcm3 vektöründe Ccm3 içeren alan uygun enzimlerle kesildi ve sonuç %1.5 agaroz içeren jelde kontrol edildi. Kesme işlemi vektörü de linear hale getirmek içindir ve bu kesim için kesinlikle genin dışında kalan enzimler seçilmelidir genin içinde de aynı enzimlerin olmamasına özen gösterilmelidir.
- Kesim sonrasında elimizde kalan DNA; 2.5 ml %100 etanolle 0.1ml. 3M sodyum asetat eklenerek çökeltilir. Santrifüj sonrasında ortaya çıkan pellet 2 defa %70 etanolle yıkanır.
- DNA (Ccm3); 1X TE Tamponunda (pH 8.0) çözülür ve son konsantrasyon 50-150 ng/μl. aralığında olmalıdır.
- Ccm3 için uygun primerler kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu, bu şekilde ürünün çoğaltılması sağlandı.
- PCR ürünü ile yeni vektörümüz (pcDNA-DEST53 GatewayTM Vector) klonlamaya tabi tutuldu. Bunun için;
- 1.5 ml.'lik tüp içerisinde aşağıdaki komponentler oda ısısında karıştırıldı;

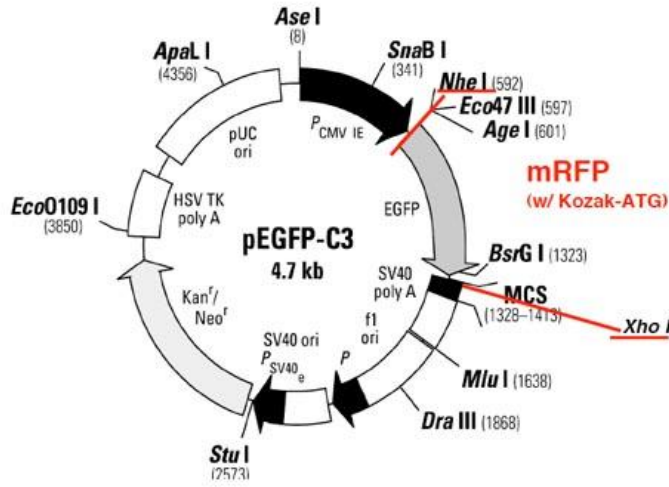
pcDNA-DEST37 Gateway TM Vector (Entry klon) (50-150 ng)	1-7 μl
pcDNA-DEST53 Gateway TM Vector (Destination vektör) (150 ng/μl)	1 μl
TE tamponu, pH 8.0	8 μl

- Buz üzerinde çözülmesi için LR KlonazTM II enzim karışımı 2 dk. bekletildi ve 2 sn. vortekslendi. 2 μl. mikrotüp içerisine eklendi.
- Oda ısısında 1 saat inkübe edildi.
- Karışıma 1 μl. Proteinaz K solüsyonundan eklendi ve 10 dk. daha 37°C de inkübe edildi.
- DH5α E. coli'ye transformasyonu sağlandı. Ampisilin dirençlilik geni (100 μg/ml) içeren LB besiyeri ortamına ekildi.
- Ertesi günü gelişen sağlıklı büyük koloniler toplanıp mini prep (QIAGEN; kitin protokolüne uygun olarak) yapıldı. Elde edilen DNA'lar sekans analizine gönderildi. Analiz sonucunda hangi tüpümüzdeki örneğimiz daha iyi çıkmışsa o örnek kullanıma alındı.

3.10.1. pcDNA-DEST53 Gateway™ Vektöründen, pEGFP-C3 ve pRFP(C3) Vektörlerinin İçerisine Ccm3'ün Klonlanması

Klonlama işleminde öncelikle pEGFP-C3 içerisine hCcm3 klonlanır daha sonra bu klonlamadan EGFP kısmı çıkartılarak mRFP eklenerek vektörün kırmızı floresan vermesi sağlanır (Şekil 3.10.1.1).

pRFP(C3) vector



Şekil 3.10.1.1. pEGFP-C3 vektörüne Ccm3 klonlanması. pEGFP-C3 vektöründen EGFP kısmının kesilip uzaklaştırılması sonucunda bu alana monomerik kırmızı floresan proteini (mRFP) eklendi.

3.11. Transfeksiyon

Kullanılan Solüsyonlar

Transfeksiyon için uygun besiyeri ortamı: OPTI-MEM-I

Kullanılan hücre hattı için uygun besiyeri ortamı

Lipofektamin-2000 (İnvitrogen)

Plazmid DNA'sı (pcDNA-DEST53-hCcm3);

pEGFP-(C3)-hCcm3;

mRFP-(C3)-hCcm3

Transfeksiyona başlamadan önce kullanılacak hücre hatları yeterli sayıya ulaşana kadar çoğaltıldı. %90 oranında hücre sıklığı sağlandıktan sonra transfeksiyon işlemine başlandı. Transfeksiyon için Lipofektamin-2000 kullanıldı. İşleme başlamadan 1 gün öncesinden 6 kuyucuklu kültür tabağındaki hücreler tripsinize edildi ve hemasitometrede

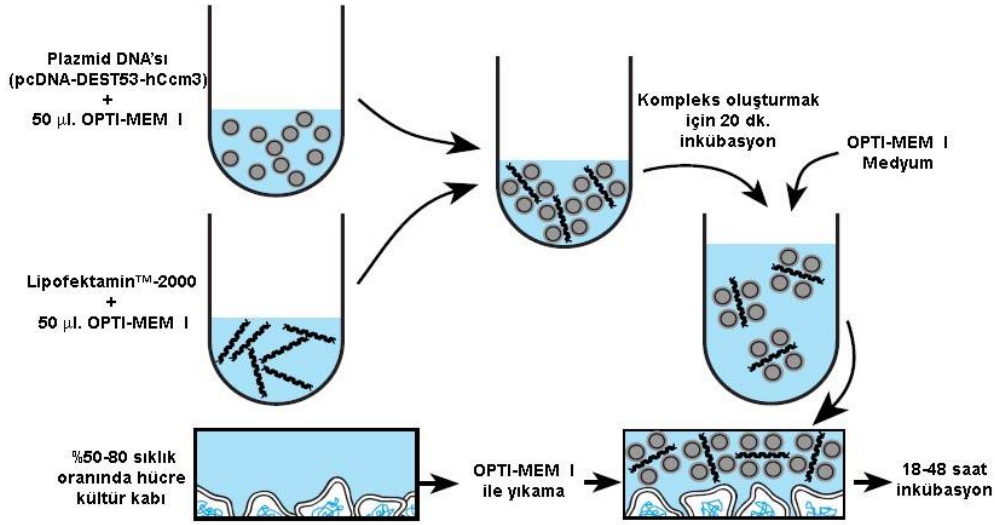
sayıldı. 2×10^5 olacak şekilde 500 μ l. hücre antibiyotik içermeyen besiyeri ortamına ekildi ve bunların %80 sıklığa ulaşabilmesi için 1 gün beklendi.

Ertesi gün hücreler kontrol edildikten sonra, kullanacağımız plazmid DNA'sı 4 μ g. olacak şekilde dilüe edildi. Her 4 μ g. plazmid DNA'sı (pcDNA-DEST53-hCcm3) için de 10 μ l. Lipofektamin-2000 kullanıldı. Bu dilüsyon aşağıdaki tabloya uyularak gerçekleştirildi (Tablo 3.11.1).

Tablo 3.11.1. Lipofektamin 2000'in kullanım klavuzundan alınmıştır.

Kültür Kabı	Kuyucuk Yüzey Alanı	Ekilecek Medyumun Hacmi	Dilüe Edilecek Medyumun Hacmi	DNA Miktarı	Lipofektamin -2000
96-kuyucuk	0.3 cm ²	100 μ l.	2x25 μ l.	0.2 μ g.	0.5 μ l.
24-kuyucuk	2 cm ²	500 μ l.	2x50 μ l.	0.8 μ g.	2.0 μ l.
12-kuyucuk	4 cm ²	1 ml.	2x100 μ l.	1.6 μ g.	4.0 μ l.
6-kuyucuk	10 cm ²	2 ml.	2x250 μ l.	4.0 μ g.	10 μ l.
60-mm	20 cm ²	5 ml.	2x0.5 ml.	8.0 μ g.	20 μ l.
10-cm	60 cm ²	15 ml.	2x1.5 ml.	24 μ g.	60 μ l.

İlk önce uygun miktardaki plazmid DNA'sı ile 50 μ l. OPTI-MEM[®] I Reduced Serum Medium bir mikrotüp içerisinde çok dikkatli ve yavaşça karıştırıldı. Başka bir mikrotüp içerisinde de uygun miktarda Lipofektamin[™]-2000 ve 50 μ l. OPTI-MEM[®] I dikkatlice karıştırıldı. Bu karışım oda ısısında 5 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında DNA'nın içerisinde olduğu medyum ile Lipofektaminin içerisinde olduğu medyum tek bir mikrotüp içerisinde toplandı. Bu tek mikrotüp oda ısısında 20 dk. inkübe edildi. Sonrasında bu karışımdan 100 μ l. herbir kuyucuk içerisine yavaşça eklendi. Üzerlerinde karışım olan hücre topluluğu kültür kapları içerisinde 37⁰C'lik CO₂'li inkübatörlerde 18-48 saat süreyle inkübe edildi. Ancak medyum 4-6 saat sonra değiştirilip yerine antibiyotikli normal besiyeri ortamından eklendi (Şekil 3.11.1). İnkübasyon süresi plazmidin hücre içerisine girip geni aktive etmesine kadar geçen zaman ile sınırlandırıldı. Bunun için floresan mikroskop altında belirli saatlerde değerlendirmeler yapılarak en iyi zaman dilimi tayin edildi.



Şekil 3.11.1. Lipofektamin-2000'in canlı hücelere uygulanmasını göstermektedir. (www.invitrogen.com. internet sayfasından alınmıştır.) Transfeksiyon işlem 3 basamaktan oluşmaktadır. 1.Basamak: Plazmid DNA'sı ile OPTI-MEM I karışımının hazırlanması. Bu işlemde DNA'dan uygun miktarda alınıp yine uygun miktarda OPTIMEM I içerisinde çözülür. Oda ısısında 5 dk. beklenir. 2.Basamak: Lipofektamin-2000 ile OPTIMEM I medyumunun karıştırılması. Uygun miktarlarda OPTI MEM I ve Lipofektamin-2000 mikrotüp içerisinde oldukça hassas bir şekilde karıştırıldı. 3.Basamak: Ayrı ayrı hazırlanan bu 2 karışım da birbirlerine karıştırılıp 20 dk. oda ısısında inkübe edildi. Kültür kapları OPTIMEM I medyumunu ile yıkanıp ölü hüceler uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa Lipofektaminli karışımdan eklendi. İnkübatörde 4 saat inkübe edildikten sonra üzerine transfeksiyon için kullanacağımız antibiyotikli medyum eklendi.

pcDNA-DEST53-hCcm3 vektörüne ek olarak aynı çalışma sonradan yapılan pEGFP-C3-hCcm3 ve mRFP-C3-hCcm3 plazmid vektörleri ve farklı hücre hatları kullanılarak doğrulandı.

3.12. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labelling) Metodu

İn vitro ortamda apoptoza giren hücelerin miktarını belirlemek için kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar

Tunel kit (Roche#11684795910)

1x PBS

%4 PFA (Parafolmaldehit)

Permeabilizasyon Solüsyonu:

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

Floresan boyanmaya spesifik DAPI'li kapatma solüsyonu (Vector lab # H1200)

İn vitro koşullarda apoptozu göstermek amacıyla TUNEL kiti kullanıldı. Kit, hücre popülasyonunda apoptozu uğrayan ve apoptoz için özgül olan DNA kırıklarının 3-0H ucuna, terminal deoksiniükleotid transferaz (TdT) enziminin floresan işaretli 12-dUTP'nin katılımı ile apoptotik hücrelerin floresan mikroskobu altında tespit edilmesine imkan tanımaktadır.

GFP içeren plazmid için kırmızı renk floresan içeren TUNEL kiti, RFP içeren plazmid için ise yeşil renk veren TUNEL kiti kullanılarak apoptoz değerlendirildi.

3.13. İstatistiksel Analiz

pcDNA-DEST53-hCcm3 plazmidini içerisine alıp apoptozu başlayan hücrelerin oranı t-testi yardımıyla değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$). Kontrol olarak kullanılan ve içerisinde Ccm3 geni bulunmayan pEGFP-N2 plazmidinde de apoptotik reaksiyon az da olsa görüldü. Bunun sebebi de lipofectAMINE'nin hücre üzerinde yarattığı toksik etkiden kaynaklanmaktaydı. LipofectAMINE'nin toksisitesi firma tarafından da onaylanmakta ve deneylerde bu gözardı edilmektedir.

3.14. siRNA Tekniği

Ccm3 geni klonlanan hücrelerde isteğe bağlı olarak genin susturulması sonucunda etkileri görebilmek için tercih ettiğimiz bir metodur. Daha önceden dizayn edilmiş siRNA'lar (PDCD10-stealth-390, 473, 540 ve negatif kontrol Cat # 10620312, Invitrogen) Invitrogen firmasından satın alındı. Alınan bu örnekler RNAi duplex-LipofectAMINE RNAiMAX complex (Invitrogen) kullanılarak son konsantrasyonu 20nM olacak şekilde firmanın önerdiği doğrultuda hücre hatlarına transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücreler serum içermeyen medyum içerisinde kültüre edildi. Ardından 24, 48 ve 72. saatlere kadar çeşitli zaman aralıklarında hücreler tripsinize edilip elde edilen proteinler western blot yöntemiyle değerlendirildi.

3.14.1 RNA İnterference (Post-transkripsiyonel Gen Susturma)

HUVEC hücreleri kuyucuk başına 5×10^4 hücre olacak şekilde 6-kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Gece boyu hücrelerin tutunması için bekledikten sonra ertesi gün 2 defa PBS ile yıkandı ve 3 set olarak gelen PDCD10 stealth TM select RNAi (25 base pair) (Unigene ID: Hs.478150), firmanın önerdiği (Invitrogen Corporation, California) doğrultuda transfekte edildi. Kontrol siRNA olarak stealth RNAi negatif kontrol çifti (Invitrogen) kullanıldı.

pdcd10-stealth-390; CCU UCU UCG UAU GGC AGC UGA UGA U
pdcd10-stealth-473; CAC GAG CAC UUA AAC AAA UUC UCA G
pdcd10-stealth-540; GAC AAU CAA GGA UAU AGC UAG UGC A

50 pmol RNAi çifti 250 ul Opti-MEM^R I Rreduced Serum içerisine eklendi ve LipofectamineTM RNAiMAX (5ul in 250ul Opti-MEM^R I Rreduced serum medyumunu ile karıştırıldı. 6 saatlik inkübasyondan sonra normal besiyeri ortamı eklendi ve 72 saat daha inkübasyona tabi tutuldu. Sonunda elde edilen protein lizatlarına Western blot yapıldı. Membranlar primer antikor olarak anti-fosfo-p38 antikor (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) ve anti-CCM3 ile inkübe edildi.

3.15. Western Blot Analizi

Klonlama ve transfeksiyon sonrasında proteinin, apoptotik yolaktaki diğer proteinler ile ilişkisinin değerlendirilmesi için kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar

10X Yürütme Tamponu:

25 mM Tris (Sigma)

192 mM Glisin (Sigma)

%0.1 SDS (Sigma)

1 litre bidistile su içerisinde çözülür ve oda ısısında saklanır. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanılır.

Bloklama Solüsyonu (%5'lik süt tozu):

5 gr. süt tozu 100 ml. TBS-T içerisinde çözülür ve +4⁰C'de saklanır.

10X TBS-T Tamponu:

24.4 gr. Tris

80 gr. NaCl

1 litre bidistile su içerisinde çözülür ve oda ısısında saklanır. Bidistile su ile 1X şeklinde dilüe edilerek kullanılır.

TBS-T Solüsyonu:

1 litre 1X TBS içerisine 1000 µl. Tween-20 eklendi ve oda ısısında saklanır.

Transfer Tamponu:

14.4gr.Glisin (Sigma)

3.05 gr. Tris (Sigma)

700 ml. bidistile su içerisinde çözülür. Bu solüsyona 200 ml. Metanol (Merck# 1.06.008.2500) eklendi ve toplam hacim 1000 ml. olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

%10'luk Poliakrilamid Jel (Hazır jel- BioRad)

Membranın Soyulma (stripping) Aşaması İçin:

TBS-T içerisinde %2'lik SDS hazırlandı. Kullanmadan önce her mililitre için 70 µl. β-merkaptetanol eklendi. 65⁰C'de 30 dk. inkübe edildi. Ardından membran TBS-T ile birkaç defa yıkandı.

Enhanced Chemiluminiscent Solüsyonu (ECL, NEN)

İmmun-blot™ PVDF Membran (BioRad# 162-01177)

Hücrelerden elde edilen proteinlerin konsantrasyonları belirlendikten sonra, her mikrosantrifüj tüpünde 20 µg. protein olacak şekilde miktarları hesaplandı. Her örnek üzerine eşit miktarda yükleme tamponu ilave edildikten sonra 95⁰C'de 5 dk. denatüre edildi. Ardından %10'luk poliakrilamid jellere yüklendi. Örnekler üst jelden çıkıncaya kadar 120 V'da yürütüldü, alt jele geldiklerinde voltaj 100 V'a düşürülerek yaklaşık 1 saat elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez sonrası jel plakalardan ayrıldı ve transfer sistemine alınarak PVDF membrana 32 mA'de gece boyu transfer edildi. Transfer sonrasında ertesi gün membranlar çıkartılıp TBS-T içerisinde yıkandıktan sonra %5'lik süt tozu içerisinde oda ısısında 1 saat bloklandı. Bloklamadan sonra süt tozu içerisinde 1/1000 dilüsyonda hazırlanan primer antikor da gece boyu +4⁰C'de bekletildi. Bu aşamayı takiben membranlar 3 defa 20 dk. süreyle TBS-T ile yıkandı. Böylece ortamda zayıf bağlanan yada bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı. Yıkama aşamalarının ardından 1/10.000 dilüsyonda TBS-T içerisinde hazırlanan sekonder antikor (Vector Lab) ile oda ısısında 1 saat inkübe edildi. TBS-T ile yıkamaların ardından immunotespit için 1/1 oranında hazırlanan ECL ile yaklaşık 1 dk. muamele edildikten sonra karanlık odada otoradyografiye (Kodak) maruz bırakıldı.

İlk antikor ile ilgili sonuç alındıktan sonra membran TBS-T ile yıkandı ve hem diğer antikor hem de β-actin uygulaması için stripping yani membranın soyulması aşamasına geçildi. Bu aşamadan sonra diğer antikorlar ile de inkübe edildi ve membrana proteinlerin eşit yüklenip yüklenmediği belirlendi.

3.16. Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Normal ve CCM gösteren damar yapılarının ultrastrüktürel özelliklerini göstermek için transmisyon elektron mikroskopisi (TEM) yöntemi uygulandı.

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalının yardımlarıyla Serebral kavernoza malformasyona sahip hastalardan lezyonlu olan bölgenin cerrahi müdahale sonucunda çıkartılmasıyla örnekler sağlandı. Bu örneklerle, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına gelen normal insan beyin preparasyonları kıyaslandı. Bunun için her 2 doku türü de elektron mikroskopik takibe alındı. Takip sonrasında damarların olduğu bölgeden kalın kesitleri takiben ince kesitleri

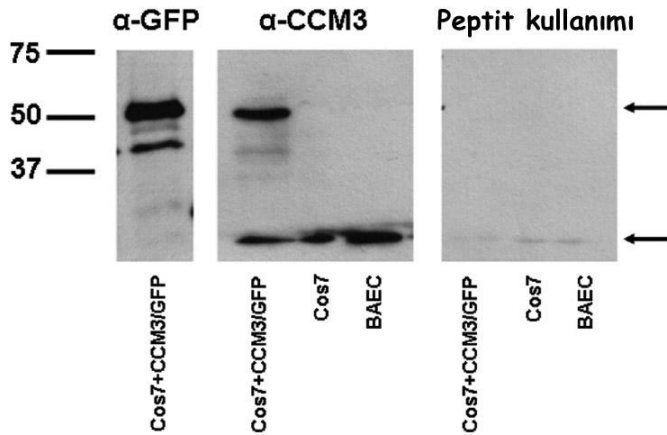
alındı. Kontrastlama sonrasında TEMGA ünitesinde bulunan Zeiss Leo-906E geçirimli elektron mikroskopunda değerlendirildi.

BULGULAR

Yale Üniversitesi (ABD) Patoloji Anabilim Dalı tarafından sağlanan insan beyin preparatları üzerinde CCM2 ve CCM3 immunohistokimyasal analizleri yapıldı. Ayrıca, hücre kültürleri hazırlandı ve kültürasyon sonrası immunofloresan boyamalar ile proteinimizin ekspresyonu değerlendirildi. Cos7, BAEC, N2A, BHK, HeLa gibi değişik hücre hatları kullanılarak genimizin içerisinde olduğu plazmidler bu hücre hatlarına transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında TUNEL, Western blot uygulamalarıyla genin apoptotik indeksi, yapılan istatistiksel analizlerle de doğrulanarak sonuçlar yorumlandı. PDCD10 genine özgün riboprolar sentezlendi ve genin beyindeki ekspresyonu in situ hibridizasyon yöntemiyle vurgulandı.

4.1. Antikor Özgüllüğünün Test Edilmesi

Çalışmaya başlamadan önce, insan PDCD10/Ccm3 genine karşı üretilen (CCM3)-tavşan spesifik poliklonal antikorunun özgüllüğü test edildi. Özellikle full-length CCM3 cDNA'sı pcDNA-DEST53 içerisine klonlandı ve bu plazmid Cos7, N2A ve BAEC hücre hatlarına LipofectAMINE yardımıyla transfekte edilerek test edildi. Transfeksiyon sonrasında uygun zaman aralıklarında protein elde edilerek Western blot analizine tabi tutuldu. Western blot sonucunda anti-CCM3 ve anti-GFP poliklonal antikorları ile firma tarafından gönderilen peptit blokajı kullanıldı. CCM3'e ait 25 kDa'luk bant, peptit blokajı yapıldığında ortadan kalktı. Çünkü CCM3 antikorunu kendi peptidi ile inkübe edilerek bloke edildiğinden kendi antijeni olan CCM3 proteinine bağlanamadığından özgül bant gözlenemedi (Şekil 4.1).



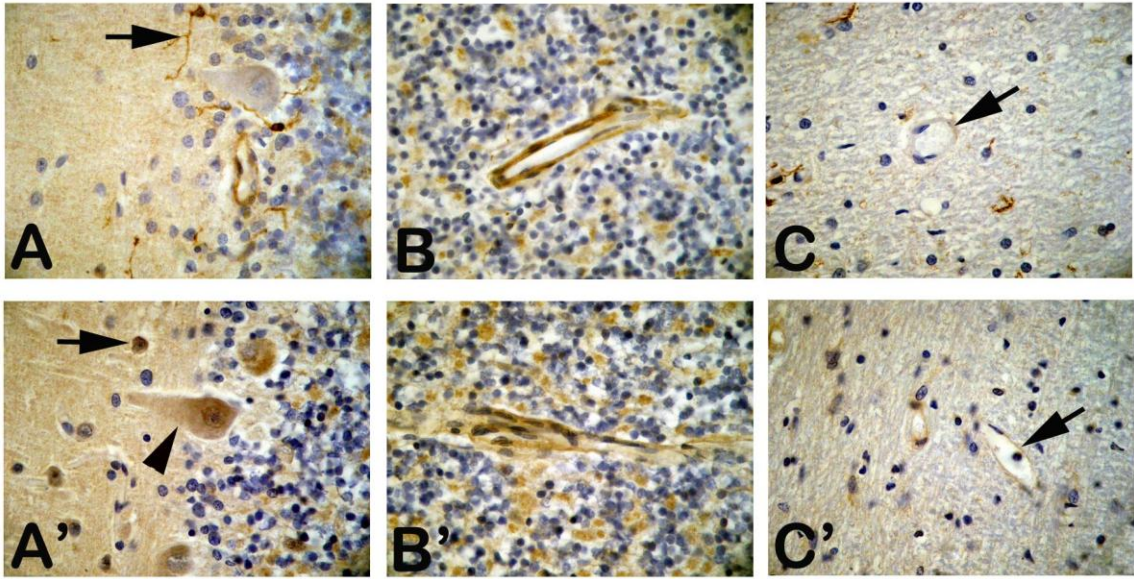
Şekil 4.1.1. CCM3 antikor özgüllüğünün Western blot yöntemiyle gösterilmesi. Cos7 hücrelerine pcDNA DEST53-hCCM3 plazmidini transfekte edildi. Transfeksiyon sonrasında elde edilen proteinden Western blot analizi yapıldı ve 52 kDa'luk band; GFP (green

fluorescence protein) proteini ile konjuge edilmiş plazmiddeki anti-GFP proteininin varlığını göstermektedir. Anti-CCM3 antikoruna ile farklı hücre hatlarındaki CCM3 proteini 24kDa'luk bant ile gösterildi. Peptit blokajı sonrasında herhangi bir banta rastlanmadı.

4.2. İmmunohistokimya Bulguları

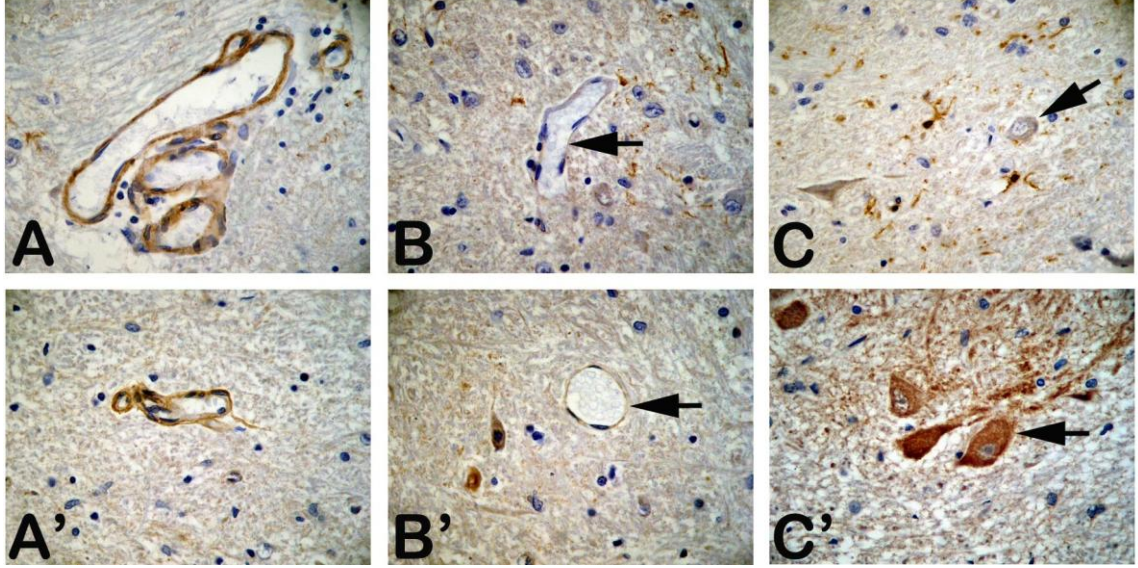
4.2.1. İnsan Serebral Dokularında CCM3 (PDCD10)'ün İmmunohistokimyasal Analizi

Yetişkin insan beyin dokularının farklı bölgelerinden alınan kesitlerde CCM3 proteininin nerelerde bulunduğunu gösterebilmek için immunohistokimyasal analizler yapıldı. Bu boyanmalar daha önce CCM2 proteininin tespit edildiği yerlerle kıyaslandı. Elde edilen veriler doğrultusunda, beyin farklı bölgelerinden alınan örneklerde CCM3 immunoreaktivitesi arteriyel endotelde gözlenirken, venöz endotelde çok az yada hiç bulunmadığı belirlendi (Şekil 4.2.1.1).



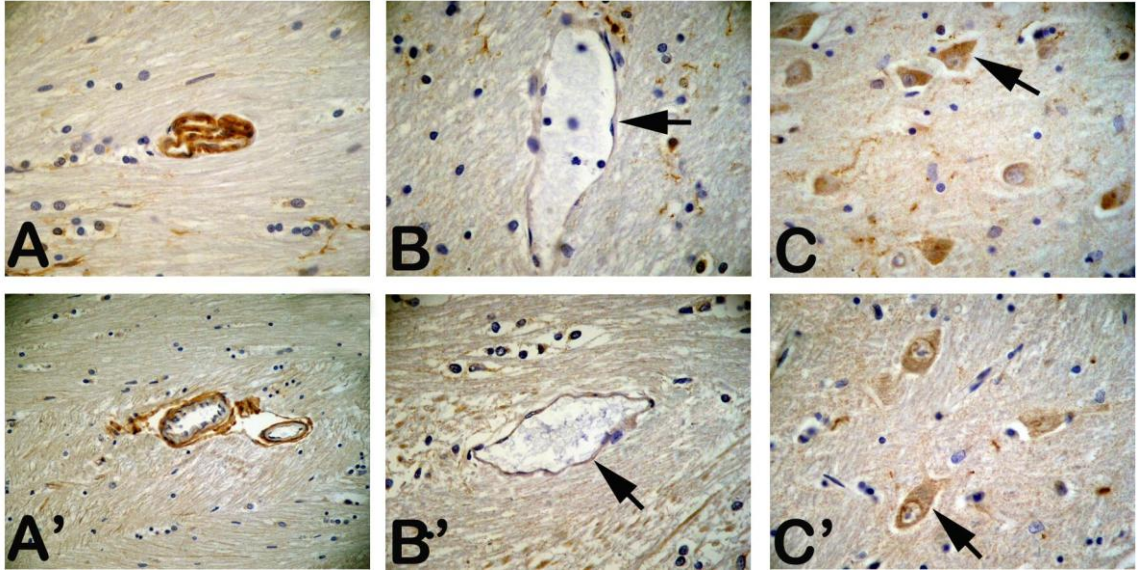
Şekil 4.2.1.1. İnsan serebellumunda CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi. İnsan serebellumundan alınan örneklerde hem CCM2 (A;B;C) hem de CCM3 (A',B',C') immunoreaktivitesinin gösterilmesi. A) CCM2 immunoreaktivitesi Purkinje hücrelerinde çok zayıf bir şekilde gözlenirken astrocytlerde ve damar endotelinde net bir şekilde izlenmekteydi (ok). Buna karşın CCM3 immunoreaktivitesi (A') Purkinje hücrelerinde (ok başı) ve moleküler tabakadaki glia hücrelerinde (ok) yoğun olarak gözlenmektedir. B) Granüler tabakada arteriyel endoteldeki CCM2 immunoreaktivitesini gösterirken, (B') CCM3 immunoreaktivitesini işaret etmektedir. C) Venöz endotelde hem CCM2 hem de CCM3 (C') immunoreaktivitesine rastlanılmadı (ok). Büyütmeler 20x

Yetişkin insan beyninin akcevheri de CCM2 ve CCM3 immunoreaktivite açısından karşılaştırıldı. İki protein için de arteriyel endotelde reaksiyon görülürken venöz endotelde reaksiyona rastlanmadı (Şekil 4.2.1.2).



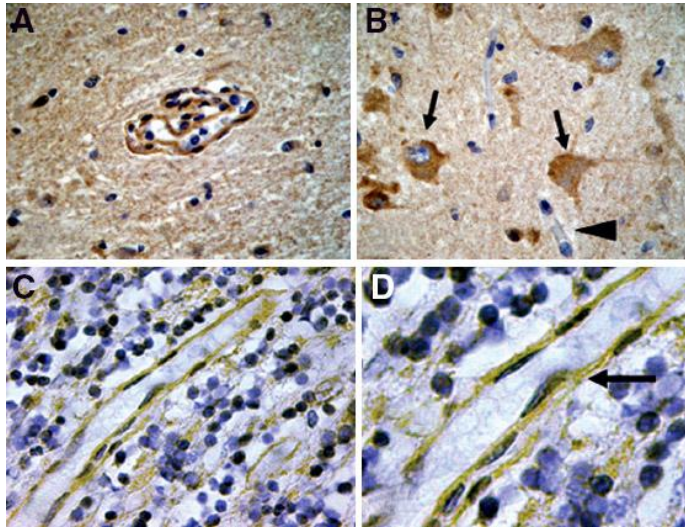
Şekil 4.2.1.2. İnsan beyninin akcevherinde CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi. Normal insan beyninin akcevher bölgesinden alınan kesitlerde CCM2 (A;B;C) ve CCM3 (A';B';C') immunoreaktivitesi. Arteriyel endotelde immunoreaktivite yoğun olarak gözlenirken (A,A') venöz endotelde (B,B') gözlenmemektedir (ok). Ayrıca medulla bölgesindeki nöronlarda CCM2 immonoreaktivitesi nöronlarda zayıfken (C,ok); CCM3 immunoreaktivitesi yoğun olarak görülmektedir (C',ok). 20X

Normal insan beyninin talamus bölgesinden alınan örneklerde de durumun diğer bölgelerle aynı özellikte olduğu belirlendi (Şekil 4.2.1.3).



Şekil 4.2.1.3. İnsan talamusunda CCM2 ve CCM3 immunoreaktivitesi. İnsan talamusundan alınan örneklerde de CCM2 (A;B;C) ve CCM3 (A';B';C') immunoreaktivitesi. Hem CCM2 (A;B;C) hem de CCM3 (A';B';C') için arteriyel endotelde reaksiyon gözlenirken venöz endotelde çok zayıf olarak görüldü (ok). Talamustaki nöronlarda da hem CCM2 (C, ok) hemde CCM3 immunoreaktivitesi şiddetli bir şekilde gözlemlendi (C', ok). 20X

İnsan serebral ve serebellar korteksinden alınan örneklerde de CCM3 immunoreaktivitesi değerlendirilmiştir. Kortikal arteriyel endotelde yoğun olarak gözlenen immunoreaktivite büyük piramidal nöronların sitoplazmalarında da belirgindi (Şekil 4.2.1.4).

