

**FARID MAMMADLI**



**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK**

**İSTANBUL – 2024**

**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DAMAR YAŞLANMASI VE HASARINDA *BMP2* GENİNİN KATKISININ  
TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ARAŞTIRILMASI**

**FARID MAMMADLI**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. VEYSEL SABRİ HANÇER**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL – 2024**

**İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DAMAR YAŞLANMASI VE HASARINDA *BMP2* GENİNİN KATKISININ  
TRANSKRİPSİYON AŞAMASINDA ARAŞTIRILMASI**

**FARID MAMMADLI**

**DANIŞMAN**  
**Prof. Dr. VEYSEL SABRİ HANÇER**

**İSTANBUL – 2024**

## TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı  
Prof.Dr. Veysel Sabri Hançer

Enstitü Müdürü  
Prof.Dr. İlhami Çolak

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığımı tasdik ederim.

Prof.Dr. Veysel Sabri Hançer  
Danışman

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

Prof.Dr. Özgür Çakır

İstanbul Üniversitesi

Prof.Dr. Veysel Sabri Hançer

İstinye Üniverstesi

Doç.Dr. Süreyya Bozkurt

İstinye Üniverstesi

## ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “Damar Yaşlanması ve Hasarında *BMP2* Geninin Katkısının Transkripsiyon Aşamasında Araştırılması” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

FARID MAMMADLI

## İTHAF

Yaşamım boyunca bana her konuda koşulsuz desteğini, güvenini, sevgisini ve yardımlarını esirgemeyen beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan Aile kelimesini en iyi şekilde bana hissettirip yaşatan en değerli varlığım annem ve babama sonsuz teşekkür ederim.



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana bilgi, deneyim ve tecrübelerini aktaran, her konuda danışabileceğimi bana hissettiren, sabır ve içtenlik ile bana emek harcayan, yardımlarını benden esirgemeyen ve süreci yönetmemde çok önemli katkılar sağlayan danışman hocam Sayın; Prof.Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Sağladığı alt yapı ve laboratuvar ekipman ve kaynaklar için İstinye Üniversitesine teşekkür ederim.



## İÇİNDEKİLER

|  |      |
|--|------|
| TEZ ONAYI.....   | i    |
| ETİK BEYANI.....   | ii   |
| İTHAF.....   | iii  |
| TEŞEKKÜR.....  | iv   |
| İÇİNDEKİLER .....  | v    |
| TABLolar LİSTESİ .....   | vii  |
| ŞEKİLLER LİSTESİ .....   | viii |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ .....                                  | ix   |
| ÖZET .....   | x    |
| ABSTRACT.....  | xi   |
| 1. GİRİŞ.....  | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER .....  | 2    |
| 2.1. Damar Yaşlanmasının Biyolojisi.....                         | 2    |
| 2.2. Damar Olgunlaşmasında BMP'lerin Rolü.....                   | 7    |
| 2.3. BMP Ligand Ailesi.....                                      | 10   |
| 2.4. BMP Ligandlarının Hücre Dışı Düzenlenmesi .....             | 11   |
| 2.5. BMP Reseptörleri.....                                       | 12   |
| 2.6. BMP Ko-reseptörleri .....                                   | 16   |
| 2.7. BMP2 ve BMP4 .....  | 18   |
| 2.8. Dolaşımında Olan BMP Ligandları .....                       | 20   |
| 2.9. BMP sinyal yolları .....                                    | 22   |
| 2.10. BMP Sinyallemesinin Biyolojik Sonuçları .....              | 23   |
| 2.11. Embriyogeneizde BMP Sinyali .....                          | 24   |
| 2.12. Kemik İliği Dokusunun Oluşumunda BMP Sinyalinin Önemi..... | 31   |

|  |    |
|--|----|
| 2.13. İskelet sisteminde BMP sinyali .....                           | 33 |
| 2.14. BMP'lerin Kardiyovasküler Ve Pulmoner Hastalıklarda Rolü ..... | 34 |
| 2.14.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon                             |    |
| (Pulmonary Arterial Hypertension - PAH) .....                        | 34 |
| 2.14.2. Kalıtsal Hemorajik Telenjektazi                              |    |
| (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia - HHT) .....                  | 35 |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....  | 37 |
| 3.1. RNA İzolasyon Protokolü .....                                   | 37 |
| 3.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu               |    |
| (Quantitative Real Time PCR).....                                    | 38 |
| 4. BULGULAR.....   | 40 |
| 5. TARTIŞMA.....   | 41 |
| 6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI.....                             | 43 |
| KAYNAKÇA.....  | 44 |
| EKLER.....   | 63 |
| EK-1 : KURUM İZİNİ ONAYI .....                                       | 64 |
| EK-2: ETİK KURUL ONAYI .....   | 65 |
| EK-3: İNTİHAL RAPORU .....   | 66 |
| EK-4: ÖZGEÇMİŞ .....   | 67 |

## TABLolar LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| Tablo 2.1. Yanlış Düzenlenen BMP Sinyallerinin Neden Olduğu Vasküler Anomaliler...                            | 8  |
| Tablo 2.2. BMP Ligandları İçin Gösterilen Tip I ve Tip II Reseptör Etkileşimleri.....                         | 12 |
| Tablo 2.3. BMP Sinyalinin Ortak Reseptörleri.....   | 17 |
| Tablo 2.4. BMP Sinyalleşmesindeki Ana Oyuncular İçin Nakavt<br>Fenotipleri ve Biyolojik Sonuçları.....        | 25 |
| Tablo 3.1. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu<br>(Quantitative Real Time PCR) bileşenleri..... | 39 |
| Tablo 3.2. Primer Dizileri.....   | 39 |
| Tablo 3.3. qRT-PCR Programı:.....   | 39 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 2.1. Damar yaşlanması ve yaşlanmayla hızlanan damar hastalığı.....  | 4  |
| Şekil 2.2. İnsan hastalıklarına neden olduğu veya bunlarla ilişkili olduğu<br>kanıtlanmış BMP sinyal yolunun temsili üyeleri..... | 5  |
| Şekil 2.3. BMP tipI ve tipII reseptörlerin iki tip serin-treonin<br>kinaz enzimine bağlanması.....                                | 6  |
| Şekil 2.4. TCF-B süper ailesi ligandlarının tam uzunluktaki insan<br>protein dizilerine dayalı filogenetik karşılaştırması.....   | 11 |
| Şekil 2.5. BMP ailesi ve sinyal yolları.....  | 23 |
| Şekil 2.6. BMP hedef genlerinin transkripsiyonu etkilemesi.....   | 32 |
| Şekil 2.7. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon.....  | 35 |
| Şekil 2.8. Kalıtsal Hemorajik Telenjektazi.....   | 36 |

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>GDF</b>                    | : Gelişme Farklılaşma Faktörleri        |
| <b>TNF</b>                    | : Tümör Nekroz Faktörü                  |
| <b>HHT</b>                    | : Kalıtsal Hemorajik Telanjiektazi      |
| <b>PAH</b>                    | : Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon      |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b> | : Dönüştürücü Büyüme Faktörü - $\beta$  |
| <b>ACVR2A</b>                 | : Aktivin A Reseptör Tipi 2A            |
| <b>ACVR2B</b>                 | : Aktivin A Reseptör Tipi 2B            |
| <b>ALK3</b>                   | : Aktivin Benzeri Kinaz                 |
| <b>SRF</b>                    | : Serum Yanıt Faktörü                   |
| <b>TCF</b>                    | : Üçlü Kompleks Faktör                  |
| <b>AP1</b>                    | : Aktivatör Protein 1                   |
| <b>ATF2</b>                   | : Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 2 |
| <b>TF</b>                     | : Transkripsiyon Faktörü                |
| <b>EPC</b>                    | : Endotel Progenitor Hücre              |
| <b>VEGF</b>                   | : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü    |
| <b>Id1</b>                    | : DNA Bağlanma İnhibitörü I             |
| <b>VSM</b>                    | : Vasküler Yumuşak Kaslar               |
| <b>MSC</b>                    | : Mezenkimal Kök Hücreleri              |

## ÖZET

MAMMADLI,F. (2024). “Damar Yaşlanması ve Hasarında *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2) Geninin Katkısının Transkripsiyon Aşamasında Araştırılması”. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışmamız *BMP2* geninin ekspresyon seviyesinin kardiyovasküler hastalıklar, kalp ve kalp damarlarına etkisi araştırmıştır.

Bu çalışmamız *BMP2* geninin venöz yetmezlik sebebiyle opere edilen hastaların damar dokusu örnekleri ile Koroner By-Pass ameliyatına alınan hastaların sağlıklı damar dokuları arasında ekspresyon seviyelerini kıyaslanmıştır.

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, *BMP* genlerinin gelişimin erken basamaklarından, birçok hastalık patofizyolojisine kadar rol oynadığını göstermiştir. *BMP* genlerinin, damar oluşumunda önemli faktörlerden biridir.

Bu çalışmada damar dokusunda oluşan kronik yaşlanma ve hasarında *BMP2* geninin ekspresyon seviyesi araştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *BMP2*, Venöz yetmezlik, Koroner By-Pass, Ekspresyon

## ABSTRACT

MAMMADLI,F. (2024). “Investigation of the Contribution of the *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2) Gene in the Transcription Stage in Vascular Aging and Damage”. İstinye University Health Sciences Institute, Department of Medical Biology and Genetics. Master's Thesis. Istanbul.

Our study investigated the effect of the expression level of the *BMP2* gene on cardiovascular diseases, heart and cardiovascular diseases.

This study compared the expression levels of the *BMP2* gene between vascular tissue samples of patients operated on due to venous insufficiency and healthy vascular tissues of patients undergoing Coronary By-Pass surgery.

Recent studies have shown that *BMP* genes play a role from early stages of development to the pathophysiology of many diseases. *BMP* genes are one of the important factors in vascular formation.

In this study, the expression level of the *BMP 2* gene in chronic aging and damage to vascular tissue was investigated.

**Key words:** BMP, Venous insufficiency, Coronary By-Pass, Expression

## 1. GİRİŞ

Damar dokusunun yaşlanması, yaşlı insanların hastalık ve ölüm oranında önemli bir rol oynar. Vasküler yaşlanmanın oluşturduğu hasarların tedavisi ve ileri yaşla bağlı vasküler patolojilerin karşısının alınması ve yeni tedaviler geliştirmek için, yaşlanması sırasında damar sisteminde meydana gelen hücresel, moleküler ve fonksiyonel değişiklikleri anlamak tedavi süreci için çok önemlidir. Bu değişiklikleri daha detaylı anlamak için mitokondriyal disfonksiyon, moleküler stresörlere karşı bozulmuş direnç, kronik düşük dereceli inflamasyon, genomik instabilite, hücresel yaşlanma, epigenetik değişiklikler, protein homeostazisinin kaybı gibi yaşlanmanın temel hücresel ve moleküler mekanizmalarının rollerini de kapsamak gereklidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Damar Yaşlanması ve Biyolojisi

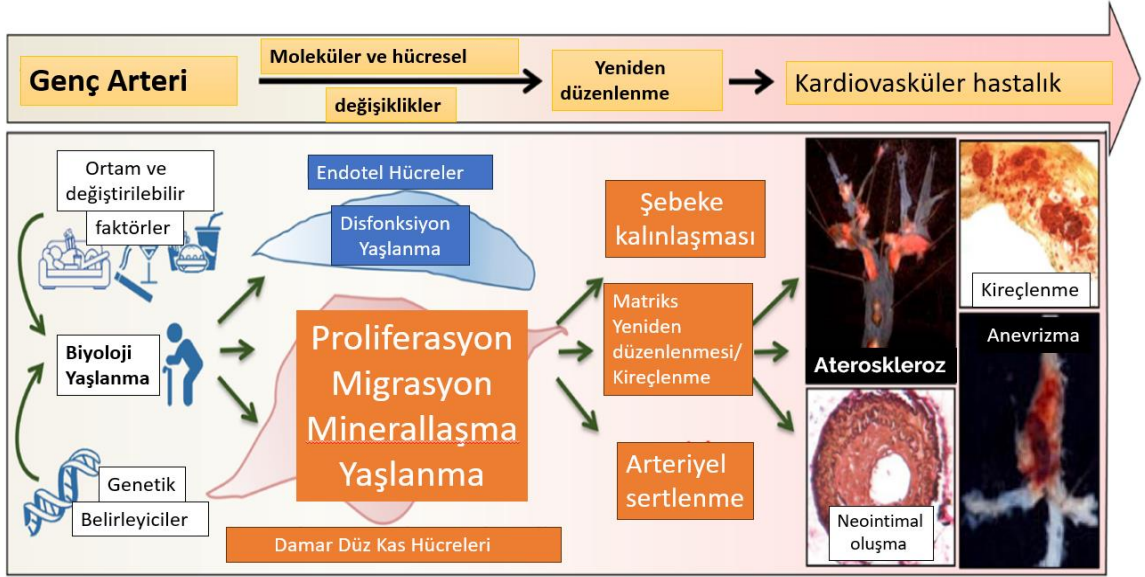
Kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar, yaşlı bireyler arasında Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın ölüm nedenidir ve 65 yaşında tüm ölümlerin  $\approx 1/3$ 'ünü ve 85 yaşında  $\approx 2/3$ 'ünü kapsamakta olup 65 yaş üstü (Statistics, N.C.f.H., Health, United States, 2016) kişilerin yakın 30 yılda sayısının %12'den %22'ye çıkacağı tahmin edilen artışla birlikte, yaşa bağlı damar hastalıkları ön plana alınması çok önemlidir, (Heidenreich ve ark., 2011) çünkü bu yaşlı hastaların bakımının yıllık maliyetinin bu süre zarfında iki katından artması beklenmektedir. Yaşa bağlı kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların oluşma nedeni, arteriyel fonksiyondaki değişikliklerden kaynaklandığı ve fenotipik olarak daha da ilerlediği için, arteriyel yaşlanmanın altında yatan mekanizmaların daha kapsamlı araştırılması önemlidir (Lakatta ve ark.,2003). Vasküler kognitif bozukluk, Alzheimer hastalığı, sarkopeni ve böbrek ve göz hastalığı dahil olmak üzere yaşa bağlı bir çok hastalığın patogenezi mikro sirkülasyonda yaşlanmanın neden olduğu fonksiyonel ve yapısal anomaliler neden olmaktadır (Zhou ve ark., 2020).

Vasküler yaşlanma, genel olarak kronolojik yaşlanmadan farklı biyolojik bir değişkenliktir; burada bir hücrede veya tüm organizmada parsiyel ve ilerleyici değişiklikler, fonksiyon bozulması, hastalık ve ölüm riskinin artmasına neden olur (Chakrabarti ve ark.,2020). Biyolojik yaşlanmanın farklı özellikleri arasında hücre fonksiyon bozukluğu ve hücre ölümüne karşı hassasiyet yer almaktadır ve bu belirtilerin çoğu aynı zamanda vasküler işlev bozukluğuna ve kireçlenmeye de kadar ilerleyebilmektedir (López-Otín ve ark.,2013). Telomerler her hücre replikasyon döngüsünden sonra kısalması ve bu da hücrelerin proliferatif özelliğinin azalmasına neden olmaktadır (Olovnikov ve ark.,1996). Telomerlerin tek sarmallı uçları, kromozomal uçların çift sarmallı DNA kırıkları olarak görünmesini, aksi takdirde DNA hasarı tepkilerine neden olmasını önlemek için korunmaktadır (de Lange.,2018). Bu telomer başlıklarının parçalanması, artan hücre yaşlanma, oksidatif stres ve iltihaplanma dahil olmak üzere yaşa bağlı damar fonksiyon bozukluklarına yol açabilir (Morgan ve ark., 2018). Yaşlanan hücreler hareketsiz değildir ve iltihaplı bir fenotipi komşu hücreye yayan kimyasal araçları dışarı çıkarabilme özelliğine sahiptir (Tchkonina ve ark.,2013). Vasküler düz kas hücreleri (SMC'ler), endotel kaynaklı eksozomların

alımına yanıt olarak yaşlanma belirteçleri sergiler ve kalsifiye olur (Lin.,2019). Ek olarak, yaşlı bireylerin yaşlanan endotel hücrelerinden alınan mikropartiküller vasküler SMC kalsifikasyonuna sebep olmaktadır (Alique Aguilar.,2017) ve in vivo insan vasküler fonksiyonu, endotel hücrelerinde yaşlanma belirteçlerinin varlığıyla ters orantılıdır (Rossmann., 2017). Farelerde, yaşlanan hücrelerin ölümüne neden olan senolitik ilaçlar, yaşlı farelerde damar fonksiyonunu geri getirebilmektedir (Roos ve ark.,2016). Eksojen faktörlere (iyonlaştırıcı radyasyon gibi), replikasyon hatalarına veya bozulmuş DNA hasarının birikmesi, kısmen reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin oluşumu sonrası hücreSEL fonksiyon bozukluğuna katkıda bulunur ve ayrıca kardiyovasküler kalsifikasyona da neden olmaktadır (Meerman ve ark., 2021). Kanda ve dokularda iltihaplanma veya proinflamatuvar belirteçlerde yaşa bağlı artış, hem biyolojik yaşlanmanın bir biyolojik belirteci hem de yaşa bağlı kardiyovasküler patolojinin nedeni olabilir. Enflamasyon, yaşlanan hücreler gibi inflamatuvar mediatörlerin artan üretimi nedeniyle veya bozulmuş inflamatuvar çözünürlük nedeniyle meydana gelebilir (Rymut ve ark., 2020). TNF (tümör nekroz faktörü) ile uyarılan endotel hücrelerinin, BMP2 (Kemik Morfogenetik Protein 2) içeren mikropartikülleri serbest bırakması, bunların da vasküler SMC'ler tarafından fagosite uğraması ve osteogenezin artması, yaşla ilişkili arteriyel kalsifikasyona neden olması inflamasyonun rolünün ne kadar önemli olduğunu desteklemektedir. BMP2 aynı zamanda proinflamatuvardır ve endotelial aktivasyonunu tetiklemek özelliğine sahiptir; bu da bu lokal inflamatuvar bozuklukların otomatik geri bildirimde bulunabileceğini ve yaşla ilişkili kalsifikasyonu artırabileceğini ihtimalini vermektedir(Csiszar ve ark., 2006).

