



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



Yüksek Lisans Tezi

**MEME KANSERİNDE RUNX2'NİN BAZI HÜCRELERARASI
MATRİKS PROTEİNLERİ VE ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Sevgi BİNAY

Biyoloji Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr.Engin KAPTAN**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 25.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

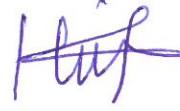
Tez Jürisi



Doç. Dr. Engin KAPTAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Hatice YORULMAZ
Haliç Üniversitesi
Tıp Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 25103 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim süresince tüm hoşgörölü ve samimi tavrı ile kıymetli bilgi, birikim ve tecrübelerini benimle paylaşan, tezimin araştırılmasından yazım aşamasına kadar fikir ve görüşleriyle beni destekleyen ve gelecekteki mesleki hayatımda da bana verdiği değerli bilgilerden faydalanacağımı düşündüğüm değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Engin KAPTAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çok değerli hocam Prof. Dr. Şehnaz BOLKENT'e eğitim hayatıma katkılarından dolayı minnet ve saygılarımı sunarım.

Deney aşamasında her zaman bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenden fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Serap SANCAR BAŞ'a teşekkür ederim.

Bilgi birikimini ve fikirlerini her zaman paylaşarak her konuda tüm güleryüzlülüğü ile yardımcı olmaya çalışan değerli hocam Prof. Dr. Selda GEZGİNCİ OKTAYOĞLU'na teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca teorik ve pratik tüm bilgilerini paylaşıp her konuda yardımcı olan, hem akademik hem de manevi destekleri için canım arkadaşım Araş. Gör. Merve ERÇİN'e, manevi destekleri için takım arkadaşım Biyolog Suna BEKTAŞ'a, Uzman Biyolog Cansu ÖZAL COŞKUN'a, Biyolog Ertan ÇELİK'e ve Biyolog Ezgi SARI'ya teşekkür ederim.

Lise yıllarımdan beri her zaman ve her konuda yanımda olan ve manevi desteklerini esirgemeyen dostlarım Elif ÇETİNKAYA SIMSIKI ve Soner YÜRÜLMEZ'e teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde en büyük desteği sağlayan, her zaman arkamda olan ve bana güvenen sahip olduğum en değerli varlık canım annem Tekcihan BİNAY'a, bu hayattaki iki iyikilerim canım ablalarım Çiğdem BİNAY'a ve İpek BİNAY'a teşekkürü bir borç bilirim ve minnetlerimi sunarım.

Kalbimin en güzel ve en derin yerinde taşıdığım kıymetli babam Ali BİNAY'a bugün olduğum kişi olabilmemi sağladığı için teşekkür ederim.

Haziran 2019

Sevgi BİNAY

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. KANSER.....	3
2.2. MEME KANSERİ	6
2.3. EKSTRASELLÜLER MATRİKS.....	6
2.3.1. Glikozaminoglikanlar	10
2.3.1.1. Hiyalüronan	10
2.3.1.2.Dermatan Sülfat.....	10
2.3.1.3.Keratan Sülfat	10
2.3.1.4.Kondroitin Sülfat	11
2.3.1.5. Heparan Sülfat.....	11
2.3.2. Proteoglikanlar	12
2.3.2.1. Ekstrasellüler Proteoglikanlar	12
2.3.2.2. Perisellüler ve Bazal Proteoglikanlar	13
2.3.2.3. Hücre Yüzey Proteoglikanları	14
2.3.2.4. İntrasellüler Proteoglikanlar	14
2.3.3. Fibröz Matrisellüler Proteinler	14
2.3.3.1. Kollagen.....	14
2.3.3.2. Laminin	15
2.3.3.3. Fibronektin	15
2.3.4. Matrisellüler Proteinler	16
2.3.4.1. Sisteince Zengin Salgılanmış Asidik Protein	16
2.3.4.2. Osteopontin.....	18

2.3.4.3. Lizil Oksidaz (LOX)	19
2.3.4.4. Heparanaz.....	20
2.4.RUNT İLİŞKİLİ PROTEİN(RUNX)	21
2.4.1. Runx1.....	23
2.4.2. Runx2.....	24
2.4.3. Runx3.....	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	26
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ	26
3.2. RUNX2 SİRNA UYGULANMASI	26
3.3. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ.....	27
3.3.1. Total RNA İzolasyonu.....	27
3.3.2. RNA Saflık, Miktar ve Kalite Tayini	28
3.3.3. cDNA Sentezi.....	29
3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	29
3.3.5. Primerlerin Tasarımı.....	30
3.3.6. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi	31
3.4. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ (WESTERN BLOTTING).....	32
3.4.1. Protein Lizatlarının Hazırlanması	32
3.4.2. Bradford Protein Tayini	32
3.4.3. %4-12 Bis-Tris Gradyent Jel Elektroforezi	32
3.4.4. Jeldeki Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarımı	33
3.5.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	33
4. BULGULAR.....	34
4.1. MCF-7 HÜCRELERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR.....	34
4.1.1. Runx2 siRNA Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde mRNA Seviyeleri	35
4.1.2. Runx2 siRNA Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Protein Seviyeleri	36
4.2.MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR	37
4.2.1. Runx2 siRNA Uygulanmış MDA-MB-231 Hücrelerinde mRNA Seviyeleri	38
4.2.2. Runx2 siRNA Uygulanmış MDA-MB-231 Hücrelerinde Protein Seviyeleri	39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
KAYNAKLAR.....	52
EKLER	73
ÖZGEÇMİŞ	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Hücre döngüsünün evrelerini gösteren şema. G1: DNA sentezine hazırlık fazı S: DNA replikasyonunun gerçekleştiği faz G2: DNA sentezinin tamamlandığı faz M: hücrenin bölünmeye başladığı mitoz fazı olarak ayrılır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolü fosforile olmuş siklin bağımlı kinazların (CDK) Siklinlerle bir araya gelip oluşturduğu birleşik yapılar tarafından kontrol edilir (www.sites.google.com'dan alınmıştır). 4
- Şekil 2.2:** Karsinogenez ve metastazın evreleri. Mutasyona uğramış genler hücre fenotipini değiştirip, onların fizyolojik koşullarında farklılık meydana getirmektedir. Hücrelerin olağan sürecinden farklı olarak anormal büyüklükte hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur. Kanserli hücreler kazandıkları bu yeni özellikler ile bulunduğu doku bölgesi olan birincil tümör alanından ayrılıp, dolaşımında hayatta kalırlar (intravazasyon). Daha sonra kan ve lenf damarlarıyla başka bölgelere (ikincil tümör) ulaşır çoğalmaya devam ederler. Kanserli hücrelerin tüm bu göç süreci metastaz olarak adlandırılır (www.ib.bioninja.com.au'dan alınmıştır). 5
- Şekil 2.3:** Glikozaminoglikan (GAG) yapıları. GAG'lar tekrarlayan disakkarid ünitelerinin bir araya gelip doğrusal polimerleri oluşturan heterojen polisakkaridlerdir. Heparin, Heparan Sülfat (HS), Keratan sülfat I (KSI), Keratan Sülfat II (KSII), Kondroitin sülfat(CS) ve Hiyalüronik Asit(HA)'ten oluşmaktadır. Hiyalüronik Asit hariç tüm GAG'lar bir protein iskeletine bağlıdır Keratan Sülfat ise protein iskeletine bağlanma bakiyeleri ile diğer GAG'lardan ayrılmaktadır. S harfi sülfat bağlanmalarını, Ser/Thr ifadeleri Serin/Treonin bakiyelerini ve Kretan Sülfat I'deki Asn ise Asparjin bakiyelerini göstermektedir(Merida-de-Barros ve diğ., 2018'den alınmıştır). 8
- Şekil 2.4:** ECM proteoglikanları bulundukları matriks alanına göre gruplandırılırlar. Bu gruplandırma ekstrasellüler proteoglikanlar, perisellüler proteoglikanlar, hücre yüzeyi proteoglikanları ve intrasellüler proteoglikanlar olmak üzere 4 sınıfta toplanmaktadır. Ekstrasellüler proteoglikanlar Hiyalektanlar ve küçük lösin bakımından zengin proteoglikanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Perisellüler proteoglikanlar perlekan, agrin ve Kollajen18 olmak üzere 3 gruba ayrılır. Hücre yüzey proteoglikanları ise transmembran ve GPI bağlantılı olmak üzere ikiye ayrılır. Son olarak intrasellüler proteoglikan örneği ise Serglikindir (Theocharis ve diğ., 2016'den alınmıştır). 9
- Şekil 3.1:** Deney ve kontrol gruplarının kalite kontrolü için rRNA alt birimlerine agoroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülendi..... 28
- Şekil 4.1:** MCF-7 hücre soyunda Runx2, HPA1, SPARC, LOX ve OPN ekspresyonunu gösteren western emdirim sonuçları. 34

Şekil 4.2: MCF-7 hücre soyunda Runx2 <i>knockdown</i> hücreler ile kontrol hücrelerinin mRNA transkript seviyelerinin agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmesi.....	35
Şekil 4.3: MCF-7 hücre soyunda Runx2 <i>knockdown</i> hücreler ile kontrol hücrelerinden elde edilen HPA1, LOX, SPARC, OPN ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren protein ekspresyon seviyeleri (Au) (sağda). Runx2 Kontrol $0,8080 \pm 0,02$; Deney $0,6036 \pm 0,01$; ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$). HPA1 Kontrol $1,052 \pm 0,03$; Deney $0,8747 \pm 0,001$; **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$). SPARC Kontrol $0,4659 \pm 0,06$; Deney $0,2117 \pm 0,01$; *Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,05$). LOX Kontrol $1,112 \pm 0,01$; Deney $0,8264 \pm 0,04$; **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$). OPN Kontrol $0,8029 \pm 0,01$ Deney $0,7586 \pm 0,02$	36
Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücre hattında Runx2, HPA1, SPARC, LOX ve OPN ekspresyonunu gösteren western emdirim sonuçları.	37
Şekil 4.5: MDA-MB-231 hücre soyunda Runx2 <i>knockdown</i> hücreler ile kontrol hücrelerinin mRNA transkript seviyelerinin agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmesi.....	38
Şekil 4.6: MDA-MB-231 hücre soyunda Runx2 <i>knockdown</i> hücreler ile kontrol hücrelerinden elde edilen HPA1, LOX, SPARC, OPN ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren protein ekspresyon seviyeleri (Au) (sağda). Runx2 Kontrol $0,8218 \pm 0,06$; Deney $0,4567 \pm 0,05$; ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$), HPA1 Kontrol $1,296 \pm 0,01$; Deney $1,050 \pm 0,03$; **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$). SPARC Kontrol $0,6591 \pm 0,05$; Deney $0,7524 \pm 0,03$; *Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,05$). LOX Kontrol $1,249 \pm 0,02$; Deney $0,9510 \pm 0,001$; ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$). OPN Kontrol $1,148 \pm 0,02$; Deney $0,8532 \pm 0,002$	39

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 2.1: Runt domain sınıfı ile ilişkili gen isimleri.	22
Tablo 3.1: Deney ve kontrol gruplarının RNA miktarları ve saflık değerleri.	28
Tablo 3.2: cDNA dönüşümü için gerekli reaksiyon karışım içeriği.	29
Tablo 3.3: PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımının hazırlanması.	30
Tablo 3.4: PCR yönteminde kullanılan döngüsel sıcaklık tablosu.	30
Tablo 3.5: PCR yönteminde kullanılan <i>revers</i> ve <i>forward</i> primer dizileri.	31

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AChR	: Asetilkolin reseptör
ADAM	: Disintegrin ve metalloproteinaz
AML	: Akut miyelojenöz lösemi
bFGF	: Basic fibroblast büyüme faktörü
BGN	: Biglikan
BM	: Bazal membran
BM-40:	: Bazal membran protein-40
BMP2	: Kemik morfogenetik protein-2
BRD4	: Bromodomain protein-4
BSP1	: Kemik sialoproteini 1
CBFα	: Çekirdek bağlayıcı faktör α
CDK	: Siklin-bağımlı kinaz
CIS	: Karsinoma in situ
CS	: Kondroitin sülfat
CSPG	: Kondroitin sülfat proteoglikan
DCIS	: Duktal karsinoma in situ
DMEM	: Dulbecco'nun modifiye eagle medyumunu
DMP1	: Dentin matriks protein 1
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DS	: Dermatan sülfat
DSPG2	: Dermatan sülfat proteoglikan-2
DSPP	: Dentin sialofosforprotein
EC	: Endotel hücreleri
ECM	: Ekstrasellüler matriks
EGF-bezeri	: Epitelial büyüme faktörü benzeri
EHS	: Engelbreth-Holm-Swarm
EMT	: Epitelial mezenkimal geçiş
ENAM	: Enamelin
ERBB	: Epitelial büyüme faktör reseptörü
ERK	: Ekstrasellüler sinyal düzenlenleyici kinaz

FADD	: Fas-bağlı protein gibi ölüm domaini
FBS	: Fetal bovine serum
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
FS	: Follistatin
GAG	: Glikozaminoglikan
Gal	: Galaktoz
GalNAc	: N-asetil galaktosamin
GlcA	: Glukuronik asit
GPI	: Glikofosfatidilinositol
HA	: Hiyalektanlar
HB-EGF	: Heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü
HER2	: İnsan epidermal büyüme faktörü reseptör-2
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HPA1	: Heparanaz
HRT	: Hair-ilişkili transkripsiyonel baskılayıcı
HS	: Heparan sülfat
HSPG	: Heparan sülfat proteoglikan
HUGO	: İnsan Genom Organizasyonu
IL	: İnterlökin
KS	: Keratan sülfat
LAM	: Laminin zinciri
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LKB1	: İnsan akciğer adenokarsinomlarında fonksiyon kaybı
LOX	: Lisil oksidaz
LPV	: Lösin-Prolin-Valin
Lz	: Lozenge (Drosophila)
M-CSFR	: Koloni stimüle edici faktör reseptörü
MAPK	: Mitojenle aktive olan protein kinaz
MEPE	: Matriks hücre dışı fosfoligoprotein
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MyNF1	: Miyeloid nükleer faktör 1
N-CAM	: Nöral hücre adezyon molekülü
NF-ΔE3A	: Nükleer faktör delta E3A
NMP	: Nükleer matriks protein

OBSC	: Osteoblast-spesifik kompleks
OPN	: Osteopontin
OSF2	: Osteoblast-spesifik faktör 2
PBC	: Birincil biliyer siroz
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PEA2	: Polyoma güçlendirici A-binding factor 2
PEBP2/PEA2	: Polyomavirüs arttırıcı bağlayıcı protein 2
PES	: Penisilinstreptomisin
PG	: Proteoglikan
PG-M	: Mezenkim proteoglikanlar
PI3K	: Fosfotidilinositol-3-kinaz
PI-PLC	: Fosfoinosid-spesifik fosfolipaz-C
PKC	: Protein kinaz C
RANKL	: NF-kB ligandın reseptör aktivatörü
RTK	: Reseptör tirozin kinaz
Runx	: Runt domain kodlayan gene
S/A-CBF	: SL3-3 ve AKV çekirdek-bağlama faktör
SEA	: Deniz keşanesi sperm proteini
SEF1	: SL3-3 güçlendirici faktör 1
SIBLING	: Küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlı glikoproteinler
SNA	: Snail
SPARC	: Sisteince zengin salgılanmış asidik protein
SPP1	: Salgılanmış fosfoprotein-1
TCR	: T hücresi reseptörleri
TGFβ	: Transforme edici büyüme faktör- beta
TIMP	: Matriks metalloproteinaz inhibitörü
til-1	: T-hücre tümör entegrasyon lokus 1 protein
TNM	: Tümör/Nod/Metastaz
VEGF	: Vasküler endotel büyüme faktörü

ÖZET

MEME KANSERİNDE RUNX2'NİN BAZI HÜCRELERARASI MATRİKS PROTEİNLERİ VE ENZİMLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sevgi BİNAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr.Engin KAPTAN

Runt ilişkili genlerden biri olan runx2 osteoblast/kondrosit farklılaşmasının önemli düzenleyici molekülünden biridir. İnsan kanserlerinde runx2'nin aşırı eksprese olduğu ve kemik metastazının esas öncülerinden biri olduğu yakın geçmişte bulunmuştur. Bunun yanı sıra, runx2'nin meme, prostat ve kolorektal kanserlerinde artmış büyüme, invazyon ve metastazla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bir kanser hücresinin metastaz yapabilmesi için ekstrasellüler matriksin (ECM) modifiye edilmesi ve ECM-hücre ilişkilerin zayıflatılması gerekmektedir. Bu işlem kanser hücreleri tarafından salgılanan çeşitli enzimler ve proteinler tarafından gerçekleştirilir. ECM modifikasyonunda ve ECM-hücre interaksiyonunda önemli role sahip matriks metalloproteinazların (MMP) ekspresyonundan runx2 sorumlu tutulmaktadır. Bu bilgiler ışığında insan meme kanseri hücre soylarında ECM modifikasyonu ve ECM-hücre etkileşiminde önemli rolleri olan heperanaz (HPA1), lizil oksidaz (LOX), sisteince zengin salgılanmış asidik protein (SPARC), ve osteopontin (OPN) gibi proteinlerin ekspresyonunda runx2 transkripsiyon faktörünün etkili olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda insan meme kanseri östrojen reseptör pozitif (MDA-MB-231) ve negatif (MCF-7) hücre hatlarında runx2 siRNA'sı kullanılarak runx2 *knockdown* modeli oluşturulmuş ve çalışmamıza konu olan ECM proteinlerinin mRNA miktarları ve protein ekspresyonlarındaki değişiklikler PCR ve Western emdirim yöntemi ile gösterilmiştir. Elde edilen veriler, MCF-7 hücrelerinde runx2'nin susturulması çalışmada ele aldığımız HPA1,

SPARC ve LOX'un hem mRNA hemde protein seviyelerinde azalma olduğunu, OPN mRNA ve protein seviyelerinde ise bir değişiklik olmadığını göstermiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde ise LOX ve HPA'nın protein ve mRNA miktarlarında belirgin bir azalma saptanmıştır. SPARC ifadesinde ise belirgin bir artış meydana geldiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, runx2 yoluyla HPA1, LOX ve SPARC gibi matrisellüler protein ekspresyonunun düzenlenmesi, insan meme kanserinin habis potansiyelinin düzenleyici mekanizmalarından biri gibi görünmektedir. Dolayısıyla, runx2 meme kanserinin tedavi sürecinde hedef bir molekül olarak düşünülebilir.

Haziran 2019, 90 sayfa.

Anahtar kelimeler: Meme kanseri, heparanaz, lizil oksidaz, osteopontin, runx2, SPARC



SUMMARY

EFFECT OF RUNX2 ON SOME EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS AND ENZYMES IN HUMAN BREAST CANCER

M.Sc. THESIS

Sevgi BİNAY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr.Engin KAPTAN

Runx2 is one of the runt related genes that are important regulatory molecules of osteoblast/chondrocyte differentiation. It has recently been discovered that runx2 is overexpressed in human cancers and is one of the major precursors of bone metastasis. In addition, runx2 has been shown to be associated with increased growth, invasion and metastasis in breast, prostate and colorectal cancers. The cancer cell metastasis requires modifications of extracellular matrix (ECM) and reduction in ECM-cell interaction. This process is performed by various enzymes and proteins secreted by cancer cells. Runx2 is responsible for the expression of MMPs which have an important role in ECM modification and ECM-cell interaction. In the light of this information, the effect of runx2 transcription factor on expression of proteins such as osteopontin, SPARC, LOX and heparanase which have important roles in ECM modification and ECM-cell interaction in human breast cancer cell lines were investigated. For this purpose, runx2 knockdown model was created by using runx2 siRNA in human breast cancer oestrogen receptor positive MDA-MB-231 and negative MCF-7 cell lines. The changes in the mRNA and protein expression levels of ECM proteins in this model were shown by the PCR and Western blotting methods respectively. The data obtained from this study showed that there was a decrease in both mRNA and protein levels of HPA1, SPARC

and LOX in MCF-7 cells, but there was no change in OPN mRNA and protein levels. However, the protein and mRNA levels of HPA and LOX were significantly reduced in MDA-MB-231 cells and SPARC expression was significantly increased. Consequently, the regulation of matricellular proteins, which are HPA1, LOX and SPARC, expressions through runx2 appears to be one of the regulatory mechanisms of the malignant potential of human breast cancer cells. Therefore, runx2 can be considered as a target molecule in the treatment process of breast cancer.

June 2019,90pages.

Keywords: Breast cancer, heparanase, LOX, osteopontin, runx2, SPARC



1. GİRİŞ

Bir transkripsiyon faktörü olarak runx proteinleri aynı isimli genler tarafından kodlanır ve genel olarak normal gelişim sürecinde osteoblast farklılaşmasını, kemik şekillenmesini ve T-hücrelerinin oluşturulmasını düzenlerler. Bu genler runx1, runx2, runx3 olarak isimlendirilen proteinlerin transkripsiyonundan sorumludur. Runx2 osteoblast farklılaşmasında ve kemik şekillenmesinde önemli bir role sahiptir. İskelet sistemindeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ve organize edilmesinde önemli bir role sahiptir (Lian ve diğ., 2004). Runx2 bazı extrasellüler matriks ve mitokondriyal proteinlerin, büyüme ve transkripsiyon faktörlerin hedef genlerinin düzenlenmesinde rol üstlenmiştir (Gaikwad ve diğ., 2001). Ancak, runx2'nin T-hücre lenfomasında baskın bir onkogen olarak fonksiyon üstlendiği gösterilerek onkogenik aktivitesinin varlığı ortaya konmuştur (Vaillant ve diğ., 2002). İnsan kanserlerinde runx2'nin aşırı eksprese olduğu ve metastatik süreci desteklediği yakın geçmişte ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra, runx2'nin regülasyonunun ve transkripsiyonel aktivitesinin göğüs, prostat ve kolorektal kanserlerinde artmış büyüme, invazyon ve metastazla bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Barnes ve diğ., 2003; Brubaker ve diğ., 2003; Wai ve diğ., 2006). Bu bağlantının, runx2'nin metastatik sürecin çeşitli aşamalarında etkin olarak rol alan MMP, galektin-3 (gal-3), Epitelial mezenkimal dönüşüm (EMT) sürecinde rol alan aracı moleküller gibi pek çok proteinin ekspresyonunun düzenlenmesi aracılığıyla gerçekleştiği ortaya konmuştur (Vladimirova ve diğ., 2008; Niu ve diğ., 2012).

Metastaz, kanserin köken aldığı organdan (birincil odak) kan veya lenf sistemi aracılığıyla başka bir organda yeni koloniler oluşturmasıyla sonuçlanan dinamik bir süreçtir. Bu birincil tümör odağından kanser hücrelerinin ayrılması, intravazasyon (dolaşım sistemine geçiş), dolaşım sistemindeki sağ kalım, ekstravazasyon (dolaşım sisteminden çıkış), ikincil tümör odağında tutunma ve büyüme için elverişli bir mikro ortamın oluşturulması gibi aşamaları içeren karmaşık bir süreçtir (Vanharanta ve Massague ve diğ., 2013). Bütün bu aşamalar karmaşık hücresel olayları bünyesinde barındırmaktadır ve metastatik sürece hizmet eden bu hücresel olayların moleküler mekanizmaların anlaşılması kanser için yeni terapi stratejileri geliştirilmesinde günümüz kanser biyolojisi çalışmalarının odağı haline gelmiştir. Bu süreçte rol alan en önemli unsurlar arasında ECM komponentleri, çeşitli hücre yüzey markörleri ve farklılaşmış hücre yüzey glikofenotipinin yer aldığı ortaya konmuştur (Varki, 2007). Özellikle

hücrelerin birincil odaktan ayrılması sürecinde ECM'nin modifiye edilmesi ve ECM ile olan ilişkilerin zayıflatılması söz konusudur ve bu işlem kanser hücreleri tarafından salgılanan çeşitli enzimler ve proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Kanser hücreleri tarafından salgılanan bu metastatik sürece hizmet eden aracı moleküllerin her biri tedavi stratejisi olarak hedef seçilebilecek niteliğe sahip olduğu çeşitli araştırmalarla da ortaya konmuştur (Weinberg, 2007)

Meme kanserinde HPA1, LOX, SPARC ve OPN gibi proteinler ECM unsurları üzerindeki etkileriyle metastatik sürecin önemli aktörleridir (Feng ve Tang,2014; Rittling ve Chambers, 2004; Krischmann ve diğ., 2002; Sanderson ve diğ., 2004) ve yaptığımız literatür taramaları sonucunda bu proteinlerin transkripsiyonel regülasyonunda runx2'nin rol oynayabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Örneğin, preosteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinde LOX ve lizil hidroksilaz (Plod2)'ın runx2 ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir(Thaler ve diğ.,2010), Runx2'nin osteoblastlarda bir glikoziltransferaz olan Exostosin-1 ve bir endoglikozidaz olan HPA1'in ekspresyonunu arttırdığı ortaya konmuştur (Teplyuk ve diğ., 2009), CT26'daki Ets-1 ve Runx2 protein ekspresyonu, antisense oligonükleotitler kullanılarak kaldırılmış ve OPN protein ekspresyonunda 7 kat azalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Ets-1 ve Runx2, CT26 kolorektal kanser hücrelerinde OPN ekspresyonunun kritik transkripsiyonel düzenleyicileri olduğu sonucuna varılmıştır (Wai ve diğ., 2006), Osteoblast spesifik transkripsiyon faktörü Osterix (Osx) ve runx2, SPARC ve col1a2 gibi kemik matris proteinlerinin transkripsiyonunu düzenlemek için harekete geçtiği gösterilmiştir (Elks ve diğ., 2009). Yapılan çalışmalar, çalışmamıza konu olan bu proteinlerin meme kanserinin metastatik sürecinde önemli bir role sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Feng ve Tang,2014; Rittling ve Chambers, 2004; Krischmann ve diğ., 2002; Sanderson ve diğ., 2004). Yapılan bu tez çalışmasında, metastatik sürece hizmet eden, HPA1, LOX, SPARC ve OPN gibi metastaz aracı enzim ve proteinlerin transkripsiyonel olarak ekspresyon süreci üzerinde, MMP ve Gal-3 gibi pek çok aracı molekülün transkripsiyonel regülasyonunda etkin olduğuna işaret edilen runx2 transkripsiyon faktörünün etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Runx2'nin metastatik süreçte önemli bir yere sahip olan ECM proteinleri ve modifiye edici enzimlerin ekspresyonları üzerindeki etkisinin araştırılması, metastazın karmaşık moleküler detaylarının aydınlatılması yönünde temel bilgi havuzuna önemli katkıları olacağı kanısındayız.

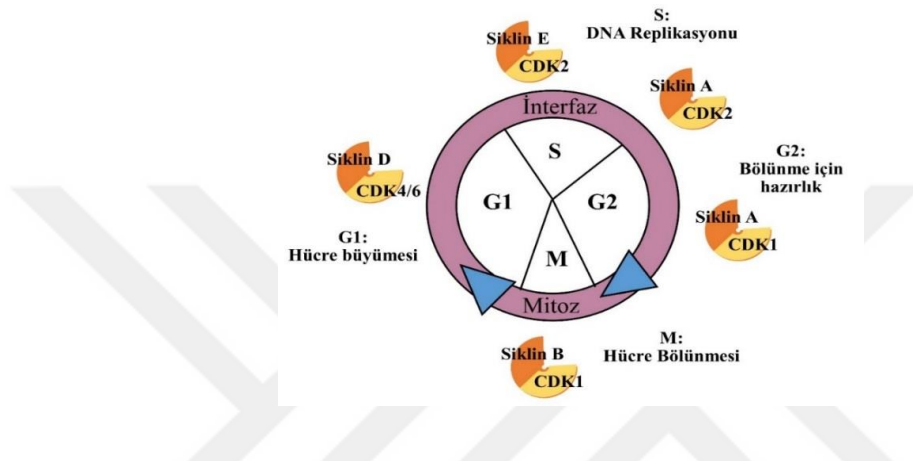
2. GENEL KISIMLAR

2.1. KANSER

Kanser; kontrolsüz hücre çoğalması, göç, kan dolaşımına veya lenfatik damarlara intravazasyon, ekstremitasyon sonrasında ikincil odakların istilası ile sonuçlanan çok aşamalı bir olaydır (Vanharanta ve Massague ve diğ., 2013). Hem birincil hem de ikincil bölgelerdeki tümör hücre fonksiyonu, büyüme faktörleri ve onların reseptörleri, kemokinler, nükleer reseptörler, hücre-hücre etkileşimleri, hücre-matris etkileşimleri gibi birçok farklı faktör tarafından kontrol edilir (Weinberg, 2007). Normal hücrelerin aşamalı olarak kansere dönüşme süreci başka bir değişle karsinogenez, genomun yapısını ve dolayısıyla bilgi içeriğini değiştiren çeşitli mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir. Genomun yapısında meydana gelen bu değişiklikler, DNA replikasyonundaki hatalar gibi endojen işlemlerin bir sonucu olabileceği gibi, bazı DNA bazlarının kimyasal kararsızlığı veya ortaya çıkan serbest radikallerin saldırısı sonucu oluşabilir. Ayrıca DNA hasarı iyonize radyasyon, UV radyasyonu, kimyasal karsinojenler ve tümör virüsleri gibi eksojen ajanlarla etkileşimin bir sonucu da olabilir. Bunlara ek olarak büyüme faktörleri ve onların reseptörleri, hücre siklusu ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan hatalar sonucu da kanser oluşumu gözlenebilir (Cooper, 1993). Örneğin; Reseptör tirozin kinaz (RTK) hücre yüzeyi reseptörleri ailesi, hücre dışı büyüme faktörleri tarafından hücre sinyalleşmesinin araçları olarak görev yapar. Epitelial büyüme faktör reseptörleri EGFR, ERBB2, ERBB3 ve ERBB4 gibi ERBB RTK ailesinin üyelerinin kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalma süreci ile güçlü bir ilişkileri olduğu gösterilmiştir (Appert-Collin ve diğ., 2015). Baş ve boyun, yumurtalık, serviks, mesane, özofagus, mide, beyin, meme, endometriyum, kolon ve akciğer kanserlerinde EGFR gen ekspresyonunun arttığı gözlenmiştir (Sharma ve diğ, 2007).