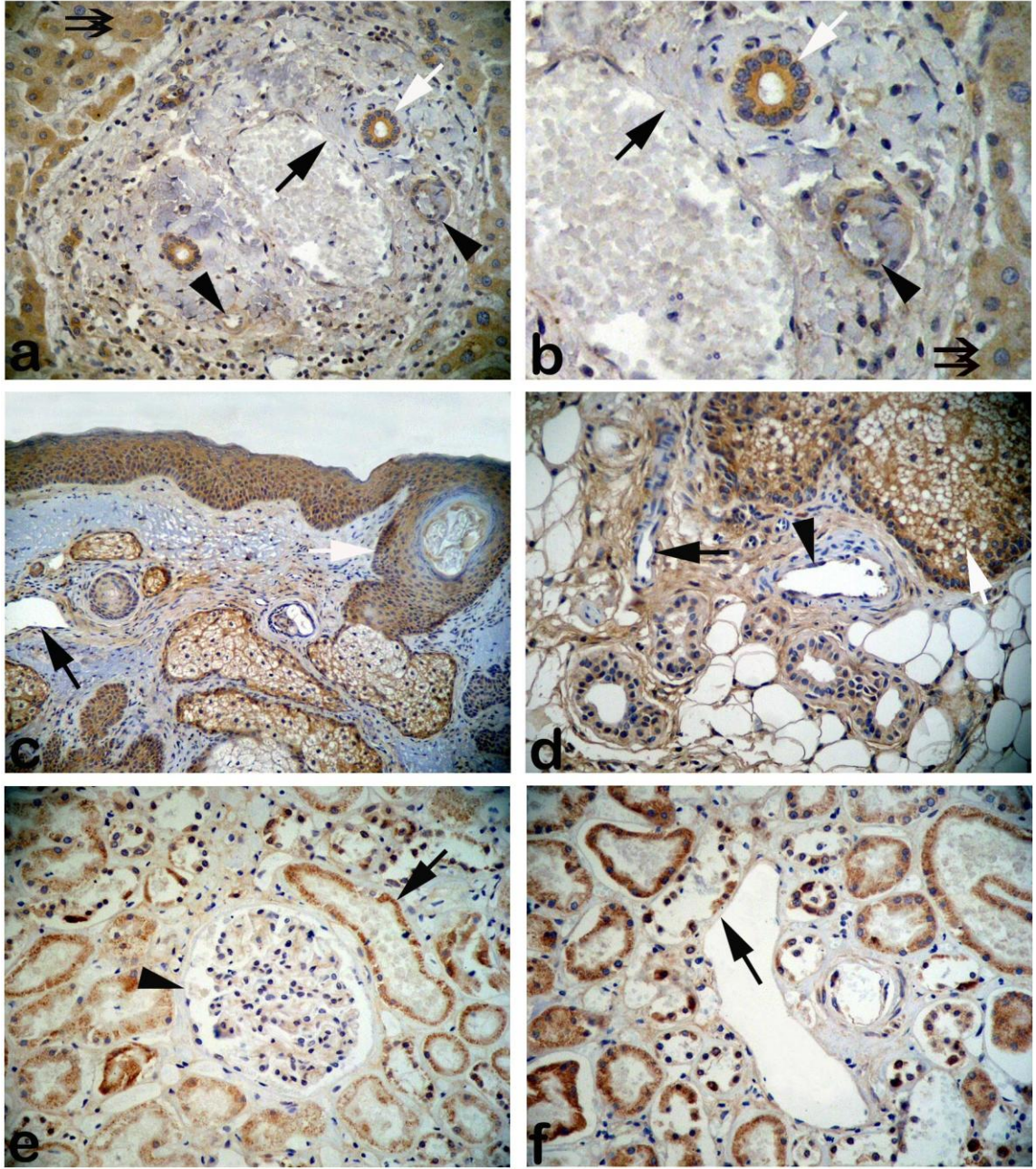


Şekil 4.2.1.4. İnsan serebral korteksinde CCM3 immunoreaktivitesi. A) CCM3 proteini kortikal arteriyel endotelde yoğun olarak bulundu. B) Aynı şekilde korteksin büyük

piramidal nöronlarının sitoplazmalarında da yoğun CCM3 immunoreaktivitesi görüldü (oklar). Ancak venöz endotelyumda hiç CCM3 immunoreaktivitesine rastlanılmadı (ok başı) 20x. C) Serebellar granüler tabakada arteriyel endoteldeki CCM3 immunoreaktivitesi 60X. D) 80X büyütmede endoteldeki CCM3 immunoreaktivitesi (ok).

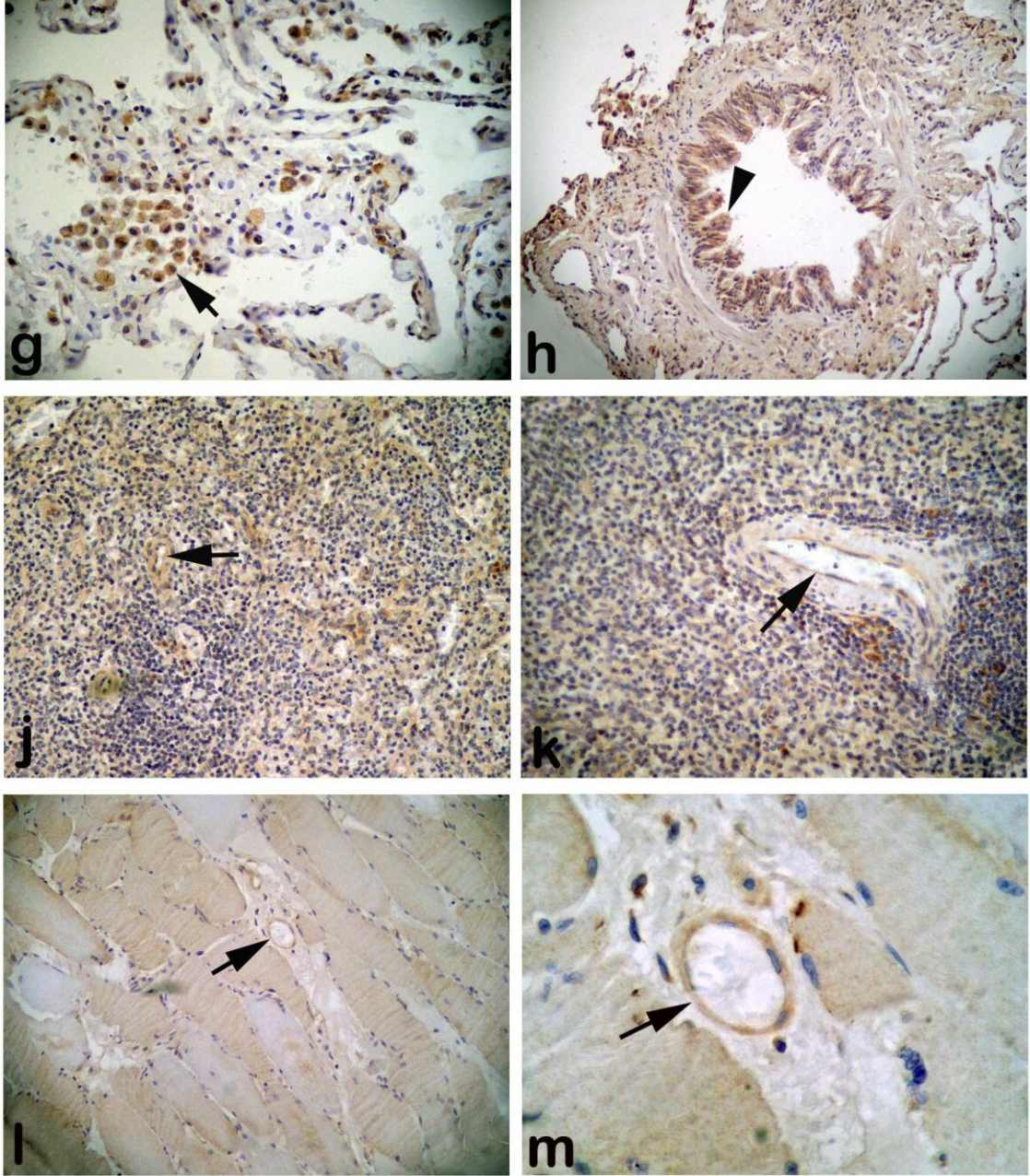
4.2.2. İnsan Ekstra-Serebral Dokularında CCM3 (PDCD10)'ün İmmunohistokimyasal Analizi

Yetişkin insan serebral dokularında CCM3 immunoreaktivitesinin gösterilmesine ek olarak, bu proteinin serebrum dışında da var olup olmadığı ve nasıl yerleştiğini gösterebilmek için çeşitli dokular kullanıldı. Bu dokulara anti-CCM3 antikoru kullanılarak immünohistokimyasal analizler yapıldı. Sonuçlar; serebruma benzer şekilde arteriyel endotelde CCM3 immunoreaktivitesi izlenirken, venöz endotelde immunoreaktiviteye rastlanılmadı. Karaciğerde safra kanallarında ve hepatositlerde, deride kıl foliküllerinde ve bezlerde, böbrekte proksimal tübüllerin epitelinde, akciğerde tip II pinömositlere benzeyen alveolar hücrelerde, bronşiyal epitelde yoğun olarak CCM3 immunoreaktivitesi belirlendi (Şekil 4.2.2.1 ve Şekil 4.2.2.2).



Şekil 4.2.2.1. İnsan karaciğer, deri ve böbrek dokusunda CCM3 immunoreaktivitesinin dağılımı. a) Karaciğerde hepatik arteriollerde (ok başı) ve safra kanallarında yoğun CCM3 immunoreaktivitesi (beyaz ok) görülürken, portal venede (ok) immunoreaktiviteye rastlanılmamaktadır. Damarlardaki ekspresyona ek olarak hepatositlerde de yoğun immunoreaktivite dikkat çekmektedir (çift ok). Büyütme 20X. b) Portal triad bölgesinin 40X büyütmesi. Tüm yapılar daha net olarak seçilebilmektedir. c) Deride CCM3 immunoreaktivitesi venöz endotelde (ok) gözlenmezken, epitelde, kıl folikülü (beyaz ok) ve bezlerde immunoreaktivite dikkat çekiciydi. d) Derinin 40X büyütmesinde arteriyel endoteldeki (ok başı) yoğun reaksiyona karşılık venöz endotelde (ok) reaksiyona rastlanılmamaktadır. Bezlerdeki immunoreaksiyon da oldukça yoğun olarak

görülmektedir (beyaz ok). e) Böbrekte glomerül endotelinde CCM3 ekspresyonu görülmezken (ok başı) proksimal tübüllerin epitelinde yoğun olarak bulunmaktadır (ok). f) Yüksek büyütmede venöz endotelin (ok) CCM3 ekspresyon etmediği görülmektedir.

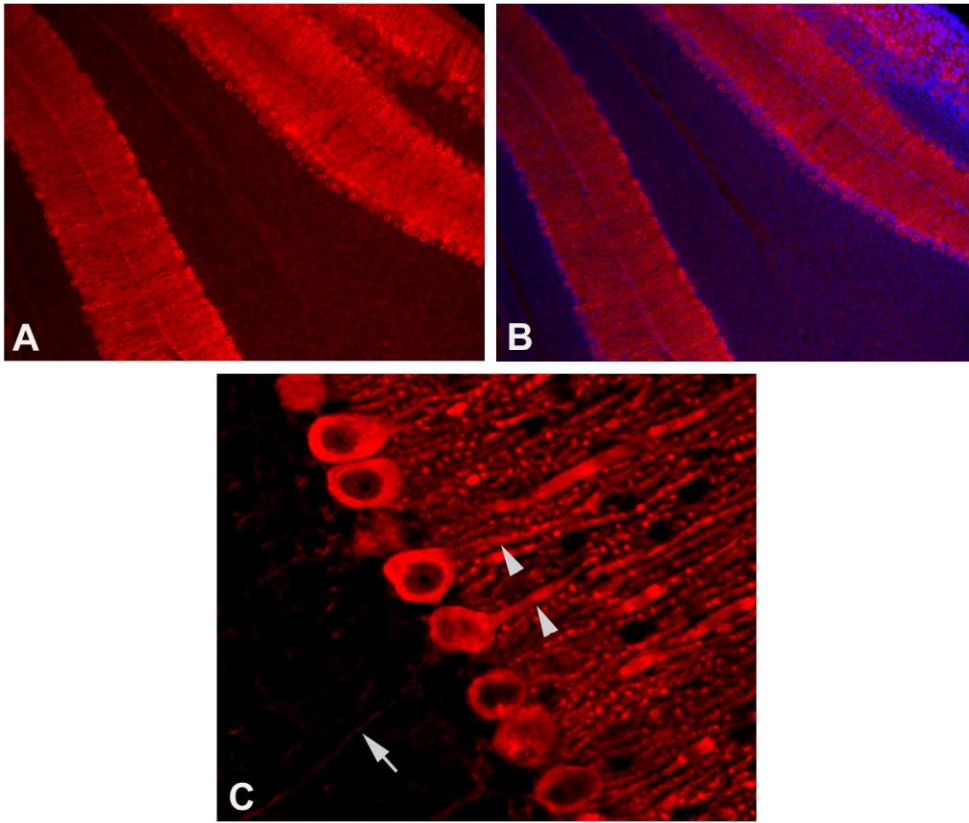


Şekil 4.2.2.2. İnsan akciğer, dalak ve iskelet kasında CCM3 immunoreaktivitesi. g) Akciğerde CCM3 immunoreaktivitesi tip II pinositlere benzeyen hücrelerde yoğun olarak gözlenmekteydi (ok) 20x. h) Bronşiyal epitelde de yoğun immunoreaktivite izlenmekteydi (ok başı) 10x. j-k) Dalakta beyaz pulpa içerisinde yer alan merkezi arter

endoteliumunda (oklar) immunoreaktivite görülmekteydi J; 10x, k;20x. l-m) İskelet kasının kapiller ve arteriyel endotelinde de CCM3 ekspresyonu (ok) görülmektedir.l; 10x, m;40x.

4.3. İmmunofloresan İşaretleme

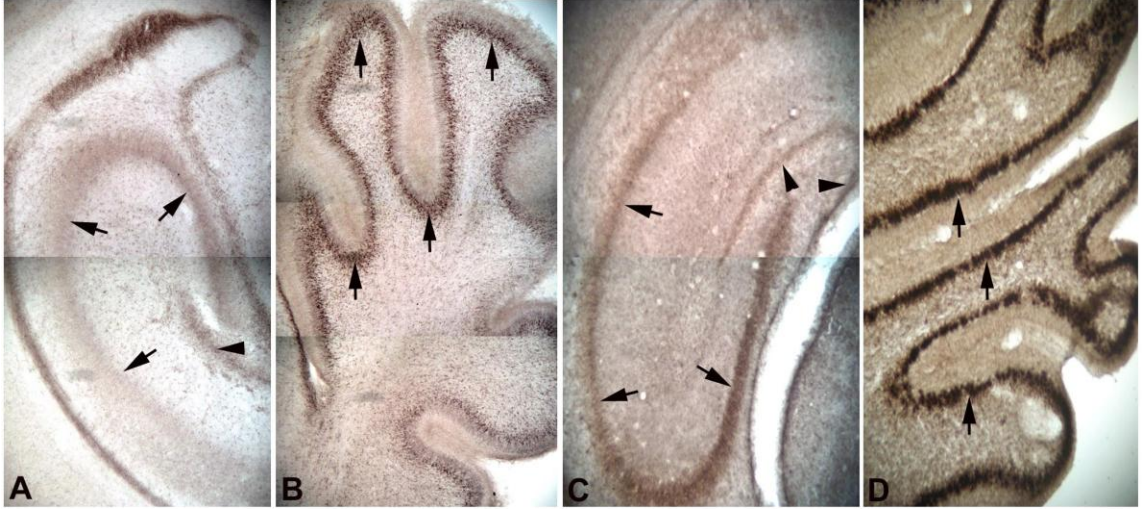
İnsandan alınan örnekler üzerinde yapılan immunohistokimyasal analizlere ek olarak fare merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinden alınan örneklerde de CCM3 immunoreaktivitesi test edildi. Ancak bu defa örnekler immunofloresan olarak işaretlendi. İnsandan alınan örneklerde olduğu gibi merkezi sinir sisteminde arteriyel endotelde reaksiyona rastlanırken, venöz endotelde immunoreaktivite gözlenmedi. Özellikle serebellumda purkinje hücrelerinde gözlenen reaksiyon dikkat çekiciydi (Şekil 4.3.1)



Şekil 4.3.1. Fare serebellumundan alınan örnekte CCM3 immunoreaktivitesi. A) Stratum gangliosum ve Stratum molekularede yoğun immünreaktivite izlenmektedir (10x). B) Aynı görüntünün DAPI ile birleştirilmiş görünümü. (10x). C) Purkinje hücrelerinin soma ve dendritlerinde (ok başı) yoğun, aksonda (beyaz ok) ise zayıf immünreaktivite izlenirken, Granüler hücreler ve Golgi tip II hücreleri ile glia hücreleri immünreaktivite göstermemektedirler (80X).

4.4. İmmünyüzdürme Metodu ile İşaretleme

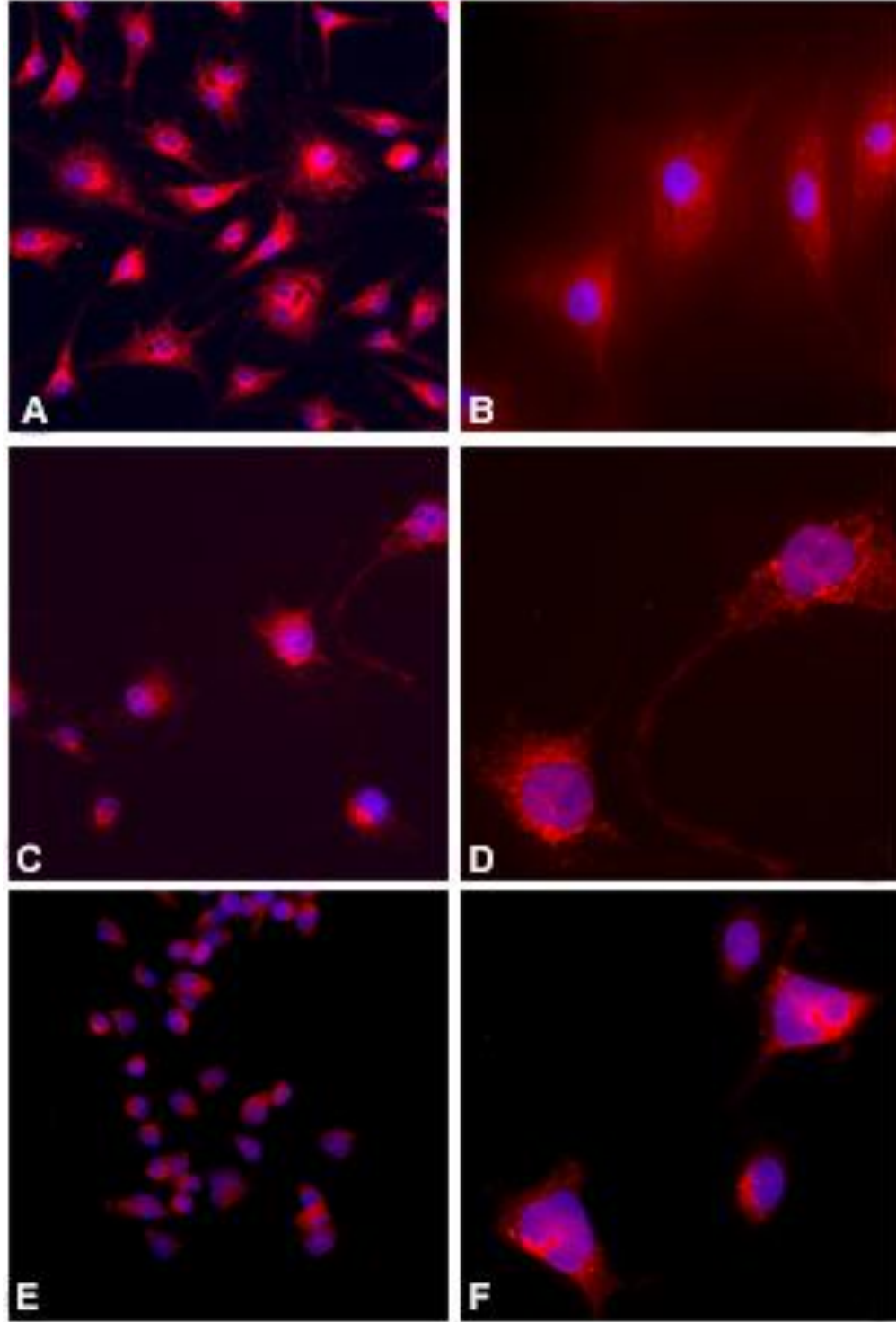
Postnatal 4 ve 7 günlük fare beyinlerinden alınan kesitlere uygulanan bu metotta, serebellum, hipokampus ve dentat girusda yoğun CCM3 immunoreaktivitesi belirlendi. CCM3'ün hüresel düzeyde dağılımı serebellum Purkinje hücrelerine benzer şekilde hipokampus piramidal hücreleri ve dentat girus granüler hücrelerinin somalarının yerleşik olduğu tabakalarda yoğunluk göstermekteydi (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1. P4 ve P7 fare beyinlerinde CCM3 immunoreaktivitesi. İmmünyüzdürme metod uygulanmış postnatal 4 günlük (P4) (A,C) ve postnatal 7 günlük (P7) (B, D) fare hipokampus (A,C) ve serebellumuna (B,D) ait CCM3 immunoreaktivitesi. A,C) Dentat girus (ok başı) granüler hücre tabakası, hipokampus (oklar) piramidal hücre tabakası B,D) Serebellum gangliosum tabakasında (oklar) CCM3 immunoreaktivitesi izlenmekte. A,B,C; 2.5x. D;5X

4.5. Hücre Kültürü ve İmmüno Floresan Boyanma

İn vitro kültür ortamlarında farklı hücre hatları kullanılarak CCM3 proteininin varlığı gösterildi. BAEC, N2A, Cos7 hücreleri uygun koşullarda kültüre edildikten sonra anti-CCM3 antikoruyla immüno floresan yöntemiyle boyandı (Şekil 4.5.1).

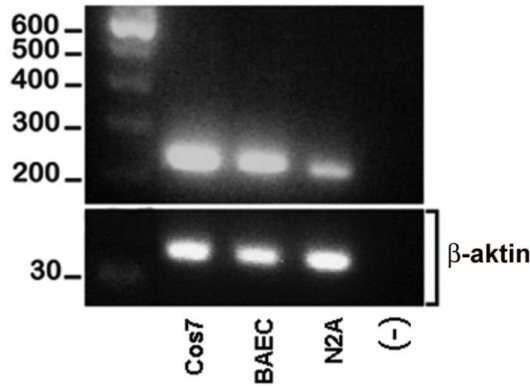


Şekil 4.5.1. Hücre hatlarında CCM3 immunoreaksiyonu. A,B) BAEC (Bovine aortic endothelial cells) hücrelerinde anti-CCM3 immunoreaktivitesi sitoplazmaya yayılmış bir şekilde

görülürken; C,D) N2A (Neuroblastoma cells) hücrelerinde ve E,F) Cos7 hücrelerinde perinükleer alanda sınırlı kalmıştır. A,C,E;20x, B, D,F;80x

4.6. RT-PCR Reaksiyonu Bulguları

Kullanılan in vitro kültür ortamlarından elde edilen mRNA'ların RT-PCR yöntemiyle cDNA'ya çevrilip çoğaltılması sonucunda ortamdaki Ccm3 düzeyi test edildi. Daha sonra da sonuçlar β -aktin primeri kullanılarak doğrulandı. Hücre hatlarındaki protein lokalizasyonuna ek olarak hücrelerde Ccm3'ün varlığı mRNA düzeyinde de belirlenmiş oldu. (Şekil 4.6.1).



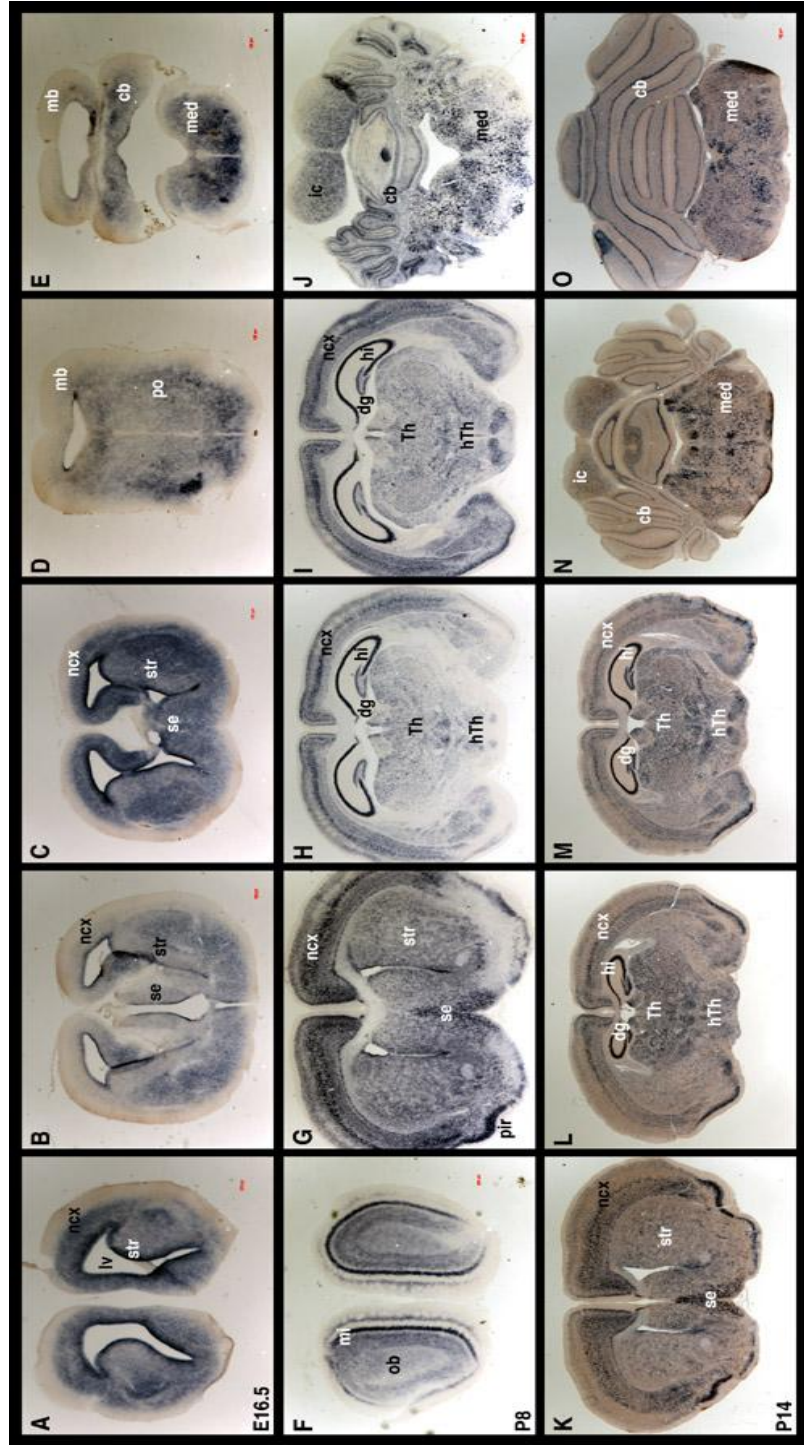
Şekil 4.6.1. Hücre hatlarından elde edilen PCR sonucu. BAEC, N2A ve Cos7 hücre hatlarından elde edilen mRNA'ların RT-PCR ile değerlendirilmesi. Hücrelerin eşit olduğunu göstermek için sonuçlar β -aktin ile doğrulandı.

4.7. İn situ Hibridizasyon

Hücre kültürlerinde mRNA'lar belirlendikten sonra, farelerde mRNA düzeyinde çalışmaların yapılması için; embriyonik ve postnatal döneme ait fare beyinlerine in situ hibridizasyon metodu uygulandı. PDCD10/Ccm3 geni mRNA düzeyinde slaytlarda işaretlendi. Total beyinden seri kesitler alındı ve her kesit üzerinde değerlendirmeler yapıldı. PDCD10/Ccm3 geninin gelişim periyodu içerisinde nerelerde bulunduğu belirlendi. Gelişim periyodu süresince ekspresyonun nasıl değiştiği de alınan seri kesitlerin aynı bölgelerinin incelenmesiyle gerçekleştirildi (Şekil 4.7.1).

Fetal günlerde özellikle de radyal glial hücrelerin geliştiği ventriküler zonda Ccm3 ekspresyonu dikkat çekiciydi. Bu durumda Ccm3'ün nörogenez sırasında önemli bir role sahip olabileceği fikrini ortaya çıkartmıştır. Ayrıca aynı dönemde ekspresyon, subventriküler, intermediyet ve gelişen korteksin altında (subplakta) yoğun olarak devam etmekteydi. Gelişmekte olan septum ve striatumda da Ccm3 ekspresyonu dikkat çekici düzeydeydi. Ccm3 düzeyi en az, gelişmekte olan orta beyinde görülürken, gelişim aşamasındaki pons, serebellum ve medullada yüksek düzeyde izlenmekteydi.

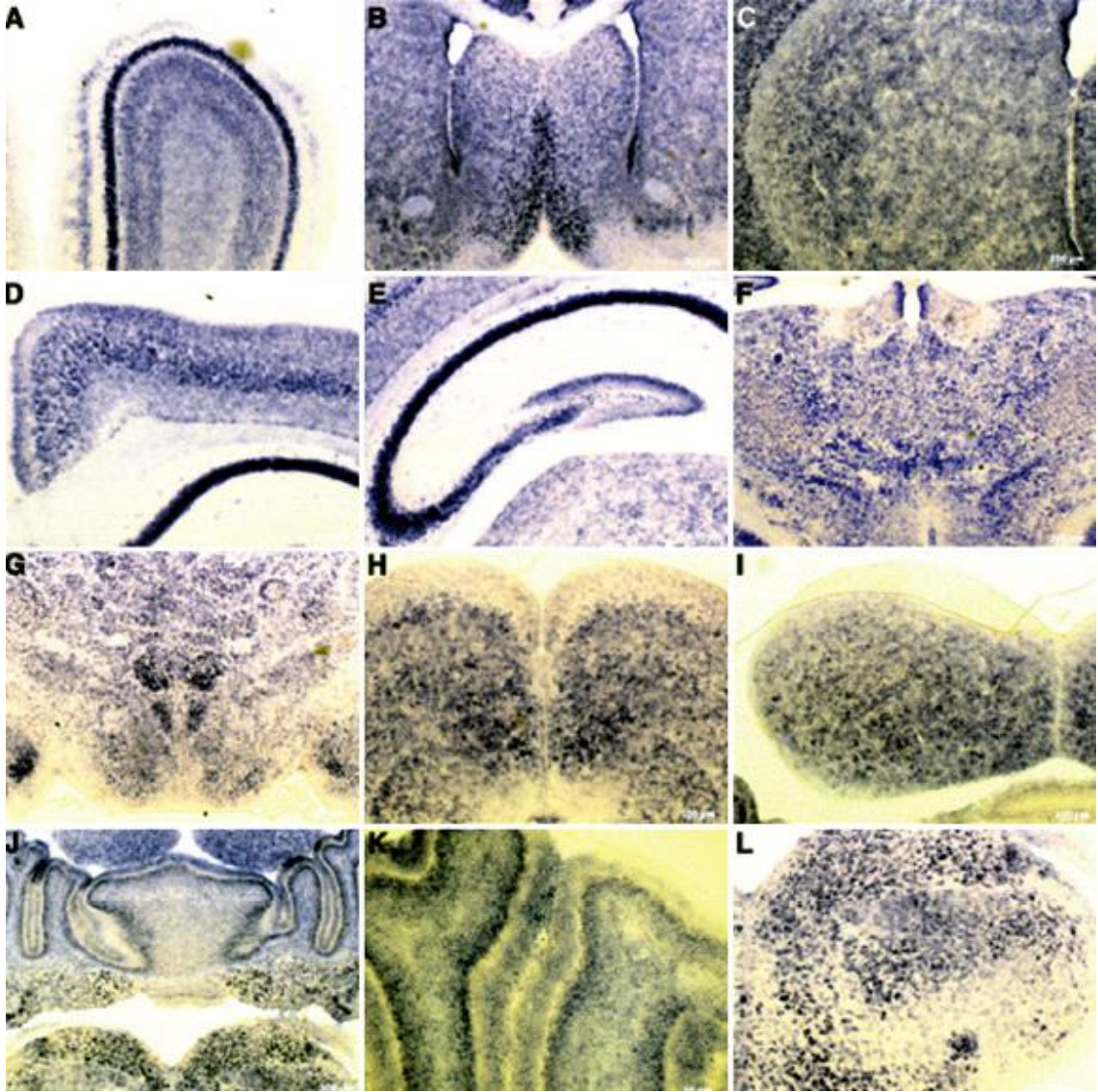
Postnatal günlerde Ccm3 ekspresyonu değerlendirildiğinde; koku soğanında, striatumda septal nukleuslarda ve neokortekste yoğun immunoreaktivite bulundu. Ayrıca hipokampus, dentat gyrus, talamik ve hipotalamik nukleuslarda ekspresyon dikkat çekici nitelikteydi. P8'de Ccm3 neokorteksin özellikle derin tabakalarında, koku soğanının mitral hücre tabakasında, striatum, septum ve priform kortekste oldukça yoğun olarak bulundu. Talamusda yoğun olarak gözlenirken, hipotalamusun altında, hipokampus ve dentat gyrusta daha düşük düzeyde bulundu. İ inferior kollikulus ve purkinje hücrelerinde dikkati çeken ekspresyona karşın serebellumun granül hücrelerinde ve medullanın derinlerinde daha düşük düzeyde rastlandı. P14'e gelindiğinde ise, neokorteks, striatum, septum, hipokampus, dentat gyrus, talamus, hipotalamus, inferior kollikulus ve serebellumun purkinje hücrelerinde ekspresyonun devam ettiği görüldü (Şekil 4.7.1).