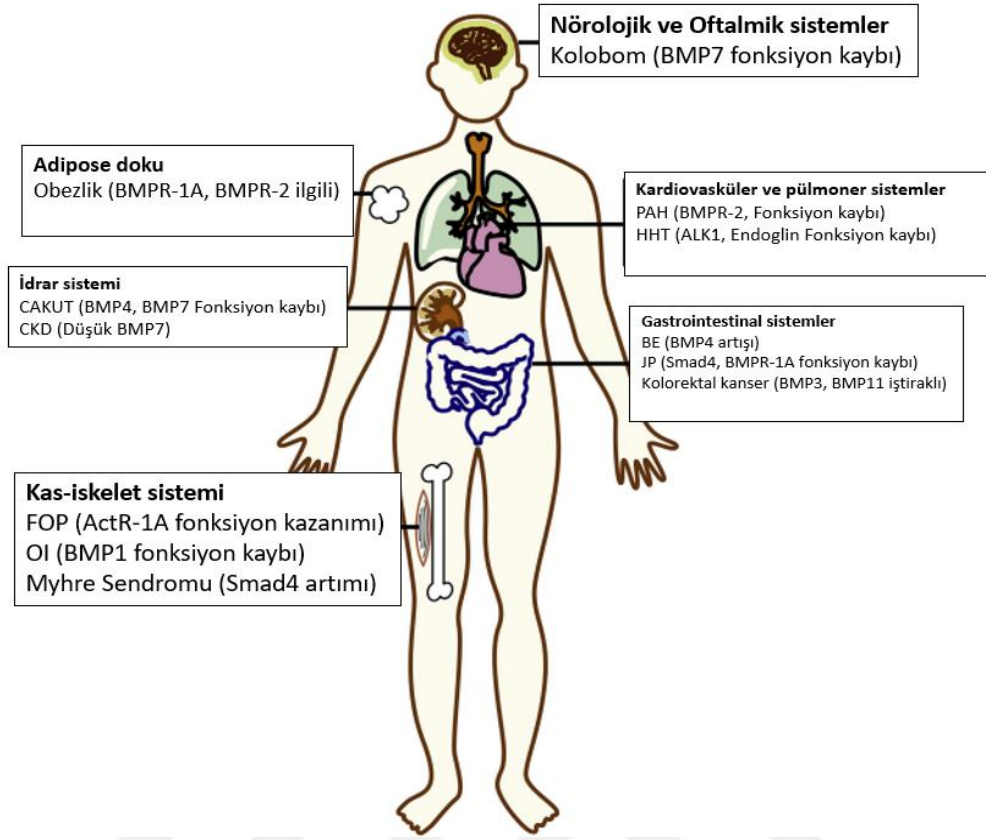
Kemik Morfogenetik Proteinlerinin (BMP'ler) fonksiyonu ilk olarak 1960'ların ortalarında ektopik kemik oluşumunu tetikleyebilecekleri keşfedildiğinde gözlemlendi (Urist., 1965). Ancak ilk BMP'lerin karakterize edildiği 1980'lerin sonlarına kadar bireysel BMP'ler biyokimyasal olarak incelenemedi (Wozney ve ark., 1988). O zamandan beri birçok çalışma, BMP'lerin mezenkimal kök hücrelerin kemiğe farklılaşmasını teşvik etme yeteneğini göstererek kemik ve kıkırdak oluşumundaki rollerini doğruladı. BMP'ler TGF- $\beta$ , aktivin, inhibin, Growth differentiation factors( GDFs), Glial derived neurotrophic factors (GDNFs), Nodal Lefty ve anti- Müllerian hormonunun dahil olduğu Transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) süper ailesinin bir parçasıdır (Şekil2.1). İlk keşfedilmelerinden bu yana, kemik ve osteogenezin ötesinde çok çeşitli hücre tiplerini ve süreçlerini etkiledikleri kanıtlanmıştır. Bunlar embriyogenez ve gelişimde önemli

morfojenlerdir ve ek olarak yetişkin doku homeostazisinin korunmasını da kontrol ederler.



**Şekil 2.1. Damar yaşlanması ve yaşlanmayla hızlanan damar hastalığı.**

Erken gelişimdeki birçok süreç, hücre büyümesi, apoptoz ve farklılaşma için BMP sinyallemeinden asılıdır (Hemmati-Brivanlou ve ark.,1995, Bobacz ve ark., 2003). BMP'ler ayrıca eklem bütünlüğünün korunması, kırık bütünlüğünün başlatılması ve vasküler yeniden yapılanma gibi yetişkin doku homeostazisinin korunmasında da önemli roller oynar (Tsuji ve ark., 2006). Tüm organ sistemlerindeki bu farklı işlevlerden dolayı BMP'lerin vücut morfojenetik proteinleri (Body Morphogenetic Proteins) olarak adlandırılmayı hak ettiği öne sürülmüştür(Obradovic Wagner ve ark.,2010). Vücuttaki düzenleyiciler olarak her yerde bulunmaları ve önemleri nedeniyle, BMP üretimindeki veya işlevselliğindeki hatalar genellikle belirgin kusurlara veya ciddi patolojilere neden olmaktadır (Şekil 2.2).



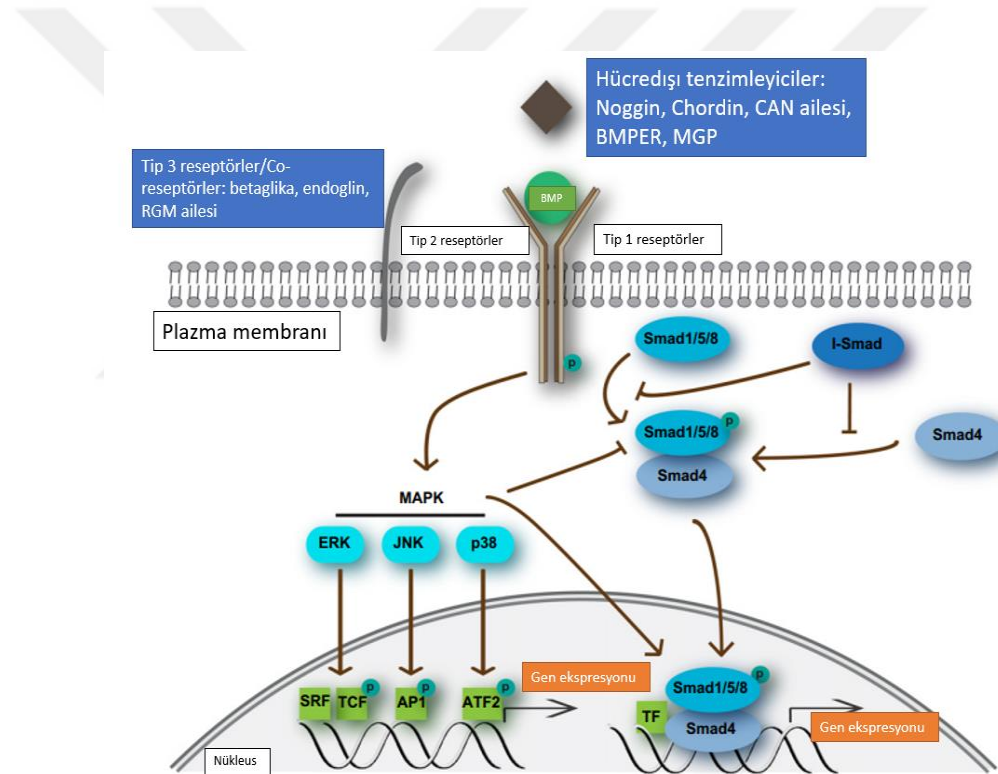
**Şekil 2.2. İnsan hastalıklarına neden olduğu veya bunlarla ilişkili olduğu kanıtlanmış *BMP* sinyal yolunun temsili üyeleri.**

*TGF-β* ailesinin diğer üyeleri gibi BMP'ler de tip I ve tip II reseptörler olarak bilinen iki tip serin-treonin kinaz reseptörüne bağlanır (Heldinve ark., 1997, Derynck ve ark.,2003) (Şekil 2.3). Her iki reseptör de benzer bir yapıya sahiptir ve kısa bir hücre dışı alan, tek bir transmembran alanı ve serin-treonin kinaz aktivitesine sahip bir hücre içi alandan oluşur. BMP'lerin tip I reseptörlere uygunluğu, tip II reseptörlere göre daha yüksektir ve uygunluğu, bir heterotetramerik reseptör kompleksinin oluşmasıyla artmaktadır (Rosenzweig., 1995). Tip II reseptör kinaz, ligand yokluğunda yapısal olarak aktiftir. *BMP* tip II reseptörü (*BMPR2*), serin ve treonin kalıntıları açısından zengin, uzun bir C-terminal kuyruğuna sahiptir (Rosenzweig., 1995). *BMPR2*'nin yanı sıra *BMP*'ler, çeşitli dokularda eksprese edilen aktivin tip II reseptörleri *ACVR2A* ve *ACVR2B* (Moustakas ve ark., 2009) aracılığıyla da sinyal verebilmektedir.

*BMPR2*, *BMP*'ler için özellikli bir reseptör olmasına rağmen, *ACVR2A* ve *ACVR2B* ayrıca aktivinler, miyostatin ve nodal tarafından da kullanılabilir. Yapısal

benzerliğe bağlı olarak BMP tip I reseptörleri iki alt gruba ayrılabilir: aktivin reseptörü benzeri kinaz 3 (*ALK3* veya *BMPr-IA*) ve *ALK6* (*BMPr-IB*) grubu ile *ALK1* ve *ALK2* grubu. *ALK2* ve *ALK3/6* çeşitli hücre tiplerinde geniş çapta eksprese edilirken, *ALK1* esas olarak endotelial hücreler ve diğer birkaç hücre tipiyle sınırlı olan daha seçici bir ekspresyon modeline sahiptir.

*RGM*, *RGMa*, *RGMb* (*DRAGON*) ve *RGMc* aile üyelerinin *BMP* sinyallemesinde rol oynadığı gösterilmiştir (Babitt ve ark., 2006, Samad ve ark., 2005). *DRAGON*, *BMP* yardımcı reseptörü olarak tanımlanan ilk *RGM* ailesi üyesidir (Carmeliet ve ark., 2011).



**Şekil 2.3. BMP tipI ve tipII reseptörlerin iki tip serin-treonin kinaz enzimine bağlanması**

BMP sinyal yolunun şematik genel görünümü. BMP'lerin yüzey reseptörleri ile etkileşimi, spesifik tip II ve tip I reseptörler arasında heteromerik kompleks oluşumuna neden olmaktadır. Bu aktivite, hücre dışı düzenleyiciler ve tip III reseptörler/yardımcı reseptörler tarafından düzenlenir. Tip II reseptörler tarafından aktive edildikten sonra tip I reseptörler, sinyali hücreye yaymak için Smad1/5/8'i (R-Smad'ler) fosforile eder. Smad1/5/8, Smad4 (Co-Smad) ile heteromerik kompleksler oluşturur ve çekirdeğe yer

değiştirir, burada diğer transkripsiyon faktörleriyle etkileşime girerek hedef gen ekspresyonunu düzenler (kanonik Smad sinyal yolu). I-Smad'ler (Smad6/7), R-Smad'lerin reseptör aktivasyonunu inhibe eder. Smad'e bağlı sinyallemenin yanı sıra Smad olmayan yollar da söz konusudur. Aktive edilmiş MAPK'ler, doğrudan fosforilasyon yoluyla veya aşağı akış efektör molekülleri aracılığıyla R-Smad aktivasyonunu düzenleyebilir. Aktive edilmiş *MAPK'ler*, serum yanıt faktörü (*SRF*), üçlü kompleks faktör (*TCF*) ailesi üyeleri, aktivatör protein 1 (*API*) kompleksleri ve aktive edici transkripsiyon faktörü 2 (*ATF2*) gibi bir dizi transkripsiyon faktörünü (TF) fosforile etmek için çekirdeğe yer değiştirebilir. ) böylece hedef gen transkripsiyonunu değiştirir (Carmeliet ve ark., 2011) (Şekil2.3).

## 2.2. Damar Olgunlaşmasında BMP'lerin Rolü

Embriyonik gelişim zamanında damar sisteminin oluşması önemli bir olaydır. Neovaskülarizasyon iki mekanizmayı içerir: birincisi, vaskülogenez gibi adlandırılan damarların de novo oluşumu ve ikincisi, anjiyogenez olarak bilinen, önceden var olan damarların yetişkinlenmesi ve büyümesidir (Carmeliet ve ark.,2011). Anjiyogenez, öncelikle embriyonik gelişim süreç sırasında ortaya çıkan çok önemli bir aşamadır ve yara sağlanması, iltihaplanmanın yanı sıra yetişkinlik döneminde neredeyse kaybolmaktadır. Sağlıklı dokularda kan damarları, yetişkinleşen anjiyogenez, kemik iliğinden türetilen ve/veya damar duvarında yerleşik EPC'lerin farklılaşması ve damar bölünmesi gibi farklı mekanizmaların bir kombinasyonu ile oluşturulur (Carmeliet ve ark.,2011). Anjiyogenez sürecindeki ana oyuncular endotel hücrelerinin (EC'ler) yanı sıra düz kas hücreleri (SMC'ler) ve perisitlerdir. EC çoğalması, göçü anjiyogenez sürecinde kritik öneme sahiptir. Anjiyogenezin olgunlaşması, çok sayıda filopodia'yı genişleterek çevredeki dokuyu istila eden önde gelen göç yapan EC'nin seçimini içerir. *VEGF/VEGFR2* sinyali tek EC'nin hücre fenotipine geçmesini tetikler; bu hücreler böylece komşu EC'lere hücreleri olarak adlandırılanlar haline gelmeleri talimatını veren bir Notch ligandı olan Delta benzeri 4'ü (Dll4) eksprese ederler (Hellström ve ark 2007). Hücrelerin arkasındaki takip eden hücreler çoğalır ve tüpler oluşturur; takip eden hücre proliferasyonu olgunlaşma damarının uzamasını sağlar (Gerhardt ve ark., 2003). Sonuçta EC'lerin çoğalması durur, hareketsiz bir fenotip kazanır ve falanks EC'leri haline gelir.

Son olarak, yeni oluşmuş damar, bazal membranın birikmesi ve perisitlerin/SMC'lerin birikmesiyle stabilize edilir (Conway ve ark., 2001).

BMP sinyallemesinin vasküler gelişimdeki rolü, nakavt hayvan modellerinde yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (Goumans ve ark., 2000). Tablo 2.1 , ligandlar, reseptörler ve Smad'ler dahil olmak üzere BMP sinyalleme bileşenleri için fare nakavt modellerinin genel bir listesini gösterir. BMP sinyalinin farklı bileşenlerinin genetik olarak susturulması veya yanlış ekspresyonu, kardiyovasküler malformasyonlar ve vasküler yeniden yapılanmadaki hatalar nedeniyle embriyonik ölüme neden olur. Ayrıca, hem EC'lerde hem de SMC'lerde uygun *BMP* sinyallemesinin uygun vaskülojenez ve anjiyogenez için önemli olduğu gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, farelerde BMP hedef genleri *Id1* ve *Id3*'ün silinmesi, hem beyinde hem de tümör ksenograftlarında anjiyogenezin bozulmasına yol açar. (Lyden ve ark., 1999)

*BMP-2*, *-4*, *-6* ve *-7'nin* anjiyogenezi, EC proliferasyonunu ve migrasyonu tetiklediği kanıtlanmıştır (David ve ark., 2009, Pardali ve ark., 2012). BMP'lerin veya *Id1*'in aşırı ekspresyonu nedeniyle *BMP* sinyal yolunun aktivasyonu üzerine tüp oluşumu artar (Valdimarsdottir ve ark.,2002, Deckers ve ark., 2002). Her ne kadar (yüksek doz) *BMP-9*, EC'ler üzerinde önleyici etkilere sahip gibi görünse de, başka bir rapor, (düşük doz) *BMP-9*'un, çeşitli EC türlerinin in vitro çoğalmasını tetiklediğini ve insan pankreas kanseri ksenograftlarında in vivo olarak anjiyogenezi desteklediğini gösterdi(Suzuki ve ark., 2010). *BMP-9*'un hücre bağlam ve *BMP-9* konsantrasyonuna bağlı olarak EC'ler üzerinde farklı etkileri olması muhtemeldir. BMP'lerin EC'ler üzerindeki etkileri, çeşitli *BMP* antagonistleri ve modülatörleri tarafından da düzenlenebilir. Örneğin *BMPER*, EC'ler tarafından eksprese edilen, *BMP-4* aktivitesini konsantrasyona bağlı bir tarzda etkilediği ve vasküler EC'lerde proanjiyojenik etkiler gösterdiği gösterilen hücre dışı bir matriks proteindir (Heinke ve ark., 2008).

**Tablo 2.1 Yanlış Düzenlenen BMP Sinyallerinin Neden Olduğu Vasküler**

**Anomaliler.**

| Gen         | Hayvan modeli                                   | İnsan hastalığı | Kaynaklar              |
|-------------|---|-----------------|------------------------|
| <i>BMP2</i> | Kardiak oluşumla birlikte Embriyon dönemde ölüm | Bilinmeyen      | Anderson ve ark., 2010 |

|              |   |            |  |
|--------------|---|------------|--|
|              |   |            | Beppu ve ark.,2004   |
| <i>BMP4</i>  | Het: az sert hipoksik p lmoner hipertansiyon, hasarlanmış vasküler yeniden düzenleme  | Bilinmeyen | Frank ve ark., 2004  |
| <i>BMP2</i>  | P lmoner hipertansiyon  | PAH        | West ve ark., 2005<br>Hong ve ark., 2008                               |
| <i>ALK1</i>  | KO: Embriyon zamanı ölüm<br>Heterozigot: HHT tip 2 modelleri; EC koşullu KO: HHT'nin tüm patolojik özelliklerini taklit eden ciddi vasküler malformasyonlar | HHT        | Song ve ark., 2005<br>Oh, S.P ve ark., 2000                            |
| <i>ALK3</i>  | Vasküler ve perikardial kanama sebebinden embriyonda letal sonuç, hasarlanmış vasküler yeniden düzenleme  | Bilinmeyen | El-Bizri ve ark., 2008<br>El-Bizri ve ark., 2008<br>Park ve ark., 2006 |
| Endoglin     | KO: Embriyonda yetişkin damar yapılanmasındaki hatalar nedeniyle  | HHT        | Arthur ve ark., 2000<br>Mahmoud ve ark., 2010                          |
| <i>Smad1</i> | KO: Embriyonda Allantois oluşumunda olan hatalar nedeniyle  | Bilinmeyen | Lechleider ve ark., 2001   |
| <i>Smad4</i> | KO: Embriyonda letal sonuç  | HHT        | Gallione ve ark., 2010,<br>Gallione ve ark., 2006<br>Lan ve ark., 2007 |