Hücrelerin kendini tüm bu oluşan hasarlardan korumak ve oluşan hataları onarmak için kontrol mekanizmaları mevcuttur. Ancak bu kontrol mekanizmalarında da hatalar olduğu görülmüş ve bu hataların genomda kalıcı değişimlere neden olduğu saptanmıştır. Siklin bağımlı kinazlar (CDK), hücre döngüsü, transkripsiyon, farklılaşma ve metabolizma gibi biyolojik işlemlerin düzenlenmesinde merkezi rol oynayan bir heterodimerik kinaz ailesidir. Siklinlerin aşırı ekspresyonu veya mutasyonu nedeniyle ortaya çıkan CDK hiperaktivitesi,

kanser hücrelerinin proliferasyonuna sebebiyet verdiği ve bu kinazların anormal aktivitesinin pek çok insan kanserinde bulunduğu saptanmıştır. İnsan genomu CDK ve siklinleri kodlayan çoklu lokuslar içerir. Ancak, sadece belirli CDK-siklin kompleksleri alt kümesi hücre döngüsünü yönlendirmekle doğrudan ilişkilidir. Bunlardan üçü interfaz CDK'ları (CDK2, CDK4 ve CDK6), biri mitotik CDK (CDK1) ve dört farklı sınıftan oluşan siklinlerdir (A, B, D ve E siklinler) (Qie ve Diehl, 2016) (**Şekil 2.1**).



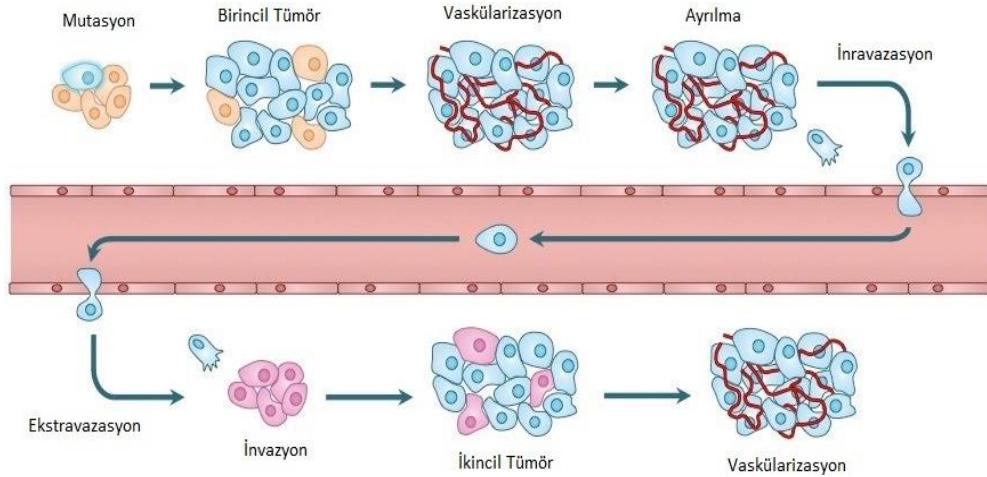
Şekil 2.1: Hücre döngüsünün evrelerini gösteren şema. G1: DNA sentezine hazırlık fazı S: DNA replikasyonunun gerçekleştiği faz G2: DNA sentezinin tamamlandığı faz M: hücrenin bölünmeye başladığı mitoz fazı olarak ayrılır. Hücre döngüsünün düzenlenmesi ve kontrolü fosforile olmuş siklin bağımlı kinazların (CDK) Siklinlerle bir araya gelip oluşturduğu birleşik yapılar tarafından kontrol edilir (www.sites.google.com'dan alınmıştır).

Kanser ile ilişkili mutasyonlar, CDK-siklin kompleksleri ayrılarak çoğu insan kanser hücrelerinin en belirgin özelliği olan, hücre döngüsünün sürekliliğini sağlayarak kontrolsüz çoğalmaya yol açar (Malumbres ve Barbacid, 2009). Böylece normal hücre bölünürken ve çoğalırken uyduğu kurallar dışına çıkıp anormal büyüklükte hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına neden olabilir. Normal hücreler organizmanın yaşamını sürdürebilmeleri için programlanıp ona göre çalışırken kanser hücrelerinin en büyük amacı kendinden başka kopyalar oluşturmak yani sürekli çoğalmaktır.

Mutasyona uğramış genler, hücrede yeni ve genellikle yüksek oranda anormal fenotiplerin ortaya çıkmasına neden olur. İnsan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğramış gen ailesi *Ras* genleridir. Bu proteinler proliferasyon ve hücre sağkalımından sorumlu olan sinyal yollarını düzenleyen GTPazlardır (Lacal ve McCormick, 2017). Anormal *Ras* fonksiyonu kanser ile ilişkilidir ve kanser hücrelerinde tipik olarak *Ras* geninin 12., 13., ya da 61. kodonda bir nokta

mutasyonu ile onkogenik aktivite kazanırlar (Sushma ve diğ.,2015). Kanseri olgusunda *Ras* genlerine benzer şekilde mutasyon taşıyan pek çok onkogenin yanı sıra, *p53* gibi hücre döngüsü ve DNA hasar sürecinde önemli bir koruyucu role sahip olan genlerin kaybı ya da sessizleşmesi de söz konusudur (Labuschagne ve diğ, 2018).

Kanser hücrelerinin bir diğer önemli özelliklerinde biri de köken aldıkları dokulardan farklı doku ya da organlara göç edebilme yetenekleridir. Metastaz olarak adlandırılan bu süreç çok basamaklı ve oldukça karmaşık bir işlemdir. Bir kanser hücresinin metastaz yapabilmesi için aşması gereken bazı engeller vardır. Öncelikle, ECM unsurlarının yıkıma uğratılarak köken aldıkları birincil odaklarından ayrılmaları gerekir. Bu süreç matriks metalloproteinazlarının da rol aldığı bir dizi olayı içinde barındırır. Bundan sonraki aşama intravazasyon olarak adlandırdığımız kanser hücrelerinin dolaşım sistemine geçişleridir. Dolaşıma geçtikten sonraki aşamada kanser hücreleri hedef organlarındaki kan damarlarının endotel hücreleriyle etkileşerek ikincil odaklar oluşturmak üzere ekstrasvazasyon olarak adlandırdığımız hedef organlarına geçişleri gerçekleşir (Vanharanta ve Massague ve diğ., 2013) (**Şekil 2.2**). Kanserli hücre çok fazla organa yayılabilir, ancak metastatik tümörler sadece bir veya birkaç tanesinde büyüyebilir (Weinberg, 2007).



Şekil 2.2: Karsinogenez ve metastazın evreleri. Mutasyona uğramış genler hücre fenotipini değiştirip, onların fizyolojik koşullarında farklılık meydana getirmektedir. Hücrelerin olağan sürecinden farklı olarak anormal büyüklükte hücre popülasyonlarının ortaya çıkmasına neden olur. Kanserli hücreler kazandıkları bu yeni özellikler ile bulunduğu doku bölgesi olan birincil tümör alanından ayrılıp, dolaşımda hayatta kalırlar (intravazasyon). Daha sonra kan ve lenf damarlarıyla başka bölgelere (ikincil tümör) ulaşarak çoğalmaya devam ederler. Kanserli hücrelerin tüm bu göç süreci metastaz olarak adlandırılır (www.ib.bioninja.com.au'dan alınmıştır).

2.2. MEME KANSERİ

Meme karsinomu, kadınlarda en yaygın malignitelerden biridir. Meme kanserlerinin %95'inden fazlası adenokarsinom olup karsinom *in situ* ve invaziv karsinom olarak ikiye ayrılır. Karsinoma *in situ* (DCIS) , bazal membran sınırlarını aşmayan kanallar ve lobüllerde gerçekleşen bir neoplastik çoğalmayı ifade eder. İnvaziv karsinom ("infüze edici" karsinom ile eşanlamlı) bazal membrandan stromaya girip metastaz yapan tipidir. Bu karsinomda, hücreler damarlara burdanda bölgesel lenf düğümlerine ve uzak bölgelere ulaşma potansiyeline sahiptir.

Duktal karsinoma *in situ* genellikle yapısal ve sitolojik özelliklere göre sınıflandırılmıştır. Ayrıca düşük, orta derece (papiller, kribriform ve solid) ve yüksek dereceli (komedo) hücre nekrozu olarak derecelerine göre de sınıflandırılır. DCIS, invaziv meme kanserinin öncül formunu temsil eder. İnvaziv karsinom alt tipi İnfiltratif duktal karsinom ise en sık rastlanan invaziv meme kanseri türüdür ve invaziv kanserlerin %70-80'ini oluşturmaktadır. İnvaziv lobüler karsinom ikinci en sık görülen invaziv meme kanseri olup, invaziv kanserlerin %5-10'unu oluşturmaktadır. İnfiltratif duktal karsinomlarla karşılaştırıldığında, invaziv lobüler karsinomlar daha yaşlı kadınlarda ortaya çıkan, çok merkezli ve/veya ikili, daha farklılaşmış olma eğilimindedir ve hormon reseptörü pozitiflik gösterir, daha yaşlı kadınlarda metastaz yapar ve meninksler, peritoneum veya gastrointestinal kanal gibi olağandışı yerlere yayılım gösterir.

Bunlar dışında invaziv karsinoma alt tipleri olarak tubular karsinom, müsinöz karsinom, medüller karsinom ve duktal lobüler karsinom vardır. Tedavi için gerekli belirteçler TNM (Tümör/Nod/Metastaz) sınıflandırılması, aksiller lenf nodu seviyesi, tümör boyutu ve derecesi, hormon reseptör durumu ve HER2 reseptör pozitifliğidir (Schatten, 2013) .

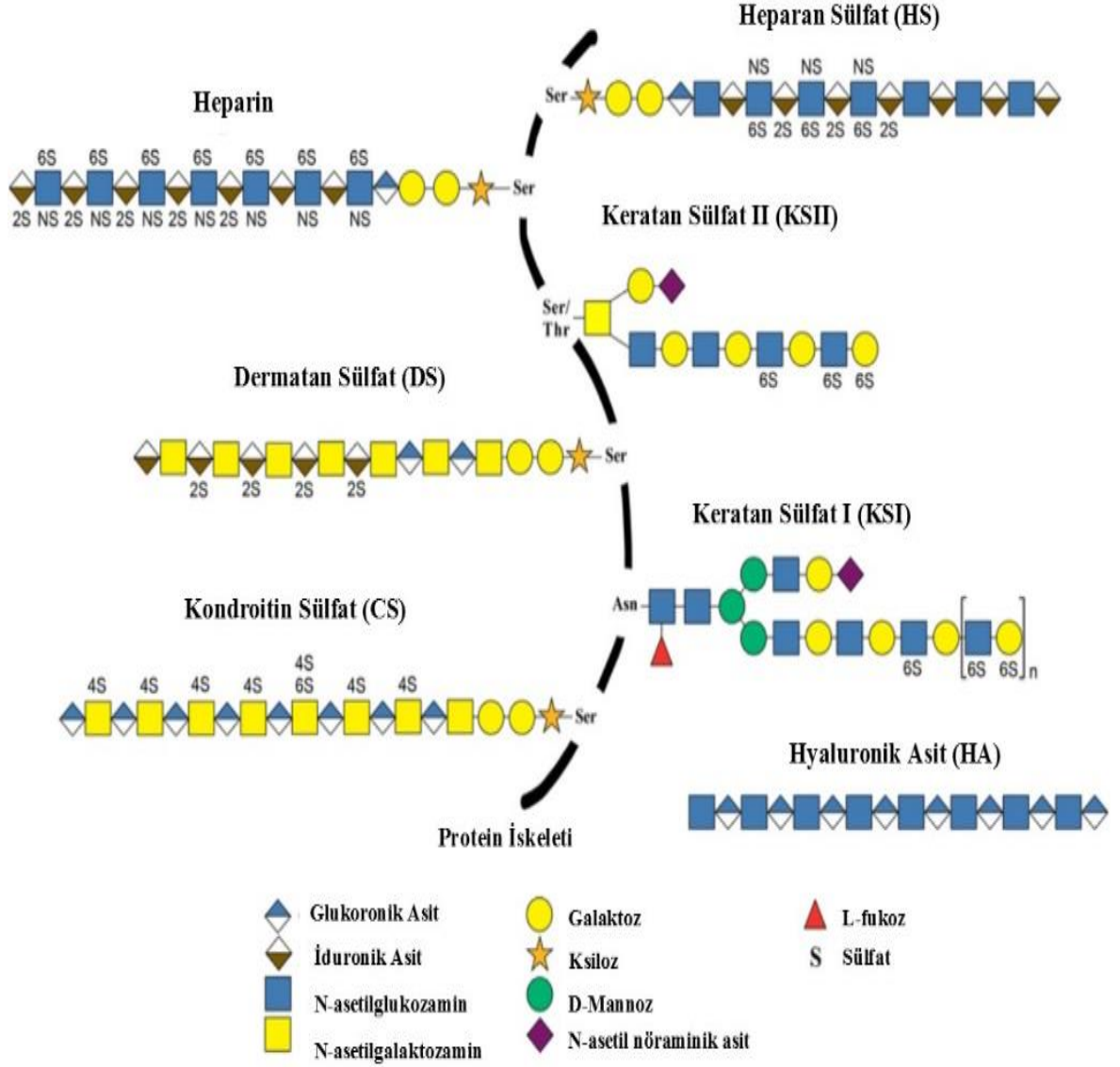
2.3. EKSTRASELLÜLER MATRİKS

Dokuları ve organları oluşturan hücreler, ECM olarak adlandırılan üç boyutlu ve ağısı bir organizasyona sahip hücre dışı bileşenlerin bir karışımı içinde gömülü olarak bulunur. ECM sadece hücrelerin içine yerleştiği fiziksel iskeleti sağlamakla kalmaz, aynı zamanda büyüme, göç, farklılaşma, hayatta kalma, homeostaz ve morfogenez gibi birçok hücresel süreci de düzenler (Naba ve diğ., 2016). ECM'nin bileşimi ve yapısı dokudan dokuya farklılık gösterir. ECM'nin ana bileşenleri, glikozaminoglikanlar; hiyaluronik asit, kondroitin sülfat (CS),

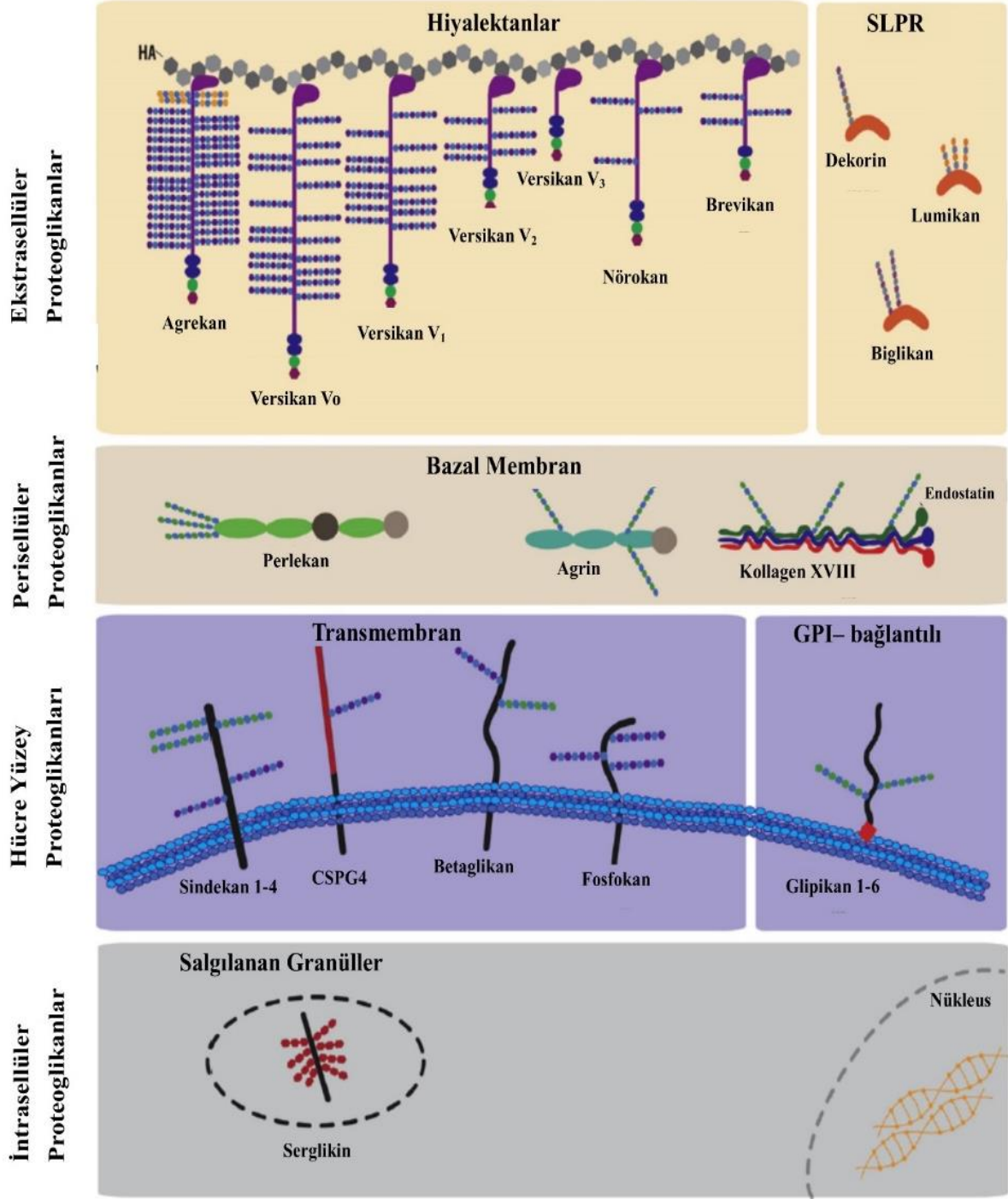
dermatan sülfat (DS) ve keratan sülfat (KS) gibi tekrarlayan disakkarit bakiyelerinden oluşan polimerik bileşikler ile konumlarına göre ayrılan proteoglikanlar ve kollagen, laminin ve fibronektin gibi fibröz proteinler bağlayıcı glikoproteinleri içeren makromoleküllerdir (Alberts ve diğ., 2002). ECM çevrelediği hücrelere yapısal destek sağlamanın ötesinde, ECM-hücre etkileşimi kimyasal ve mekanik sinyaller yoluyla pek çok yaşamsal olayın düzenlenmesinde rol alır. ECM'nin yapısı ve moleküler kompozisyonun, embriyonik gelişim, hücre göçü, farklılaşma, proliferasyon, apoptoz ve adezyon gibi süreçlerde belirleyici bir etkisi vardır (Multhaupt ve diğ., 2016). Hücreler integrinler, kaderinler ve selektinler gibi spesifik hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla ECM ile etkileşerek, hücre içine sinyallerin iletilmesinin yanında, çözünebilir büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler için bir rezervuar gibi davranarak onların dağıtımını, aktivasyonunu ve hücrelere sunumunu düzenler (Hynes, 2009). ECM'nin bu rezervuar görevi, hücre fenotipinin ortaya çıkmasında büyük öneme sahip olduğu bilinmektedir. Matriks içindeki hücreler ECM moleküllerini salgılayarak, kendi harici destek ağlarını kurmuş olur ve etraflarındaki matriksi modifiye ederek yeniden şekillendirebilirler. ECM'nin modifikasyonlarını anlamak ve kontrol etmek günümüzde büyük ilgi konusudur, çünkü gelişimde, yara iyileşmesi ve kanser gibi pek çok durumda önemli bir rol oynamaktadır. Bu modifikasyonlar MMP ve disintegrin metaloproteinaz ailesi (ADAM'lar) gibi proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir (Bosman ve Stamenkovic, 2003).

Glikozaminoglikanlar, bir amino şekerden (N-asetilglukozamin veya N-asetilgalaktozamin gibi glukozamin çeşitleri) oluşan disakkarit yapı blokları ve bir üronik asit (glukuronik asit veya iduronik asit) veya galaktozdan oluşan doğrusal polisakkaritlerdir. Bu polisakkaritler, içeriğinde amino şekerler ve polimerik formdaki diğer şekerleri bulundurduğu için glikozaminoglikanlar (GAG) olarak isimlendirilmişlerdir (Esko ve diğ., 2009). Proteoglikanlarla (PG) ilgili yapılan çalışmaların başlangıcı kıkırdaktan “kondromukoid” (291) ve karaciğerden elde edilen antikoagülan (heparin) (Howell, 1925) eldesiyle 20. yüzyılın başlarında başlamıştır. 1930-1960'lı yıllar arasında, bu polisakkaritlerin (aynı zamanda “mukopolisakkaritler” olarak da bilinen) kimyasal analizinde, hiyalüronan, DS, KS, CS'nin farklı izomerik formları, heparin ve heparan sülfat (HS)'ın yapıları bulunmuştur (Jeanloz, 1960). Proteoglikanlar ise bir protein iskeleti ve bu iskelete bağlı bir veya daha fazla kovalent olarak bağlanmış glikozaminoglikan (GAG) zincirinden oluşur ve çoğu hayvan hücresi tarafından üretilir (Esko, 1991) (**Şekil 2.3**). Proteoglikanlar 4 sınıf altında toplanır

(Şekil 2.4). Hücresel ve alt hücresel lokalizasyonlarına, protein dizisi homolojisine ve protein modüllerinin varlığına göre; hücre içinde, hücre yüzeyinde, bazal membranda ve hücre dışında bulunan proteoglikanlar olarak sınıflandırılırlar (Iozzo ve Schaefer, 2015).



Şekil 2.3: Glikozaminoglikan (GAG) yapıları. GAG'lar tekrarlayan disakkarid ünitelerinin bir araya gelip doğrusal polimerleri oluşturan heterojen polisakkaridlerdir. Heparin, Heparan Sülfat (HS), Keratan sülfat I (KSI), Keratan Sülfat II (KSII), Kondroitin sülfat(CS) ve Hiyalüronik Asit(HA)'ten oluşmaktadır. Hiyalüronik Asit hariç tüm GAG'lar bir protein iskeletine bağlıdır Keratan Sülfat ise protein iskeletine bağlanma bakiyeleri ile diğer GAG'lardan ayrılmaktadır. S harfi sülfat bağlanmalarını, Ser/Thr ifadeleri Serin/Treonin bakiyelerini ve Kretan Sülfat I'deki Asn ise Asparjin bakiyelerini göstermektedir(Merida-de-Barros ve diğ., 2018'den alınmıştır).



Şekil 2.4: ECM proteoglikanları bulundukları matriks alanına göre gruplandırılırlar. Bu gruplandırma ekstrasellüler proteoglikanlar, perisellüler proteoglikanlar, hücre yüzeyi proteoglikanları ve intrasellüler proteoglikanlar olmak üzere 4 sınıfta toplanmaktadır. Ekstrasellüler proteoglikanlar Hiyalektanlar ve küçük lösin bakımından zengin proteoglikanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Perisellüler proteoglikanlar perlekan, agrin ve Kollajen18 olmak üzere 3 gruba ayrılır. Hücre yüzey proteoglikanları ise transmembran ve GPI bağlantılı olmak üzere ikiye ayrılır. Son olarak intrasellüler proteoglikan örneği ise Serglikindir (Theocharis ve diğ., 2016'den alınmıştır).

2.3.1. Glikozaminoglikanlar

2.3.1.1. Hiyalüronan

Hiyalüronan (ayrıca hiyalüronik asit veya hiyalüronat olarak da bilinir) basit bir kimyasal yapıya sahip bir polisakkarittir. Glukuronik asit ve N-asetilglukozamin'nin tekrarlayan disakkaritlerinden oluşan büyük, negatif yüklü, dallanmamış bir polimer olarak sentezlenir: $[-\beta(1,4)\text{-GlcUA-}\beta(1,3)\text{-GlcNAc-}]_n$ (Toole, 2004). Hiyalüronan diğer GAG'lerden farklı özelliklere sahiptir. Diğer GAG'lar endoplazmik retikulumda ve Golgi cisimciklerinde sentezlenirken, hiyalüronan plazma membranında sentezlenir. Hiyalüronan diğer glikozaminoglikanlar gibi tek bir polisakkarit zincirinden oluşmasına rağmen, moleküler ağırlığı genellikle milyonlara ulaşır ve dolayısıyla daha uzundur (Fraser ve diğ., 1997). Hiyalüronanın, matriks-hiyalüronan bağlayıcı proteinleri ve hücre yüzey hiyalüronan reseptörleri ile etkileşimi; hücre göçü, hücre-hücre adezyonu ve hücre farklılaşması gibi birçok hücre davranışını düzenlemektedir. Hiyalüronan bağlayıcı proteinler, hiyaladerin olarak adlandırılır ve bunların matriks ve hücre yüzeyinde bulunan iki ayrı formu bulunmaktadır (Knudson ve Knudson, 1993). Bu proteinler, gen ekspresyonu ve dokunun makro ve mikroçevresinin düzenlenmesinde rol alır. Hiyalüronan deride, eklemlerde, gözlerde ve diğer birçok organ ve dokuda bulunur (Laurent ve diğ., 1992; Nakamura ve diğ. 1993; Meyer ve Stern, 1994). Hiyalüronanın deride yüksek miktarda bulunması nedeniyle yara iyileşmesinde önemli biyolojik rolü vardır (Catanzano ve diğ., 2015).

2.3.1.2. Dermatan Sülfat

Kondroitin sülfat B (CS-B) olarak da bilinen DS, sırasıyla β -1,4 veya 1,3 bağları ile bağlanmış, N-asetil galaktosamin (GalNAc) veya glukuronik asit (GlcA) içeren disakkarit birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşan doğrusal bir polisakkarittir. DS bir iduronik asit olan IdoA içeren CS olarak da bilinir (Casu ve diğ., 1988). DS, yara onarımı sırasında bir büyüme faktörü olan fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2)'ye bağlanır ve hücre çoğalmasını artırır (Penc ve diğ., 1998).

2.3.1.3. Keratan Sülfat

KS, her iki heksoz bakiyesinin 6. karbonunda sülfatlanmış laktozamin olan doğrusal bir polimerdir. KS'nin sınıflandırılmasında aldığı KSI ve KSII isimleri sırasıyla kornea ve

kıkırdakta bulunma durumuna göredir. Korneal KS iskelet proteinindeki Asn (Asparjin) bakiyelerine N-bağılı iken, kıkırdak KS Serin (Ser) veya Threonin (Thr) bakiyelerine O-bağılıdır (Krusius, 1986). Nöral hücreler, kondrositler ve keratositler gibi hücreler KS salgırlar. Ancak *in vitro* koşullarda kondrositler ve keratositler genellikle fibroblast benzeri bir morfolojiye dönüşür ve KS sentezini kaybeder. Korneal yaralarda da bölünmek üzere aktive olan keratositler, kültüre edilmiş korneal fibroblastlara benzer bir fenotipe bürünür ve KS sentezine başlarlar. Korneada patolojik durumların sürekli ve akut hale gelmesi KS sentezi kaybını arttırır (Funderburgh, 1990; Rodrigues,1992).

2.3.1.4.Kondroitin Sülfat

Kondroitin Sülfat proteoglikanı (CSPG)'nın iskelet proteinine GAG olarak CS bağılıdır. Bu moleküldeki çeşitlilik; iskelet proteindeki farklılıklar, CS yan zincirlerinin sayısı, uzunluğu, sülfatlanmanın miktarı ve N- ya da O-bağılı oligosakkaritlerin çekirdek proteinine ilave edilmesinden kaynaklanmaktadır (Morgenstern, 2002). CSPG'ler çeşitli büyüme molekülleri ile etkileşime girebilir, hücrelerden salgılanır ve ECM oluşumuna katılır (Galtrey ve Fawcett, 2007). CSPG'ler aksonal büyümenin hem pozitif hem de negatif modülatörleri olarak rol alırlar (Dou ve Levine, 1994).

2.3.1.5. Heparan Sülfat

Güçlü, anyonik ve doğrusal bir polisakkarit olan HS, mast hücreleri tarafından sentezlenen ve bir antikoagülan olan heparinden daha düşük bir sülfasyon derecesiyle ayırt edilmiştir. Heparin gibi, HS zincirleri yapısal olarak heterojendir ve fizyolojik koşullar altında çeşitli proteinlere bağlanır (Iozzo, 2001). Hücre yüzeyi HS'leri, çok sayıda bağlayıcı protein gerektirmeden, hücrelerde fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve epiteliyal büyüme faktörü benzeri (EGF-bezeri) büyüme faktörü gibi çok çeşitli ekstrasellüler araçlar ile etkileşime geçebilir (Higashiyama ve diğ.,1993; Ornitz, 2000). HS, çeşitli hücre yüzey proteinlerinde bulunur. Ancak, zara bağılı iki büyük proteoglikan ailesi olan sindekanların ve glipikanların üyeleri üzerinde sürekli olarak bulunur (Iozzo, 2001). HSPG'lerin Schwartz-Jampel kondrodistrofik miyotoni (Nicole ve diğ., 2000), Silverman-Handmaker tipi dissegmental displazisi (Arikawa-Hirasawa ve diğ., 2001) ve aşırı büyüme sendromu (Simpson-Golabi-Behmel) (Veugelers ve diğ., 2000) gibi çeşitli insan hastalıkları ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir.