Şekil 4.7.1.

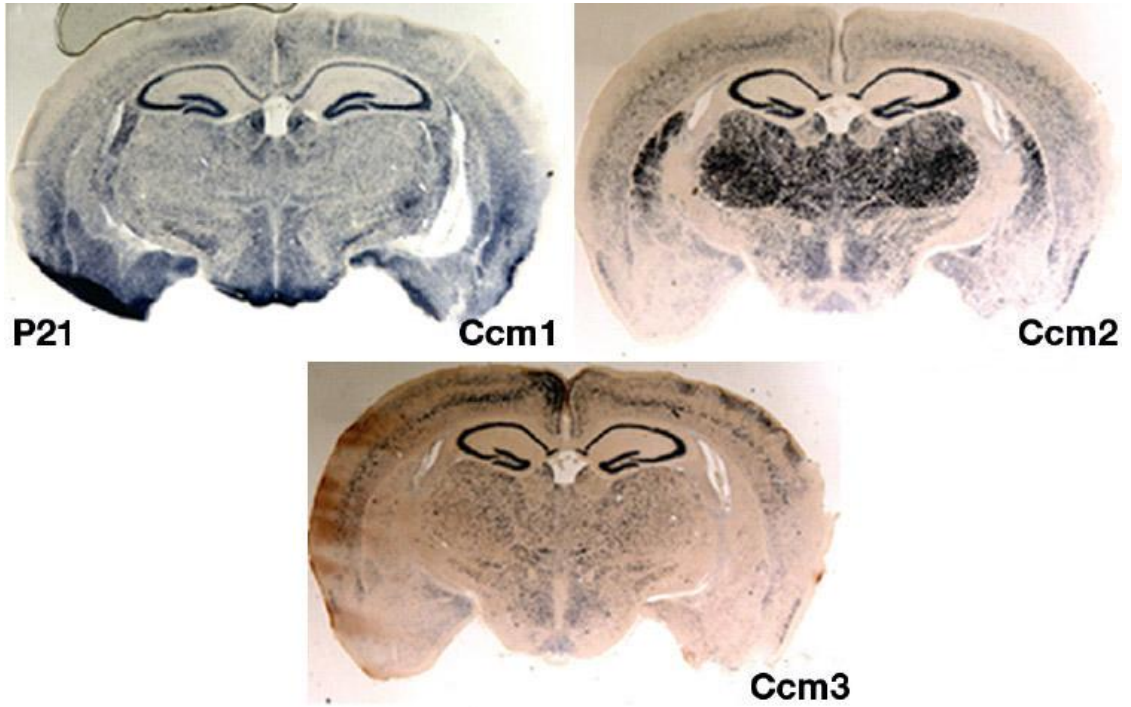
Ccm3geninin in situ hibridizasyon ile değerlendirilmesi. PDCD10/Ccm3 geninin fetal ve postnatal döneme ait fare beyinlerinde mRNA düzeyinde ekspresyonunun değerlendirilmesi. Anteriyordan posteriroya doğru alınan seri koronal kesitler üzerinde değerlendirmeler yapıldı. A-E: Fetal 16.5. günde, F-J: Postnatal 8. günde ve K-O: Postnatal 14. günde Ccm3 geninin ekspresyon alanlarını göstermektedir. (ncx;

neokorteks, str; striatum, se; septum, mb; orta beyin, po; pons, cb; serebellum, med; medulla, mi; mitral hücre tabakası, ob; koku soğanı, pir; piriform korteks, Th; talamus, hTh; hipotalamus, hi; hipokampus, dg; dentat giyru, ic; inferior kollikulus. Büyütmeler 2.5x



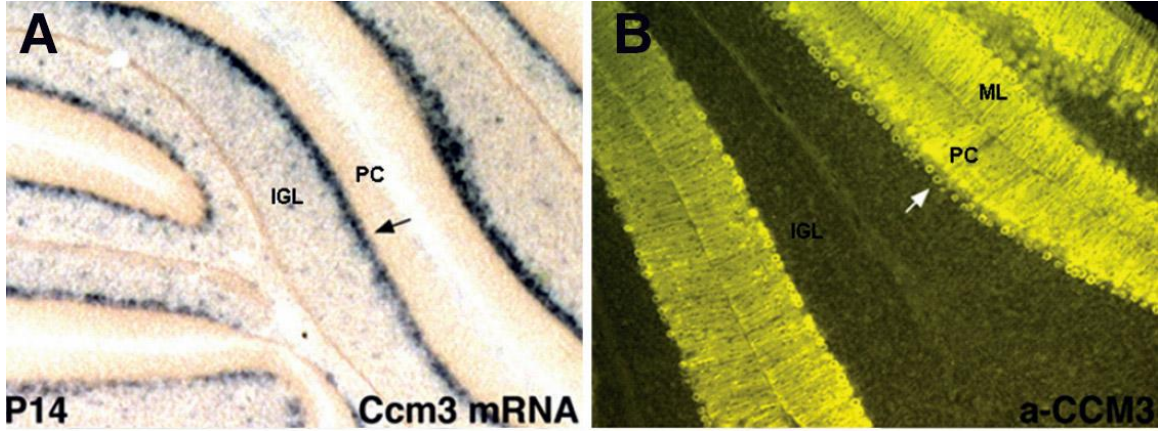
Şekil 4.7.2. Ccm3 geninin fare beyin dokusunda bazı alanlarda büyütülerek in situ hibridizasyon metoduyla gösterilmesi. Fare fetal ve postnatal dönemine ait beyinlerde PDCD10/Ccm3 geninin ekspre olduğu alanların daha büyük büyütmelerde detaylı olarak gösterilmesi. A) Koku soğanı B) Septum, C) Striatum, D) Neokorteks, E) Hipokampus ve dentat giyru, F) Talamus, G) Hipotalamus, H) Superior kollikulus, I) İnferior kollikulus, J) Serebellum ve derin serebellar nukleuslar, K) Serebellar korteks, L) Medulla oblangata

Serebral kaverno malformasyon oluşumuna sebep olan sadece PDCD10/Ccm3 geni olmadığından bilinen diğer 2 gen olan Ccm1 ve Ccm2'nin de mRNA dizeyleri değerlendirilmiştir. Daha once şeker ve arkadaşları tarafından yayınlanan Ccm1 ve Ccm2 mRNA dizeyleri ile Ccm3'ün mRNA dizeyi kıyaslandı. Buna gore mRNA'nın dağılımı Ccm genleri için hem benzerlikler hem de farklılıklar gostermekteydi. Her 3 gende de neokorteks ve dentat giyrusda ekspresyon yoğun olarak bulundu. Ayrıca bazı bölgelerdeki ekspresyonlar rtuşurken bazı bölgelerde de farklı reaksiyonlar sergiledikleri gözlendi (şekil 4.7.3).



şekil 4.7.3. P21 fare beyinlerinden alınan örneklerde seri kesitler uzerinde Ccm1, Ccm2 ve Ccm3 için mRNA dizeyelerinin değerlendirilmesi. Büyütmeler 2.5x.

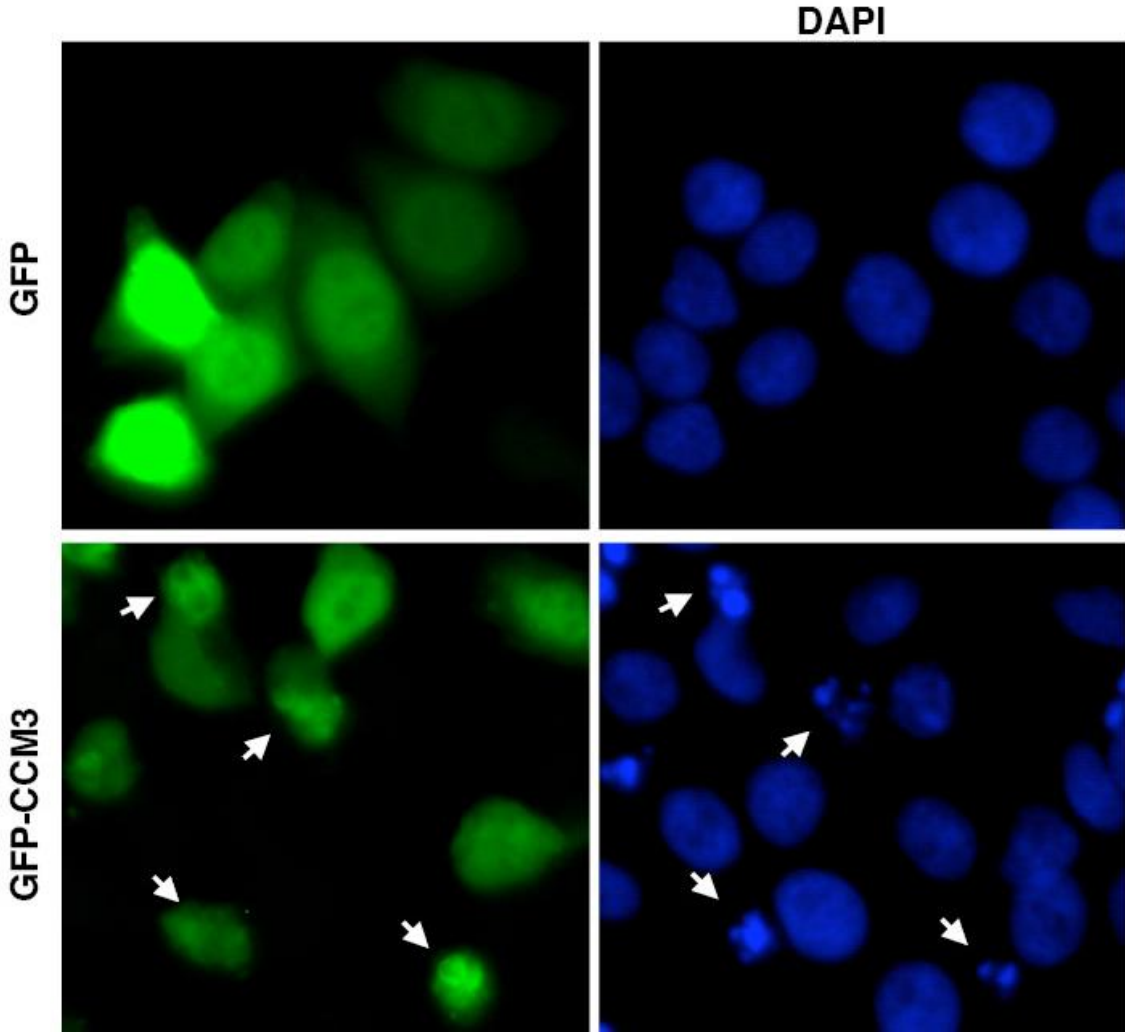
Fare beyinlerden alınan örneklerde PDCD10/Ccm3 için belirlenen mRNA dizeyleri CCM3 proteininin bulunduğu yerlerle kıyaslandı ve ekspresyon alanlarının çakıştığı gözlendi bunun için en iyi örnek serebellumun ganglion hücre tabakasındaki purkinje hücrelerinde gözlenen yoğun reaksiyon alanıydı. Bu nedenle de daha once immunofloresan metodu ile boyanan CCM3 proteininin bulunduğu alanlarla, in situ hibridizasyon sonucunda belirlenen mRNA dağılımı karşılaştırıldı (şekil 4.7.4).



Şekil 4.7.4. P14 fare beyinlerinde in situ hibridizasyon ve immunofloresan sonuçlarının kıyaslanması. P14 fare beyinlerine uygulanan in situ hibridizasyon ve immunofloresan boyama metodları sonucunda benzer bölgelerdeki ekspresyonlar görülüyor. A) Ccm3 in situ hibridizasyonu ile purkinje hücrelerindeki yoğun ekspresyon (ok) görülüyor (10x). B) Anti-CCM3 antikoruna kullanılarak yapılan immunofloresan boyama sonucunda purkinje hücrelerindeki ekspresyon görülüyor (ok, 10x). IGL; iç granüler tabaka, PC; Purkinje hücre tabakası, ML; moleküler tabaka.

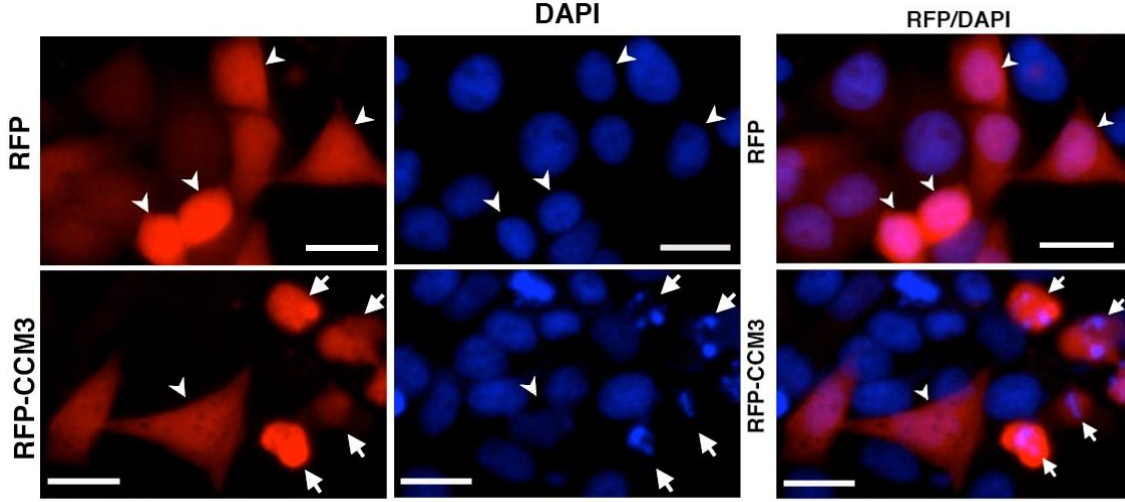
4.8. Klonlama Bulguları

İn vitro koşullarda BAEC, N2A ve Cos7 hücre hatlarına içerisinde PDCD10/Ccm3 geni yerleştirilmiş pcDNA-DEST53 vektörünün lipofektamin aracılı transfeksiyon metoduyla girmesi sağlandı. Transfeksiyon için, önceden klonlanan plazmidin içerisinde GFP (yeşil floresan protein) proteini PDCD10/Ccm3 geninin önünde yer almaktaydı. Dolayısıyla, plazmid hücre içerisine girip transfeksiyon için işlemleri başlatmadan önce GFP ışması ortaya çıkacaktı. Yaklaşık 4 saat içerisinde ortaya çıkan bu ışma sonrasında hücre hatları sık sık kontrol edilerek genimizin aktivasyonu için doğru zaman aralığı belirlendi. Programlı olarak hücre ölümüne sebep olduğu düşünülen PDCD10/Ccm3 geni ölüm emrini verdiği andan itibaren hücreler DAPI ile işaretlenerek görüntülendi (Şekil 4.8.1).



Şekil 4.8.1. Klonlama sonrasında hücrelerin durumu. İlk panel kontrol vektörü olan pcDNA-N3'ü içeren HeLa hücreleridir ve transfeksiyon sonrasında GFP ışması ve DAPI boyanması görülüyor. Alttaki panel ise, pcDNA-DEST53-hCcm3 plazmidini içeren HeLa hücreleridir. Transfeksiyon sonrasında yapılan DAPI boyanmasında GFP içeren hücrelerin bir kısmının nükleer parçalanmaya girdikleri görülüyor (oklar). (80x)

Plazmidimizi kontrol etmek ve deneyi de doğrulamak amacıyla 2. kez dizayn edilmiş RFP içeren vektörle aynı işlemler tekrarlandı. HeLa hücrelerine transfekte edildikten sonra DAPI ile boyanarak apoptotik etkinin varlığı belirlendi (Şekil 4.8.2).

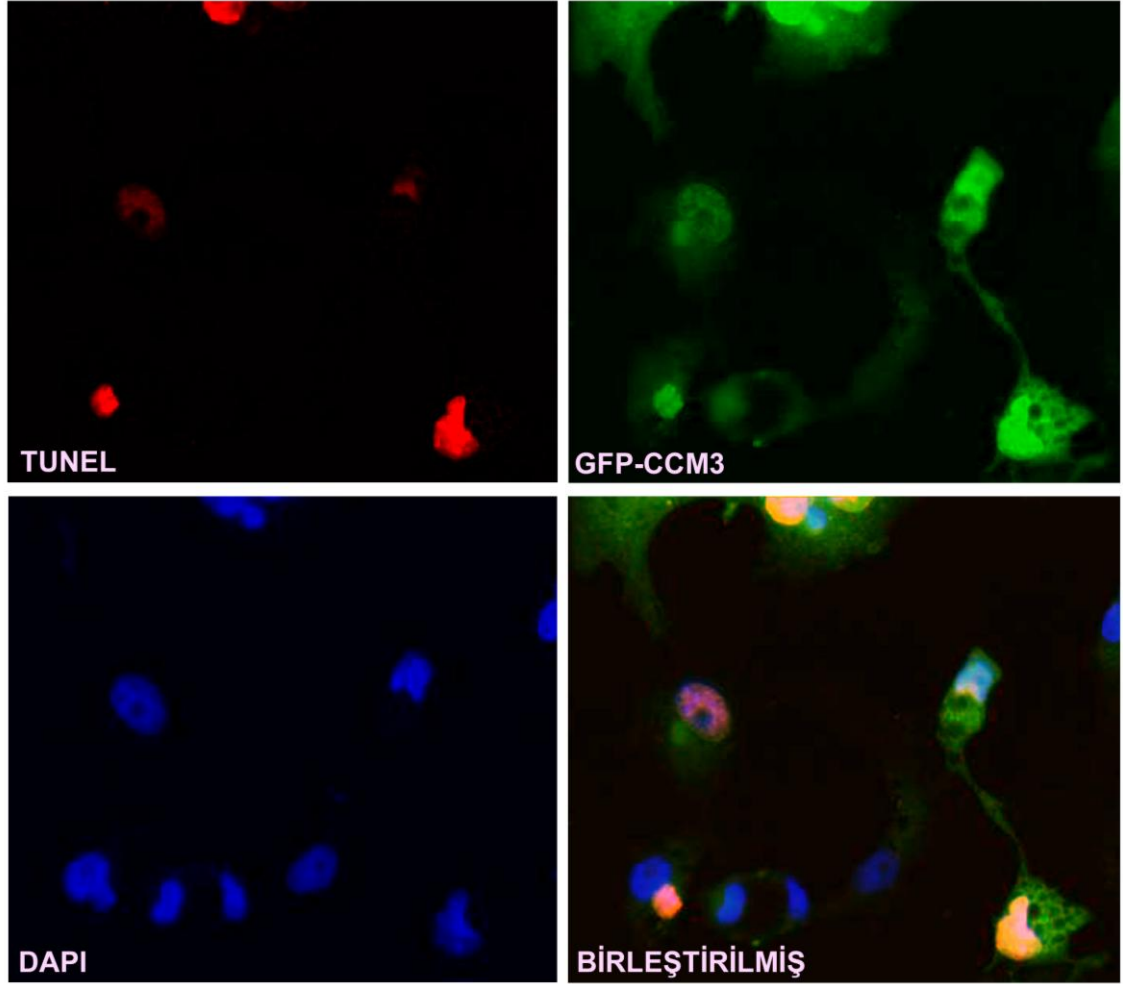


Şekil 4.8.2: Ccm3 geninin RFP vektörüne klonlanması. Üst panel RFP (kırmızı floresan protein) içeren kontrol vektörünün, alt panel ise Ccm3 içeren plazmidin HeLa hücrelerine transfeksiyonu sonrasında DAPI ile boyanma ve bunların birleştirilmiş halidir. Oklar apoptotik hücreleri işaret etmekte ve skala 20 mikronu göstermektedir.

4.9. TUNEL Bulguları

Değişik hücre hatlarını kullanarak transfekte edilen PDCD10/Ccm3 içeren plazmid hücre içerisine girip apoptotik fonksiyonu yerine getirebilmesi için gerekli zaman geçtikten sonra TUNEL metodu ile boyama yapıldı. TUNEL, nükleus içerisindeki DNA kırıklarını gösteren bir boyanma metodu olduğundan hücrenin apoptoza girdiğini açıkça ifade etmektedir (Şekil 4.9.1).

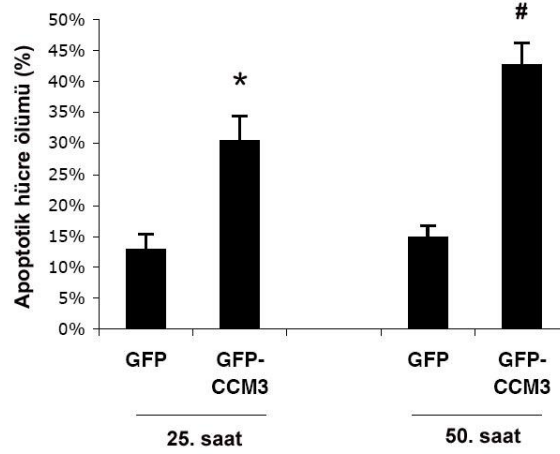
pcDNA-DEST53-hCcm3 plazmidini Cos7 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası 50. saatte hücreler fikse edilip TUNEL reaksiyonuna tabi tutuldu. Kültür tabağındaki birçok hücrenin apoptotik yola girdiği yapılan TUNEL reaksiyonu sonucunda (kırmızı floresan ile) belirlendi. Hücre nükleuslarını göstermek için de DAPI boyanması yapıldı. Floresan mikroskopu altında incelenen hücreler farklı filtreler kullanılarak görüntülendi (Şekil 4.9.1).



Şekil 4.9.1. Ccm3 geninin klonlama sonrasında TUNEL reaksiyonu. İlk panel pcDNA-DEST53-hCcm3 plazmidi tranfekte edildikten sonra yapılan TUNEL boyanması sonucunda apoptotik hücreleri göstermektedir. İkinci panel (GFP-CCM3); transfeksiyonun gerçekleştiğini göstermek için konuldu. DAPI; nukleusları göstermek amacıyla konuldu. Son panelde de tüm görüntüler birbiri üzerine çakıştırılarak elde edildi. (60x)

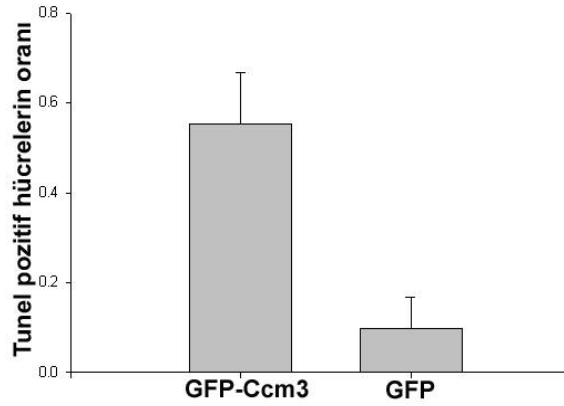
4.10. İstatistiksel Analiz

TUNEL uygulamasının ardından hücrelerdeki apoptotik indeksi hesaplayabilmek ve istatistiksel olarak bir anlam olup olmadığını belirleyebilmek için TUNEL pozitif hücreler sayıldı. Ccm3 transfekte edilen kültürlerde TUNEL pozitif hücre oranının kontrol vektörünün transfekte edildiği hücelere oranla artmış olduğu görüldü (Şekil 4.10.1 ve 4.10.2). Bu artış istatistiksel olarak 50. saatin sonunda hem Cos7 hemde HeLa hücrelerinde $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı bulundu.



Şekil 4.10.1. HeLa hücrelerine transfeksiyon sonrası apoptotik hücre ölüm oranı. HeLa hücrelerine yapılan transfeksiyon sonrasında kontrol ve Ccm3 içeren vektörlerin 25 ve 50. saatte hücre sayısı üzerinde yaptıkları değişimi göstermektedir. *GFP-CCM3 içeren plazmidde $p < 0.002$ anlamlılık oranındayken, 50. saatin sonunda aynı plazmidde $p < 0.001$ anlamlılık oranına sahip olduğu Student t-testi ile gösterildi.

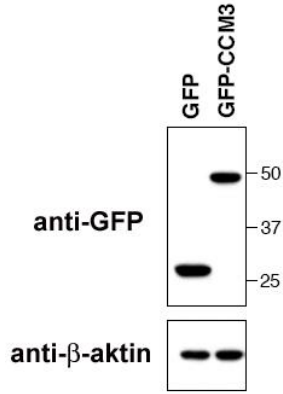
Aynı basamaklar HeLa hücrelerinden sonra Cos7 hücreleri için de yapıldı ve sonuçlar benzer bulundu (Şekil 4.10.2). Böylece farklı hücre hatlarında da aynı etkinin görüldüğü kolaylıkla söylenebilir.



Şekil 4.10.2. Cos7 hücrelerine transfeksiyon sonrası apoptotik hücre ölüm oranı. Cos7 hücre hattına yapılan transfeksiyon sonrası, 50. saatteki farklılık Student t-testi $p < 0.001$ düzeyinde anlamlı bulundu.

pcDNA-DEST53-hCcm3 plazmidini ile kontrol olarak kullanılan pcDNA-N2 plazmidini hücrelere transfekte edildikten 25 saat sonra, protein elde edildi. Bu protein örneğine anti-GFP antikoru kullanılarak Western blot analizi yapıldı. Bunun sonucunda transfeksiyonun başarıyla yapılmış olduğu elde edilen doğru bantlar sayesinde teyid

edildi. GFP proteini 27 kDa ağırlığında bir proteindir ve CCM3 ise 25kDa ağırlığındadır. Vektöre transfekte edilen CCM3'ün de 52 kDa'da bant vermesi beklendi. Sonrasında membran soyulup üzerine β -aktin antikoru uygulandı ve eşit oranda protein yüklendiği belirlendi (Şekil 4.10.3). Bu bulgular transfeksiyonun başarı ile yapıldığının bir göstergesi olarak kabul edildi.

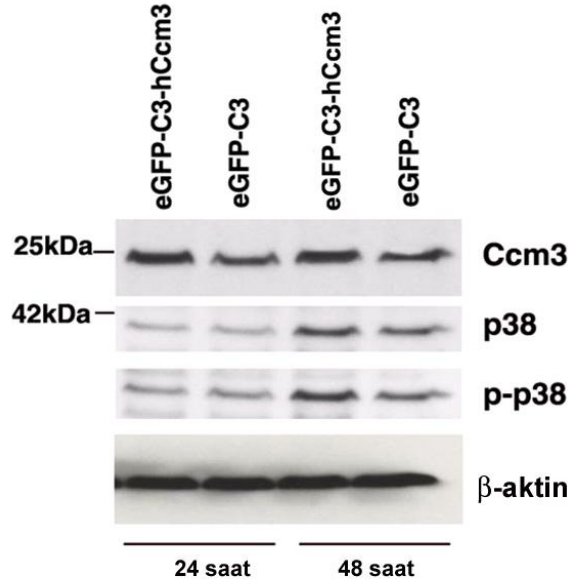


Şekil 4.10.3. Transfeksiyonun başarısının kontrol edilmesi. Transfeksiyon sonrasında Western blot analizi yapılarak 27kDa GFP, 25 kDa'da CCM3'ün ağırlığı jelde belirlendi

4.11. Western Blot Analizi

Hücre hatlarına eGFP-C3-hCcm3 plazmidini ve bunun kontrolü olan eGFP-C3 vektörü transfekte edildikten 24 ve 48 saat sonra CCM3, p38 ve p-p38 varlığı için Western blot analizleri yapıldı. Bunun sonucunda Ccm3 içeren plazmidin olduğu hücrelerden elde edilen proteinlerde kontrollere nazaran hem CCM3, p38 hem de p-p38 bandı yoğun çıktı. BHK (baby hamster kidney) hücreleri üzerinde yapılan bu çalışmada p38'in CCM3 ile benzer yolda üzerinde çalıştığına dair bulgular elde edildi. p-p38 ile bu yolağın aktive olduğu da söylenebilmekteydi. Aynı zamanda p38'in de CCM3 ile birlikte aynı apoptotik yolda görev alabileceği gözlenmekteydi. 24 saatlik transfeksiyon sonunda bu bulguların daha az ayırıldığı, 48. saatin sonunda ise daha belirgin olduğu dikkati çekmekteydi. Dolayısıyla Ccm3 geni aktive olduktan sonra ölüm emrini vermiş olabileceği yorumunu yapabiliriz.

Sonuçları kontrol etmek amacıyla β -aktin antikoru ile eşit sayıda hücre kullanıp kullanılmadığı teyid edildi. Bantlar eşit yoğunlukta bulundu (Şekil 4.11.1).

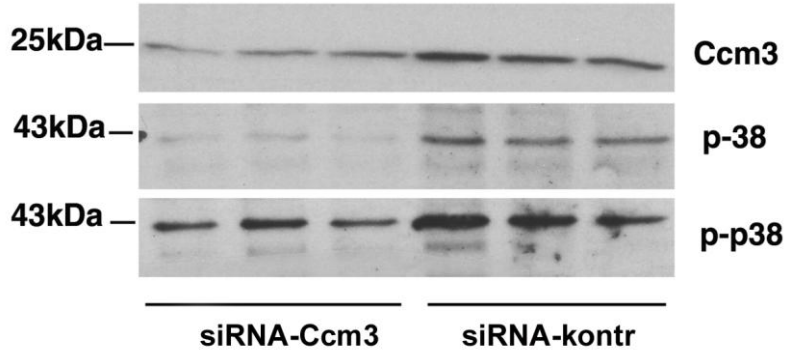


Şekil 4.11.1. Transfeksiyon sonrası Western blot analizi. BHK hücrelerine eGFP-C3-hCcm3 plazmidi ve bunun kontrolü olan eGFP-C3 vektörünün transfeksiyonu sonrasında elde edilen proteinlere Western blot analizi sonucunda CCM3, p38 ve p-p38 ekspresyonlarının değerlendirilmesi.

4.12. siRNA Tekniği

Değişik hücre hatlarında in vitro PDCD10/Ccm3 ekspresyonunun baskılanması için siRNA oligonükleotidleri kullanıldı. Bu baskılanma ile genin etkisi azaldığında p38 ve p-p38 düzeylerinin nasıl olacağı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Transfeksiyon sonrasında hücreler tripsinize edilip, elde edilen proteinler kullanılarak Western blot analizi yapıldı. Bunun için anti-CCM3 antikorunu kullanılarak genin susturulup susturulmadığı kontrol edildi.

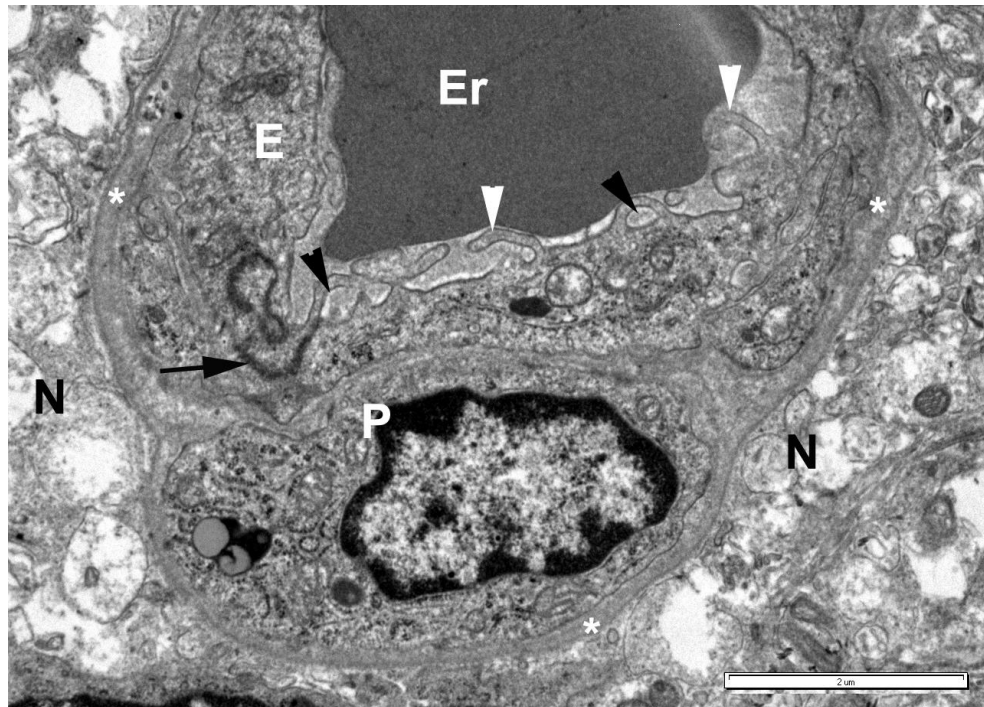
Kontrol oligonükleotidlerinde CCM3 için bantlar normal kalınlıktayken, siRNA ile gen susturulunca bantların kalınlıklarının azaldığı gözlemlendi. Anti-CCM3 antikoruna ek olarak apoptotik yolda yer alan p38 ve p-p38 antikorları da kullanıldığında sonuçların CCM3 ile benzer olduğu görüldü (Şekil 4.12.1). Bu sonuçlardan yola çıkarak Ccm3 genini susturduğumuzda, bununla birlikte p38 ve p-p38'in de benzer şekilde sustuğu, normallere kıyasla ekspresyonun azaldığı görüldü.