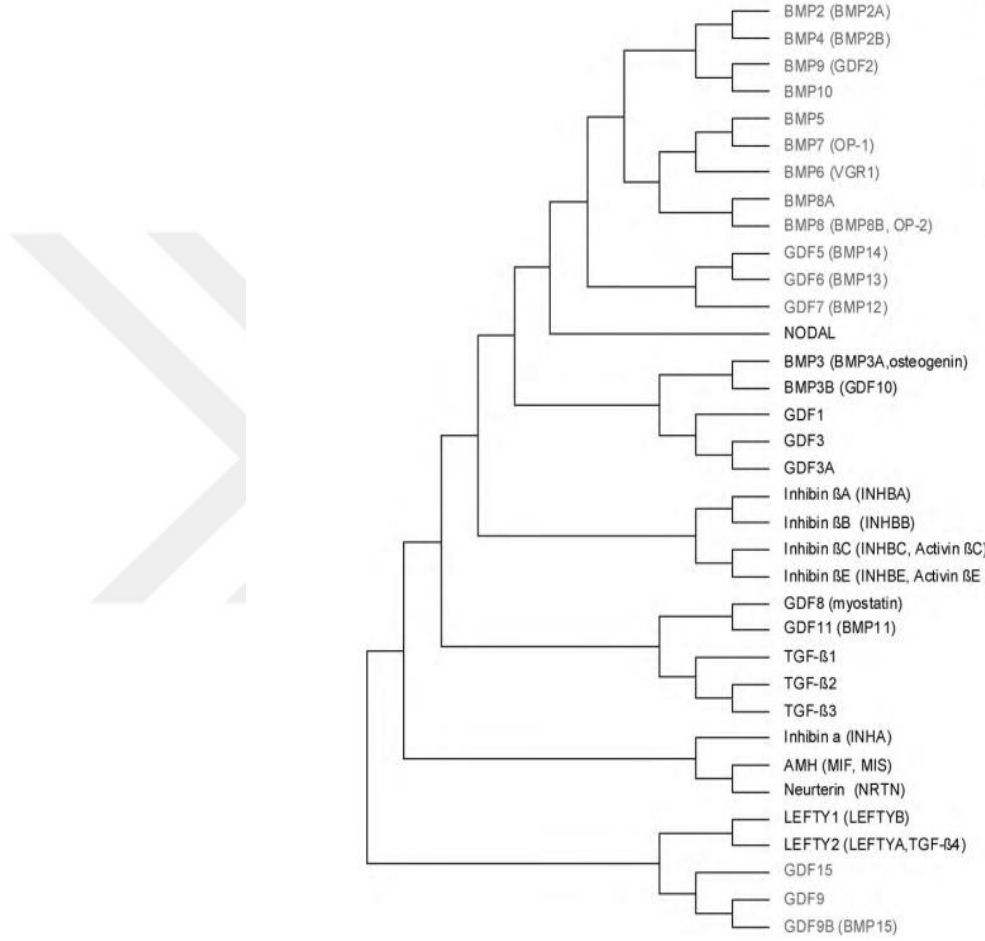
|              |  |            |   |
|--------------|--|------------|---|
| <i>Smad5</i> | KO: Angiyogenez Hataları   | Bilinmeyen | Yang ve ark., 1999<br>Chang ve ark., 1999 |
| <i>Smad6</i> | KO: Kardiyovasküler bozukluklar, vasküler kireçlenme                       | CVM        | Tan ve ark., 2012<br>Galvin ve ark., 2000 |
| <i>Smad7</i> | KO: Embriyonda letal sonuç   | Bilinmeyen | Chen ve ark., 2009                        |
| <i>Smad8</i> | <i>Smad8</i> mutasyonlu fare: Bozuk pülmoner vasküler yeniden düzenlenmesi | PAH        | Huang ve ark., 2009                       |

### 2.3. BMP Ligand Ailesi

BMP'ler ilk olarak kemik matrisinden elde edilen ekstraktlarda tanımlanan, sıçanlarda deri altına implante edildiğinde ektopik kemik oluşumunu tetikleyebilen TGF- $\beta$  süper ailesi ligandlarıdır. Embriyonik damar sistemi de dahil olmak üzere neredeyse tüm omurgalı organlarının gelişiminde BMP'lerin önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Kishigami ve ark., 2005, Zhao ve ark 2003). BMP ligandları (aynı zamanda bazıları büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF'ler) olarak da bilinir) ilkel organizmalardaki korunmuş moleküllere olan dizi benzerliğine dayalı olarak dallar halinde TGF- $\beta$  süper ailesi içinde organize edilebilir. *Drosophila* BMP ortologlarına dizi benzerliği belirtilmiştir. Alternatif isimler parantez içinde listelenmiştir. Gri renkli ligandlar, BMP-SMAD'leri aktive ettiği gösterilen gerçek BMP'lerdir. Filogenetik analizler MEGA4'te (Tamura ve ark., 2007) komşu birleştirme yöntemi (Saitou ve ark., 1987) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.4).

MP ligandlarının salgılanması farklı düzeylerde düzenlenir. Uzun menzilli, dokuya özgü düzenleyici elementler tarafından düzenlenen transkripsiyonlar *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* ve *Gdf6* mRNA'dır (Pregizer ve ark., 2009). Dokuya özgü bir şekilde düzenlenen BMP'lerin salgılanması aynı zamanda (Goldman ve ark., 2006) prodomainlerin (Cui ve ark., 1998, Constam ve ark., 1999) doğru hücre içi bölünmesine de bağlıdır. BMP7 ve BMP9, bölünmüş prodomainleri ile stabil kompleksler olarak

salgılanır(Gregory ve ark., 2008). Ancak TGF-b'den farklı olarak çoğu BMP'nin bölünmüş prodomaini, olgun ligand salgılandıkça ayrılıyor. Bu düzenleyici mekanizmaların, gerektiği ve mümkün olduğunda olgun protein ekspresyonunun değerlendirilmesi ihtiyacını güçlendirir, BMP ligandlarının sağlam damar sistemindeki rolünün incelenmesine yönelik etkileri vardır.



**Şekil 2.4. TCF-B süper ailesi ligandlarının tam uzunluktaki insan protein dizilerine dayalı filogenetik karşılaştırması**

#### **2.4. BMP Ligandlarının Hücre Dışı Düzenlenmesi**

Bir çok BMP antagonisti ve diğer reseptöre bağlanmayan proteinler, bu ligandların uzun süreli etkilerini düzenler (Brown ve ark., 2005). BMP antagonistleri Noggin, Twisted gastrulasyon (TSG), Follistatin ve Chordin ve DAN protein ailesi üyeleri arasında yer alıyor. Ek olarak heparan sülfat proteoglikanlar ve tip IV kollajen, fibrillin ve matris Gla-proteini de dahil olmak üzere bağlam ve konsantrasyona bağlı bir şekilde

spesifik BMP ligand aktivitesi hücre dışı matris bileşenleri, ile etkileşime girer ve bunları değiştirir. Kapsamlı bir şekilde Bu faktörlerin BMP sinyalinin düzenlediği mekanizmalar, embriyonik gelişim sırasında araştırılmıştır; burada BMP gradyanlarının sıkı kontrolü, gelişimsel kalıplanmanın kontrolünde kritik bir rol oynar. Ligandları reseptörlerinden uzaklaştırarak bu proteinler, hücre dışı alanda serbest hareketi azaltarak veya ligandların endositik alımını ve bozunmasını teşvik ederek BMP aktivitesini azaltıyor. Değişen benzerlikle ligandlar bu inhibitörlere bağlanır. *BMP9* ve *BMP10* aktivitesini hiçbir şekilde inhibe etmez ancak örneğin *Noggin*, *BMP2*, *BMP4*, *BMP7* ve *GDF5*'e yüksek benzerlikle bağlanır (Umulis ve ark., 2009, Seemann ve ark., 2009). Chordin, diğer BMP ailesi üyeleriyle etkileşime girmez ancak *BMP2*, *BMP4* ve *BMP7*'ye bağlanır (Zimmerman ve ark., 1996).

## 2.5. BMP Reseptörleri

Sinyal iletimi, reseptörlere kombinasyonlarını içeren heterotetramerik komplekslerinin bağlanarak ve tip 1 (Aktivin reseptörü benzeri kinazlar (*ALK*) 1/2/3 ve 6) ve tip 2 *BMP* reseptörlerinin (*BMPR2*, *ACVR2A* ve *ACVR2B*) oluşmasıyla başlatılır (Piccolo ve ark., 82). *BMP* tip 1 reseptörleri dizi benzerliklerine göre iki gruba ayrılır: *ALK3/6* ve *ALK1/2*. Bunlar farklı ligand bağlama yeteneklerine sahiptir (Tablo 2.2), ancak *TGF-β* süper ailesinin farklı üyelerine bağlanmada rastgelelik gösterirler (Miyazono ve ark., 2010).

**Tablo 2.2 BMP Ligandları İçin Gösterilen Tip I ve Tip II Reseptör Etkileşimleri**

|       | Reseptör             | Ligand             | Kaynaklar                       |
|-------|----------------------|--------------------|---------------------------------|
| Tip I | <i>ALK1 (ACVRL1)</i> | <i>BMP9</i> (GDF2) | (David, Mallet ve ark., 2007)   |
|       |                      | <i>BMP10</i>       | (Mitchell, Pobre ve ark., 2010) |
|       | <i>ALK2 (ACVR1)</i>  | <i>BMP6</i> (VGR1) | (Ebisawa, Tada ve ark., 1999)   |

|  |                      |                     |   |
|--|----------------------|---------------------|---|
|  |                      | <i>BMP7 (OP-1)</i>  | (Ten Dijke, Yamashita ve ark., 1994)        |
|  |                      | <i>BMP9 (GDF2)</i>  | (Scharpfenecker, van Dinther ve ark., 2007) |
|  | <i>ALK3 (BMPRIA)</i> | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Yamashita, ten Dijke ve ark., 1995)        |
|  |                      | <i>BMP4 (BMP2B)</i> | (Beck, Drahushuk ve ark., 2001)             |
|  |                      | <i>BMP5</i>         | (Beck, Drahushuk ve ark., 2001)             |
|  |                      | <i>BMP6 (VGR1)</i>  | (Zimmerman, De Jesus-Escobar ve ark., 1996) |
|  |                      | <i>BMP10</i>        | (Mazerbourg and Hsueh 2006)                 |
|  |                      | <i>GDF5 (BMP14)</i> | (Erlacher, McCartney ve ark., 1998)         |
|  |                      | <i>GDF6 (BMP13)</i> | (Erlacher, McCartney ve ark., 1998)         |
|  |                      | <i>GDF9</i>         | (Vitt, Mazerbourg ve ark., 2002)            |
|  | <i>ALK6 (BMPR1B)</i> | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Allendorph, Vale ve ark., 2006)            |
|  |                      | <i>BMP4 (BMP2B)</i> | (Ten Dijke, Yamashita ve ark., 1994)        |
|  |                      | <i>BMP6 (VGR1)</i>  | (Ebisawa, Tada ve ark., 1999)               |

|        |               |                      |                                      |
|--------|---------------|----------------------|--------------------------------------|
|        |               | <i>BMP7 (OP-1)</i>   | (Ten Dijke, Yamashita ve ark., 1994) |
|        |               | <i>BMP10</i>         | (Mazerbourg and Hsueh 2006)          |
|        |               | <i>GDF5 (BMP14)</i>  | (Erlacher, Mccartney ve ark., 1998)  |
|        |               | <i>GDF6 (BMP13)</i>  | (Erlacher, Mccartney ve ark., 1998)  |
|        |               | <i>GDF9</i>          | (Vitt, Mazerbourg ve ark., 2002)     |
|        |               | <i>GDF9B (BMP15)</i> | (Nishitoh, Ichijo ve ark., 1996)     |
| Tip II | <i>BMPR2</i>  | <i>BMP2 (BMP2A)</i>  | (Moore, Otsuka ve ark., 2003)        |
|        |               | <i>BMP4 (BMP2B)</i>  | (Schneyer 2007)                      |
|        |               | <i>BMP6 (VGR1)</i>   | (Schneyer 2007)                      |
|        |               | <i>BMP9 (GDF2)</i>   | (Ebisawa, Tada ve ark., 1999)        |
|        |               | <i>BMP10</i>         | (Mazerbourg and Hsueh 2006)          |
|        |               | <i>GDF5 (BMP14)</i>  | (Erlacher, Mccartney ve ark., 1998)  |
|        |               | <i>GDF6 (BMP13)</i>  | (Vitt, Mazerbourg ve ark., 2002)     |
|        |               | <i>GDF9</i>          | (Moore, Otsuka ve ark., 2003)        |
|        | <i>ACVR2A</i> | <i>BMP2 (BMP2A)</i>  | (Schneyer 2007)                      |
|        |               | <i>BMP4 (BMP2B)</i>  | (Schneyer 2007)                      |
|        |               | <i>BMP6 (VGR1)</i>   | (Ebisawa, Tada ve ark., 1999)        |

|  |               |                     |   |
|--|---------------|---------------------|---|
|  |               | <i>BMP7 (OP-1)</i>  | (Macías-Silva, Hoodless ve ark., 1998)      |
|  |               | <i>BMP9 (GDF2)</i>  | (Scharpfenecker, van Dinther ve ark., 2007) |
|  |               | <i>GDF9</i>         | (Vitt, Mazerbourg ve ark., 2002)            |
|  | <i>ACVR2B</i> | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Kirsch, Nickel ve ark., 2000)              |
|  |               | <i>BMP4 (BMP2B)</i> | (Macías-Silva, Hoodless ve ark., 1998)      |
|  |               | <i>BMP6 (VGR1)</i>  | (Ebisawa, Tada ve ark., 1999)               |
|  |               | <i>BMP9 (GDF2)</i>  | (Scharpfenecker, van Dinther ve ark., 2007) |

Ayrıca, aşırı ekspresyon çalışmaları, BMP ligandlarının, daha yüksek reseptör bağlanma afinitelerini teşvik eden ve/veya *BMP* reseptörlerinin daha karmaşık düzeneklerini toplayan ikili ligand-reseptör bağlanma bölgeleri sunan heterodimerler olarak salgılanabileceğini göstermektedir (Moustakas ve ark., 2009). Henüz *BMP'lerin* aslında fizyolojik koşullar altında heteromerik ligandlar olarak salgılanıp salgılanmadığı belirlenmemiştir. *BMP'lerin* tip 1 ve tip 2 reseptörleri için farklı afiniteleri vardır. BMP2 ve 4, *ALK3* ve 6'ya bağlanır ancak bu tip 1 reseptörlere bağlandıktan sonra yalnızca tip 2 reseptörleri, *BMPR2*, *ACVR2A* ve/veya *ACVR2B*'yi toplar. Bundan farklı olarak, *BMP* 5-8 ligand grubu, *BMP5*, *BMP6*, *BMP7* ve *BMP8A/B*, *ACVR2A* ve *ACVR2B*'ye yüksek benzerlikle bağlanır ve ardından tip 1 reseptörleri aktif sinyal komplekslerine dahil eder. *GDF9* gibi bazı *BMP'ler* *BMPR2* ile etkileşime girer ancak aynı zamanda *TGF-β* reseptörü *ALK5*'i aktif sinyal komplekslerine dahil eder (Chan ve ark., 2007, Schwappacher ve ark., 2009). Ayrıca *TGF-β*, *ALK1*, *ALK2* ve *ALK3*'ü tip 1 *TGF-β*

reseptörü ALK5 ile heteromerik komplekslere dahil edebilir (Lee-Hoeflich ve ark., 2004, Nickel ve ark., 2009). Ayrıca TGF- $\beta$ , ALK1, ALK2 ve ALK3'ü tip 1 TGF- $\beta$  reseptörü ALK5 ile heteromerik komplekslere dahil edebilir (Sampath ve ark., 1990). ACVR2A ve ACVR2B, TGF-b/Aktivin tip 1 reseptörlerini sinyal komplekslerine dahil eden Aktivinler, GDF8 ve GDF11 ile etkileşime girer. Bu, aynı zamanda BMP ligandları ile etkileşime giren tip 2 reseptörlerini tecrit ederek BMP yanıtlarını inhibe eder. BMP3 ve Inhibin ayrıca tip 2 reseptörlerini tecrit ederek BMP sinyalini de inhibe eder (Gamer ve ark.,2007, Wiater.,2003).

## 2.6. BMP Ko-reseptörleri

BMP ligand-reseptör etkileşimlerini değiştirerek BMP sinyalini değiştiren bir dizi membranla ilişkili yardımcı reseptör tanımlanmıştır (Tablo 2.3). Bunlardan Betaglycan/*TGFbR3* and Endoglin/*CD105* vaskular oluşumda ve hastalıklarda önemli rolü vardır (Little and Mullins 2009). Her ikisinde kinaz aktivitesinin eksik olduğu büyük ekstrasvasküler domeynler ve kısa sitoplazmatik kuyruk var. Endoglin ve Betaglikan proteolitik bölünmeye maruz kalır, çözünebilir hücre dışı alan hücre dışı boşluğa gider ve membranla ilişkili yardımcı reseptörlerin etkilerini antagonize etmek özelliğine sahiptir (Vitt, Mazerbourg ve ark., 2002, Mazerbourg, Klein ve ark., 2004). Betaglikan her yerde eksprese edilebilir özelliğe sahiptir ve temel hücre yüzeyi TGF- $\beta$  bağlayıcı proteindir, fakat aynı zamanda *BMP2*, *BMP4*, *BMP7*, *GDF5* (Daly, Randall ve ark., 2008) ve Inhibin (Goumans, Valdimarsdottir ve ark., 2003) ile doğrudan etkileşime giriyor. Betaglikan'ın i klasik mekanizma ile BMP sinyalini güçlendirdiği, *BMP* ligandının *ALK3* ve *ALK6*'ya bağlanmasını arttırmaktır (Goumans, Valdimarsdottir ve ark., 2002).

Bununla birlikte Betaglikan aynı zamanda etkileşimli reseptörlerin trafiğini ve hücre lokalizasyonunu düzenleme yeteneği sayesinde *BMP* sinyalini de arttırır (Lee, Kirkbride ve ark., 2009). Ek olarak Betaglikan'ın, *BMPR2* ve ACVR2'yi inhibin içeren inaktif komplekslere ayırarak *BMP2* ve *BMP7* sinyalini inhibe ettiği kanıtlanmıştır . Endoglin ayrıca, Aktivin A, *BMP2*, *BMP7* ve *BMP9* dahil olmak üzere diğer TGF-b ailesi ligandlarının aracılık ettiği sinyallemeyle etkileşime giren ve bunları değiştiren bir TGF-b etkileşimli yardımcı reseptördür. Her yerde ekspresyon olunan Betaglikan'ın aksine, Endoglin baskın olarak EC'lerde ekspresyon edilir. Ek olarak, *BMP9* hariç , Endoglin-ligand etkileşimlerinin çoğu, doğrudan bağlanabildiği (Scharpfenecker, van

Dinther ve ark., 2007) ilgili ligand bağlayıcı *TGF-β* süper ailesi reseptörlerinin varlığına bağlıdır (Barbara, Wrana ve ark., 1999). Endoglin, *BMP7* ve *BMP9'a* bağımlı SMAD1/5 yanıtlarını artırır (David, Mallet ve ark., 2007), ancak bunun gerçekleştiği mekanizma hakkında detaylı bir veriye ulaşılammıştır. Endoglin, tip 1/tip 2 reseptör komplekslerini geliştirmez (Barbara, Wrana ve ark., 1999) ve gerekli değildir (Schnerer, Meurer ve ark., 2007). Ancak ALK5, Endoglin'in sitoplazmik kuyruğunu fosforile eder ve bu, Endoglin'in EC'lerde hem *TGF-β* hem de *BMP9'a* bağımlı ALK1 sinyallemesini aktive etmesi için önemli rolü vardır (Ray, Lee ve ark., 2010). Bu, Endoglin'in sitoplazmik kuyruğunun *ALK1* sinyalinin aktive edilmesinde rol oynadığını göstermektedir.