2.3.2. Proteoglikanlar

2.3.2.1. Ekstrasellüler Proteoglikanlar

Hiyalektanlar (HA ve lektin bağlayıcı PG'ler) olarak adlandırılan matriks proteoglikanların alt ailesidir, ortak yapısal özellikleri paylaşan agrekan, versikan, nörokan ve brevikanı içerir. Agrekan, Latincece birikme, birleşme anlamına gelen “*aggre*” kelimesinden türemiş ve adındanda anlaşılacağı gibi, hiyalüronan ve bağlantı proteini ile birlikte 200 kDa’dan büyük supramoleküler kompleksler oluştururlar (Wight ve diğ., 2011). Bu büyük kompleksler yoğun bir şekilde paketlenmiştir ve kollagen fibrilleri ile diğer proteoglikanlar ve glikoproteinleri içeren bir ağ oluşturarak hidratlanmış bir jel oluştururlar (Heinegård, 2009). Agrekan, kıkırdak hücrelerarası matriksini dolduran benzersiz bir şekilde yapılanmış büyük ve oldukça karmaşık bir makromoleküldür. Agrekan genindeki mutasyonlardan kaynaklanan ölümcül kondrodistrofi, agrekan yokluğunun bir sonucudur (Vertel, 1995).

Versikan Latince çok yönlü anlamına gelen “*versatile*” kelimesinden türetilmiştir (Zimmermann ve Ruoslahti, 1989). Hiyalektan ailesinin en büyük üyesidir. Tavuk bacağındaki iskelet gelişiminin erken evre kondrojenezinde sırasında eksprese edilen uzun CSPG’dir ve memelilerdeki emsali PG-M’dir (Shinomura ve diğ., 1993). Adından da anlaşılacağı üzere, versikanın işlevsel rolleri oldukça fazla ve karmaşıktır. Versikan, hücre adezyonu, göç ve inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynar (Wight ve diğ., 2014a; Wight ve diğ., 2014b). İki otozomal dominant göz hastalığı, Wagner sendromu ve eroziv vitreo-retinopati (gözün vitröz kısmında boşluklar oluşması), gibi patolojik durumlar versikan genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (Mukhopadhyay ve diğ., 2006)

Hiyalektanların diğer üyesi olan Nörokan, başlangıçta fare beyininden klonlanmıştır ve bu nöronal orijininden dolayı nörokan olarak isimlendirilmiştir (Rauch ve diğ., 1992). Nörokan, bir G1 domaini ve bir de Ig tekrar domaini içeren N-terminal alana sahiptir (Retzler ve diğ., 1996). Brevican ise nöronların dış yüzeyinde bulunur ve perisinaptik bölgelerde zenginleştirilir. Brevican, G3 benzeri bölgesi vasıtasıyla tenaskin-R ve fibulin-2 ile etkileşime girer (Frischknecht ve Seidenbecher, 2012).

Küçük lörin bakımından zengin proteoglikanlar dekorin, biglikan ve lumikan olmak üzere 3 alt sınıftan oluşur. DSPG2 olarak da bilinen dekorin, başlangıçta bir fibroblast cDNA kütüphanesinden kopyalanmıştır (Krusius ve Ruoslahti, 1986) ve daha sonra kollagen

fibrillerini dekore etme kabiliyeti nedeniyle dekorin olarak adlandırılmıştır (Ruoslahti, 1988). Dekorin, hücre büyümesinin kontrolünde doğrudan görev aldığı belirlenen ilk proteoglikandır ve tersine hamsterin yumurtalık hücrelerinde transforme edici büyüme faktör- beta (TGF β)'ya bağlanarak inhibe etmesine dayanan bir mekanizma vasıtasıyla büyümeyi baskılar (Yamaguchi ve Ruoslahti, 1988; Yamaguchi ve diğ.,1990). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Dekorinin vasküler endotelial büyüme faktör reseptörü-2 (VEGFR2) ile kısmi agonistik aktiviteye sahip olduğu ve endotel hücrelerinde hücrenin kendi kendini liziz etme olayı olan otofajiyi aşırı uyardığı keşfedilmiştir (Buraschi ve diğ., 2013).

Dekorine en yakın proteoglikan olan biglikan (BGN), başlangıçta sığır kemiğinden izole edilmiştir. Sonra klonlama ve dizi analiz çalışmalarıyla N-terminal bölgesinde iki Ser-Gly bağlama bölgesini içerdiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler iki GAG zinciri taşıdığını göstermiştir (Fisher ve diğ., 1989). Biglikan eksikliği olan farelerde, osteoporoz ve eklem iltihaplanmasının erken evresini andıran bir fenotip ile yaşa bağlı osteopeni (kemik güçsüzleşmesi) geliştiği bulunmuştur (Chen ve diğ., 2004).

2.3.2.2. Perisellüler ve Bazal Proteoglikanlar

Dört proteoglikandan oluşan bu grup, integrinler veya diğer reseptörler ile etkileşim halinde olan ve hücre yüzeyine yakın konumlanan proteoglikanlardır. Ancak, bazen bazal membranın bir parçası da olabilirler. Perlekan, karmaşık bir promotörü olan büyük bir gen tarafından kodlanan bir HSPG'dir (Noonan ve diğ., 1991). Yaklaşık 500 kDa ağırlığındaki protein iskeleti, SEA, N-CAM, IgG, LDL reseptörü ve lamininin homolojisine sahip 5 domainden oluşur (Iozzo, 2005). Perlekanın yaygın dağılımından dolayı çeşitli biyolojik süreçleri düzenleme ve çeşitli ligandlarla ve reseptör tirozin kinaz (RTK)'larla etkileşime girebilme kabiliyetine sahiptir (Murdoch ve diğ., 1994; Whitelock ve diğ., 2008). Perlekan, TGF β tarafından uyarılır (Dodge ve diğ., 1990) ve interferon γ tarafından baskılanır (Sharma ve Iozzo, 1998). Perlekanın protein iskeleti ve taşıdığı HS zincirleri, HPA1 ve çeşitli proteazlar ile parçalanabilir (Reiland ve diğ., 2004), Bu durum çeşitli pro-anjiyojenik faktörlerin serbest kalmasını sağlar (Iozzo,2000). Perlekan, hücre adezyonu (Lord ve diğ., 2014), lipid metabolizması (Fuki ve Iozzo, 2000), tromboz ve hücre ölümü (Nugent ve diğ., 2000; Laplante ve diğ., 2006), kan damarlarının ve kıkırdak biyomekaniği (Wilusz ve diğ., 2014), deri ve endokondral kemik oluşumu (Sher ve diğ., 2006; Ishijima ve diğ., 2012) ve kemik

büyümesi osteofit oluşumunda rol oynar (Kaneko ve diğ., 2013). Perlekan, çeşitli büyüme faktörleri ile bağlanır ve morfogenlerin aktivitesinde düzenler (Mongiat ve diğ., 2000).

İkinci periselüler/bazal membran HSPG'si Agrindir. HS zincirine sahip olmayan Agrinin C-terminal kısmı, ilk defa bir nörotransmitter olan asetilkolin reseptörünün (AChR) kümelenmesinden sorumlu bir ajan olan Torpedo balığının elektrik organından izole edilmiştir. Bu nedenle Yunancada birleştirme, kümeleme anlamına gelen “*ageirein*” kelimesinden türetilmiştir (Nitkin ve diğ., 1987). Memelilerdeki Agrin üzerine yapılan araştırmaların çoğunda, Agrinin nöromusküler bağlantılardaki postsinaptik aygıt üzerindeki rolüne odaklanılmıştır. Bununla birlikte, uzun yıllar süren araştırmalardan sonra Agrinin kuş beyinde N-CAM ile etkileşime giren bir HSPG olduğu açık bir şekilde keşfedilmiştir (Tsen ve diğ., 1995). Distalmiyopatiye benzeyen distal kas güçsüzlüğü ve atrofisi olan konjenital miyastenik sendromuna neden olarak Agrinin çekinik missense mutasyonları gösterilmiştir (Nicole ve diğ., 2014).

2.3.2.3. Hücre Yüzey Proteoglikanları

Hücre membranına bağlı olarak bulunan bu sınıftaki proteoglikanlar on üç gen, yedi transmembran proteoglikan ve altı Glikofosfatidilinositol (GPI) bağlantılı proteoglikanları içerir. İsmi Yunancada birbine bağlanma anlamına gelen “*syndein*” kelimesinden türetilmiş olan Sindekan ailesi, bir hücre dışı, bir transmembran ve bir de hücre içi domain olmak üzere 3 domaini bulunan tek geçişli transmembran protein iskeleti kodlayan dört farklı gen tarafından kodlanır (Teng ve diğ., 2012).

2.3.2.4. İntrasellüler Proteoglikanlar

Yalnızca Serglisini içeren alt sınıftır. Serglisin endotelial ve hematopoetitik hücrelerde bulunur. Serglisin, depolama granüllerinin ve salgı veziküllerinin içinde önemli enflamatuar mediatörlerin tutulması için önemlidir (Kolset ve Tveit, 2008)

2.3.3. Fibröz Matrisellüler Proteinler

2.3.3.1. Kollagen

Kollagen, dokular arası alanda en bol bulunan lifli proteindir. Periselüler matris alanında da bulunduğu gösterilmiştir (Kadle ve diğ., 2007). Kollagen insanlarda toplam proteinlerin %

30'unu oluşturur ve ECM'lerde çoğunlukla fibroblastlar tarafından sentezlenir ve salgılanır (Frantz ve diğ., 2010). Fibroblastlar, matris üzerine gerilim uygulayarak kollagen fibrillerini, kollagen liflerinin hizalanmasını belirgin şekilde etkileyen tabakalar ve kablolar halinde düzenler. Kollagen süperailisi, omurgalılarda en az kırk altı ayrı polipeptid zincirinden (α zincirleri) oluşan yirmi sekiz farklı kolajen türünden oluşur. Kollagenler üç α zincirinin birbiri etrafında sarılıp dönerek oluşturdukları sarmal bir motiftir. Kollagenler yapılarına ve özelliklerine göre birbirlerinden farklılık gösterir. Örneğin, bazı kollagen tipleri üçlü sarmal yapılarında kısa kesintilere sahiptir ve kendi kendilerine bir araya gelemmezler, transmembran kollagenler gibi diğer kollagenler ise uzun kesintiler gösterir ve hücre sinyalleşmesinde ve adezyonda önemli bir rol oynar. Örneğin; Kollagen tip I, fibriller kendiliğinden bir araya gelerek heterotrimerik üçlü heliksleri oluşturur ve dokular arasında en yaygın ve bol ekspresyon gösteren kollagendir. Bu tip kollagen, dermis, kemik ve tendon gibi dokularda ana yapısal bir elementtir (Kadle ve diğ., 2007). Kollagenin gerilime dayanıklı olması doku sertliği oluşumunun ana belirleyicisi olmasını sağlamıştır. Fakat artan kollagen birikimi ve çapraz bağlanma ile indüklenen ECM sertleşmesi doku morfogenezini bozduğu ve malignant ilerlemeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Bonnans ve diğ., 2014).

2.3.3.2. Laminin

Lamininler, çapraz olarak birbirine sarılmış heterotrimerik yapıya sahip olan glikoproteinlerdir. Laminin, her biri ayrı ayrı genler tarafından kodlanan bir α , bir β ve bir γ zincirden oluşur. Omurgalılarda beş α (LAMA1-5), üç β (LAMB1-3) ve üç γ (LAMC1-3) zinciri tanımlanmıştır. Lamininler erken embriyonik gelişim ve organogenezde kritik rol oynar (Durbeej, 2010).

2.3.3.3. Fibronektin

Çeşitli hücre tiplerinde ECM'de ifade edilen Fibronektin omurgalıların gelişiminde kritik fonksiyonlara sahiptir. Fibronektin, C-terminallerinde disülfid bağlarıyla kovalent olarak bağlanmış yaklaşık 250 kDa büyüklüğünde iki alt üniteden oluşur ve bu iki alt birim tipI, tipII, tipIII tekrarları denen üç farklı yapıdan oluşur (Hynes, 1986; Gullberg ve diğ., 2012). Çapı 10 nm ile mikrometre arasında değişen süpermoleküler fibriller bir araya gelerek uzunlukları onlarca mikrometreye ulaşan Fibronektin yapısını oluştururlar. Bu fibriller birbirlerine bağlanarak uzunluğu artan bir ağ yapısını oluşturup gelişmekte olan dokuları ve

gelişmekte olan embriyonun etrafını sararlar (Davidson ve diğ., 2004). Fibronektin; hücreye hücre adezyonu, embriyogenez, sinir yenilenmesi, ve fibroblast göçü gibi durumlarda rol alır (Proctor, 1987).

2.3.4. Matrisellüler Proteinler

Hücreler arası matriks büyük yapısal elemanlarına ek olarak, gelişimsel morfogenezini düzenlemek, yetişkinlerde doku homeostazisini korumak ve yaralanmayı takiben dokuları yeniden oluşturmak için önemli olan bir dizi unsura daha sahiptir. Bunlar matrisellüler proteinler olarak adlandırılır (Bornstein, 2009). HPA1, LOX, SPARC ve OPN gibi proteinleri içeren matrisellüler proteinler, kalıtsal bozukluklarda, yaralanma ve strese yanıtta ve çeşitli kronik hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynayan ve araştırmalarda giderek daha fazla önem gören proteinlerdir (Bradshaw ve Sage, 2001; Kyriakides ve Bornstein, 2003; Wang ve Denhardt, 2008). Matrisellüler proteinlerin gelişim, akut yaralanma veya kronik hastalık durumlarında ifadeleri artar (Chiodoni ve diğ., 2010). Her biri spesifik olarak bazı hücre yüzey reseptörleri, hücre dışı matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri ile etkileşime girebilir (Wong ve Rustgi, 2013). Aynı zamanda bu proteinler hücrelerde adezyonu ve deadezyonu düzenleyebilir (Murphy-Ullrich, 2001; Liu ve diğ., 2009). Matrisellüler proteinlerin işlev ve mekanizmalarının daha iyi anlaşılması, çeşitli hastalıkların önlenmesi veya tedavisi için birer hedef olabileceklerini düşündürmektedir.

2.3.4.1. Sisteince Zengin Salgılanmış Asidik Protein

SPARC, hücre-matriks etkileşimine aracılık eden 32kDa ağırlığında bir glikoproteindir (Lane ve Sage, 1994). SPARC, ilk defa üç farklı araştırma grubu tarafından *in vitro* çoğalan hücrelerin salgıladığı sığır ve insan kemiğinin temel bileşeni olan bir protein olarak tanımlanmıştır (Termine ve diğ., 1981; Otsuka ve diğ., 1984). Daha sonra, cDNA dizi analizleri sonucunda farklılaşmış fare embriyosu parietal endoderm hücrelerinden salgılanan esas ürün olduğu ve hücre kültürü sırasında kültür ortamına alışmaya çalışırken strese giren hücrelerin yaşadığı kültür şoku sonucu ortaya çıkan 43kDa ağırlığındaki endotel glikoproteini, Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) tümörü sırasında bazal membrandan üretilen BM-40 proteini ve osteonektin ile özdeş olduğu anlaşılmıştır (Mason ve diğ., 1986; Mann ve diğ., 1987). SPARC geninin, farenin 11. kromozomunda, insanda ise 9. kromozomun uzun kolunda olduğu saptanmıştır (McVey ve diğ., 1988; Yeoh ve diğ., 2011). SPARC geninin dizi

analizi TATA ve CAAT kutu dizilerinin olmadığını ortaya çıkarmıştır. TATA kutusu transkripsiyonun başlatılmasında düzenleyici bir role sahiptir. TATA kutusunun olmadığı durumlarda çoklu transkripsiyon başlatma bölgeleri bulunur. Buna karşın SPARC'da yalnızca bir tane başlatma bölgesi vardır (McVey ve diğ., 1988). SPARC proteini, 3 ayrı domainden oluşur (Maurer ve diğ., 1995). İlk domain Düşük afinite ile Ca^{+2} 'yı bağlayan oldukça asidik bir domainden oluşur. İkinci domain; sistince zengin, aktivin bağlayıcı protein olan follistatin (FS)'nin tekrarlayan domainleri ile homolog olan FS-benzeri domain ve TGF- β benzeri sitokinlerin bir inhibitörünün bulunduğu domaini içerir (Lane ve Sage, 1994). Üçüncüsü ise Kalsiyum bağlayıcı "EF-hand" domainidir (EC) ve bu domainin farklı hücre tiplerine ve bazı kollagen tiplerine bağlanabilme yeteneği olduğu bulunmuştur (Engel ve diğ., 1987). SPARC; vitronektin, entaktin/nidogen ve kollagen gibi bir dizi ECM bileşenine bağlanır (Brekken ve Sage, 2000). SPARC'ın, kemikleşmiş ve mineralize dokuların gelişmesinde Ca^{+2} bağlayıcı bir protein olarak görev almasının yanında, doku yenilenmesi, onarımı, gelişimi, hücre döngüsü ve kemik minerilazasyonu ve ayrıca kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayan önemli mekanizmaları da kontrol eder (Feng ve Tang, 2014). Örneğin; SPARC, büyüme faktör-reseptör etkileşimini kaldırarak trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin mitojenik potansiyelini bağlar ve azaltır. SPARC'ın, sığır endotel hücrelerinde temel fibroblast büyüme faktörüne (bFGF) olan yanıtları azalttığı ve FGF reseptör 1'in miyoblastlarda fosforilasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. SPARC'ın bu büyüme faktörleriyle etkileşimi ve VEGF, bFGF ve PDGF tarafından indüklenen hücre proliferasyonunu inhibe ettiğinin gösterilmesi anjiyogenezdeki önemine işaret etmiştir (Funk ve Sage, 1991). Yapılan çalışmalar sonucu SPARC ifadesinin, hücreler ve ECM arasındaki etkileşimleri düzenlediği de bulunmuştur. ECM'nin özellikle aktin ile etkileşimlerde olduğu yerlerde SPARC ifadesinin hücrenin yassılaşmasını inhibe ettiği, fokal adezyonları parçalara ayırdığı ve düz kas hücrelerinde G0 'dan S fazına ilerlemeyi düzenleyen faktörlerden biri olan kollagen-3 ile etkileşime girdiğinde bu faz ilerlemesinin inhibe ederek hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (Tremble ve diğ., 1993; Motamed ve Sage, 1998). Bunlara ek olarak, SPARC, epitelial mezenkimal geçişin (EMT) düzenlenmesi, apoptoz, anjiyogenez ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde görev almaktadır (Feng ve Tang, 2014).

2.3.4.2. Osteopontin

OPN ilk olarak salgılanmış fosfoprotein 1 (SPP1) (Senger ve diğ., 1979) ve daha sonra *2ar* genin klonlanması ile transformasyon ilişkili hücre adezyon fosfoproteini olarak tanımlanmıştır (Craig ve diğ., 1989). Yapılan bir diğer çalışmada ise osteopontinin kemik dokusunun ECM'sinde bulunuş ve kemik sialoproteini 1 (BSP1) olarak isimlendirilmiştir (Kinne ve Fisher., 1987; Prince ve Butler, 1987; Zhang ve diğ., 1990.). Hücreler arasında köprü görevi gören üstlenmelerinden dolayı Latince köprü anlamına gelen “*pon*” eki ile kemik anlamına gelen “*Osteo*” kelimesi birleştirilerek osteopontin ismi verilmiştir (Oldberg ve diğ., 1986). OPN, post translasyonel seviyede büyük ölçüde modifiye edilir. OPN'nin insan geni 7 adet ekzon bölgesi içerir ve 4. kromozomun uzun kolunda (4q13) haritalanmıştır (Young ve diğ., 1990; Hijiya ve diğ., 1994). Farede ise 5. kromozom üzerindeki Rickettsia direnç geni *Ricr*'nin lokasyonundadır (Fet ve diğ., 1989). Memeliler ve kuşlarda OPN benzer sayıda amino asitler sahipken translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu farklı boyutlara sahip olabilirler (Yang ve diğ., 1995). OPN aspartik asit bakımından zengindir ve dokuya bağlı olarak OPN peptit zincirinin üzerindeki serin ve treonin bakiyeleri yüksek oranda fosforile edilebilir, bu da proteine oldukça asidik bir karakter kazandırır. Bu özellikler, OPN'ye oldukça büyük miktarlarda Ca^{+2} bağlama ve yüksek afinitede kalsiyum tuzu olan hidroksiapatit kristalleri ile etkileşime girme yeteneği sağlar (Giachelli ve diğ., 1995). OPN, hücre adezyon molekülleriyle etkileşebilen özel domainler taşır. Bunlardan ilki, hücre yüzey integrinlerinden $\alpha 5\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 5\beta 5$ ile etkileşime giren arginin-glisin-aspartat (RGD) içeren domaindir (Liaw ve diğ., 1995). İkincisi trombin bölünmesinden sonra $\alpha 9\beta 1$ ile etkileşime giren kriptik, serin-valin-valin-tirozin-glutamik asit-lösin-arginin (SVVYGLR) içeren domain (Smith ve diğ., 1996; Yokosaki ve diğ., 1999) ve son olarak lösin-prolin-valin (LPV) gibi $\alpha 4\beta 1$ ile etkileşime giren N-terminal domaindir (Bayless ve diğ., 1998). OPN, sağlıklı yetişkin insanlarda ve hayvanlarda sınırlı bir dağılımda bulunur. En fazla kemik ve böbrekte bulunur bunun yanı sıra vücuttaki çoğu epiteliyal hücrede de ifade edilir ve ayrıca idrar, tükürük, süt ve safra gibi vücut salgılarının çoğunda bulunur (Giachelli ve diğ., 1995b). OPN, kemik hücre tipi osteoblastlar ve kemik dokusunu bozan hücre tipi osteoklastlar arasındaki iletişimde önemli bir aracı olarak hareket eder ve osteoklastların oluşumunda, göçünde ve kemiğe bağlanmasında önemli bir rol oynar (Chellaiah ve diğ., 2003). OPN ifadesi osteoklast farklılaşmasını ve kemik rezorpsiyonunu teşvik eden Vitamin D tarafından kuvvetli bir şekilde uyarılır (Shen ve Christakos, 2005). OPN, damar sertliğine neden olan ateroskleroz

gelişiminde, vasküler yeniden modellenme ve damar tıkanıkları sonucu damarı açmak için kullanılan yöntem anjiyoplasti sonrası tekrar damarda daralma olan restenoztada rol oynar (Ström ve diğ., 2004). Farelerin birkaç böbrek hastalığı modelinde glomerüler ve tübulointerstisiyel yaralanmalarında rol aldığı gösterilmiştir. OPN'nin ifadesindeki azalmanın makrofaj kümelenmesini durduğu ve ileri derecede böbrek hasarına neden olduğu gösterilmiştir (Xue ve diğ., 2000). Kemik sialoprotein (BSP), dentin matriks protein 1 (DMP1), dentin sialofosforprotein (DSPP), enamelin (ENAM), matriks hücre dışı fosfoligoprotein (MEPE) ve OPN, kemiklerde ve/veya dişlerde eksprese edilen glikoposfolinlerdir. Bu aile üyeleri küçük integrin bağlayıcı ligand N-bağlı glikoproteinler (SIBLING) ailesinin üyesi olan proteinleri kodlarlar ve böylece MMP'lere bağlanıp spesifik promatriks kısımlarını aktive eder. Ayrıca, MMP inhibitörü olan TIMP'leri durdurabilme kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden erken tümör ilerlemesinde potansiyel belirleyiciler olarak işlev görürler (Rittling ve Chambers, 2004). OPN, yumurtalık (Kim ve diğ., 2002), prostat (Thalmann ve diğ., 1999), akciğer (Chambers ve diğ., 1996) ve kolon kanserinde (Agrawal ve diğ., 2002) rol oynar.

2.3.4.3. Lizil Oksidaz (LOX)

Lizil oksidaz (LOX) bakır bağımlı bir amin oksidazdır. Hücre dışı matris proteinlerinin, kollagenin ve elastinin çapraz bağlanmasını sağlayarak bağ dokusu matrikslerinin oluşumunda kritik bir rol oynar (Hall ve Jackson, 2013). LOX, fibrojenik hücreler tarafından salgılanır (Smith-Mungo ve Kagan,1998). Birçok fibrotik hastalıkta LOX ifadesi artarken, bakır seviyesinin azalması sonucu oluşan hastalıklarda LOX ifadesinin azladığı görülmüştür. LOX ilk önce 50 kDa ağırlığında bir pro-enzim olarak sentezlenir. Daha sonra proteolitik olarak kesilmiş olgun enzimin molekül ağırlığı 32 kDa büyüklüğünde olduğu bulunmuştur (Hall ve Jackson, 2013). Sığır aortundan elde edilmiş katalitik olarak fonksiyonel proteinin ağırlığı 32 kDa iken (Kagan ve diğ., 1979) cDNA'nın analizi ile sıçanda molekül ağırlığı 46kDa'dır (Trackman ve diğ.,1990). Transform edici büyüme faktörü-3, PDGF, adrenal korteksten aldosteron sekresyonunu uyaran anjiyotensin II, Vitamin A analogu olan retinoik asit ve FGF, LOX ekspresyonunu düzenleyen efektörlerdir (Hall ve Jackson, 2013). LOX'un birçok hastalıkta rol oynadığı bulunmuştur. Örneğin normal karaciğer hücrelerinde LOX çok fazla ifade edilmezken Wilson hastalığı ile birincil biliyer siroz (PBC) hastaları, hepatositlerde LOX ve lizil-oksidad benzeri protein-2 (Loxl2 veya LOR-1) eksprese eder ve

bu ekspresyona hepatositlerin etrafına kollagen birikimi eşlik eder. LOX ayrıca hepatit B ve C gibi fibrotik karaciğer hastalıklarında da eksprese edilir. Ancak bu hastalıklarda ekspresyon fibrotik lezyonlarla sınırlandırılır ve kollagenler hepatositler etrafında birikmez (Vadasz ve diğ., 2005). LOX, hücre dışı matriks stabilitesinin korunmasında önemli bir rol oynar ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili vasküler yeniden modellenmeye katılır. LOX ekspresyonundaki azalma, aterosklerotik sürecin erken aşamalarında görülen endotel disfonksiyon ile ilişkilidir. Fakat bunun aksine bu enzimin vasküler hücrelerde, damar sertliğine ve ameliyat sonrası damarın tekrar tıkanmasına neden olabilir (Rodríguez ve diğ., 2008). LOX ve diğer LOX familyası üyelerinin mRNA ekspresyonu sadece yüksek derecede invaziv metastatik fenotipli meme kanseri hücrelerinde gözlemlenmiştir, ancak zayıf invaziv/metastatik olmayan meme kanseri hücrelerinde gözlenmemiştir (Kirschmann ve diğ., 2002). LOX'un ayrıca kemik lezyonlarında (Cox ve diğ., 2015), kolorektal kanserde (Baker ve diğ., 2013) ve mide kanserinde (Kaneda ve diğ., 2004) de rol aldığı bulunmuştur.

2.3.4.4. Heparanaz

HPA1, HS parçalanmasından sorumludur, kanla taşınır ve tümör kaynaklı hücrelerde bol miktarda bulunur (Parish ve diğ., 2001; Vlodavsky ve Friedmann, 2001). HPA1 düşük sülfat konjugasyonu olan bölgelerde HS'nin yan zincirlerini keser. Böylece, ECM'nin ve epitelyal ve endotel hücrelerin altında yatan bazal membranın yapısal değişikliklerine katkı sağlar (Fux ve diğ., 2009). HPA1 aktivitesi, aralarında trofoblastların iç kısmını oluşturan hücreler sitotroblastlar, endotel hücreleri (EC), trombositler, mast hücreleri, nötrofiller, makrofajlar, T ve B lenfositleri ve lenfoma, melanom ve karsinoma hücreleri olmak üzere çeşitli normal ve malign hücreler ve dokularda tanımlanmıştır (Parish ve diğ., 1987; Nakajima ve diğ., 1988; Parish ve diğ., 2001; Vlodavsky ve diğ., 1992; Vlodavsky ve diğ. 1994). HPA1 geni (50 kb), insan kromozomu 4q21.3'te bulunur. Bu genin alternatif splicing ile farklı eksonların bir araya gelmesiyle 5kb ve 1.7kb büyüklüğünde mRNA ürünleri oluşur. 5 kb'lik form 14 ekzon ve 13 intron içerir, 1.7kb olan ise ilk ve 14. ekzon eklenerek düzenlenmektedir (Dong ve diğ., 2000). HPA1 dizisi, varsayılan bir N-terminal sinyal peptit dizisi (Met1-Ala35) ve bir aday transmembran bölgesi (Pro515-Ile534) içerir (Hulett ve diğ., 1999; Vlodavsky ve diğ., 1999). Klonlanan tavuk heparanazı ile insan heparanazı arasında %61 homoloji olduğu ortaya çıkmıştır (Goldshmidt ve diğ., 2001). HPA1'in fizyolojik fonksiyonları arasında HS'yi degrades etmesi, embriyo gelişimi, kıllanma ve yara iyileşmesi bulunur (Goldshmidt ve diğ.