Şekil 4.12.1. BHK hücrelerinin siRNA oligonükleotidleri yardımıyla Ccm3 geninin susturulması.

4.13. Elektron Mikroskopik Değerlendirme

Normal beyin dokusundan takip edilen örneklerde, damar yapıları incelendiğinde, bazal laminanın ve perisitlerin düzgün olduğu, endotel ve perisitler arasındaki sınırların net olarak ayırdedilebildiği görüldü. Perivasküler alan düzenli bir yapı sergilemekteydi. Lümene uzanan endotel hücrelerinde pinositotik veziküller gözlenmekteydi ve bunlar kaotik bir yapı sergilemiyorlardı. Endotel hücrelerinin sitoplazmalarında herhangi bir interdijitasyon görülüyordu ve hücreler arasındaki bağlantı kompleksleri de normal görünümündü (Şekil 4.13.1).

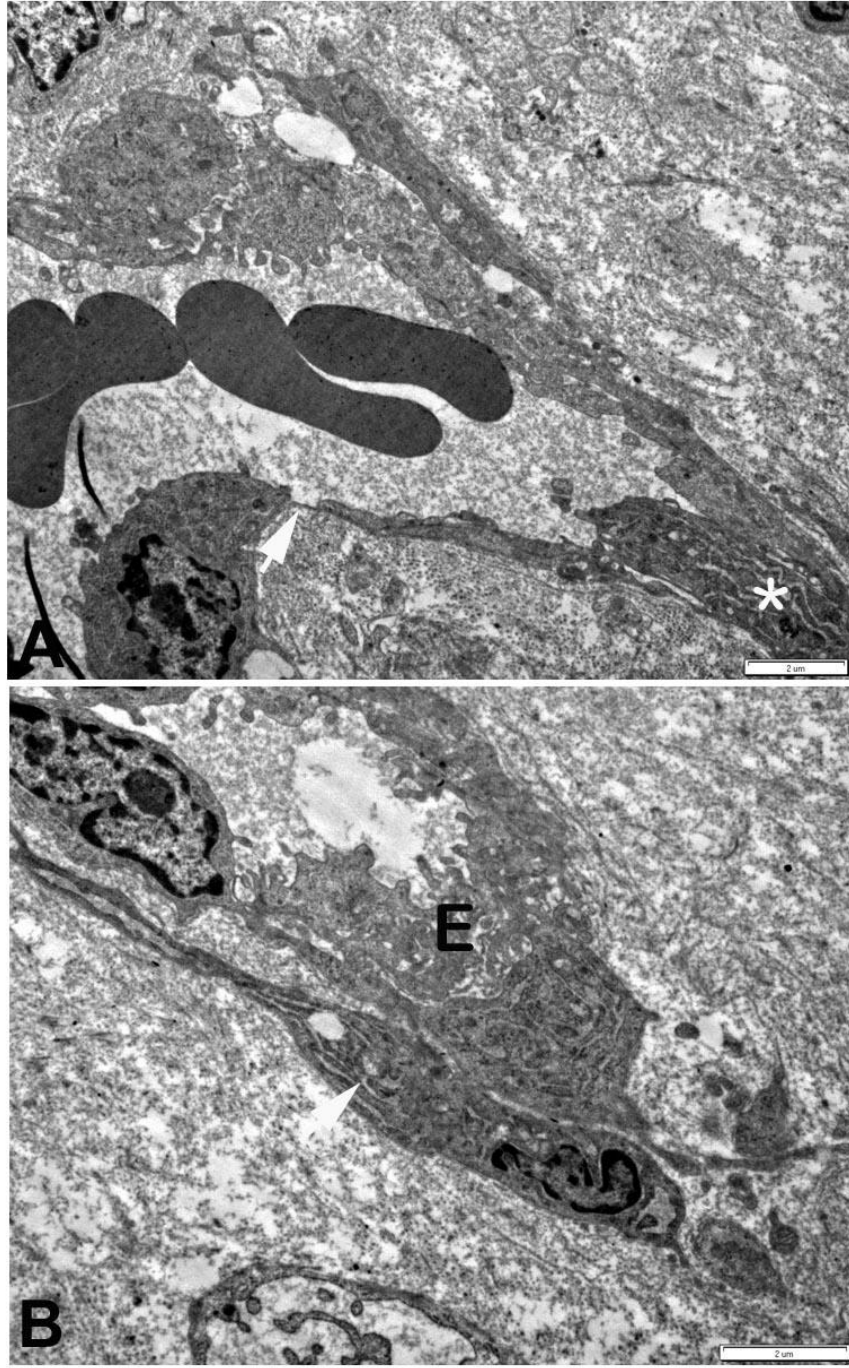


Şekil 4.13.1 Normal yapıda beyin damarı elektronmikrografı. Ortak bazal laminayla (*) çevrili damar endoteli (E), perisit (P) ve damarı çevreleyen nöropil (N) izleniyor. Oldukça büyük hücreler arası sıkı bağlantı (ok) gösteren endotel, pinositik aktivite için damar lümenine sitoplazmik uzantılar (beyaz ok başı) uzatarak hücre içine lümen içeriğini alan pinositotik veziküller (siyah ok başları) ve lümeninde bir eritrosit (Er) izlenmekte.

Serebral kavernoza malformasyonlu hastalardan çıkartılan oluşumun elektron mikroskopik değerlendirmesinde normal damar yapısından farklı bazı özellikleri sergiledikleri gözlemlendi. Hem endotel içerisinde hem de perisitte endoplazmik retikulum sarnıçlarının anormal derecede uzadığı ve genişlediği gözlemlendi. Ayrıca endotelin nükleus lokalizasyonu dışındaki sitoplazmik alanların yoğun interdiyitasyonlar taşıdığı görüldü. Buna ek olarak, lümeneye doğru yoğun bir şekilde, düzensiz protoplazmik uzantıların uzandığı görülmekteydi. Bu görünüm bazı alanlarda endotel için kaotik görünüm oluşturmuştu. Endotel heterokromatik ve çok belirgin bir nükleusa sahipti. Bazal lamina ise, çoğu yerde bulunmamakla birlikte bulunduğu yerlerde de düzensizlik ve kesintiler göstermekteydi.

Perisit yapısı incelendiğinde, endotel hücrelerinde olduğu gibi intrastoplazmik aralıkların varlığı görülmekteydi. Bunların organizasyonu ise daha çok hücrenin uzun eksenine ve birbirine paralel seyretmekteydi (Şekil 4.13.2,B). Bazı alanlarda da bu aralıklar içerisine uzanan protoplazmik uzantılar görüldü.

Bağlantı kompleksleri incelendiğinde ise, sağlam gözükmesine rağmen belirli alanlarda çok ince membranöz aralıklar oluşturdukları ve bu alanlardan direk lümen ile perivasküler dokuya komşu oldukları gözlemlendi (Şekil 4.13.2,A ok).



Şekil 4.13.2: CCM oluşumunun elektron mikroskopik görüntüsü. A) Serebral kavernoza malformasyonlu lezyon alanlarında endotel yapısında izlenen kaotik interdijitasyonlar (*) ve sitoplazmasını kaybetmiş zar bariyeri (ok) izlenmektedir. B) Fenotipik değişiklik sergileyen perisit (ok) ve yoğun intrasitoplazmik dijitasyon gösteren endotel (E) değişiklikleri görülmektedir. Skala; 2µm.

TARTIŞMA

Serebral kavernoza malformasyon, merkezi sinir sistemini kanlandıran kan damarlarının yapılarının değişip anormal bir karakter kazanması sonucunda ortaya çıkan vasküler bir hastalıktır (82). Kavernomaların toplumda görölme sıklığı çok yüksek olmamasına rağmen Amerikalılar arasında İspanyol kökenli olanlarda daha yoğun olarak ortaya çıkması, bunun kalıtsal kökenli bir hastalık olduğunu göstermektedir (110, 142). Kalıtsal kökenli olan lezyonların yanı sıra sporadik olgulara da sıklıkla rastlanılmaktadır (143).

Kavernomaların çok dinamik lezyonlar olduğu yapılan MRI çalışmalarında açıkça gösterilmiştir. Bu lezyonlar zaman zaman hastalarda çok ağır seyreden semptomlara sebep olabilmektedir. Bu nedenle de lezyonun cerrahi müdahale ile çıkartılması hastalığın seyri ve yaratacağı olumsuz koşullar açısından oldukça önemlidir (112).

Son yıllarda yapılan bağlantı analizi (linkaj) çalışmaları ve mutasyon analizleri doğrultusunda, kavernomaya sebep olan 3 lokus belirlenmiş ve her biri için bir gen tanımlanmıştır. Kısaca CCM1, CCM2 ve CCM3 diye adlandırılan bu 3 gen üzerinde çalışmalar son yıllarda yoğunlaştırılmıştır. İlk olarak klonlanan Ccm1 geni olup, bu gendeki mutasyonun kavernomaya sebep olduğu açıkça gösterilmiştir (144-147). Daha sonra Ccm1 genini takiben Ccm2 geni aydınlatılmış ve birçok çalışmada bu iki genin birlikte işlev görebileceği söylenmiştir (106). Bu iki genin birlikte işlev gördüğü ve kavernomaya sebep olduğu söylenince, buradaki moleküler mekanizmaların neler olduğu dikkati çekmiştir. Günümüzde de bu mekanizmanın çözülebilmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu sorun aydınlatılmaya çalışılırken biz de bir başka gen, PDCD10 üzerinde çalışmaya karar verdik. Bu gen de diğer iki gen gibi işlev görebilir ve belki onlarla birlikte aynı yolakta yer alabilir veya birçok mekanizmanın başlamasına sebep olabilir. Tüm bu düşüncelerden yola çıkarak, PDCD10 yani Ccm3 geni insan serebral kavernoza malformasyonlarının patogeneğinde nasıl bir rol oynar sorusuna ışık tutmaya çalıştık.

Bu amaç için CCM3 proteininin insanda hücresel düzeydeki lokalizasyonu ve ekspresyon profilini belirledik. Bu açıdan bulgularımız CCM3 proteininin insan dokusundaki lokalizasyonunu hücresel düzeyde ortaya koyan ilk çalışmadır.

CCM3'ün serebral ve ekstra-serebral insan dokularında hücresel düzeydeki dağılımı immunohistokimyasal yöntemler kullanılarak belirlendi. Serebral dokulardaki ekspresyonuna ilaveten ekstra-serebral dokularda da özellikle arteriyel ve kapiller

endotelde yoğun olarak bulunurken, venöz endotelde ekspresyonuna rastlanılmadı. CCM3'ün bu immun dağılımı CCM1 ve CCM2'nin immun dağılımı ile benzer özelliktedir (97). Ayrıca, arteriyel fenotipte yoğun olarak gözlenen bu immun dağılımı, CCM3'ün arterlerde vasküler kimliğin gelişmesinde rolü olabileceğini de düşündürmektedir. Serebral dokularda piramidal, glial ve Purkinje hücrelerinin sitoplazmalarında gözlenen yoğun immunolokalizasyon; daha önce CCM1 ve CCM2 ile ilgili yapılan çalışmalarda (70, 97, 103, 148-151) gibi CCM3'ün de beyin parankiması ve endoteli arasındaki çapraz etkileşimde rol aldığını düşündürmektedir. Bu durum beyinde sinir hücrelerinin fonksiyonel yaşamının vasküler endotelin etki alanında olduğunun göstergesidir. Kısaca, CCM3'ün mutasyonla bir şekilde fonksiyonunun bozulması durumunda nörovasküler ünite düzeyinde önemli sorunların ortaya çıkacağı ve bu sorunların sinir hücresi fonksiyonları veya sağlığı için son derece önemli problemler yaratabileceği öngörülmektedir.

CCM3'ün vasküler sistemdeki ekspresyonu, beyin gelişimi ve arteriyovenöz kimliğin ortaya çıkma sürecindeki durumu konusunda merak uyandırmaktadır. Güzeloğlu-Kayışlı ve arkadaşlarının CCM1 için söylediği gibi (149); CCM3'ün de anjiyogenez ve vaskülogenez basamaklarında rol oynayabileceğini düşündük. Bunun test edilmesi için bu konuda en iyi model olan insan plasentasını kullandık. Bulgularımızda plasental gelişim sırasında ve termde CCM3'ün anjiyogenik hücre kordonlarında ve Hofbauer hücrelerinde görülmesi (yayınlanmamış bulgular), parakrin bir etkiye sahip olduğunu ve damar oluşumunda etkin bir rol oynayabileceğinin güçlü kanıtları olarak değerlendirebiliriz.

Kleaveland ve arkadaşlarının zebrafish üzerinde yaptıkları çalışmalarda kardiyovasküler sistemin gelişiminde CCM proteinlerinin endotelial hücre-hücre ilişkilerini düzenlediklerini söylemişlerdir. Hücre dışı matriks, hücre-hücre adezyonu vb. birçok durum için damar endotelindeki CCM ekspresyonunun oldukça önemli olduğu düşünülmektedir. Kardiyovasküler sistem gelişimini düzenlemeleri ve endotelial hücrelerin ilişkilerini kontrol etmeleri, CCM proteinlerinin beyin dışında da vasküler sistem gelişimindeki öneminin bir göstergesidir. Bu sistem içerisinde oluşan bozulmalar, CCM patogenezinin ortaya çıkmasını tetikleyebilmekte ve çoğu kez bu durum ölüme sebep olmaktadır (152).

Serebral kavernoza malformasyonlara beyin dışında birçok organda da rastlanılmaktadır (153-157). Serebral dokular dışında ekstra-serebral dokularda da CCM3 ekspresyonunun görülmesi, bazı paradoksların doğmasına sebep olmuştur. Çünkü CCM3 ekspresyonunun dağılımına bakılınca lezyonların sıklıkla beyinde ortaya çıktığı görülmektedir ancak, diğer organlarda da çeşitli problemler ortaya çıkarabileceği özellikle de vasküler sistemde ciddi sorunlara neden olabileceği son yıllarda değişik alanlarda yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır (152). Bu çerçevede testis üzerinde yaptığımız çalışmalarda, normal ve varikosel modeli oluşturulmuş sıçanlarda CCM3 immun ekspresyonunda değişimler olduğunu ve bu değişimlerin de hastalığın

gelişmesinde rol oynayabileceğini gösterdik (yayınlanmamış bulgu). Beyinde önemli bir vasküler hastalığa sebep olan CCM3 geninin aynı zamanda testisin önemli bir vasküler hastalığı olan varikoselde de etkin olabileceğinin gösterilmesi, CCM3'ün vasküler sistemde etkin bir protein olduğunun kanıtıdır. Ayrıca bu proteinin beyin dışında başka bir organda ve vasküler sistemle ilişkilendirilmiş bir patogeneizde gösterilmesi CCM3'ün sağlıklı vasküler gelişimin aydınlatılmasında oldukça önemli olduğunu göstermektedir.

Ekstra-serebral dokularda vasküler sisteme ek olarak bunun dışında farklı bölgelerde de immunolokalizasyonunun olması, bu proteinin bilinmeyen başka fonksiyonlarının da olabileceği fikrini destekler niteliktedir. Yaptığımız testis çalışmasında spermatogenik seride ekspre olması, ancak olgun spermde gözlenememesi CCM3'ün spermatogenez yada mayotik basamaklarda rol oynayabileceğinin bir kanıtıdır. Bu bulgu, fertilitate problemlerine yanıt bulunmasında farklı bir pencerenin açılımı olarak değerlendirilebilir.

İnsan ve fare dokularında yapılan immunohistokimyasal ve immunofloresan boyanmalar CCM3'ün ekspresyon tablosunu açıkça ortaya çıkartmıştır. Bu sonuçlar da yapılan in situ hibridizasyon çalışmalarıyla desteklenmiştir. Bu ekspresyon modeli sonucunda ortaya çıkan tabloyu doğrulamak için, birçok hücre hattı kullanılarak da CCM3'ün ekspresyonu değerlendirildi. CCM3'ün hücresel düzeydeki lokalizasyonu, daha önce gösterilen CCM1'in sitoplazma ve perinükleer alandaki lokalizasyonu ile benzer bulundu (103). Ayrıca Ma ve arkadaşlarının hücre hatlarında CCM3 ile yaptıkları immunofloresan boyanmalarda ekspresyon alanları bizim bulgularımızla da benzerlik göstermekteydi (158). Bu ekspresyon çalışmalarına hücre kültürlerinden elde edilen mRNA'ların değerlendirilmesi de eklenince CCM3'ün hücre sitoskeletonunun yeniden şekillenmesinde fonksiyonel açıdan katkıda bulunabileceği fikri ortaya çıktı. Ayrıca, proteinin lokalizasyonunun değerlendirilmesi ileride yapılacak olan çalışmalara da ışık tutacaktır.

CCM3'ün farelerdeki immunohistokimyasal analizlerine ek olarak yaptığımız in situ çalışmalarında da genin ekspresyon alanlarını aydınlattık. Şeker ve arkadaşlarının Ccm1 ve Ccm2 için yapmış oldukları in situ hibridizasyon çalışmaları ile benzerlikler gösteren Ccm3 in situ hibridizasyon sonuçları, bu üç genin birlikte işlev görebileceği fikrini destekler niteliktedir (97). CCM'lerde bu üç genin de varlığı, lezyonların oluşumunda hangisinin olayı tetiklediği ve lezyon oluşumunu başlattığı sorusunu akla getirmektedir. Dolayısıyla bugün hala tartışmalı olan bu konu ile ilgili olarak en yaygın görüş Ccm1 ve Ccm2 genlerinin birlikte işlev görebileceği, aynı yolak üzerinden çalışabileceği fikridir (96). Bu üç genin birbirleriyle olan müşterek ilişkilerinde (159), CCM2'nin bağlayıcı bir protein olduğu; CCM3 ile CCM1 arasında bir köprü vazifesi gördüğü görüşü daha hakimdir. Stahl ve arkadaşlarının yaptığı çalışma, Hilder ve arkadaşlarının yaptığı çalışmayı desteklerken (160) hücrelerde bu kompleksin varlığı her üç proteinin işbirliği içerisinde olduğunun bir göstergesi kabul edilebilir (161).

Şeker ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada CCM1 ve CCM2'nin mRNA düzeyinde dağılımları karşılaştırıldığında, hem uzaysal (spatiyal) hem de zamansal (temporal) olarak benzer işlevsel özellikleri paylaştıkları fikri ortaya atıldı (97). Bu nedenle de, yolağın herhangi bir şekilde bozulması durumunda, bu üç genin birbirleri ile olan ilişkisi de aksayacak ve belki de hastalık farklı etkilerle ortaya çıkacaktır. Hastalığın genetik boyutu henüz tam olarak aydınlatılamadığı için bu tarz değerlendirmeler henüz spekülasyon niteliğindedir (106, 162, 163, 164). Bu görüşten yola çıkarak serebral kavernoza malformasyonlu hastalarda, hastalığın hangi gen tarafından yapıldığının söylenmesi oldukça zordur. Çünkü üç genin de işlevsel olarak birbirini etkilemesi hastalık belirtilerinin ortaya çıkmasında etkilidir.

Petit ve arkadaşları geliştirmekte olan beyinde CCM3 ekspresyonunu merkezi sinir sisteminde anjiyogenezin meydana geldiği alanlarda (neokorteks, ventriküler ve subventriküler zonlar gibi), gelişen nöral tüpün radyal glia hücrelerinin olduğu alanlara kıyasla daha yoğun olduğunu belirlemişlerdir. Bu durum CCM3 molekülünün embriyonik nörogenezde rol oynadığının bir işareti sayılabilir. Sıçanlarda yapılan bu çalışmada her üç CCM geninin de ekspresyonunu embriyonik dönemden postnatal 19'a kadar incelemişler ve P19'dan sonra Ccm2 ve Ccm3 ekspresyonunu görememişlerdir (150). Bu çalışma, bizim fare embriyoları üzerinde yaptığımız in situ hibridizasyon çalışmasının sonuçları ile uyumludur. Ccm3 mRNA'sının merkezi sinir sisteminin çeşitli bölgelerinde yoğun olarak bulunduğunu ifade ettik ancak farelerde P21'den sonra yaptığımız in situ çalışmalarında Petit ve arkadaşlarının bulgularından farklı olarak hala Ccm3 mRNA'sının yoğun olarak bulunduğunu gözlemledik. Bu sonuçlarımızı da embriyonik dönemden başlayarak yetişkine kadar geçen süreç içerisinde yaptığımız immunohistokimya bulguları ile destekledik.

Farelerde yaptığımız in situ hibridizasyon sonucunda elde ettiğimiz bulgular CCM fenotipinin aydınlatılmasına ışık tutacak niteliktedir. Çünkü spesifik olarak lezyonların oluşacağı ve lokalize olacağı bölgeler hakkında bilgi vermektedir. Bu bilgi, merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında CCM3 geninin temporal ve spatiyal modelini yansıtmaktadır. Daha önce Şeker ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma da Ccm2'nin beyindeki dağılımını göstermekteydi (97) ve çalışmamız bu bulgularla uyumludur. Aslında fareleri kullanarak insanlarda görülen bir merkezi sinir sistemi hastalığını aydınlatmaya çalışmak oldukça sınırlı bir çalışma olanağı sağlamasına rağmen, insan Tip 1 lisensefali ve Miller-Dieker sendromu da bu şekilde çözülen hastalıklardandır (165, 166).

Birlikte-lokalizasyon çalışmalarına ek olarak, her bir CCM geninin apoptotik yolda rol oynayabileceğine dair görüşler de ortaya atılmıştır. İnsanda Malcavernin olarak tanımlanan Ccm2 geni, farede MEKK3 (OSM; osmosensing scaffold protein) olarak belirtilir ve bu da p38 MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) sinyal yolağına katılmaktadır (106, 167).

CCM2 ve CCM1'in de p38 MAPK sinyal yolağında rol aldıkları belirlenmiştir. Hem CCM1 hemde CCM2 c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK) yolağına da katılırlar (Günel yayınlanmamış bulgu, (106)). Hem p38 MAPK hemde JNK yolakları apoptoz sırasındaki sinyalin işleminde çok önemlidirler (106, 168). C. Elegans'da, kri-1 olarak adlandırılan CCM1 homologunun da apoptozda rol oynadığı belirlenmiştir (169). PDCD10'un biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen C. Elegans da bunun homologu olan 2K806 olarak bilinen genin susturulmasıyla (knock-down) embriyolojik ölümler artmış, yaşayan bireylerde de kısa ve şişman morfolojiye sahip tıknaz bir fenotip ortaya çıkmıştır (170, 171). Çalışmamızda hücrelere klonlanan PDCD10/Ccm3 geninin klonlama sonrasında normal hücreleri ölüm yoluna soktuğu TUNEL ve DAPI reaksiyonları ile açıkça gösterilmiştir. Sonuçlarımız da PDCD10/Ccm3 geninin apoptotik yolakda rol oynayan bir gen olduğunu doğrular niteliktedir. Daha önce yayınlanan çalışmalarda CCM3'ün TF-1 premyeloid hücre hatlarında da apoptozu indüklediği gösterilmiştir (172). Ancak apoptotik yolağın hangi basamaklarını kullandığı hala tartışma konusudur. Çalışmamızda CCM3'ün p38 yolağını kullanabileceğini vurgulamaya çalışmakta ve diğer CCM proteinleri ile de işbirliği yapıp hücreyi ölüm yoluna çektiğini düşünmekteyiz.

P38 MAPK'in etkisiyle MEKK3, CCM2 ve CCM1 birlikte dördü bir kompleks oluşturmaktadırlar ve CCM3'de bu komplekse eklenen son parçadır (106, 162). Hücre kültürü çalışmalarımıza uygulanan Western blot analizlerinde de gördüğümüz gibi CCM3'ün ekspresyonu p38 ile birlikte artıp azalmaktadır. Bu durum CCM3'ün de bu yolak içerisinde yer aldığı bir ifadesi olabilir. Aynı zamanda p38 sinyali anjiyogenez sırasında da önemli bir rol oynamaktadır ve CCM2'de p38 MAPK modülünde Rac/MEKK3/MKK3 için yapıtaşı proteinini oluşturmaktadır (167). Konu ile ilgili olarak yapılan diğer çalışmalarda da p38a'nın bozulmasıyla hayvanlarda embriyonik dönemde ölümler görülmüş, özellikle de bozulmuş vaskularizasyona ek olarak artmış apoptoz, abnormal anjiyogenez ve bunun sonucunda da plasental defektler ortaya çıkmıştır (173). Ayrıca, MKK3 eksik farelerde damar gelişimi de gözlenememiştir (174). CCM2'nin eksik olduğu hücrelerde de ortaya çıkan hücresel strese yanıt olarak p38 aktivasyonunun azaldığı bu durumda var olan damar yapılarının bozulmasında rol oynadığı görülmüştür. Oluşan bu malformatif damar yapısı, serebral kavernoza malformasyon oluşumu için ortam yaratıyor olabilir.

Yapılan çalışmalarda CCM3'ün STK25 (Serine/threonine-protein kinase 25) ve MST4 (Serine/threonine-protein kinase MASK) ile ilişki içerisinde olduğu söylenmiştir (116). Bu ilişki normal vasküler gelişim için önemli bir ilişki olması yanında, bu bağlantıda ortaya çıkacak sorun da CCM patolojisinin oluşmasına sebep olacaktır. STK25'in hücre migrasyonunu desteklediği bilinirken, CCM3'ün bağlanma partnerleri olan STK24 ve MST4'ün de bu migrasyonu inhibe ettiği söylenmektedir. Bu nedenle de, CCM3, beyinde ortaya çıkacak vasküler lezyonların oluşumunda, hücre migrasyonu açısından da dengenin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Dengenin bozulumu CCM patogenezi destekler niteliktedir (159).

PDCD10/MST4 sinyal yolağı ve CCM proteinlerinin fonksiyonu değerlendirilmiştir (158). CCM1/2 kompleksi integrin aracılı hücre adezyonunu modüle eder ve bunu da sitoplazmadaki ICAP1 aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Bu üç proteinin de amacı p38 MAPK sinyal kompleksini organize etmektir (106). Ancak, MST4, MEK-1/ERK aracılığıyla Ras/Raf bağımsız yolağını aktive etmektedir (175). Bu bilgiler, CCM3'ün MST4 ve onun modüle ettiği ERK MAPK yolağı ile ilişkide olduğunun bir kanıtıdır. Ancak p38 ve JNK (c-Jun NH₂-Terminal Kinase) hakkında henüz detaylı bir literatür bilgisi yoktur. Çalışmamızda p38 ekspresyonunun siRNA Ccm3 ekspresyonuyla birlikte azalması, Ccm3'ün de bu yolakta p38 ile ilişkide olabileceğini düşündürmektedir.

Deneyssel olarak yapılan zebrafish çalışmalarında genin susturulduğu (knock-out ve knock-down) modellerde endotelial hücre morfolojisinde değişimlerin olduğu görülmüştür (176). Pagenstecher ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, kalın duvarlı tromboz kavernlere, sıklıkla kavernoza duvarda endotelial hücrelerini kaybetmiş şekilde rastlamışlardır (177). Çalışmamızda; CCM3'ün arteriyel endoteldeki ekspresyonuna dayanarak serebral kavernoza malformasyonlu hastalarda damar duvarındaki değişikliklerin nasıl olduğunu elektron mikroskopik olarak değerlendirdik ve bulgularımız literatürdekilerle benzer olarak bazı alanlarda endotelial yapısal anormallikleri göstermekteydi (70, 72).

Sonuç olarak, apoptotik etkiyi arttıran CCM3 proteini diğer CCM1 ve CCM2 ile ilişkiye girerek kurduğu denge sayesinde, nörovasküler birim içerisinde nöral hücreler ve endotelium arasındaki dengenin potansiyel olarak değişimden sorumludur. CCM3'ün bu apoptotik etkiyi hücre siklusunun modülasyonu ile direk yada indirek mi yaptığı bilinmemektedir. Ancak, gelecekte yapılacak alışmalar CCM patolojisinin anlaşılmasına olanak sağlayacak; bununla birlikte belki birçok hastalığın da moleküler mekanizmasının özölmesine ışık tutacaktır. Çalışmamız insan serebral ve ekstra-serebral dokularında da CCM3'ün immün lokalizasyonunu gösteren ilk çalışmadır. Bu bulgular merkezi sinir sistemi ve diğer sistemlerde ortaya çıkan patolojilerde; vasküler nedenlerin etkisinin olup olmadığının sorgulanmasında önemli bir adımdır.

SONUÇLAR

Bu tezde, PDCD10/CCM3'ün hücresel işlevinin anlaşılmasına yönelik elde ettiğimiz sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir.

1-İnsan dokularından alınan örneklerle uygulanan immunohistokimyasal analizler sonucunda PDCD10/CCM3'ün hem merkezi sinir sisteminde hem de merkezi sinir sistemi dışında ekstra serebral dokularda arteriyel endotelde ekspre edildiği venöz endotelde ise ekspre edilmediği gösterildi. PDCD10/CCM3'ün nöron, glia ve arteriyel endoteldeki ekspresyonu, genin nörovasküler yapılanma için önemli olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

2-İnsan dokularından elde edilen örneklerle ek olarak yapılan fare çalışmalarında da sonuçların insan dokularından elde edilenlerle benzer olduğu bulundu. Buna göre, gelişim sırasında PDCD10/CCM3'ün ekspresyonunun değişimi arteriyel endotelin fenotipinde önemli rol oynadığını düşündürmektedir.

3-Yapılan in vitro hücre kültürü çalışmalarında PDCD10/CCM3'ün intrasitoplazmik lokalizasyonunun perinükleolar alanlar olduğu belirlendi.

4-Farelerde prenatal ve postnatal in situ hibridizasyon sonuçları PDCD10/CCM3'ün nörogenez sırasında önemli bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.

5-PDCD10/CCM3'ün CCM1 ve CCM2 ile beyindeki ortak ekspresyon alanları merkezi sinir sisteminde özellikle vasküler sistemin gelişimi yada beynin gelişimi sırasında bu genlerin birlikte işlev yapabileceklerini düşündürmektedir.

6- DAPI ve TUNEL boyanmaları PDCD10/CCM3'ün apoptotik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

7-Hücre hatlarına transfeksiyon sonrasında yaptığımız Western blot ve siRNA analizleri, PDCD10/CCM3 proteini ile p38, p-p38 gibi apoptotik yolaktaki etkin diğer proteinler arasında fonksiyonel bir ilişki olabileceğini düşündürmektedir.

8-Serebral kavernoza malformasyonlu hastaların lezyonlu alandaki damar ultrastrüktürü, hücresel morfoloji ve bağlantı kompleksleri bakımından normal yapıdan farklı, oldukça zayıf bir duvar yapısına sahip olduğunu gösterdi.