**Tablo 2.3. BMP Sinyalinin Ortak Reseptörleri.**

| Ko-reseptörler             | Partnerler          | Kaynaklar                           |
|----------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| Endoglin (CD105)           | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Barbara, Wrana ve ark., 1999)      |
|                            | <i>BMP7 (OP-1)</i>  | (Barbara, Wrana ve ark., 1999)      |
|                            | <i>BMP9 (GDF2)</i>  | (Barbara, Wrana ve ark., 1999)      |
| <i>TGFβR3</i> (Betaglycan) | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Kirkbride, Townsend ve ark., 2008) |
|                            | <i>BMP4 (BMP2B)</i> | (Kirkbride, Townsend ve ark., 2008) |
|                            | <i>BMP7 (OP-1)</i>  | (Kirkbride, Townsend ve ark., 2008) |
|                            | <i>GDF5 (BMP14)</i> | (Kirkbride, Townsend ve ark., 2008) |
| <i>RGMa</i>                | <i>BMP2 (BMP2A)</i> | (Babitt, Zhang ve ark., 2005)       |
|                            | <i>BMP4 (BMP2B)</i> | (Babitt, Zhang ve ark., 2005)       |
|                            | <i>GDF7 (BMP12)</i> | (Halbrooks, Ding ve ark., 2007)     |

|                           |                       |                                     |
|---------------------------|-----------------------|-------------------------------------|
| <i>RGMb (DRAGON)</i>      | <i>BMP2 (BMP2A)</i>   | (Samad, Rebbapragada ve ark., 2005) |
|                           | <i>BMP4 (BMP2B)</i>   | (Samad, Rebbapragada ve ark., 2005) |
|                           | <i>GDF7 (BMP12)</i>   | (Halbrooks, Ding ve ark., 2007)     |
| <i>RGMc (Hemojuvelin)</i> | <i>BMP2 (BMP2A)</i>   | (Halbrooks, Ding ve ark., 2007)     |
|                           | <i>BMP4 (BMP2B)</i>   | (Xia, Babitt ve ark., 2008)         |
|                           | <i>BMP6 (VGRI)</i>    | (Xia, Babitt ve ark., 2008)         |
|                           | <i>GDF7 (BMP12)</i>   | (Halbrooks, Ding ve ark., 2007)     |
| Bambi (Nma)               | <i>ALK1 (ACVRL1)</i>  | (Onichtchouk, Chen ve ark., 1999)   |
|                           | <i>ALK3 (BMPRIA)</i>  | (Onichtchouk, Chen ve ark., 1999)   |
|                           | <i>ALK6 (BMPRI1B)</i> | (Onichtchouk, Chen ve ark., 1999)   |
|                           | <i>ACVR2A</i>         | (Onichtchouk, Chen ve ark., 1999)   |
| <i>TRKC</i>               | <i>BMPRI2</i>         | (Jin, Yun ve ark., 2007)            |
| <i>ROR2</i>               | <i>ALK6 (BMPRI1B)</i> | (Sammar, Sieber ve ark., 2009)      |

## 2.7. BMP2 ve BMP4

BMP2 ve BMP4'ün ekspresyonu, sistemik vasküler yaralanma bölgelerinde ve aterosklerotik plaklarda EC'lerde gerektiğinden fazla regülasyon olunuyor (López-Casillas, Payne ve ark., 1994, Piek, Afrakhte ve ark., 1999, Kirkbride, Ray ve ark., 2005). Ayrıca, sistemik hipertansiyona sahip iki farklı sıçan modelinde damar duvarlarında da BMP2 ekspresyonu fazla regülasyon olunmuştur (Venkatesha, Toporsian ve ark., 2006). İn vivo vaskülatör sistemde BMP2 ligandının ekspresyonunun genetik manipülasyonunun

rölüne bağlı bir veri yoktur. Bununla birlikte, bir adenoviral dağıtım sistemi kullanılarak indüklenen *BMP2'nin* aşırı ekspresyonu, sıçanlarda neointimal proliferasyonu azaltır ve sonra karotis arter balon yaralanmasına neden olur (Kirkbride, Townsend ve ark., 2008). Bunun tam tersi olarak, farelerde *BMP4'ün* sürekli deri altı infüzyonu sistemik hipertansiyona yol neden olur ve aort halkası preparasyonlarında bozulmuş EC'ye bağlı damar genişliğine sebep olmaktadır (Lewis, Gray ve ark., 2000).

Son etkiler, EC'lerdeki reaktif oksijen türlerinin (*ROS*) *BMP4* ile indüksiyonuna bağlıdır ve eksojen *BMP2'nin*, *ROS'u* tetiklediği ve fare karotid arter halkalarında EC'ye bağlı vazodilatasyonu inhibe ettiği gözlemiyle tutarlıdır (Csiszar, Ahmad ve ark., 2006). Üstelik hem *BMP2* hem de *BMP4*, *ROS'a* bağımlı bir şekilde dolaşımdaki inflamatuvar hücrelere EC bağımlılığını artırır (Sorescu, Song ve ark., 2004, Csiszar, Labinsky ve ark., 2008). Bu bulgular, BMP'lerin sadece vasküler hücre çoğalmasını ve/veya farklılaşmasını değil, aynı zamanda vasküler reaktiviteyi ve inflamatuvar yanıtları da etkilediğini kanıtlamaktadır. Bu etkiler vasküler şebekeye bağlı olabilir, çünkü *BMP4'ün* karotis ve koronerde EC'ye bağlı vazodilatasyonu inhibe ettiği ancak pulmoner arter preparasyonlarında bu etkiyi göstermediği kanıtlanmıştır (Csiszar, Labinsky ve ark., 2008). Pulmoner *BMP2* ve *BMP4* ekspresyonu aynı zamanda kronik hipoksinin yol açtığı pulmoner hipertansiyon (PH) modelinde de çok fazla düzenlenmektedir (Frank, Abtahi ve ark., 2005). Bu model, artan periferik pulmoner vasküler yeniden yapılanma ile ilişkili pulmoner vasküler dirençteki sürekli artışlarla karakterizedir (Meyrick and Reid 1983). *BMP4* ekspresyonu pulmoner damar sistemi ile yakından ilişkilidir ancak büyük ölçüde alveoler ve bronşiyal epitel ile sınırlıdır (Frank, Abtahi ve ark., 2005).

Bunun tam tersi *BMP2*, hipoksiye maruz kalmanın ardından pulmoner damar sisteminin periferik direnç damarlarında büyük ölçüde eksprese edilir (Anderson, Lowery ve ark., 2010). İn vitro çalışmalar *BMP'lerin* pulmoner vasküler hücreler üzerindeki etkileri hakkında çelişkili raporlar göstermektedir. Buna örnek olarak, *BMP4*, proksimal pulmoner arter *VSMC'lerinde* proliferasyonu inhibe eder ve apoptozu tetikler (Takeda, Otsuka ve ark., 2004, Lagna, Nguyen ve ark., 2006), ancak daha periferik damarlardan türetilen *VSMC'lerde* proliferasyonu artırır ve apoptozu inhibe eder (Yang, Long ve ark., 2005). Ayrıca *BMP4*, erken geçişli fare proksimal pulmoner *VSMC'lerinde* proliferasyonu teşvik eder ancak geç geçişli *VSMC'ler* üzerinde ters etki özelliğine sahiptir (Frank, Abtahi ve ark., 2005). Bu in vitro yanıtların karmaşıklığı ve heterojenliği göz önünde

bulundurduktaki, bu ligandların sağlam damar sistemindeki fonksiyonel rolünü değerlendirmek için genetik metodlar kullanılmıştır. Ek olarak, Bmp4 eksikliği olan farelerde pulmoner VSMC proliferasyonu ve periferik damar yeniden şekillenmesi azalırken, hipoksik Bmp2 eksikliği olan farelerde VSMC proliferasyonunda veya periferik damar yeniden şekillenmesinde herhangi bir değişiklik gözükmemiştir.

Bu, hipoksinin neden olduğu *BMP4* ekspresyonunun pulmoner *VSMC* proliferasyonu ve yeniden şekillenmesi üzerinde farklı etkileri olduğunu, ancak *BMP2'nin* bunu yapmadığını göstermektedir. Ayrıca hipoksik Bmp2, Bmp4 eksikliği olan farelerde pulmoner *eNOS* ekspresyonunu ve aktivitesini azaltmıştır (fosfo-S239 VASP ekspresyonu (Anderson, Lowery ve ark., 2010)), bu da hipoksinin indüklediği *BMP2'nin EC* nitrik oksit üretimini artırarak pulmoner vasküler direnci azaltabileceğini düşündürmektedir.

## **2.8. Dolaşımda Olan *BMP* Ligandları**

*BMP* ligandlarının lokal doku üretimine ek olarak, sirkulasyonda biyolojik olarak aktif *BMP4*, *BMP6* ve *BMP9'un* yüksek (nanogram/ml) konsantrasyonları bulunmuştur (David, Mallet ve ark., 2008, Herrera and Inman 2009). Bu ligandların sistemik ve pulmoner vasküler yatalara direk erişimi olması normal vasküler homeostazın korunmasında önemli bir faktör olduğu düşündürmektedir. Kültürlenmiş *EC*'lerde proanjyogenik etkilere sahip olan *BMP4* ve *BMP6'nın* farklı olarak (Ren, Charles ve ark., 2007, Heinke, Wehofsits ve ark., 2008), ekzojen *BMP9*, dolaşımda bulunan konsantrasyonlarda anjiyojenik yanıtların güçlü bir inhibitörüdür (Scharpfenecker, van Dinther ve ark., 2007, David, Mallet ve ark., 2008). Bu nedenle *BMP9*, dolaşımdaki vasküler hareketsizlik faktörü olarak önemli bir rol oynayabilir. İlginç bir şekilde, *BMP4'ten* farklı olarak *BMP9*, Noggin tarafından inhibe edilmez (Seemann, Brehm ve ark., 2009) ve dolaşımdaki *BMP9'un* (veya diğer *BMP* ligandlarının) in vivo fonksiyonel rolü bilinmemektedir.

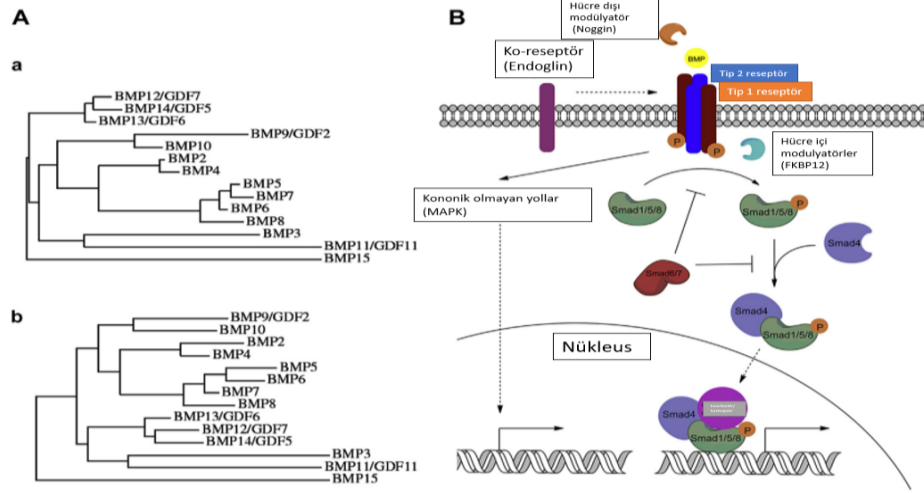
Bir çok çalışmalar sonrasında, vasküler yaralanma ve hastalıkla ilişkili *BMP* sinyalinin hücre dışı modülatörlerinin ekspresyonunda farklılıklar olduğunu göstermiştir. Bu *BMP* düzenleyicilerinin vasküler hücre çalışmasını in vitro olarak değiştirdiği gösterilmiştir, ancak bunların vasküler yapıyı ve/veya in vivo fonksiyonu

düzenlemedeki rolleri hakkında tam belirli bir veri yoktur ve elde olan bilgiler de sınırlıdır. *BMP* antagonisti Gremlin, aortik *VSMC* proliferasyonunu ve migrasyonunu tetikler (Maciel, Melo ve ark., 2008) ve üremili hastaların (yaygın vasküler kalsifikasyonla ilişkili olan) sistemik damar sisteminde, karotis arter yaralanma modelinde ve alveolar hipokside (ph gelişimiyle ilişkili) sistemik damar sisteminde gerektiğinde daha fazla aktive olur (Maciel, Melo ve ark., 2008, Jara, Chacón ve ark., 2009) Ancak Gremlin gibi *BMP* antagonistlerinin oluşturduğu etkileri, *BMP* sinyal yolunun diğer bileşenleri ile birlikte yorumlanmalıdır. Vasküler alandaki gremlin ekspresyonu, sıçan vasküler kalsifikasyon modelinde fazla aktive olunuyor, ancak bu aynı zamanda artan *BMP2* ekspresyonu ile de ilişkilidir (Jara, Chacón ve ark., 2009). Benzer şekilde *BMP4*, sistemik damar sistemindeki *BMP* antagonistleri Noggin, Follistatin ve matriks Gla-proteini ile beraber eksprese edilir (Chang, Weiss ve ark., 2007). Bu çalışmalar, vasküler hastalıklarda *BMP* sinyal yolundaki gen/protein regülasyonunu ve fonksiyonunu değerlendirmek için entegre yaklaşımlar geliştirmenin önemini bir daha göstermektedir. *BMPER/CV2* ayrıca damar gelişimini de düzenler. Zebra balığında *BMPER/CV2'nin* devre dışı bırakılarak susturulması vasküler desenlemede hatayla sonuçlanır (Moser, Yu ve ark., 2007). Memeli hücrelerinde *BMPER/CV2*, EC'lerde eksprese edilir ve *BMP4*'e bağımlı anjiyojenik yanıtları modüle eder (Heinke, Wehofsits ve ark., 2008). Düşük seviyeli *BMPER/CV2* ekspresyonu in vitro EC büyümesini ve göçünü desteklerken, yüksek seviyeli *BMPER/CV2* bu yanıtları baskılar (Heinke, Wehofsits ve ark., 2008). Ancak *BMPER/CV2'nin* memeli vasküler homeostazisini in vivo olarak düzenlediği ile ilgili kanıt yoktur, çalışmalar sonrasında elde edilen bilgiler de işlevsel değildir. Matriks Gla-proteini (MGP), *BMP2* ve *BMP4*'ü konsantrasyona bağlı bir şekilde inhibe eden veya aktive eden, *VSMC*'ler tarafından üretilen hücre dışı bir matriks bileşenidir (98,99). MGP eksikliği olan farelerde yaygın damar kalsifikasyonu bulunmuştur (Luo, Ducy ve ark., 1997) ve homozigot germ hattı MGP mutasyonlarını kalıtsal olarak alan Keutel sendromlu hastalarda stenozlar periferik pulmoner damarlarda fark edilmiştir (Hur, Raymond ve ark., 2005). Bu mutasyonların *BMP* sinyalleme üzerindeki etkilerini değiştirmek gibi bir özellikleri yoktur. Bununla birlikte, MGP'nin akciğerde aşırı ekspresyonu (*MGP BAC* transgenik fareleri), azalmış *BMP-SMAD* sinyali ve azalmış pulmoner vasküler yaygınlaşması ile ilişkilidir (Yao, Nowak ve ark., 2007). Bu, MGP'nin vasküler etkilerinin *BMP* sinyallemesinin inhibisyonu yoluyla aracılık edebileceğini göstermektedir.

## 2.9. BMP sinyal yolları

BMP'ler, bir N-terminal sinyal peptidi, katlama ve sentezleme için bir prodomain ve bir C-terminal olgun peptid ile öncü proteinler olarak sentezlenir. (Harrison, Al-Musawi ve ark., 2011). Öncüler, sitoplazmada, N- ve C-terminal fragmanlarını yaratmak üzere pro-protein dönüştürücüler tarafından parçalanan dimerik pro-protein kompleksleri olarak oluşturulur. C-terminali olgun fragmanı, kovalent olmayan şekilde ilişkili prodomain önemli bir düzenleyici rol oynayarak reseptörüne bağlanma özeliğine sahiptir. BMP'ler hem kanonik hem de kanonik olmayan yollardan sinyal verebilir. Kanonik sinyal yolunda, hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanarak ve tip I ve tip II serin/treonin kinaz reseptörlerinin iki dimerinden oluşan bir heterotetramerik kompleks oluşturarak sinyal iletim zincirini başlatırlar (Şekil 2.5)(Heldin, Miyazono ve ark., 1997).

Her iki reseptör tipi de kısa bir hücre dışı alana, tek bir transmembran alana ve serin/treonin kinaz özeliğine sahip bir hücre içi alana sahiptir. *TGF- $\beta$*  ligand ailesi toplam yedi tip I reseptör (*ALK1-7*) içerir; bunlardan üçü BMP'leri bağlar: tip 1A BMP reseptörü (*BMPR-1A* veya *ALK3*), tip 1B BMP reseptörü (*BMPR-1B* veya *ALK3*) *ALK6* ve tip 1A aktivin reseptörü (*ActR-1A* veya *ALK2*).(Horbelt, Denkis ve ark., 2012). *TGF- $\beta$*  ailesi için toplam dört tip II reseptör vardır ve bunlardan üçünün BMP'lerle etkileşime girdiği bilinmektedir: tip 2 BMP reseptörü (*BMPR-2*), tip 2 aktivin reseptörü (*ActR-2A*) ve tip 2B aktivin reseptör (*ActR-2B*). *BMPR-1A*, *BMPR-1B* ve *BMPR-2*, BMP'lere özgü olsa da *ActR-1A*, *ActR-2A* ve *ActR-2B*, aynı zamanda *TGF- $\beta$*  süper ailesinin üyeleri olan aktivinler için reseptör olarak çalışabilir. Heterotetramerik sinyal kompleksi oluşumunun mekanizması değişebilir. Örneğin, *BMP6* ve *BMP7*, tip II reseptörlerle etkileşime girer ve tip I reseptörleri toplarken, *BMP2* ve *BMP4* tercihen tip I reseptörlere bağlanır ve tip II reseptörleri toplar(De Caestecker 2004).



**Şekil 2.5. BMP ailesi ve sinyal yolları**

## 2.10. BMP Sinyallemesinin Biyolojik Sonuçları

Bilinen 15'ten fazla BMP amino asit veya nükleotid benzerliğine dayalı olarak alt gruplara ayrılabilir. Özellikle *BMP2/4*, *BMP5/6/7/8*, *BMP9/BMP10* ve *BMP12/13/14* (GDF5/6/7), filogenetik analize dayalı alt gruplardır (Şekil 1A)(Mueller and Nickel 2012). BMP'lerin amino asit (Şekil 1A, panel a) veya nükleotid (Şekil 1A, panel b) dizileri ile yapılan analiz, benzer kümelenme modelleri verir. *BMP1*, kemik ve kıkırdak gelişimini tetikleyebilmesine rağmen, kollajen olgunlaşmasında prokollajen C-proteinaz olarak işlev gören bir metaloproteazdır ve *TGF-β* süper ailesinin bir parçası değildir(Kessler, Takahara ve ark., 1996). Adı tüm üyelerin kemik tetikleyicileri olduğunu ima etse de, bazı BMP'ler kemik oluşumunun inhibitörleri olarak görev yapabileme özelliğine sahiptir. Örneğin, *BMP3* kemik yoğunluğunun negatif düzenleyicisidir ve *BMP13* kemik oluşumunun güçlü bir inhibitörüdür (Daluisi, Engstrand ve ark., 2001). *BMP2*, 4, 6, 7 ve 9'a yaygın olarak osteojenik BMP'ler denir(Luu, Song ve ark., 2007). Örneğin *BMP2* endokondral kemik oluşumunda çok önemlidir ve hatta vazgeçilmezdir(Shu, Zhang ve ark., 2011).