2004; Zcharia ve diğ., 2005a; Zcharia ve diğ., 2005b). HPA1 tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz, iltihaplanma ve glomerüler hastalıklar gibi çeşitli patolojilere neden olur (Edovitsky ve diğ., 2004; Sanderson ve diğ., 2004; McKenzie ve Edward, 2007; Van den Hoven ve diğ 2007). Çeşitli malign tümörlerde HPA1'in aşırı ekspresyonu, kanser tedavisi için bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

2.4. RUNT İLİŞKİLİ PROTEİN(RUNX)

Birçok laboratuarda yapılan bağımsız çalışmalar sonucu DNA bağlama aktivitesi ile ilgili birprotein birçok farklı şekilde bulunup isimlendirilmiştir; daha ileri çalışmalarında bu proteinlerin transkripsiyon faktörlerinin Runt-domain sınıfı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Van Wijnen ve diğ., 2004) (**Tablo 2.1**). Akut miyeloid lösemi (AML), lösemi ile ilişkili kromozomal translokasyonların genetik çalışmalarına dayanmaktadır. Akut miyeloid lösemide t (8; 21) kromozom translokasyonunun kesme noktaları, kromozom 21 üzerinde bulunan insan geninin AML1 içinde kümelenmiştir (Miyoshi ve diğ., 1991). AML1 ürününün yaklaşık 130 amino asit uzunluğunda bir bölgesi *Drosophila* segmentasyon geni olan *Runt* (runt homoloji bölgesi) ile büyük bir homoloji gösterir. Bir diğer isimlendirme fare fibroblastlarından izole edilen cDNA'lardan kodlanan Polyomavirüs arttırıcı bağlayıcı protein 2'nin (PEBP2/PEA2) alfa alt biriminin de *runt* homolojisi taşıyan bir bölge içerdiği bulunmuştur. PEBP2'den türetilmiş amino asit dizisinde *runt* homoloji bölgesi dahil ilk 241 bakiye AML1'deki bakiyeler ile %99 aynı olduğu bulunmuştur (Bae ve diğ., 1993). Kemik hücre biyolojisindeki çalışmalarda, nükleer matriks protein 2 (NMP2), osteoblast-spesifik kompleks (OBSC) ve osteoblast-spesifik faktör 2 (OSF2) dahil olmak üzere farklı isimlerle adlandırılmışlardır. Tüm bu proteinlerin ve DNA bağlama aktivitelerinin, *Drosophila* runt proteininin memeli homologlarını temsil ettiği bilinmektedir (Merriman ve diğ., 1995; Banerjee ve diğ., 1997; Ducy ve diğ., 1997). Runx genlerinin isimlendirilmesi konusundaki kafa karıştırıcı isimlendirme tarihesinin nedeni tesadüf eseri farklı fonksiyonlarda keşfedilmelerinden kaynaklanmıştır. Kasım 1999'da, İnsan Genom Organizasyonu'nun (HUGO) İsimlendirme Komitesi, başlangıçta yer alan sekiz araştırmacıdan oluşan bir panelin ortak tavsiyesi ve bu genleri kodlayan kromozom kırılma noktalarının veya cDNA'ların klonlanmaları referans alınarak runt ile ilişkili proteinleri kodlayan genleri ifade etmek için “runx” teriminin kullanılmasını kabul etmiştir.

Tablo 2.1: Runt domain sınıfı ile ilişkili gen isimleri.

Gen Adı	Kısaltma
<i>Runt (Drosophila)</i>	Runt
<i>Lozenge (Drosophila)</i>	Lz
<i>Akut miyeloid lösemi (insan)</i>	AML
<i>Poliyoma virus güçlendirici-bağlama protein 2-α (fare)</i>	PEBP2α
<i>Güçlendirici çekirdek-bağlama faktör α lösemi virüsü (fare)</i>	CBFα
<i>Poliyoma güçlendirici α-bağlama faktör-2 (fare)</i>	PEA2
<i>SL3-3 güçlendirici faktör 1 (fare)</i>	SEF1
<i>SL3-3 ve AKV çekirdek-bağlama faktör (fare)</i>	S/A-CBF
<i>Nüklear faktör Δ E3A (insan)</i>	NF-ΔE3A
<i>Miyeloid nüklear faktör 1 (fare)</i>	MyNF1
<i>Nüklear matriks protein 2 (sıçan)</i>	NMP2
<i>Osteoblast-spesifik kompleks (sıçan)</i>	OBSC
<i>Osteoblast-spesifik faktör-2 (fare)</i>	OSF2
<i>T-hücre tümör entegrasyon lokus 1 protein (fare)</i>	tl-1
<i>Runt domain-kodlayan gen (Caenorhabditis elegans)</i>	Runx

AML1 (ayrıca CBFA2 ve PEBP2αB olarak da bilinir) olarak tanımlandı ve sistemik isimlendirmede runx1 ismini almıştır. Genel olarak kemik biyolojisi alanında AML3 (CBFA1ve PEBP2αA olarak da bilinir) olarak anılan gen, şimdi runx2 olarak adlandırılmıştır. AML2 (CBFA3 ve PEBP2αC olarak bilinir) üçüncü runt ilişkili gen runx3 olarak adlandırılır. Sistematik isim runx, “runt ilişkili protein” teriminin kısaltmasıdır (Van Wijnen ve diğ., 2004).

Drosophila’nın *Runt* geni erken embriyonik segmentasyonda temel bir gendir (Gergen ve Butler, 1988). Üç memeli Runx geni, 1p, 6p ve 21q kromozomlarında belirgin olan 500 kb’lik triplikasyonun parçasıdır (Strippoli ve diğ., 2002). PEBP2/ Çekirdek bağlayıcı faktör (CBF), α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. CBF, CBFα olarak adlandırılan bir DNA bağlayan alt birim ve CBFα olarak adlandırılan bir DNA bağlanmayan alt birimden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. α alt birimi *Drosophila* segmentasyon geni runt ile yapısal olarak homologtur ve β alt birimi ise DNA’ya bağlanmak için gerekli olan Runt alanı olarak adlandırılan korunmuş bir bölge içerir. Runx’in korunmuş runt domainine ek olarak bir diğer korunmuş kısım ise eksprese edilen farklı amino-terminallerle izoformları kodlayan iki promotörlerden (P1 ve P2) eksprese edilen

omurgalı runx genleridir. Potansiyel runx gen ürünlerinin çeşitliliğiekson atlama ve alternatif splice sonucueksonların uç uca eklenmesi sonucu artmaktadır (Miyoshi ve diğ., 1995; Levanon ve diğ., 1996; Terry ve diğ., 2004). Runx proteinlerinin aktivitesi ve stabilitesi post translasyonal seviyede fosforilasyon ve asetilasyon tarafından etkilendiğini göstermiştir (Tanaka ve diğ., 1996; Wee ve diğ., 2002; Jin ve diğ., 2004; Yamaguchi ve diğ., 2004). Runx faktörleri kan hücresinin gelişim süreci olan hematopoez ve kemiğin kolayca kırılmasına neden olan hastalık olan osteogeneziste görev alırlar (Otto ve diğ., 2003).

2.4.1. Runx1

AML1 olarak bilinen runx1, PEBP2 α B veya CBF α olarak da adlandırılır. İlk olarak, t (8; 21) translokasyonun kırılma noktasında (breakpoint) bulunan bir gen olarak tanımlanmış, birçok hematopoetik soyda fazlaca ifade edilen ve çeşitli hematopoetik genlerin ekspresyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olduğu bulunmuştur. Runx1, yüksek oranda korunan bir 128 amino asit alanı içermektedir. Bu homoloji bölgesi ilk olarak *Drosophila melanogaster*da segmentasyon, cinsiyet belirleme ve sinir gelişiminde rol alan bir DNA bağlayıcı protein olarak dikkat çekmiştir (Ogawa ve diğ., 1993). DNA bağlanması için gerekli konsensüs dizisi PEBP2 dizisi olarak adlandırılan PyGPyGGT'dir (Levanon ve diğ., 1998a). Tüm runt proteinleri ailesi tarafından aynı sekansın paylaşıldığı görülmüştür (Levanon ve diğ., 1998b). Runx1 ile DNA'ya kendiliğinden bağlanamayan CBF β 'in heterodimerizasyonu runx1'in DNA bağlama afinitesini arttırdığı ve ubiquitin aracılı proteolizden koruduğu gösterilmiştir (Kurokawa ve Mineo, 2006). AML1'nin hematopoetik hücrelerde üç izoformu (AML1a, AML1b ve AML1c) bulunmuştur. AML1/CBF β kompleksi, makrofilik yaş koloni stimüle edici faktör reseptörü (M-CSFR), interlökin-3 (IL-3), nötrofil elastaz ve T hücresi reseptörleri (TCR'ler) olmak üzere çok sayıda hematopoez ile ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenler (Nuchprayoon ve diğ., 1994; Uchida ve diğ., 1999; Fontana ve diğ., 2007; Ono ve diğ., 2007). Runx1, transkripsiyon aktivasyonunu sağlayan kompleksleri regüle eden organizatör bir protein olarak işlev görür. PEBP2 dizileri, birçok hedef gen promotörü içinde Ets, C/EBP α ve Myb gibi hematopoetik transkripsiyon faktörlerine bağlanır (Friedman ve David, 1996). Bu faktörlerin hepsinin, gen transkripsiyonunu aktive etmek için AML1 ile işbirliği yaptığı bilinmektedir (Zaiman ve diğ., 1996; Levanon ve diğ., 1998c; Westendorf ve diğ., 1998).

2.4.2. Runx2

Runx2 osteoblast farklılaşması ve kemik dokusunun meydana gelmesinde rol oynayan çok önemli bir faktördür. Runx2, MRIPV dizisiyle başlayan tip I Runx2 ve MASNS dizisiyle başlayan tip II runx2 olarak farklı N terminali olan iki tip izoforma sahiptir ve sırasıyla P1 ve P2 olacak şekilde iki farklı promotörler altında eksprese edilir (Komori ve Kishimoto, 1998). Osteoblastlarda tip I runx2 ekspresyonu yayginken, kondrositlerde hem tip I hem de II runx2 izoformları eksprese edilir (Enomoto ve diğ., 2000). İskelet gelişimi sırasında, hem tip I hem de tip II runx2 mRNA'ları çoğalan kondrositlerde düşük oranda eksprese edilir, kondrositler farklılaştıkça ekspresyon miktarları değişerek hem tip I hem de tip II runx2 mRNA'ları, olgunlaşma aşamaları olan kondrositlerde daha fazla eksprese edilmeye başlar (Kim ve diğ., 1999; Enomoto ve diğ., 2000). Runx2 gen ekspresyonu mezenkimal oluşumun erken evresinde ve kemik mineralizasyonunun geç evrelerinde upregüle olur (Drissi ve diğ., 2000). Osteojenik BMP2 yolağından gelen sinyaller, erken mezenkimal embriyonik gelişim sırasında runx2 ekspresyonunun promotörü olarak rol oynarlar. Runx2'nin hem kemik dokularının oluşumuna katkı sağlaması hem de BMP2 ile olan etkileşimi, WNT sinyal yolağının β -kateninin ile ve β -kateninin de BMP2 etkileşimi sonucu oluşan osteoblast farklılaşması runx2 ile WNT sinyal yolağı arasında bir bağlantı olduğunu düşündürmüştü ve yapılan çalışma sonucunda WNT'nin osteoblast farklılaşmasını sağlayan runx2 transkripsiyon faktörünün aktivasyonu yoluyla kemik oluşumuna katkıda bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Gaur ve diğ., 2005). Runx genlerinde ortak olarak bulunan runt domaininin karboksi terminali, nükleusta runx2 birikimi için nükleer lokalizasyon sinyali oluşturur. Runx2'nin bu karboksi terminali, prolin-serin-treonin (PST) bakımından zengin bir transaktivasyon alanıdır. Ek olarak, karboksi terminal runx2 ile Smad proteinlerinin etkileşimi için önemli bir bölge içerir. Runx2 genlerinde meydana gelen kromozomal translokasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar, nonsense ve missense mutasyonlar sonucu çoklu iskelet anormallikleri ile karakterize edilen kleidokraniyal displazi hastalığına neden olmaktadır (Otto ve diğ., 2002). Transkripsiyonel düzenleyici NOTCH1'de meydana gelen mutasyon sonucu bir transkripsiyonel baskılayıcı olan hairy ilişkili aile üyesi HRT'yi aktive ederek runx2'nin ifadesinin baskılandığı ve bunun sonucunda aort kapağında erken gelişim evresi sırasında defektler olduğu ve aort kapağında kalsiyum birikimi sonucu kireçlenmeye neden olduğu görülmüştür (Garg ve diğ., 2005). Runx2'nin agresif olarak kemikten dokusundan meme ve prostat dokularına metastaz yaptığı ve buralarda çok yüksek seviyelerde ifade edildiği görülmüştür. Kanser hücrelerinde runx2'nin

metastaza neden olan faktörlerle (MMP, anjiyogenik faktörler ve adeziv faktörler gibi) etkileşime geçip aktive ettiği görülmüştür. Örneğin, MMP'ler ECM'yi degrede eden endopeptidazlardır. MMP'ler hem osteoblast hem de osteoklast hücrelerinde ifade edilirler bunu yanı sıra hücre gelişimi, göçü ve hücre dışı matrisin yeniden düzenlenmesinde rol alırlar. Yapılan çalışmada, MMP9'un runx2'nin direkt hedef geni olduğu ve MMP9 ekspresyonunu kanser hücrelerinde indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, MMP13'ünde Runx2'nin hedef geni olduğu ve kansere neden olduğu bulunmuştur (Pratap ve diğ., 2005). Bunların yanı sıra, runx2'nin BMP / TGF β , diğer büyüme faktörü sinyalleri ve tümör oluşumuna katkı sağlayacak sinyal yolları ile etkileşerek kanser oluşumuna aracılık ettiği gösterilmiştir (Pratap ve diğ., 2006).

2.4.3. Runx3

Runx3'ün sinir kök hücre üretimi süreci olan nörojenezde, timus hücrelerinin olgun T hücrelerine farklılaşması olayı timopoezde ve mide epitelinin hücre proliferasyonu ile apoptozisinin kontrolünde rol oynadığı gösterilmiştir. Runx3, runx gen ailesi içerisinde en az sayıda ekson içeren ve en fazla korunmuş olan genidir. Runx3, T hücreli lenfomada baskın bir onkogen olarak hem tümör oluşturucu hem de mide kanserinde tümör baskılayıcı olarak görev yapabilir (Levanon ve diğ., 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Bu çalışmada, meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücre soylarının kültürleri yapılmıştır. Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu (DMEM) ve F12 medyumunu 1:1 oranında içeren, %10 fetal sığır serum (FBS) ve penisilin streptomisin (100 U/ml penisilin G, 100 µl/ml streptomisin (PES)) ilaveli flasklarda 37°C'de, 1 atmosfer basınçta, %5 CO₂'li inkübatörlerde çoğaltıldı. Flasktaki hücre yoğunluğu arttığında, flasktaki medyum çekilip kalsiyum-magnezyum içermeyen steril PBS ile yıkandı. Steril TrypLE(Gibco) solüsyonu flaska eklenip 3 dakika etüvde bekletilerek hücrelerin kaldırılması sağlandı ve daha sonra medyum ilave edilerek TrypLE'nin aktivitesi inhibe edildi. Daha sonra TrypLE ve medyum içeren solusyon falkona alınarak 1500g'de 5 dakika santrifüj edilip hücreler çöktürüldü. Çöktürülen hücreler medyumla süspanse edilerek yeni flasklara ekim yapıldı veya istenilen miktarda hücre Thoma lamında sayılarak uygulanacak yönteme göre ekim yapıldı. Hücreler uzun süre kullanılabilmesi için donduruldu. Dondurma için çoğaltılan hücreler TripLE ile kaldırılıp Thoma lamında sayıldı. Sayım sonrası hesaplamalar yapıp sonra falkon tüpe alınıp 1500g'de 5 dakika santrifüj edilerek toplandı. Santrifüj yapılırken dondurma medyumunu hazırlandı. %90 soğuk fetal sığır serumu (FBS) ile %10 oranında kriyoprotektan ajan olarak dimetilsülfoksit (DMSO) kullanıldı. Her kriyotüpte 1 milyon hücre olacak şekilde hücreler alikotlandı. Kriyotüpler bir gece -86°C'de tutulup ertesi gün -153°C'ye kaldırıldı.

3.2. RUNX2 siRNA UYGULANMASI

Meme kanseri hücre soyu olan MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde runx2 *knockdown* modeli oluşturmak amacı ile runx2 siRNA uygulaması gerçekleştirilmiştir. siRNA uygulamasından bir gün önce 6 kuyucuklu hücre kültür plakalarına 1x10⁵ hücre ekimi gerçekleştirildi. Böylece sonraki gün yaklaşık olarak %60-70'lik hücre dolgunluğu sağlanmış oldu. Penisilin-streptomisin içermeyen FBS'li hücre kültür medyumunda bir gece bekletilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerine 50µM runx2 siRNA ve aynı konsantrasyonda kontrol siRNA transfeksiyonu lipofektamin 2000 (ThermoFisher) kullanılarak gerçekleştirildi. Transfeksiyon işlemini takiben 12, 18, 24, 48 ve 72 saat sonra hücrelerden gen ve protein ekspresyon çalışmaları için hücre lizatları hazırlandı.

3.3. GEN EKSPRESYON ANALİZLERİ

Runx2 knockdown modeli oluşturulan MCF-7 hücrelerinde, hem hedef genin ve hem de hipotezimize göre hedef genin susması sonrasında etkileneceği öngörülen genlerin ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Bu amaç doğrultusunda gen ekspresyon analizleri için mRNA miktarındaki değişiklikler PCR yöntemi ile incelendi. Bu analizlerin yapılabilmesi için 6 farklı aşamada işlemler gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Total RNA İzolasyonu

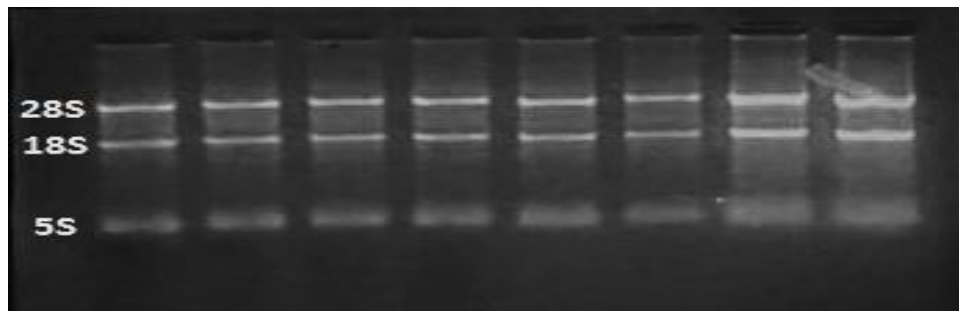
Bu çalışmada her aşama steril şartlar altında ve RNaz inhibitörleri ile temizlenmiş ortam şartlarında gerçekleştirildi. İlk aşama, runx2 siRNA ve kontrol siRNA uygulanmış MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin yetiştirildiği 6 kuyucuklu kültür plakarından hücre medyumunu uzaklaştırılmasıyla başlamıştır. Sonrasında PBS ile yıkanan hücreler, yetiştirdiği yüzey alanı göz önüne alınarak Trizol ayırıcı (Ambion) ile muamele edildi (10 cm²'ye 1 ml olarak). Trizol eklendikten sonra hücrelerin yetiştirdiği kuyu içinde pipetaj yapıldı ve böylece hücrelerin lizisi sağlandı. Bu işlem sonrasında oluşan Trizollü hücre lizatları DNaz ve RNaz içermeyen, steril 2ml'lik bir ependorf tüpe aktarıldı. Hücre lizatları oda ısısında 5 dakika beklendikten sonra, ependorf tüplere 200µl kloroform eklendi ve tüpler 15-30 sn vortekslendi. Ardından oda ısısında 2 dakikalık bir beklemeden sonra, tüpler 12.000g'de 30 dakika ve +4°C'de santrifüj edildi. Bu işlemten sonra 3 faza ayrıldığı gözlenen hücre lizatının RNA içeren ve şeffaf olan en üst fazı toplanarak DNaz ve RNaz içermeyen, steril bir ependorf tüpe aktarıldı. Sonrasında bu tüplere 500µl soğuk izopropanol eklenerek tüpler ters düz edildi ve 15 dakika buz içinde bekletildi. Hemen ardından 12.000g'de 15 dakika ve +4°C'de santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant döküldü ve tüpün dibinde bulutsu bir çökelek olarak gözlemlenen pelete 1ml %70 etanol eklendi. Etanol ile RNA yıkama aşaması olarak adlandırılan bu aşamada tüpler 7500g'de 5 dakika ve +4°C'de santrifüj edildi. Etanol ile aynı işlemler yapılarak ikinci kez yıkanan RNA çökeltisi, sonrasında oda ısısında 15-20 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan pelete 30 µl DNaz ve RNaz içermeyen su eklendi ve peletin çözünmesi sağlandı. Ependorf tüplere 3'er µl DNaz tamponu ile DNaz-I eklendi ve tüpler 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buza oturtuldu ve son konsantrasyon 5mM olacak şekilde stok 0.2 M EDTA'dan 1'er µl tüplere eklendi. Bu aşamada RNA miktar, kalite ve saflık hesaplamaları yapıldı kadar buzda tutuldu.

3.3.2. RNA Saflık, Miktar ve Kalite Tayini

Yukarıda yapılan total RNA izolasyon işlemlerinden sonra, elde edilen izolatın içerdiği total RNA miktarını saptamak amacıyla Nanodrop (ThermoFisher, USA) cihazı kullanıldı (**Tablo 3.1**). Total RNA izolatından 1 μ l kullanılarak 280, 260 ve 230 nm dalga boylarında alınan absorbans değerleri göz önünde bulundurularak izolatların miktarı ve saflık dereceleri belirlendi. Nükleik asitler UV bölgesinde 260 nm, proteinler ise 280 nm dalga boylarında maksimum absorbansa sahiptirler. Nükleik asitlerin saflık değerleri için saflık değerleri 260/280 oranı verir. Beklenen saflık değeri; DNA ölçümleri için : $\sim 1,8$ RNA ölçümleri için : $\sim 2,0$ kabul edilir. 260/230 oranı ise 2 ile 2,2 arasında en saf haldedir (Özalp ve diğ., 2010). Kalite kontrolü için agaroz jelde yürütüldüğünde rRNA'ların alt birimleri 28S, 18S ve 5S rRNA'ların üçüde ayrı ayrı ve parlak şekilde saptandı (**Şekil 3.1**).

Tablo 3.1: Deney ve kontrol gruplarının RNA miktarları ve saflık değerleri.

İsim	RNA Miktarı	A260/280	A260/230
DRS17	324,4 ng/ μ l	1,85	0,46
DKS17	706,4 ng/ μ l	1,77	0,90
DRS20	522,7 ng/ μ l	1,80	0,50
DKS20	781,8 ng/ μ l	1,98	0,65
CRS17	317,6 ng/ μ l	1,89	0,85
CKS17	428,9 ng/ μ l	1,97	0,61
CR21	581,3 ng/ μ l	1,94	0,71
CK20	877,9 ng/ μ l	1,90	0,82



Şekil 3.1: Deney ve kontrol gruplarının kalite kontrolü için rRNA alt birimlerine agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülendi.

3.3.3. cDNA Sentezi

Saf olarak elde edilen RNA'nın hem dayanıklılığını arttırıp bozulmasını önlemek hemde araştırdığımız proteinlerin deney ve kontrol gruplarındaki ekspresyonlarını görebilmek adına spesifik bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan PCR yöntemi ile cDNA'ya dönüşümü sağlandı. Kalıp olarak kullanılan RNA ipliğine rastgele primerler bağlandıktan sonra revers transkriptaz enzimi karşı zincirini dNTP'ler ile tamamlaya başlar ve RNA/DNA hibridi oluşturur. Daha sonra RNA ipliği degrade olur ve cDNA ipliğinin ucunda hairpin ilmeği oluşur. Bu işlem sırasında revers transkriptaz enzimi, dNTP karışımı, rastgele primerler ve tampon içeren bir master mix(High capacity cDNA kit) ile elde ettiğimiz RNA kalıp olarak kullanıldı. Steril ortam koşullarında steril PCR tüpleri içerisine total hacim 20µl olacak şekilde master karışım, Kalıp RNA ve DNaz RNaz içermeyen su eklenerek vortekslenir. Daha sonra kit protokolü doğrultusunda sıcaklıkları ayarlanmış PCR cihazına yerleştirildi (**Tablo 3.2**).

Tablo 3.2: cDNA dönüşümü için gerekli reaksiyon karışım içeriği.

Reaksiyon Karışımı	Miktar
Master Miks	10µl
Kalıp RNA	3000ng
Nükleaz İçermeyen su	5µl
Toplam Hacim	20µl

3.3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA'nın araştırılan ve istenilen dizilerin çoğalması esasına dayanan bir yöntemdir. PCR yöntemi üç aşamadan meydana gelir. Birinci aşama, 92-95°C sıcaklığa maruz bırakılan çift iplikli DNA zincirinin birbirinden ayrılmasıdır. İkinci aşama 37-65°C sıcaklığa maruziyet sağlanarak açılmış olan DNA ipliklerine primerlerin kendi baz dizilerine karşılık gelen kısımlara bağlanmasıdır. Son aşamada ise DNA polimeraz enzimi aracılığı ile primerlerin uzatılması işlemi gerçekleşir. Üçüncü aşamada kullanılan DNA polimerazın optimum katalitik aktivite göstermesi için işlem 72°C'de gerçekleştirilmektedir. Deney gruplarından elde edilen kalıp RNA'lar cDNA'ya dönüştürdükten sonra spesifik olarak transkript seviyesini belirlemek istediğimiz gen bölgelerini çoğaltabilmek için her genin kendine ait ayrı revers ve forward primerleri kullanıldı. Toplam PCR karışımı her bir gen için Applied Biosystem Ampli Taq Gold 360 Master Mix kiti kullanılarak hazırlandı. Steril PCR

tüpleri içerisine total hacim 50 μ l olacak şekilde master mix, her gene özgü revers ve forward primerler, kalıp cDNA ve DNaz RNaz-içermeyen su eklenerek vortekslenip ve kısa-hızlı bir santrifüj işlemine tabi tutuldu (**Tablo 3.3**). Daha sonra primer uzunluklarına göre sıcaklık süreleri programlanıp ayarlanmış PCR cihazına yerleştirildi (**Tablo 3.4**).

Tablo 3.3: PCR yöntemi için gerekli reaksiyon karışımının hazırlanması.

Reaksiyon Karışımı	Miktar
Master Miks	25 μ l
Revers Primer	5 μ l
Forward Primer	5 μ l
Kalıp DNA	2,5 μ l (250ng)
Nükleaz İçermeyen Su	12,5 μ l
Toplam Hacim	50 μ l

Tablo 3.4: PCR yönteminde kullanılan döngüsel sıcaklık tablosu.

Sıcaklık	Süre
95°C	10 sn
95°C	30 sn
48°C	30sn
72°C	9 sn (OPN) 12sn Runx2 14 sn (SPARC) 15 sn (GAPDH) 15sn (LOX) 18 sn (HPA)
72°C	7 dk

40 Döngü

3.3.5. Primerlerin Tasarımı

Çalışmamızda gen ekspresyon analizleri için kullanacağımız PCR pirimerleri, Amerikan Biyoteknoloji Bilgisi Ulusal Merkezi (NCBI)'nin nükleotit bilgi bankasından alınan mRNA verileri kullanılarak gerçekleştirildi. Primer3 (version 0.4.0) web tabanlı yazılım primer tasarımı için kullanıldı. Bu yazılımdan primer seçimi için uygun kriterlere sahip primerler

seçilerek “Basic Local Alignment Search Tool” aracılığı ile çalışacağımız örneklerle uygunluğu test edildi. Aşağıdaki tabloda çalışmamızda ekspresyon analizini yaptığımız genler için kullandığımız *forward* ve *revers* primerlerin dizileri verilmiştir (**Tablo 3.5**).

Tablo 3.5: PCR yönteminde kullanılan *revers* ve *forward* primer dizileri.

Primer Adı	Primer Sekansı
GAPDH / <i>FORWARD</i>	GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG A
GAPDH / <i>REVERSE</i>	TTC GTT GTC ATA CCA GGA AAT G
RUNX2 / <i>FORWARD</i>	ACC CAA GCA GAA TTT AGC AGA G
RUNX2 / <i>REVERSE</i>	AAG GAG TCA GGA TGA ATT CCA A
HPA1 / <i>FORWARD</i>	TCC TGT CCT CGA ACT CCT GT
HPA1 / <i>REVERSE</i>	GAT GGC ATG TGT CTG TGG TC
OPN / <i>FORWARD</i>	TGA AAC GAG TCA GCT GGA TG
OPN / <i>REVERSE</i>	TGA AAT TCA TGG CTG TGG AA
SPARC / <i>FORWARD</i>	GTG CAG AGG AAA CCG AAG AG
SPARC / <i>REVERSE</i>	TCA TTG CTG CAC ACC TTC TC
LOX / <i>FORWARD</i>	CAG AGG AGA GTG GCT GAA GG
LOX / <i>REVERSE</i>	CCA GGT AGC TGG GGT TTA CA

3.3.6. PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi

PCr reaksiyonu sonrasında ürünleri görüntülemek amacıyla %2’lik agar jel hazırlandı. Bunun için 1 gr agaroz 49ml distile su ve 1ml 50X TAE tamponu karıştırılarak mikrodalgaya konuldu ve agar karışımı tamamen şeffaf hale gelene kadar ısıtıldı. Daha sonra soğutulmaya bırakıldı. Yaklaşık 60°C’lik bir sıcaklığa kadar soğuması beklendikten sonra 2,5µl Etidyum bromür eklenip yatay elektroforez tankına döküldü ve örneklerin yükleneceği kuyucukları şekillendirecek taraklar sisteme yerleştirildi. Polimerizasyon işleminin gerçekleşmesinden sonra, PCR ürünlerinin 5µl’si için 6x DNA boya (Fermantas) çözeltisinden 1 µl karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa markör(Abcam) yüklendi. Daha sonra jelde ayrışan bandlar UV transluminatör (Ave ANE) kullanılarak görüntülendi.