KAYNAKLAR

1. Snell RS. Clinical Neuroanatomy. 1997.
2. Yaltkaya K BS, Oğuz Y. Nöroloji Ders Kitabı. Palme Yayıncılık, Ankara; 1994.
3. Adams R. Principles of Neurology. Mc Graw Hill; 1989.
4. Cotran RS KV, Robbins SL. . Pathologic Basis of Disease Philadelphia; 1994.
5. www.beliefnet.com/.../images/si55551195.jpg.
6. Kalaria RN, Ballard C. Stroke and cognition. Curr Atheroscler Rep 2001; 3: 334-339.
7. Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. N Engl J Med 1992; 326: 733-736.
8. Broderick J, Brott T, Tomsick T, Tew J, Duldner J, Huster G. Management of intracerebral hemorrhage in a large metropolitan population. Neurosurgery 1994; 34: 882-887; discussion 887.
9. Schievink WI, Wijdicks EF, Parisi JE, Piepgras DG, Whisnant JP. Sudden death from aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Neurology 1995; 45: 871-874.
10. Schievink WI, Wijdicks EF, Piepgras DG, Chu CP, O'Fallon WM, Whisnant JP. The poor prognosis of ruptured intracranial aneurysms of the posterior circulation. J Neurosurg 1995; 82: 791-795.
11. Inagawa T, Hirano A. Autopsy study of unruptured incidental intracranial aneurysms. Surg Neurol 1990; 34: 361-365.
12. Connolly ES, Jr., Choudhri TF, Mack WJ, Mocco J, Spinks TJ, Slosberg J, Lin T, Huang J, Solomon RA. Influence of smoking, hypertension, and sex on the phenotypic expression of familial intracranial aneurysms in siblings. Neurosurgery 2001; 48: 64-68; discussion 68-69.
13. Nahed BV, DiLuna ML, Morgan T, Ocal E, Hawkins AA, Ozduman K, Kahle KT, Chamberlain A, Amar AP, Gunel M. Hypertension, age, and location predict

- rupture of small intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 2005; 57: 676-683; discussion 676-683.
14. Belz MM, Hughes RL, Kaehny WD, Johnson AM, Fick-Brosnahan GM, Earnest MP, Gabow PA. Familial clustering of ruptured intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2001; 38: 770-776.
 15. Harris PC, Germino G, Klinger K, Landes G, van Adelsberg J. The PKD1 gene product. *Nat Med* 1995; 1: 493.
 16. Mochizuki T, Wu G, Hayashi T, Xenophontos SL, Veldhuisen B, Saris JJ, Reynolds DM, Cai Y, Gabow PA, Pierides A, Kimberling WJ, Breuning MH, Deltas CC, Peters DJ, Somlo S. PKD2, a gene for polycystic kidney disease that encodes an integral membrane protein. *Science* 1996; 272: 1339-1342.
 17. Van Adelsberg JS, Frank D. The PKD1 gene produces a developmentally regulated protein in mesenchyme and vasculature. *Nat Med* 1995; 1: 359-364.
 18. Kim K, Drummond I, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Klinger K, Arnaout MA. Polycystin 1 is required for the structural integrity of blood vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1731-1736.
 19. Wu G, Markowitz GS, Li L, D'Agati VD, Factor SM, Geng L, Tibara S, Tuchman J, Cai Y, Park JH, van Adelsberg J, Hou H, Jr., Kucherlapati R, Edelmann W, Somlo S. Cardiac defects and renal failure in mice with targeted mutations in *Pkd2*. *Nat Genet* 2000; 24: 75-78.
 20. Yonekawa Y, Kahn N. Moyamoya disease. *Adv Neurol* 2003; 92: 113-118.
 21. Hung CC, Tu YK, Su CF, Lin LS, Shih CJ. Epidemiological study of moyamoya disease in Taiwan. *Clin Neurol Neurosurg* 1997; 99 Suppl 2: S23-25.
 22. Ikeda H, Sasaki T, Yoshimoto T, Fukui M, Arinami T. Mapping of a familial moyamoya disease gene to chromosome 3p24.2-p26. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 533-537.
 23. Jensson O, Gudmundsson G, Arnason A, Blondal H, Petursdottir I, Thorsteinsson L, Grubb A, Lofberg H, Cohen D, Frangione B. Hereditary

- cystatin C (gamma-trace) amyloid angiopathy of the CNS causing cerebral hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 1987; 76: 102-114.
24. Luyendijk W, Bots GT, Vegter-van der Vlis M, Went LN, Frangione B. Hereditary cerebral haemorrhage caused by cortical amyloid angiopathy. *J Neurol Sci* 1988; 85: 267-280.
 25. Kierszenbaum A. *Histology and Cell Biology*. Mosby; 2006.
 26. ww2.heartandstroke.ca/.../stroke_hem_web.jpg.
 27. Sabin FR. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. *Anat Rec* 1917; 13: 199-204.
 28. Streeter GL. The developmental alterations in the vascular system of the brain. *Contrib Embryol* 1918; 8: 5-38.
 29. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders; 1982.
 30. Waxman SG. *Molecular Neurology*. Burlington, MA, USA: Elsevier Inc.; 2007.
 31. Coffin JD, Poole TJ. Embryonic vascular development: immunohistochemical identification of the origin and subsequent morphogenesis of the major vessel primordia in quail embryos. *Development* 1988; 102: 735-748.
 32. Stewart PA, Wiley MJ. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev Biol* 1981; 84: 183-192.
 33. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
 34. Machein MR, Kullmer J, Fiebich BL, Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and, capillary permeability in human brain tumors. *Neurosurgery* 1999; 44: 732-740; discussion 740-731.
 35. Wilting J, Brand-Saberi B, Kurz H, Christ B. Development of the embryonic vascular system. *Cell Mol Biol Res* 1995; 41: 219-232.

36. Schmidt-Lademann S, Stoeter P, Voigt K. Embryonal and fetal development of capillaries: microangiographic investigations. II. The telencephalon. *Diagn Imaging* 1980; 49: 177-187.
37. Stoeter P, Schmidt-Lademann S, Voigt K. Embryonal and fetal development of capillaries: microangiographic investigations. I. The brain stem. *Diagn Imaging* 1980; 49: 131-140.
38. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
39. Plate KH, Warnke PC. Vascular endothelial growth factor. *J Neurooncol* 1997; 35: 365-372.
40. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114: 521-532.
41. Poole TJ, Coffin JD. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 1989; 251: 224-231.
42. Zadeh G, Guha A. Angiogenesis in nervous system disorders. *Neurosurgery* 2003; 53: 1362-1374; discussion 1374-1366.
43. Vikkula M, Boon LM, Mulliken JB. Molecular genetics of vascular malformations. *Matrix Biol* 2001; 20: 327-335.
44. Olivecrona H LJ. Congenital Arteriovenous aneurysms of the carotid and vertebral artery systems. Berlin, Springer-Verlag, 91. 1957.
45. Perl J RJ. Diagnostic imaging of cavernous malformations: In: Awad IA, Barrow D, ed., *Cavernous Malformations*. Park Ridge: AANS, 37-48. 1993.
46. McCormick WF. The pathology of vascular ("arteriovenous") malformations. *J Neurosurg* 1966; 24: 807-816.
47. McCormick WF. Pathology of vascular malformations of the brain. In Wilson CB, Stein BM (ed). *Intracranial arteriovenous malformations*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1984: 44-63.

48. Martin N VH. Pathology and grading of intracranial vascular malformations, in Barrow DL (ed): Intracranial vascular malformations. Park Ridge, IL, The American Association of Neurological Surgeons 1990: 1-30.
49. Wilkins HW. Natural history of arteriovenous malformations: in intracranial vascular malformations ed by Barrow DL. AANS publication 1993: 31-45.
50. Selman WR TR, Ratcheson RA. Intracranial arteriovenous malformations: Patient evaluation and consideration for treatment. In Batjler HH, Caplan KR, Friberg , Phidelphia, NY: Lippincott-Raven,. 1997: 679-690.
51. Ojemann RG HR, Crowell RM. Surgical management of cerebrovascular disease. Baltimore: Williams&Wilkins. 1988.
52. Vinuela F DG, Guglielmi G. Principles of interventional neuroradiology In: Batjler HH, Caplan LR, Friberg L, Greenlee RG, Kopitnik TA, Young WL eds. Cerebrovascular disease. Phidelphia, NY. Lippincott-Raven publisher. 1997: 691-705.
53. Yaşargil M. Arteriovenous malformation of the brain: Clinical considerations, general and special operative techniques. New York, George Thime Verlag.; 1988.
54. Wilkins RH. Natural history of intracranial vascular malformations: a review. Neurosurgery 1985; 16: 421-430.
55. McCormick WF, Boulter TR. Vascular malformations ("angiomas") of the dura mater. J Neurosurg 1966; 25: 309-311.
56. Jellinger K. Vascular malformations of the central nervous system: a morphological overview. Neurosurg Rev 1986; 9: 177-216.
57. Rhoten RL, Comair YG, Shedid D, Chyatte D, Simonson MS. Specific repression of the preproendothelin-1 gene in intracranial arteriovenous malformations. J Neurosurg 1997; 86: 101-108.
58. Breugem CC, Alders M, Salieb-Beugelaar GB, Mannens MM, Van der Horst CM, Hennekam RC. A locus for hereditary capillary malformations mapped on chromosome 5q. Hum Genet 2002; 110: 343-347.

59. Osler W. On a family form of recurring epistaxis, associated with multiple telangiectases of the skin and mucous membranes. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1901; 7: 333-337.
60. Braverman IM, Keh A, Jacobson BS. Ultrastructure and three-dimensional organization of the telangiectases of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 422-427.
61. Roman G, Fisher M, Perl DP, Poser CM. Neurological manifestations of hereditary hemorrhagic telangiectasia (Rendu-Osler-Weber disease): report of 2 cases and review of the literature. *Ann Neurol* 1978; 4: 130-144.
62. Swanson KL, Prakash UB, Stanson AW. Pulmonary arteriovenous fistulas: Mayo Clinic experience, 1982-1997. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 671-680.
63. Willemsse RB, Mager JJ, Westermann CJ, Overtoom TT, Mauser H, Wolbers JG. Bleeding risk of cerebrovascular malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Neurosurg* 2000; 92: 779-784.
64. McDonald MT, Papenberg KA, Ghosh S, Glatfelter AA, Biesecker BB, Helmbold EA, Markel DS, Zolotor A, McKinnon WC, Vanderstoep JL, et al. A disease locus for hereditary haemorrhagic telangiectasia maps to chromosome **9q33-34. *Nat Genet* 1994; 6: 197-204.**
65. Johnson DW, Berg JN, Gallione CJ, McAllister KA, Warner JP, Helmbold EA, Markel DS, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. A second locus for hereditary hemorrhagic telangiectasia maps to chromosome 12. *Genome Res* 1995; 5: 21-28.
66. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, Gallione CJ, Baldwin MA, Jackson CE, Helmbold EA, Markel DS, McKinnon WC, Murrell J, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 1994; 8: 345-351.
67. Berg JN, Gallione CJ, Stenzel TT, Johnson DW, Allen WP, Schwartz CE, Jackson CE, Porteous ME, Marchuk DA. The activin receptor-like kinase 1 gene: genomic structure and mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 60-67.

68. Shovlin CL, Hughes JM, Scott J, Seidman CE, Seidman JG. Characterization of endoglin and identification of novel mutations in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 68-79.
69. Vikkula M, Boon LM, Carraway KL, 3rd, Calvert JT, Diamonti AJ, Goumnerov B, Pasyk KA, Marchuk DA, Warman ML, Cantley LC, Mulliken JB, Olsen BR. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996; 87: 1181-1190.
70. Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D. Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71: 188-192.
71. Wong JH, Awad IA, Kim JH. Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. *Neurosurgery* 2000; 46: 1454-1459.
72. Perl J, Ross, J. *Diagnostic imaging of cavernous malformations.*; 1993.
73. Chin D, Harper C. Angiographically occult cerebral vascular malformations with abnormal computed tomography. *Surg Neurol* 1983; 20: 138-142.
74. Cohen HC, Tucker WS, Humphreys RP, Perrin RJ. Angiographically cryptic histologically verified cerebrovascular malformations. *Neurosurgery* 1982; 10: 704-714.
75. el-Gohary EG, Tomita T, Gutierrez FA, McLone DG. Angiographically occult vascular malformations in childhood. *Neurosurgery* 1987; 20: 759-766.
76. Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP. KRIT1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 10677-10682.
77. Del Curling O, Jr., Kelly DL, Jr., Elster AD, Craven TE. An analysis of the natural history of cavernous angiomas. *J Neurosurg* 1991; 75: 702-708.
78. Lobato RD, Perez C, Rivas JJ, Cordobes F. Clinical, radiological, and pathological spectrum of angiographically occult intracranial vascular

- malformations. Analysis of 21 cases and review of the literature. *J Neurosurg* 1988; 68: 518-531.
79. Simard JM, Garcia-Bengochea F, Ballinger WE, Jr., Mickle JP, Quisling RG. Cavernous angioma: a review of 126 collected and 12 new clinical cases. *Neurosurgery* 1986; 18: 162-172.
 80. Wojnowski L, Zimmer AM, Beck TW, Hahn H, Bernal R, Rapp UR, Zimmer A. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nat Genet* 1997; 16: 293-297.
 81. Wood MW, White RJ, Kernohan JW. Cavernous hemangiomas involving the brain, spinal cord, heart, skin and kidney: report of case. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1957; 32: 249-254.
 82. Rigamonti DH, Monsein LH. . Cavernous malformations and related lesions. In *Neurosurgery Update*, R.S. In: Wilkins RH, ed. II. New York, NY:McGraw-Hill 1996: 2503-2508.
 83. Perret G, Nishioka H. Report on the cooperative study of intracranial aneurysms and subarachnoid hemorrhage. Section VI. Arteriovenous malformations. An analysis of 545 cases of cranio-cerebral arteriovenous malformations and fistulae reported to the cooperative study. *J Neurosurg* 1966; 25: 467-490.
 84. Robinson JR, Awad IA, Little JR. Natural history of the cavernous angioma. *J Neurosurg* 1991; 75: 709-714.
 85. Kim DS, Park YG, Choi JU, Chung SS, Lee KC. An analysis of the natural history of cavernous malformations. *Surg Neurol* 1997; 48: 9-17; discussion 17-18.
 86. Sage MR, Brophy BP, Sweeney C, Phipps S, Perrett LV, Sandhu A, Albertyn LE. Cavernous haemangiomas (angiomas) of the brain: clinically significant lesions. *Australas Radiol* 1993; 37: 147-155.
 87. Moriarity JL, Wetzel M, Clatterbuck RE, Javedan S, Sheppard JM, Hoenig-Rigamonti K, Crone NE, Breiter SN, Lee RR, Rigamonti D. The natural history of cavernous malformations: a prospective study of 68 patients. *Neurosurgery* 1999; 44: 1166-1171; discussion 1172-1163.

88. Di Rocco C, Iannelli A, Tamburrini G. Cavernous angiomas of the brain stem in children. *Pediatr Neurosurg* 1997; 27: 92-99.
89. Robinson JR, Jr., Awad IA, Magdinec M, Paranandi L. Factors predisposing to clinical disability in patients with cavernous malformations of the brain. *Neurosurgery* 1993; 32: 730-735; discussion 735-736.
90. Barrow DL, Reisner A. Natural history of intracranial aneurysms and vascular malformations. *Clin Neurosurg* 1993; 40: 3-39.
91. Otten P, Pizzolato GP, Rilliet B, Berney J. [131 cases of cavernous angioma (cavernomas) of the CNS, discovered by retrospective analysis of 24,535 autopsies]. *Neurochirurgie* 1989; 35: 82-83, 128-131.
92. Farmer JP, Cosgrove GR, Villemure JG, Meagher-Villemure K, Tampieri D, Melanson D. Intracerebral cavernous angiomas. *Neurology* 1988; 38: 1699-1704.
93. Steiger HJ, Markwalder TM, Reulen HJ. Clinicopathological relations of cerebral cavernous angiomas: observations in eleven cases. *Neurosurgery* 1987; 21: 879-884.
94. Denier C, Labauge P, Brunereau L, Cave-Riant F, Marchelli F, Arnoult M, Cecillon M, Maciazek J, Joutel A, Tournier-Lasserre E. Clinical features of cerebral cavernous malformations patients with KRIT1 mutations. *Ann Neurol* 2004; 55: 213-220.
95. Guclu B, Ozturk AK, Pricola KL, Bilguvar K, Shin D, O'Roak BJ, Gunel M. Mutations in apoptosis-related gene, PDCD10, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery* 2005; 57: 1008-1013.
96. Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CT, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP. Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1851-1858.
97. Seker A, Pricola KL, Guclu B, Ozturk AK, Louvi A, Gunel M. CCM2 expression parallels that of CCM1. *Stroke* 2006; 37: 518-523.

98. Chang DD, Wong C, Smith H, Liu J. ICAP-1, a novel beta1 integrin cytoplasmic domain-associated protein, binds to a conserved and functionally important NPXY sequence motif of beta1 integrin. *J Cell Biol* 1997; 138: 1149-1157.
99. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. Interaction between krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2953-2960.
100. Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. KRIT1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: a new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (CCM1) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 389-396.
101. Marchuk DA, Srinivasan S, Squire TL, Zawistowski JS. Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. *Hum Mol Genet* 2003; 12 Spec No 1: R97-112.
102. Zhang XA, Hemler ME. Interaction of the integrin beta1 cytoplasmic domain with ICAP-1 protein. *J Biol Chem* 1999; 274: 11-19.
103. Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor NM, Voorhees J, Luleci G, Lifton RP, Gunel M. KRIT1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery* 2004; 54: 943-949; discussion 949.
104. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 2003; 73: 1459-1464.
105. Seker A, Yildirim O, Kurtkaya O, Sav A, Gunel M, Pamir MN, Kilic T. Expression of integrins in cerebral arteriovenous and cavernous malformations. *Neurosurgery* 2006; 58: 159-168; discussion 159-168.

106. Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 2521-2531.
107. Plummer NW, Zawistowski JS, Marchuk DA. Genetics of cerebral cavernous malformations. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2005; 5: 391-396.
108. Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. Low frequency of PDCD10 mutations in a panel of CCM3 probands: potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat* 2006; 27: 118.
109. Verlaan DJ, Roussel J, Laurent SB, Elger CE, Siegel AM, Rouleau GA. CCM3 mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology* 2005; 65: 1982-1983.
110. Hayman LA, Evans RA, Ferrell RE, Fahr LM, Ostrow P, Riccardi VM. Familial cavernous angiomas: natural history and genetic study over a 5-year period. *Am J Med Genet* 1982; 11: 147-160.
111. Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP, Johnson PC, Hoenig-Rigamonti K, Knight JT, Spetzler RF. Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. *N Engl J Med* 1988; 319: 343-347.
112. Gunel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP. Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 6620-6624.
113. Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, Spetzler RF, Rich SS, Orr HT, Weber JL. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 453-458.
114. Johnson EW, Iyer LM, Rich SS, Orr HT, Gil-Nagel A, Kurth JH, Zabramski JM, Marchuk DA, Weissenbach J, Clericuzio CL, Davis LE, Hart BL, Gusella JF, Kosofsky BE, Louis DN, Morrison LA, Green ED, Weber JL. Refined localization of the cerebral cavernous malformation gene (CCM1) to a 4-cM

interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. *Genome Res* 1995; 5: 368-380.

- 115.** Denier C, Goutagny S, Labauge P, Krivosic V, Arnoult M, Cousin A, Benabid AL, Comoy J, Frerebeau P, Gilbert B, Houtteville JP, Jan M, Lapierre F, Loiseau H, Menei P, Mercier P, Moreau JJ, Nivelon-Chevallier A, Parker F, Redondo AM, Scarabin JM, Tremoulet M, Zerah M, Maciazek J, Tournier-Lasserre E. Mutations within the MGC4607 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 326-337.
- 116.** Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 2005; 76: 42-51.
- 117.** http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=retrieve&dopt=default&n=1&list_uids=11235.
- 118.** www.niaaa.nih.gov/.../0/changes.gif.
- 119.** Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- 120.** White E. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 1996; 10: 1-15.
- 121.** Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5: 97-104.
- 122.** Takahashi A, Earnshaw WC. ICE-related proteases in apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 50-55.
- 123.** Zamzami N, Kroemer G. Condensed matter in cell death. *Nature* 1999; 401: 127-128.
- 124.** Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
- 125.** Eastman A. Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; 6: 45-52.
- 126.** Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.

127. Ameisen JC. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 2002; 9: 367-393.
128. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science* 1993; 262: 695-700.
129. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266: 699-717.
130. Reed JC. Apoptosis-based therapies. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1: 111-121.
131. Mullauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A. Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res* 2001; 488: 211-231.
132. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77: 81-137.
133. Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* 2002; 277: 3247-3257.
134. Wu Y, Mehew JW, Heckman CA, Arcinas M, Boxer LM. Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene* 2001; 20: 240-251.
135. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 594-604.
136. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 68-75.
137. Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG, Ray SK, Hazen-Martin DJ, Hogan EL, Banik NL. Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 2003; 73: 95-104.
138. Gewies A. Introduction to Apoptosis. *ApoReview*, 1-26. 2003.
139. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 299-306.

140. Choi WS, Lee EH, Chung CW, Jung YK, Jin BK, Kim SU, Oh TH, Saido TC, Oh YJ. Cleavage of Bax is mediated by caspase-dependent or -independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl-2. *J Neurochem* 2001; 77: 1531-1541.
141. Hu Y, Benedict MA, Ding L, Nunez G. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J* 1999; 18: 3586-3595.
142. Laurans MS, DiLuna ML, Shin D, Niazi F, Voorhees JR, Nelson-Williams C, Johnson EW, Siegel AM, Steinberg GK, Berg MJ, Scott RM, Tedeschi G, Enevoldson TP, Anson J, Rouleau GA, Ogilvy C, Awad IA, Lifton RP, Gunel M. Mutational analysis of 206 families with cavernous malformations. *J Neurosurg* 2003; 99: 38-43.
143. Labauge P, Brunereau L, Levy C, Laberge S, Houtteville JP. The natural history of familial cerebral cavernomas: a retrospective MRI study of 40 patients. *Neuroradiology* 2000; 42: 327-332.
144. Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 1999; 23: 189-193.
145. Chen DH, Lipe HP, Qin Z, Bird TD. Cerebral cavernous malformation: novel mutation in a Chinese family and evidence for heterogeneity. *J Neurol Sci* 2002; 196: 91-96.
146. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Dietz HC. Mutations in KRIT1 in familial cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 2000; 46: 1272-1277; discussion 1277-1279.
147. Reich P, Winkler J, Straube A, Steiger HJ, Peraud A. Molecular genetic investigations in the CCM1 gene in sporadic cerebral cavernomas. *Neurology* 2003; 60: 1135-1138.
148. Denier C, Gasc JM, Chapon F, Domenga V, Lescoat C, Joutel A, Tournier-Lasserre E. Krit1/cerebral cavernous malformation 1 mRNA is preferentially

- expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult. *Mech Dev* 2002; 117: 363-367.
149. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Amankulor NM, Voorhees JR, Gokce O, DiLuna ML, Laurans MS, Luleci G, Gunel M. Krev1 interaction trapped-1/cerebral cavernous malformation-1 protein expression during early angiogenesis. *J Neurosurg* 2004; 100: 481-487.
 150. Petit N, Blecon A, Denier C, Tournier-Lasserre E. Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (CCM) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr Patterns* 2006; 6: 495-503.
 151. Plummer NW, Squire TL, Srinivasan S, Huang E, Zawistowski JS, Matsunami H, Hale LP, Marchuk DA. Neuronal expression of the Ccm2 gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. *Mamm Genome* 2006; 17: 119-128.
 152. Kleaveland B, Zheng X, Liu JJ, Blum Y, Tung JJ, Zou Z, Chen M, Guo L, Lu MM, Zhou D, Kitajewski J, Affolter M, Ginsberg MH, Kahn ML. Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. *Nat Med* 2009; 15: 169-176.
 153. Zabramski JM, Henn JS, Coons S. Pathology of cerebral vascular malformations. *Neurosurg Clin N Am* 1999; 10: 395-410.
 154. Eerola I, Plate KH, Spiegel R, Boon LM, Mulliken JB, Vikkula M. KRIT1 is mutated in hyperkeratotic cutaneous capillary-venous malformation associated with cerebral capillary malformation. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 1351-1355.
 155. Couteulx SL, Brezin AP, Fontaine B, Tournier-Lasserre E, Labauge P. A novel KRIT1/CCM1 truncating mutation in a patient with cerebral and retinal cavernous angiomas. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 217-218.
 156. Davenport WJ, Siegel AM, Dichgans J, Drigo P, Mammi I, Pereda P, Wood NW, Rouleau GA. CCM1 gene mutations in families segregating cerebral cavernous malformations. *Neurology* 2001; 56: 540-543.

157. Clatterbuck RE, Cohen B, Gailloud P, Murphy K, Rigamonti D. Vertebral hemangiomas associated with familial cerebral cavernous malformation: segmental disease expression. Case report. *J Neurosurg* 2002; 97: 227-230.
158. Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D. PDCD10 interacts with Ste20-related kinase MST4 to promote cell growth and transformation via modulation of the ERK pathway. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1965-1978.
159. Voss K, Stahl S, Hogan BM, Reinders J, Schleider E, Schulte-Merker S, Felbor U. Functional analyses of human and zebrafish 18-amino acid in-frame deletion pave the way for domain mapping of the cerebral cavernous malformation 3 protein. *Hum Mutat* 2009.
160. Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res* 2007; 6: 4343-4355.
161. Stahl S, Gaetzner S, Voss K, Brackertz B, Schleider E, Surucu O, Kunze E, Netzer C, Korenke C, Finckh U, Habek M, Poljakovic Z, Elbracht M, Rudnik-Schoneborn S, Bertalanffy H, Sure U, Felbor U. Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Hum Mutat* 2008; 29: 709-717.
162. Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U. CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 2007; 8: 249-256.
163. Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. Interaction between krit1 and malcavernin: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 2007; 60: 353-359; discussion 359.
164. Revencu N, Vikkula M. Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. *J Med Genet* 2006; 43: 716-721.
165. Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A. Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1)

activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* 1998; 19: 333-339.

166. Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai LH, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A. 14-3-3epsilon is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 2003; 34: 274-285.
167. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. Rac-MEKK3-MKK3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 2003; 5: 1104-1110.
168. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 2004; 23: 2838-2849.
169. Berman JR, Kenyon C. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of DAF-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling. *Cell* 2006; 124: 1055-1068.
170. Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2003; 30: 313-321.
171. Kamath RS, Fraser AG, Dong Y, Poulin G, Durbin R, Gotta M, Kanapin A, Le Bot N, Moreno S, Sohrmann M, Welchman DP, Zipperlen P, Ahringer J. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* 2003; 421: 231-237.
172. Busch CR, Heath DD, Hubberstey A. Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Gene* 2004; 329: 1-10.
173. Mudgett JS, Ding J, Guh-Siesel L, Chartrain NA, Yang L, Gopal S, Shen MM. Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 10454-10459.
174. Yang J, Boerm M, McCarty M, Bucana C, Fidler IJ, Zhuang Y, Su B. Mekk3 is essential for early embryonic cardiovascular development. *Nat Genet* 2000; 24: 309-313.

175. Lin JL, Chen HC, Fang HI, Robinson D, Kung HJ, Shih HM. MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. *Oncogene* 2001; 20: 6559-6569.
176. Hogan BM, Bussmann J, Wolburg H, Schulte-Merker S. *ccm1* cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 2424-2432.
177. Pagenstecher A, Stahl S, Sure U, Felbor U. A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of CCM1, CCM2 or CCM3 in affected endothelial cells. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 911-918.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında İzmir’de doğdu. İlk öğrenimini 1987 yılında Dumlupınar İlkokulunda, Ortaöğrenimini 1990 yılında Atatürk Ortaokulunda ve Lise öğrenimini de 1993 yılında Antalya Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini 1994-1998 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde bitirdi. 1999-2000 yılları arasında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesinde Biyolog olarak çalıştı. Yüksek Lisans eğitimini 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında tamamladı. 2003 yılında Milli Eğitim Bakanlığının bursu ile Oslo Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında Dr. Joel C. Glover ile birlikte 5 ay çalıştı. Sonrasında, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Doktora programına başladı ve bu program içerisinde doktora tezinin bir kısmını Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin Cerrahisi Anabilim Dalı, Nörovasküler Genetik laboratuvarlarında Dr. Murat Günel’in ikinci danışmanlığında tamamladı. 18’si Science Citation Index’te olmak üzere 19 makale, 1 uluslararası kitapta bölüm yazarlığı ve 20 kongre bildirisi bulunmaktadır. 2006 yılında Beyin Araştırmaları derneğinin proje destek ödülünü, 2009 yılında da BAD-Novartis yayın teşvik ödülünü kazanmıştır. 2000 yılından beri Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır. Gamze TANRIÖVER 26 Haziran 2009 tarihinde, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tez Savunmasını yapacaktır.

EKLE

PDCD10, THE GENE MUTATED IN CEREBRAL CAVERNOUS MALFORMATION 3, IS EXPRESSED IN THE NEUROVASCULAR UNIT

Gamze Tanriover, M.Sc.

Department of Histology and Embryology, Akdeniz University, Antalya, Turkey, and Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Arianne J. Boylan, B.S.

Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Michael L. DiLuna, M.D.

Department of Neurosurgery and Program on Neurogenetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Katie L. Pricola, B.A.

Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Angeliki Louvi, Ph.D.

Department of Neurosurgery and Program on Neurogenetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Murat Gunel, M.D.

Departments of Neurosurgery and Neurobiology and Program on Neurogenetics, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut

Reprint requests:

Murat Gunel, M.D., Department of Neurosurgery, TMP4, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, New Haven, CT 06510. Email: murat.gunel@yale.edu

Received, March 11, 2007.

Accepted, November 15, 2007.

OBJECTIVE: Mutations in the programmed cell death 10 gene, *PDCD10*, cause the autosomal-dominant familial cerebral cavernous malformation 3 (CCM3). Little is known about the function of this gene in disease pathogenesis.

METHODS: As a first step, we analyzed the messenger ribonucleic acid (mRNA) expression of *CCM3* in the embryonic and postnatal mouse brain by in situ hybridization. We generated and characterized *CCM3*-specific polyclonal antibodies and analyzed *CCM3* protein expression in human cerebral and solid organ (extracerebral) tissues using immunohistochemistry.

RESULTS: In embryonic mouse brain, *CCM3* mRNA is seen in the ventricular, subventricular, and intermediate zones, the cortical plate, the developing septum, striatum, midbrain, pons, cerebellum, and medulla. In the postnatal mouse brain, we detected *CCM3/PDCD10* expression in the olfactory bulb, neocortex, striatum, septal nuclei, hippocampus, dentate gyrus, thalamic and hypothalamic nuclei, inferior colliculus, Purkinje and granule cell layers and deep nuclei of the cerebellum, and in many cells and nuclei in the medulla. Similar to *CCM1* and *CCM2*, the *CCM3/PDCD10* protein is expressed in the neurovascular unit but weakly in venous structures within cortical, subcortical, and brainstem tissue. *CCM3/PDCD10* protein is strongly expressed in arterial endothelium but weakly or not at all in venous endothelium of extracerebral tissue.

CONCLUSION: The expression pattern of *CCM3/PDCD10* in multiple organ systems displays similarities to *CCM1* and *CCM2*. *PDCD10/CCM3* is highly expressed in the neurovascular unit and in the arterial endothelium of structures within multiple organ systems, including the brain. These data provide additional information about *CCM3* expression and its role in lesion development and pathogenesis.

KEY WORDS: *CCM3*, Expression, Gene, Neurovascular unit, *PDCD10*, Programmed cell death

Neurosurgery 62:930–938, 2008

DOI: 10.1227/01.NEU.0000297075.21046.0E

www.neurosurgery-online.com

Cerebral cavernous malformations (CCMs) are vascular lesions that affect the central nervous system (CNS). They occur in both sporadic and familial forms. Linkage analysis has identified three different loci at 7q21.2 (*CCM1*), 7p13 (*CCM2*), and 3q25.2-q27 (*CCM3*) that segregate with the familial phenotype (3, 5, 7, 8, 13). The first two genes, *CCM1* and *CCM2*, have been identified as *Krev1 Interaction Trapped 1* (*KRIT1*, Genbank AAH98442; OMIM 604214) and *MGC4607* or malcavernin (Genbank AAH63663; OMIM 607929), respectively (14, 16). Recently, it was demonstrated that mutations in the programmed cell death 10 gene, *PDCD10* (Gen-

bank CAG33388; OMIM 609118), also cause CCMs (1, 6, 17, 24). This gene was first identified through a screen of genes expressed during the induction of apoptosis in a premyeloid cell line (1).

Recent research has begun to shed light on the molecular mechanisms that, when disrupted, lead to CCMs. *CCM1* (*KRIT1*), a protein originally identified as a binding partner for Rap1A, has been demonstrated to colocalize with microtubules (9) and is now known to bind integrin cytoplasmic domain-associated protein-1 (*ICAP1*) (26, 28). These results place *CCM1* into a role in the interplay between the cytoskeleton and the extracellular matrix.

CCM2 (MGC4607) was originally identified as a binding partner for MAP/ERK Kinase Kinase 3 (MEKK3), and was subsequently shown in *in vitro* osmotic shock assays to play a role in p38 activation by interacting with (providing a scaffold for) the Rac1-MEKK3-MAP Kinase Kinase 3 (MKK3) complex (23). CCM1 and CCM2 are also known to interact (bind) through a similar means as CCM1 and ICAP1, placing CCM1 in the scaffold for the Rac1-MEKK3-MKK3 complex (27, 29). The present hypothesis of lesion formation in the presence of CCM1 or CCM2 mutations suggests that loss of signaling through this complex leads to the CCM phenotype through p38 dysregulation and loss of integrin-mediated cell adhesion.

Previously, we characterized the messenger ribonucleic acid (mRNA) distribution of CCM1 and CCM2 in the embryonic and postnatal mouse CNS (20). CCM1 expression parallels that of CCM2 and is primarily observed on the arterial side of the cerebral vasculature, neurons, and astrocytes. In contrast, little is known regarding the CCM3/PDCD10 protein, including its expression pattern. On the basis of its clinical presentation and pathological characteristics of the lesions, we hypothesized nearly 10 years ago that all three genes are involved in the same pathway (3). To further test this hypothesis and to gain insight into CCM3 function, we analyzed the tissue and cell type-specific expression patterns of CCM3/PDCD10 mRNA and protein. To this end, we performed *in situ* analysis of CCM3 gene expression during brain development in mice. We also performed immunohistochemical analysis using a novel antibody generated against the CCM3/PDCD10 protein in human brain and extracerebral tissues.

MATERIALS AND METHODS

In situ Hybridization

Animal handling was performed in accordance with Institutional Animal Care and Utilization Committee guidelines under an approved animal protocol. Brains were fixed by transcardiac perfusion with 4% paraformaldehyde, cryoprotected by immersion in 30% sucrose, and sectioned at 36 μ m using a microtome (Leica Microsystems, Allendale, NJ). Sections were hybridized with antisense probes against mouse CCM3 (IMAGE clone 4022513; IMAGE Consortium, Livermore, CA) using standard procedures (21) with minor modifications. Probes for mouse CCM1 (IMAGE clone 5390736) and CCM2 (IMAGE clone 4952288) were prepared and labeled as previously described (20).

Cell Cultures

Cos7 cells were maintained in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. N2A cells (murine neuroblastoma cells) were plated in 50% high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with 50% Opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and 1% L-glutamine. Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were plated in high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% L-glutamine. Cells were seeded in four-chamber slides at a density of 5×10^5 cells/chamber and cultured in growth medium at 37°C.