Birçok organ sistemi, gelişim için önemli olan bir veya daha fazla BMP'ye sahiptir. *BMP4* uzuv gelişimini düzenlemede görev alırken, aynı zamanda *BMP13*'ün de göz gelişiminde modülatör gibi önemli rolü vardır (Selever, Liu ve ark., 2004). Göz gelişimi için önemli olan *BMP7*, böbrekte de hayati önem taşıyor. *BMP8*'in

spermatogenezde kanıtlanmış bir rolü vardır, BMP12 vezikül gelişimi için gereklidir ve BMP15 klasik olarak yumurtalık işleviyle ilişkilidir(Zhao, Liaw ve ark., 1998).

## 2.11. Embriyogenezde BMP Sinyali

BMP'ler embriyogenez zamanı, özellikle mezoderm oluşumu ve kalp gelişimi için çok önemlidir. BMP2 veya BMP4'ün nakavt edilmesi embriyonik ölüme neden olur ve *BMP1*, *BMP7* ve *BMP11* nakavtları doğumdan kısa bir süre sonra ölüme sonuçlanır (Tablo 2.4). BMP2 eksikliği olan farelerde amniyon ve koryon malformasyonu ve kalp kusurlarının olduğu rapor edilmiştir. *BMP4* eksikliği olan farelerde mezoderm farklılaşması yoktur, bu da *BMP4*'ün gastrulasyon kadar erken gelişimsel süreçler için çok önemli olduğunu gösterir. Bu farelerde ayrıca PGC'ler (primordial germ cells) eksikliği vardır(Lawson, Dunn ve ark., 1999). *BMP4* heterozigotları yaşamak özelliğine sahiptirler, ancak çok çeşitli anormallikler bulundurur(Zhao, Liaw ve ark., 1998). BMP1'de delesyonu olan fareler ventral vücut duvarını kapatamamakta ve bunun sonucunda bağırsak fitiği oluşmaktadır(Suzuki, Labosky ve ark., 1996).

*BMPR-1A*, *ActR-1A* ve *BMPR-2*'nin silinmesi embriyonik ölüme neden olur ve *ActR-2B* nakavtları doğumdan kısa bir süre sonra yaşamları biter (Tablo 2.4). Bu farelerde görülen kusurlar, BMP sinyallemesinin eksikliği nedeniyle tablodaki fenotiplerle tutarlıdır. Örneğin, *BMPR-1A* gastrulasyon ve mezoderm oluşumu için önemlidir(Mishina, Suzuki ve ark., 1995). *ActR-1A* bununla birlikte fare embriyosunda gastrulasyon için de önemli rolü vardır; bu reseptörün eksik olduğu farelerde mezoderm oluşumunda hatalar görülür ve PGC yoktur(de Sousa Lopes, Roelen ve ark., 2004). Smad1, Smad5, Smad4 ve Smad7 nakavtlarının tümü embriyonik olarak letaldır, ancak ilginç bir şekilde Smad8 gelişim için hayati önemi vardır ve hatta vazgeçilmezdir (Tablo 2.4)(Arnold, Maretto ve ark., 2006). Smad1, amniyon ve koryonun füzyonunda önemli bir rol oynar ve mutantların ekstraembriyonik yapılarda ve germ hücre oluşumunda kusurları vardır(Tremblay, Dunn ve ark., 2001). Smad5 nakavtları, sol-sağ asimetri ve önemli ölçüde azalmış PGC sayısı dahil olmak üzere birden fazla embriyonik ve ekstra embriyonik hatalar da sergiler(Chang, Huylebroeck ve ark., 1999).

**Tablo 2.4. BMP Sinyalleşmesindeki Ana Oyuncular İçin Nakavt Fenotipleri ve Biyolojik Sonuçları**

| Sinyal molekülleri | Fenotip   | Kaynaklar  |
|--------------------|---|--|
| <i>BMP1</i>        | Doğumdan sonra ölmek, ventral vücut duvarının kapanmaması   | (Suzuki, Labosky ve ark., 1996)  |
| <i>BMP2</i>        | Embriyonik olarak öldürücü, amniyon/kordon ve kalp gelişiminde kusurlar<br>Uzuv: spontan kırıklar ve bozulmuş kırık onarımı<br>Kondrosit: ciddi kondrodizplazi<br>Kalp progenitör: anormal kalp kapakçığı gelişimi<br>Miyokard: miyokard düzenindeki kusurlar   | (Shu, Zhang ve ark., 2011)   |
| <i>BMP3</i>        | Yüksek kemik sıklığı  | (Daluisi, Engstrand ve ark., 2001)   |
| <i>BMP4</i>        | Embriyonik olarak öldürücü, mezoderm oluşumu eksikliği<br>PGC<br>Lens indüksiyonu yok<br>Heterozigotlar: çeşitli organ anormallikleri<br>HSC mikro-ortam<br>Uzuv tomurcuğu mezodermi: kusurlu rakam<br>Adiposit: genişlemiş adipositler ve bozulmuş insülin duyarlılığı<br>Diğer hedeflenen: trakeya kaybı fenotipi<br>Anormal bronşiyal arterleri ve çıkış yolu septasyonu<br>Mandibula gelişimindeki kusurlar<br>Vestibüler aparatındaki kusurlar | (Selever, Liu ve ark., 2004)<br><br>(Winnier, Blessing ve ark., 1995)<br><br>(Lawson, Dunn ve ark., 1999)<br><br>(de Sousa Lopes, Roelen ve ark., 2004)<br><br>(Furuta and Hogan 1998) |

|             |   |   |
|-------------|---|---|
|             |   | <p>(Dunn, Winnier ve ark., 1997)</p> <p>(Goldman, Bailey ve ark., 2009)</p> <p>(Qian, Tang ve ark., 2013)</p> <p>(Li, Gordon ve ark., 2008)</p> <p>(Liu, Selever ve ark., 2004)</p> <p>(Liu, Selever ve ark., 2004)</p> <p>(Chang, Lin ve ark., 2008)</p> |
| <i>BMP5</i> | <p>Kısa kulak fenotipi</p> <p>Daha küçük ve daha zayıf kemikler</p>                             | <p>(Kingsley, Bland ve ark., 1992)</p> <p>(Mikić, Van Der Meulen ve ark., 1995)</p>   |
| <i>BMP6</i> | <p>Sternum kemikleşmesinde gecikme</p> <p>Küçük uzun kemikler</p> <p>Doğurganlığın azalması</p> | <p>(Solloway, Dudley ve ark., 1998)</p>   |

|             |   |  |
|-------------|---|--|
|             |   | (Perry, McDougall ve ark., 2008)<br>(Sugiura, Su ve ark., 2010)  |
| <i>BMP7</i> | Doğumdan sonra ölmek, böbrek ve göz gelişiminde bozukluk<br>İskelet desenlemesindeki kusurlar5<br>Bozulmuş kortikogenez<br>Kahverengi yağda azalma<br>Langerhans hücre sayısında azalma<br>Uyarılabilir silme: böbrek progenitör hücrelerinin erken farklılaşması<br>Uzuv: etkisi yok<br>Podosit: kusurlu böbrek gelişimi | (Dudley, Lyons ve ark., 1995)<br>(Luo, Hofmann ve ark., 1995)<br>(Segkha, Seuntjens ve ark., 2012)<br>(Tseng, Kokkotou ve ark., 2008)<br>(Yasmin, Bauer ve ark., 2013)<br>(Tomita, Asada ve ark., 2013)<br>(Tsuji, Cox ve ark., 2010)<br>(Kazama, Mahoney ve ark., 2008) |

|                      |  |   |
|----------------------|--|---|
| <i>BMP8</i>          | Germ hücresi dejenerasyonu<br>Kusurlu PGC oluşumu<br>Germ hücresi eksikliği ve kısırılık   | (Zhao, Liaw ve ark., 1998)<br>(Ying, Liu ve ark., 2000)<br>(Zhao, Deng ve ark., 1996)   |
| <i>BMP9 / GDF2</i>   | Anormal lenfatik gelişim   | (Levet, Ciais ve ark., 2013)<br>(Yoshimatsu, Lee ve ark., 2013)   |
| <i>BMP10</i>         | Kardiyomiyosit çoğalmasının azalması   | (Chen, Shi ve ark., 2004)   |
| <i>BMP11 / GDF11</i> | Doğumdan sonra ölmek, A-P desenlemesindeki kusurlar<br>Daha küçük pankreas<br>Azaltılmış b hücre sayıları<br>Böbrek agenezisi<br>Omurga nöron farklılaşmasının yavaşlaması<br>Koku alma nörojeniğinde artış<br>Retina anormallikleri | (McPherron, Lawler ve ark., 1999)<br><br>(Dichmann, Yassin ve ark., 2006)<br>(Harmon, Apelqvist ve ark., 2004)<br>(Esquela and Lee 2003)<br>(Shi and Liu 2011)<br>(Wu, Ivkovic ve ark., 2003) |

|                    |   |  |
|--------------------|---|--|
|                    |   | (Kim, Wu ve ark., 2005)  |
| <i>BMP12 /GDF7</i> | Endokondral kemik büyümesinde artış<br>Daha küçük kemik kesit parametreleri<br>Kuyruk tendonu fenotipi üzerinde hiçbir etkisi yoktur<br>Kusurlu dorsal internöron oluşumu | (Mikic, Ferreira ve ark., 2008)<br>(Maloul, Rossmeier ve ark., 2006)<br><br>(Mikic, Entwistle ve ark., 2008)<br><br>(Mikic, Bierwert ve ark., 2006)                                    |
| <i>BMP13 /GDF6</i> | El ve ayak bileklerinde kemik füzyonları<br>Göz ve sinir bozuklukları<br><br>Klippel Feil sendromu<br>Erkeklerde: alt kuyruk tendonu kolajeni                             | (Lee, Mendelsohn ve ark., 1998)<br>(Settle Jr, Rountree ve ark., 2003)<br>(Asai-Coakwell, March ve ark., 2013)<br>(Tassabehji, Fang ve ark., 2008)<br>(Mikic, Rossmeier ve ark., 2009) |

|                     |   |  |
|---------------------|---|--|
|                     |   | (Mikic, Rossmeier ve ark., 2009)   |
| <i>BMP14 / GDF5</i> | <p>Uzuv, göğüs kemiği ve parmak kemiklerindeki malformasyonlar</p> <p>Gecikmiş kırık iyileşmesi</p> <p>Bozulmuş eklem oluşumu ve osteoartrit</p> <p>Miyokard enfarktüsünden sonra yara izinde artış, değişen cilt özellikleri</p> | <p>(Storm, Huynh ve ark., 1994)</p> <p>(Storm and Kingsley 1999)</p> <p>(Chhabra, Zijerdi ve ark., 2005)</p> <p>(Coleman, Scheremeta ve ark., 2011)</p> <p>(Masuya, Nishida ve ark., 2007)</p> <p>(Zaidi, Huang ve ark., 2010)</p> |
| <i>BMP15</i>        | <p>Erkekler: normal ve doğurgan</p> <p>Dişiler: dölleme ve yumurtlama oranlarının azalmasıyla birlikte kısırır</p>  | <p>(Battaglia 2005)</p> <p>(Yan, Wang ve ark., 2001)</p>   |

## 2.12. Kemik İliği Dokusunun Oluşumunda BMP Sinyalinin Önemi

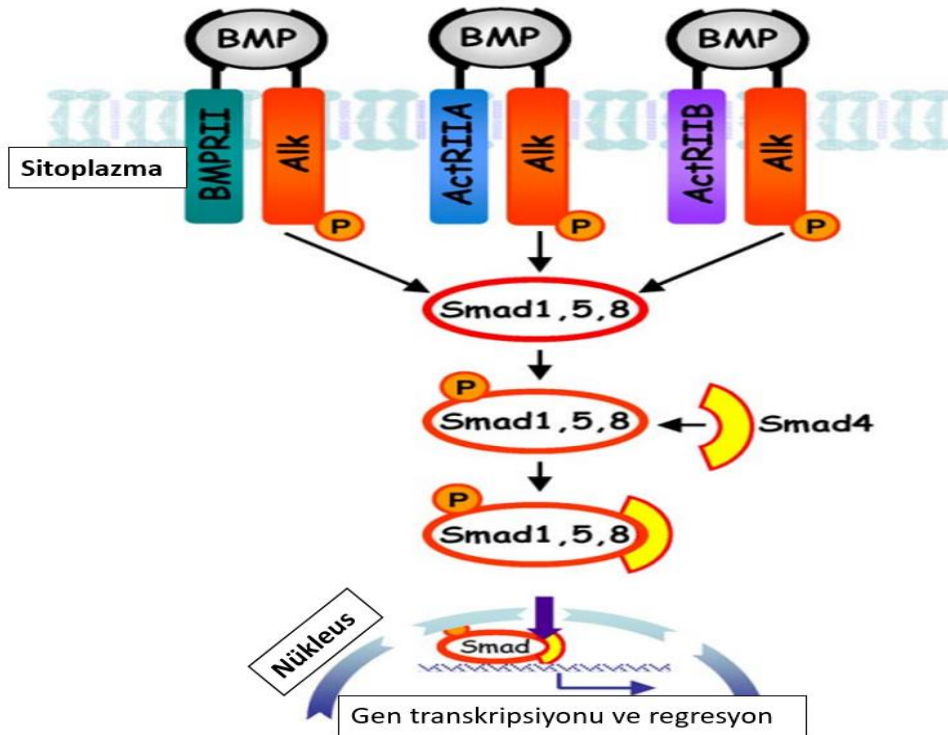
Farelerde yapılan çalışmalar, endokondral ossifikasyon sırasında BMP sinyallemesine önemli olduğunu göstermiştir. BMP kombinasyonlarının çıkarıldığı fareler, bireysel BMP'lerin belirli iskelet bölgelerinde uygun BMP aktivitesi seviyelerini sağlamak için uyum içinde çalıştığı fikriyle tutarlı olarak çeşitli iskelet fenotipleri sergiler (Bandyopadhyay, Tsuji ve ark., 2006).

Bu çalışmalar ayrıca BMP'lerin kemik oluşumundan önce doğrudan kondrojeneze aracılık ettiğine de dikkat çekti. BMP aktivitesini nötralize etmek için noggin ve kordin kullanarak Barna ve Niswander (Barna and Niswander 2007), BMP sinyallemesinin sıkışmaya aracılık ettiğini belirledi. Bu, Sox9 ifadesinden önce meydana geldiği için BMP sinyallemesi için en erken iskelet gereksinimi gibi görünmektedir. BMP aktivitesi, kondensasyon meydana geldikçe Sox9 ifadesini başlatmak için gereklidir ancak yeterli değildir ve erken kondensasyonlarında Sox9'u korumak için gereklidir. Kondensasyon meydana geldiğinde, devam eden BMP sinyali kondroblast çoğalmasına aracılık eder. Lyons ve iş arkadaşları tarafından yapılan çalışmalar, BMP reseptörlerinin Col2a eksprese eden hücrelerden çıkarılmasının, kondensasyonlardan PCNA boyamasının kaybına yol açtığını gösterdi (Yoon, Ovchinnikov ve ark., 2005, Yoon, Pogue ve ark., 2006).

Bu kondensasyon aynı zamanda BMP'lerin kondroblastların hayatta kalmasındaki rolüne işaret eden artan TUNEL etiketlemesini de sergiliyor. Daha sonra uzuv gelişiminde BMP aktivitesinin yokluğu, prekondrositlerin kondrositlere farklılaşmasını bozar. BMP'ler aynı zamanda kondrosit hipertrofinde de rol oynarlar (Enomoto-Iwamoto, Iwamoto ve ark., 1998, Kobayashi, Lyons ve ark., 2005) ve bu gereksinimin PTHrP'den bağımsız olduğu ve FGF'lerin karşı çıktığı görülmektedir. Kondrojenezdeki doğrudan rolüne ek olarak BMP sinyali, ekstremite interdigital mezenkimalin şekillenmesine yardımcı olur. Uzuv tomurcuğundaki BMP sinyali, AER hücreleri tarafından FGF üretimini modüle ederek interdigital mezenkimal hücrelerin programlanmış hücre ölümünü dolaylı olarak düzenler (Pajni-Underwood, Wilson ve ark., 2007). AER'de hem Bmp2 hem de Bmp4 ekspresyonu bulunmayan otopodlar, programlanmış hücre ölümünde bir azalmaya ve altta yatan mezoderimde hücre proliferasyonunda bir artışa bağlı olarak ekstra basamaklar, basamak çatallanmaları ve parmaklar arası ağ içerir (Maatouk, Choi ve ark., 2009). BMP ailesinin üyelerinin iskelet elemanları arasında

sınırların oluşturulmasında ve eklem oluşumunun yönlendirilmesinde anahtar rol oynadığı eklem morfogenezi sırasında BMP sinyalleme için ek bir rol bulunabilir (Settle Jr, Rountree ve ark., 2003).

BMP'lerin hedef hücreleri aktive etmesinin birincil yolu olan kanonik BMP sinyali, BMP'ler, transmembran serin/treonin kinaz olan tip I ve tip II BMP reseptörleri ile birleştiğinde ve bir multimerik reseptör ligand kompleksi oluşturduğunda başlatılır. Bu kompleks içinde, yapısal olarak fosforile edilmiş tip II BMP reseptörleri, tip I BMP reseptörlerini fosforilasyon yoluyla aktive eder ve kanonik BMP sinyalleşme kademesini başlatır. Aktive edilmiş tip I BMP reseptörleri, BMP'ye özgü RSmad 1, 5 ve 8'i fosforile ederek BMP sinyallerini yayar. Bu RSmad'ler Smad4 ile kompleks yapar, çekirdeğe gider ve hedef genlerin transkripsiyonunun aktivatörleri ve baskılayıcıları olarak görev yapar.



**Şekil 2.6. BMP hedef genlerinin transkripsiyonu etkilemesi**

BMP'ler, tip I (burada Alk olarak etiketlenmiştir) ve tip II reseptörleri (burada BMPRII ve ActRII olarak etiketlenmiştir), yapısal olarak aktive edilen tip II reseptörün, tip I reseptörünü fosforilasyon yoluyla aktive ettiği bir multimerik kompleks

oluşturduğunda başlatılır. Aktive edilmiş tip I reseptör daha sonra BMP'ye özgü RSmad'ler 1, 5 ve 8'i fosforile eder. Smad 4 ile kompleksleştikten sonra BMP RSmad'ler çekirdeğe gider ve BMP hedef genlerinin transkripsiyonunu etkiler (Şekil 2.6)

### 2.13. İskelet sisteminde BMP sinyali

*BMP'ler* kemik ve kıkırdak oluşumunda çok önemli bir rol oynar ve bu protein ailesinin yanı sıra yetişkin kemik fonksiyonunun homeostazisine de isim verir. Her ne kadar BMP'lerin başlangıçta kemik oluşumunu indüklediği keşfedilmiş olsa da, *BMP3'ün* kemik yoğunluğunun negatif düzenleyicisi olduğu gösterilmiştir(Daluiski, Engstrand ve ark., 2001). Osteoblastlarda *BMPR-1A'nın* silinmesi de şaşırtıcı bir şekilde kemik kütlelerinin artmasına neden olur(Kamiya, Ye ve ark., 2008). BMP7'nin uzuvdan koşullu olarak silinmesinin gözle görülür bir etkisi olmadığından bazı BMP'ler kemik oluşumunda gereksiz rollere sahip olabilir(Tsuji, Cox ve ark., 2010). Bununla birlikte, BMP7 eksikliği olan farelerde kaburgalar, kafatası ve arka bacaklarla sınırlı olan iskelet desenleme kusurları vardır (Luo, Hofmann ve ark., 1995). Ek olarak, BMP11 mutantları Hox gen ekspresyonunu ve aksel iskeletin anormal ön-arka (A-P) desenlemesini değiştirdiğinden, BMP11 gelişim sırasında iskelet desenlemesinde önemli roller oynar(McPherron, Lawler ve ark., 1999). *BMP14* mutantlarının incelenmesi, *BMP14'ün* parmak gelişimi sırasında kemik ve eklem oluşumunu da koordine ettiğini ortaya çıkardı(Storm and Kingsley 1999). *BMP5/14* çift mutantları, tek mutantlara kıyasla ek kusurlara sahiptir ve bu da olası bir sinerjistik fonksiyonu akla getirir(Storm and Kingsley 1999).