3.4. PROTEİN EKSPRESYON ANALİZLERİ (WESTERN BLOTTING)

3.4.1. Protein Lizatlarının Hazırlanması

Hücre kültürü ve siRNA uygulamaları sonrasında hücre kültür plakalarından medyum çekilip, steril PBS ile yıkandı. Sonrasında buz üzerine alınarak her kuyucuğa 100µl Lizis tamponu ilave edildi. 30 dakika boyunca her 5 dakikada bir plakanın çalkalanması sağlandı. Hücrelerin kaldırılması için hücre kazıyıcısı kullanıldı ve kaldırılan hücreler lizis tamponuyla birlikte 1,5 ml'lik ependorf tüpe alındı. Hücre lizatları 5sn vorteks 5sn buz olacak şekilde 3 defa vortekslendi. Sonrasında 13000g'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant 20µl olacak şekilde alikotlanarak Bradford protein tayini için kullanıldı veya daha sonra kullanılmak üzere -86°C'ye kaldırıldı.

3.4.2. Bradford Protein Tayini

Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının proteinlere bağlanarak mavi renge dönüşmesi ve protein miktarına göre oluşan farklı renk yoğunluklarının spektrofotometrik olarak 595 nm dalga boyunda absorbans değerleri kullanılarak protein miktarının saptanması temeline dayanmaktadır. Bradford ayıracı, 25mg Coomassie Brilliant Blue G-250 12,5 ml %95 etanolde çözündürerek ve daha sonra 25 mL %85 fosforik asit (H₃PO₄) eklenerek hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözelti filtre kağıdından süzülür ve protein tayini için kullanılır. Protein miktar tayini için 1,46 mg/ml Bovine Serum Albumin (BSA)'dan 80, 40, 20, 10, 8 µg/mL konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. 1:100 oranında ultra saf su ile örnekler sulandırıldı. 160µl örnek ile 40µl Bradford boyası karıştırılıp kuyulara konuldu ve mikropilaka okuyucuda (Biotek-µquant) 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Standart grafiği oluşturuldu ve bu grafiğe göre protein miktarları hesaplandı.

3.4.3. %4-12 Bis-Tris Gradyent Jel Elektrofrez

Bradford yöntemi ile ölçüm sonucu 20 µg protein için kaç µl örnek alınması gerektiği bulundu. Daha sonra ependorf tüplere 5 µl LDS, 2 µl SRA, örnek ve toplamda 20µl tamamlayacak şekilde ultra saf su konuldu. Hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dakika bekletildi. Daha sonra Bolt %4-12 Bis-Tris Jel Plus hazır jeller (Invitrogen) kullanılarak kuyulara örnekler yüklendi. 20 ml MES buffer (Novex) + 380 ml saf su olacak şekilde yürütme tamponu hazırlandı ve örnekler 165 V 300 A 30 dakika yürütüldü.

3.4.4. Jeldeki Proteinlerin Nitroselüloz Membrana Aktarımı

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membranlara aktarımı yarı kuru emdirim yöntemi kullanıldı. Bu işlem i-Blot cihazı (Invitrogen) kullanılarak 7 dakikalık süre zarfında gerçekleştirildi. Özgün olmayan antikor bağlanmalarını engellemek amacıyla, proteinlerin aktarıldığı membran, TBS-T tamponunda %5 oranında yağsız süt tozu (SantaCruz) içeren çözelti içinde 1 saat süreyle bloklama işlemine tabi tutuldu. TBS ile bloklama solüsyonu 1:1 oranında hazırlanıp 1:1000 veya 1:500 oranında primer antikor ile +4°C’de 16 saat muamele edildi. Yıkamalara alınmadan önce 1 saat oda sıcaklığında tutuldu. TBS-T ile yıkamalar yapıp daha sonra sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında muamele edilip tekrardan TBS-T ile yıkamalar yapıldı. Son olarak TBS tamponuna alındı. Protein bantları, Lüminol (SantaCruz) kullanılarak kemilüminesans olarak görüntülendi. Bantlar, Kodak GL1500 Jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi ve Kodak Molecular Imaging Systems yazılımı ile densitometrik analizleri yapıldı.

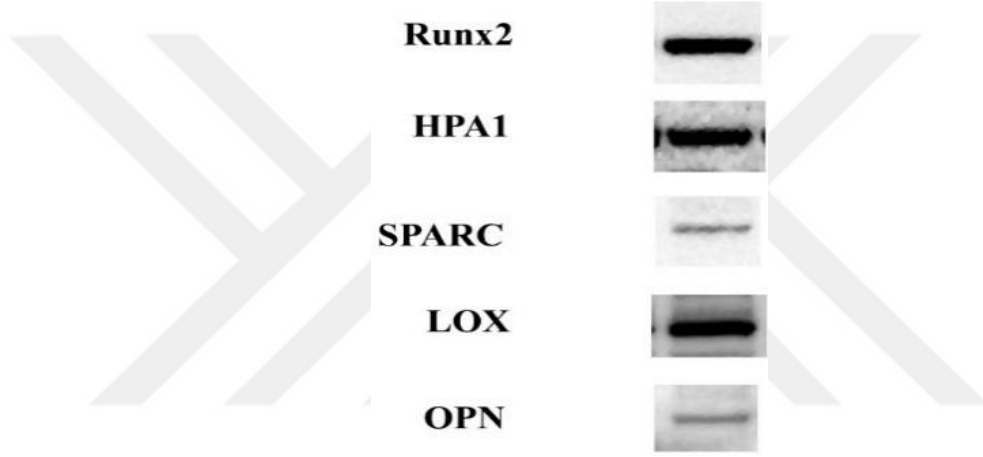
3.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Runx2 *knockdown* hücre hatları ile kontrol hücre hatlarından elde edilmiş protein band yoğunlukları Kodak GL1500; Kodak Molecular Imaging Sytems yazılımı kullanılarak elde edilmiş ve Graphpad Prism (5.01) programında istatistiksel analizler için kullanılmıştır. Deney ve kontrol grupları nonparametrik t-testi kullanılarak karşılaştırılmış ve iki grup arasındaki istatistiksel anlamlılık dereceleri analiz edilmiştir. Grafikler Microsoft Office Excel’de hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. MCF-7 HÜCRELERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

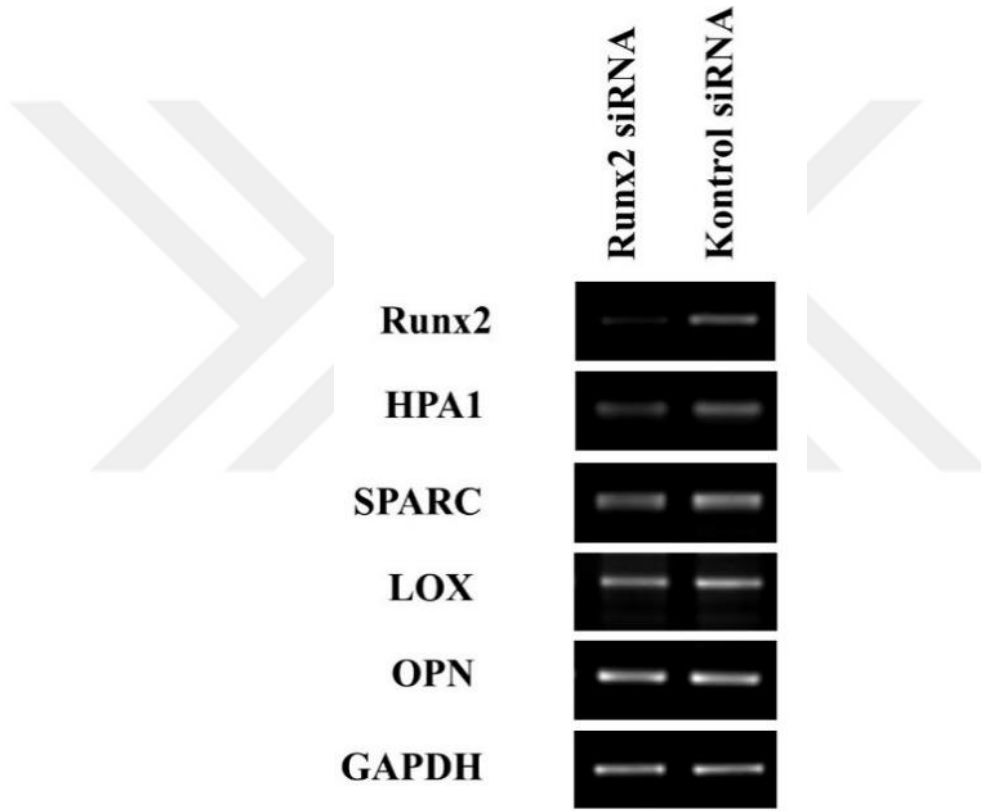
Çalışmamızda ele aldığımız HPA1, SPARC, LOX, ve OPN matriselüler proteinlerinin meme kanseri hücre soyu ve östrojen reseptör negatif olan MCF-7 hücrelerinde mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları araştırılmıştır. Western emdirim yöntemi ile bu hücrelerde ele alınan proteinlerin varlığı ortaya koyulmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: MCF-7 hücre soyunda Runx2, HPA1, SPARC, LOX ve OPN ekspresyonunu gösteren western emdirim sonuçları.

4.1.1. Runx2 siRNA Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde mRNA Seviyeleri

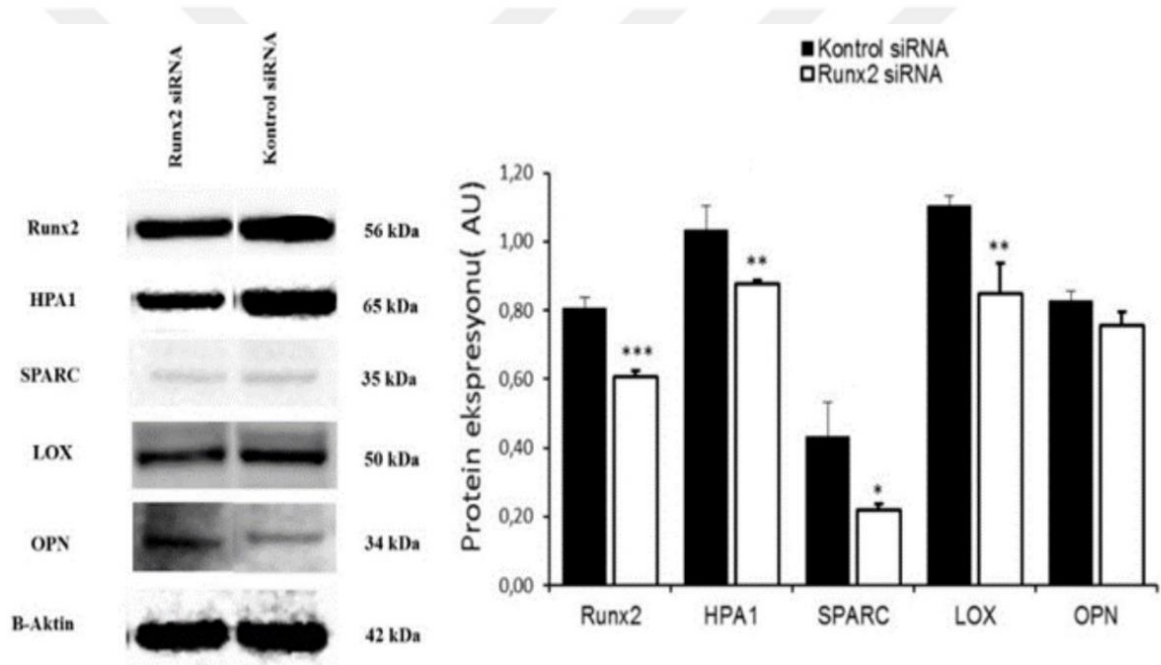
Runx2 siRNA'sı uygulanarak MCF-7 hücrelerinde oluşturulan runx2 *knockdown* modelinde, bu hücrelerde Runx2'nin transkript seviyesi büyük oranda baskılanmıştır. Bu hücrelerde HPA1, SPARC, LOX, ve OPN'nin mRNA seviyelerine PCR yöntemi ile bakıldığında, HPA1 ve SPARC'nin mRNA seviyelerinin belirgin bir biçimde azaldığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, HPA1 ve SPARC kadar olmasa da LOX mRNA seviyesinde de bir azalma tespit edilmiştir. Ancak, OPN ekspresyonunda herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: MCF-7 hücre soyunda Runx2 *knockdown* hücreler ile kontrol hücrelerinin mRNA transkript seviyelerinin agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmesi.

4.1.2. Runx2 siRNA Uygulanmış MCF-7 Hücrelerinde Protein Seviyeleri

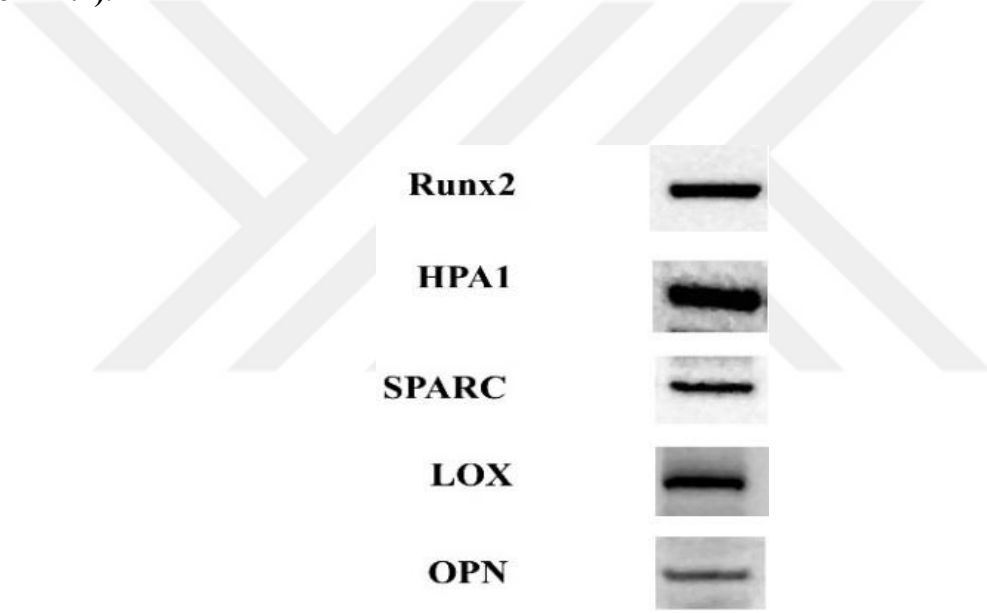
MCF-7 hücre soyunda runx2 siRNA'sı uygulanan hücrelerde runx2'nin protein seviyesi belli bir oranda baskılanmıştır ($p \leq 0,001$). Runx2 *knockdown* MCF-7 hücrelerinde ise HPA1, SPARC, LOX, ve OPN gibi matriselüler proteinlerin ekspresyon seviyeleri Western emdirim yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığında, HPA1, LOX ($p \leq 0,01$) ve SPARC ($p \leq 0,05$) protein seviyelerinin belirgin bir biçimde azaldığı, OPN'de ise istatistiksel açıdan anlam taşımayan çok az miktarda bir azalama olduğu görülmüştür. SPARC'ın MCF-7 hücrelerinde protein varlığı çok az olmasına rağmen Runx2 *knockdown* hücrelerde SPARC ifadesinin daha da azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: MCF-7 hücre soyunda Runx2 *knockdown* hücreler ile kontrol hücrelerinden elde edilen HPA1, LOX, SPARC, OPN ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren protein ekspresyon seviyeleri (Au) (sağda). Runx2 Kontrol 0,8080±0,02; Deney 0,6036±0,01; ***Kontrolle göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$). HPA1 Kontrol 1,052±0,03; Deney 0,8747± 0,001; **Kontrolle göre anlamlı ($p \leq 0,01$). SPARC Kontrol 0,4659±0,06; Deney 0,2117±0,01; *Kontrolle göre anlamlı ($p \leq 0,05$). LOX Kontrol 1,112±0,01; Deney 0,8264±0,04; **Kontrolle göre anlamlı ($p \leq 0,01$). OPN Kontrol 0,8029± 0,01 Deney 0,7586±0,02.

4.2.MDA-MB-231 HÜCRELERİNDE ELDE EDİLEN BULGULAR

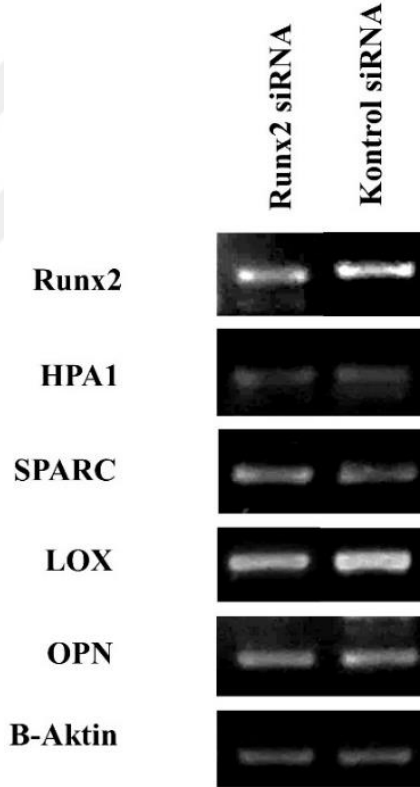
Östrojen reseptör pozitif olan MDA-MB-231 hücre soyunda HPA1, SPARC, LOX, ve OPN matriselüler proteinlerinin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonları araştırılmıştır. Çalışmamızda ele aldığımız proteinlerin varlığı Western emdirim yöntemi ile gösterilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: MDA-MB-231 hücre hattında Runx2, HPA1, SPARC, LOX ve OPN ekspresyonunu gösteren western emdirim sonuçları.

4.2.1. Runx2 siRNA Uygulanmış MDA-MB-231 Hücrelerinde mRNA Seviyeleri

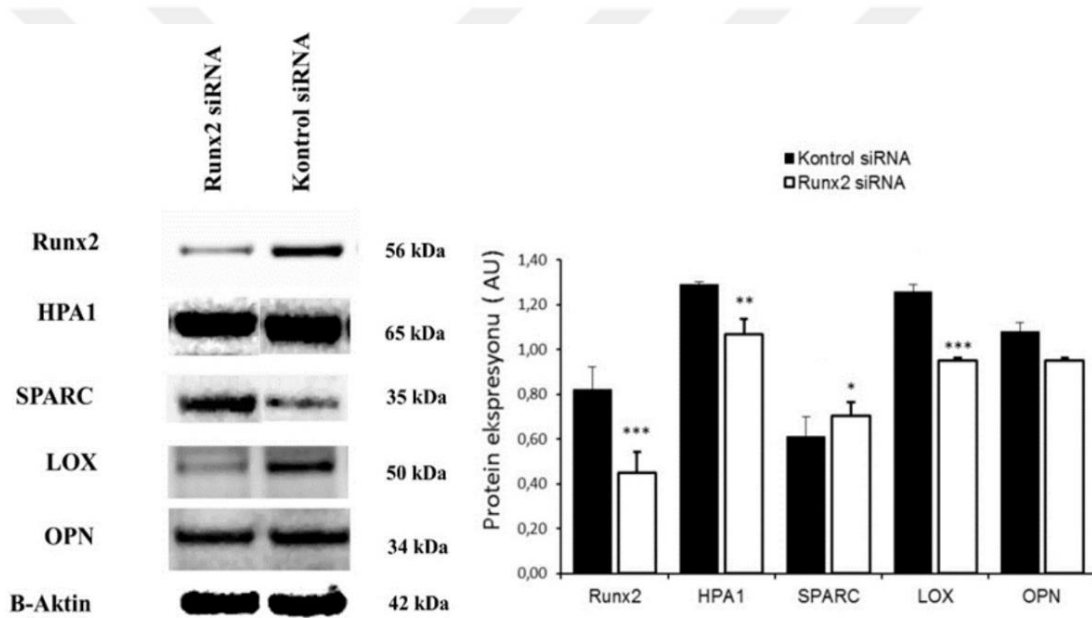
Runx2 siRNA'sı uygulanarak MDA-MB-231 hücrelerinde oluşturulan runx2 *knockdown* modelinde, bu hücrelerde Runx2'nin transkript seviyesi belli bir oranda baskılanmıştır. Runx2 *knockdown* MDA-MB-231 hücre soyunda LOX'un büyük oranda azaldığı gözlenmiştir. HPA1'in mRNA seviyesinde de azalma saptanmış fakat LOX ifadesi kadar olmadığı gösterilmiştir. Buna karşın, SPARC ifadesinin Runx2 *knockdown* hücrelerde artmış olduğu gözlenmiştir. OPN mRNA seviyesinde ise herhangi bir değişiklik saptanamamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: MDA-MB-231 hücre soyunda Runx2 *knockdown* hücreler ile kontrol hücrelerinin mRNA transkript seviyelerinin agaroz jel elektroforezi yöntemi ile görüntülenmesi.

4.2.2. Runx2 siRNA Uygulanmış MDA-MB-231 Hücrelerinde Protein Seviyeleri

Östrojen reseptör pozitif MDA-MB-231 hücre soyunda runx2 siRNA uygulanarak oluşturulan deney modelinde, runx2'nin protein seviyesi belli bir oranda baskılanmıştır ($p \leq 0,001$). Kontrol grubu ile çalışmamızda ele alınan proteinlerin seviyeleri Western emdirim yöntemi kullanılarak karşılaştırıldığında, runx2 *knockdown* MDA-MB-231 hücrelerinde HPA1 ($p \leq 0,01$) ve LOX ($p \leq 0,001$) protein seviyelerinde çok belirgin bir azalma olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, OPN protein seviyesinde istatistiksel açıdan anlam taşımayan çok küçük bir miktarda azalma olduğu tespit edilmiştir. Ancak, SPARC'ın protein seviyesinde de mRNA seviyesinde olduğu gibi diğer proteinlerin aksine bir artış olduğu gösterilmiştir ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: MDA-MB-231 hücre soyunda Runx2 *knockdown* hücreler ile kontrol hücrelerinden elde edilen HPA1, LOX, SPARC, OPN ve yükleme kontrolü olarak kullanılan β -aktin protein bantları (solda) ile bu bantların optik yoğunluk oranlarını gösteren protein ekspresyon seviyeleri (Au) (sağda). Runx2 Kontrol $0,8218 \pm 0,06$; Deney $0,4567 \pm 0,05$; ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$), HPA1 Kontrol $1,296 \pm 0,01$; Deney $1,050 \pm 0,03$; **Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,01$). SPARC Kontrol $0,6591 \pm 0,05$; Deney $0,7524 \pm 0,03$; *Kontrole göre anlamlı ($p \leq 0,05$). LOX Kontrol $1,249 \pm 0,02$; Deney $0,9510 \pm 0,001$; ***Kontrole göre önemli derecede anlamlı ($p \leq 0,001$). OPN Kontrol $1,148 \pm 0,02$; Deney $0,8532 \pm 0,002$.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

ECM hücreleri çevreleyen ve hücreler arası iletişimde, hücre farklılaşması ve hücrenin yaşamsal sinyallerinin temini gibi diğer pek çok fonksiyonel süreçte önemli rollere sahip dinamik bir yapıdır. ECM matrisellüler proteinler ve kompleks proteoglikanlardan oluşur. ECM oluşumu büyüme ve yara iyileşmesi gibi süreçlerde oldukça önemlidir. ECM'nin yapısını ve kompozisyonunu anlamak tümör invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerin kavranmasında da önemlidir. ECM'nin fonksiyonlarının gerçekleşmesi ve düzenlenmesinde pek çok matrisellüler proteinler görev alır. Çalışmamızda metatetik süreçlerde rol aldığı bilinen HPA1, LOX, SPARC ve OPN gibi matrisellüler proteinlerin ekspresyon örüntülerinin, bir onkogen olarak ön plana çıkan runx2 transkripsiyon faktörü ile bağlantılı olup olmadığı noktasında önemli bilgiler sağlanmıştır.

Bir matrisellüler protein olarak SPARC doku yenilenmesi, onarımı, gelişimi, hücre döngüsü, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayan önemli mekanizmaların içinde yer alır (Funk ve Sage, 1991; Feng ve Tang, 2014; Chang ve diğ., 2017). İnsan prostat kanserinde aday markörler ve yeni farmakolojik hedefler saptamak amacıyla mikroarray teknolojisi kullanılarak yapılan total gen ekspresyon çalışmalarında, kanserin derecesi ile bağlantılı olarak SPARC ve BGN ifadelerinin arttığı gösterilmiştir (Lapointe ve diğ., 2004). Öte yandan bir başka çalışmada, birincil kolorektal adenokarsinom dokuları ve kolorektal alandan metastaz yoluyla karaciğere yayılan dokulara yapılan biyopsilerde Northern blot analizi ve *in situ* hibridizasyon yöntemi ile SPARC'ın ekspresyonundaki farklılıkları incelenmiştir (Porte ve diğ., 1995). Elde edilen veriler, birincil kolorektal adenokarsinomların %83'ünde ve karaciğer metastazlarının %95'inde SPARC mRNA'sının yüksek seviyelerde olduğunu ortaya koymuştur. Neoplastik olmayan kolorektal mukoza biyopsilerinin %42'sinde ve kontrol karaciğer dokusunun %28'inde SPARC mRNA seviyelerinin ise düşük veya orta derecede olduğunu göstermiştir. Bu verilerden yola çıkan araştırmacılar, SPARC'ın normal dokularda düşük seviyelerde bulunduğunu ve aşırı derecede eksprese olduğu durumların kanserin malignant karakteri ile bağlantılı olduğu sonucuna varmışlardır. Gary ve diğ. (2001) insan yumurtalık yüzeyi immortalize epiteliyal hücre soyu olan HOSE hücrelerinde Northern ve Western emdirim yöntemleri sonucu SPARC ifadesinin çok yüksek olduğunu tespit

etmişlerdir. Ancak yumurtalık kanser hücre soylarında ve biyopsi dokularında SPARC ifadesinin azaldığı görülmüştür. İmmunohistokimya yöntemi ile normal yumurtalık hücresi ve kanserli yumurtalık hücresinde SPARC lokalizasyonuna bakıldığında SPARC'ın sitoplazmada konumlandığı fakat stromada bulunmadığı anlaşılmıştır. Aksine, 3. seviye yumurtalık karsinomunda sitoplazmada SPARC miktarı azalmış ve stromada konumlandığı saptanmıştır. Bu çalışmada ayrıca bir diğer yumurtalık kanser hücre soyu olan SKOV3 hücrelerine eksojen olarak SPARC uygulanması sonucunda apoptotik ölüm sürecinin uyarıldığı gösterilmiştir (Yiu ve diğ., 2001). Beyin tümör hücreleri ile yapılan bir çalışmada ise hücreler serumsuz ortamda kontrol retroviral vektör ve SPARC kodlayan retroviral vektör ile enfekte edilmiştir. Daha sonra SPARC ifadesinin apoptoza etkisini görmek için Flow Sitometri yöntemi ile Sub-G0 fraksiyonu ölçümü yapılmış ve sonuç olarak SPARC vektörü içeren hücrelerde apoptozun azaldığı gösterilmiştir. Böylece serumsuz ortamda büyüme faktörlerinin olmaması durumunda hücrenin apoptoza gitmesine SPARC ifadesinin direnç oluşturduğu bulunmuştur. Bu direncin altında yatan nedenleri bulmak için hem proapoptotik proteinlerin aktivitesini azaltan hemde tümör hücre invazyonunda rol oynayan protein kinaz B/AKT ve PI3K ile SPARC arasındaki ilişkiye bakılmıştır. AKT ve PI3K ayrı ayrı susturularak apoptoza etkileri bakılmış ve sonuç olarak SPARC'ın apoptoz direnci sağlayabilmesi için AKT ve PI3K'nın aktive olması gerektiği bulunmuştur. Dolayısıyla SPARC, yumurtalık kanser hücrelerinde apoptozu indüklerken beyin tümörlerinde apoptozu azaltarak tümör hücre invazyonunu arttırmaktadır (Shi ve diğ., 2004). Gastrik kanser lezyonlarında SPARC, integrin $\beta 1$ ve MMP-2 protein düzeylerinin kanserli olmayan dokulara kıyasla arttığı bulunmuştur. SPARC, 436 insan mide kanser vakasının 334'ünde tespit edilmiş ve 239 vakada ise yüksek oranda eksprese edildiği görülmüştür. 97 vakada düşük SPARC ifadesi ile düşük MMP-2 ifadesi bulunmuş, 207 vakada ise yüksek SPARC ifadesi ile yüksek MMP-2 ifadesi olduğu tespit edilmiştir. 163 vakada düşük SPARC ifadesi ile düşük integrin $\beta 1$ ifadesi, 161 vakada yüksek SPARC ifadesi ile yüksek integrin $\beta 1$ ifadesi bulunmuştur. Dolayısıyla SPARC ifadesi ile integrin $\beta 1$ ve MMP-2 ifadeleri arasında anlamlı bir korelasyon olduğu bulunmuştur (Zhao ve diğ., 2010). Yapılan tüm bu çalışmalardan yola çıkarak SPARC'ın bulunduğu mikroçevreye göre davranış değiştirdiği, ekspresyonundaki ve aktivitesindeki değişikliklerin ise kanser tipine ve hangi hücre tarafından ifade edildiğine bağlı olarak değiştiği anlaşılmaktadır (Tai ve Tang, 2008). Bu nedenle, SPARC'ın tümör büyümesine ve ilerlemesine spesifik katkısı net değildir. Bu katkı kanser çeşidi ve hücre tipi

ile bağlantılıdır. Bizim bulgularımızda ise, iki farklı karakterdeki meme kanser hücre soylarında MCF-7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde SPARC ekspresyonunun varlığı saptanmıştır. Ancak, MCF-7 hücrelerinde SPARC ekspresyonunun MDA-MB-231 hücre soyuna göre çok daha düşük oranda olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, runx2 ekspresyonunun susturulması sonucunda SPARC ekspresyon düzeyi her iki hücrede farklı şekillerde etkilenmiştir. Bu durum, bu proteinin ekspresyonunun aynı kanser türünün farklı hücrelerinde farklı mekanizmalar aracılığı ile düzenlendiğine işaret etmektedir.