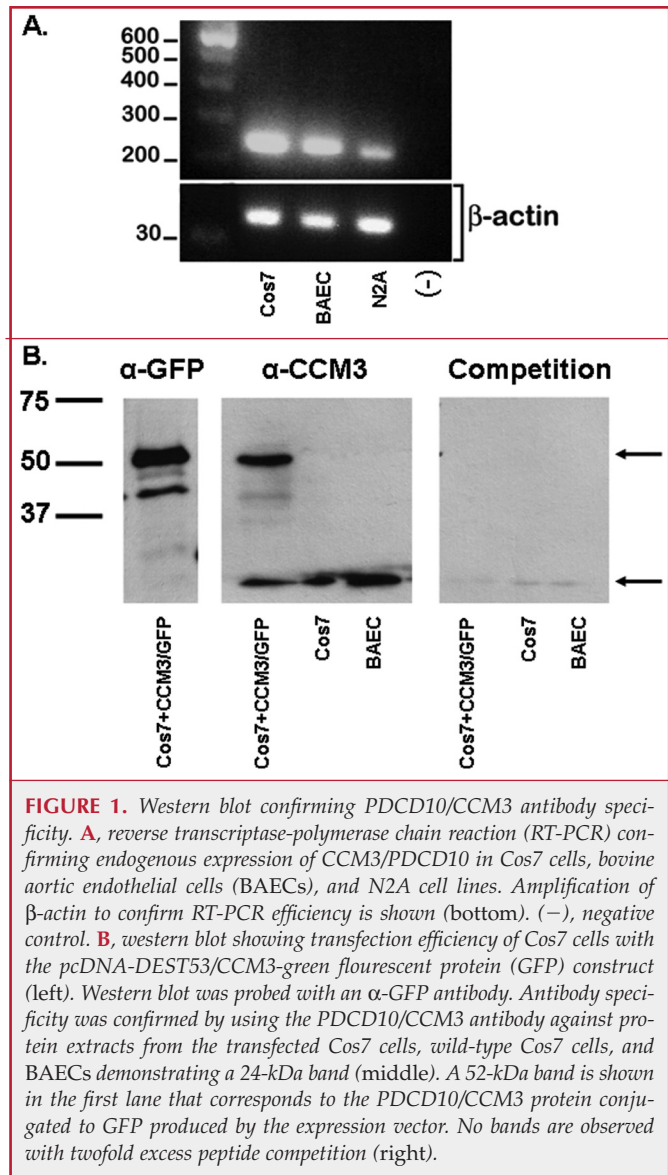


FIGURE 1. Western blot confirming PDCD10/CCM3 antibody specificity. **A**, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) confirming endogenous expression of CCM3/PDCD10 in Cos7 cells, bovine aortic endothelial cells (BAECs), and N2A cell lines. Amplification of β -actin to confirm RT-PCR efficiency is shown (bottom). (-), negative control. **B**, western blot showing transfection efficiency of Cos7 cells with the pcDNA-DEST53/CCM3-green fluorescent protein (GFP) construct (left). Western blot was probed with an α -GFP antibody. Antibody specificity was confirmed by using the PDCD10/CCM3 antibody against protein extracts from the transfected Cos7 cells, wild-type Cos7 cells, and BAECs demonstrating a 24-kDa band (middle). A 52-kDa band is shown in the first lane that corresponds to the PDCD10/CCM3 protein conjugated to GFP produced by the expression vector. No bands are observed with twofold excess peptide competition (right).

Reverse Transcriptase-polymerase Chain Reaction

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) on complementary DNA (cDNA) from cell lines was performed according to standard techniques. RNA was extracted from cell cultures using TRIzol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol, RT-PCR was performed using Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen, Valencia, CA), and cDNA was then amplified with *Taq* polymerase (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN). PCR primers were designed specific for PDCD10 and yielded a 250-bp fragment (Cos7 and BAECs: forward, 5'-CCCAGATGAGATCAATGACAGA-3'; reverse, 5'-ATGAATTAGTCGGTTGGCACTT-3'; and neuroblastoma (N2A) cells: forward, 5'-TGGTTTCTATGCCTCTCTATGC-3'; reverse, 5'-GCCGCTCAATCATGTACTCTT-3'). Primers for β -actin were used to control for RT-PCR efficiency and cDNA synthesis and yielded a 50-bp fragment (forward primer, ACTACCTCATGAAGATCCTC; reverse primer, CGTGGTGGTGAAGCTGTAGC).

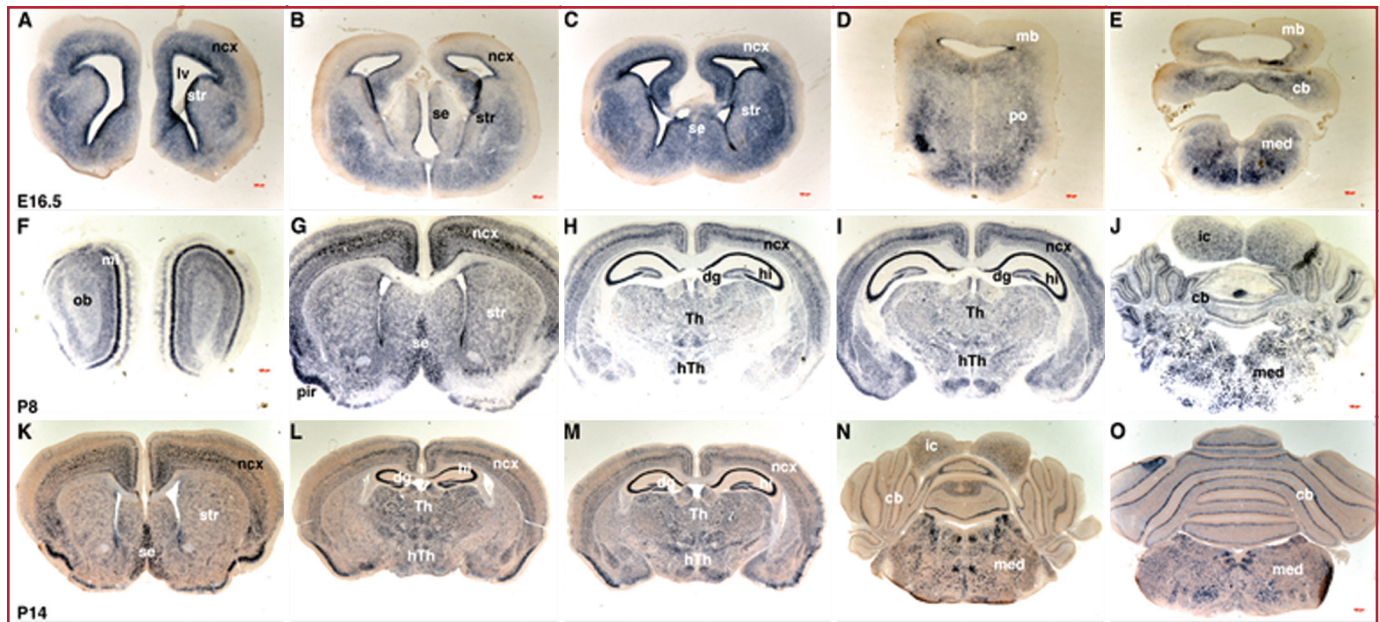


FIGURE 2. Analyses of PDCD10 (CCM3) messenger ribonucleic acid (mRNA) distribution in mouse embryonic and postnatal brain were performed. Coronal sections through the mouse brain are shown in anterior to posterior order. In situ hybridization occurs. **A–E**, at embryonic Day 16.5, CCM3 is detected in the ventricular, subventricular, and intermediate zones of the developing neocortex (ncx) in the developing striatum (str). Expression is high in the septum (se), lower in the developing midbrain (mb), and is also detected in the developing pons (po), cerebellum (cb), and medulla (med). **F–J**, at P8, CCM3 is expressed highly in the mitral cell layer (mi) of the olfactory

bulb (ob), in the neocortex (especially in the deeper layers), striatum, septum, and piriform cortex (pir). Strong expression is detected in the thalamus (Th) and at lower levels in the hypothalamus (hTh), the hippocampus (hi), and the dentate gyrus (dg). Expression is prominent in the inferior colliculus (ic) and the Purkinje cells but lower in the granule cells in the cerebellum (cb) and high in the medulla. **K–O**, at P14, CCM3/PDCD10 mRNA continues to be detected in the neocortex, striatum, septum, hippocampus, dentate gyrus, thalamus, hypothalamus, inferior colliculus, and Purkinje cells of the cerebellum, as well as in various nuclei in the medulla.

CCM3 Antibody Production

A CCM3/PDCD10 (CCM3)-specific rabbit polyclonal antibody was synthesized and affinity-purified against the antigenic peptide KIPDEINDRVRFLQTIKD (Open Biosystems, Huntsville, AL). The CCM2 antibody synthesis, characterization, and validation have been previously described (20). Antibody specificity was tested by transfecting Cos7 cells with an expression vector encoding a CCM3-GFP fusion protein as previously described (15, 20). In brief, the full-length CCM3 cDNA was cloned into *pcDNA-DEST53* (Invitrogen) and transfected into Cos7 cells using Lipofectamine (Invitrogen). Protein extracts prepared from these cells were fractionated by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel and analyzed by Western blot with the anti-CCM3 antibody. The CCM3/PDCD10 antibody was also tested for specificity against cell lysates from Cos7 cells, BAECs, and N2A cells in the same Western blot. For peptide competition assays, the anti-CCM3 antibody was preincubated with a twofold molar excess of the immunizing peptide before use.

Immunohistochemical Analysis

Sections of human organ tissue were obtained from the Department of Pathology at Yale University School of Medicine (Human Investigation Committee no. 7680) and processed as described previously (10, 11). A rabbit polyclonal primary antibody against CCM3 or CCM2 was used at a 1:250 dilution. The immune reactions were developed with 1, 4-dimethylaminoazobenzene, and the sections were counterstained with hematoxylin. For a negative control, we

used non-immune-reactive isotypes as primary antibodies for immunohistochemical staining. No immunoreactivity was detected (data not shown).

RESULTS

Confirmation of the CCM3/PDCD10 Antibody

Antibody specificity was determined by comparison of protein lysates from Cos7 cells transfected with a green fluorescent protein (GFP)-tagged CCM3 construct with those from untransfected control Cos7 cells. Expression of endogenous CCM3/PDCD10 in the cell lines was confirmed after RT-PCR (Fig. 1A). Kidney fibroblasts (Cos7), BAECs, and neuroblastoma (N2A) cell lines demonstrated endogenous expression. Cos7 cells were used for subsequent assays because of their relative ease of culture and transfection efficiency. Western blot analysis indicated that the CCM3/PDCD10 antibody recognized a protein of the expected size of 25 kDa in cell lines and 52 kDa in transfected cells (human CCM3 clone, ~25 kDa, plus GFP protein, ~27 kDa) in extracts of the transfected Cos7 cells (Fig. 1B, center). Specificity was confirmed by a twofold molar excess peptide competition with the immunizing peptide (Fig. 1B, right). Transfection efficiency of Cos7 cells was confirmed with an antibody to GFP (Fig. 1B, left).

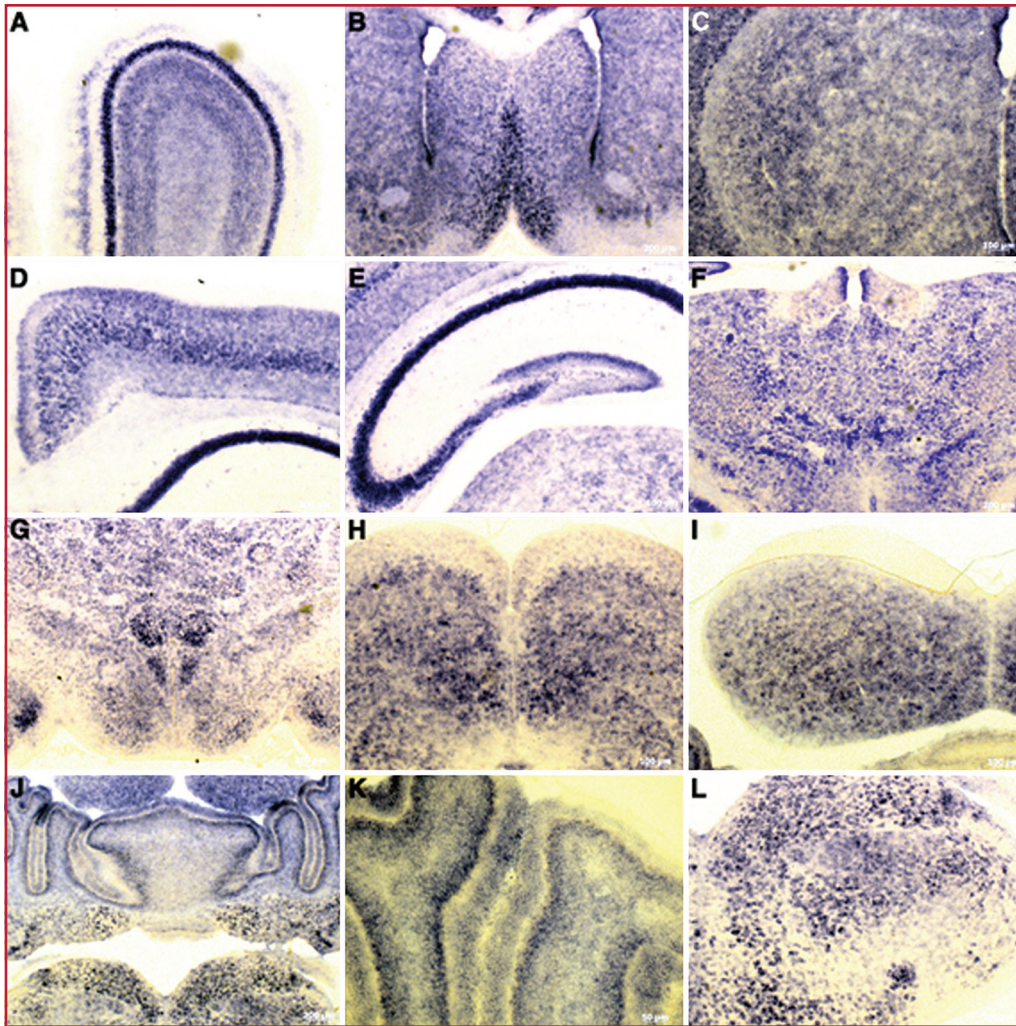


FIGURE 3. Analyses of PDCD10 (CCM3) mRNA distribution in mouse embryonic and postnatal brain. Higher-magnification images show structures detailed in Figure 2, including **A**, olfactory bulb; **B**, septum; **C**, striatum; **D**, neocortex; **E**, hippocampus and dentate gyrus; **F**, thalamus; **G**, hypothalamus; **H**, superior colliculus; **I**, inferior colliculus; **J**, cerebellum and deep cerebellar nuclei; **K**, higher magnification of cerebellar cortex; and **L**, medulla.

CCM3 Messenger RNA Expression in Mouse Cerebral Tissue

To focus on the temporal and special expression of CCM3 during development, we chose an embryonic and postnatal mouse model. A previous study demonstrated that CCM3 mRNAs are expressed in cortical vessels from the embryo to postnatal Day P8, but not by P19 (18). We characterized CCM3 mRNA expression in the CNS by in situ hybridization in mouse embryos and 1- and 2-week-old animals. At embryonic Day E16.5 (Fig. 2, A–E), strong expression of CCM3 was detected in the neural tube and especially in the ventricular zone, where radial glial cells are generated. This highlights a potential role in neurogenesis. Expression was high in the subventricular and intermediate zones, and lower in the developing cortical plate. Other prominent sites of CCM3 expression include the develop-

ing septum and striatum. Expression was low in the developing midbrain but high in the developing pons, cerebellum, and medulla.

We analyzed CCM3 mRNA distribution in the CNS of animals at P8 and P14. At P8 (Fig. 2, F–J; higher magnification of structures seen in Fig. 3), we detected strong expression in the olfactory bulb (especially in the mitral cell layer; Fig. 3A), striatum, and many septal nuclei (Fig. 3, B and C) and the neocortex (all layers, but expression appears higher in pyramidal cells; Fig. 3D). CCM3 expression is prominent in the hippocampus and the dentate gyrus (Fig. 3E) and present in many thalamic and hypothalamic nuclei (Fig. 3, F and G). CCM3 mRNA is detected in the superior and inferior colliculus of the midbrain at this stage (Fig. 3, H and I), whereas, in the cerebellum, expression is prominent in the Purkinje cell layer and lower, but clearly detectable in the external granule cell layer as well as in the granule cells that have migrated to the internal granule layer. The deep cerebellar nuclei strongly express CCM3 mRNA (Fig. 3, J and K). Finally, expression is high and widespread in many cells and nuclei in the medulla (Fig. 3L).

For animals examined at P14 (Fig. 2, K–O), this pattern is essentially unchanged. Expression in the neocortex appears stronger in the deep layers, remains prominent in the septum and the piriform cortex, and continues to be detected in the thalamus, hypothalamus, hippocampus, dentate gyrus, and inferior colliculus. In the cerebellum, CCM3 mRNA expression remains particularly strong in the Purkinje cells but appears downregulated in the internal granule cell layer. Many neurons and nuclei in the medulla continue with high levels of CCM3 expression.

To test species specificity of the anti-CCM3/PDCD10 antibody that we generated and characterized, we performed in situ hybridization and immunofluorescence experiments in parallel on sections from P14 mouse brain. As expected, strong CCM3 mRNA expression was detected in the Purkinje cells (Fig. 4A). Strong immunoreactivity was detected in the cyto-

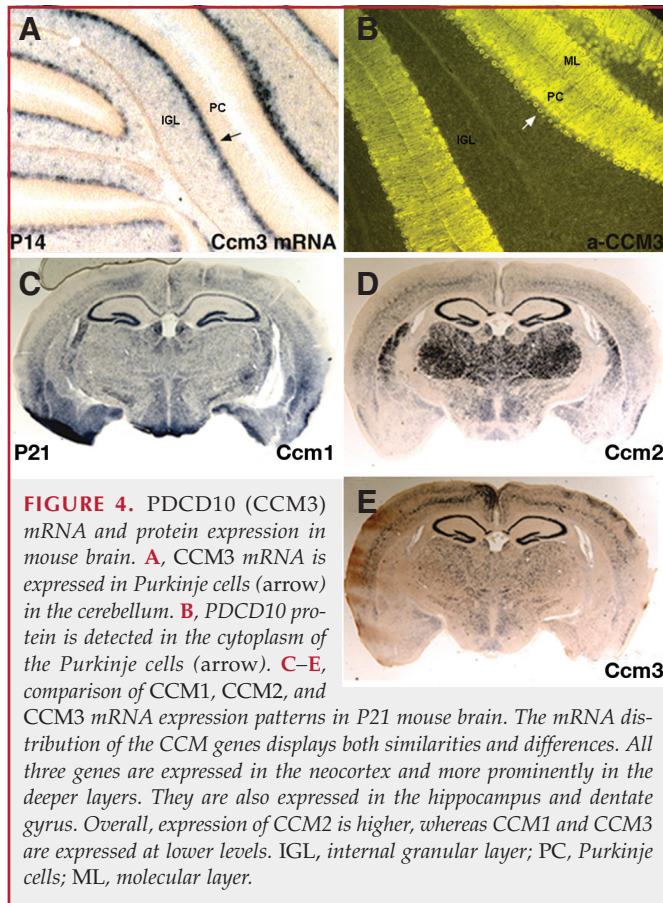


FIGURE 4. PDCD10 (CCM3) mRNA and protein expression in mouse brain. **A**, CCM3 mRNA is expressed in Purkinje cells (arrow) in the cerebellum. **B**, PDCD10 protein is detected in the cytoplasm of the Purkinje cells (arrow). **C–E**, comparison of CCM1, CCM2, and CCM3 mRNA expression patterns in P21 mouse brain. The mRNA distribution of the CCM genes displays both similarities and differences. All three genes are expressed in the neocortex and more prominently in the deeper layers. They are also expressed in the hippocampus and dentate gyrus. Overall, expression of CCM2 is higher, whereas CCM1 and CCM3 are expressed at lower levels. IGL, internal granular layer; PC, Purkinje cells; ML, molecular layer.

plasm of Purkinje cells, thereby demonstrating the antibody’s cross-reactivity with mouse CCM3/PDCD10 protein.

Finally, we compared mRNA expression of CCM1, CCM2, and CCM3 in sections from a 3-week-old mouse brain. Expression of all three genes was detected in the olfactory bulb, cortex, thalamic nuclei, hippocampus and dentate gyrus, inferior colliculus, Purkinje cells in the cerebellum, and pontine and medullary nuclei. In one representative example of adjacent sections through the same brain (Fig. 4, C–F), all three genes were expressed in the neocortex, and this expression was more prominent in the deeper layers. Furthermore, all three genes share strong expression in the hippocampus and dentate gyrus. CCM2 mRNA is prominent in the thalamus, where both CCM1 and CCM3 are expressed at lower levels.

Analysis of PDCD10 (CCM3) Expression in Human Cerebral Tissue

Using immunohistochemical staining, we studied the expression patterns of CCM3/PDCD10 in human cerebral tissue. We further compared CCM3/PDCD10 protein expression with that of CCM2. In human cerebellum (Fig. 5), CCM2 protein is seen in astrocytes (Fig. 5A) and arterial endothelium (Fig. 5B) and is weakly seen in venous endothelium (Fig. 5C). Similarly, CCM3/PDCD10 expression is observed in Purkinje cells and

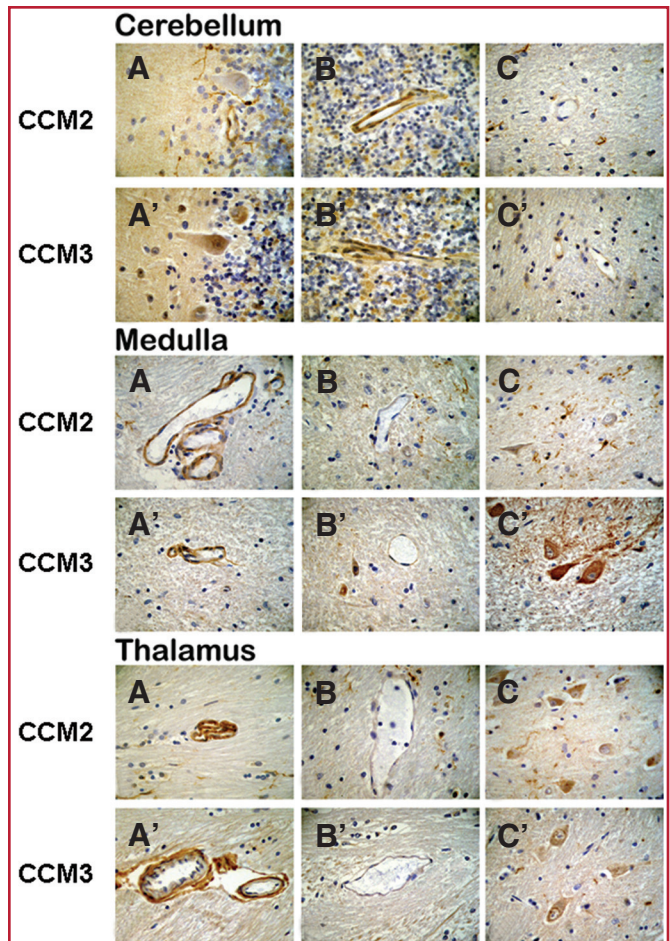


FIGURE 5. CCM3/PDCD10 and CCM2 protein distribution in the human central nervous system. In the cerebellum, CCM2 expression was absent in Purkinje cells but present in astrocytes (B). In comparison, CCM3/PDCD10 expression was observed in Purkinje cells and glia (A’). CCM2 and CCM3/PDCD10 protein expression was detected in arterial endothelia but only weakly in venous endothelia (A, B’, C, C’). This same pattern of protein expression of CCM2 and CCM3/PDCD10 was observed in the medulla and thalamus (A, A’ and B, B’). CCM2 and CCM3/PDCD10 expression was also observed in the pyramidal cells of medulla and thalamus (C’).

glia (Fig. 5A’) and arterial endothelium (Fig. 5B’), but its expression is relatively weak in venous endothelium (Fig. 5C’). A clear difference is the absence of CCM2 protein expression in Purkinje cells (Fig. 5A). In human medulla, both CCM2 and CCM3/PDCD10 protein expression is observed in arterial endothelium (Fig. 5, A and A’, respectively), is weak in venous endothelium (Fig. 5, B and B’, respectively), and overlaps in expression in pyramidal cells (Fig. 5, C and C’, respectively). Similar staining results were observed in the thalamus (Fig. 5).

In the human cortex, strong immunoreactivity to CCM3/PDCD10 was observed in arterial endothelium (Fig. 6A) and glial cells (Fig. 6B, arrows), and weak or no immunoreactivity

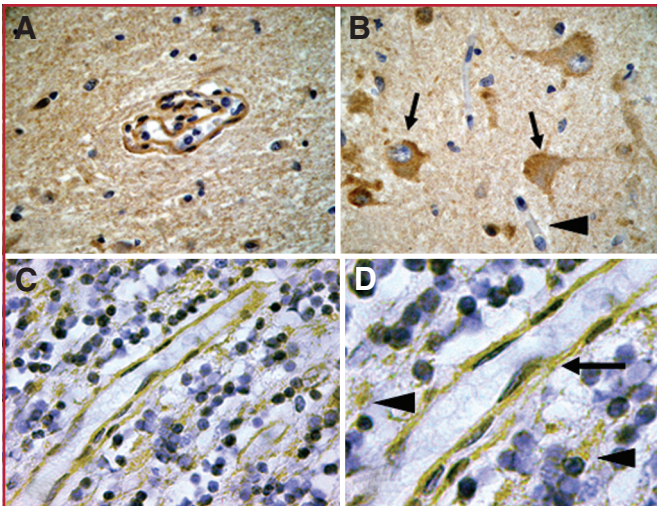


FIGURE 6. CCM3/PDCD10 protein expression in the human cortex. CCM3/PDCD10 protein expression was strong in cortical arterial endothelium (A) and was also observed in the cytoplasm of large pyramidal neurons (B, arrows), but was weakly expressed or absent from cortical venous endothelium (B, arrowhead). Similar protein expression intensity is shown in the cerebellum (C and D, higher magnification) with staining observed in vessels (arrow) and neurons (arrowheads).

was observed in venous endothelium (Fig. 6B, arrowhead). CCM3/PDCD10 immunoreactivity is also observed in cerebellar neurons within the granule cell layer (Fig. 6, C and D, arrowheads) in close proximity to vessels (Fig. 6, C and D, arrow).

CCM3/PDCD10 Expression in Human Extracerebral Tissue

CCM3/PDCD10 also localizes to various epithelia in human extracerebral tissue (Fig. 7, A–L). Expression was detected in the hepatic arteriolar branches (Fig. 7, A and B, arrow) and bile duct (Fig. 7, A and B, white arrow), but not in the portal vein (Fig. 7, A and B, arrowhead). In the skin, CCM3/PDCD10 was expressed in hair follicles and glands (Fig. 7, C and D, arrow) and in arterial endothelium (Fig. 7, C and D, arrowhead), but is weakly expressed in venous endothelium (Fig. 7, C and D, white arrow). In the kidney, CCM3/PDCD10 was detected in the epithelium of the proximal tubules (Fig. 7, E and F, arrow) but was absent in the glomerulus (Fig. 7, E and F, arrowhead). In the lung, CCM3/PDCD10 was present in the alveolar cells (Fig. 7G, arrow) and the columnar epithelium of the bronchioles (Fig. 7H, arrow). Expression was observed in the endothelium of central arteries in the white pulp of the spleen (Fig. 7, I and J, arrows) and in the endothelium of arterioles and capillaries of skeletal muscle (Fig. 7, K and L, arrows).

DISCUSSION

CCM is a common form of intracranial vascular malformation. Three genes known to cause familial forms of CCM have now been identified; however, their function and role in lesion

development are only beginning to be understood. Because the lesions in all three familial forms of CCM are essentially indistinct phenotypically, we had previously hypothesized that these genes all participate in a common pathway (3). Thus, the disruption of this pathway would lead to similar manifestations of disease. Furthermore, recent evidence suggests that all three genes may directly interact in a complex (25). To test this hypothesis, we previously compared the expression of CCM1 and CCM2 and determined that they shared a similar pattern both spatially and temporally (20). In the present study, we report the expression pattern of CCM3/PDCD10, the third gene mutated in CCM, in the developing mouse brain and in human organ tissues and compare it with CCM1 and CCM2 expression patterns.

In developing mouse brain, CCM3 expression is most robust in areas where CNS angiogenesis occurs (neocortex, ventricular, and subventricular zones) as well as in the radial glia of the developing neural tube, which suggests a role in embryonic neurogenesis. Phenotypic investigation of this finding warrants additional investigation. Petit et al. (18) previously demonstrated the ubiquitous expression of the three CCM genes in mice from embryo to P19 and claim an absence of expression of CCM2 and CCM3 after P19. Our results confirm their *in situ* results from mouse embryo of CCM3 mRNA in the various CNS regions shown in Figures 2 and 3; however, we observed strong expression up to P21.

At P21, the distribution of the three CCM genes exhibits both similarities and differences. In general, all three are expressed at this stage, but overall, expression of CCM2 is stronger, whereas CCM1 expression appears diffuse and CCM3 expression appears to be the lowest of the three. The distribution of expression in subcortical gray matter is also similar. Although the expression pattern of CCM3 is less ubiquitous or intense than CCM1 or CCM2, the domains or regions of the brain that exhibit expression are similar among all three transcripts (hippocampus, neocortex, and dentate gyrus).

The mouse *in situ* results do not offer clear insight into the phenotype of CCM, specifically with respect to location of lesion formation. Instead, these data provide insight to the temporal and spatial patterns of CCM3/PDCD10 expression during central nervous system development. Indeed, studies on mice have proven to be somewhat insightful with respect to human CNS disease phenotypes, with numerous limitations. An example is human Type I lissencephaly disorder and the more severe Miller-Dieker syndrome. The human phenotypes of Type I lissencephaly and Miller-Dieker syndrome are caused by mutations in *Lis1* and *14-3-3 epsilon* leading to a dramatic CNS cortical development phenotype, whereas the mouse knockout phenotype is arguably subtle (12, 22). Nevertheless, the mouse model and expression studies offer great insight into the underlying genetic mechanisms of neuronal migration. In a similar fashion, analysis of *in situ* CCM gene expression, in the absence of knockout data, is an important first step in the elucidation of its underlying role in CNS development.

To confirm our findings on the basis of *in situ* analysis of mRNA expression at the protein level, we investigated the

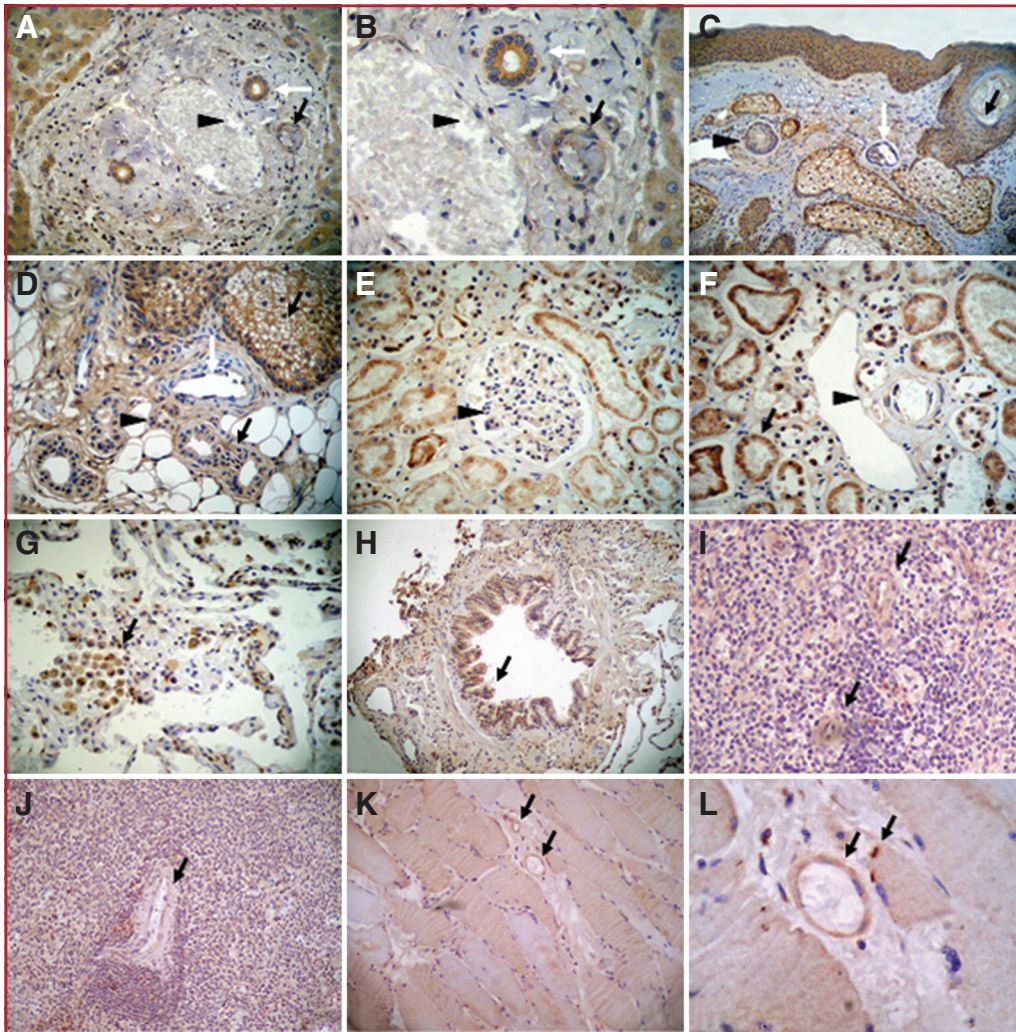


FIGURE 7. CCM3/PDCD10 protein expression in extracerebral tissues. CCM3/PDCD10 localizes to various epithelia in human extra cerebral tissue (A–L). Expression was detected in the hepatic arteriolar branches (A and B, arrow) and bile duct (A and B, white arrow), but not in the portal vein (A and B, arrowhead). In the skin, CCM3/PDCD10 was expressed in hair follicles and glands (C and D, arrow) and in arterial endothelium (C and D, arrowhead), but is very weakly expressed in venous endothelium (C and D, white arrow). In kidney, CCM3/PDCD10 was expressed in the epithelium of the proximal tubules (E and F, arrow) but was absent in the glomerulus (E and F, arrowhead). In lung, CCM3/PDCD10 was present in the alveolar cells (G, arrow) and the columnar epithelium of the bronchioles (H, arrow). Expression was observed in the endothelium of central arteries in the white pulp of the spleen (I–J, arrows) and in the endothelium of arterioles and capillaries of skeletal muscle (K and L, arrows).

expression pattern of CCM3/PDCD10 in human tissue using immunohistochemical staining. These data demonstrate that, similar to CCM1 and CCM2 (2, 4, 10, 11, 18–20), CCM3/PDCD10 is expressed in the endothelium both in cerebral and extracerebral tissue. Again, PDCD10 expression is strong in arterial and capillary endothelium and is weak or absent from the venous side of circulation, which adds additional support to our proposal that CCM represents an arterial phenotype and is important in establishing an arterial identity in the developing vasculature.