BMP'ler ayrıca genellikle kemik oluşumuyla koordine edilen kıkırdak gelişimini de düzenler. *BMP2*, kondrosit çoğalması ve olgunlaşması için endokondral kemik gelişimi sırasında ana oyuncu olarak kabul edilir. *BMP2'nin* kondrosite spesifik nakavt edilmesi, ciddi bir kondrodisplazi fenotipiyle sonuçlanır(Shu, Zhang ve ark., 2011).

BMP'ler yetişkin kemik homeostazisinde ve kırık iyileşmesinde önemli bir rol oynar. BMP2 kemik oluşumu için vazgeçilmez olsa da kırık iyileşmesinin başlatılması için gereklidir(Tsuji, Bandyopadhyay ve ark., 2006). Uzuvlara özgü *BMP2* nakavtlarında, BMP2 içermeyen kemiklerde kendiliğinden kırıklar vardır ve kırık iyileşmesinin erken aşamalarını başlatamama söz konusudur. *BMP14* eksikliği, muhtemelen hücrelerin toplanmasındaki ve kondrosit farklılaşmasındaki gecikmeye bağlı olarak kırık iyileşme

sürecindeki bir gecikmeyle ilişkilidir, ancak uzun süreli iyileşmeden taviz verilmemektedir(Chhabra, Zijerdi ve ark., 2005, Coleman, Scheremeta ve ark., 2011) .

## **2.14. BMP'lerin Kardiyovasküler Ve Pulmoner Hastalıklarda Rolü**

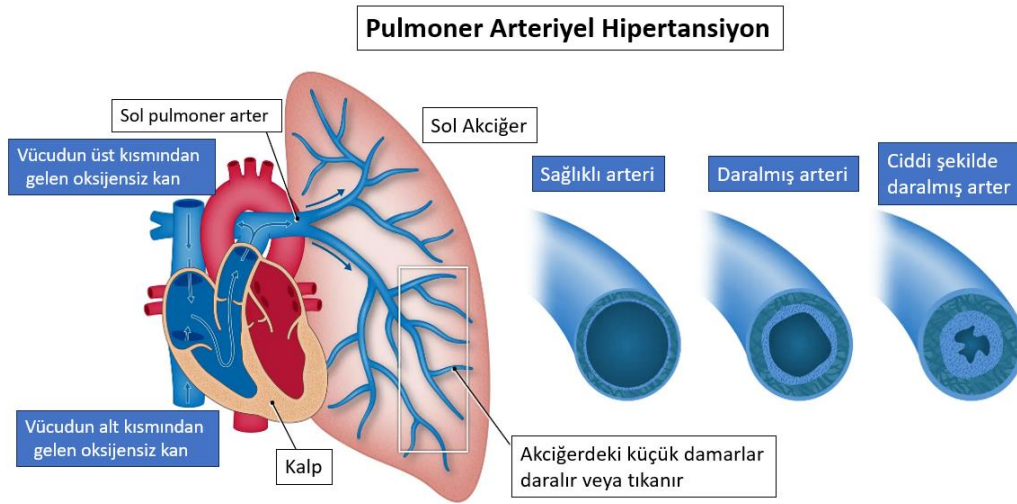
BMP sinyal mekanizmasının vasküler fonksiyondaki önemi rolü, in sandaki genetik çalışmalarla kanıtlanmıştır (Lowery and de Caestecker 2010). Genetik analiz, BMP sinyalleme genlerindeki veya BMP sinyalleme fonksiyonunu etkileyen genlerdeki mutasyonların, vasküler fonksiyon bozukluğuna ve kalıtsal hemorajik telanjiektazi (Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia - HHT) ve pulmoner arteriyel hipertansiyon (Pulmonary arterial hypertension - PAH), vasküler kalsifikasyon ve tümör anjiyogenezi gibi hastalıklara yol açtığını ortaya çıkardı. Ek olarak, vasküler yaralanma, hipertansiyon veya ateroskleroz nedeniyle vasküler homeostazisin bozulmasının BMP'lerin ekspresyonunu etkilediği belli edilmiştir, bu da BMP'lerin anormal vasküler yanıtlarda rol oynadığını öne sürülmektedir(Lowery and de Caestecker 2010)

### **2.14.1. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (Pulmonary Arterial Hypertension - PAH)**

PAH, yüksek pulmoner arter basıncı ve bunun sonucunda ortaya çıkan kalp yetmezliği ile karakterizedir. İki tipi vardır: idiyopatik pulmoner arteriyel hipertansiyon (İPAH) ve kalıtsal pulmoner arteriyel hipertansiyon (HPAH). *BMPR-2*'de HPAH hastalarının %70'inden fazlasında ve İPAH hastalarının %20'sinde bulunan heterozigot germline mutasyonları bulunur(Cai, Pardali ve ark., 2012). Hastalığın patogenezi iyi anlaşılmamıştır ve *BMPR-2* dışında çeşitli faktörlerin de rol oynaması muhtemeldir. Otozomal dominant hastalık olan HPAH'ta taşıyıcıların yalnızca %20'si hastalığa yakalanır ve düşük penetrans, *BMPR-2* alternatif birleştirmesindeki değişikliklerle açıklanabilir(Cogan, Austin ve ark., 2012). *BMPR-2* mutasyonları hastalık ifadesini erkeklerde kadınlara göre daha açık bir şekilde etkilemektedir(Liu, Wu ve ark., 2012).

BMP sinyalinin azalmasına yol açan mutasyonlar ligand bağlama alanında, kinaz alanında ve uzun sitoplazmik kuyrukta bulunmuştur. Mutant reseptörler daha düşük seviyede eksprese edilebilse veya hiç eksprese edilemese de, hücrel lokalizasyonu

değiştirmiş olmaları da mümkündür. Birkaç mutantın kaveola ve klatrin kaplı çukurlarla anormal şekilde ilişki kurduğu ve bu alanların bozulmasının *BMP* sinyalini vahşi tip seviyelere geri getirdiği gösterildi. *BMPR-2* ayrıca hücre iskeleti ile etkileşime girer ve mutant reseptörler, pah gelişimiyle ilişkili hücre iskeleti bozukluklarına neden olabilir(Jiang, Nohe ve ark., 2011). Pulmoner arteriyel düz kas hücrelerinde (PASMC'ler) *BMPR-2* ekspresyonu bozulduğunda, *BMP2* ve *BMP4* sinyalleşmesinin azalması ancak *BMP6* ve *BMP7* sinyalleşmesinin artması dahil olmak üzere, vahşi tiple karşılaştırıldığında çeşitli farklılıklar kaydedilmiştir(Paul, Beppu ve ark., 2005). Bu, *BMP4*'ün anti-proliferatif etkilerinin kaybına ve ayrıca *p38-MAPK* yolunun aktivasyonuna yol açarak anormal PASMC proliferasyonuna ve apoptoz eksikliğine yol açar(Dewachter, Adnot ve ark., 2009).



**Şekil 2.7. Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon**

#### **2.14.2. Kalıtsal Hemorajik Telenjiektazi (Hereditary Hemorrhagic T elangiectasia - HHT)**

HHT, deri ve mukozada anormal ve kırılabilir kan damarı oluşumuyla ilişkili otozomal dominant bir hastalıktır. HHT tip 1, bir *BMP* yardımcı reseptörü olan Endoglin'deki mutasyonlardan kaynaklanırken, HHT tip 2, *ALK1* fonksiyon kaybından kaynaklanmaktadır. Smad4 mutasyonlarının torasik aort hastalığına zemin hazırlayan

kombine JP-HHT sendromuyla ilişkili olduğu bilinmektedir(Teekakirikul, Milewicz ve ark., 2013). *ALK1*'in ligandı olarak BMP9'un keşfi, reseptördeki mutasyonların hatalı BMP9 sinyallemesine yol açtığını gösterdi(Ricard, Bidart ve ark., 2010). *ALK1* esas olarak arteriyel endotel hücrelerinde eksprese edilir ve kusurlu BMP9 sinyali muhtemelen Id1 ve Id3 seviyelerinin azalmasına yol açar. *VEGR2*'nin daha sonra artan ekspresyonunun, anormal endotelial hücre filizlenmesinin mekanizması olarak ileri sürülmektedir. *MAPK* kademesi gibi diğer Smad olmayan yollar da muhtemelen süreçte önemli bir rol oynamaktadır(Choi, Kim ve ark., 2013). Bu süreç *BMP9*'un yetişkinlerde anjiyogenezin düzenleyicisi olarak rolünü ortaya koymaktadır. *ALK1* normalde anti-anjiyogenik etkilere sahip olduğundan ve çoğunlukla endotelial hücrelerde eksprese edildiğinden, kanser gibi anjiyogenezle ilişkili hastalıklarda potansiyel olarak ilginç bir hedef oluşturur ve *BMP9*, reseptörün ana ligandlarından biri olduğundan bu tür tedavilerde düşünülebilir(Mitchell, Pobre ve ark., 2010).



**Şekil 2.8. Kalıtsal Hemorajik Telenjiektazi**

### 3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Sağlık Bilimleri Fakültesi, Geronteknoloji merkezine ve Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastesine başvuran, ameliyatı belirlenmiş hastalardan izinleri dahilinde elde edilen örnekler oluşturmaktadır. Araştırmanın örnekleme; Venöz yetmezlik sebebiyle opere edilen hastalardan (25 hasta: 3erkek ve 22 kadın ) dejenere damar yapıları için örnekler elde edilecektir. Koroner By-Pass ameliyatına alınan hastalardan (16 hasta: 13 erkek ve 3 kadın) ise sağlıklı damar yapısını analiz etmek için örnekler elde edilmiştir, doku örnekleri çalışma aşamasına kadar -80°C'de tutulmuştur. *BMP2* geninin ekspresyonunu belirlemek nedeniyle damar dokusu örneklerinden RNA izolasyonu, ardından her örnek için üç kez Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR) gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. RNA İzolasyon Protokolü

1. RL'e 10 µL β-Merkaptoetanol eklenmiş, ardından bistüri yoluyla iyice karıştırılmış ve homojenizasyon sağlanmıştır.
2. ardından 10 saniye boyunca pipetlenmiş ve SciLogex cihazı kullanılarak yaklaşık 30 saniye boyunca vortekslenmiştir.
3. Hazırlanan karışımlar daha sonra 2 mL Eppendorf tüplerine yerleştirildikten sonra 600 µL distille suyu ve 20 µL Protein Kinaz enzimi karışımında 15 dakika 55.2°C inkubasyonu gerçekleştirilmiştir.
4. Bu aşamada tüpler 1 dakika 14.000 rpm hızla santrifüj yapılmıştır.
5. Bir Hitachi cihazında 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj işlemi takiben, elde edilen tüplerin alt kolonlarının çıkarılmasına izin verilmiş ve bunlar daha sonra 1,5 mL Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Ardından %100 etanol eklenmiş ve yaklaşık 10 kez pipetlenerek nazıkçe karıştırılmıştır.
6. Pembe kolonlar (RNeasy spin kolonları) açılmış ve her birine bir önceki numunedan yaklaşık 700 µL aktarılmıştır. Bu kolonlar, sonraki adımlarda kirleticileri yıkarken ilgilenilen RNA'yı özel olarak tutmak için tasarlanmıştır.
7. 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra alt tüpler atılmış ve kolonlar yeni 2 mL Eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir.

8. Proteinleri ve tuzları yıkamak için tüplere 700 µL RW1 eklenmiş ve ardından 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj edilen kolonlar daha sonra 2 mL Eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
10. İkinci yıkama solüsyonu olarak RPE kullanılmış, her tüpe 500 µL eklenmiş ve ardından ilk yıkama için 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
11. Sonraki yıkamada, aynı şekilde 500 µL RPE eklenmiş ve ardından 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Kolonlar tekrar 1,5 mL Eppendorf tüplerine yerleştirilerek 30 µL RNaz içermeyen su filtreye temas ettirilmeden dikkatlice uygulandı. Örnekler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmeden önce 5 dakika dinlendirilmiştir.
13. RNA izolasyon işlemini tamamlamak için örneklerden 1,5 µL alınıp Nanodrop ölçümleri için Thermo Scientific Nanodrop One kullanılarak analiz edilmiştir.

### **3.2. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)**

Araştırma çalışmamızda, gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği ile titizlikle değerlendirilmiştir. *BMP2* geni için uyarlanmış primerlerin formüle edilmesini takiben Gerçek Zamanlı PCR yoluyla gen ekspresyon profili çıkarılacaktır. Ek olarak, B-aktin geni, farklı dokular arasında tutarlılığı sağlamak ve hücresel canlılığı desteklemek için temizlik/referans geni olarak işlev görülme üzere üç kez polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR analizi sırasında gen ekspresyon seviyelerini tespit etmek için primerler akıllıca hazırlanmıştır. Kullanılan spesifik primer dizileri aşağıda verilen tabloda özetlenmiştir. qRT-PCR aşamasında forward ve reverse primerler 100-400nM, RNA örnekleri ise 1pg-1µg konsantrasyonunda olması gerekiyor.

**Tablo 3.1. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR) bileşenleri**

| İçerik                            | Miktar |
|-----------------------------------|--------|
| RNA Free Water                    | 11 µL  |
| One-Step Green RT-qPCR Master Mix | 5 µL   |
| Reverse Primer                    | 1µL    |
| Forward Primer                    | 1 µL   |
| Örnek                             | 1 µL   |
| RT Mix                            | 1 µL   |
| Total Hacim                       | 20 µL  |

**Tablo 3.2 Primer Dizilimleri**

|                 |                        |        |
|-----------------|------------------------|--------|
| B Aktin Forward | TGTTTGAGACCTTCAACACCC  | 529bp  |
| B Aktin Reverse | AGCACTGTGTTGGCGTACAG   |        |
| BMP2 Forward    | GCTTCCACCATGAAGAATCTTT | 158 bp |
| BMP2 Reverse    | ATCTTGCATCTGTTCTCGG    |        |

**Tablo 3.3 qRT-PCR Programı:**

|                       |               |                |
|-----------------------|---------------|----------------|
| Revers Transkripsiyon | 50 °C 15 dk   |                |
| Preinkübasyon         | 95°C 60 sn    |                |
| Amplifikasyon         | 95°C 30 sn    | } 40-45 siklus |
| Amplifikasyon         | 60-65°C 30 sn |                |

#### 4. BULGULAR

Çalışmamızda, BMP2 enziminin ekspresyon seviyeleri Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi her örnek için en az üç Cp değeri üretmiş ve analiz için bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta CP_{\text{Hedef}}(\text{Kontrol- Örnek})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CP_{\text{Ref}}(\text{Kontrol- Örnek})}}$$

formülü kullanılmıştır.

## 5. TARTIŞMA

*BMP2* geni dokusunun oluşumu ve gelişmesinde çok önemli bir role sahiptir. Çalışmamızda qRT-PCR yöntemi sonucunda Venöz yetmezlik sebebiyle opere edilen hastalarda *BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden Ct ortalamaları: *BMP2* Ct: 33,73 Actb Ct: 21,95 , Koroner By-Pass ameliyatına alınan hastalarda ise *BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden *BMP2* Ct: 35,58 Actb Ct: 24,03

Robert N. Willette ve arkadaşlarının 1999 araştırmalarına göre insan aterosklerotik kan damarlarında immünoreaktif *BMP2*'yi gösteren önceki raporları doğrulamakta ve genişletmektedir. *BMP-2*'nin damar sistemindeki her yerde bulunan gen ekspresyonunun fonksiyonel önemi bilinmemektedir. Bununla birlikte, *BMP-2* serin/treonin kinaz reseptörlerinin gen ekspresyonu ve bu reseptörler için sinyal transdüksiyon proteinleri (SMAD'ler) vasküler hücre tiplerinde de tanımlanmıştır. Birlikte ele alındığında, yukarıdaki gözlemler, *TFG-β* ve aktivin gibi *BMP-2*'nin de vasküler modelleme/yeniden modelleme için gerekli olan hücresel düzenlemede temel bir parakrin veya otokrin rol oynayabileceğini göstermektedir. Standart RT-PCR teknikleri kullanılarak, incelenen tüm ana vasküler hücre tiplerinde, yani VSM hücreleri, makrofaj, endotel hücrelerinde *BMP-2* gen ekspresyonu tanımlandı. Benzer şekilde insan kan damarlarında, *BMP-2* gen ekspresyonu, aterosklerotik numunelerin yanı sıra görünüşte normal olanlarda da gözlemlendi. Tüm sonuçlar, spesifik bir yuvalanmış primer çifti kullanılarak ve insan *BMP-2*'nin doğrulanmış tam uzunluktaki dizisini içeren plazmid DNA ile karşılaştırılarak doğrulandı. Bu gözlemler, insan aterosklerotik kan damarlarında immünoreaktif *BMP2*'yi gösteren önceki raporları doğrulamakta ve genişletmektedir.

Hidenori Matsubara ve arkadaşlarının 2012 yaptığı araştırmada Kemik onarımını destekleyen *BMP'lerin* ya MSC'ler ve osteojenik hücreler tarafından lokal olarak üretildiğine inanılırken, verileri bu varsayımlara karşı çıkmaktadır. Bu soruyu yanıtlamak için birkaç farklı yaklaşım kullanarak, hem vasküler düz kas hem de endotel hücrelerinin, rejeneratif ortamda *BMP2*'yi eksprese eden birincil hücre tiplerinden ikisi olduğunu bulunmuştur. Transgen ekspresyonunun kullanımı, *BMP2* eksprese eden hücrelerin tamamını tam olarak tanımlayamasa da, *BMP2* antikor lokalizasyonu kullanılarak gözlemlenen *BMP2* ekspresyonunun karşılaştırılabilir hücre dağılımı, transgenin *BMP2* ekspresyonunun aslına sadık bir temsilini sağladığına dair güçlü bir kanıttı. Bu bulgular beklenmedik olmakla birlikte, *BMP* sinyallemesinin

vaskülarizasyonda oynadığı rol son zamanlarda daha kapsamlı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır.