İlerlemiş meme kanseri hastalığı olan kadınlarda genellikle kemik metastazları yaygındır. Meme kanser hücrelerinin kemik dokusuna metastaz afinitesi, meme kanserinin intrinsik biyolojik özelliklerine ve kemik mikroçevresi ile spesifik etkileşimlere dayanır. Meme kanseri hücreleri SPARC, OPN gibi ektopik olarak kemik matriks proteinlerini eksprese eder ve böylece osteoblast-benzeri fenotip kazanabilir (Bellahcene ve diğ., 2007) . Bu durum, bizim çalışmamızda, zayıf metastatik karakterli MCF-7 hücrelerinde yüksek metastatik kabiliyete sahip MDA-MB-231 hücrelerine göre daha düşük oranda SPARC ekspresyonu saptamamızın sebebini açıklayabilir. Zira, Briggs, ve diğ. (2002) MCF-7 hücre hattında SPARC'ın çok az salgılandığını rapor etmiş olması bizim bulgularımızı destekler niteliktedir. Yapılan çalışmalar, ayrıca, kemik ile ilişkili ektopik gen ekspresyonunun meme kanser hücrelerinde osteoblast benzeri fenotipin kazanılmasında runx2'nin kemik ile ilişkili genlerin transkripsiyonunu baskılayarak veya aktive ederek esas aracı molekül olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Cong-Cong ve diğ., 2016). Dolayısıyla, çalışmamızda runx2'nin susturulması sonucu MCF-7 hücrelerinde SPARC ekspresyonundaki azalmanın, MDA-MB-231 hücrelerinde ise SPARC ekspresyonundaki artmanın sebebi runx2'nin kemik ile ilişkili genlerin transkripsiyonu üzerindeki değişken etkisine bağlanabilir. Runx2'nin direkt olarak bu genlerin transkripsiyonu üzerinde etkileri olduğuna ilişkin veriler bulunmamasına rağmen indirekt olarak bu genlerin transkripsiyonu üzerinde etkili olabileceğine dair kanıtlar da mevcuttur.

SPARC, tümörlerin yaşaması için kritik olan bir neovaskülarizasyon süreci olan anjiyogeneizde rol almaktadır. Endotel hücrelerinde SPARC ifadesinin artması anjiyojenik büyüme faktörleri VEGF, PDGF ve bFGF aktivitesini inhibe etmiştir (Kupprion ve diğ., 1998). Yapılan başka bir çalışmada da SPARC-null fareler ile vahşi-tip yumurtalık kanseri hayvan modellerinde, SPARC'nin olmaması, VEGF, VEGFR2, MMP2 ve MMP9'un yüksek

ekspresyonuna yol açarak bu kanserlerin anjiyojenik ve metastatik potansiyelini arttırmıştır (Said ve Motamed, 2005; Said ve diğ., 2007). MMP2 aktivasyonunun, tümör invazyonu ile alakalı ECM proteolizinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Zhao ve diğ., 2010). İnvaziv hücre hatları MDA-MB-231 ve BT549 da MMP2 aktivasyonunu SPARC'ın indüklediği ancak invazif olmayan MCF-7 hücre hattında etkilemediği bulunmuştur (Gilles ve diğ., 1998). Diğer taraftan, Koblinski ve diğ. (2005) MDA-MB-231 hücrelerinde endojen SPARC ekspresyonunun hücrelerin invaziv kabiliyetini düşürerek ve tümör hücre-platelet etkileşimini azaltarak metastatik karakteri önemli ölçüde baskıladığı sonucuna varmışlardır. *İn vitro* yapılan bir çalışmada, SPARC ifadesinin, hücre yassılaşmasını önlediği ve hücrelerin ayrılmasını indüklediği gösterilmiştir (Salvatierra ve diğ., 2015). SPARC, hücre-substrat bağlantılarını keserek ve aktin hücre iskelet elemanlarının yeniden düzenlenmesini teşvik ederek hücre-hücre veya hücre-matris etkileşimlerini değiştirebildiği de saptanmıştır (Brekken ve diğ., 2000). SPARC, EMT'nin bazı basamaklarında rol alarak malign fenotipe katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Örneğin, melanom hücrelerinde SPARC ekspresyonu, E-kaderini baskılamış ve fokal adezyon kinazın (FAK) fosforilasyonu yoluyla N-kaderin ve vimentin ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, alternatif olarak SPARC'nin hücre göçünü ve invaziv kapasiteyi artıran Snail'i uyardığı da saptanmıştır (Smit ve diğ., 2007; Sosa ve diğ., 2007). Runx2 transkripsiyon faktörünün SPARC gibi EMT'yi düzenlediği ve tiroit kanserinde invazyona neden olduğu bilinmektedir (Niu ve diğ., 2012). Runx2 ve runx1'in ifadesinin normal hücrelere göre tiroit kanserli dokularda ve tiroit kanser hücre hatları olan WRO, KTC-1, UA-2,TPC-1 ve 8305C hücrelerinde ekspresyon seviyelerinin yüksek olduğu gösterilmiştir. Runx2 tiroit kanser hücre hatlarında MAPK/ERK (mitojenle aktive olan protein kinaz/hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz) sinyali ile bağlantılı olduğu bilinmektedir. MAPK/ERK sinyal yolağı inhibitörü MEK hücrelere uygulandığında runx2 ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Ayrıca, çalışmada oligo RNA'lar kullanılarak runx2 ekspresyonu susturulmuş tiroit kanser hücrelerinde EMT ile ilgili moleküller (SNAI1, SNAI2, SNAI3 ve TWIST1), MMP'ler (MMP1, MMP2 ve MMP9) ve vaskülojenik faktörler (VEGFA ve VEGFC)'in azaldığı görülmüştür (Niu ve diğ., 2012). İnsan prostat kanser dokusundan kemiğe metastaz yapmış PC3 hücrelerinde de runx2'nin yüksek seviyelerde eksprese olduğu ve runx2'nin bu hücrelerde VEGF, MMP9 gibi genleri etkilediği bulunmuştur (Akech ve diğ., 2010). Çalışmamızda MDA-MB-231 hücrelerinde runx2 ifadesinin susturulması SPARC'nin ekspresyonunun artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla, Koblinski ve diğ. (2005) bulguları

göz önüne alındığında; SPARC ekspresyonunun MDA-MB-231 hücrelerinde metastazı baskılaması ve pek çok çalışmada ortaya konduğu üzere runx2 aşırı ekspresyonunun maligniteye hizmet ettiği olgusundan yola çıkarak runx2 *knockdown* MDA-MB-231 hücrelerinde SPARC ekspresyonundaki artış runx2'nin anti-metastatik kabiliyete hizmet ettiği yönünde yorumlanabilir. Bunun yanı sıra, bulgularımız MCF-7 hücrelerinde runx2 ekspresyonunun susturulması neticesinde ise SPARC ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. MCF-7 meme kanseri hücre hattında c-Jun'un transfeksiyon yoluyla aşırı ekspresyonu sağlandığında SPARC ekspresyonunda bir artışın meydana geldiği ve hücrelerin hareketliliğinde ve invazyonunda artışa neden olduğu rapor edilmektedir (Briggs ve diğ., 2002). Runx2 ve c-Jun birçok onkogenik sinyalin aşağı akış hedefidir ve kanser hücrelerinde hedef gen ekspresyonunun düzenlenmesinde işbirliği yaptıkları gösterilmiştir. Tiroid ve meme kanserinde runx2 transkripsiyonu, üç *enhanser*'in (ENH3, ENH11 ve ENH13) işbirliğini gerektirir. Bu *enhanser*'lar runx2'nin ifadesi için gerekli olan P2 promötör bölgesi ile etkileşime geçerler. Aynı zamanda c-Jun'nun bu üç *enhanser*'in düzenleyicisi olduğu bulunmuştur (Sancisi ve diğ. 2017). Heidari ve diğ. (2012) lösemi hücrelerinde runx2'nin downregülasyonu sonucunda c-Jun'nun hem mRNA ve hem de protein ekspresyonunda azalma olduğunu saptamışlardır. Dolayısıyla çalışmamızda MCF-7 hücrelerinde runx2'nin susturulması ile SPARC ifadesindeki azalma c-Jun ifadesinin azalması ile ilişkili olabilir.

Bazal membranlar (BM), epiteliyal ve endoteliyal hücrelerin göç ettiği, çoğaldığı ve farklılaşmasına yardımcı karakteristik makromoleküllerden (kolajen tip IV, laminin, HSPG'ler gibi) oluşan özelleşmiş ECM yapılarıdır. Karsinomlarda, BM genellikle tümör hücrelerini çevresindeki dokudan ayırır ve bu nedenle tümör istilasını ve metastatik yayılmayı sınırlayan temel bir fiziksel bariyer olarak görev alır (Timple, 1989). HSPG'ler kan damarlarının en önemli bileşenleridir ve endotel hücrelerinin konumlandığı damarlarının bazal membranında fazlaca bulunmaktadır. HSPG'ler endotel hücrelerinin çoğalmasını ve göç etmesini desteklerken, kılcal damar duvarlarının yapısını da koruyan bir özelliğe sahiptir. Dolayısıyla HS'lerin HPA1 ile parçalanması sonucu anjiyojenik endotel hücrelerin oluşmasına ve kanla taşınan tümör hücrelerinin ekstrasvazyonuna aracılık eder (Vlodavsky ve Friedmann, 2001). HPA1, meme kanseri oluşumunu düzenleyen birçok temel olayda yer almaktadır. Bunlardan ilki, kanser hücrelerinde ve ECM'de bulunan HS'yi parçalamasıdır. HS, heparin bağlayıcı büyüme faktörlerinin ve anjiyojenik faktörlerin toplandığı bir haznedir. Malign meme kanseri hücreleri tarafından üretilen HS, normal meme hücrelerinden üretilen

HS ile karşılaştırıldığında FGF2'ye ve hepatosit büyüme faktörüne bağlanma kapasitesine sahip olduğu bulunmuştur. HPA1 HS'yi parçalayarak tümör büyümesini, invazyonunu ve anjiyogenezi teşvik eden sinyal moleküllerini serbest bırakarak kansere katkı sağladığı gösterilmiştir (Bashkin ve diğ., 1989; Delehedde ve diğ., 2001). Bir diğer olay, kanser hücrelerinin altta kalan stromayı istila etmesi ve vasküler ve lenfatik yollardan distal olarak metastaz yapması için, hücrelerin HS proteoglikanları, kollagenleri ve lamininleri içeren bazal membran ile ECM bileşenlerini parçalaması gerektiği ve bununda HPA1 ve diğer glikozidik ve proteolitik enzimlerin etkisiyle gerçekleştirildiği bildirilmiştir (Nakajima ve diğ., 1988). Son olarak, meme kanseri hücrelerinde yüksek HPA1 ekspresyonu, osteoklastogenezin uyarılması yoluyla metastazı artırır ve kemik rezorpsiyonuna neden olur (Kelly ve diğ., 2005). HSPG'lar, birçok hücre dışı matriks bileşeni, büyüme faktörü ve enzimi ile etkileşime girmektedir. HS'nin endoglikosidik HPA1 bölünmesiyle bozulması, çeşitli biyolojik işlemleri etkilemiştir (Vlodavsky ve diğ., 1999). HPA1 enzimatik aktivitesi, çeşitli mitojenik, anjiyojenik ve kemotaktik heparin bağlayıcı büyüme faktörlerini (örneğin, bFGF, PDGF ve Heparin bağlayıcı EGF benzeri büyüme faktörü (HB-EGF)) bazal membran içindeki depo bölgelerinden serbest bırakarak kanser hücresi adezyonunda ve anjiyogenezinde rol oynamaktadır (Vlodavsky ve diğ., 1991; Vlodavsky ve diğ., 1996). Runx2 ve FGF2 sinyalinin birlikte OPN ifadesini indükleyerek osteoblast çoğalması ve olgunlaşmasını kontrol ettiği bulunmuştur. Ayrıca runx2-null hücrelerle kontrol hücreleri ile karşılaştırılmış ve proteoglikanların ekspresyon seviyelerine bakılmıştır ve Runx2 varlığında Ekzotoksin-1, HPA1, sindekan 1-3, kondroitin ve HS proteoglikanları Versikan ve Glipikan-1 ifadelerinin arttığı Glipikan-4 ve Dekorinin ise ifadelerinin azaldığı görülmüştür. Bunların yanı sıra, runx2 varlığında ve yokluğunda FGF2'nin glikoproteinlerle etkileşimine bakılmış ve runx2 yokluğunda FGF2 sinyalinin Sindekan-2, Glipikan-6, Versikan, Eksostotin-1 and Perlekan ifadelerini azalttığı bulunmuştur (Teplyuk ve diğ., 2009). Bu bilgiler ışığında bulgularımızda hem MDA-MB-231 hemde MCF-7 hücre hatlarında runx2 susturulması sonucu HPA1 ifadesinde saptadığımız azalma şaşırtıcı değildir. Dolayısıyla HPA1 ifadesindeki azalma, FGF, PDGF ve HB-EGF gibi büyüme faktörlerinin serbest kalmasını azaltıp kanser hücrelerinde adehezyonu ve anjiyogenezi önleyebileceğini düşündürmektedir.

Pankreatik kanserli dokularda yapılan çalışmalar, normal pankreatik doku, kanserli doku ve kronik pankreatit dokularında HPA1 seviyesi RT-PCR yöntemi ile karşılaştırılmış ve normal pankreatik dokuda HPA1 ifadesi neredeyse yok iken kronik pankreatit doku ve özellikle

kanserli dokularda çok daha fazla HPA1 ifadesi gösterilmiştir (Koliopanos ve diğ., 2001). Western emdirim yöntemi ile de normal pankreatik dokularda HPA1 ifadesinin neredeyse olmadığı görülmüş, kronik pankreatitte belirgin bir bant şeklinde görülmüş, kanserli dokularda ise kalın bantlar şeklinde gözlemlenmiştir. Ayrıca lenf nodu ve pankreas kanserinin karaciğerdeki metastatik dokuları, normal ve duktal pankreas kanseri doku örneklerinde HPA1 mRNA lokalizasyonu analiz edilmiştir. *In situ* hibridizasyon yoluyla normal pankreas dokularında HPA1 mRNA seviyesi bakıldığında çok düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Buna karşılık birincil pankreas kanseri doku örneklerinde *in situ* hibridizasyon yöntemi sonucunda yoğun HPA1 mRNA seviyesi gözlemlenmiştir. Şaşırtıcı olarak, lenf düğümlerinde ve pankreas kanserinin karaciğerdeki metastatik odaklarında zayıf ila orta HPA1 mRNA seviyeleri görülmüştür (Koliopanos ve diğ., 2001). Mide kanserlerinin metastazında HPA1'in önemli bir rolü olduğu bulunmuştur. Hepatosit büyüme faktörü (HGF), mide kanseri örneklerinde normal mide dokularıyla karşılaştırıldığında çok fazla seviyede ifade edildiği saptanmıştır. Benzer şekilde, HPA ifadesinin normal mide dokularda da zayıf bir şekilde eksprese edildiği ancak mide kanser örneklerinde anlamlı olarak arttığı rapor edilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, HGF veya HPA1 ile kanser hastalarının klinikopatolojik özellikleri arasındaki ilişkiyi analiz etmişlerdir. HGF'nin yüksek ifadesi TNM evresi, lenf nodu metastazı ve invazyonu ile pozitif korelasyon gösterdiği ortaya konmuştur. HPA1'in fazla ifadesi de TNM evresi ve invazyon ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. HGF ve HPA1'in aşırı ekspresyonu gastrik kanserli hastaların sağkalım oranının düşük olması ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla HGF ile HPA1'in pozitif korelasyona sahip oldukları ve mide kanserinde önemli bir rol oynadıkları düşünülmektedir. Ayrıca eksojen HGF uygulanmış HGF-null MKN74 hücrelerinde HPA1 ifadesini önemli ölçüde arttırdığı bulunmuştur. HGF'nin de PI3K/AKT ve aşağı NF- κ B sinyalini aktive ederek HPA1'in ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur (Hao ve diğ., 2015). PI3K ve AKT proteinlerinin alt birimleri olan p85 ve PIK3CB (p110 β) ve Akt kinazın runx2 tarafından düzenlendiği başlangıçta fare osteoblast ve kondrosit farklılaşmasında gösterilmiştir (Cohen-Solal ve diğ., 2015). Bu veriler, bizim bulgularımızda runx2 *knockdown* hücrelerde PI3K ve AKT aktivasyonunun azaldığına işaret etmektedir. Dolayısıyla hem MDA-MB-231 hem de MCF-7 hücre hatlarında HPA1 seviyesindeki azalmanın nedeni PI3K ve AKT yolağındaki aktivasyon değişikliğine de bağlanabilir.

LOX'un gen ekspresyonunun, hücre göçü ve hücre adezyonunun düzenlenmesi gibi birçok farklı fonksiyonda görev aldığı rapor edilmiştir (Payne ve diğ., 2007). Bu farklı fonksiyonlar araştırmacıları LOX'un hem ekstrasellüler hem de intrasellüler fonksiyonları etkileyen çoklu rollere sahip olabileceğini varsaymaya yöneltmiştir (Erler ve diğ., 2006). Aslında araştırmacıları bu varsayıma yöneltten bulgu, çeşitli kanserli dokularda ve neoplastik hücre hatlarında gözlenen anormal LOX ifadesi ve aktivitesi olmuştur. LOX upregülasyonu ile invaziv metastatik potansiyel arasındaki korelasyon, sıçan prostat tümör hücre hatlarında ve insan kutanöz ve uveal melanom hücre hatlarında da gösterilmiştir. Bu sonuçlar, LOX'un kanser hücrelerinin metastaz sürecine dahil olduğuna dair önemli kanıtlar sunmaktadır (Kirschmann ve diğ., 2002). Ancak LOX'un tümör dokularında ve kanser hücre hatlarında hem downregüle hemde upregüle olması LOX'un kanserdeki rolünü tam olarak belirlenmesini engellemiştir (Payne ve diğ., 2007). Metastaz, çoğu kanserde ölümden sorumlu olan çok aşamalı bir süreçtir ve hem yakın mikroçevreden (hücre-hücre veya hücre-matris etkileşimleri) hem de genişletilmiş tümör mikro-ortamından (örneğin vaskülarizasyon) etkilenebilir. Hipoksi (oksijen açlığı) metastazla alakalıdır ve Hipoksik insan tümör hücrelerinde LOX ekspresyonunun çok fazla olduğu bulunmuştur. LOX ekspresyonu, hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF1 α) tarafından düzenlenir ve LOX ekspresyonu insan göğsü ile baş ve boyun tümörlerinde hipoksi ile ilişkilidir. LOX'un inhibisyonu, ortotopik olarak büyütülmüş meme kanseri tümörleri olan farelerde metastazı ortadan kaldırır. Ayrıca, salgılanan LOX, hipoksik insan kanser hücrelerindeki FAK aktivitesi ve hücre-matriks adezyonunu yoluyla gerçekleşen invazyonla ilişkilendirilmiştir (Erler ve diğ., 2006). İnsan akciğer adenokarsinomlarında gözlenen fonksiyon kaybı mutasyonları (LKB1), akciğer kanseri malignitesinin ilerlemesine önemli ölçüde katkıda bulunur. LKB1 tarafından mTOR-HIF-1 α sinyalleşmesi ile negatif olarak düzenlenen LOX, akciğer kanseri ilerlemesine aracı olduğu bulunmuştur. LOX aktivitesinin inhibisyonu, akciğer kanseri malignite ilerlemesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Upregüle edilmiş LOX ekspresyonu, LKB1 eksikliği olan akciğer tümörlerinde aşırı kollagen birikimini tetiklemiş ve bu da β 1 integrin sinyalleşmesi yoluyla kanser hücresi proliferasyonu ve invazivliğini arttırmıştır (Gao ve diğ., 2010). Bunlara ek olarak, runx2 eksprese etmeyen pluripotent C3H10T1/2 mezenkimal hücrelere runx2-eksprese eden adenovirus (AdRunx2) transfekte edilmiş ve normoksik(hava ile aynı oranda oksijen içeren gaz karışımı), hipoksik ve hipoksik havayı taklit eden (CoCl₂uygulaması) koşullara maruz bırakılmıştır. Bu koşullar altında VEGF ve HIF-1 α 'nın mRNA ve protein seviyelerine

bakılmıştır. Runx2 en çok normoksik koşullarda VEGF'in mRNA ve protein seviyelerini arttırmıştır. CoCl₂'li hipoksik koşulda da normoksik koşulda olduğu kadar olmasada bir artış gerçekleşmiştir. Runx2 HIF-1 α 'nında normoksik koşullarda mRNA ve protein seviyelerini arttırmış fakat VEGF'den farklı olarak HIF-1 α hipoksik durumlardan hiç etkilememiştir (Kwon ve diğ., 2011). LOX ifadesi HIF-1 α tarafından düzenlendiği ve runx2'inde HIF-1 α 'yı düzenlediği göz önüne alırsa, çalışmamızda elde ettiğimiz runx2 *knockdown* MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında LOX ifadesinin azalması yukarıdaki bilgileri doğrular niteliktedir.

LOX kaynaklı kollagen çapraz bağlama, matriksin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak sertleşmesine neden olur. Matriks sertliği ve FAK /SRC sinyal yolağının aktivasyonu arasında güçlü bir ilişki olduğu ve LOX ifadesinin artışı ile FAK/SRC fosforile olması matriks sertliğini arttırarak daha proliferatif ve invaziv bir fenotipe sahip olmasına neden olmuştur. LOX'un da FAK aracılığıyla matriks sertliğini arttırarak kolorektal kansere neden olduğu bulunmuştur (Baker ve diğ., 2013). LOX ve diğer LOX familyası üyelerinin (lisil oksidaz benzeri (LOXL, LOXL2, LOXL3 ve LOXL4)) mRNA ekspresyonu, invaziv/metastatik fenotip içeren (MDA-MB-231) meme kanseri hücrelerinde gözlenmiştir. LOX ve LOXL2'nin, iki yüksek invaziv/metastatik meme kanseri hücre hattında (MDA-MB-231 ve Hs578T) invaziv potansiyel ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. *In vitro* olarak, LOX antisens oligonükleotitleri, MDA-MB-231 ve Hs578T hücrelerine transfekte edilmiş ve edilmemiş olanlarla karşılaştırıldığında kollagen IV/laminin/jelatin matriks aracılığıyla invazyon oluşumunu önlediği bulunmuştur. Ayrıca, MDA-MB-231 ve Hs578T hücrelerinin β -aminopropiyonitril (LOX enzimatik aktivitenin geri dönüşümsüz bir inhibitörü/ β APN) ile tedavisi sonucu da invazif aktivitenin azaldığı görülmüştür. Buna karşın MCF-7 hücre hattında β -aminopropiyonitril ilavesi invazivliği 2 kat arttırdığı saptanmıştır (Kirschmann ve diğ., 2002). Katalitik olarak aktif LOX, *in vitro* hareketlilik/göç ve hücre-matriks adezyonunu düzenlemektedir. İnvaziv meme kanseri hücreleri β APN ile tedavi edildiğinde adezyon kompleksinde anahtar rol oynayan proteinlerden aktive edilmiş FAK ve SRC kinazın azaldığı tespit edilmiştir. MCF-7 hücre hatlarında ise β APN ilavesi sonucu FAK ve SRC'nin arttığı gözlenmiştir. Bunun yanı sıra, hidrojen peroksit, LOX aktivitesinin bir yan ürünüdür ve katalaz muamelesi SRC aktivasyonunda kayba neden olmuştur. Bu sonuçlar LOX'un FAK/SRC sinyal yolağı ve hidrojen peroksit aracılığıyla meme kanseri hücrelerinde invazyonu arttırdığı ve hücre-matriks etkileşimini kolaylaştırdığını göstermektedir (Payne ve diğ., 2005). Ayrıca FAK, ekstrasellüler sinyal düzenlenleyici kinazı (ERK) aktive eder.

ERK/MAPK yolağı ise Runx2 fosforillenmesini aktive eder (Ge ve diğ., 2009). Dolayısıyla Runx2'nin susturulması MDA-MB-231 hücre hatlarında ERK ve FAK yolaklarını etkileyip LOX'un azalmasına neden olmuş olabilir.

OPN, çeşitli malignitelerde yüksek oranda eksprese edilmektedir. OPN'nin bol miktarda salgılanması, meme ve prostat kanseri, osteosarkom, glioblastom, skuamoz hücreli karsinom ve melanom için bir markör görevi görmüştür (Rittling ve diğ., 2004). OPN, metastatik melanomda en bol eksprese edilen genlerden biridir (Haqq ve diğ., 2005). OPN-null mutant farelerin metastatik hücrelerin büyümesinde veya hayatta kalmasında rol oynadığı gösterilmiştir. Birçok çalışma, PI3K'nın OPN'ye cevap olarak aktifleştirilebileceğini göstermiştir. PI3K'nın aşağı hedef moleküllerinden biri Akt'dir. Akt, hücre döngüsü ilerlemesini, büyüme faktörü aracılı hücre sağkalımını, hücre göçünü ve tümör hücrelerinin büyümesini düzenlemektedir (Nicholson ve diğ., 2002). OPN'nin, BA/F3 murin pro-B-hücre hatlarında PI3K/AKT yolunu aktive ederek hücreleri apoptozdan koruduğu ELİSA ölü hücre bulma kiti ve tripan blue kullanılarak gösterilmiştir (Lin ve diğ., 2001). OPN'nin, meme kanseri hücrelerinde $\alpha\beta3$ integrin aracılığıyla PI3K ve PI3K bağımlı AKT fosforilasyonunu indüklediği Western emdirim analizi ile tespit edilmiştir (Das ve diğ., 2003). İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), endotel hücrelerindeki endojen runx2 aktivitesini PI3K/ERK'ye bağımlı ve Akt-bağımsız sinyal yolu ile düzenlemektedir (Qiao ve diğ., 2004). OPN ayrıca tümör mekanizmasını düzenleyerek ve neoplastik hücrelerin apoptozunu inhibe ederek kanserin ilerlemesine katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. OPN ve BSP'nin ifadesi ELİSA yöntemi ile gösterilmiş ve tümör hücrelerinde hayatta kalma avantajı sağladığı bulunmuştur. Bunlara ek olarak hücre lizisinde anahtar bir düzenleyici olan Faktör H, immünopresipitasyon, Western emdirim ve immünoassay yöntemleri kullanılarak BSP'ye bağlanan protein olarak tanımlanmıştır. OPN, bir integrin olan $\alpha\beta3$ veya bir adezyon molekülü CD44 ile etkileşerek Faktör H'nin hücre yüzeyinden ayrılmasını teşvik etmiş ve böylece kompleman aracılı hücre ölümünü inhibe etmiştir (Fedarko ve diğ. 2000). Bununla birlikte, çözünür OPN, büyüme faktörlerini ve sitokinleri kullanarak HUVEC hücrelerinin apoptozunu inhibe etmiştir (Khan ve diğ., 2002). OPN, MMP'leri kritik bir şekilde düzenleyerek ECM'nin bozulmasına, tümör ilerlemesine ve vaskülarizasyona neden olmuştur (Xie ve diğ., 2003). Tüm bunlar OPN'nin apoptoz inhibisyonu üzerindeki potansiyel rolünü ve çeşitli kanserler için prognostik bir markör olarak hareket edebileceğini göstermektedir. OPN'nin, meme kanserinin malignitesinde fonksiyonel bir rol oynadığı bildirilmektedir.