We also detected CCM3/PDCD10 expression in the CNS within the cytoplasm of large pyramidal cells of the thalamus,

cortex, and medulla and in the Purkinje cells and some glial cells in the molecular layer of the cerebellum. As was demonstrated in CCM1 and CCM2 expression studies, CCM3/PDCD10 expression is suggestive that it may play a role in the cross-talk between brain parenchyma and endothelium and specifically in the communication between the neural structures and the endothelium. The disruption of CCM3/PDCD10 function caused by mutations may result in CCM lesion formation by dysregulation of this cross-talk at the level of the neurovascular unit. This hypothesis might explain why CCM lesions are CNS-specific despite expression of all three genes in extracerebral tissues. This hypothesis will need to be tested with *in vivo* functional studies.

It remains unclear how the CCM3 expression domains in the mammalian embryonic and adult CNS observed in this study correlate to the severity of disease phenotype or lesion location. The development of a mouse knockout model of CCM3 mutations will provide insight linking gene expression differences to phenotype. Our study (Fig. 4) demonstrates some clear differences between CCM1, CCM2, and CCM3 expression in adult mice (Fig. 4, P21); therefore, one could hypothesize that because there is a

difference in the temporal expression, the CCM proteins play different roles at different stages of CNS development and angiogenesis.

A specific interplay between the neuron and endothelium at the level of the neurovascular unit is crucial to the development of the brain and its vasculature, including assignment of arterial versus venous identity. CCM signaling may be acting at this level, and mutations in the three CCM genes might lead to a loss of this interaction and subsequently to a loss of an arterial phenotype in CNS-specific lesions. It is likely that the interaction among neurons, glia, and endothelia that would lead to

CCM lesions in patients harboring mutations is a process highly specific to the CNS.

CONCLUSION

Our data suggest that *CCM3/PDCD10* is widely expressed in both CNS and extracerebral tissues. Specific expression is seen in neurons, glia, and CNS endothelia (arterial more than venous), which suggests that its functional role is at the level of the neurovascular unit. These expression data provide insight into CCM lesion pathogenesis and support the hypothesis that the CCM genes play a role in CNS development and angiogenesis, and specifically in assigning an arterial identity. Additional functional evidence is necessary to prove this interaction at the level of the neurovascular unit.

REFERENCES

- Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E: Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 76:42–51, 2005.
- Clatterbuck RE, Eberhart CG, Crain BJ, Rigamonti D: Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood–brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 71:188–192, 2001.
- Craig HD, Günel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CT, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP: Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15–13 and 3q25.2–27. *Hum Mol Genet* 7:1851–1858, 1998.
- Denier C, Gasc JM, Chapon F, Domenga V, Lescoat C, Joutel A, Tournier-Lasserre E: *Krit1*/cerebral cavernous malformation 1 mRNA is preferentially expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult. *Mech Dev* 117:363–367, 2002.
- Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, Spetzler RF, Rich SS, Orr HT, Weber JL: A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 4:453–458, 1995.
- Guclu B, Ozturk AK, Pricola KL, Bilguvar K, Shin D, O’Roak BJ, Gunel M: Mutations in apoptosis-related gene, *PDCD10*, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery* 57:1008–1013, 2005.
- Gunel M, Awad IA, Finberg K, Anson JA, Steinberg GK, Batjer HH, Kopitnik TA, Morrison L, Giannotta SL, Nelson-Williams C, Lifton RP: A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med* 334:946–951, 1996.
- Günel M, Awad IA, Finberg K, Steinberg GK, Craig HD, Cepeda O, Nelson-Williams C, Lifton RP: Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery* 38:1265–1271, 1996.
- Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP: *KRIT1*, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10677–10682, 2002.
- Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor NM, Voorhees J, Luleci G, Lifton RP, Gunel M: *KRIT1*/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery* 54:943–949, 2004.
- Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Amankulor NM, Voorhees JR, Gokce O, DiLuna ML, Laurans MS, Luleci G, Gunel M: *Krev1* interaction trapped-1/cerebral cavernous malformation-1 protein expression during early angiogenesis. *J Neurosurg* 100 [Suppl 5]:481–487, 2004.
- Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A: Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* 19:333–339, 1998.
- Johnson EW, Iyer LM, Rich SS, Orr HT, Gil-Nagel A, Kurth JH, Zabramski JM, Marchuk DA, Weissenbach J, Clericuzio CL: Refined localization of the cerebral cavernous malformation gene (*CCM1*) to a 4-cM interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. *Genome Res* 5:368–380, 1995.
- Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E: Truncating mutations in *CCM1*, encoding *KRIT1*, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet* 23:189–193, 1999.
- Laurans MS, DiLuna ML, Shin D, Niazi F, Voorhees JR, Nelson-Williams C, Johnson EW, Siegel AM, Steinberg GK, Berg MJ, Scott RM, Tedeschi G, Enevoldson TP, Anson J, Rouleau GA, Ogilvy C, Awad IA, Lifton RP, Gunel M: Mutational analysis of 206 families with cavernous malformations. *J Neurosurg* 99:38–43, 2003.
- Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA: Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet* 73:1459–1464, 2003.
- Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA: Low frequency of *PDCD10* mutations in a panel of *CCM3* probands: Potential for a fourth *CCM* locus. *Hum Mutat* 27:118, 2006.
- Petit N, Blécon A, Denier C, Tournier-Lasserre E: Patterns of expression of the three cerebral cavernous malformation (*CCM*) genes during embryonic and postnatal brain development. *Gene Expr Patterns* 6:495–503, 2006.
- Plummer NW, Squire TL, Srinivasan S, Huang E, Zawistowski JS, Matsunami H, Hale LP, Marchuk DA: Neuronal expression of the *Ccm2* gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. *Mamm Genome* 17:119–128, 2006.
- Seker A, Pricola KL, Guclu B, Ozturk AK, Louvi A, Gunel M: *CCM2* expression parallels that of *CCM1*. *Stroke* 37:518–523, 2006.
- Tole S, Patterson PH: Regionalization of the developing forebrain: A comparison of *FORSE-1*, *Dlx-2*, and *BF-1*. *J Neurosci* 15:970–980, 1995.
- Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello MJ, Cardoso C, Leventer R, Ward HL, Ayala R, Tsai LH, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A: 14-3-3 epsilon is important for neuronal migration by binding to *NUDEL*: A molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* 34:274–285, 2003.
- Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell’Acqua ML, Johnson GL: *Rac-MEKK3-MKK3* scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol* 5:1104–1110, 2003.
- Verlaan DJ, Roussel J, Laurent SB, Elger CE, Siegel AM, Rouleau GA: *CCM3* mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology* 65:1982–1983, 2005.
- Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbor U: *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics* 8:249–256, 2007.
- Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA: *KRIT1* association with the integrin-binding protein *ICAP-1*: A new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (*CCM1*) pathogenesis. *Hum Mol Genet* 11:389–396, 2002.
- Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA: *CCM1* and *CCM2* protein interactions in cell signaling: Implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet* 14:2521–2531, 2005.
- Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC: Interaction between *krit1* and *icap1alpha* infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet* 10:2953–2960, 2001.
- Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE: Interaction between *krit1* and malcavernin: Implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery* 60:353–359, 2007.

Acknowledgments

This study was supported by National Institutes of Health/National Institute of Neurological Disorders and Stroke grant R01 NS-046521 to Murat Gunel,

M.D., and is part of the Ph.D. thesis of Gamze Tanriover, M.Sc., who was partially supported by the Research Fund of Akdeniz University, Antalya, Turkey.

COMMENTS

The authors report striking similarities between the distributions of primary degenerative cerebral disease (PDCD)10/cerebral cavernous malformation (CCM)3 and CCM1 and CCM2 in developing mice, although this is not universal given the example of lack of coherence in Purkinje cells. The authors point out that the expression of these gene products in arterial and capillary tissue, but not in venous tissue, suggests that cavernous malformations are an arterial deviant phenotype. They further suggest that because the CCM gene is also expressed in neurons that there is somehow communication between the neurons and the surrounding vascular tissue based on this gene and that this combination makes up a neurovascular unit. Although there is certainly great influence by neural metabolism on surrounding arterioles, I am skeptical that the fact that a neuron and an arteriole share a gene expression pattern implies that they are communicating with each other in some sort of specific unitized format. I think this conclusion is not justified by these data. This does not lessen the genetic insights to be gained in the mechanisms of cavernous malformation pathogenesis by this report.

Charles J. Hodge, Jr.
Syracuse, New York

This is another nice piece of work by the Yale neurovascular group, adding a new piece to the puzzle of CCM pathogenesis and how mutations in one or more of the putative genes may lead to the abnormal vascular phenotype. The concept of a common disease pathway is appealing, where the three respective gene products (KRIT1, Malcavernin, and PDCD10) would be involved in joint functional interaction, so that a mutation in one of the loci can disturb the same molecular functional unit. Expression of PDCD10 in the neurovascular unit, as apparently demonstrated in this study, would seem to support that hypothesis. The apparently selective neural cell expression may explain in part the propensity of CCM lesions to form within neural parenchyma, even when a germ line mutation would be expected to affect every cell in the body.

One might ask why all the fuss about this particular disease. For one, CCM is one of the most prevalent pathologic vascular phenotypes, affecting more than a million Americans and predisposing them to potential epilepsy, stroke, or other sequelae. Only a handful of laboratories are currently engaged in serious funded research on this disease, and they have made fantastic discoveries in recent years. In comparison, less prevalent diseases, such as multiple sclerosis and neurofibromatosis, have had substantially greater funding, investigative critical mass, and time. It remains a mystery why some CCM lesions grow and proliferate, and others stay quiescent and asymptomatic. Many lesions are apparently sporadic, often in association with venous developmental anomaly, whereas others are familial, inherited in autosomal dominant fashion in association with three gene loci. It is not known what mechanisms predispose one to such an abnormal phenotype of proliferative hemorrhagic dysangiogenesis in only a tiny fraction of cases of venous developmental anomaly, what triggers the genesis of a lesion in these or familial cases, and why lesions so often form in neural parenchyma and more rarely elsewhere. The answers to these questions may teach us much about the human neurovascular unit and shed light on other neurovascular diseases. CCM is very much a paradigm disease, allowing the testing of hypotheses that will prove relevant more broadly in neurogenetics (and the interaction of host predisposition and acquired factors), in neurovascular disease (and its sequelae of

hemorrhagic stroke and epilepsy), and even in the fine line between a hamartoma and a tumor. Novel molecular diagnoses and therapies would surely arise from these discoveries.

Of course, mere coexpression in background tissue, as demonstrated by the authors, does not necessarily imply functional molecular interactions. There is no evidence that PDCD10 plays a role in sporadic or familial cases other than CCM3. A molecular interaction has been shown between KRIT1 and Malcavernin, and it is hoped that ongoing biochemistry work will better clarify the nature and signaling function of that unit and how PDCD10 protein may interact with it. Such work as reported by Gunel et al. is an important step in assembling the complex puzzle of this disease.

Issam A. Awad
Evanston, Illinois

Dr. Gunel's group continues to lead in defining the genetics and pathogenesis of brain cavernous malformations. This impressive body of work characterizes the expression of PDCD10, the third gene mutated in cavernous malformations, in the brains of mice and in human tissues. All three of the involved genes are expressed in developing mouse brain in areas involved in angiogenesis, such as the subventricular, ventricular, and intermediate zones, as well as in the neurons and arteries of adults. These necessary beginning characterizations and development of reagents to detect the message and protein will form the basis for working out the pathogenesis of these lesions. It is of interest that although mesenchyme around the brain grows into it to vascularize it from the outside, this is not well detected here. It may be the method of processing the tissue that removes much of this layer. Future studies need to characterize subcellular localization of these proteins. If, as hypothesized, the CCM1 or CCM2 form complexes with RAC1-MEKK3-MKK3 and participates in cell adhesion, then does this have to occur only in endothelial cells? And if so, why only in the brain?

R. Loch Macdonald
Toronto, Canada

The CCM genes 1 to 3 encode a diverse group of proteins that have been implicated in autosomal dominant CCMs. Characterization of these genes during normal development and interpretation of the mechanistic basis for why mutations in these genes cause vascular anomalies remain important questions in this field. This study, from one of the leading laboratories in the genetics of cavernous malformations, presents novel data detailing the expression pattern of CCM3 in the murine nervous system, human brain, and human extracerebral tissues. They characterize a polyclonal antibody directed against CCM3 to evaluate tissue protein expression and assess the developmental expression of CCM3 mRNA, comparing it with that of CCM1 and CCM2.

The experiments are well executed and yield new insights into the possible developmental role of CCM3. The authors draw appropriate conclusions from these data. Although the expression pattern of CCM3 and presence in neurons and arterial endothelium in the murine and adult brain are compelling, functional data will be required to establish a role for CCM3 in neurovascular development. It would also be of interest to explore the discrepancy in P19-P21 expression of CCM3 reported in the literature.

Overall, the authors make a valuable contribution in their annotation of the expression of CCM3 in the developing mouse brain and in human central nervous system and non-central nervous system tissue.

Ian F. Dunn
Robert M. Friedlander
Boston, Massachusetts

Stroke

American Stroke
AssociationSM

A Division of American
Heart Association



JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

Apoptotic Functions of PDCD10/CCM3, the Gene Mutated in Cerebral Cavernous Malformation 3

Leiling Chen, Gamze Tanriover, Hiroko Yano, Robert Friedlander, Angeliki Louvi
and Murat Gunel

Stroke published online Feb 26, 2009;

DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.527135

Stroke is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2009 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0039-2499. Online
ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org>

Subscriptions: Information about subscribing to *Stroke* is online at
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Apoptotic Functions of *PDCD10/CCM3*, the Gene Mutated in Cerebral Cavernous Malformation 3

Leiling Chen, MD; Gamze Tanriover, MSc; Hiroko Yano, PhD; Robert Friedlander, MD; Angeliki Louvi, PhD; Murat Gunel, MD

Background and Purpose—Mutations in the *Programmed Cell Death 10 (PDCD10)* gene cause autosomal dominant familial cerebral cavernous malformations (CCM3). To date, little is known about the function of this gene and its role in disease pathogenesis.

Methods—We examined the effects of overexpression of wild-type and 2 human disease-causing variants of *PDCD10* on cell death using 3 different methods (TUNEL and MTT assays and caspase-3 activation). We analyzed expression of CCM3, activated caspase-3, and p38 in endothelial cell lines using the serum deprivation model of apoptosis induction. Finally, we assayed the effects of siRNA-mediated inhibition of endogenous *PDCD10* expression on cell death in endothelial cell cultures.

Results—Overexpression of wild-type CCM3, but not disease-linked mutant forms, induced apoptosis as confirmed by TUNEL and increased levels of activated caspase-3. Serum starvation of endothelial cells, an inducer of apoptosis, led to increased expression of CCM3 and activation of p38 and ultimately activated caspase-3. siRNA-mediated inhibition of CCM3 expression resulted in decreased levels of p38 and activated caspase-3, and decreased cell death.

Conclusions—CCM3 is both necessary and sufficient to induce apoptosis in vitro in well-defined cell culture systems. Even though it is currently unclear whether this effect on apoptosis is direct or indirect through modulation of cell cycle, these results led to the novel hypothesis that CCM lesions may form as a consequence of aberrant apoptosis, potentially altering the balance between the endothelium and neural cells within the neurovascular unit. (*Stroke*. 2009;40:00-00.)

Key Words: cerebral cavernous malformations ■ CCM3 ■ PDCD10 ■ apoptosis ■ p38 ■ caspase-3

Cerebral cavernous malformations (CCM) are vascular lesions affecting almost exclusively the central nervous system (CNS) and the retina.¹ Grossly, they are a collection of enlarged sinusoidal vascular channels almost resembling a raspberry.¹ Ultrastructurally, these channels are lined by a single layer of endothelium, lack normal vessel wall elements such as smooth muscle and are devoid of intervening normal CNS parenchyma.^{2,3} These lesions can occur sporadically, or as a familial form attributable to mutations in 3 different genes: *Krev1 Interaction Trapped 1 (KRIT1*; alternative name: *CCM1*), *CCM2 (malcavernin)* and *Programmed Cell Death 10 (PDCD10*; alternative name: *CCM3*).^{4–14} Overall, mutations in these 3 genes account for approximately 96% of familial cases.¹⁵ Despite the identification and characterization of these 3 CCM genes, several questions regarding this complex disorder remain unanswered. These include a sophisticated understanding of the function of the CCM genes and how mutations lead to formation of lesions that almost exclusively affect the CNS and are focal in nature. It has been suggested that the CCM lesions may be the consequence of

hemorrhage-induced proliferation, a process by which abnormal vascular beds cause reactive angiogenesis with new vessel formation and coalescence,¹⁶ but mechanistic insight into lesion formation is lacking.

Recent molecular biological studies on the CCM1 and 2 proteins shed some light into their functions. CCM1 was shown to bind to microtubules in vitro^{17–19} and to interact individually with Krev1/Rap1a,^{19–21} ICAP1a (integrin cytoplasmic domain associated protein 1 alpha),^{22,23} β -catenin,²¹ and CCM2²⁴ in various in vitro systems. CCM2 binds CCM1 and MEKK3 in a ternary complex and acts as a scaffolding protein signaling through p38 after extracellular stimulation.^{24,25} p38 pathway is known to be important in diverse physiological processes ranging from proliferation to differentiation to apoptosis.²⁶ More recently, CCM3 was shown to be a part of this complex in vitro.^{18,27,28}

Despite this recent progress, little is known about the biological functions of the CCM3 protein. It was first identified through a screen of genes expressed during the induction of apoptosis in a premyeloid cell line.¹¹ Recent evidence suggests

Received May 28, 2008; final revision received September 20, 2008; accepted October 3, 2008.

From the Departments of Neurosurgery and Neurobiology and the Yale Program on Neurogenetics (L.C., G.T., A.L., M.G.), Yale University School of Medicine, New Haven, Conn; the Department of Histology and Embryology (G.T.), Akdeniz University, Antalya, Turkey; and the Department of Neurosurgery (H.Y., R.F.), Brigham and Women's Hospital, Boston, Mass.

Correspondence to Murat Gunel, MD, Department of Neurosurgery, Yale University School of Medicine, 333 Cedar St, New Haven, CT 06510. E-mail murat.gunel@yale.edu

© 2009 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.527135

that CCM3 binds to and is phosphorylated by serine/threonine kinase 25 (STK25) and is dephosphorylated by binding to the phosphatase domain of Fas-associated phosphatase-1.²⁷

Based on these limited data, we sought to investigate the biological function of CCM3 and specifically focused on its potential involvement in apoptotic pathways. We modulated CCM3 expression using cell culture based assays in vitro and examined its effects on cell death. Our results indicate that CCM3 has a proapoptotic function in the cell culture models tested and led to the novel hypothesis that CCM lesions potentially form as a result of aberrant apoptosis in the vasculature within the neurovascular unit.

Methods

Cell Culture

HeLa cells were plated in high glucose DMEM supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, and 1% L-glutamine. Primary human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from the Vascular Biology and Transplantation Program at Yale University (New Haven, Conn). HUVECs were grown in M199 medium with 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% endothelial cell growth supplement (ECGS), on gelatin-coated (0.1%) plates (J.T. Baker Inc). Cells used in this study were obtained between passages 3 and 6. For serum starvation assays, HUVECs were seeded on 0.1% gelatin coated culture slides and after 48 hours of attachment in standard media, cells were washed in 0.2% FBS medium, followed by an additional 24-hour incubation in 0.2% FBS.

Expression Vector Construction

A PCR-amplified human *PDCD10/CCM3* (*hCCM3*) cDNA fragment was subcloned into XhoI and HindIII sites of the pEGFP-C3 vector (Clontech) or a pRFP-C3 vector containing monomeric red fluorescent protein, resulting in a C-terminal GFP- or RFP-tagged CCM3, respectively. Both expression constructs are indistinguishable in terms of transfection efficiency and cytotoxicity in HeLa cells (data not shown). Expression plasmids carrying two human disease causing *PDCD10/CCM3* point mutations (*c.283C>T* and *c.192delA*)¹² were generated from the pEGFP-C3-*hCCM3* plasmid using a standard mutagenesis kit (Stratagene). All constructs were verified by direct sequencing.

Transfections

HeLa cells were seeded (1×10^5) in 6-well plates. The pEGFP-C3-*hCCM3* or pRFP-C3-*CCM3* and pEGFP-C3 or pRFP-C3 (empty) plasmids were transfected into the cell lines using with lipofectAMINE 2000 (Invitrogen Corp) according to the manufacturer's protocols. After overnight incubation at 37°C to ensure attachment, the cells were transfected with one of the previously mentioned plasmids encoding either the GFP-tagged wild-type *hCCM3*, *hCCM3* with a point mutation (*c.283C>T*), or a single base-pair deletion (*c.192delA*).

Western Blotting

Cells were harvested and total protein from the cells was extracted in a lysis buffer (50 mmol/L HEPES, pH:7.4, 150 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1.5 mmol/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1 mmol/L EGTA, 100 mmol/L NaF, 10 mmol/L sodium pyrophosphate and protease inhibitors, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10 mg/mL leupeptin, 10 mg/mL aprotinin and 4 mmol/L PMSF). Cell lysates were centrifuged to collect supernatant, and equal amounts of protein, 50 μ g/lane, (Bio-Rad protein assay system; Bio-Rad Laboratories) were separated with 10% or 4% to 20% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (Bio-Rad Laboratories) and transferred onto a PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). The membranes were incubated with primary antibodies: anticleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology Inc), antiphospho-p38 or antip38 (Cell Signaling Technology), anti-GAPDH (Santa Cruz), or anti-GFP (Sigma

Aldrich) followed by the appropriate fluorescence-conjugated (immunohistochemistry) or HRP-conjugated (Western blot) secondary antibodies.

Apoptosis Assays

Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium citrate for 2 minutes on ice and the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) reaction mixture (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR-red, Roche) was applied for 1 hour at 37°C. Cell counts were performed at 10 different fields in 5 separate transfection experiments.

Cell Viability Assays (MTT)

Cell viability was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) assay. Briefly, 72 hours after transfection, MTT was added to each well at a final concentration of 0.5 mg/mL for 4 hours; the cells were subsequently lysed in dimethyl sulfoxide (DMSO) and the amount of MTT formazan was quantified by determining the absorbance at 550 nm, using a microplate reader. Cell viability is expressed as a percentage of the control culture value (GFP plasmid transfection group).

PDCD10 siRNA Inhibition

HUVECs were seeded on 6-well plates (5×10^4 cells per well). After attachment overnight, cells were washed in PBS, and transfected with 3 sets of *PDCD10* Stealth select siRNAs (25 bp; Unigene ID: Hs.478150), following the manufacturer's protocol (Invitrogen Corporation). As control siRNA, stealth RNAi negative control (Invitrogen) was used. After 72 hours of incubation, HUVECs were washed and exposed to low serum (0.2% FBS). At different time points, HUVECs were harvested for Western blotting. The membranes were incubated with the following antibodies: antiphospho-p38 (Cell Signaling Technology), anti-CCM3,²⁹ or anti-GAPDH (Santa Cruz).

To quantify cell death occurring in the cultures, terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated UTP end labeling (TUNEL) analysis was performed as above. The percentage of apoptotic cells was calculated from the positively labeled cells in each field (400 \times) from at least 5 fields for each group.

Statistical Analyses

Data are presented as means \pm SE of absolute values or percent of control and were analyzed using either Student *t* test (Figures 1 and 2) or 1-way ANOVA (Figures 3 to 5). We initially performed a global ANOVA test to check for significance and when proven, proceeded with pair-wise comparisons to examine which groups were significantly different from the baseline. Bonferroni correction was applied to correct for multiple testing unless specified otherwise and $P < 0.05$ was considered significant. The global ANOVA probability values and Bonferroni corrected probability values for pair-wise ANOVA tests are reported.

Results

CCM3 Induces Apoptosis in HeLa Cells

We analyzed the effects of CCM3 overexpression in cell culture by transfecting HeLa cells with the expression plasmid pEGFP-C3-*hCCM3* (referred as GFP-CCM3 henceforth). GFP-CCM3 (wild-type) overexpression resulted in increased levels of apoptosis compared to vector alone (Figure 1). A significantly larger proportion of apoptotic cells with fragmented nuclei was observed in the population of GFP-positive (and, therefore, CCM3 expressing) cells transfected with GFP-CCM3 compared to those from control transfections with empty vector (Figure 1b). Protein expression of GFP and GFP-CCM3 was confirmed by immunoblotting with anti-GFP (Figure 1c).

We then investigated whether CCM3-mediated cell death is associated with caspase-3 activation. Caspase-3 has previously

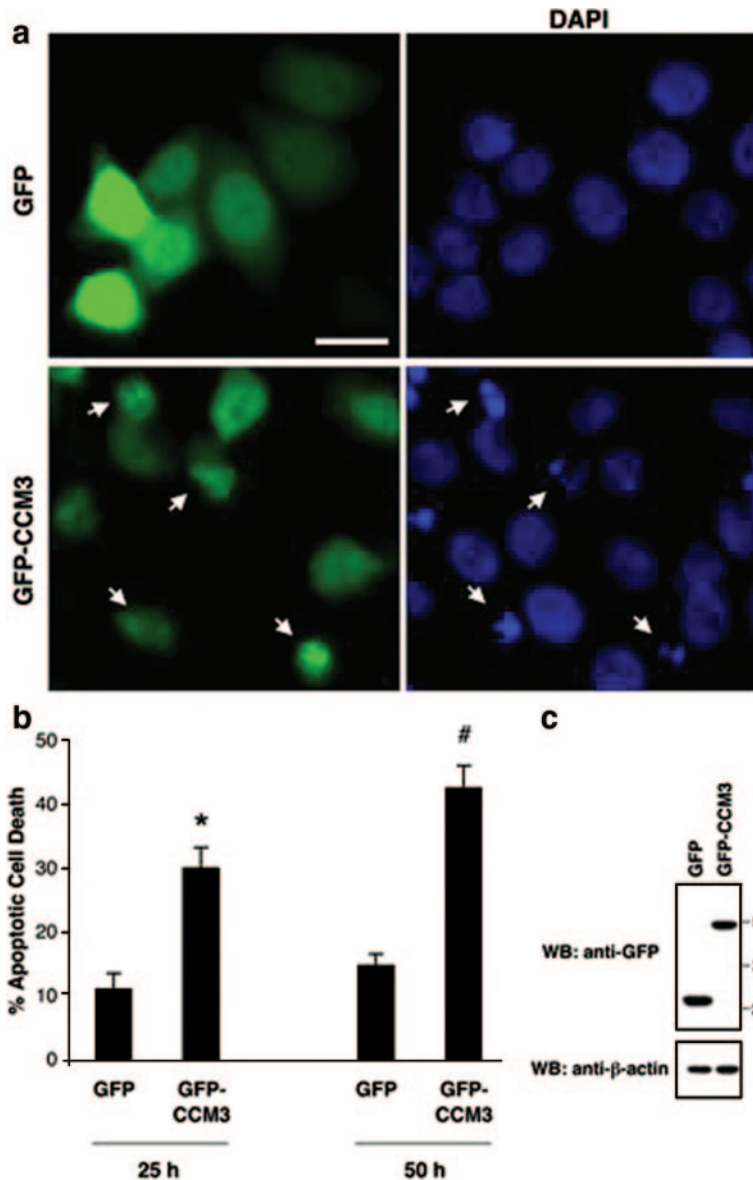


Figure 1. CCM3 overexpression induces apoptosis in HeLa cells. **a**, HeLa cells were transfected with vector alone or GFP-CCM3 constructs (see Methods). 50 hours after transfection, cells were fixed, and nuclei stained with DAPI (blue). Arrows point to the GFP-CCM3-positive cells (green) with condensed or fragmented apoptotic nuclei. Scale bar=20 μ m. **b**, GFP-positive cells were quantified for apoptosis by scoring apoptotic nuclear morphology as in **a**. The percentage of GFP-positive cells with apoptotic nuclei was represented as mean \pm SEM from 3 and 4 independent experiments for the 25- and 50-hour time point, respectively (left panel). * $P<0.002$, significant difference from GFP-transfected cells; # $P<10^{-3}$, significant difference from GFP-transfected cells (by Student *t* test). **c**, Protein expression of GFP and GFP-CCM3 25 hours after transfection was confirmed by immunoblotting with anti-GFP. Anti- β -actin was used as loading control (bottom panel).

been established as a terminal executioner of the apoptotic cell death pathway.³⁰ Activated caspase-3 was detected in apoptotic cells with fragmented/condensed nuclei expressing CCM3 (Figure 2). These data indicate that CCM3 overexpression in HeLa cells results in caspase-3 activation and cell death.

Disease-Causing Mutated CCM3 Fails to Induce Apoptosis

We had previously reported 4 novel disease-causing *PDCD10/CCM3* mutations in CCM families.¹² We introduced 2 of these point mutations (c.283C>T [M1], c.192delA [M2]) into the GFP-CCM3 expression vector. Both mutations lead to production of truncated proteins (Figure 3a). We tested the effects of overexpression of mutated forms of CCM3 in HeLa cells. As expected, overexpression of wild-type CCM3 resulted in increased cleaved caspase-3 levels, whereas overexpression of either mutant form of CCM3 (c.283C>T, c.192delA) had no effect on cleaved caspase-3 expression (Figure 3b). In addition, overexpression of either

CCM3 mutant resulted in reduced cell loss by the MTT assay compared to wild type CCM3 (Figure 3c), further suggesting that mutant forms of CCM3 fail to induce apoptosis.

Serum-Deprivation of Endothelial Cells Results in Increased CCM3 Levels

Expanding on a previously established assay for the induction of apoptosis in endothelial cells,³⁰ we cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in low-serum media. Serum-deprived HUVECs demonstrated an increase in cleaved caspase-3 protein levels by Western blotting after 3 hours as expected (Figure 4a). Interestingly, CCM3 expression increased on serum-deprivation starting at approximately 30 minutes, before the increase in cleaved caspase-3 levels (Figure 4b). After serum starvation, reincubation of cells in normal media (20% FBS) allows for cell recovery and restores (reduces) CCM3 expression to normal levels (Figure 4c). To establish the mechanism of this increase in CCM3 expression, we incubated the cells with different concentra-

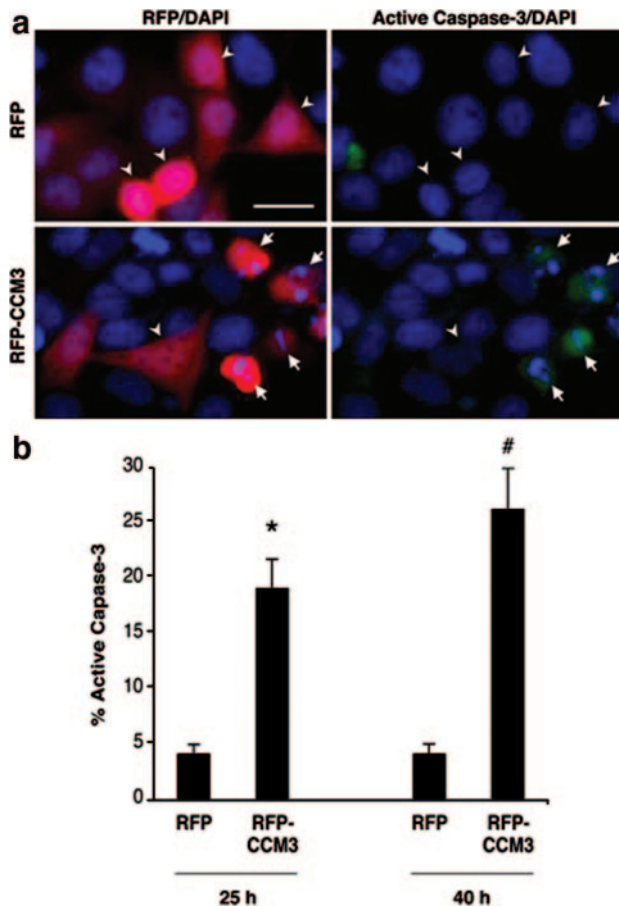


Figure 2. CCM3 activates caspase-3 in HeLa cells. a, HeLa cells were transfected with vector alone or the RFP-CCM3 construct. 40 hours after transfection, cells were fixed and immunostained with FITC-conjugated anticleaved caspase-3 (green), and nuclei were labeled with DAPI (blue). Arrows point to RFP-CCM3-positive cells (red) that are immunoreactive for activated caspase-3. Arrowheads represent transfected cells that are not activated caspase-3 immunoreactive. Scale bar=20 μ m. b, RFP-positive cells were assessed for caspase-3 activation by scoring activated caspase-3-immunoreactivity as indicated in a. Histogram represents mean \pm SEM from 3 independent experiments for the 25-hour and 40-hour time point, respectively. * $P < 10^{-3}$, significant difference from RFP-transfected cells; # $P < 10^{-3}$, significant difference from RFP-transfected cells (by Student *t* test).

tions of actinomycin D, a transcription inhibitor. Actinomycin D treatment inhibits CCM3 expression confirming that serum starvation causes an increase in CCM3 through transcriptional control (Figure 4d).