Iwona Kochanowska, Slawomir Chaberek ve arkadaşlarının 2007 yılında yürüttüğü çalışmada Gerçek zamanlı PCR tekniği, üç BMP isoform ekspresyonunun tespiti, belirlenmesi ve karşılaştırılması için çok önemli olmuştur.  $\beta$ -aktin gen ekspresyonunun bir kontrol geni olarak kullanılması *BMP-2*, *BMP-4* ve *BMP-6* gen ekspresyonunun sadece kendi arasında değil aynı zamanda farklı kemik türleri arasında karşılaştırılmasını da sağladı. Elde edilen sonuçlar, bu proteinlerin iki izoformunun (*BMP-2* ve *BMP-4*) anlamlı ekspresyonunun olduğunu gösterdi. Analiz sonrasında, incelenen tüm kemik numunelerinde *BMP-6* gen ekspresyonunun bulunmadığı sonucuna varıldı.

Çalışmada *BMP2* geninin hasarsız doku örneklerinde ekspresyonunun hasarlı doku örnekleri ile kıyasta daha düşük seviyede olması Hidenori Matsubara ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı araştırmada *BMP2* geninin yalnız sağlıklı damar dokusunun oluşması ve normal çalışması sağlamanın yanı sıra VSM hücreleri, makrofaj, endotel hücrelerinde de önemini göstermektedir. Ancak Tüm çalışmalar 9-12 haftalık erkek farelerle gerçekleştirilmiştir ve farelerde qRT-PCR analizi yapılmıştır. Hedef genlerin ekspresyon değerleri, çalışmanın başında toplanan, ameliyat edilmemiş kontrollerden kemik ve kas dokuları kullanılmıştır. Kontrol dokuları için karşılaştırılabilir anatomik intraosseöz ve kas bölgeleri kullanıldı.

Damar dokusunun yaşlanmasında ve hasarına *BMP2* genin ekspresyonunun etkisi insanlarda fazla çalışılmadığından bizim çalışmamız gelecekte bu konu ile ilgili diğer araştırmalara da bir başlangıç verebilmektedir.

## 6. SONUÇ, ÖNERİLER VE TOPLUMA KATKI

Çalışmamızda, Venöz yetmezlik sebebiyle opere edilen hastalardan (25 hasta: 3erkek ve 22 kadın ) dejenere damar yapıları için örnekler elde edilmiştir. Koroner By-Pass ameliyatına alınan hastalardan (16 hasta: 13 erkek ve 3 kadın) ise sağlıklı damar yapısını analiz etmek için örnekler elde edilmiştir.

Çalışmamızda qRT-PCR yöntemi sonucunda Venöz yetmezlik sebebiyle opere edilen hastalarda *BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden Ct ortalamaları: *BMP2* Ct: 33,73; Actb Ct: 21,95

Koroner By-Pass ameliyatına alınan hastalarda ise *BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden Ct ortalamaları: *BMP2* Ct: 35,58; Actb Ct: 24,03

*BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden Ct ortalamaları: *BMP2* Ct: 33,73; Actb Ct: 21,95 > *BMP2* geninin kontrol gen olan B Aktin geninden Ct ortalamaları: *BMP2* Ct: 33,73; Actb Ct: 21,95 olarak hesaplandı.

$\Delta \Delta Ct$  yöntemine göre analiz sonucuna göre; *BMP2* miktarı kontrol grubunda (hasarsız damar) 0,85 kat daha fazla bulunmuştur.

Damar dokusunun yaşlanması ve hasarında *BMP2* geninin için klinik çalışmalar yürütmek: Çalışmamız daha çok insanlarda uygulamak *BMP2* geninin damar dokusunu oluşturmakta rolünü daha detaylı incelemekte yardım edecektir.

## KAYNAKÇA

Agrotis A, Samuel M, Prapas G, Bobik A: Vascular smooth muscle cells express multiple type I receptors for TGF $\beta$ , activin and bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;219:613–618. 16.T

Alique Aguilar, M., ve ark., Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification. 2017.

Allendorph, G.P., W.W. Vale, and S. Choe, Structure of the ternary signaling complex of a TGF- $\beta$  superfamily member. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006. 103(20): p. 7643- 7648.

Anderson, L., ve ark., Bmp2 and Bmp4 exert opposing effects in hypoxic pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2010. 298(3): p. R833-R842.

Arnold, S.J., ve ark., Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Developmental biology*, 2006. 296(1): p. 104-118.

Arthur, H.M., ve ark., Endoglin, an ancillary TGF $\beta$  receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology*, 2000. 217(1): p. 42-53.

Asai-Coakwell, M., ve ark., Contribution of growth differentiation factor 6-dependent cell survival to early-onset retinal dystrophies. *Human molecular genetics*, 2013. 22(7): p. 1432-1442.

Babitt, J.L., ve ark., Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(33): p. 29820- 29827.

Bandyopadhyay, A., ve ark., Genetic analysis of the roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *PLoS genetics*, 2006. 2(12): p. e216.

Barbara, N.P., J.L. Wrana, and M. Letarte, Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(2): p. 584-594.

Barna, M. and L. Niswander, Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Developmental cell*, 2007. 12(6): p. 931- 941.

Battaglia, T.C., GDF-5 deficiency alters stress-relaxation properties in mouse skin. *Journal of dermatological science*, 2005. 39(3): p. 192-195.

Beck, H.N., ve ark., Bone morphogenetic protein-5 (BMP-5) promotes dendritic growth in cultured sympathetic neurons. *BMC neuroscience*, 2001. 2: p. 1-11.

Beppu, H., ve ark., BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *American Journal of Physiology\_Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004. 287(6): p. L1241-L1247.

Bobacz, K., ve ark., Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 2003. 48(9): p. 2501-2508.

Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL: Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1993;91:1800–1809. 14T

Brown, M.A., ve ark., Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(26): p. 25111-25118.

Cai, J., et at., BMP signaling in vascular diseases. *FEBS letters*, 2012. 586(14): p. 1993-2002.

Carmeliet, P. and R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011. 473(7347): p. 298-307.

Chakrabarti, A., D.R. Goldstein, and N.R. Sutton, Age-associated arterial calcification: the current pursuit of aggravating and mitigating factors. *Current opinion in lipidology*, 2020. 31(5): p. 265- 272.

Chan, M.C., ve ark., A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Molecular and cellular biology*, 2007. 27(16): p. 5776-5789.

Chang, H., ve ark., Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development*, 1999. 126(8): p. 1631-1642.

Chang, K., ve ark., Bone morphogenic protein antagonists are coexpressed with bone morphogenic protein 4 in endothelial cells exposed to unstable flow in vitro in mouse aortas and in human coronary arteries: role of bone morphogenic protein

antagonists in inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2007. 116(11): p. 1258-1266.

Chang, W., ve ark., Bmp4 is essential for the formation of the vestibular apparatus that detects angular head movements. *PLoS genetics*, 2008. 4(4): p. e1000050. 167.

Chen, H., ve ark., BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. 2004.

Chen, Q., ve ark., Smad7 is required for the development and function of the heart. *Journal of Biological Chemistry*, 2009. 284(1): p. 292-300.

Chhabra, A., ve ark., BMP-14 deficiency inhibits long bone fracture healing: a biochemical, histologic, and radiographic assessment. *Journal of orthopaedic trauma*, 2005. 19(9): p. 629-634.

Choi, E.-J., ve ark., Enhanced responses to angiogenic cues underlie the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia 2. *PLoS One*, 2013. 8(5): p. e63138

Cogan, J., ve ark., Role of BMPR2 alternative splicing in heritable pulmonary arterial hypertension penetrance. *Circulation*, 2012. 126(15): p. 1907-1916.

Coleman, C.M., ve ark., Delayed fracture healing in growth differentiation factor 5-deficient mice: a pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2011. 469(10): p. 2915-2924.

Constam, D.B. and E.J. Robertson, Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *The Journal of cell biology*, 1999. 144(1): p. 139-149.

Conway, E.M., D. Collen, and P. Carmeliet, Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, 2001. 49(3): p. 507-521.

Csiszar, A., ve ark., Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *The American journal of pathology*, 2006. 168(2): p. 629-638.

Csiszar, A., ve ark., Differential proinflammatory and prooxidant effects of bone morphogenetic protein-4 in coronary and pulmonary arterial endothelial cells. *American Journal of Physiology\_Heart and Circulatory Physiology*, 2008. 295(2): p. H569-H577.

Cui, Y., ve ark., BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *The EMBO journal*, 1998. 17(16): p. 4735-4743.

Daluiski, A., ve ark., Bone morphogenetic protein-3 is a negative regulator of bone density. *Nature genetics*, 2001. 27(1): p. 84-88.

Daly, A.C., R.A. Randall, and C.S. Hill, Transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Molecular and cellular biology*, 2008. 28(22): p. 6889-6902.

David, L., ve ark., Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circulation research*, 2008. 102(8): p. 914-922.

David, L., ve ark., Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, 2007. 109(5): p. 1953-1961.

David, L., J.-J. Feige, and S. Bailly, Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009. 20(3): p. 203-212.

De Caestecker, M., The transforming growth factor- $\beta$  superfamily of receptors. *Cytokine & growth factor reviews*, 2004. 15(1): p. 1-11.

de Lange, T., Shelterin-mediated telomere protection. *Annual review of genetics*, 2018. 52: p. 223- 247.

de Sousa Lopes, S.M.C., ve ark., BMP signaling mediated by ALK2 in the visceral endoderm is necessary for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & development*, 2004. 18(15): p. 1838-1849.

Deckers, M.M., ve ark., Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A. *Endocrinology*, 2002. 143(4): p. 1545-1553.

Derynck, R. and Y.E. Zhang, Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signalling. *Nature*, 2003. 425(6958): p. 577-584.

Dewachter, L., ve ark., Bone morphogenetic protein signalling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 2009. 34(5): p. 1100-1110.

Dichmann, D.S., H. Yassin, and P. Serup, Analysis of pancreatic endocrine development in GDF11-deficient mice. *Developmental dynamics*, 2006. 235(11): p. 3016-3025.

Dudley, A.T., K.M. Lyons, and E.J. Robertson, A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & development*, 1995. 9(22): p. 2795-2807.

Dunn, N.R., ve ark., Haploinsufficient Phenotypes in *Bmp4* Heterozygous Null Mice and Modification by Mutations in *Gli3* and *Alx4*. *Developmental biology*, 1997. 188(2): p. 235-247.

Ebisawa, T., ve ark., Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *Journal of cell science*, 1999. 112(20): p. 3519-3527.

El-Bizri, N., ve ark., *SM22 $\alpha$* -targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. 2008.

El-Bizri, N., ve ark., Smooth Muscle Protein 22 $\alpha$ -Mediated Patchy Deletion of *Bmpr1a* Impairs Cardiac Contractility but Protects Against Pulmonary Vascular Remodeling. *Circulation research*, 2008. 102(3): p. 380-388.

Enomoto-Iwamoto, M., ve ark., Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *The Journal of cell biology*, 1998. 140(2): p. 409-418. 2

Erlacher, L., ve ark., Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 1998. 13(3): p. 383-392.

Esquela, A.F. and S.-J. Lee, Regulation of metanephric kidney development by growth/differentiation factor 11. *Developmental biology*, 2003. 257(2): p. 356-370.

Frank, D.B., ve ark., Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research*, 2005. 97(5): p. 496-504.

Furuta, Y. and B.L. Hogan, BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes & development*, 1998. 12(23): p. 3764-3775.

Gallione, C., ve ark., Overlapping spectra of SMAD4 mutations in juvenile polyposis (JP) and JP-HHT syndrome. *American journal of medical genetics Part A*, 2010. 152(2): p. 333-339.

Gallione, C.J., ve ark., SMAD4 mutations found in unselected HHT patients. *Journal of medical genetics*, 2006. 43(10): p. 793-797.

Galvin, K.M., ve ark., A role for *smad6* in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nature genetics*, 2000. 24(2): p. 171-174.

Gamer, L.W., ve ark., BMP-3 is a novel inhibitor of both activin and BMP-4 signaling in *Xenopus* embryos. *Developmental biology*, 2005. 285(1): p. 156-168.

Gerhardt, H., ve ark., VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology*, 2003. 161(6): p. 1163-1177.

Goldman, D.C., ve ark., BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2009. 114(20): p. 4393-4401.

Goldman, D.C., ve ark., Mutation of an upstream cleavage site in the BMP4 prodomain leads to tissue-specific loss of activity. 2006.

Goumans, M.-J. and C. Mummery, Functional analysis of the TGF $\beta$  receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *International Journal of Developmental Biology*, 2000. 44(3): p. 253-266.

Goumans, M.-J., ve ark., Activin receptor-like kinase (ALK) 1 is an antagonistic mediator of lateral TGF $\beta$ /ALK5 signaling. *Molecular cell*, 2003. 12(4): p. 817-828.

Goumans, M.J., ve ark., Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *The EMBO journal*, 2002

Gregory, K.E., ve ark., The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *Journal of Biological chemistry*, 2005. 280(30): p. 27970-27980.

Halbrooks, P.J., ve ark., Role of RGM coreceptors in bone morphogenetic protein signaling. *Journal of molecular signaling*, 2007. 2: p. 1-10.

Harmon, E.B., ve ark., GDF11 modulates NGN3+ islet progenitor cell number and promotes  $\beta$ -cell differentiation in pancreas development. 2004.

Harrison, C.A., S.L. Al-Musawi, and K.L. Walton, Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF- $\beta$  superfamily ligands. *Growth factors*, 2011. 29(5): p. 174-186.

Hazama, M., ve ark., Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochemical and biophysical research communications*, 1995. 209(3): p. 859-866.

Heidenreich, P.A., ve ark., Stroke Council; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Clinical Cardiology; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Arteriosclerosis; Thrombosis and Vascular Biology; Council on Cardiopulmonary. *Critical Care*, 2011: p. 933-944.

Heinke, J., ve ark., BMPER is an endothelial cell regulator and controls bone morphogenetic protein\_4-dependent angiogenesis. *Circulation research*, 2008. 103(8): p. 804-812.

Heldin, C.-H., K. Miyazono, and P. Ten Dijke, TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 1997. 390(6659): p. 465-471.

Hellström, M., ve ark., Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 2007. 445(7129): p. 776-780.

Herrera, B. and G.J. Inman, A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC cell biology*, 2009. 10: p. 1-11.

Hidenori Matsubara a , Daniel E. Hogan a , Elise F. Morgan b , Douglas P. Mortlock c , Thomas A. Einhorn a , Louis C. Gerstenfeld “Vascular tissues are a primary source of BMP2 expression during bone formation induced by distraction osteogenesis”

Hong, K.-H., ve ark., Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2008. 118(7): p. 722-730.

Horbelt, D., A. Denkis, and P. Knaus, A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012. 44(3): p. 469-474.

Huang, Z., ve ark., Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Human molecular genetics*, 2009. 18(15): p. 2791-2801.

Hur, D.J., ve ark., A novel MGP mutation in a consanguineous family: review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2005. 135(1): p. 36-40.

Jara, A., ve ark., Expression of gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, is associated with vascular calcification in uraemia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2009. 24(4): p. 1121-1129.

Jiang, Y., ve ark., Trapping of BMP receptors in distinct membrane domains inhibits their function in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2011. 301(2): p. L218-L227.

Jin, W., ve ark., TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling. *Cancer research*, 2007. 67(20): p. 9869-9877.

Kamiya, N., ve ark., BMP signaling negatively regulates bone mass through sclerostin by inhibiting the canonical Wnt pathway. 2008.

Kazama, I., ve ark., Podocyte-derived BMP7 is critical for nephron development. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2008. 19(11): p. 2181-2191.

Kessler, E., ve ark., Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science*, 1996. 271(5247): p. 360-362.

Kim, J., ve ark., GDF11 controls the timing of progenitor cell competence in developing retina. *Science*, 2005. 308(5730): p. 1927-1930.

Kingsley, D.M., ve ark., The mouse short ear skeletal morphogenesis locus is associated with defects in a bone morphogenetic member of the TGF $\beta$  superfamily. *Cell*, 1992. 71(3): p. 399-410.

Kirkbride, K.C., B.N. Ray, and G.C. Blobe, Cell-surface co-receptors: emerging roles in signaling and human disease. *Trends in biochemical sciences*, 2005. 30(11): p. 611-621.

Kirkbride, K.C., ve ark., Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor  $\beta$  type III receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. 283(12): p. 7628-7637.

Kirsch, T., J. Nickel, and W. Sebald, BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *The EMBO journal*, 2000. 19(13): p. 3314.

Kishigami, S. and Y. Mishina, BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine & growth factor reviews*, 2005. 16(3): p. 265-278.

Kobayashi, T., ve ark., BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(50): p. 18023-18027.

Kojima I, Mogami H, Kawamura N, Yasuda H, Shibata H: Modulation of growth of vascular smooth muscle cells by activin-A. *Exp Cell Res* 1993;206:152–156 9. T

Lagna, G., ve ark., BMP-dependent activation of caspase-9 and caspase-8 mediates apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2006. 291(5): p. L1059-L1067.

Lakatta, E.G. and D. Levy, Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a “set up” for vascular disease. *Circulation*, 2003. 107(1): p. 139- 146.

Lan, Y., ve ark., Essential role of endothelial Smad4 in vascular remodeling and integrity. *Molecular and cellular biology*, 2007. 27(21): p. 7683-7692.

Larrain, J., ve ark., Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. 2001.

Lawson, K.A., ve ark., Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & development*, 1999. 13(4): p. 424-436.

Lechleider, R.J., ve ark., Targeted mutagenesis of Smad1 reveals an essential role in chorioallantoic fusion. *Developmental biology*, 2001. 240(1): p. 157-167.

Lee, K.J., M. Mendelsohn, and T.M. Jessell, Neuronal patterning by BMPs: a requirement for GDF7 in the generation of a discrete class of commissural interneurons in the mouse spinal cord. *Genes & development*, 1998. 12(21): p. 3394-3407.

Lee, N.Y., ve ark., The transforming growth factor- $\beta$  type III receptor mediates distinct subcellular trafficking and downstream signaling of activin-like kinase (ALK) 3 and ALK6 receptors. *Molecular biology of the cell*, 2009. 20(20): p. 4362-4370.

Lee-Hoeflich, S.T., ve ark., Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *The EMBO journal*, 2004. 23(24): p. 4792-4801.

Levet, S., ve ark., Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2013. 122(4): p. 598- 607.

Lewis, K.A., ve ark., Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*, 2000. 404(6776): p. 411-414.

Li, Y., ve ark., Bmp4 is required for tracheal formation: a novel mouse model for tracheal agenesis. *Developmental biology*, 2008. 322(1): p. 145-155.

Lin, X., ve ark., Exosomal Notch3 from high glucose-stimulated endothelial cells regulates vascular smooth muscle cells calcification/aging. *Life sciences*, 2019. 232: p. 116582.

Little, S.C. and M.C. Mullins, Bone morphogenetic protein heterodimers assemble heteromeric type I receptor complexes to pattern the dorsoventral axis. *Nature cell biology*, 2009. 11(5): p. 637- 643.

Liu, D., ve ark., BMPR2 mutations influence phenotype more obviously in male patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2012. 5(5): p. 511-518.

Liu, W., ve ark., Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. 101(13): p. 4489-4494.