Memeli endotel hücre hatlarında hücre yüzeyi integrinleri $\alpha\beta3$ - $\alpha\beta1$ ve $\alpha\beta5$ ile OPN'nin etkileştiği ve aynı zamanda hiyalüronan bağlama reseptörü CD44 ile de etkileşimde bulunduğu görülmüştür. İntegrinlerin OPN'ye bağlanarak adezyonu inhibe etme yeteneği ve CD44'ün de yine OPN ile etkileşip hücre adezyonu, göçü ve metastazı tetiklemesi, araştırmacıları OPN'yi meme kanseri hücre hatlarında araştırmaya yöneltmiştir. 21PT, 21NT, MT-1 ve MDA-MB-435 meme kanser hücre hatlarında OPN ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu hücrelerden 21PT nontümörojenik, 21NT tümörojenik fakat metastatik değildir. Oysa MT1 tümörojenik ve zayıf metastatiktir. MDA-MB-435 ise tümörojenik ve fazla metastatiktir. Migrasyon assay yöntemi ile 21PT (PT) ve 21NT (NT) hücre soylarında OPN'nin $\alpha\beta5$ ile etkileşerek göçe neden olduğu bulunmuştur fakat $\alpha\beta3$ 'ün böyle bir rolü olmadığı görülmüştür. Benzer şekilde, MDA-MB-435 hücre soyunda ise OPN'nin $\alpha\beta3$ ile etkileşerek göç olayını gerçekleştirdiği fakat $\alpha\beta5$ 'in bu süreçte bir ilişkisi olmadığı saptanmıştır (Tuck ve Ann, 2001). Çalışmamızda MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre soylarında OPN varlığına hem protein hemde mRNA seviyesinde bakılmıştır. İnvaziv ve agresif MDA-MB-231 hücre soyunda agresif olmayan MCF-7 hücre hattına göre OPN ekspresyonunun daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu durum MDA-MB-231 hücrelerinin invaziv ve agresif karakterinin bir neticesi olarak düşünülebilir. Runx2 *knockdown* MDA-MB-231 ve MCF-7 hücre hatlarında ise OPN seviyesinde istatistiksel açıdan anlamlı derecede bir değişim gözlenmemiştir. Ancak runx2'nin kemik matriks proteinlerinin ekspresyonu üzerinde direkt ya da indirekt olarak etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, çalışmamıza konu olan meme kanser hücrelerinde runx2'nin OPN ekspresyonu üzerinde direkt olarak etkili olup olmadığı qPCR gibi daha ileri analizlerle araştırılmalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda runx2 siRNA'sı kullanılarak oluşturulan runx2 *knockdown* MCF-7 hücre soyunda ekstrasellüler matriks unsurları üzerindeki etkileriyle metastatik sürecin önemli aktörlerinden olan HPA1, LOX ve SPARC'ın mRNA transkriptlerinde ve protein seviyelerinde azalma, OPN ekspresyonunda ise anlamlı bir değişiklik olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte, MDA-MB-231 hücre soyunda HPA1 ve LOX mRNA transkriptlerinde ve protein seviyelerinde azalma, MCF-7 hücre soyunun tersine SPARC ifadesinde bir artış saptanmıştır. OPN ifade seviyesinde ise MCF-7 hücrelerine benzer şekilde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bulgularımız, son yıllarda, çeşitli tip kanser hücrelerinde anormal şekilde artan ekspresyonlarına dikkat çekilen runx2 transkripsiyon faktörünün kanser hücrelerinin metastazında önemli görevler üstlenen çeşitli matrisellüler proteinlerin

ekspresyonunu düzenleyerek meme kanserinin malignitesinde önemli bir rolü olabileceğine işaret etmektedir. Dolayısıyla, çalışmamızın sonuçları, runx2 transkripsiyon faktörünün inhibisyonu yoluyla meme kanserinin metastatik kabiliyetinin engellenmesi temeline dayanan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Agrawal, D., Chen, T., Irby, R., Quackenbush, J., Chambers, A.F., Szabo, M., Cantor, A., Coppola, D. and Yeatman, T.J., 2002, Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling, *Journal of the National Cancer Institute*, 94(7), 513-521.
- Akech, J., Wixted, J.J., Bedard, K., Van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T.A., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Languino, L.R., Altieri, D.C. and Pratap, J., 2010, Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions, *Oncogene*, 29(6), 811.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002, *The extracellular matrix of animals*, In Molecular Biology of the Cell, New York, Garland Science, 4th edition.
- Appert-Collin, A., Hubert, P., Crémel, G. and Bennisroune, A., 2015, Role of ErbB receptors in cancer cell migration and invasion, *Frontiers in pharmacology*, 6, 283.
- Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W.R., Le, A.H., Silverman, N., Govindraj, P., Hassell, J.R. and Yamada, Y., 2001, Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type, is caused by functional null mutations of the perlecan gene, *Nature genetics*, 27(4), 431.
- Bae, S.C., Yamaguchi-Iwai, Y., Ogawa, E., Maruyama, M., Inuzuka, M., Kagoshima, H., Shigesada, K., Satake, M. and Ito, Y., 1993, Isolation of PEBP2 alpha B cDNA representing the mouse homolog of human acute myeloid leukemia gene, AML1, *Oncogene*, 8(3), 809-814.
- Baker, A.M., Bird, D., Lang, G., Cox, T.R. and Erler, J.T., 2013, Lysyl oxidase enzymatic function increases stiffness to drive colorectal cancer progression through FAK, *Oncogene*, 32(14), p.1863.
- Barnes, G.L., Javed, A., Waller, S.M., Kamal, M.H., Hebert, K.E., Hassan, M.Q., Bellahcene, A., Van Wijnen, A.J., Young, M.F., Lian, J.B. and Stein, G.S., 2003, Osteoblast-related transcription factors Runx2 (Cbfa1/AML3) and MSX2 mediate the expression of bone sialoprotein in human metastatic breast cancer cells, *Cancer research*, 63(10), 2631-2637.
- Bashkin, P., Doctrow, S., Klagsbrun, M., Svahn, C.M., Folkman, J. and Vlodavsky, I., 1989, Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules, *Biochemistry*, 28(4), 1737-1743.
- Bayless, K.J., Meininger, G.A., Scholtz, J.M. and Davis, G.E., 1998, Osteopontin is a ligand for the alpha4beta1 integrin, *Journal of cell science*, 111(9), 1165-1174.

- Bellahcene, A., Bachelier, R., Detry, C., Lidereau, R., Clezardin, P., and Castronovo, V., 2007, Transcriptome analysis reveals an osteoblast-like phenotype for human osteotropic breast cancer cells, *Breast cancer research and treatment*, 101(2), 135-148.
- Bonnans, C., Chou, J. and Werb, Z., 2014, Remodelling the extracellular matrix in development and disease, *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(12), 786.
- Bornstein, P., 2009, Matricellular proteins: an overview, *Journal of cell communication and signaling*, 3(3-4), 163.
- Bosman, F. T. and Stamenkovic, I. 2003, Functional structure and composition of the extracellular matrix, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 200(4), 423-428.
- Bradshaw, A.D. and Sage, E.H., 2001, SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury, *The Journal of clinical investigation*, 107(9), 1049-1054.
- Brekken, R.A. and Sage, E.H., 2000, SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell–matrix, *Matrix Biology*, 19(7), 569-580.
- Briggs, J., Chamboredon, S., Castellazzi, M., Kerry, J.A. and Bos, T.J., 2002, Transcriptional upregulation of SPARC, in response to c-Jun overexpression, contributes to increased motility and invasion of MCF7 breast cancer cells, *Oncogene*, 21(46), 7077.
- Brubaker, K.D., Vessella, R.L., Brown, L.G. and Corey, E., 2003, Prostate cancer expression of runt-domain transcription factor Runx2, a key regulator of osteoblast differentiation and function, *The Prostate*, 56(1), 13-22.
- Buraschi, S., Neill, T., Goyal, A., Poluzzi, C., Smythies, J., Owens, R.T., Schaefer, L., Torres, A. and Iozzo, R.V., 2013, Decorin causes autophagy in endothelial cells via Peg3, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), E2582-E2591.
- Casu, B., Petitou, M., Provasoli, M. and Sinay, P., 1988, Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans, *Trends in biochemical sciences*, 13(6), 221-225.
- Catanzano, O., D'esposito, V., Acierno, S., Ambrosio, M.R., De Caro, C., Avagliano, C., Russo, P., Russo, R., Miro, A., Ungaro, F. and Calignano, A., 2015, Alginate–hyaluronan composite hydrogels accelerate wound healing process, *Carbohydrate polymers*, 131, 407-414.
- Chambers, A.F., Wilson, S.M., Kerkvliet, N., O'Malley, F.P., Harris, J.F. and Casson, A.G., 1996, Osteopontin expression in lung cancer, *Lung cancer*, 15(3), 311-323.
- Chang, C.H., Yen, M.C., Liao, S.H., Hsu, Y.L., Lai, C.S., Chang, K.P. and Hsu, Y.L., 2017, Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) enhances cell proliferation, migration, and epithelial mesenchymal transition, and SPARC expression is associated with tumor grade in head and neck cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(7), 1556.

- Chellaiah, M.A., Kizer, N., Biswas, R., Alvarez, U., Strauss-Schoenberger, J., Rifas, L., Rittling, S.R., Denhardt, D.T. and Hruska, K.A., 2003, Osteopontin deficiency produces osteoclast dysfunction due to reduced CD44 surface expression, *Molecular biology of the cell*, 14(1), 173-189.
- Chen, X.D., Fisher, L.W., Robey, P.G. and Young, M.F., 2004, The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation, *The FASEB Journal*, 18(9), 948-958.
- Chiodoni, C., Colombo, M.P. and Sangaletti, S., 2010, Matricellular proteins: from homeostasis to inflammation, cancer, and metastasis, *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(2), 295-307.
- Cohen-Solal, K.A., Boregowda, R.K. and Lasfar, A., 2015, RUNX2 and the PI3K/AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression, *Molecular cancer*, 14(1), 137.
- Cooper, G.M., 1993, The Cancer Book: A Guide to Understanding the Causes, *Prevention, and Treatment of Cancer* (Jones & Bartlett Publishers, 1993), 127-144.
- Cox, T.R., Rumney, R.M., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Ab Latif, N., Forrest, H., Evans, H.R. and Huggins, I.D., 2015, The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase, *Nature*, 522(7554), 106.
- Craig, A.M., Smith, J.H. and Denhardt, D.T., 1989, Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis, *Journal of Biological Chemistry*, 264(16), 9682-9689.
- Das, R., Mahabeleshwar, G.H. and Kundu, G.C., 2003, Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor κ B-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28593-28606.
- Davidson, L.A., Keller, R. and DeSimone, D.W., 2004, Assembly and remodeling of the fibrillar fibronectin extracellular matrix during gastrulation and neurulation in *Xenopus laevis*, *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 231(4), 888-895.
- Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H. and Fernig, D.G., 2001, Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 6(3), 253-273.
- Dodge, G.R., Kovalszky, I., Hassell, J.R. and Iozzo, R.V., 1990, Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 265(29), 18023-18029.

- Dong, J., Kukula, A.K., Toyoshima, M. and Nakajima, M., 2000, Genomic organization and chromosome localization of the newly identified human heparanase gene, *Gene*, 253(2), 171-178.
- Dou, C.L. and Levine, J.M., 1994, Inhibition of neurite growth by the NG2 chondroitin sulfate proteoglycan, *Journal of Neuroscience*, 14(12), 7616-7628.
- Drissi, H., Luc, Q., Shakoori, R., Chuva De Sousa Lopes, S., Choi, J.Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J.C., Lian, J.B. and Stein, J.L., 2000, Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene, *Journal of cellular physiology*, 184(3), 341-350.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L. and Karsenty, G., 1997, Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *cell*, 89(5), 747-754.
- Durbbeej, M., 2010, Laminins, *Cell and tissue research*, 339(1), 259.
- Engel, J., Taylor, W., Paulsson, M., Sage, H. and Hogan, B., 1987, Calcium binding domains and calcium-induced conformational transition of SPARC/BM-40/osteonectin, an extracellular glycoprotein expressed in mineralized and nonmineralized tissues, *Biochemistry*, 26(22), 6958-6965.
- Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T. and Komori, T., 2000, Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation, *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8695-8702.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.T., Chi, J.T.A., Jeffrey, S.S. and Giaccia, A.J., 2006, Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis, *Nature*, 440(7088), 1222.
- Esko, J. D., Kimata, K., & Lindahl, U. 2009, *Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans*. In Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition.
- Esko, J.D., 1991, Genetic analysis of proteoglycan structure, function and metabolism, *Current opinion in cell biology*, 3(5), 805-816.
- Fedarko, N.S., Fohr, B., Robey, P.G., Young, M.F. and Fisher, L.W., 2000, Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell evasion of complement-mediated attack, *Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16666-16672.
- Felber, K., Elks, P. M., Lecca, M., and Roehl, H. H., 2015, Expression of osterix is regulated by FGF and Wnt/ β -catenin signalling during osteoblast differentiation, *PloS one*, 10(12), e0144982.
- Feng, J. and Tang, L., 2014, SPARC in tumor pathophysiology and as a potential therapeutic target, *Current pharmaceutical design*, 20(39), 6182-6190.
- Fet, V., Dickinson, M.E. and Hogan, B.L., 1989, Localization of the mouse gene for secreted phosphoprotein 1 (Spp-1)(2ar, osteopontin, bone sialoprotein 1, 44-kDa bone phosphoprotein, tumor-secreted phosphoprotein) to chromosome 5, closely linked to Ric (Rickettsia resistance), *Genomics*, 5(2), 375-377.

- Fisher, L.W., Termine, J.D. and Young, M.F., 1989, Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species, *Journal of Biological Chemistry*, 264(8), 4571-4576.
- Fontana, L., Pelosi, E., Greco, P., Racanicchi, S., Testa, U., Liuzzi, F., Croce, C.M., Brunetti, E., Grignani, F. and Peschle, C., 2007, MicroRNAs 17-5p–20a–106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation, *Nature cell biology*, 9(7), 775.
- Frantz, C., Stewart, K.M. and Weaver, V.M., 2010, The extracellular matrix at a glance, *J Cell Sci*, 123(24), 4195-4200.
- Fraser, J.R.E., Laurent, T.C. and Laurent, U.B.G., 1997, Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover, *Journal of internal medicine*, 242(1), 27-33.
- Friedman, A.D., 1996, Regulation of immature myeloid cell differentiation by PEBP2/CBF, Myb, C/EBP and Ets family members, In *Molecular Aspects of Myeloid Stem Cell Development*, Springer, Berlin, Heidelberg, 149-157.
- Frischknecht, R. and Seidenbecher, C.I., 2012, Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain, *The international journal of biochemistry & cell biology*, 44(7), 1051-1054.
- Fuki, I.V., Iozzo, R.V. and Williams, K.J., 2000, Perlecan Heparan Sulfate Proteoglycan A NOVEL RECEPTOR THAT MEDIATES A DISTINCT PATHWAY FOR LIGAND CATABOLISM, *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25742-25750.
- Funderburgh, J.L., Funderburgh, M.L., Rodrigues, M.M., Krachmer, J.H. and Conrad, G.W., 1990, Altered antigenicity of keratan sulfate proteoglycan in selected corneal diseases, *Investigative ophthalmology & visual science*, 31(3), 419-428.
- Funk, S.E. and Sage, E.H., 1991, The Ca²⁺ (+)-binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine aortic endothelial cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2648-2652.
- Fux, L., Ilan, N., Sanderson, R.D. and Vlodavsky, I., 2009, Heparanase: busy at the cell surface, *Trends in biochemical sciences*, 34(10), 511-519.
- Gaikwad, J.S., Cavender, A. and D'Souza, R.N., 2001, Identification of tooth-specific downstream targets of Runx2, *Gene*, 279(1), 91-97.
- Galtrey, C.M. and Fawcett, J.W., 2007, The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system, *Brain research reviews*, 54(1), 1-18.
- Gao, Y., Xiao, Q., Ma, H., Li, L., Liu, J., Feng, Y., Fang, Z., Wu, J., Han, X., Zhang, J. and Sun, Y., 2010, LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18892-18897.

- Garg, V., Muth, A.N., Ransom, J.F., Schluterman, M.K., Barnes, R., King, I.N., Grossfeld, P.D. and Srivastava, D., 2005, Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease, *Nature*, 437(7056), 270.
- Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyan, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V., Komm, B.S., Javed, A., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B., 2005, Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression, *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33132-33140.
- Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N.E., Roca, H. and Franceschi, R.T., 2009, Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor, *Journal of Biological Chemistry*, 284(47), 32533-32543.
- Gergen, J.P. and Butler, B.A., 1988, Isolation of the *Drosophila* segmentation gene runt and analysis of its expression during embryogenesis, *Genes & development*, 2(9), 1179-1193.
- Giachelli, C.M., Schwartz, S.M. and Liaw, L., 1995, Molecular and cellular biology of osteopontin: potential role in cardiovascular disease, *Trends in cardiovascular medicine*, 5(3), 88-95.
- Gilles, C., Bassuk, J.A., Pulyaeva, H., Sage, E.H., Foidart, J.M. and Thompson, E.W., 1998, SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines, *Cancer research*, 58(23), 5529-5536.
- Goldshmidt, O., Yeikilis, R., Mawasi, N., Paizi, M., Gan, N., Ilan, N., Pappo, O., Vlodavsky, I. and Spira, G., 2004, Heparanase expression during normal liver development and following partial hepatectomy, *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 203(1), 594-602.
- Goldshmidt, O., Zcharia, E., Aingorn, H., Guatta-Rangini, Z., Atzmon, R., Michal, I., Pecker, I., Mitrani, E. and Vlodavsky, I., 2001, Expression pattern and secretion of human and chicken heparanase are determined by their signal peptide sequence, *Journal of Biological Chemistry*, 276(31), 29178-29187.
- Gullberg, D., Paraskevi, H., Schaefer, L., Tenni, R., Theocharis, A. and Winberg, J.O., 2012, Extracellular matrix: pathobiology and signaling, *Walter de Gruyter*, 592-602.
- Hall, D.A. and Jackson, D.S., 2013, *International review of connective tissue research* (Vol. 10). Elsevier.
- Hao, N.B., Tang, B., Wang, G.Z., Xie, R., Hu, C.J., Wang, S.M., Wu, Y.Y., Liu, E., Xie, X. and Yang, S.M., 2015, Hepatocyte growth factor (HGF) upregulates heparanase expression via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway for gastric cancer metastasis, *Cancer letters*, 361(1), 57-66.
- Haqq, C., Nosrati, M., Sudilovsky, D., Crothers, J., Khodabakhsh, D., Pulliam, B.L., Federman, S., Miller, J.R., Allen, R.E., Singer, M.I. and Leong, S.P., 2005, The gene expression signatures of melanoma progression, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(17), 6092-6097.

- Heidari, N., Miller, A. V., Hicks, M. A., Marking, C. B., & Harada, H., 2012, Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells, *Cell death & disease*, 3(7), e349.
- Heinegård, D., 2009, Fell-Muir Lecture: Proteoglycans and more—from molecules to biology, *International journal of experimental pathology*, 90(6), 575-586.
- Higashiyama, S., Abraham, J.A. and Klagsbrun, M., 1993, Heparin-binding EGF-like growth factor stimulation of smooth muscle cell migration: dependence on interactions with cell surface heparan sulfate, *The journal of cell Biology*, 122(4), 933-940.
- Hijiya, N., Setoguchi, M., Matsuura, K., Higuchi, Y., Akizuki, S. and Yamamoto, S., 1994, Cloning and characterization of the human osteopontin gene and its promoter, *Biochemical Journal*, 303(1), 255-262.
- Howell, W.H., 1925, The purification of heparin and its presence in blood, *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 71(3), 553-562.
- <https://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cancer-development.html>
- <https://sites.google.com/site/cundiffbiologyportfolio/home/regulation/cell-cycle-regulators-and-cyclins>
- Hulett, M.D., Freeman, C., Hamdorf, B.J., Baker, R.T., Harris, M.J. and Parish, C.R., 1999, Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis, *Nature medicine*, 5(7), 803.
- Hynes, R.O., 1986, Fibronectins. *Scientific American*, 254(6), 42-51.
- Hynes, R.O., 2009, The extracellular matrix: not just pretty fibrils, *Science*, 326(5957), 1216-1219.
- Iozzo, R.V. and Schaefer, L., 2015, Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans, *Matrix Biology*, 42, 11-55.
- Iozzo, R.V. ed., 2000, *Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions*, CRC Press.
- Iozzo, R.V., 2001, Series Introduction: Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions, *The Journal of clinical investigation*, 108(2), 165-167.
- Iozzo, R.V., 2005, Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling, *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(8), 646.
- Ishijima, M., Suzuki, N., Hozumi, K., Matsunobu, T., Kosaki, K., Kaneko, H., Hassell, J.R., Arikawa-Hirasawa, E. and Yamada, Y., 2012, Perlecan modulates VEGF signaling and is essential for vascularization in endochondral bone formation, *Matrix Biology*, 31(4), 234-245.

- Jeanloz, R.W., 1960, The nomenclature of mucopolysaccharides, *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 3(3), 233-237.
- Jin, Y.H., Jeon, E.J., Li, Q.L., Lee, Y.H., Choi, J.K., Kim, W.J., Lee, K.Y. and Bae, S.C., 2004, Transforming growth factor- β stimulates p300-dependent RUNX3 acetylation, which inhibits ubiquitination-mediated degradation, *Journal of Biological Chemistry*, 279(28), 29409-29417.
- Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J. and Boot-Handford, R.P., 2007, Collagens at a glance, *Journal of cell science*, 120(12), pp.1955-1958.
- Kagan, H.M., Sullivan, K.A., Olsson, T.A. and Cronlund, A.L., 1979, Purification and properties of four species of lysyl oxidase from bovine aorta, *Biochemical Journal*, 177(1), 203-214.
- Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T. and Ushijima, T., 2004, Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers, *Cancer research*, 64(18), 6410-6415.
- Kaneko, H., Ishijima, M., Futami, I., Tomikawa-Ichikawa, N., Kosaki, K., Sadatsuki, R., Yamada, Y., Kurosawa, H., Kaneko, K. and Arikawa-Hirasawa, E., 2013, Synovial perlecan is required for osteophyte formation in knee osteoarthritis, *Matrix Biology*, 32(3-4), 178-187.
- Kelly, T., Suva, L.J., Huang, Y., MacLeod, V., Miao, H.Q., Walker, R.C. and Sanderson, R.D., 2005, Expression of heparanase by primary breast tumors promotes bone resorption in the absence of detectable bone metastases, *Cancer research*, 65(13), 5778-5784.
- Khan, S.A., Lopez-Chua, C.A., Zhang, J., Fisher, L.W., Sørensen, E.S. and Denhardt, D.T., 2002, Soluble osteopontin inhibits apoptosis of adherent endothelial cells deprived of growth factors, *Journal of cellular biochemistry*, 85(4), 728-736.
- Kim, I.S., Otto, F., Zabel, B. and Mundlos, S., 1999. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1, *Mechanisms of development*, 80(2), 159-170.
- Kim, J.H., Skates, S.J., Uede, T., Wong, K.K., Schorge, J.O., Feltmate, C.M., Berkowitz, R.S., Cramer, D.W. and Mok, S.C., 2002, Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer, *Jama*, 287(13), 1671-1679.
- Kinne, R.W. and Fisher, L.W., 1987, Keratan sulfate proteoglycan in rabbit compact bone is bone sialoprotein II, *Journal of Biological Chemistry*, 262(21), 10206-10211.
- Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Fong, S.F., Nieva, D.R., Sullivan, C.M., Edwards, E.M., Sommer, P., Csiszar, K. and Hendrix, M.J., 2002, A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion, *Cancer research*, 62(15), 4478-4483.
- Kleeff, J., Ishiwata, T., Kumbasar, A., Friess, H., Büchler, M.W., Lander, A.D. and Korc, M., 1998, The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor

- action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer, *The Journal of clinical investigation*, 102(9), 1662-1673.
- Koblinski, J.E., Kaplan-Singer, B.R., VanOsdol, S.J., Wu, M., Engbring, J.A., Wang, S., Goldsmith, C.M., Piper, J.T., Vostal, J.G., Harms, J.F. and Welch, D.R., 2005, Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis, *Cancer research*, 65(16), 7370-7377.
- Koliopanos, A., Friess, H., Kleeff, J., Shi, X., Liao, Q., Pecker, I., Vlodavsky, I., Zimmermann, A. and Büchler, M.W., 2001, Heparanase expression in primary and metastatic pancreatic cancer, *Cancer Research*, 61(12), 4655-4659.
- Kolset, S. O. and Tveit, H. 2008, Serglycin—structure and biology, *Cellular and molecular life sciences*, 65(7-8), 1073-1085.
- Krusius, T. and Ruoslahti, E., 1986, Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(20), 7683-7687.
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R.K. and Margolis, R.U., 1986, Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain, *Journal of Biological Chemistry*, 261(18), 8237-8242.
- Kupprion, C., Motamed, K. and Sage, E.H., 1998, SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273(45), 29635-29640.
- Kurokawa, M., 2006, AML1/Runx1 as a versatile regulator of hematopoiesis: regulation of its function and a role in adult hematopoiesis, *International journal of hematology*, 84(2), 136-142.
- Kwon, T.G., Zhao, X., Yang, Q., Li, Y., Ge, C., Zhao, G. and Franceschi, R.T., 2011, Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 α induce vascular endothelial growth factor gene expression, *Journal of cellular biochemistry*, 112(12), 3582-3593.
- Kyriakides, T.R. and Bornstein, P., 2003, Matricellular proteins as modulators of wound healing and the foreign body response, *Thrombosis and haemostasis*, 90(12), 986-992.
- Labuschagne, C.F., Zani, F. and Vousden, K.H., 2018, Control of metabolism by p53—cancer and beyond, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1870(1), 32-42.
- Lacal, J.C. and McCormick, F.P., 2017, *The Ras Superfamily of GTPases (1993)*, CRC Press.
- Lane, T.F. and Sage, E.H., 1994, The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions, *The FASEB Journal*, 8(2), 163-173.
- Lapante, P., Raymond, M.A., Labelle, A., Abe, J.I., Iozzo, R.V. and Hébert, M.J., 2006, Perlecan proteolysis induces an $\alpha 2\beta 1$ integrin-and Src family kinase-dependent anti-

- apoptotic pathway in fibroblasts in the absence of focal adhesion kinase activation, *Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30383-30392.
- Lapointe, J., Li, C., Higgins, J.P., Van De Rijn, M., Bair, E., Montgomery, K., Ferrari, M., Egevad, L., Rayford, W., Bergerheim, U. and Ekman, P., 2004, Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(3), 811-816.
- Laurent, U.B., Fraser, J.R.E., Engström-Laurent, A., Reed, R.K., Dahl, L.B. and Laurent, T.C., 1992, Catabolism of hyaluronan in the knee joint of the rabbit. *Matrix*, 12(2), 130-136.
- Levanon, D. and Groner, Y., 2004, Structure and regulated expression of mammalian RUNX genes. *Oncogene*, 23(24), 4211.
- Levanon, D., Bernstein, Y., Negreanu, V., Ghazi, M.C., Bar-Am, I., Aloya, R., Goldenberg, D., Lotem, J. and Groner, Y., 1996, A large variety of alternatively spliced and differentially expressed mRNAs are encoded by the human acute myeloid leukemia gene AML1, *DNA and cell biology*, 15(3), 175-185.
- Levanon, D., Eisenstein, M. and Groner, Y., 1998a, Site-directed mutagenesis supports a three-dimensional model of the runt domain. *Journal of Molecular Biology*, 509-512
- Levanon, D., Goldstein, R.E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z.E. and Groner, Y., 1998b, Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11590-11595.
- Levanon, D., Goldstein, R.E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z.E. and Groner, Y., 1998c, Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11590-11595.
- Li, N., Felber, K., Elks, P., Croucher, P. and Roehl, H.H., 2009, Tracking gene expression during zebrafish osteoblast differentiation, *Developmental dynamics*, 238(2), 459-466.
- Lian, J.B., Javed, A., Zaidi, S.K., Lengner, C., Montecino, M., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L. and Stein, G.S., 2004, Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors, *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*, 14(1&2).
- Liaw, L., Skinner, M.P., Raines, E.W., Ross, R., Cheresch, D.A., Schwartz, S.M. and Giachelli, C.M., 1995, The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. Role of alpha v beta 3 in smooth muscle cell migration to osteopontin in vitro, *The Journal of clinical investigation*, 95(2), 713-724.
- Lin, Y.H. and Yang-Yen, H.F., 2001, The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46024-46030.