Because of previous evidence that the CCM1/2 complex signals through p38^{24,25} combined with the possibility that CCM1, 2, and 3 may all interact,^{18,27,28} and signal through either the same or parallel pathways, we hypothesized that CCM3 might also signal through p38. Consistent with this hypothesis, serum deprivation that results in an increase in CCM3 levels also resulted in a bimodal increase in activated phosphorylated p38 (p-p38) and activated caspase-3 levels. Although the levels of p-p38 increase dramatically almost immediately on serum withdrawal, this early peak may not be related to increased CCM3 expression, as it occurs early after challenge, and before CCM3 levels significantly change at about 1 hour following serum starvation (Figure 4e).

In summary, serum deprivation of endothelial cells results in increases in CCM3 and phosphorylated p38 protein levels followed by caspase-3 activation.

siRNA Inhibition of CCM3 Expression Reduces Endothelial Cell Apoptosis During Serum Deprivation

Using the same serum-starvation model, we then reduced CCM3 protein levels with siRNAs as described in Methods. HUVECs treated with CCM3 siRNA demonstrated decreased levels of cell death, as shown by the TUNEL assay (Figure 5a and 5b). We then evaluated whether the reduction of cell death correlated with reduction of caspase-3 activation. Serum-starved HUVECs also demonstrated decreased activated caspase-3 levels after treatment with CCM3 siRNA (Figure 5c). This decrease in CCM3 and activated caspase-3 levels correlates with decreased p38 activation after CCM3 siRNA transfection compared to cells treated with siRNA controls (stealth RNAi negative control; Figure 5d).

Discussion

Because CCM lesions in all 3 inherited forms of the disease are clinically and pathologically nearly identical, we had hypothesized over 10 years ago that genes causing familial cavernous malformations CCM1, 2, and 3 (*KRIT1*, *CCM2*, and *PDCD10*, respectively) all participate in a common or parallel pathways,^{7,12,31} and thus disruption of signaling would lead to similar disease manifestations. To test this hypothesis, we previously investigated the expression patterns of CCM1, 2, and 3 and showed that these proteins spatially and temporally show similar expression patterns.^{29,31–33} These proteins are specifically expressed throughout the endothelium in many tissues and organs and within the neurovascular unit of the CNS that consists of astrocytes, neurons, and vascular endothelium.^{29,31–33} Consistent with this observation, recent data from yeast and mammalian systems demonstrate that CCM1, 2, and 3 physically interact,^{18,24,27,28} confirming findings in zebrafish which demonstrate that CCM1 and 2 act in a common pathway³⁴ with *ccm1* and *ccm2* mutants displaying comparable vascular defects.³⁵ Similarly, in vivo studies in the mouse based on *Ccm1* and 2 knockout models have revealed their nonredundant, vital roles in angiogenesis^{36,37} but failed to reveal any breakthrough insights into their function.

On the other hand, multiple levels of in vitro evidence suggest that the CCM genes might play a role in a variety of biological processes linking extracellular signals, including adhesion (through β 1 integrin^{22,23} or β -catenin²¹ interactions) or stress (including osmo- or mechano-stress) to various biological responses, including changes in morphology and proliferation.³⁸ In this article, we present data that link CCM signaling to apoptotic pathways.

Indeed, in vitro work has shown that the CCM1 protein, KRIT1, binds to microtubules^{17,18} in a folded state.¹⁹ Both Rap1a and ICAP1 α can disrupt the association of KRIT1 with microtubules localizing it to endothelial cell-cell junctions.^{19,21} Interestingly, only ICAP1 α appears to be able to unfold KRIT1.¹⁹ After localization to the cell membrane through its FERM domain, KRIT1 binds to β -catenin and plays a role in stabilizing adherens junctions and regulates

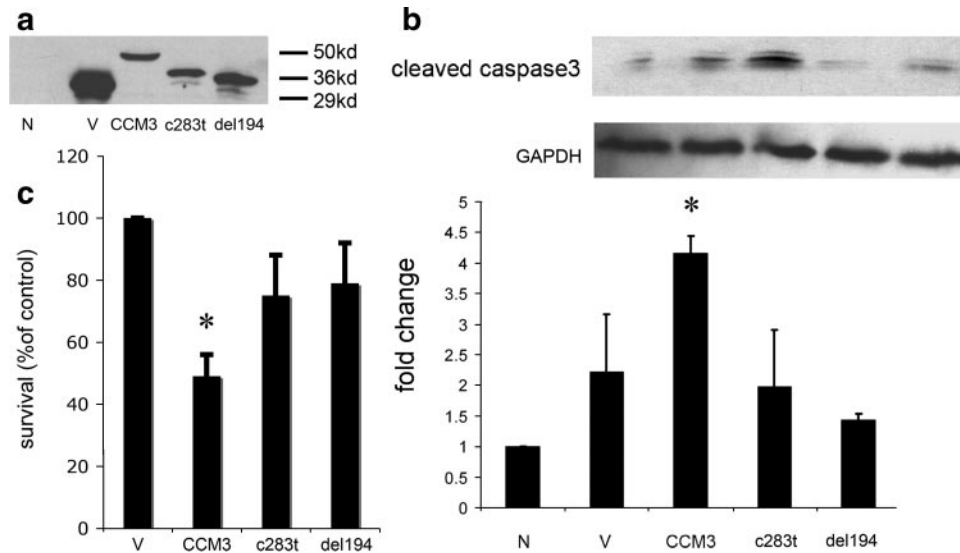


Figure 3. Mutant CCM3 fails to induce cell death in HeLa cells. Transient transfections in HeLa cells with the following expression plasmids: N=untransfected; V=vector alone; CCM3=wild-type GFP-CCM3 construct; M1=GFP-CCM3 construct harboring the 283C>T mutation; M2=GFP-CCM3 construct harboring the 192delA mutation. a, Western blotting for anti-GFP demonstrates transfection efficiency. HeLa cells were transiently transfected, cell lysates were prepared and immunoblotted with an antibody against GFP. The anti-CCM3 antibody²⁹ is downstream to the mutated sequences and thus fails to recognize the truncated protein. b, Transfection with wild-type CCM3 increases activated caspase-3 expression levels, whereas transfection with either mutated CCM3 construct has no effect on cleaved caspase-3 expression. * $P < 0.05$ compared with untransfected group ($n=3$). c, Transfections with mutated CCM3 fail to elicit significant cell loss in comparison with wild-type CCM3. Cell viability was measured using the MTT assay (see Methods) and is graphed as a percentage of the control culture value (GFP vector alone transfection group) as quantified by determining the absorbance of cell cultures at 550 nm. * $P < 0.05$ vs GFP plasmid transfection group ($n=3$).

endothelial permeability.²¹ Through its NPXY domains, KRIT1 also binds CCM2,²⁴ potentially recruiting CCM2 to these junctions. CCM2 has been identified as a human paralog of the mouse *osmosensing scaffold protein for MEKK3 (OSM)*, which, after binding with CCM1 and potentially this complex, might participate in the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) stress signaling pathway.^{24,25} More recent evidence suggests that CCM3, at least in certain biological states, might be part of this complex.^{18,27,28} Furthermore, on activation of this complex, CCM1 shuttles from the cytoplasm and the cell membrane into the nucleus and therefore might interact with other nuclear molecules, including transcription factors, which might influence basic cellular functions such as proliferation and apoptosis.³⁹ Consistent with this hypothesis is the observation in *C. elegans*, in which *kri-1*, a CCM1 ortholog, interacts with DAF-16, a transcription factor, such that mutations in *kri-1* lead to an increase in life span.⁴⁰

Based on these observations, we investigated the biological functions of CCM3 using overexpression or siRNA-mediated inhibition of *PDCD10/CCM3* expression. Previously published studies showed CCM3 to be a part of a cohort of proteins upregulated on growth factor deprivation and apoptosis induction in the TF-1 premyeloid cell line¹¹ as well as in a fibroblast cell line.⁴¹ Based on these data which suggested that CCM3 might play a role in apoptosis signaling, we initially focused our attention at understanding the capacity of CCM3 to induce apoptosis in the absence of exogenous proapoptotic stimuli. Overexpression of CCM3 in HeLa cells was in fact sufficient to induce increased levels of cell death as evidenced by both nuclei morphology as well as caspase-3

activation, a well established common end pathway protein in apoptosis.^{30,42,43} This increase in apoptosis and activated caspase-3 levels was abrogated when cells were transfected with biologically inactive forms of CCM3, identified as mutations causing CCM in patients with the familial form of the disease.¹²

We then focused on whether CCM3 was induced in the presence of proapoptotic stimuli. With the induction of serum starvation in HUVECs, CCM3 levels increased concomitantly with increased levels of activated caspase-3 and p38. Interestingly, this increase in the percentage of apoptotic cells and activated caspase-3 and p38 expression levels was diminished when endogenous CCM3 was blocked by siRNA, suggesting that CCM3 might be necessary for induction of apoptosis in this in vitro model. Furthermore, although HUVECs represent a well-characterized model of endothelial cell responses in culture, it is always possible that in the context of the organism, endothelial cells behave differently. Thus, in vivo experiments are needed to extend and confirm these findings. In addition, even though some of the molecules involved in CCM signaling are known,¹⁸ many remain anonymous. Identification of these molecules along with in vivo experiments are needed to dissect the biological role of CCM signaling. Our results demonstrating CCM3 to be both necessary and sufficient for programmed cell death in cell culture models provide a novel insight into this complex pathophysiology.

The effects of CCM3 on apoptosis could be direct or indirect through cell cycle modulation. Previous evidence in the literature suggests that interference with cell cycle progression can lead to apoptosis.⁴⁴ If true, CCM signaling can

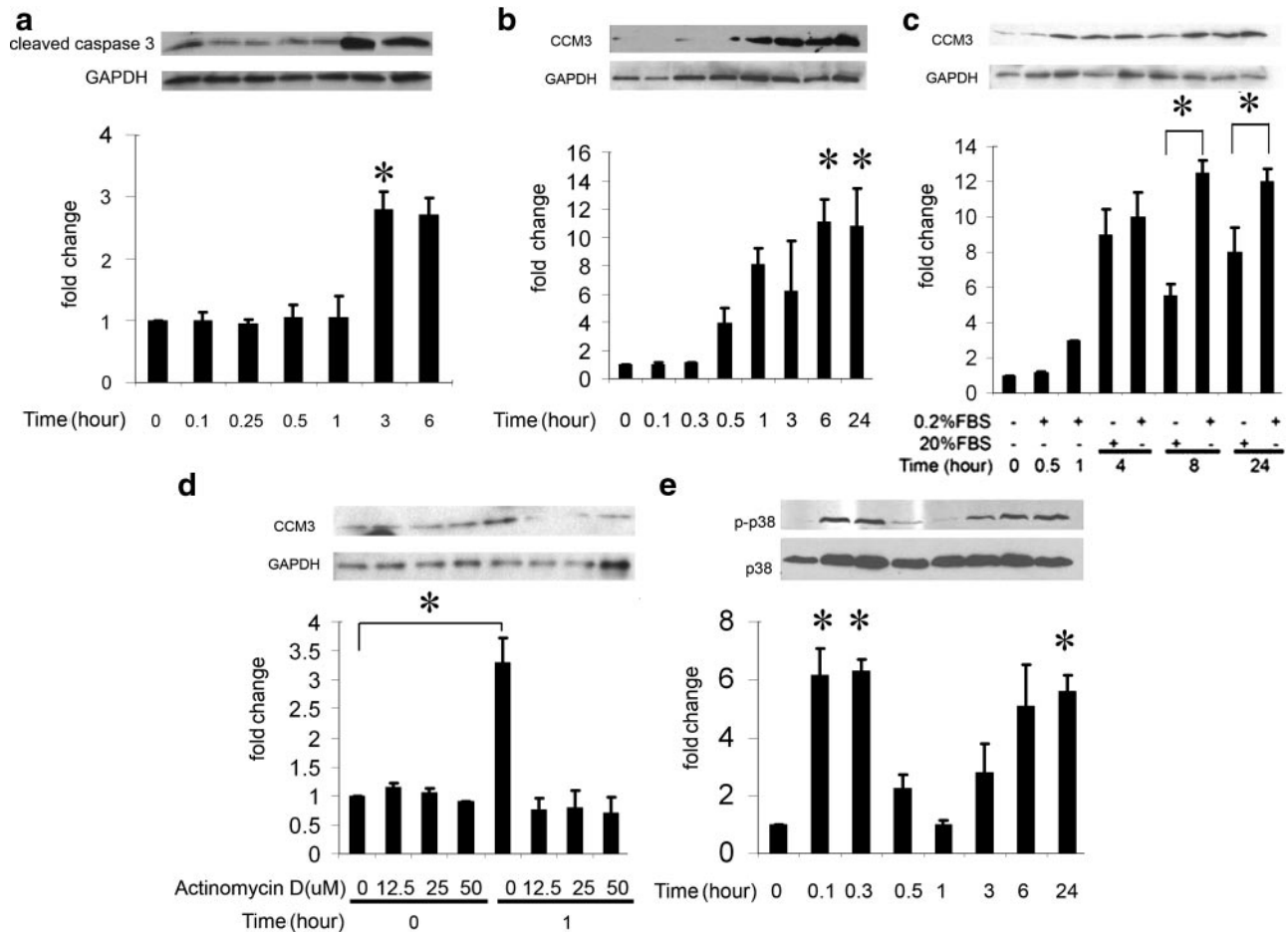


Figure 4. Serum deprivation of endothelial cells results in increased CCM3, activated caspase-3 and p38 levels. **a**, Serum-deprived HUVECs demonstrate an increase in cleaved caspase-3 levels starting at 3 hours post serum withdrawal (global ANOVA $P < 10^{-3}$). At different time points after serum withdrawal, cells lysates were prepared, and cleaved caspase-3 levels were detected with Western blotting. Graphed densitometric analysis of cleaved caspase-3 is normalized to GAPDH. *Corrected $P < 0.05$ compared with the group in 20% FBS at 0 hour ($n = 3$). **b**, CCM3 expression increases on serum deprivation starting at approximately 30 minutes, preceding the increase in cleaved caspase-3 levels as above (global ANOVA $P < 10^{-5}$). *Pair-wise corrected $P < 0.01$ compared with the group at 0 hour ($n = 3$). **c**, Addition of 20% FBS to the cell cultures reduces the increase in CCM3 expression elicited by serum deprivation. Cells were cultured under 0.2% FBS for 1 hour, then exposed to 20% FBS or remained in 0.2% FBS, as described in the Figure. * $P < 0.05$ compared between the 0.2% FBS treated group and the 20% FBS-treated group at 8- and 24-hour time points ($n = 3$). **d**, Actinomycin D treatment of serum-deprived HUVECs prevents the increase in CCM3 protein levels, indicating that serum deprivation causes an increase in CCM3 transcription. HUVECs were incubated with various concentrations of actinomycin D, a transcription inhibitor, for 4 hours in 20% FBS, then exposed to 0.2% FBS still containing various concentrations of actinomycin D; cell lysates were prepared after 1 hour, and CCM3 levels were investigated with Western blotting. *Corrected $P < 0.01$ compared with the group at 0 hour ($n = 3$). **e**, Serum deprivation results in increase in phosphorylation of p38, again preceding the increase in cleaved caspase-3 levels (see **a**; global ANOVA $P < 10^{-5}$). p38 phosphorylation increases dramatically on serum starvation at 5 minutes, followed by a second peak beginning at 3 hours after serum withdrawal. *Corrected $P < 0.05$ compared with non-0.2% FBS-treated group at 0 hour ($n = 3$).

affect both proliferation³⁸ and apoptosis in a cell type-dependent manner, potentially explaining observed effects of CCM3 on these biological processes. Further work will be needed to answer these questions. Our results, however, lead to the novel hypothesis of attenuated apoptosis affecting endothelial cells within the neurovascular unit as a molecular mechanism underlying cavernous malformations. If proven to be true in vivo, this might lead to a mechanistic understanding of the role of apoptosis and cell cycle control in CCM pathophysiology, potentially having significant implications in designing new therapies.

Conclusions

CCM3 is both necessary and sufficient to induce apoptosis in well-defined cell culture systems. These results led to a novel

hypothesis that CCM lesions may form because of aberrant apoptosis, potentially altering the balance between the endothelium and neural cells within the neurovascular unit. Even though it is currently unclear whether this effect on apoptosis is direct or indirect through modulation of cell cycle, the current data provide a testable hypothesis about CCM lesion development and has potentially important implications for a mechanistic understanding of CCM pathophysiology.

Acknowledgments

We thank Dr Katsuhito Yasuno for his help with statistical analysis.

Sources of Funding

This study was supported by NIH/NINDS grant RO1-NS046521 (to M.G.) and is part of the PhD thesis of G.T., who was partially supported by the Research Fund of Akdeniz University, Antalya, Turkey.

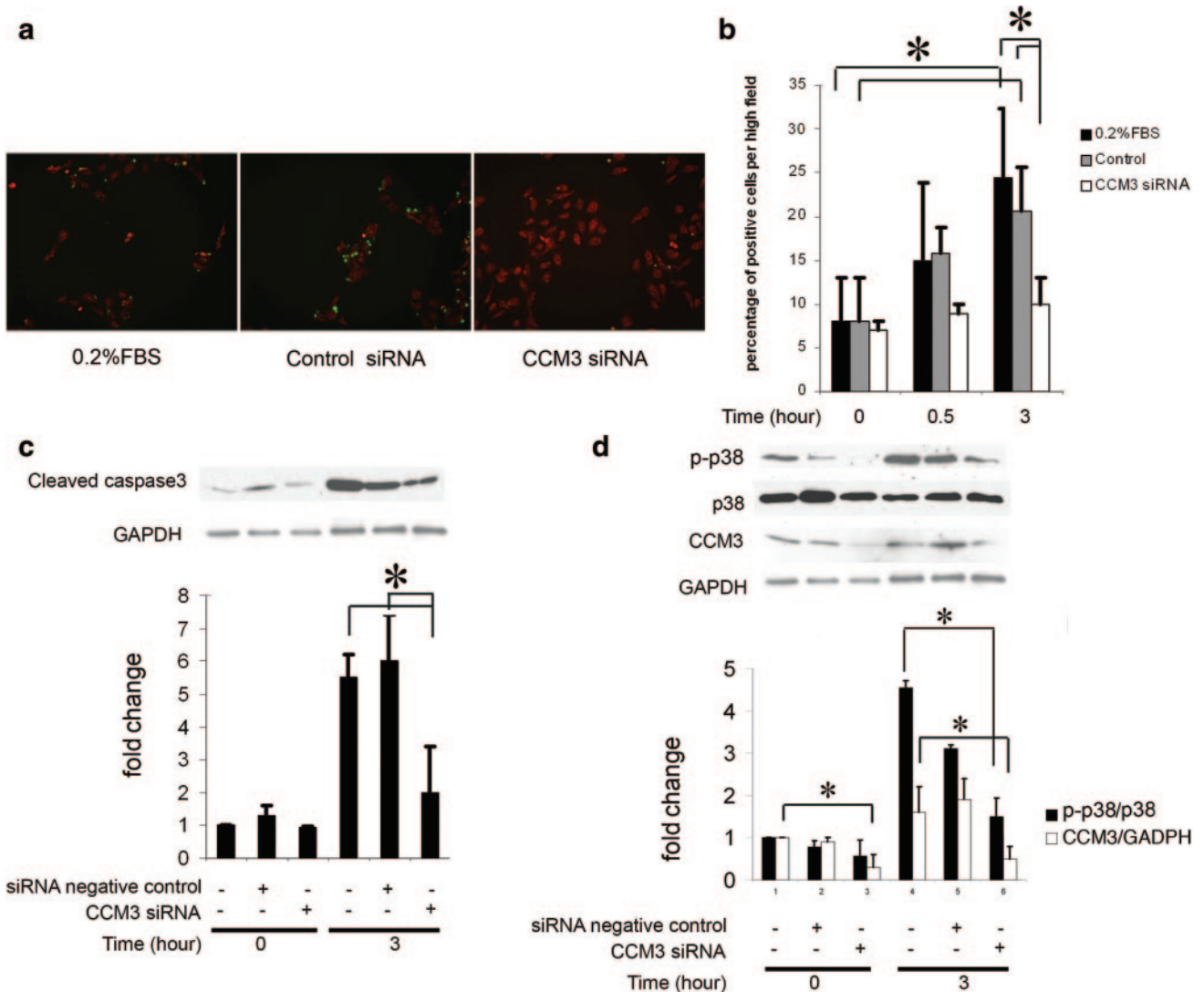


Figure 5. siRNA inhibition of CCM3 expression in endothelial cells results in decreased cell death, p38, and cleaved caspase-3 expression. **a**, Serum-deprived HUVECs treated with CCM3 siRNA show decreased cell death. Representative images (20× original magnification) at the 3-hour time point are shown for untransfected HUVECs (no siRNA group, left panel) or those transfected either with control siRNA (middle panel) or CCM3 siRNA (right panel). All groups were subjected to serum deprivation (see Methods) and cell death was analyzed at various time points by TUNEL assay. TUNEL-positive cells (green) are scarce in the sample treated with CCM3 siRNA (right panel) compared to those untreated (left panel) or treated with control siRNA (middle panel). **b**, The percentage of apoptotic cells was calculated from TUNEL-positive cells in each field (400×) and in at least 5 fields for each group (global ANOVA $P < 10^{-3}$ in both control groups across all time points and within the 3-hour group). *Corrected $P < 0.05$ compared with the equivalent groups before serum deprivation (0 hour; $n = 3$). **c**, Serum-deprived HUVECs show decreased cleaved caspase-3 levels after treatment with CCM3 siRNA (global ANOVA $P < 10^{-3}$ in both control groups across 2 time points). HUVECs were transfected with control siRNA or CCM3 siRNA, then were cultured under serum deprivation conditions (0.2% FBS). Cells lysates were prepared at various time points and cleaved caspase-3 levels were analyzed using Western blotting. Serum deprivation results in increase of cleaved caspase-3 in both the no siRNA and control siRNA treated groups, but not in the CCM3 siRNA-treated group. *Corrected $P < 0.05$ compared with the equivalent groups before serum deprivation (0 hour; $n = 3$). **d**, HUVECs treated with CCM3 siRNA demonstrate decreased p38 activation (global ANOVA $P < 10^{-3}$ in p-p38/p38 and CCM3/GSDPH groups across 2 time points). Similar to the procedure in **c**, serum deprivation results in increase of p38 activation and CCM3 protein levels in the no siRNA- and control siRNA-treated groups, but not in the CCM3 siRNA-treated group. *Corrected $P < 0.05$ compared with the equivalent groups at each time point ($n = 3$).

Disclosures

None.

References

- Russell DS, Rubenstein LJ. *Pathology of Tumors of the Nervous System*. Baltimore: Williams and Wilkins 1989.
- Tu J, Stoodley MA, Morgan MK, Storer KP. Ultrastructural characteristics of hemorrhagic, nonhemorrhagic, and recurrent cavernous malformations. *J Neurosurg*. 2005;103:903–909.
- Wong JH, Awad IA, Kim JH. Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: A preliminary report. *Neurosurgery*. 2000;46:1454–1459.
- Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, Spetzler RF, Rich SS, Orr HT, Weber JL. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet*. 1995;4:453–458.
- Johnson EW, Iyer LM, Rich SS, Orr HT, Gil-Nagel A, Kurth JH, Zabramski JM, Marchuk DA, Weissenbach J, Clericuzio CL, Davis LE, Hart BL, Gusella JF, Kosofsky BE, Louis DN, Morrison LA, Green ED, Weber JL. Refined localization of the cerebral cavernous malformation

- gene (CCM1) to a 4-cm interval of chromosome 7q contained in a well-defined yac contig. *Genome Res.* 1995;5:368–380.
6. Gunel M, Awad IA, Finberg K, Anson JA, Steinberg GK, Batjer HH, Kopitnik TA, Morrison L, Giannotta SL, Nelson-Williams C, Lifton RP. A founder mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Engl J Med.* 1996;334:946–951.
 7. Gunel M, Awad IA, Finberg K, Steinberg GK, Craig HD, Cepeda O, Nelson-Williams C, Lifton RP. Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery.* 1996;38:1265–1271.
 8. Craig HD, Gunel M, Cepeda O, Johnson EW, Ptacek L, Steinberg GK, Ogilvy CS, Berg MJ, Crawford SC, Scott RM, Steichen-Gersdorf E, Sabroe R, Kennedy CT, Mettler G, Beis MJ, Fryer A, Awad IA, Lifton RP. Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet.* 1998;7:1851–1858.
 9. Laberge-le Couteulx S, Jung HH, Labauge P, Houtteville JP, Lescoat C, Cecillon M, Marechal E, Joutel A, Bach JF, Tournier-Lasserre E. Truncating mutations in CCM1, encoding Krit1, cause hereditary cavernous angiomas. *Nat Genet.* 1999;23:189–193.
 10. Liquori CL, Berg MJ, Siegel AM, Huang E, Zawistowski JS, Stoffer T, Verlaan D, Balogun F, Hughes L, Leedom TP, Plummer NW, Cannella M, Maglione V, Squitieri F, Johnson EW, Rouleau GA, Ptacek L, Marchuk DA. Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2003;73:1459–1464.
 11. Bergametti F, Denier C, Labauge P, Arnoult M, Boetto S, Clanet M, Coubes P, Echenne B, Ibrahim R, Irthum B, Jacquet G, Lonjon M, Moreau JJ, Neau JP, Parker F, Tremoulet M, Tournier-Lasserre E. Mutations within the programmed cell death 10 gene cause cerebral cavernous malformations. *Am J Hum Genet.* 2005;76:42–51.
 12. Guclu B, Ozturk AK, Pricola KL, Bilguvar K, Shin D, O'Roak BJ, Gunel M. Mutations in apoptosis-related gene, pcd10, cause cerebral cavernous malformation 3. *Neurosurgery.* 2005;57:1008–1013.
 13. Verlaan DJ, Roussel J, Laurent SB, Elger CE, Siegel AM, Rouleau GA. CCM3 mutations are uncommon in cerebral cavernous malformations. *Neurology.* 2005;65:1982–1983.
 14. Liquori CL, Berg MJ, Squitieri F, Ottenbacher M, Sorlie M, Leedom TP, Cannella M, Maglione V, Ptacek L, Johnson EW, Marchuk DA. Low frequency of pcd10 mutations in a panel of CCM3 probands: Potential for a fourth CCM locus. *Hum Mutat.* 2006;27:118.
 15. Labauge P, Denier C, Bergametti F, Tournier-Lasserre E. Genetics of cavernous angiomas. *Lancet Neurol.* 2007;6:237–244.
 16. Awad IA, Robinson JR Jr, Mohanty S, Estes ML. Mixed vascular malformations of the brain: Clinical and pathogenetic considerations. *Neurosurgery.* 1993;33:179–188; discussion 188.
 17. Gunel M, Laurans MS, Shin D, DiLuna ML, Voorhees J, Choate K, Nelson-Williams C, Lifton RP. Krit1, a gene mutated in cerebral cavernous malformation, encodes a microtubule-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:10677–10682.
 18. Hilder TL, Malone MH, Bencharit S, Colicelli J, Haystead TA, Johnson GL, Wu CC. Proteomic identification of the cerebral cavernous malformation signaling complex. *J Proteome Res.* 2007;6:4343–4355.
 19. Beraud-Dufour S, Gautier R, Albiges-Rizo C, Chardin P, Faurobert E. Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. *FEBS J.* 2007;274:5518–5532.
 20. Serebriiskii I, Estojak J, Sonoda G, Testa JR, Golemis EA. Association of Krev-1/Rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. *Oncogene.* 1997;15:1043–1049.
 21. Glading A, Han J, Stockton RA, Ginsberg MH. Krit-1/CCM1 is a rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. *J Cell Biol.* 2007;179:247–254.
 22. Zawistowski JS, Serebriiskii IG, Lee MF, Golemis EA, Marchuk DA. Krit1 association with the integrin-binding protein ICAP-1: A new direction in the elucidation of cerebral cavernous malformations (ccm1) pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2002;11:389–396.
 23. Zhang J, Clatterbuck RE, Rigamonti D, Chang DD, Dietz HC. Interaction between Krit1 and icap1alpha infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. *Hum Mol Genet.* 2001;10:2953–2960.
 24. Zawistowski JS, Stalheim L, Uhlik MT, Abell AN, Ancrile BB, Johnson GL, Marchuk DA. CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: Implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2521–2531.
 25. Uhlik MT, Abell AN, Johnson NL, Sun W, Cuevas BD, Lobel-Rice KE, Horne EA, Dell'Acqua ML, Johnson GL. Rac-mekk3-mkk3 scaffolding for p38 MAPK activation during hyperosmotic shock. *Nat Cell Biol.* 2003;5:1104–1110.
 26. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15:11–18.
 27. Voss K, Stahl S, Schleider E, Ullrich S, Nickel J, Mueller TD, Felbro U. CCM3 interacts with CCM2 indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. *Neurogenetics.* 2007;8:249–256.
 28. Stahl S, Gaetner S, Voss K, Brackertz B, Schleider E, Surucu O, Kunze E, Netzer C, Korenke C, Finckh U, Habek M, Poljakovic Z, Elbracht M, Rudnik-Schoneborn S, Bertalanffy H, Sure U, Felbro U. Novel CCM1, CCM2, and CCM3 mutations in patients with cerebral cavernous malformations: In-frame deletion in CCM2 prevents formation of a CCM1/CCM2/CCM3 protein complex. *Hum Mutat.* 2008;29:709–717.
 29. Tanriover G, Boylan AJ, Diluna ML, Pricola KL, Louvi A, Gunel M. Pcd10, the gene mutated in cerebral cavernous malformation 3, is expressed in the neurovascular unit. *Neurosurgery.* 2008;62:930–938; discussion 938.
 30. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/akt signal transduction pathway. Requirement for flk-1/kdr activation. *J Biol Chem.* 1998;273:30336–30343.
 31. Seker A, Pricola KL, Guclu B, Ozturk AK, Louvi A, Gunel M. CCM2 expression parallels that of CCM1. *Stroke.* 2006;37:518–523.
 32. Guzeloglu-Kayisli O, Amankulor NM, Voorhees J, Luleci G, Lifton RP, Gunel M. Krit1/cerebral cavernous malformation 1 protein localizes to vascular endothelium, astrocytes, and pyramidal cells of the adult human cerebral cortex. *Neurosurgery.* 2004;54:943–949; discussion 949.
 33. Guzeloglu-Kayisli O, Kayisli UA, Amankulor NM, Voorhees JR, Gokce O, DiLuna ML, Laurans MS, Luleci G, Gunel M. Krev1 interaction trapped-1/cerebral cavernous malformation-1 protein expression during early angiogenesis. *J Neurosurg.* 2004;100:481–487.
 34. Mably JD, Chuang LP, Serluca FC, Mohideen MA, Chen JN, Fishman MC. Santa and valentine pattern concentric growth of cardiac myocardium in the zebrafish. *Development.* 2006;133:3139–3146.
 35. Hogan BM, Bussmann J, Wolburg H, Schulte-Merker S. CCM1 cell autonomously regulates endothelial cellular morphogenesis and vascular tubulogenesis in zebrafish. *Hum Mol Genet.* 2008;17:2424–2432.
 36. Whitehead KJ, Plummer NW, Adams JA, Marchuk DA, Li DY. CCM1 is required for arterial morphogenesis: Implications for the etiology of human cavernous malformations. *Development.* 2004;131:1437–1448.
 37. Plummer NW, Squire TL, Srinivasan S, Huang E, Zawistowski JS, Matsunami H, Hale LP, Marchuk DA. Neuronal expression of the CCM2 gene in a new mouse model of cerebral cavernous malformations. *Mamm Genome.* 2006;17:119–128.
 38. Ma X, Zhao H, Shan J, Long F, Chen Y, Zhang Y, Han X, Ma D. Pcd10 interacts with ste20-related kinase mst4 to promote cell growth and transformation via modulation of the erk pathway. *Mol Biol Cell.* 2007;18:1965–1978.
 39. Zhang J, Rigamonti D, Dietz HC, Clatterbuck RE. Interaction between krit1 and malcavernin: Implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. *Neurosurgery.* 2007;60:353–359; discussion 359.
 40. Berman JR, Kenyon C. Germ-cell loss extends *C. elegans* life span through regulation of daf-16 by kri-1 and lipophilic-hormone signaling. *Cell.* 2006;124:1055–1068.
 41. Busch CR, Heath DD, Hubberstey A. Sensitive genetic biomarkers for determining apoptosis in the brown bullhead (ameiurus nebulosus). *Gene.* 2004;329:1–10.
 42. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Cpp32, a novel human apoptotic protein with homology to caenorhabditis elegans cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem.* 1994;269:30761–30764.
 43. Kumar S. The apoptotic cysteine protease cpp32. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:393–396.
 44. Aylon Y, Oren M. Living with p53, dying of p53. *Cell.* 2007;130:597–600.