López-Casillas, F., ve ark., Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *The Journal of cell biology*, 1994. 124(4): p. 557-568.

López-Otín, C., ve ark., The hallmarks of aging. *Cell*, 2013. 153(6): p. 1194-1217.

Lowery, J.W. and M.P. de Caestecker, BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 2010. 21(4): p. 287-298.

Luo, G., ve ark., BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes & development*, 1995. 9(22): p. 2808-2820.

Luo, G., ve ark., Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 1997. 386(6620): p. 78-81.

Luu, H.H., ve ark., Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic research*, 2007. 25(5): p. 665-677.

Lyden, D., ve ark., Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature*, 1999. 401(6754): p. 670-677.

Maatouk, D.M., ve ark., In the limb AER Bmp2 and Bmp4 are required for dorsal-ventral patterning and interdigital cell death but not limb outgrowth. *Developmental biology*, 2009. 327(2): p. 516- 523.

Macías-Silva, M., ve ark., Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. 273(40): p. 25628-25636.

Maciel, T.T., ve ark., Gremlin promotes vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2008. 44(2): p. 370-379.

Mahmoud, M., ve ark., Pathogenesis of arteriovenous malformations in the absence of endoglin. *Circulation research*, 2010. 106(8): p. 1425-1433. 56.

Maloul, A., ve ark., Geometric and material contributions to whole bone structural behavior in GDF<sub>7</sub>-deficient mice. *Connective tissue research*, 2006. 47(3): p. 157-162.

Masuya, H., ve ark., A novel dominant-negative mutation in Gdf5 generated by ENU mutagenesis impairs joint formation and causes osteoarthritis in mice. *Human molecular genetics*, 2007. 16(19): p. 2366-2375.

Mazerbourg, S. and A.J. Hsueh, Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Human reproduction update*, 2006. 12(4): p. 373- 383.

Mazerbourg, S., ve ark., Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. *Molecular Endocrinology*, 2004. 18(3): p. 653-665.

McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.-J. Lee, Regulation of anterior/posterior patterning of the axial skeleton by growth/differentiation factor 11. *Nature genetics*, 1999. 22(3): p. 260-264.

Meerman, M., ve ark., Radiation Induces valvular interstitial cell calcific response in an in vitro model of calcific aortic valve disease. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 2021. 8: p. 687885.

Meyrick, B. and L. Reid, Pulmonary hypertension: anatomic and physiologic correlates. *Clinics in chest medicine*, 1983. 4(2): p. 199-217.

Mikic, B., ve ark., Accelerated hypertrophic chondrocyte kinetics in GDF-7 deficient murine tibial growth plates. *Journal of orthopaedic research*, 2008. 26(7): p. 986-990.

Mikic, B., ve ark., Effect of GDF-7 deficiency on tail tendon phenotype in mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 2008. 26(6): p. 834-839.

Mikić, B., ve ark., Long bone geometry and strength in adult BMP-5 deficient mice. *Bone*, 1995. 16(4): p. 445-454.

Mikic, B., K. Rossmeier, and L. Bierwert, Identification of a tendon phenotype in GDF6 deficient mice. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 2009. 292(3): p. 396-400.

Mikic, B., K. Rossmeier, and L. Bierwert, Sexual dimorphism in the effect of GDF-6 deficiency on murine tendon. *Journal of Orthopaedic Research*, 2009. 27(12): p. 1603-1611.

Mikic, B., L. Bierwert, and D. Tsou, Achilles tendon characterization in GDF-7 deficient mice. *Journal of orthopaedic research*, 2006. 24(4): p. 831-841.

Mishina, Y., ve ark., Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes & development*, 1995. 9(24): p. 3027-3037.

Mitchell, D., ve ark., ALK1-Fc inhibits multiple mediators of angiogenesis and suppresses tumor growth. *Molecular cancer therapeutics*, 2010. 9(2): p. 379-388.

Miyazono, K., Y. Kamiya, and M. Morikawa, Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *Journal of biochemistry*, 2010. 147(1): p. 35-51.

Moore, R.K., F. Otsuka, and S. Shimasaki, Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(1): p. 304-310.

Morgan, R.G., A.J. Donato, and A.E. Walker, Telomere uncapping and vascular aging. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2018. 315(1):

Moser, M., ve ark., BMPER is a conserved regulator of hematopoietic and vascular development in zebrafish. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2007. 43(3): p. 243-253.

Moustakas, A. and C.-H. Heldin, The regulation of TGF $\beta$  signal transduction. *Development*, 2009. 136(22): p. 3699-3714.

Mueller, T.D. and J. Nickel, Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS letters*, 2012. 586(14): p. 1846-1859.

Nickel, J., ve ark., Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009. 20(5-6): p. 367-377.

Nishitoh, H., ve ark., Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *Journal of biological chemistry*, 1996. 271(35): p. 21345-21352.

Obradovic Wagner, D., ve ark., BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. 2010, American Association for the Advancement of Science.

Oh, S.P., ve ark.,, Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(6): p. 2626-2631.

Olovnikov, A.M., Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Experimental gerontology*, 1996. 31(4): p. 443-448.

Onichtchouk, D., ve ark.,, Silencing of TGF- $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 1999. 401(6752): p. 480-485.

Pajni-Underwood, S., ve ark.,, BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. 2007.

Pardali, E. and P. Ten Dijke, TGF $\beta$  signaling and cardiovascular diseases. *International journal of biological sciences*, 2012. 8(2): p. 195.

Park, C., ve ark.,, Bone morphogenetic protein receptor 1A signaling is dispensable for hematopoietic development but essential for vessel and atrioventricular endocardial cushion formation. 2006.

Park, S.O., ve ark.,, ALK5-and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2008. 111(2): p. 633-642.

Paul, B.Y., ve ark.,, Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(26): p. 24443-24450.

Perry, M.J., ve ark.,, Impaired growth plate function in bmp-6 null mice. *Bone*, 2008. 42(1): p. 216- 225.

Piccolo, S., ve ark.,, Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell*, 1996. 86(4): p. 589-598.

Piek, E., ve ark.,, Functional antagonism between activin and osteogenic protein-1 in human embryonal carcinoma cells. *Journal of cellular physiology*, 1999. 180(2): p. 141-149.

Pregizer, S. and D.P. Mortlock, Control of BMP gene expression by long-range regulatory elements. *Cytokine & growth factor reviews*, 2009. 20(5-6): p. 509-515.

Qian, S.-W., ve ark.,, BMP4-mediated brown fat-like changes in white adipose tissue alter glucose and energy homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(9): p. E798- E807.

Ray, B.N., ve ark., ALK5 phosphorylation of the endoglin cytoplasmic domain regulates Smad1/5/8 signaling and endothelial cell migration. *Carcinogenesis*, 2010. 31(3): p. 435-441.

Ren, R., ve ark., Gene expression profiles identify a role for cyclooxygenase 2–dependent prostanoid generation in BMP6-induced angiogenic responses. *Blood*, 2007. 109(7): p. 2847-2853.

Ricard, N., ve ark., Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2010. 116(9): p. 1604-1612.

Roos, C.M., ve ark., Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging cell*, 2016. 15(5): p. 973-977.

Rosenzweig, B.L., ve ark., Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995. 92(17): p. 7632- 7636.

Rossmann, M.J., ve ark., Integrative Cardiovascular Physiology and Pathophysiology: Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2017. 313(5): p. H890.

Rymut, N., ve ark., Resolvin D1 promotes efferocytosis in aging by limiting senescent cell-induced MerTK cleavage. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2020. 34(1): p. 597.

Saitou, N. and M. Nei, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 1987. 4(4): p. 406-425.

Samad, T.A., ve ark., DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(14): p. 14122-14129.

Sammar, M., C. Sieber, and P. Knaus, Biochemical and functional characterization of the Ror2/BRIb receptor complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009. 381(1): p. 1-6.

Sampath, T.K., ve ark., Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(22): p. 13198-13205.

Scharpfenecker, M., ve ark., BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of cell science*, 2007. 120(6): p. 964-972.

Scherner, O., ve ark., Endoglin differentially modulates antagonistic transforming growth factor- $\beta$ 1 and BMP-7 signaling. *Journal of biological chemistry*, 2007. 282(19): p. 13934-13943.

Schneyer, A., Repulsive guidance molecule RGMA alters utilization of bone morphogenetic protein (BMP) Type II receptors by BMP2 and BMP4. 2007.

Schwappacher, R., ve ark., Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *The EMBO journal*, 2009. 28(11): p. 1537-1550.

Seemann, P., ve ark., Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS genetics*, 2009. 5(11): p. e1000747.

Segkilia, A., ve ark., Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e34088.

Selever, J., ve ark., Bmp4 in limb bud mesoderm regulates digit pattern by controlling AER development. *Developmental biology*, 2004. 276(2): p. 268-279

Settle Jr, S.H., ve ark., Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Developmental biology*, 2003. 254(1): p. 116-130.

Shi, Y. and J.-P. Liu, Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 2011. 31(3): p. 883-893.

Shu, B., ve ark., BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *Journal of cell science*, 2011. 124(20): p. 3428-3440.

Solloway, M.J., ve ark., Mice lacking Bmp6 function. *Developmental genetics*, 1998. 22(4): p. 321-339.

Song, Y., ve ark., Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation*, 2005. 112(4): p. 553-562.

Sorescu, G.P., ve ark., Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress induces monocyte adhesion by stimulating reactive oxygen

species production from a nox1- based NADPH oxidase. *Circulation research*, 2004. 95(8): p. 773-779.

Srinivasan, S., ve ark., A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Human molecular genetics*, 2003. 12(5): p. 473-482.

Statistics, N.C.f.H., Health, United States, 2016, with chartbook on long-term trends in health. 2017.

Storm, E.E. and D.M. Kingsley, GDF5 coordinates bone and joint formation during digit development. *Developmental biology*, 1999. 209(1): p. 11-27.

Storm, E.E., ve ark., Limb alterations in brachypodism mice due to mutations in a new member of the TGF $\beta$ -superfamily. *Nature*, 1994. 368(6472): p. 639-643.

Sugiura, K., Y.-Q. Su, and J.J. Eppig, Does bone morphogenetic protein 6 (BMP6) affect female fertility in the mouse? *Biology of reproduction*, 2010. 83(6): p. 997-1004.

Suzuki, N., ve ark., Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C<sub>1</sub> proteinase encoded by Bmp1, a mammalian gene related to Drosophila tolloid. *Development*, 1996. 122(11): p. 3587-3595.

Suzuki, Y., ve ark., BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *Journal of cell science*, 2010. 123(10): p. 1684-1692.

Takeda, M., ve ark., Characterization of the bone morphogenetic protein (BMP) system in human pulmonary arterial smooth muscle cells isolated from a sporadic case of primary pulmonary hypertension: roles of BMP type IB receptor (activin receptor-like kinase-6) in the mitotic action. *Endocrinology*, 2004. 145(9): p. 4344-4354.

Tamura, K., ve ark., MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 2007. 24(8): p. 1596-1599.

Tan, H.L., ve ark., Nonsynonymous variants in the SMAD6 gene predispose to congenital cardiovascular malformation. *Human mutation*, 2012. 33(4): p. 720-727.

Tassabehji, M., ve ark., Mutations in GDF6 are associated with vertebral segmentation defects in Klippel-Feil syndrome. *Human mutation*, 2008. 29(8): p. 1017-1027.

Tchkonia, T., ve ark., Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *The Journal of clinical investigation*, 2013. 123(3): p. 966-972.

Teekakirikul, P., ve ark., Thoracic aortic disease in two patients with juvenile polyposis syndrome and SMAD4 mutations. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 2013. 161(1): p. 185-191.

Ten Dijke, P., ve ark., Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(25): p. 16985-16988.

Tomita, M., ve ark., Bmp7 maintains undifferentiated kidney progenitor population and determines nephron numbers at birth. *PloS one*, 2013. 8(8): p. e73554.

Tremblay, K.D., N.R. Dunn, and E.J. Robertson, Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. 2001.

Tseng, Y.-H., ve ark., New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 2008. 454(7207): p. 1000-1004.

Tsuji, K., ve ark., BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics*, 2006. 38(12): p. 1424-1429.

Tsuji, K., ve ark., Conditional deletion of BMP7 from the limb skeleton does not affect bone formation or fracture repair. *Journal of orthopaedic research*, 2010. 28(3): p. 384-389.

Umulis, D., M.B. O'Connor, and S.S. Blair, The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development*, 2009. 136(22): p. 3715-3728.

Urist, M.R., Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965. 150(3698): p. 893-899.

Urness, L.D., L.K. Sorensen, and D.Y. Li, Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nature genetics*, 2000. 26(3): p. 328-331.

Valdimarsdottir, G., ve ark., Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation*, 2002. 106(17): p. 2263-2270.

Venkatesha, S., ve ark., Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature medicine*, 2006. 12(6): p. 642-649.

Vitt, U.A., ve ark., Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biology of reproduction*, 2002. 67(2): p. 473-480.

West, J., ve ark., Mice expressing BMPR2R899X transgene in smooth muscle develop pulmonary vascular lesions. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2008. 295(5): p. L744-L755.

Wiater, E. and W. Vale, Inhibin is an antagonist of bone morphogenetic protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(10): p. 7934-7941.

Winnier, G., ve ark., Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & development*, 1995. 9(17): p. 2105-2116.

Wozney, J.M., ve ark., Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988. 242(4885): p. 1528-1534. 20. Hemmati-Brivanlou, A. and G.H. Thomsen, Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Developmental genetics*, 1995. 17(1): p. 78-89.

Wu, H.-H., ve ark., Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron*, 2003. 37(2): p. 197-207.

Xia, Y., ve ark., Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 2008. 111(10): p. 5195-5204.

Yamashita, H., ve ark., Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *The Journal of cell biology*, 1995. 130(1): p. 217-226.

Yan, C., ve ark., Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular endocrinology*, 2001. 15(6): p. 854-866.

Yang, X., ve ark., Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*, 1999. 126(8): p. 1571-1580.

Yang, X., ve ark., Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation research*, 2005. 96(10): p. 1053-1063.

Yao, Y., ve ark., Matrix GLA protein, an inhibitory morphogen in pulmonary vascular development. *Journal of biological chemistry*, 2007. 282(41): p. 30131-30142.

Yasmin, N., ve ark., Identification of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) as an instructive factor for human epidermal Langerhans cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 2013. 210(12): p. 2597-2610.

Ying, Y., ve ark., Requirement of *Bmp8b* for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Molecular endocrinology*, 2000. 14(7): p. 1053-1063.

Yoon, B.S., ve ark., *Bmpr1a* and *Bmpr1b* have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005. 102(14): p. 5062- 5067.

Yoon, B.S., ve ark., BMPs regulate multiple aspects of growth-plate chondrogenesis through opposing actions on FGF pathways. 2006.

Yoshimatsu, Y., ve ark., Bone morphogenetic protein-9 inhibits lymphatic vessel formation via activin receptor-like kinase 1 during development and cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(47): p. 18940-18945.

Zaidi, S.H., ve ark., Growth differentiation factor 5 regulates cardiac repair after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 2010. 55(2): p. 135-143.

Zhao, G.Q., Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *genesis*, 2003. 35(1): p. 43- 56.

Zhao, G.-Q., ve ark., The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes & development*, 1996. 10(13): p. 1657- 1669.

Zhao, G.-Q., L. Liaw, and B.L. Hogan, Bone morphogenetic protein 8A plays a role in the maintenance of spermatogenesis and the integrity of the epididymis. *Development*, 1998. 125(6): p. 1103-1112.

Zhou, J., ve ark., AQP5 regulates the proliferation and differentiation of epidermal stem cells in skin aging. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2020. 53: p. e10009.

Zimmerman, L.B., J.M. De Jesus-Escobar, and R.M. Harland, The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell*, 1996. 86(4): p. 599-606.

## **EKLER**

**EK - 1** : Kurum İzni Onayı

**EK - 2** : Etik Kurul Onayı

**EK - 3** : İntihal Raporu

**EK - 4** : Özgeçmiş



## **EK - 1 : KURUM İZİNİ ONAYI**

### **İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU BAŞKANLIĞINA**

Tarih :09.05.2024

FARID MAMMADLI isimli araştırmacının "Damar Yaşlanması ve Hasarında *BMP2* (Bone Morphogenetic Protein 2) Geninin Katkısının Transkripsiyon Aşamasında Araştırılması" adlı çalışmasını İstinye Üniversitesi'nde da araştırmaya dahil edilecek kişilere uygulanması uygundur.

**Kurum yetkililerine ait kaşe ve imzalar**

## EK-2: ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ  
İNSAN ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU

|  |            |                         |         |                     |       |
|--|------------|-------------------------|---------|---------------------|-------|
| <b>Araştırmanın Başlığı:</b> Damar Yaşlanması ve hasarında BMP2 geninin katkısının transkripsiyon aşamasında araştırılması |            |                         |         |                     |       |
| <b>Proje Danışmanı:</b> Prof. Dr. Veysel Sabri Hançer  |            |                         |         |                     |       |
| <b>Sorumlu Araştırmacı:</b> Farid Mammadlı   |            |                         |         |                     |       |
| <b>Yardımcı Araştırmacı:</b> -   |            |                         |         |                     |       |
| <b>Toplantı Tarihi:</b>  | 31.05.2024 | <b>Toplantı Sayısı:</b> | 2024/04 | <b>Protokol No:</b> | 24-91 |

### SONUÇ

|   |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Uygun                                     |
| <input type="checkbox"/> Düzeltme gereklidir:                                 |
| <input type="checkbox"/> Görevsizdir; Gerekçe, Görüş, Tavsiye ve Açıklamalar: |

Başvuruda bulunduğunuz başvuru dosyası ve ilgili belgeleri İstinye Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiştir

### EK-3: İNTİHAL RAPORU

%**25** EN  
BENZERLİK ENDEKSİ

%**21**  
İNTERNET KAYNAKLARI

%**24**  
YAYINLAR

%**9**  
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

#### BİRİNCİL KAYNAKLAR

|          |   |             |
|----------|---|-------------|
| <b>1</b> | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a><br>İnternet Kaynağı  | % <b>11</b> |
| <b>2</b> | <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a><br>İnternet Kaynağı  | % <b>3</b>  |
| <b>3</b> | Rosen, V.. "BMP2 signaling in bone development and repair", Cytokine and Growth Factor Reviews, 200910/12<br>Yayın  | % <b>2</b>  |
| <b>4</b> | Submitted to University of Kufa<br>Öğrenci Ödevi  | % <b>1</b>  |
| <b>5</b> | Nadia R. Sutton, Rajeev Malhotra, Cynthia St. Hilaire, Elena Aikawa et al. "Molecular Mechanisms of Vascular Health: Insights From Vascular Aging and Calcification", Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2023<br>Yayın | % <b>1</b>  |
| <b>6</b> | <a href="http://www.karger.com">www.karger.com</a><br>İnternet Kaynağı  | % <b>1</b>  |

## EK-6: ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı: FARID MAMMADLI

Yabancı dil bilgisi: İngilizce, Rusca

Telefon No:

Mail Adresi:

Doğum tarihi ve yeri.

Eğitimi: Bakü Devlet Üniversitesi (Lisans) – Biyoloji