- Lord, M.S., Chuang, C.Y., Melrose, J., Davies, M.J., Iozzo, R.V. and Whitelock, J.M., 2014, The role of vascular-derived perlecan in modulating cell adhesion, proliferation and growth factor signaling, *Matrix Biology*, 35, 112-122.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2009, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm, *Nature Reviews Cancer* 9(3). 153-166.
- Mann, K., Deutzmann, R., Paulsson, M. and Timpl, R., 1987, Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with cheating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC, *FEBS letters*, 218(1), 167-172.
- Mason, I.J., Taylor, A., Williams, J., Sage, H. and Hogan, B.L., 1986, Evidence from molecular cloning that SPARC, a major product of mouse embryo parietal endoderm, is related to an endothelial cell 'culture shock' glycoprotein of Mr 43,000, *The EMBO journal*, 5(7), 1465-1472.
- McKenzie, E.A., 2007, Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation. *British journal of pharmacology*, 151(1), 1-14.
- McVey, J.H., Nomura, S., Kelly, P., Mason, I.J. and Hogan, B.L., 1988, Characterization of the mouse SPARC/osteonectin gene, Intron/exon organization and an unusual promoter region. *Journal of Biological Chemistry*, 263(23), 11111-11116.
- Merida-de-Barros, D. A., Chaves, S. P., Belmiro, C. L. R., and Wanderley, J. L. M., 2018, Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy?, *Parasites & vectors*, 11(1), 536.
- Merriman, H.L., Van Wijnen, A.J., Hiebert, S., Bidwell, J.P., Fey, E., Lian, J., Stein, J. and Stein, G.S., 1995, The tissue-specific nuclear matrix protein, NMP-2, is a member of the AML/PEBP2/runt domain transcription factor family: interactions with the osteocalcin gene promoter, *Biochemistry*, 34(40), 13125-13132.
- Meyer, L.J. and Stern, R., 1994, Age-dependent changes of hyaluronan in human skin, *Journal of Investigative Dermatology*, 102(3), 385-389.
- Miyoshi, H., Ohira, M., Shimizu, K., Mitani, K., Hirai, H., Imai, T., Yokoyama, K., Soceda, E. and Ohki, M., 1995, Alternative splicing and genomic structure of the AML1 gene involved in acute myeloid leukemia, *Nucleic acids research*, 23(14), 2762-2769.
- Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y. and Ohki, M., 1991, t (8; 21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10431-10434.
- Mongiat, M., Taylor, K., Otto, J., Aho, S., Uitto, J., Whitelock, J.M. and Iozzo, R.V., 2000, The protein core of the proteoglycan perlecan binds specifically to fibroblast growth factor-7, *Journal of Biological Chemistry*, 275(10), 7095-7100.
- Morgenstern, D.A., Asher, R.A. and Fawcett, J.W., 2002, Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response, *In Progress in brain research* , Elsevier, Vol. 137, 313-332.

- Motamed, K. and Sage, E.H., 1998, SPARC inhibits endothelial cell adhesion but not proliferation through a tyrosine phosphorylation-dependent pathway, *Journal of cellular biochemistry*, 70(4), 543-552.
- Mukhopadhyay, A., Nikopoulos, K., Maugeri, A., de Brouwer, A.P., van Nouhuys, C.E., Boon, C.J., Perveen, R., Zegers, H.A., Wittebol-Post, D., van den Biesen, P.R. and van der Velde-Visser, S.D., 2006, Erosive vitreoretinopathy and wagner disease are caused by intronic mutations in CSPG2/Versican that result in an imbalance of splice variants, *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(8), 3565-3572.
- Multhaupt, H. A., Leitinger, B., Gullberg, D., & Couchman, J. R. 2016, Extracellular matrix component signaling in cancer, *Advanced drug delivery reviews*, 97, 28-40.
- Murdoch, A.D., Liu, B., Schwarting, R., Tuan, R.S. and Iozzo, R.V., 1994, Widespread expression of perlecan proteoglycan in basement membranes and extracellular matrices of human tissues as detected by a novel monoclonal antibody against domain III and by in situ hybridization, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 42(2), 239-249.
- Murphy-Ullrich, J.E., 2001, The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state?, *The Journal of clinical investigation*, 107(7), 785-790.
- Naba, A., Clauser, K.R., Ding, H., Whittaker, C.A., Carr, S.A. and Hynes, R.O., 2016, The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era, *Matrix Biology*, 49, 10-24.
- Nakajima, M., Irimura, T. and Nicolson, G.L., 1988, Heparanases and tumor metastasis, *Journal of cellular biochemistry*, 36(2), 157-167.
- Nakamura, M., Hikida, M., Nakano, T., Ito, S., Hamano, T. and Kinoshita, S., 1993, Characterization of water retentive properties of hyaluronan, *Cornea*, 12(5), 433-436.
- Nicholson, K.M. and Anderson, N.G., 2002, The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy, *Cellular signalling*, 14(5), 381-395.
- Nicole, S., Chaouch, A., Torbergesen, T., Bauché, S., de Bruyckere, E., Fontenille, M.J., Horn, M.A., van Ghelue, M., Løseth, S., Issop, Y. and Cox, D., 2014, Agrin mutations lead to a congenital myasthenic syndrome with distal muscle weakness and atrophy, *Brain*, 137(9), 2429-2443.
- Nicole, S., Davoine, C.S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C.B., Hammouda, H., Cruaud, C., White, P.S. and Samson, D., 2000, Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia), *Nature genetics*, 26(4), 480.
- Nitkin, R.M., Smith, M.A., Magill, C., Fallon, J.R., Yao, Y.M.M., Wallace, B.G. and McMahan, U.J., 1987, Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ, *The Journal of cell biology*, 105(6), 2471-2478.
- Niu, D.F., Kondo, T., Nakazawa, T., Oishi, N., Kawasaki, T., Mochizuki, K., Yamane, T. and Katoh, R., 2012, Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial–mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas, *Laboratory investigation*, 92(8), 1181.

- Noonan, D.M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y. and Hassell, J.R., 1991, The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule, *Journal of Biological Chemistry*, 266(34), 22939-22947.
- Nuchprayoon, I., Meyers, S., Scott, L.M., Suzow, J., Hiebert, S. and Friedman, A.D., 1994, PEBP2/CBF, the murine homolog of the human myeloid AML1 and PEBP2 beta/CBF beta proto-oncoproteins, regulates the murine myeloperoxidase and neutrophil elastase genes in immature myeloid cells, *Molecular and cellular biology*, 14(8), 5558-5568.
- Nugent, M.A., Nugent, H.M., Iozzo, R.V., Sanchack, K. and Edelman, E.R., 2000, Perlecan is required to inhibit thrombosis after deep vascular injury and contributes to endothelial cell-mediated inhibition of intimal hyperplasia, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6722-6727.
- Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J.I.E., Satake, M., Shigesada, K. and Ito, Y., 1993. PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(14), 6859-6863.
- Oldberg, A., Franzén, A. and Heinegård, D., 1986, Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(23), 8819-8823.
- Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T. and Sakaguchi, S., 2007, Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1, *Nature*, 446(7136), 685.
- Ornitz, D.M., 2000, FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development, *Bioessays*, 22(2), 108-112.
- Otsuka, K., Yao, K.L., Wasi, S., Tung, P.S., Aubin, J.E., Sodek, J. and Termine, J.D., 1984, Biosynthesis of osteonectin by fetal porcine calvarial cells in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, 259(15), 9805-9812.
- Otto, F., Kanegane, H. and Mundlos, S., 2002, Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia, *Human mutation*, 19(3), 209-216.
- Otto, F., Lübbert, M. and Stock, M., 2003, Upstream and downstream targets of RUNX proteins, *Journal of cellular biochemistry*, 89(1), 9-18.
- Özalp, G.R., Şimşek, G., Akçağlar, S. and Shenavai, S., 2010, Trizol RNA Ekstraksiyon Metodu: İnek Plasentomu için Oldukça Etkili Metod Değerlendirmesi, *Uludağ University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 29(1), 1-6.
- Parish, C.R., 2001, Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion, *Biochimica et biophysica acta*, 1471, M99-M108.

- Parish, C.R., Coombe, D.R., Jakobsen, K.B., Bennett, F.A. and Underwood, P.A., 1987, Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumour metastasis by blocking tumour-cell-derived heparanases, *International journal of cancer*, 40(4), 511-518.
- Payne, S.L., Hendrix, M.J. and Kirschmann, D.A., 2007, Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—a prospect, *Journal of cellular biochemistry*, 101(6), 1338-1354.
- Penc, S.F., Pomahac, B., Winkler, T., Dorschner, R.A., Eriksson, E., Herndon, M. and Gallo, R.L., 1998, Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function, *Journal of Biological Chemistry*, 273(43), 28116-28121.
- Porte, H., Chastre, E., Prevot, S., Nordlinger, B., Empereur, S., Basset, P., Chambon, P. and Gespach, C., 1995, Neoplastic progression of human colorectal cancer is associated with overexpression of the stromelysin-3 and BM-40/SPARC genes, *International journal of cancer*, 64(1), 70-75.
- Pratap, J., Javed, A., Languino, L.R., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. and Lian, J.B., 2005, The Runx2 osteogenic transcription factor regulates matrix metalloproteinase 9 in bone metastatic cancer cells and controls cell invasion, *Molecular and cellular biology*, 25(19), 8581-8591.
- Pratap, J., Lian, J.B., Javed, A., Barnes, G.L., Van Wijnen, A.J., Stein, J.L. and Stein, G.S., 2006, Regulatory roles of Runx2 in metastatic tumor and cancer cell interactions with bone, *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(4), 589-600.
- Prince, C.W. and Butler, W.T., 1987.,1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the biosynthesis of osteopontin, a bone-derived cell attachment protein, in clonal osteoblast-like osteosarcoma cells, *Collagen and related research*, 7(4), 305-313.
- Proctor, R.A., 1987, Fibronectin: a brief overview of its structure, function, and physiology. *Reviews of infectious diseases*, 9, S317-S321.
- Qiao, M., Shapiro, P., Kumar, R. and Passaniti, A., 2004, Insulin-like growth factor-1 regulates endogenous RUNX2 activity in endothelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/ERK-dependent and Akt-independent signaling pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 279(41), 42709-42718.
- Qie, S. and Diehl, J.A., 2016, Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment, *Journal of Molecular Medicine*, 94(12), 1313-1326.
- Rauch, U., Karthikeyan, L., Maurel, P., Margolis, R.U. and Margolis, R.K., 1992, Cloning and primary structure of neurocan, a developmentally regulated, aggregating chondroitin sulfate proteoglycan of brain, *Journal of Biological Chemistry*, 267(27), 19536-19547.
- Reiland, J., Sanderson, R.D., Waguespack, M., Barker, S.A., Long, R., Carson, D.D. and Marchetti, D., 2004, Heparanase degrades syndecan-1 and perlecan heparan sulfate functional implications for tumor cell invasion, *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8047-8055.

- Retzler, C., Wiedemann, H., Kulbe, G. and Rauch, U., 1996, Structural and electron microscopic analysis of neurocan and recombinant neurocan fragments, *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17107-17113.
- Rittling, S. R. and Chambers, A. F. 2004, Role of osteopontin in tumour progression, *British journal of cancer*, 90(10), 1877.
- Rodrigues, M., Nirankari, V., Rajagopalan, S., Jones, K. and Funderburgh, J., 1992, Clinical and histopathologic changes in the host cornea after epikeratoplasty for keratoconus, *American journal of ophthalmology*, 114(2), 161-170.
- Rodríguez, C., Martínez-González, J., Raposo, B., Alcudia, J.F., Guadall, A. and Badimon, L., 2008, Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases, *Cardiovascular research*, 79(1), 7-13.
- Ruoslahti, E., 1988, Structure and biology of proteoglycans, *Annual review of cell biology*, 4(1), 229-255.
- Said, N. and Motamed, K., 2005, Absence of host-secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) augments peritoneal ovarian carcinomatosis, *The American journal of pathology*, 167(6), 1739-1752.
- Said, N., Socha, M.J., Olearczyk, J.J., Elmarakby, A.A., Imig, J.D. and Motamed, K., 2007, Normalization of the ovarian cancer microenvironment by SPARC, *Molecular cancer research*, 5(10), 1015-1030.
- Salvatierra, E., Alvarez, M.J., Leishman, C.C., Baquero, E.R., Lutzky, V.P., Chuluyan, H.E. and Podhajcer, O.L., 2015, SPARC controls melanoma cell plasticity through Rac1, *PloS one*, 10(8), e0134714.
- Sancisi, V., Manzotti, G., Gugnoni, M., Rossi, T., Gandolfi, G., Gobbi, G., Torricelli, F., Catellani, F., Faria do Valle, I., Remondini, D. and Castellani, G., 2017, RUNX2 expression in thyroid and breast cancer requires the cooperation of three non-redundant enhancers under the control of BRD4 and c-JUN, *Nucleic acids research*, 45(19), 11249-11267.
- Sanderson, R.D., Yang, Y., Suva, L.J. and Kelly, T., 2004, Heparan sulfate proteoglycans and heparanase—partners in osteolytic tumor growth and metastasis, *Matrix Biology*, 23(6), 341-352.
- Schatten, H. 2013, *Cell and molecular biology of breast cancer*, Humana Press. New York. 3-6.
- Senger, D.R., Wirth, D.F. and Hynes, R.O., 1979, Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins, *Cell*, 16(4), 885-893.
- Sharma, B. and Iozzo, R.V., 1998, Transcriptional silencing of perlecan gene expression by interferon- γ , *Journal of Biological Chemistry*, 273(8), 4642-4646.

- Sharma, S., Bell, D., Settleman, J. and Haber, D. 2007, Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169-181.
- Shen, Q. and Christakos, S., 2005, The vitamin D receptor, Runx2, and the Notch signaling pathway cooperate in the transcriptional regulation of osteopontin, *Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40589-40598.
- Sher, I., Zisman-Rozen, S., Eliahu, L., Whitelock, J.M., Maas-Szabowski, N., Yamada, Y., Breitkreutz, D., Fusenig, N.E., Arikawa-Hirasawa, E., Iozzo, R.V. and Bergman, R., 2006, Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation, *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 5178-5187.
- Shi, Q., Bao, S., Maxwell, J.A., Reese, E.D., Friedman, H.S., Bigner, D.D., Wang, X.F. and Rich, J.N., 2004, Secreted protein acidic, rich in cysteine (SPARC), mediates cellular survival of gliomas through AKT activation, *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52200-52209.
- Shinomura, T., Nishida, Y., Ito, K. and Kimata, K., 1993, cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multifunctions of PG-M and their relationships to versican, *Journal of Biological Chemistry*, 268(19), 14461-14469.
- Smit, D.J., Gardiner, B.B. and Sturm, R.A., 2007, Osteonectin downregulates E-cadherin, induces osteopontin and focal adhesion kinase activity stimulating an invasive melanoma phenotype, *International journal of cancer*, 121(12), 2653-2660.
- Smith, L.L., Cheung, H.K., Ling, L.E., Chen, J., Sheppard, D., Pytela, R. and Giachelli, C.M., 1996, Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by $\alpha 9\beta 1$ integrin, *Journal of Biological Chemistry*, 271(45), 28485-28491.
- Smith-Mungo, L.I. and Kagan, H.M., 1998, Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology, *Matrix biology*, 16(7), 387-398.
- Sosa, M.S., Girotti, M.R., Salvatierra, E., Prada, F., de Olmo, J.A.L., Gallango, S.J., Albar, J.P., Podhajcer, O.L. and Llera, A.S., 2007, Proteomic analysis identified N-cadherin, clusterin, and HSP27 as mediators of SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteines) activity in melanoma cells, *Proteomics*, 7(22), 4123-4134.
- Strippoli, P., D'addabbo, P., Lenzi, L., Giannone, S., Canaider, S., Casadei, R., Vitale, L., Carinci, P. and Zannotti, M., 2002, Segmental paralogy in the human genome: a large-scale triplication on 1p, 6p, and 21q, *Mammalian genome*, 13(8).
- Ström, Å., Franzén, A., Wängnerud, C., Knutsson, A.K., Heinegård, D. and Hultgårdh-Nilsson, A., 2004, Altered vascular remodeling in osteopontin-deficient atherosclerotic mice, *Journal of vascular research*, 41(4), 314-322.
- Sushma, C., Prasad, S., Devi, R., Murthy, S., Rao, T.S. and Naidu, C., 2015, High Frequency of Codon 12 but not Codon 13 and 61 K-ras Gene Mutations in Invasive Ductal Carcinoma of Breast in a South Indian Population, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(8), 3505-3508.

- Tai, I.T. and Tang, M.J., 2008, SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy, *Drug Resistance Updates*, 11(6), 231-246.
- Tanaka, T., Kurokawa, M., Ueki, K., Tanaka, K., Imai, Y., Mitani, K., Okazaki, K., Sagata, N., Yazaki, Y., Shibata, Y. and Kadowaki, T., 1996, The extracellular signal-regulated kinase pathway phosphorylates AML1, an acute myeloid leukemia gene product, and potentially regulates its transactivation ability, *Molecular and cellular biology*, 16(7), 3967-3979.
- Tanaka, T., Tanaka, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Mitani, K., Nishida, J., Shibata, Y., Yazaki, Y. and Hirai, H., 1995, An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms, *The EMBO journal*, 14(2), pp.341-350.
- Teng, Y.H.F., Aquino, R.S. and Park, P.W., 2012, Molecular functions of syndecan-1 in disease, *Matrix biology*, 31(1), 3-16.
- Teplyuk, N.M., Haupt, L.M., Ling, L., Dombrowski, C., Mun, F.K., Nathan, S.S., Lian, J.B., Stein, J.L., Stein, G.S., Cool, S.M. and Van Wijnen, A.J., 2009, The osteogenic transcription factor Runx2 regulates components of the fibroblast growth factor/proteoglycan signaling axis in osteoblasts, *Journal of cellular biochemistry*, 107(1), 144-154.
- Termine, J.D., Kleinman, H.K., Whitson, S.W., Conn, K.M., McGarvey, M.L. and Martin, G.R., 1981, Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen, *Cell*, 26(1), 99-105.
- Terry, A., Kilbey, A., Vaillant, F., Stewart, M., Jenkins, A., Cameron, E. and Neil, J.C., 2004, Conservation and expression of an alternative 3' exon of Runx2 encoding a novel proline-rich C-terminal domain, *Gene*, 336(1), 115-125.
- Thaler, R., Spitzer, S., Rumpel, M., Fratzl-Zelman, N., Klaushofer, K., Paschalis, E.P. and Varga, F., 2010, Differential effects of homocysteine and beta aminopropionitrile on preosteoblastic MC3T3-E1 cells, *Bone*, 46(3), 703-709.
- Thalmann, G.N., Sikes, R.A., Devoll, R.E., Kiefer, J.A., Markwalder, R., Klima, I., Farach-Carson, C.M., Studer, U.E. and Chung, L.W.K., 1999, Osteopontin: possible role in prostate cancer progression, *Clinical Cancer Research*, 5(8), 2271-2277.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., and Karamanos, N. K., 2016, Extracellular matrix structure, *Advanced drug delivery reviews*, 97, 4-27.
- Thomas, R., True, L.D., Bassuk, J.A., Lange, P.H. and Vessella, R.L., 2000, Differential expression of osteonectin/SPARC during human prostate cancer progression, *Clinical Cancer Research*, 6(3), 1140-1149.
- Timpl, R. 1989, Structure and biological activity of basement membrane proteins, *European Journal of Biochemistry*, 180(3), 487-502.

- Toole, B.P., 2004, Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue, *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 528.
- Trackman, P.C., Pratt, A.M., Wolanski, A., Tang, S.S., Offner, G.D., Troxler, R.F. and Kagan, H.M., 1990, Cloning of rat aorta lysyl oxidase cDNA: complete codons and predicted amino acid sequence, *Biochemistry*, 29(20), 4863-4870.
- Tremble, P.M., Lane, T.F., Sage, E.H. and Werb, Z., 1993, SPARC, a secreted protein associated with morphogenesis and tissue remodeling, induces expression of metalloproteinases in fibroblasts through a novel extracellular matrix-dependent pathway, *The Journal of cell biology*, 121(6), 1433-1444.
- Tsen, G., Halfter, W., Kröger, S. and Cole, G.J., 1995, Agrin is a heparan sulfate proteoglycan, *Journal of Biological Chemistry*, 270(7), 3392-3399.
- Tuck, A. B., & Chambers, A. F. 2001, The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies, *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 6(4), 419-429.
- Uchida, H., Downing, J.R., Miyazaki, Y., Frank, R., Zhang, J. and Nimer, S.D., 1999, Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter, *Oncogene*, 18(4), 1015.
- Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H.M., Baruch, Y., Izhak, O.B. and Neufeld, G., 2005, Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2, *Journal of hepatology*, 43(3), 499-507.
- Vaillant, F., Blyth, K., Andrew, L., Neil, J.C. and Cameron, E.R., 2002, Enforced expression of Runx2 perturbs T cell development at a stage coincident with β -selection, *The Journal of Immunology*, 169(6), 2866-2874.
- Van den Hoven, M.J., Rops, A.L., Vlodavsky, I., Levidiotis, V., Berden, J.H. and Van der Vlag, J., 2007, Heparanase in glomerular diseases, *Kidney international*, 72(5), 543-548.
- Van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Gergen, J.P., Groner, Y., Hiebert, S.W., Ito, Y., Liu, P., Neil, J.C., Ohki, M. and Speck, N., 2004, Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins, *Oncogene*, 23(24), 4209.
- Vanharanta, S. and Massagué, J., 2013, Origins of metastatic traits, *Cancer cell*, 24(4), 410-421.
- Varki, N.M. and Varki, A., 2007, Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease, *Laboratory investigation*, 87(9), 851.
- Vertel, B.M., 1995, The ins and outs of aggrecan, *Trends in cell biology*, 5(12), 458-464.
- Veugelers, M., Cat, B.D., Muyldermans, S.Y., Reekmans, G., Delande, N., Frints, S., Legius, E., Fryns, J.P., Schrandt-Stumpel, C., Weidle, B. and Magdalena, N., 2000, Mutational analysis of the GPC3/GPC4 glypican gene cluster on Xq26 in patients with Simpson-

- Golabi-Behmel syndrome: identification of loss-of-function mutations in the GPC3 gene, *Human molecular genetics*, 9(9), 1321-1328.
- Vladimirova, V., Waha, A., Lückerrath, K., Pesheva, P. and Probstmeier, R., 2008, Runx2 is expressed in human glioma cells and mediates the expression of galectin-3, *Journal of neuroscience research*, 86(11), 2450-2461.
- Vlodavsky, I. and Friedmann, Y., 2001, Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis, *The Journal of clinical investigation*, 108(3), 341-347.
- Vlodavsky, I., Bar-Shavit, R., Ishar-Michael, R., Bashkin, P. and Fuks, Z., 1991, Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism?, *Trends in biochemical sciences*, 16, 268-271.
- Vlodavsky, I., Eldor, A., Haimovitz-Friedman, A., Matzner, Y., Ishai-Michaeli, R., Lider, O., Naparstek, Y., Cohen, I.R. and Fuks, Z., 1992, Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: possible involvement in diapedesis and extravasation, *Invasion & metastasis*, 12(2), 112-127.
- Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I. and Spector, L., 1999, Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis, *Nature medicine*, 5(7), 793.
- Vlodavsky, I., Mohsen, M., Lider, O., Svahn, C.M., Ekre, H.P., Vigoda, M., Ishai-Michaeli, R. and Peretz, T., 1994, Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin, *Invasion & metastasis*, 14(1-6), 290-302.
- Wai, P.Y., Mi, Z., Gao, C., Guo, H., Marroquin, C. and Kuo, P.C., 2006, Ets-1 and runx2 regulate transcription of a metastatic gene, osteopontin, in murine colorectal cancer cells, *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 18973-18982.
- Wang, K.X. and Denhardt, D.T., 2008, Osteopontin: role in immune regulation and stress responses, *Cytokine & growth factor reviews*, 19(5-6), 333-345.
- Wee, H.J., Huang, G., Shigesada, K. and Ito, Y., 2002, Serine phosphorylation of RUNX2 with novel potential functions as negative regulatory mechanisms, *EMBO reports*, 3(10), 967-974.
- Weinberg, R. 2007, *The biology of cancer*, Garland Science, 1st ed., New York, 25-30.
- Westendorf, J.J., Yamamoto, C.M., Lenny, N., Downing, J.R., Selsted, M.E. and Hiebert, S.W., 1998, The t (8; 21) fusion product, AML-1-ETO, associates with C/EBP- α , inhibits C/EBP- α -dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation, *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 322-333.
- Whitelock, J.M., Melrose, J. and Iozzo, R.V., 2008, Diverse cell signaling events modulated by perlecan, *Biochemistry*, 47(43), 11174-11183.

- Wight, T.N., Kang, I. and Merrilees, M.J., 2014a, Versican and the control of inflammation, *Matrix Biology*, 35, 152-161.
- Wight, T.N., Kinsella, M.G., Evanko, S.P., Potter-Perigo, S. and Merrilees, M.J., 2014b, Versican and the regulation of cell phenotype in disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(8), 2441-2451.
- Wight, T.N., Toole, B.P. and Hascall, V.C., 2011, Hyaluronan and the aggregating proteoglycans. In *The extracellular matrix: an overview*, Springer, Berlin, Heidelberg, 147-195
- Wilusz, R.E., DeFrate, L.E. and Guilak, F., 2012, A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, *Matrix Biology*, 31(6), 320-327.
- Wilusz, R.E., Sanchez-Adams, J. and Guilak, F., 2014, The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage, *Matrix biology*, 39, 25-32.
- Wong, G.S. and Rustgi, A.K., 2013, Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis, *British journal of cancer*, 108(4), 755.
- Xie, Z., Singh, M., Siwik, D.A., Joyner, W.L. and Singh, K., 2003, Osteopontin Inhibits Interleukin-1 β -stimulated Increases in Matrix Metalloproteinase Activity in Adult Rat Cardiac Fibroblasts ROLE OF PROTEIN KINASE C- ζ , *Journal of Biological Chemistry*, 278(49), 48546-48552.
- Xue, Q.Y., Wu, L.L., Huang, X.R., Yang, N., Gilbert, R.E., Cooper, M.E., Johnson, R.J., Lai, K.N. and Lan, H.Y., 2000, Osteopontin expression in progressive renal injury in remnant kidney: role of angiotensin II, *Kidney international*, 58(4), 1469-1480.
- Yamaguchi, Y. and Ruoslahti, E., 1988, Expression of human proteoglycan in Chinese hamster ovary cells inhibits cell proliferation, *Nature*, 336(6196), p.244.
- Yamaguchi, Y., Kurokawa, M., Imai, Y., Izutsu, K., Asai, T., Ichikawa, M., Yamamoto, G., Nitta, E., Yamagata, T., Sasaki, K. and Mitani, K., 2004, AML1 is functionally regulated through p300-mediated acetylation on specific lysine residues, *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15630-15638.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M. and Ruoslahti, E., 1990, Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin, *Nature*, 346(6281), 281.
- Yang, R., Gotoh, Y., Moore, M.A., Rafidi, K. and Gerstenfeld, L.C., 1995, Characterization of an avian bone sialoprotein (BSP) cDNA: comparisons to mammalian BSP and identification of conserved structural domains, *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(4), 632-640.
- Yeoh, G., Barton, S. and Kaestner, K., 2011, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, Preface. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(2), 172.

- Yiu, G.K., Chan, W.Y., Ng, S.W., Chan, P.S., Cheung, K.K., Berkowitz, R.S. and Mok, S.C., 2001, SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells, *The American journal of pathology*, 159(2), 609-622.
- Yokosaki, Y., Matsuura, N., Sasaki, T., Murakami, I., Schneider, H., Higashiyama, S., Saitoh, Y., Yamakido, M., Taooka, Y. and Sheppard, D., 1999, The integrin $\alpha 9\beta 1$ binds to a novel recognition sequence (SVVYGLR) in the thrombin-cleaved amino-terminal fragment of osteopontin, *Journal of Biological Chemistry*, 274(51), 36328-36334.
- Young, M.F., Kerr, J.M., Termine, J.D., Wewer, U.M., Wang, M.G., McBride, O.W. and Fisher, L.W., 1990, cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN), *Genomics*, 7(4), 491-502.
- Zaiman, A.L. and Lenz, J., 1996, Transcriptional activation of a retrovirus enhancer by CBF (AML1) requires a second factor: evidence for cooperativity with c-Myb, *Journal of virology*, 70(8), 5618-5629.
- Zcharia, E., Philp, D., Edovitsky, E., Aingorn, H., Metzger, S., Kleinman, H.K., Vlodavsky, I. and Elkin, M., 2005, Heparanase regulates murine hair growth, *The American journal of pathology*, 166(4), 999-1008.
- Zcharia, E., Zilka, R., Yaar, A., Yacoby-Zeevi, O., Zetser, A., Metzger, S., Sarid, R., Naggi, A., Casu, B., Ilan, N. and Vlodavsky, I., 2005, Heparanase accelerates wound angiogenesis and wound healing in mouse and rat models, *The FASEB Journal*, 19(2), 211-221.
- Zhang, Q., Domenicucci, C., Goldberg, H.A., Wrana, J.L. and Sodek, J., 1990, Characterization of fetal porcine bone sialoproteins, secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin), bone sialoprotein, and a 23-kDa glycoprotein. Demonstration that the 23-kDa glycoprotein is derived from the carboxyl terminus of SPPI, *Journal of Biological Chemistry*, 265(13), 7583-7589.
- Zhao, Z.S., Wang, Y.Y., Chu, Y.Q., Ye, Z.Y. and Tao, H.Q., 2010, SPARC is associated with gastric cancer progression and poor survival of patients, *Clinical Cancer Research*, 16(1), 260-268.
- Zimmermann, D.R. and Ruoslahti, E., 1989, Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican, *The EMBO journal*, 8(10), 2975-2981.

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı Sevgi Binay
 Doğum Yeri İstanbul
 Doğum Tarihi 22.12.1991
 Uyruğu ☒ T.C. ☐ Diğer:
 Telefon 05365456515
 E-Posta Adresi sevgican.binay@gmail.com
 Web Adresi



Eğitim Bilgileri

Lisans

Üniversite Ege Üniversitesi
 Fakülte Fen Fakültesi
 Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ağırlıklı Biyoloji
 Mezuniyet Yılı 01.01.2014

Yüksek Lisans

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Biyoloji
 Programı Moleküler Biyoloji

Doktora

Üniversite İstanbul Üniversitesi
 Enstitü Adı Fen Bilimleri Enstitüsü
 Anabilim Dalı Anabilim Dalı Adı
 Programı Program Adı

Makale ve Bildiriler